

Aus dem Anatomischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUM
EINFLUSS DES PROINFLAMMATORISCHEN
ZYTOKINS INTERLEUKIN-1 AUF HYALINEN
GELENKNORPEL UND FASERKNORPEL DES
MENISKUS IM RINDERMODELL**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
JONAS CONRAD
aus Hamburg

Kiel, 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Kurz, Anatomisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Hassenpflug, Klinik für Orthopädie
Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2014
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 15.07.2014

gez.: Prof. Dr. J. Roider
(Vorsitzender des Promotionsausschusses)

**In großer Dankbarkeit meinen Eltern
Waltraut und Detlef Conrad
gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Anatomische und funktionelle Grundlagen zum Kniegelenk	2
1.2.1 Makroskopische Anatomie und Funktion des Kniegelenkes und der Menisken	2
1.2.2 Histologie des hyalinen Gelenkknorpels im Kniegelenk	4
1.2.3 Histologie des Meniskusgewebes	5
1.3 Interleukin-1 assoziierte, degenerative Gelenkerkrankungen.....	7
1.3.1 Osteoarthrose	7
1.3.2 Rheumatoide Arthritis.....	8
1.4 Einfluss von Interleukin-1 auf matrixabbauende Proteasen im Gelenkknorpel und Meniskusgewebe	9
1.4.1 Interleukin-1	9
1.4.2 Stickstoffmonoxid (NO) als Bestandteil der IL-1 Signalkaskade.....	11
1.4.3 Aufbau und Funktion der Matrixmetalloproteasen.....	12
1.4.4 Aufbau und Funktion von ADAMTS-4 (Aggrecanase 1).....	14
1.5 Fragestellung	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.2 Materialien und Laborgeräte	20
2.3 Gewebeherkunft und -isolierung	22
2.4 Kultivierung von Meniskus- und Gelenkknorpelimplantaten	24
2.5 Quantifizierung der sulfatierten Glykosaminoglykane im Kulturüberstand..	25
2.6 Quantifizierung von Stickstoffmonoxid (NO) im Überstand	25
2.7 Quantifizierung von Hydroxyprolin im Überstand	26
2.8 Histologische Untersuchungen.....	28
2.8.1 Aufbereitung der Gewebeimplantate für die Histologie	28

2.8.2	Färbung von Gewebeschnitten mit Toluidinblau	28
2.8.3	Färbung von Gewebeschnitten mit Mayer's Hämalaun-Lösung.....	29
2.8.4	Immunhistochemische Untersuchung von Gewebeschnitten.....	30
2.8.5	Der lichtmikroskopische Nachweis von apoptotischen Prozessen.....	31
2.9	Untersuchungen zur Genexpression von Matrixproteinen und matrixdegradierenden Enzymen auf mRNA-Ebene	31
2.9.1	RNA-Isolierung aus Gewebeexplantaten	31
2.9.2	Quantifizierung der isolierten RNA-Menge.....	33
2.9.3	Durchführung der SYBR [®] Green Real-time RT-PCR.....	33
2.9.4	Auswertung und Darstellung der Real-time RT-PCR Daten.....	36
2.10	Untersuchungen zur Genexpression von matrixdegradierenden Enzymen auf Proteinebene.....	38
2.10.1	Zymografische Analysen mit SDS-Polyacrylamidgelen mit Casein....	38
2.10.2	Zymografische Analysen mit SDS-Polyacrylamidgelen mit Gelatine..	39
2.11	Statistische Auswertung	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Histologische Untersuchungen.....	42
3.1.1	Allgemeine lichtmikroskopische Histologie.....	42
3.1.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf apoptotische Prozesse im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe.....	46
3.2	Einfluss von IL-1 auf den GAG-Verlust.....	49
3.3	Histochemische Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf die Aggrecanase-Aktivität im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe.....	50
3.4	Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion im Gewebe	53
3.5	Einfluss von IL-1 auf den Gehalt von Hydroxyprolin im Kulturüberstand....	54
3.6	Zymografische Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf die Expression von Matrixmetalloproteasen in den Gewebeproben auf Proteinebene.....	55
3.7	Einfluss von IL-1 auf die Transkription von matrixdegradierenden Enzymen und deren Substraten	57
4	Diskussion	64
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis	78
7	Danksagungen	84
8	Lebenslauf.....	85

Abkürzungsverzeichnis

Δ	delta
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ mol	Mikromol
Abb.	Abbildung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Motifs
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BSS	Buffering Salt Solution
bzw.	beziehungsweise
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
C _T	Threshold Cycle
dest	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblauschlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethyldiamintetraacetatessigsäure
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
et al.	et alii
FG	Feuchtgewicht
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSJ	Freiwilliges Soziales Jahr

G	Gramm
G	Gravitationskonstante
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H	Stunden
HBSS	Hank's Buffering Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
IL-1	Interleukin-1
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1r-AcP	Interleukin-1Rezeptor Accessory Protein
IL-1RI	Interleukin-1-Rezeptor Typ I
IL-1RII	Interleukin-1-Rezeptor Typ II
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS, (c/e/i/n)NOS	(konstitutive/endotheliale/induzierbare/neuronale) NO-Synthase
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NTC	No Template Control
OA	Osteoarthrose
OD	Optische Dichte
P	Irrtumswahrscheinlichkeit

PBS	Phosphate-buffered Saline
pDMBA	p-Dimethylaminobenzaldehyd
PG	Proteoglykan
pH	pH-Wert
PTFE	Polytetrafluorethylen
RA	rheumatoide Arthritis
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SF	Standardfehler
sGAG	sulfatierte Glykosaminoglykane
sog.	so genannt
SYSADOA	Symptomatic Slow Acting Drugs in Osteoarthritis
T	Tage
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteases
T_m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	atomare Masseneinheit
v/v	Volumen / Volumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w/v	Gewicht / Volumen
α	alpha
β	beta
λ	lambda

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Übersicht über die Anatomie des rechten Kniegelenkes (A) und des Tibiaplateaus mit aufliegenden Menisken (B) (Quelle: Schünke et al. 2011).....	3
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Kollagenfaserstruktur im Meniskus nach rasterelektronenmikroskopischen Befunden (Quelle: Petersen et al. 1999)	6
Abb. 2.1 Ablauf der Gewebegewinnung	23
Abb. 3.1 Lichtmikroskopische Darstellung eines Meniskusexplantates (Toluidinblau-Färbung).....	43
Abb. 3.2 Lichtmikroskopische Darstellung eines Gelenkknorpelxplantates (Toluidinblau-Färbung)	45
Abb. 3.3 Lichtmikroskopische Darstellung von Beispielen normaler, kondensierter und im Prozess des Kernblebbings befindlicher Zellkerne im Gelenkknorpel- und Meniskusgewebe (Färbung mit Mayer's Hämalaun-Lösung).....	46
Abb. 3.4 Einfluss von IL-1 auf apoptotische Prozesse im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe.....	47
Abb. 3.5 GAG-Verluste von Meniskus- und Gelenkknorpelxplantaten nach Stimulation mit IL-1	49
Abb. 3.6 Immunhistochemische Darstellung des Aggrekanase-spezifischen Aggrekanneoepitops NITEGE in Gelenkknorpelxplantaten	51
Abb. 3.7 Immunhistochemische Darstellung des Aggrekanase-spezifischen Aggrekanneoepitops NITEGE in Meniskusexplantaten	52
Abb. 3.8 Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion in Meniskus- und Gelenkknorpelxplantaten.....	54
Abb. 3.9 Standard-Wirkungskurve für Hydroxyprolintest.....	55
Abb. 3.10 Zymografische Analyse der Kulturüberstände von Gewebeexplantaten .	57
Abb. 3.11 C _T -Werte des Housekeeping-Gens GAPDH und dem Einfluss von IL-1 in den Gewebeproben.....	58
Abb. 3.12 CT-Werte des Housekeeping-Gens 18S rRNA und dem Einfluss von IL-1 in den Gewebeproben	59
Abb. 3.13 Einfluss von IL-1 auf die Transkription von matrixdegradierenden Enzymen.....	61

Abb. 3.14 Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Transkription von ausgewählten Matrix-Proteinen	62
Abb. 3.15 Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Transkription der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Zusammensetzung des DMEM-Kulturmediums, Versuchs- und Kontrollmediums.....	24
Tabelle 2.2 Zusammensetzung der Puffer-Lösung, Chloramin-T-Lösung und des DMBA-Reagenz.....	27
Tabelle 2.3 Schmelztemperaturen (T_m) der RT-PCR-Produkte	35
Tabelle 2.4 Schematischer Ablauf der SYBR® Green Real-time RT-PCR.....	35
Tabelle 2.5 Primer-Sequenzen für Real-time RT-PCR	36
Tabelle 2.6 Rechenschritte zur Bestimmung der Relativen Zielmenge nach Real-time RT-PCR.....	37
Tabelle 2.7 Zusammensetzung Probenpuffer, Laufpuffer, Proteolysispuffer, die Coomassie-Blau-Färbelösung und die Entfärbelösung.....	39
Tabelle 2.8 Zusammensetzung der Trenngelpuffer, Sammelgelpuffer	40
Tabelle 3.1 Kumulative Hydroxyprolinmenge in Kulturüberstand / Feuchtgewicht (ng/mg FG)	55

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

In Deutschland gehören Krankheiten des Bewegungsapparates zu den häufigsten Erkrankungen, dessen Behandlung sie zur drittteuersten Krankheitsgruppe mit hohen volkswirtschaftlichen Folgekosten macht.[1] Degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis und rheumatoide Arthritis haben hierbei einen großen Anteil. Sie führen zu jahrelangen Gelenkschmerzen und zunehmender Einschränkung der Bewegungsfreiheit, woraus starke Einbußen in der Lebensqualität resultieren. Als eines der größten und am stärksten belasteten Gelenke des menschlichen Körpers ist das Kniegelenk mit dem Meniskus häufig am stärksten von diesen Erkrankungen betroffen. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1) hat als Mediator in den frühen Phasen und der Progredienz dieser Erkrankungen einen entscheidenden Einfluss.

Zu den IL-1 vermittelten Pathomechanismen, die an der Zerstörung der Menisken beteiligt sind, ist noch wenig bekannt, obwohl bekannt ist, dass Schäden am Meniskus eine weiterführende Degeneration des Gelenkes in Richtung Osteoarthritis initiieren können. Anders verhält es sich hingegen beim Gelenkknorpelgewebe. Der Einfluss von IL-1 auf dessen Destruktion wurde in Hinblick auf degenerative Gelenkerkrankungen bereits deutlich ausführlicher beschrieben.

Es wurde daher für diese Arbeit ein Versuchsaufbau entwickelt, bei dem Gewebeproben vom Meniskus und Gelenkknorpel aus dem gleichen Gelenk und unter den gleichen Bedingungen mit IL-1 stimuliert werden. Dieser Versuchsaufbau ermöglicht einen qualitativen und quantitativen Vergleich des Einflusses von IL-1 auf die unterschiedlichen und doch ähnlichen Gewebetypen.

Die erhobenen Daten und Ergebnisse sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie von degenerativen Gelenkerkrankungen liefern, um ihnen entgegenzuwirken und die Entwicklung von verbesserten frühzeitigen Therapiekonzepten voranzutreiben.

1.2 Anatomische und funktionelle Grundlagen zum Kniegelenk

1.2.1 Makroskopische Anatomie und Funktion des Kniegelenkes und der Menisken

Im Kniegelenk artikulieren Femur, Tibia und Patella. Bei gemeinsamer Gelenkkapsel unterteilt sich das Kniegelenk in einen tibiofemuralen und einen patellofemuralen Anteil. Der patellofemorale Gelenkanteil befindet sich zwischen der in die Membrana fibrosa der Gelenkkapsel eingelagerten Patella und der Femurkondylen. Bei Bewegungen im Kniegelenk gleitet die Facies patellaris femoris bis zu 10cm an der Facies articularis patellae vorbei. Das Kniegelenk im engeren Sinne befindet sich im tibiofemuralen Anteil. Hier artikulieren der Condylus medialis und lateralis femoris sowie der Condylus medialis und lateralis tibiae. Zwei Menisken, intraartikuläre Faserknorpelscheiben, umfassen beidseits halbmondförmig die Gelenkflächen und vergrößern so die Kontaktfläche zwischen den stark konvexen Femurkondylen und der flachen, tibialen Gelenkpfanne.[2, 3] Die Oberseite der Menisken passt sich durch eine konkave Oberfläche der Konvexität der anliegenden Femurkondylen an. Die flache Unterseite der Menisken liegt dem Tibiaplateau auf. Stabilisiert wird das Gelenk unter anderem durch die Gelenkkapsel und extra- sowie intraartikuläre Bänder. Das Lig. cruciatum anterius (vorderes Kreuzband) und das Lig. cruciatum posterius (hinteres Kreuzband) bilden die intraartikulären Bänder. Zu den extraartikulären Bändern zählen das Lig. collaterale tibiale, Lig. collaterale fibulare, Lig. patellae, Lig. popliteum obliquum, Lig. popliteum arcuatum, Retinaculum patellae longitudinale mediale und laterale sowie das Retinaculum patellae transversale mediale und laterale.[2, 4]

Die im Querschnitt keilförmigen Menisken haben geringe anatomische Unterschiede. Von oben betrachtet ist der mediale Meniskus C-förmig, während der laterale Meniskus O-förmig erscheint. Durch seine Anheftung an die Gelenkkapsel und das Lig. collaterale tibiale ist der mediale Meniskus weniger beweglich als der laterale Meniskus. Dieser ist im Vergleich nicht mit dem Lig. collaterale fibulare verwachsen.[5] Zudem liegen seine medialen Befestigungen nahe beieinander, wodurch er Scherbelastungen besser ausweichen kann als der mediale Meniskus.[2] Das Vorder- und Hinterhorn sind über insertionale Bänder fest mit dem Knochen

verbunden. Diese solide Enthese ist ausschlaggebend für die Druckverteilungsfunktion der Menisken.[6]

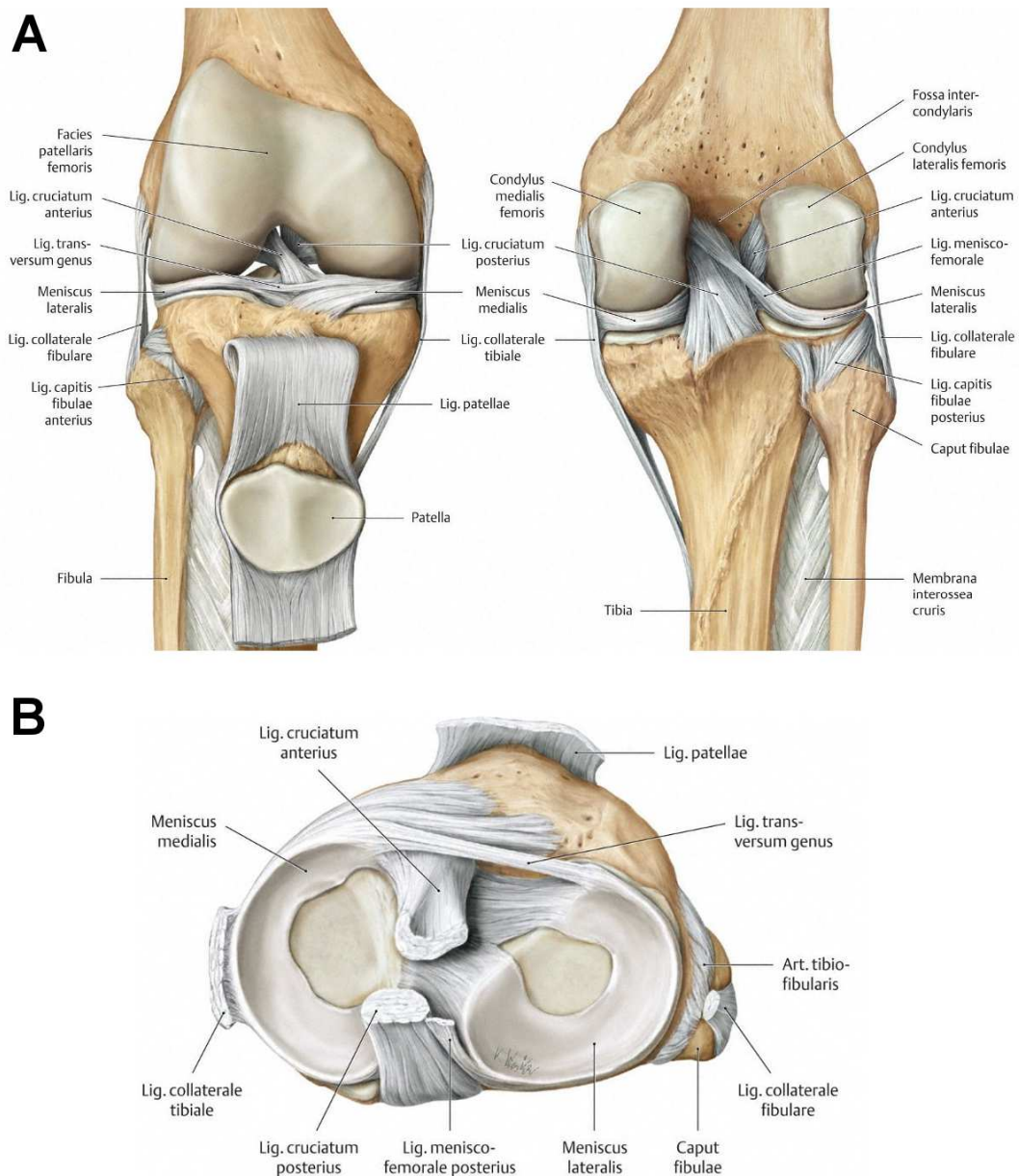


Abb. 1.1| Übersicht über die Anatomie des rechten Kniegelenkes (A) und des Tibiaplateaus mit aufliegenden Menisken (B) (Quelle: Schünke et al. 2011)

A) Ansicht eines rechten Kniegelenkes von vorne (links) mit Lig. patellae sowie Patella nach unten geklappt und von hinten.

B) Ansicht von proximal auf das rechte Tibiaplateau nach Entfernung des Femurs. Zu erkennen sind der aufliegende mediale sowie laterale Meniskus und deren Anheftungsstellen.

Die Blutversorgung der Menisken erfolgt überwiegend durch die Arteriae descendens genicularis superior, inferior medialis und lateralis. Diese bilden einen Plexus in der

Gelenkkapsel und Synovialmembran. Von hier werden die peripheren 10-30% der Menisken direkt mit Blut versorgt. Im mittleren Drittel ist die Blutversorgung sehr limitiert und das innere Drittel hat keinen Anschluss an die Blutversorgung. Die Ernährung erfolgt hier durch Diffusion und die Zirkulation der Synovialflüssigkeit.[7] Die tibiofemorale Gewichtsübertragung, Stoßabsorption und das Schmieren des Gelenkes sind die Hauptaufgabe der Menisken.[8] Im Stehen übertragen die Menisken beim Menschen 30-55% des Körpergewichtes.[9] Nach Entfernung der Menisken waren die Kontaktflächen im tibiofemorale Gelenkanteil stark reduziert und der Druck auf den tibialen Gelenkknorpel um das Zwei- bis Dreifache erhöht.[10, 11] Wasser bildet ca. 72% des Gesamtgewichtes eines Meniskus.[12] Durch Belastung wird das Wasser aus dem Meniskus herausgedrückt und verbessert als zusätzliches Gleitmittel die Bewegung der Gelenkflächen. Die hierdurch hervorgerufene Zirkulation der Synovialflüssigkeit unterstützt zudem die Ernährung des Gelenkknorpels.[8]

1.2.2 Histologie des hyalinen Gelenkknorpels im Kniegelenk

Der histologische Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels an den Kondylen des Femurs und des Tibiaplateaus sowie der feinstrukturelle Aufbau der Menisken haben einen entscheidenden Einfluss auf deren biomechanische Funktionalität und die Funktionsweise des Kniegelenkes. Hyaliner Gelenkknorpel enthält in der ungleichmäßig anfärbaren Interzellulärsubstanz (interterritoriale Extrazellulärmatrix oder Interterritorien) einzelne Knorpelzellen (Chondrozyten), die auch in isogenen Gruppen auftreten können (Chondrone oder Territorien). Die Chondrozyten sind von einer besonders basophilen Knorpelkapsel umgeben, die nur wenig kollagene Fibrillen aber reichlich basophile Proteoglykanpolymere zusammengesetzt aus den Glykosaminoglykanen Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat und Keratan-Sulfat enthält. Die territoriale Matrix ist im Vergleich zur interterritorialen Extrazellulärmatrix wesentlich stärker basophil. Die fleckenförmige Färbung der Interterritorien beruht auf einer inhomogenen Verteilung von basophilen Glykosaminoglykanen zwischen einheitlich ausgerichteten Kollagenfibrillen in der Knorpelmatrix.[13] Glykosaminoglykane (GAG) sind Ketten aus sich wiederholenden Disaccharid-

Einheiten. Sie tragen bis zu drei negative Ladungen, sind meistens sulfatiert (sGAG) und kovalent an ein Protein gebunden. In diesem Fall handelt es sich dann um Proteoglykane (PG). Sie bestehen aus einem Proteinfaden (core protein) an dem mindestens ein oder bis zu über hundert GAG-Moleküle kovalent gebunden sind.[14] Ein prädominantes PG im hyalinen Gelenkknorpel ist Aggrekan. Bis zu 100 Aggrekan-Moleküle bilden zusammen mit dem nicht sulfatierten GAG Hyaluronan große PG-Aggregate. Dabei ist jedes Aggrekan-Molekül mittels eines Verbindungsproteins (link protein) an Hyaluronan gebunden.[15] Die Aggrekan-Moleküle sind zudem mit den Kollagenfibrillen in der Extrazellulärmatrix vernetzt.[16] Aufgrund der zahlreichen, negativen Ladungen binden diese Aggregate Wasser. Durch die Vernetzung mit den Kollagenfibrillen werden die PG-Aggregate in der Extrazellulärmatrix fixiert und bilden hydratisiert ein Gel, welches die Druckelastizität des Knorpelgewebes erklärt.[17] Im hyalinen Gelenkknorpel, der im Vergleich zu anderen hyalinen Knorpelarten nicht von Perichondrium bedeckt ist, sind die Kollagenfibrillen arkadenartig angeordnet.[18] Der Anteil von Kollagen am Trockengewicht liegt bei 50-73%. Dabei ist Kollagen Typ II prädominant. GAGs bilden einen Anteil von 15-25%.[19]

1.2.3 Histologie des Meniskusgewebes

Die Menisken sind aus faserknorpeligem Gewebe zusammengesetzt. Ein gesunder Meniskus enthält 72% Wasser, 22% Kollagen, 0,12% DNA und 0,8% GAGs. Mit zunehmender Degeneration steigt der Wasser-Anteil im Meniskusgewebe und der Anteil an Kollagen und GAGs nimmt ab.[12] Der Kollagenanteil am Trockengewicht beträgt 60-70%.[19] Einlagert in den Faserknorpel finden sich Fibrochondrozyten, welche Eigenschaften der Chondrozyten und Fibrozyten tragen. Sie sind für die Produktion und den physiologischen Umbau der Extrazellulärmatrix verantwortlich.[20] In der superfiziellen Schicht des Meniskus finden sich parallel zur Oberfläche fusiforme Zellen. Die Zellen in den tieferen Schichten haben eine ovoide, polygonale Form.[21] Mikrostrukturell besteht ein Meniskus überwiegend aus Kollagen Typ I-Fasern. Diese sind prinzipiell zirkumferent angeordnet, wobei es in der mittleren Zone und an den Oberflächen auch radial ausgerichtete Fasern gibt, die

vermutlich wie eine Schelle die zirkumferenten Faser fixieren.[22] Rasterelektronenmikroskopisch lässt sich der Meniskus in drei Schichten unterteilen. Oberflächlich befindet sich ein Fibrillennetz unter dem auf der tibialen und femoralen Seite eine lamellenartig aufgebaute Schicht liegt. Es folgt der zentrale Hauptteil mit zirkulär ausgerichteten Kollagenfibrillenbündeln und radiären Fasersystemen.[23]

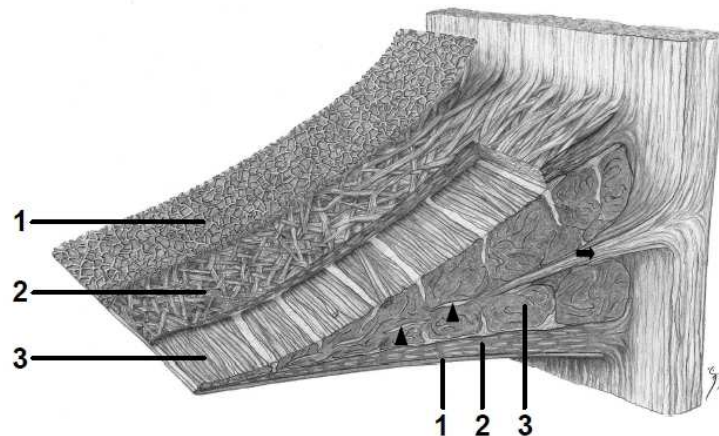


Abb. 1.2| Schematische Darstellung der Kollagenfaserstruktur im Meniskus nach rasterelektronenmikroskopischen Befunden (Quelle: Petersen et al. 1999)

Zu erkennen ist oberflächlich ein dünnes Fibrillennetzwerk (1), das eine Schicht lamellenartiger, sich überkreuzender Kollagenfaserbündel (2) bedeckt. Im zentralen Hauptteil werden zirkulär ausgerichtete Fibrillenbündel (3) durch radiäre Kollagenfibrillen (▲) schellenartig umfasst. Von der Gelenkkapsel aus dringt lockeres Bindegewebe (➔) zwischen die zirkulär verlaufenden Fibrillenbündel in den Meniskus ein.

Der Anteil von Kollagen Typ I an der gesamten Kollagenmenge im bovinen Meniskus liegt bei über 90%. Kollagen Typ II, III und V bilden den verbliebenen Kollagenanteil.[24] Die im humanen Meniskus enthaltenen PGs setzen sich aus 40% Chondroitin-6-Sulfat, 10-20% Chondroitin-4-Sulfat, 20-30% Dermatan-Sulfat und 15% Keratan-Sulfat zusammen. Die höchsten GAG-Konzentrationen wurden korrelierend mit den einwirkenden Kräften an den Hörnern und der inneren Hälfte des Meniskus nachgewiesen.[12] Aggrekan ist dabei eines der häufigsten PGs im menschlichen Meniskusgewebe.[6] Im Gegensatz zu seiner diffusen Verteilung im Gelenkknorpel zeigten Untersuchungen am Meniskus eine räumlich organisierte Verteilung von Aggrekan zwischen den Kollagenfibrillen. Die PGs haben wie im hyalinen Gelenkknorpel eine kraftverteilende Funktion.[25]

1.3 Interleukin-1 assoziierte, degenerative Gelenkerkrankungen

1.3.1 Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (OA) ist eine polyätiologische, primär nicht-entzündliche degenerative Erkrankung der Gelenkgewebe.[26] Sie gilt als die meistverbreitete Gelenkerkrankung.[27] Weltweit sind 9,6% der Männer und 18,0% der Frauen über 60 Jahre an OA erkrankt. Bis zu einem Alter von 45 Jahren sind im Durchschnitt mehr Männer betroffen, ab dem 55. Lebensjahr ist jedoch der Anteil der Frauen an den Erkrankten höher. OA kann jedes Gelenk betreffen. Allerdings entfällt hierbei ein Großteil auf die Knie- und Hüftgelenke. Bei den OA-Patienten in Europa und den USA sind bei Männern über 45 Jahre zu 14,1% und bei Frauen zu 22,8% das Kniegelenk betroffen.[28] Für OA wurden endogene und exogene Risikofaktoren aufgedeckt. Zu den endogenen Risikofaktoren zählen Alter, Geschlecht, Heredität, ethnische Abstammung und postmenopausale Veränderungen. Zu den exogenen Risikofaktoren werden Traumata sowie wiederholte Mikrotraumata, Übergewicht (BMI>30), resective Gelenk-Operationen und der Konsum von Alkohol und Tabak gezählt. Ätiologisch wird am Kniegelenk zwischen der primären/ideopathischen und der sekundären OA unterschieden. Die sekundäre OA ist polyätiologisch. Sie kann aus Traumata, genetischer Veranlagung bzw. Fehlbildungen, Fehlhaltungen (Varus- und Valgus-Stellung der Beine), Operationen, endokrinen Störungen (Akromegalie, Hyperparathyreoidismus, Hyperurikämie), Stoffwechselerkrankungen (Hämochromatose, Oochondrose, Chondrokalzinose, Rachitis) und aseptischer Osteonekrose resultieren. Die pathophysiologischen Grundlagen für die Gelenkknorpeldegeneration sind nicht ausreichend geklärt. Es wird vermutet, dass am Anfang der OA ein übermäßig schädlicher Einfluss auf den Gelenkknorpel besteht, welcher die Kompensationsmöglichkeiten des Gelenkes (z.B. durch IL-1 und TNF- α regulierten Umbau der Knorpelmatrix) übersteigt. Im Folgenden kommt es zu einer Degeneration des Gelenkknorpels, wobei vermutlich mechanische und enzymatische Faktoren die Zerstörung der Knorpelmatrix beeinflussen.[29] Die von Synovial- und Gelenkknorpelzellen produzierten proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α führen zu einer verstärkten Genexpression von matrixdegenerierenden MMPs und hemmen die Produktion von Extrazellulärmatrix.[30]

Auch aufgrund des unzureichenden Wissens über die Ätiologie und Pathogenese gibt es bis heute keine kausale Therapie für die OA. Symptomatische Therapieansätze reichen von der konservativen Therapie mit Arzneimitteltherapie und intraartikulärer Kortikosteroidinjektion über gelenkerhaltende chirurgische Therapiekonzepte bis zum Ersatz des Gelenkes durch eine Prothese.

Die Arzneimitteltherapie beinhaltet die Gabe von Analgetika, Opiode, Glukokortikoiden, SYSADOA-Präparaten (SYSADOA = Symptomatic Slow Acting Drugs in Osteoarthritis) und Anti-Zytokine.[29, 31]

1.3.2 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist ein autoimmuner, fortschreitender, destruierender Entzündungsprozess an zahlreichen Gelenken, der von Bindegewebsentzündungen an verschiedenen Organen begleitet wird.[32]

In nordeuropäischen Staaten beträgt die jährliche Anzahl der Neuerkrankungen an RA 20-300 pro 100 000 Einwohner. Dabei sind doppelt so viele Frauen als Männer betroffen. Studien aus den USA und Europa beziffern die Prävalenz der RA in den meisten Industriestaaten zwischen 0,3% bis 1%. Sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz steigen mit zunehmendem Alter an. Ab dem 70. Lebensjahr sind die Raten dann jedoch abfallend.[28]

Die Ätiologie der RA ist bis heute nicht bekannt, jedoch beinhaltet sie vermutlich biomechanische Faktoren, neuroimmunologische Interaktionen und veränderte mikrovaskuläre Bedingungen im Gelenk. Verschiedene Gene wurden in Verbindung mit der Anfälligkeit und dem Schweregrad der RA beschrieben. Die wohl wichtigste genetische Verbindung besteht zu dem HLA-DR4 Gen, welches über den Major Histocompatibility Complex (MHC) eine Rolle bei der Präsentation von Antigenfragmenten spielt. Umweltfaktoren wie insbesondere Rauchen haben auch einen Einfluss auf Entstehung, Schweregrad und Fortschreiten der Erkrankung.[33]

Die gesunde Synovialmembran der Gelenkkapsel ist eine relativ zellarme Struktur mit einer zarten synovialen Intima. Bei der RA infiltrieren CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen die Synovialmembran und organisieren sich gelegentlich in eigenständigen lymphoiden Aggregaten mit Keimzentren. Vermehrte A-Zellen und B-

Zellen führen zu einer Hyperplasie der synovialen Intima. Es kommt zu einer lokalen Expression von matrixdegradierenden Enzymen (MMPs, Serin-Proteasen und Aggrecanasen), welche die Extrazellulärmatrix im Gelenk verdauen und die artikulierenden Strukturen zerstören.[34]

Zytokine sind in jeder Phase der Pathogenese beteiligt. Sie fördern die Autoimmunreaktion, halten die chronische Entzündung der Synovialmembran aufrecht und unterstützen die Zerstörung des angrenzenden Gewebes. In den Chondrozyten zum Beispiel bewirkt IL-1 den Wechsel von der Produktion von Matrixmolekülen hin zur Aktivierung matrixdegradierender Enzyme. Stimuliert durch IL-1 produzieren A-Zellen der synovialen Intima ebenfalls matrixdegradierende Enzyme und dringen in den Knorpel ein.[33]

Die Pharmakotherapie von RA reicht von der Gabe von klassischen nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) im Frühstadium der Krankheit über Kortikosteroide bis hin zu neuen Therapiekonzepten mit monoklonalen Antikörpern, z.B. Anti-TNF (Infliximab) oder IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) Anakinra. Die operative Therapie kann Synovektomie und Gelenkersatz beinhalten.[32, 34]

1.4 Einfluss von Interleukin-1 auf matrixabbauende Proteasen im Gelenkknorpel und Meniskusgewebe

1.4.1 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) gehört als Proteohormon zur Gruppe der Zytokine, welche als interzelluläre Botenstoffe zwischen verschiedensten Zellen dienen.[35] IL-1 wird mit seinen beiden Formen IL-1 α und IL-1 β zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt, da es unter anderem durch seine Wirkung auf den Hypothalamus Fieber auslösen und in der Leber die Produktion und Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen bewirken kann.[35, 36] Die „IL-1 Genfamilie“ besteht aus IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra, einem spezifischen Rezeptorantagonisten. Die Intron-Exon-Struktur dieser drei IL-1 Gene und Gemeinsamkeiten in der Tertiärstruktur deuten auf eine Beziehung über ein ursprüngliches Urgen zu Fibroblast Growth Factor (FGF) hin. IL-

IL-1 α und IL-1 β werden als Prohormone ohne Signalpeptide in Verbindung zu den Mikrotubuli des Zytoskelettes synthetisiert. Das Molekulargewicht dieser Proformen beträgt 31 kDa. Nach Prozessierung durch spezifische zelluläre Proteasen wie die kalziumabhängige Cystein-Protease Calpain hat das reife IL-1 α ein Molekulargewicht von 17 kDa.[37] Im Gegensatz zu Pro-IL-1 β ist die Proform von IL-1 α biologisch aktiv. Ein geringer Anteil des im Zytosol befindlichen Pro-IL-1 α kann nach Anlagerung von Myristinsäure die Plasmamembran durchdringen und wird zu Membran-gebundenem IL-1. Pro-IL-1 β kann erst nach Spaltung durch das im Zytosol lokalisierte IL-1 β -Converting Enzyme zu IL-1 β die Zellmembran passieren.[38, 39] Durch Zelltod freigesetztes Pro-IL-1 α kann auch durch extrazelluläre Proteasen gespalten werden. Es gibt zwei verschiedene IL-1 Rezeptoren: Der Typ I Rezeptor (IL-1RI) vermittelt nach Bindung von IL-1 α oder IL-1 β eine Signalübertragung, die vermutlich durch die Komplexbildung des Rezeptors mit dem IL-1R Accessory Protein (IL-1r-AcP) initiiert wird. Der Typ II Rezeptor (IL-1RII) überträgt kein Signal und wird daher auch als decoy (engl.: Falle, Köder) für IL-1 β bezeichnet. Es existieren lösliche Formen dieser Rezeptoren IL-1sRI/IL-1sRII im Extrazellulärraum, die als natürliche Puffer IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra binden können.[37]

Die Synthese von IL-1 wurde inzwischen in einer Vielzahl von Zelltypen nachgewiesen. Hierzu gehören unter anderem Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und Chondrozyten.[38] IL-1 beeinflusst stark die Regulierung der Immunabwehr und spielt als proinflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Krankheiten. Hierzu zählen auch degenerativ-entzündliche Gelenkerkrankungen.[40] Unter anderem wurde IL-1 in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen und bei der intraartikulären Injektion von IL-1 in die Kniegelenke von Mäusen wurde eine verstärkte Leukozyteninfiltration, ein Anstieg des Proteoglykan-Abbaus und eine verminderte Synthese von Proteoglykanen beschrieben.[41, 42] Auch bei Patienten mit Osteoarthrose konnte in der Synovia IL-1 nachgewiesen werden.[43] Sowohl IL-1 als auch IL-1Ra als natürlicher Antagonist wurden in Synovialozyten von RA und OA Patienten detektiert. Jedoch war die Menge an IL-1Ra zu gering, um die biologische Wirkung von IL-1 zu unterdrücken.[44]

1.4.2 Stickstoffmonoxid (NO) als Bestandteil der IL-1 Signalkaskade

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges, freies Radikal, das aus molekularem Sauerstoff und dem Guanin-Stickstoff von Arginin durch die NO-Synthase (NOS) synthetisiert wird. Im menschlichen Körper dient NO als Mediator für verschiedenste physiologische und pathophysiologische Prozesse. Begründet durch seine Reaktionsfreudigkeit hat NO nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden und wirkt daher als auto- bzw. parakriner Mediator. Es reagiert im Gewebe unter anderem zu Nitrat (NO_3^-), Nitrit (NO_2^-) und Peroxinitrit (ONOO^-) [45, 46] NO ist sowohl wasser- als auch lipidlöslich und kann daher die Zellmembran durch Diffusion passieren.[47]

Von der NO-Synthase (NOS) sind drei Isoformen bekannt, die durch jeweils ein bestimmtes Gen kodiert werden. Dies sind: Die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1), die induzierbare NOS (iNOS, NOS2) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS3). Diese drei Isoformen werden zu zwei NOS-Typen zusammengefasst: Die konstitutive NO-Synthasen (cNOS), zu der die nNOS und die eNOS zählen. Sie sind kalziumabhängig und permanent vorhanden. Die induzierbare NOS (iNOS) im Gegensatz ist kalziumunabhängig und wird nur nach Zytokin-Stimulation exprimiert.[48] Die Aktivität der NO-Synthase wird durch negative Rückkopplung auf Proteinebene durch das zuvor produzierte NO gehemmt.[49]

Eine erhöhte NO-Produktion konnte bei Patienten mit Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis in der Synovialflüssigkeit, dem Serum und Urin nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung von NO bei der Pathogenese dieser Krankheiten hinweist.[50–54] Der Gelenkknorpel scheint bei OA-Patienten der wesentliche Produzent für iNOS-generiertes NO im Gelenk zu sein. Immunologische Untersuchungen zeigten eine hohe Expression von iNOS im Gelenkknorpel verglichen zu einer kleinen bis nicht vorhandenen Expression in der Synovialmembran.[55]

Experimental konnte nachgewiesen werden, dass NO bei der IL-1 induzierten Degeneration von Gelenkknorpel und Meniskus mit der IL-1 Signalkaskade assoziiert ist. Nach der Stimulation mit IL-1 konnte in Meniskusexplantaten in vitro eine erhöhte Menge an NO festgestellt werden. NO unterdrückte dabei die Kollagen- und Proteoglykan-Synthese, hatte jedoch auch einen protektiven Effekt auf den Proteoglykan-Abbau im Meniskus.[56, 57] Auch bei mit IL-1 stimulierten Chondrozyten konnte eine erhöhte NO-Freisetzung gemessen werden.[58]

Versuche mit Chondrozyten der gleichen Spezies lassen darüber hinaus vermuten, dass die durch IL-1 hervorgerufene Hemmung der Kollagen-Synthese auf Proteinebene durch NO vermittelt wird.[59] Im humanen und bovinen Gelenkknorpel konnte mittels eines kompetitiven NO-Synthase-Inhibitors und exogen zugeführten NOs nachgewiesen werden, dass endogenes NO bei der durch IL-1 stimulierten Aktivierung von MMPs (Kollagenase und Stromelysin) in Chondrozyten und Gelenkknorpel regulativ wirkt.[60]

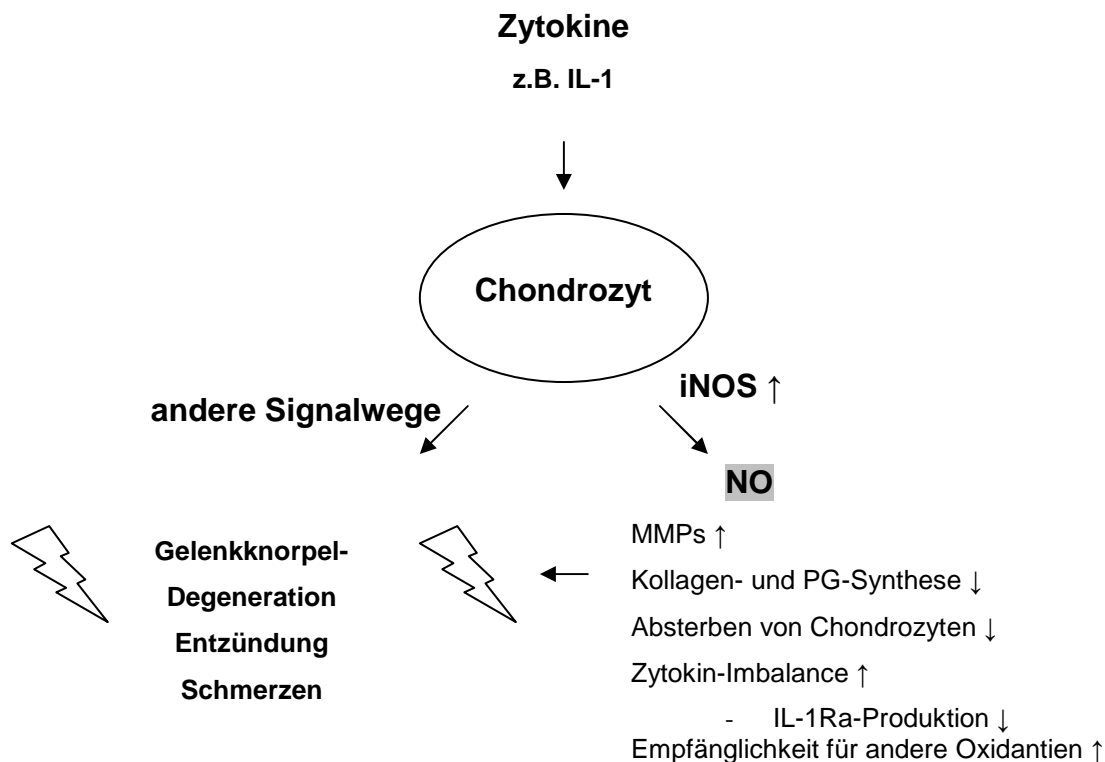


Abb. 1.3| Schematische Darstellung der Effekte von NO im Gelenkknorpel bei Osteoarthrose (modifiziert nach Voulteenaho et al. 2007)

1.4.3 Aufbau und Funktion der Matrixmetalloproteasen

Die zinkabhängigen MMPs (Matrixmetalloproteasen) sind extrazelluläre, multidomäne Endopeptidasen, die Matrixbestandteile und weitere Proteine spalten

und abbauen. Sie haben eine wichtige Aufgabe bei der Morphogenese, Wundheilung, Geweberegeneration bzw. -umbau nach einer Verletzung und in der Progression von Krankheiten wie Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis und invasiven Tumoren sowie deren Metastasierung.[61, 62] Im Menschen wurden 23 MMPs identifiziert. Diese werden in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und Membrane-type MMPs unterteilt, wobei jedoch sieben MMPs in dieser Einteilung nicht erfasst sind.[62] In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von MMP-1, -2, -3, -9 und MMP-13 untersucht. MMP-1 und MMP-13 zählen zu den Kollagenasen und zerteilen neben Kollagen Typ I, II, III auch andere Matrix-Proteine.[63] Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 spalten denaturiertes Kollagen und Gelatine. MMP-2 kann neben dem auch Kollagen Typ I, II, III, IV spalten.[64] MMP-3 (Stromelysin-1) zerlegt Fibronectin, Decorin und E-Cadherin und ist an der enzymatischen Aktivierung einiger pro-MMPs wie z.B. pro-MMP-1 beteiligt.[62, 63, 65] Alle MMPs werden mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Diese wird beim Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum abgespalten und es resultiert das inaktive Proenzym. Nach dem Transport zur Zelloberfläche werden die MMPs aktiviert und verbleiben entweder gebunden an die Zellmembran oder werden in den Extrazellulärraum freigegeben. Alle humanen pro-MMPs tragen ein ca. 80 Aminosäuren langes Signalpeptid gefolgt von der charakteristischen, ca. 175 Aminosäuren langen katalytischen Domäne. Diese enthält bei MMP-2 und MMP-9 zusätzliche Fibronectin-II-Domänen.[66] Hinzu kommen in einigen Fällen noch eine Linker-Sequenz und eine Hämopexin-ähnliche Domäne. Die katalytische Domäne aller MMPs hat als aktives Zentrum eine flache Spalte, die in die frontale Oberfläche gekerbt ist und eine Unterteilung in eine größere, obere sowie eine kleinere, untere Subdomäne erlaubt. Jeweils zwei essentielle Zink- und Kalzium-Ionen sind in der katalytischen Domäne gebunden.[67, 68] Die Aktivität der MMPs wird überwiegend durch zwei endogene Inhibitoren reguliert: α_2 -Makroglobulin und TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Das Glykoprotein α_2 -Makroglobulin deaktiviert die MMPs durch Aufnahme in das Makroglobulin. Anschließend wird der Komplex durch Rezeptor-vermittelte Endozytose abgebaut. Die 184-194 Aminosäuren umfassenden TIMPs können alle MMPs und teilweise auch ADAM-Metalloproteasen (A Disintegrin And Metalloprotease) sowie ADAMTS-Metalloproteasen (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Motifs) inhibieren.[62] Sie bilden mit den MMPs einen non-kovalenten 1:1-Komplex. Mit seiner keilförmigen Struktur blockiert

TIMP-1 beispielsweise einen Großteil der katalytischen Domäne von MMP-3. Die Amino- und Carboxylgruppe des N-terminalen Cysteins bilden eine Chelatkomplex mit dem katalytischen Zink und verdrängen das dort gebundene Wassermolekül.[69] Ein kontrolliertes Gleichgewicht aus MMPs und deren Inhibitoren regelt die physiologischen Funktionen der MMPs. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass MMPs nicht für die embryonale Entwicklung von Blutgefäßen und Knochen benötigt werden, jedoch sind sie Voraussetzung für die postnatale Entwicklung und dem damit verbundenen Gewebeumbau. Ergebnisse von Untersuchungen am Menschen sprechen für eine entscheidende Rolle der MMPs bei der postnatalen Gewebeentwicklung, dem physiologischen Gewebeumbau und dem Gewebeumbau bzw. der Gewebereparation in Folge von Verletzung, Krankheit oder Infektion.[70] Neben ihren physiologischen Aufgaben können die MMPs auch in pathologischen Prozessen beteiligt sein. Unter anderem wird ihnen eine Schlüsselrolle bei der Degeneration von Gelenkknorpel zugeschrieben, wie sie bei der rheumatoiden Arthritis und Osteoarthritis zu beobachten ist. Verschiedene Studien haben beispielsweise gezeigt, dass im Serum und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA die Menge an MMP-2 und MMP-9 erhöht ist.[71, 72]

Zymografische Analysen an in vitro kultivierten Chondrozyten konnten eine Produktion von Gelatinasen hervorgerufen durch die Stimulation mit IL-1 zeigen.[73] Am bovinen Gelenkknorpel wurde auch eine 2- bis 3-fach gesteigerte IL-1-induzierte mRNA-Expression von MMP-3 und MMP-13 aufgezeigt.[74] Lemke, Sandy et al. konnten mittels zymografischen Analysen mit Gelatine und Casein als Substrat die Produktion von pro-MMP-2 und pro-MMP-3 in mit IL-1 stimulierten Meniskusexplantaten nachweisen. Zudem wurde nach dreitägiger Kultivierung eine gesteigerte IL-1-abhängige mRNA-Expression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 beschrieben.[75]

1.4.4 Aufbau und Funktion von ADAMTS-4 (Aggrecanase 1)

Die 19 ADAMTS-Enzyme sind eine Gruppe von sezernierten Metalloendopeptidasen, die strukturell Ähnlichkeiten mit den ADAM-Peptidasen und den Matrixmetalloproteasen aufweisen. ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 spalten Aggrecan

an der Schnittstelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴[76] und wurden daher als Aggrekanasen bezeichnet. ADAMTS-4 (Aggrekanase 1) spaltet neben Aggrekan auch die Proteoglykane Versican, Brevican, Fibromodulin, Decorin und COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein)[77] ADAMTS-4 und ADAMTS-5 wurden bei Osteoarthrose als verantwortlich für die Spaltung von Aggrekan identifiziert.[78]

Beim Menschen kodieren 19 Gene für die ADAMTS-Enzyme. Diese werden initial als inaktive Prä-Proenzyme synthetisiert. In ihrem gemeinsamen Aufbau vom N- zum C-Terminus bestehen sie aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne, einer zinkbindenden katalytischen Domäne wie die der Metalloproteasen mit einem Methionin-Rest, einer Sequenz, die den in einigen Schlangengiften enthaltenden Disintegrinen ähnelt, einer Thrombospondin-1-ähnlichen Peptidabfolge (TS), einer Cystein-reichen Domäne und einem Platzhaltersequenz von variabler Länge. Nach letzterer folgen bei einigen ADAMTS-Enzymen noch weitere C-terminale Module. Cotranslational kommt es zur Abspaltung des Signalpeptids und nachfolgend zur Entfernung der Pro-Domäne, bevor die Enzyme sezerniert werden. Extrazellulär spalten die ADAMTS-Enzyme neben Aggrekan und einigen weiteren Proteoglykanen auch Prokollagen, den von Willebrand-Faktor und sie inhibieren die VEGF-induzierte Angiogenese.[79]

ADAMTS-4 spaltet Aggrekan an der für die Aggrekanasen spezifischen Schnittstelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ sowie an vier weiteren Schnittstellen zwischen der G2- und G3-Domäne. Dabei ist die enzymatische Spaltung an diesen vier Schnittstellen effizienter als an der erstgenannten Schnittstelle.[80] Das in dieser Arbeit untersuchte G1-NITEGE-Spaltprodukt entsteht durch die enzymatische Teilung von Aggrekan zwischen den Aminosäuren Glu³⁷³-Ala³⁷⁴. [81]

TIMP-3 ist ein potenter Inhibitor von ADAMTS-4 und ADAMTS-5.[82] In vitro konnte nachgewiesen werden, dass auch bestimmte Catechingallat-Ester, welche in hohen Konzentrationen in grünem Tee enthalten sind, die Aggrekan-Spaltung durch ADAMTS-1, -4, -5 selektiv unterbinden.[83]

Die Regulation der ADAMTS-Genexpression ist in großen Teilen noch ungeklärt, obwohl es Hinweise gibt, dass einige durch Wachstumsfaktoren, Hormone und proinflammatorische Zytokine beeinflusst werden.[79]

Tortorella et al. konnte am bovinen Gelenkknorpel zeigen, dass die IL-1 induzierte Freisetzung von Aggrekan-Spaltfragmenten in Zusammenhang mit der Spaltung von Aggrekan durch ADAMTS-4 und -5 steht. In Gelenkknorpel wurde sowohl ADAMTS-

4 als auch ADAMTS-5 exprimiert. Dabei war die Expression von ADAMTS-5 konstitutiv und die von ADAMTS-4 durch IL-1 induzierbar. Durch Immunodepletion dieser beiden Enzyme konnte ihr Anteil an der Aggrecanase-Aktivität mit zusammen ca. 90% beziffert werden.[84]

In mit IL-1 stimulierten bovinen Nasen- und Gelenkknorpel konnte eine Aktivitätssteigerung von ADAMTS-4 nachgewiesen werden, wobei jedoch die Menge an ADAMTS-4 unverändert blieb.[85] Wilson, Vanderploeg et al. konnten G1-NITEGE Spaltfragment in frisch isolierten Meniskusexplantaten von jungen Rindern nachweisen. Nach Stimulation dieser Explantate mit IL-1 wurde eine verstärkte Akkumulation an G1-NITEGE Spaltfragmenten in der inneren und mittleren Schicht der untersuchten Menisken festgestellt.[86] An Faserknorpel-explantaten von bovinen Menisken konnten Lemke, Sandy et al. zeigen, dass ADAMTS-4 in vivo konstitutiv exprimiert wird. Nach Stimulation dieser Meniskusexplantate in vitro mit IL-1 konnte eine erhöhte GAG-Freisetzung und eine gesteigerte Expression und Menge von ADAMTS-4 nachgewiesen werden. Der GAG-Verlust wurde dabei auf die Aktivität der Aggrecanasen zurückgeführt.[87] Patwari, Gao et al. zeigten am bovinen Gelenkknorpel nach sechstägiger Kultivierung eine gesteigerte IL-1-abhängige ADAMTS-4 Produktion und mRNA-Expression.[88]

1.5 Fragestellung

Um ein besseres Verständnis von den biochemischen und zellbiologischen Pathomechanismen von degenerativen Gelenkerkrankungen wie Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis zu erlangen, ist es notwendig, die Rolle von IL-1 bei der hiermit verbundenen Destruktion der Menisken und des Gelenkknorpels weitergehend zu untersuchen.

Hierzu wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ein in vitro-Modell entwickelt, mit dem eine frühe Entzündungsphase im Meniskusgewebe und Gelenkknorpelgewebe simuliert werden kann.[87] Untersuchungen an Meniskusexplantaten über eine Dauer von 3 Tagen belegten den destruktiven Einfluss von IL-1 auf das Gewebe und eröffneten Fragestellungen im Hinblick auf eine längere Stimulationsdauer sowie eine

vergleichende Quantifizierung der beobachteten Effekte am Meniskus gegenüber dem Gelenkknorpel im gleichen Gelenk. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Arbeit das in vitro-Modell an Explantaten vom Meniskus und benachbarten Gelenkknorpel der Femurkondylen über eine Dauer von 3 sowie 10 Tagen angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem im Hinblick auf Untersuchungen zum Kollagenabbau im Gewebe durch matrixdegradierende Enzyme in der Arbeitsgruppe eine Untersuchungsmethode eingeführt, mit Hilfe derer Hydroxyprolin als Indikator für Kollagenfragmente im Kulturüberstand nachgewiesen werden kann.

Die Untersuchungen des Einflusses von IL-1 auf die beiden Gewebetypen erfolgen mit der Absicht auf weiterführende Erkenntnisse zu folgenden speziellen Fragestellungen:

- Welchen Einfluss hat IL-1 in den beiden Gewebetypen auf den Verlust von Glykosaminoglykanen (GAG) und die NO-Produktion bei Stimulierung des Gewebes über einen Zeitraum bis zu 10 Tage?
- Welche morphologischen Veränderungen im Gewebe (Immunhistochemische Untersuchungen zum Aggrecan-Abbau) und der Zellen (Histologische Untersuchungen zu apoptotischen Prozessen) werden durch die Stimulation hervorgerufen?
- Lassen sich in den Kulturüberständen Anzeichen für einen IL-1-induzierten Abbau von Kollagen im Gewebe nachweisen?
- Welche Auswirkungen hat die Stimulation mit IL-1 auf die Expression der für den Gewebeabbau bekannten Enzyme MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-4 sowie deren Substrate Kollagen II und Aggrecan im zeitlichen Verlauf?
- Welche MMPs lassen sich im Verlauf der Stimulation mittels zymografischer Untersuchungsmethoden in den Kulturüberständen nachweisen?

Der Versuchsaufbau wurde so konzipiert, dass bei Untersuchung dieser Fragestellungen sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen den beiden Gewebetypen verglichen werden konnten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
1,9-Dimethylmethylenblausäurechlorid (DMMB)	Polysciences
4-(Dimethylamino)benzaldehyd	Sigma-Aldrich
Acrylamid	Sigma-Aldrich
AK: Alexa Fluor 488 [®] Goat Anti-rabbit SFX Kit	Invitrogen
AK: Anti-Aggreccan Neo rabbit	Dianova
Antibiotic/Antimycotic	PAA Laboratories
Antikörper Verdünnung Lösung	Invitrogen
Antikörper-Verdünnungslösung	Dako
APS	Pharmacia Biotech
Aqua dest.	
Bisbenzimid	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Promega
CaCl ₂	Merck
Chloramin-T-Hydrat	Sigma-Aldrich
Chloroform	
Chondroitin-C-Sulfat	Sigma-Aldrich
Citronensäure	Roth
Coomassieblau	Serva
DePeX [®]	Serva
Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Borax)	Merck
Dulbecco's MEM	Biochrom AG
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories
EDTA	Fluka
Eisessig	Roth
Ethanol	Merck
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako
Gelatine	Merck

Glycin	Roth
Griess Reagent	Sigma-Aldrich
Hank's BSS	PAA Laboratories
HCL	Merck
HEPES Buffer Solution (1M)	PAA Laboratories
Isopropanol	Merck
Isopropylalkohol	
ITS Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Methylbenzoat	Merck
Na ₂ EDTA	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Roth
NaOH	Merck
Natriumacetat Anhydrat/wasserfrei	Merck
Natriumacetat Trihydrat	Sigma-Aldrich
Natriumnitrit	Merck
n-Propanol	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast [®]	Roth
Perchlorsäure	Sigma-Aldrich
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Prolin	
Pyronin G	Merck
QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit	Qiagen
Ready Gel Zymogramm Gel, 12% Casein	Bio-Rad
Recombinant Human IL-1 α /IL-1F1	R&D Systems
RQ1 DNase	Promega
RQ1 DNase 10x Reaktionspuffer	Promega
RQ1 DNase Stop Solution	Promega
SDS	Serva
Sodium Pyruvat Solution (100mM)	PAA Laboratories
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas

TEMED	Sigma-Aldrich
Toluidinblau	Sigma-Aldrich
trans-4-Hydroxy-L-prolin	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Tris HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizol	
Tween-20	Roth
Vitamin C	Sigma-Aldrich
Xylol	Roth
Zymogram Sample Buffer	BioRad

2.2 Materialien und Laborgeräte

Produkt	Hersteller
24-Well-Platte	Sarstedt
96-Well-Platte	Sarstedt
ABI Prism 7000	Applied Biosystems
Adhäsions-Objektträger	Histobond
ApoTom	Zeiss
AxioCam MRm	Zeiss
Axioskop	Zeiss
Axiovert 200M	Zeiss
Biopsiestanze 10mm	Arthrex
Brutschrank	Heraeus
Centrifuge 5415 R	eppendorf
Combitips plus 0,5ml	eppendorf
Combitips plus 10ml	eppendorf
Combitips plus 1ml	eppendorf
Combitips plus 2,5ml	eppendorf
Combitips plus 5ml	eppendorf
Cutfix Stainless Einmalskalpell	Aesculap
Deckgläser	Menzel-Gläser
Einmal-Küvetten 1,5ml halbmikro	Plastibrand

Einmalspritzen 10ml	Henke&Sass&Wolf
Epoch Microplate-Reader	BioTek
Gefrierschrank (-70°C)	Hereaus
Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2	Leybold-Heraeus
Hautstanze 3mm	Hebu
Kultur-Röhrchen mit Schraubverschluss	DURAN Group
Micro-Schraubröhre 2ml	Sarstedt
Microtom ,RM2165'	Leica
Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad
Multipette® plus	eppendorf
Netzanschlussgerät PowePac 200	BioRad
Objektträger	Paul Marienfeld
pH-Elektrode InLab®	Mettler-Toledo
pH-Meter MP220	Mettler-Toledo
Pipetten	eppendorf
Pipettenspitzen 1000µl&100µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 25ml&10ml	Sarstedt
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt
Röhre 13ml	Sarstedt
Röhre 15ml	Sarstedt
Rüttler 3015	GFL
Skalpellsklingen	Bayha
Spritzenfilter 0,2µm Porengröße	Sarstedt
Thermocycler, primus 96'	peqLab
Ultrospec IIE – Photometer	LKB Biochrom
Vakuum-Zentrifuge VR-1	Intermed
Vortexer REAX 2000	OMNILAB
Waage	Sautorius
Wärmeplatte	MEDAX Nagel
Wasserbad	MEDAX Nagel
Wasserbad WB 22	memmert

2.3 Gewebeherkunft und -isolierung

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben wurden aus Kniegelenken von Mast-Rindern von einem regionalen Schlachtbetrieb (VION Food Hamburg GmbH, Bad Bramstedt) gewonnen. Es handelte sich dabei um Proben von weiblichen Rindern, die älter als 12 Monate waren. Die Zerlegung der geschlachteten Tiere erfolgte bei 12°C und die Lagerung bis zur Freigabe der Proben durch den Veterinärmediziner bei 7°C.

Die Knie von am Vortag geschlachteten Rindern wurden unter keimarmen Bedingungen ins Labor transportiert und dort auf einer Reinraumwerkbank zur Gewebeprobenentnahme mit sterilen Einmalskalpellen zerlegt. Nach Eröffnung der Kniegelenkkapsel und Durchtrennung der Kreuzbänder wurden der innere und äußere Meniskus unter Abtrennung der peripheren Anheftungen herauspräpariert und zwischenzeitlich in einer HBSS-Lösung mit Antibiotikazusatz (HBSS = Hank's Buffering Salt Solution, 10.000 U/ml Penicillin G, 10mg/ml Streptomycinsulfat und 25µg/ml Amphotericin) gelagert.

Die Entnahme der Gelenkknorpelimplantate erfolgte vom medialen Rand des Condylus lateralis femoris. Hierzu wurden mit einer sterilen Hautstanze mit 3mm Durchmesser entsprechende Impressionen in den Gelenkknorpel gestanzt und die Implantate dann mit einem parallel unter der Gelenkknorpeloberfläche geführten Skalpell in gleichmäßiger Schichtstärke von ca. 1mm abgelöst. Die Gelenkknorpelimplantate wurden bis zur Weiterverarbeitung getrennt von den Menisken in einer HBSS-Lösung mit Antibiotikazusatz gelagert.

Bei der Gewinnung der Meniskusimplantate wurde ein etabliertes Verfahren verwendet, welches es ermöglicht, reproduzierbar Implantate aus definierten anatomischen Lokalisationen mit einer übereinstimmenden Geometrie herzustellen.

Hierzu wurden auf einer sterilen PTFE-Platte mit einer Stanze mit 10mm Durchmesser vier bis sechs Gewebezylinder aus den lateralen und medialen Menisken herausgetrennt. Die peripheren, vaskularisierten Anteile der Menisken wurden nicht miteinbezogen.

Mit Hilfe eines Messingzylinders mit einer runden Aussparung von 10mm im Durchmesser und 1mm Tiefe wurde von der ehemals der Tibia zugewandten, planen Unterseite der Meniskus-Zylinder eine 1mm hohe Scheibe gewonnen.

Letztendlich wurden aus diesen Scheiben mit einer Hautstanze jeweils 4 Explantate herausgestantzt, welche einen Durchmesser von 3mm und eine Höhe von 1mm aufwiesen. Dieser Arbeitsschritt erfolgte unter einer Sterilwerkbank. Die Explantate wurden anschließend kurzzeitig in einer HBSS-Lösung mit Antibiotikazusatz gelagert.

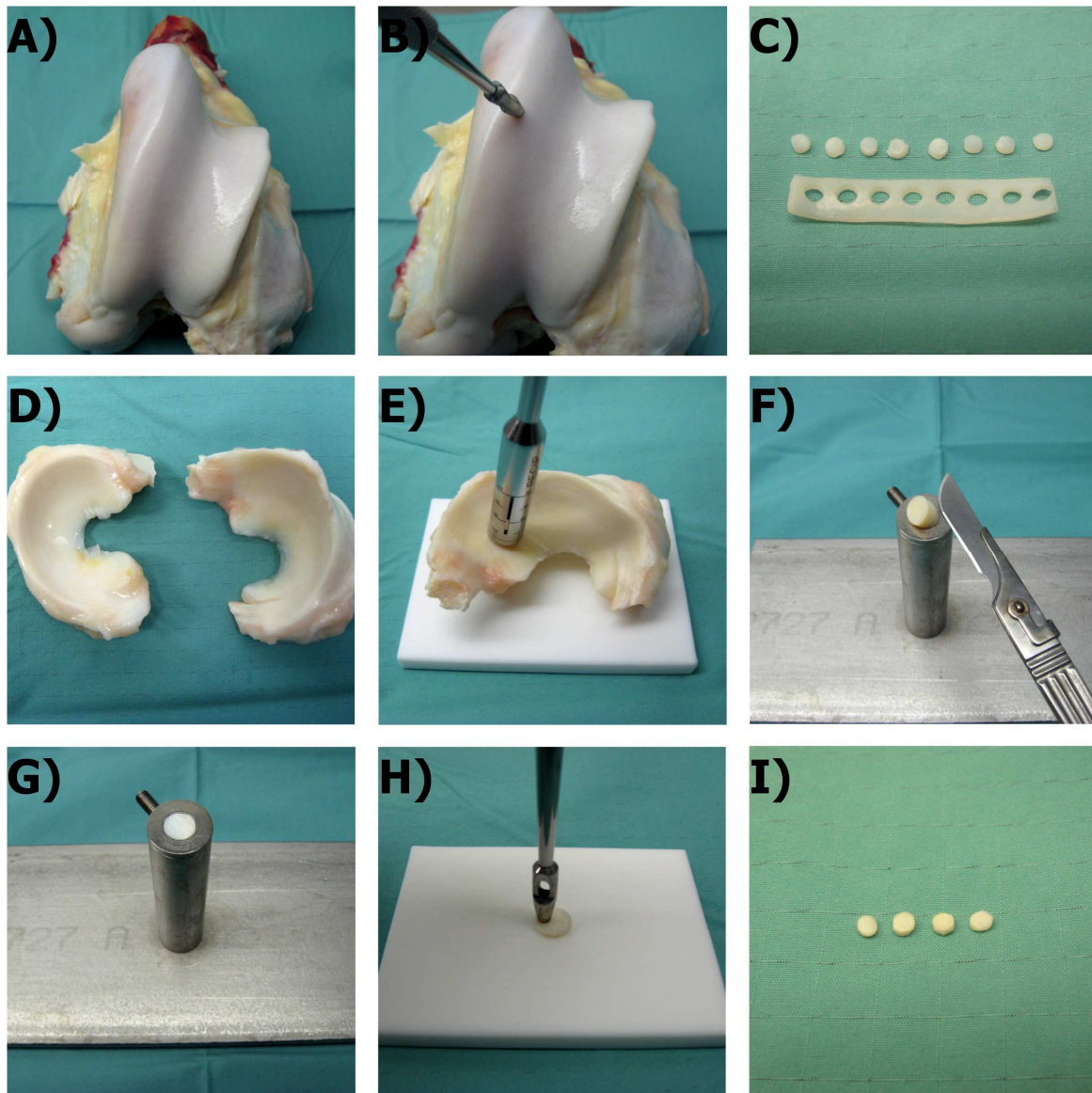


Abb. 2.1| Ablauf der Gewebegewinnung

Aus dem medialen Rand des Condylus lateralis femoris (A) wurden mittels einer Hautstanze (B) und einem parallel zur Oberfläche geführten Skalpell Gelenkknorpel-explantate (C) mit 3 mm Durchmesser und etwa 1 mm Höhe präpariert. Aus den freigelegten Menisken (D) wurden 4-6 Gewebezylinder herausgestantzt (E) mittels eines negativ formkongruenten Messingzylinders mit 1mm Tiefe wurde von der ehemals der Tibia zugewandten, planen Unterseite der Meniskus-Zylinder eine 1mm hohe Scheibe gewonnen (F+G). Aus dieser wurden mit einer Hautstanze (H) 4 Meniskusexplantate mit einem Durchmesser von 3 mm (I) isoliert.

2.4 Kultivierung von Meniskus- und Gelenkknorpel-explantaten

Nach der Bestimmung des Feuchtgewichtes der Gelenkknorpel- und Meniskus-explantate wurden diese gleichmäßig auf die Versuchsgruppen aufgeteilt. Die Kultivierung erfolgte in 24er Multi-Wellplatten mit 3 Explantaten pro Well in 1ml DMEM-Kulturmedium. Dem DMEM-Kulturmedium der Versuchsgruppen war IL-1 α (Recombinant Human IL-1 α /IL-1F1) in einer Konzentration von 10ng/ml beigefügt. Jeweils eine Versuchs- und Kontrollgruppe von Gelenkknorpel- und Meniskus-explantaten wurde 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Identische Gruppen wurden zudem auch für 10 Tage kultiviert. Der Wechsel des DMEM-Kulturmediums erfolgte hierbei nach 3 und 6 Tagen.

Zusammensetzung DMEM-Kulturmedium, Versuchs- und Kontrollmedium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Kontrollmedium (Angaben für 9ml)	Versuchsmedium (Angaben für 9ml)
10 mM HEPES	8820 μ l DMEM-Kulturmedium	8820 μ l DMEM-Kulturmedium
1 mM Na-Pyruvat	90 μ l BSA (10%ig)	90 μ l BSA (10%ig)
0,4 mM Prolin	90 μ l BSA (0,1%ig)	90 μ l BSA (0,1%ig)
50 μ g/ml Vitamin C		90 ng IL-1 α
10.000 U/ml Penicillin G		
10 mg/ml Streptomycinsulfat		
25 μ g/ml Amphotericin		
10 μ g/ml Insulin		
5,5 μ g/ml Transferrin		
5 ng/ml Natriumselenit		

Tabelle 2.1| Zusammensetzung des DMEM-Kulturmediums, Versuchs- und Kontrollmediums

Die einzelnen Kulturüberstände nach Tag 3, 6 und 10 wurden in 1,5ml-Reaktionsgefäßen für die anschließenden Untersuchungen gesammelt und bei -20°C gelagert. Die Explantate, bei denen Untersuchungen zur Genexpression erfolgen sollten, wurden nach der Kultivierung in 2ml-Mikro-Schraubröhren überführt und in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Explantate für histologische Untersuchungen wurden in kleinen Plastikkörbchen gesammelt und bis zur Einbettung in einer Paraformaldehyd-Lösung gelagert.

2.5 Quantifizierung der sulfatierten Glykosaminoglykane im Kulturüberstand

Bei allen entnommenen Überständen wurden die Menge an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) nach Inkubation der Explantate mittels des Dimethylmethylenblau (DMMB)-Tests bestimmt. 1,9-Dimethylmethylenblau bildet dabei einen Farbkomplex mit den sulfatierten GAGs dessen Extinktion bei 525nm gemessen wird.

Zur Herstellung des DMMB-Reagenz werden zuerst 16mg DMMB in 10ml reinem Ethanol gelöst. In einen 1L-Standzylinder werden 2,37g NaCl, 3,04g Glycine, 85ml 0,1M HCl vermischt und mit Aqua dest. auf 980ml aufgefüllt. Dazu kommen 10ml des in Ethanol gelösten DMMB. Der pH-Wert wird auf 3,0 eingestellt.

Die einzelnen Überstände werden vor der Messung mit einer PBE-Lösung (0,1M Na_2HPO_2 , 0,01M Na_2EDTA , pH=6,5) im Verhältnis 4:10 (Überstand:PBE-Lösung) verdünnt. Dann werden 80 μl der verdünnten Überstände mit 800 μl des DMMB-Reagenz in einer Einmal-Küvette vermischt und sofort die Extinktion mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 525nm gemessen.

Zur Bestimmung der sGAG-Konzentration und absoluten sGAG-Menge in den Überständen wurden die Extinktionen mit denen einer zuvor angesetzten Standardreihe mit Chondroitin-C-Sulfat verglichen und berechnet.

Anschließend wurde die errechnete sGAG-Menge (in μg) eines jeden Überstandes ins Verhältnis zum anfangs gemessenen Feuchtwicht (FG) der zugehörigen Explantate gesetzt.

2.6 Quantifizierung von Stickmonoxid (NO) im Überstand

Da Stickstoffmonoxid (NO) als sehr reaktives, freies Radikal nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden besitzt, erfolgt dessen Nachweis indirekt über die stabilen Reaktionsprodukte Nitrat (NO_3^-) oder Nitrit (NO_2^-), die bei der Oxidation mit physikalisch gelöstem Sauerstoff entstehen.

Die Menge an Nitrit in den Überständen wurde mit Hilfe des Griess-Reagenz photometrisch bestimmt. Sulfanilamid wird hierbei im sauren Milieu durch Nitrit diazotiert. Die entstehende Diazo-Verbindung reagiert in einer elektrophilen Substitution mit N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin zu einem stabilen roten Azofarbstoff, dessen Extinktion photometrisch bestimmt werden kann.

Zu Herstellung einer Standardkurve wurden 69mg Natriumnitrit (NaNO_2) und 1ml Kulturmedium zu einer Stammlösung vermischt und eine Verdünnungsreihe bis auf eine Konzentration von $1,5625\mu\text{mol NaNO}_2/\text{ml}$ erzeugt. In einer 96er-Microtiterplatte wurden dann geschützt von direkter Lichteinstrahlung auf $100\mu\text{l}$ der zu untersuchenden Probe $100\mu\text{l}$ Griess-Reagenz pipettiert. Nach 15 min Inkubation wurde mit einem Photometer die Extinktion bei 540nm gemessen und anhand der Standardkurve die Nitrit-Konzentration bestimmt. Abschließend wurde die absolute Nitrit-Menge (μmol) in den Kulturüberständen berechnet und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

2.7 Quantifizierung von Hydroxyprolin im Überstand

Die Aminosäure Hydroxyprolin kommt fast ausschließlich im kollagenen Gewebe vor.[89, 90] Daher wurden die Zellkulturüberstände mittels der Chloramin-T/p-Dimethylaminobenzaldehyd (pDMBA)-Reaktion auf ihren Gehalt an der Aminosäure Hydroxyprolin untersucht, um indirekt die vom Gewebe freigesetzte Kollagenmenge in den Überständen zu bestimmen. Hydroxyprolin wird hierbei in einem schwach sauren Puffer durch Chloramin-T in Pyrrol umgewandelt. Pyrrol wird in Perchlorsäure mit pDMBA umgesetzt und es bildet sich ein Farbkomplex, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.

Der beschriebene Test hat laut Literatur ein Detektionslimit von 15ng Hydroxyprolin/Probe.[91]

Zur Vorbereitung einer Standard-Reihe wurden 5mg Hydroxyprolin in 5ml Kulturmedium gelöst und eine Verdünnungsreihe bis auf eine Konzentration von $0,39\mu\text{g Hydroxyprolin/ml Kulturmedium}$ hergestellt.

Von den zu untersuchenden Überständen und Standards wurden $200\mu\text{l}$ vermischt mit $400\mu\text{l}$ 100%igem Ethanol über Nacht bei 4°C in Reaktionsröhrchen ausgefällt. Die

Präzipitate wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 4°C sowie 1700 x g pelletiert und die Überstände in Micro-Schraubröhrchen transferiert. Die Pellets wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und die Überstände mit denen in den Micro-Schraubröhrchen vermischt. Die Pellets wurden verworfen.

Die Überstände wurden lyophilisiert und zu den Produkten der Vaccum-Evaporation wurden anschließend 300µl 6M HCl hinzugefügt. Nach der Hydrolyse für 3,5h in einem Wärmeschrank bei 135°C wurden die Proben erneut lyophilisiert und die Lyophilisate danach in 200µl Reinstwasser gelöst.

Die Lösungen wurden in Reaktionsröhrchen transferiert und für 7 min mit 9400 x g zentrifugiert. Es bildete sich am Boden des Röhrchens ein Pellet mit den Produkten der vorangegangenen „Veraschung“. Von den Überständen wurden jeweils 60µl in eine 96-Mikrotiterplatte pipettiert und zu jeder Probe wurden 20µl Puffer-Lösung sowie 40µl Chloramin-T-Lösung hinzugefügt.

Pufferlösung	Vorrats-Puffer (pH = 6,1)
<ul style="list-style-type: none"> - n-Propanol - demineralisiertes Wasser - Vorrats-Puffer - Verhältnis 3(n-Propanol):2 (Wasser):10(Vorratspuffer) 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,24M (1M=1mol/L) Zitronensäure Anhydrat - 0,88M Natriumacetat Trihydrat - 0,88M anhydrisches Natriumacetat - 0,21M Essigsäure - 0,85M Natriumhydroxid
Chloramin-T-Lösung	DMBA-Reagenz
<ul style="list-style-type: none"> - 0,282g Chloramin-T - 1ml n-Propanol - 1ml Reinstwasser - 8ml Vorrats-Puffer 	<ul style="list-style-type: none"> - 2g pDMBA - 1,25ml n-Propanol - 2,75ml Perchlorsäure

Tabelle 2.2| Zusammensetzung der Puffer-Lösung, Chloramin-T-Lösung und des DMBA-Reagenz

Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 80µl DMBA-Reagenz zu den Proben pipettiert. Die Microtiterplatte wurde dann für 20 min in ein leicht bewegtes, 60°C warmes Wasserbad gestellt, sodass nur die Unterseite der Platte mit dem Wasser in Kontakt war. Anschließend wurde die Platte für 10 min gekühlt und abgetrocknet. Die Extinktion der Proben wurde mit einem Photometer bei 570nm Wellenlänge bestimmt und der Hydroxyprolin-Gehalt der Proben über die Standardkurve berechnet.

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 Aufbereitung der Gewebeexplantate für die Histologie

Nach Abschluss der Kultivierung nach 3 bzw. 10 Tagen wurden die für histologische Untersuchungen bestimmten Gewebeexplantate über Nacht in einer Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Zur weiteren Aufbereitung wurden die Explantate nach Entfernung der Paraformaldehyd-Lösung eine Stunde mit Leitungswasser gewässert, worauf die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol) folgte. Anschließend wurden die Gewebeexplantate 3 x 2 Stunden mit Methylbenzoat behandelt und darauf 2 x 2 Stunden in Paraplast überführt. Die abschließende Einbettung in Paraffin erfolgte in einem Vakuumschrank.

Nach Erhärtung des Paraffins wurden mittels eines Microtoms histologische Schnitte (7µm Dicke) der Gewebeproben angefertigt und auf adhäsiven Objektträger mit silanisierter Oberfläche (Histobond[®]) aufgetragen.

Die Bestandteile der Paraformaldehyd-Lösung waren:

- PBS
- 4% (w/v) Paraformaldehyd
- 0,1% (v/v) NaOH

2.8.2 Färbung von Gewebeschnitten mit Toluidinblau

Für die standardmäßige lichtmikroskopische Untersuchung der Gewebeproben wurden diese mit Toluidinblau gefärbt. Hierzu wurden die zuvor angefertigten Paraffinschnitte der Gewebeproben mit Xylol 3 x 5 min entparaffiniert. Anschließend folgte die Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 60% Ethanol) für jeweils 5 min. Vor und nach der Inkubation in der

Toluidinblau-Färbelösung für 5 min wurden die Schnitte mit Aqua dest gespült. Es folgte das Eintauchen in 96%iges Ethanol. Daraufhin wurden die Schnitte 3 x 3 min in 98%iges Propanol und danach 3 x 5 min in Xylol getaucht.

Die Deckelung der gefärbten Schnitte erfolgte abschließend mit dem Eindeckmedium DePeX.

Die Toluidinblau-Färbelösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 0,0714% (w/v) Toluidinblau
- 0,0714% (w/v) Pyronin G
- 0,143% (w/v) Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Borax)

2.8.3 Färbung von Gewebeschnitten mit Mayer's Hämalaun-Lösung

Zur Beurteilung der Zellkernmorphologie wurden die konservierten Gewebeschnitte mit Mayer's Hämalaun-Lösung gefärbt. Dieser kationische Farbstoff bindet an die anionischen Zellkomponenten (z.B. DNA, RNA). Die Entparaffinierung mit Xylol, die Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe und die Spülung mit Aqua dest folgte dem für die Toluidinblau-Färbung beschriebenen Schema (s.o.). Dann wurden die Gewebeschnitte für 6 min in Mayer's Hämalaun-Lösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest gespült. Nach dem Eintauchen in 96%iges Ethanol wurden die Gewebeschnitte für 10 min in lauwarmem Leitungswasser stehen gelassen. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 3 min und der Behandlung mit Xylol für 3 x 5 min wurden die gefärbten Schnitte abschließend mit DePeX eingedeckelt.

2.8.4 Immunhistochemische Untersuchung von Gewebeschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch auf das Aggrekan-Neoepitop NITEGE (G1-Fragment von Aggrekan) untersucht.

Die Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert und dann für 2,5 min in 0,01M Citratpuffer (pH=6) mit 0,05%igem Tween-20 Zusatz gekocht. Nach 20 min Abkühlen wurden die Schnitte 3 x 5 min in eine Tris-Pufferlösung getaucht.

Der Primärantikörper „Anti-Aggrecan neo rabbit“ wurde mit 1%igem BSA und einer Antikörper-Verdünnungslösung (Dako®) auf ein Verhältnis von 1:50 eingestellt. Dann erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit der verdünnten Antikörper-Lösung für mehrere Stunden in einer Feuchtkammer bei 8°C. Um den spezifisch bindenden Primärantikörper sichtbar zu machen, erfolgte anschließend die Inkubation mit dem AlexaFluor 488®-konjugierten Sekundärantikörper. Hierzu wurden die Schnitte zunächst 3 x 5 min mit der Tris-Pufferlösung behandelt und anschließend mit der Sekundärantikörper-Lösung (Verdünnung 1:500) für eine Stunde bei 17°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Bevor die Zellkerne spezifisch durch eine Bisbenzimid-Färbung dargestellt wurden, erfolgte eine weitere Spülung jeweils 3 x 5 min mit der Tris-Pufferlösung. Dann wurde die Schnitte 3 min in einer mit Tris-NaCl angesetzten Bisbenzimid-Lösung inkubiert und abschließend dreimal mit der Tris-Pufferlösung gespült.

Die Schnitte wurden mit einem Eindeckmedium (Fluoreszenz Mounting Medium) sowie einem Abdeckglas konserviert und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Die Tris-Pufferlösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

- Tris
- 0,1M HCl
- 9% NaCl
- pH=7,5

2.8.5 Der lichtmikroskopische Nachweis von apoptotischen Prozessen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zu Veränderungen der Zellkernmorphologie als Zeichen für apoptotische Prozesse innerhalb der Zelle erfolgten an den mit Mayer's Hämalaun-Lösung gefärbten Gewebeschnitten. Die Zellkerne wurden bei einer 40 x 0,75 Vergrößerung beurteilt. Pro Gewebeschnitt wurden in drei Gesichtsfeldern die Gesamtanzahl der Zellkerne, die Anzahl der kondensierten Zellkerne und die Anzahl von Zellkernen mit so genanntem Blebbing (apoptotische Zellkerne) [92, 93] bestimmt. Das zentrale Gesichtsfeld war im Zentrum eines Gewebeschnittes lokalisiert. Die beiden anderen Gesichtsfelder grenzten links und rechts an das zentrale Gesichtsfeld, sodass eine Erfassung von möglichen durch die Gewebegewinnung induzierten Artefakten im Randbereich der Explantate vermieden wurde. Pro Versuchsgruppe wurden 12 Schnitte verblindet ausgezählt. Für die anschließende statistische Auswertung wurde der relative Anteil der kondensierten und apoptotischen Zellkerne an der Gesamtzellzahl bestimmt.

2.9 Untersuchungen zur Genexpression von Matrixproteinen und matrixdegradierenden Enzymen auf mRNA-Ebene

2.9.1 RNA-Isolierung aus Gewebeexplantaten

Nach Beendigung der Stimulation wurde in jedem Experiment aus den 12 Gewebeexplantaten jeder Versuchsgruppe die RNA isoliert, um die Genexpression von Matrixproteinen und matrixdegradierenden Enzymen zu untersuchen.

Die Meniskusexplantate wurden hierzu mit einem Skalpell geviertelt und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff bei -70°C eingefroren. Die Gelenkknorpel-explantate wurden ohne Zerkleinerung ebenfalls tiefgefroren.

Anschließend wurden die Explantate in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zermörsert und das pulverisierte Gewebe wurde in Reaktionsröhrchen mit 1ml Trizol vermischt. Dann wurden die Proben mit einem Dispergiergerät so lange homogenisiert, bis keine Gewebestückchen mehr in der Lösung sichtbar waren. Die

Proben wurden dann in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und 10 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, wobei restliche Zelltrümmer aus der Lösung entfernt wurden.

Der Proteine, DNA und RNA enthaltende Überstand wurde vorsichtig abgezogen und in ein weiteres Reaktionsröhrchen pipettiert. Zur Isolierung der RNA wurden hierzu 200µl Chloroform hinzugefügt und die Proben für 15 s geschüttelt. Nach Inkubation für 2-3 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Hiernach bildeten sich in der Lösung zwei Phasen. Die obere, wässrig farblose Phase enthielt die zu untersuchende RNA. Die untere, rötliche Phenol-Chloroform Phase enthielt Proteine und die DNA. Die obere Phase wurde vorsichtig, ohne die Interphase zu berühren und mit DNA zu verunreinigen, abgezogen und in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Die Röhrchen mit der unteren Phase wurden verworfen.

Zum Ausfällen der RNA wurden den Proben dann 500µl Isopropylalkohol beigefügt und die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, sodass sich am Boden des Reaktionsröhrchens ein Gel-artiges, RNA enthaltendes Pellet absetzte. Der Überstand im Röhrchen wurde abpipettiert und verworfen, bevor das Pellet im 1ml 75%igem Ethanol gelöst wurde. Diese Lösung wurde 5 min bei 4°C und 7500 x g zentrifugiert und der resultierende Ethanol enthaltende Überstand verworfen. Diese Spülung des Pellets mit Ethanol wurde zwei-/dreimal wiederholt um Phenolrückstände zu entfernen, welche die photometrische Bestimmung der RNA-Menge beeinflussen würden.

Das Pellet wurde dann für 10 min luftgetrocknet und anschließend in 50µl Reinstwasser gelöst. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 55-60°C, bevor photometrisch die RNA-Menge in den Proben bestimmt wurde.

Abschließend wurden die Proben bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C tiefgefroren.

2.9.2 Quantifizierung der isolierten RNA-Menge

Zur Bestimmung der isolierten RNA-Menge wurde mittels einer photometrischen Messung die optische Dichte (OD) der isolierten RNA-Proben bestimmt. Hierzu wurden 5µl der RNA-Probe mit 496µl Aqua bidest in einer Quarzküvette versetzt und mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm (Absorptionsmaximum von RNA) die Extinktion bestimmt. Um die Qualität der Probe zu beurteilen und um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen, wurde zusätzlich die optische Dichte der Lösung bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Als Reinheitskriterium für die Proben galt ein Wert $\geq 1,8$ für den Quotienten von OD260/OD280.

2.9.3 Durchführung der SYBR[®] Green Real-time RT-PCR

Die Real-time Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (Real-time RT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, bei der die relative Quantifizierung der untersuchten Genprodukte mittels Fluoreszenz-Messung in Echtzeit (Real-time) erfolgt. Hierbei wurde das Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR Kit benutzt. Der Cyanin-Farbstoff SYBR Green I bindet selektiv an doppelsträngige DNA und bildet dabei einen fluoreszierenden DNA-Farbstoff-Komplex, der Licht der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 494\text{nm}$ absorbiert und grünes Licht mit der Wellenlänge $\lambda_{\max} = 521\text{nm}$ emittiert. Mit zunehmender Vervielfältigung der PCR-Produkte kann somit auch eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden.

Vor Beginn der Real-time RT-PCR wurden die zu untersuchenden RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen, um mögliche Verunreinigungen der Proben mit DNA zu eliminieren. Hierzu wurde die RQ1 RNase-Free DNase (Promega[®]) verwendet. Diese DNase I degradiert einzel- und doppelsträngige DNA.

Jeder Probe mit 1-8µl RNA wurden 1µl RQ1 DNase 10 x Reaktionspuffer (400mM Tris-HCl (pH=8), 100mM MgSO₄, 10mM CaCl₂) und RQ1 DNase (RQ1 DNase, 10mM HEPES (pH=7,5), 50% (v/v) Glycerol, 10mM CaCl₂, 10mM MgCl₂)

hinzugegeben. Die Lösungen wurden mit Nuklease-freiem Wasser bis auf 10µl aufgefüllt. Dann erfolgte eine Inkubation im Thermocycler für 30 min bei 37°C. Die anschließende Inaktivierung der DNase in den Proben wurde durch die Zugabe von 1µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EGTA, pH=8) und 10 min Inkubation bei 65°C bewirkt. Nach dem DNase-Verdau wurden die RNA-Proben für den folgenden Reaktionsansatz zur quantitativen Bestimmung der Zielgene verwendet.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 12,5µl QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
- 0,5µl Primer (Sense)
- 0,5µl Primer (Antisense)
- 0,5µl QuantiTect RT Mix
- 11,25µl RNA

Endvolumen: 25µl

Jeder Reaktionsansatz wurde doppelt pipettiert. Für jeden Primer gab es zudem eine „No Template Control“ (NTC). Dieser Reaktionsansatz stellte eine Kontrolle dar und enthielt keine „Template“-RNA. Somit war hier keine Gen-Amplifikation möglich und kein RT-PCR-Produkt detektierbar.

Für die Amplifikation der zu untersuchenden mRNA-Abschnitte mussten diese zu Anfang der RT-PCR mittels der Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, welche im folgenden Ablauf der PCR als template (Vorlage) für die Amplifikation dient. Dies erfolgte für 30 min bei einer Temperatur von 50°C. Darauf folgte die Initialisierung der PCR durch das Erhitzen der Reaktionsansätze auf 95°C für 15 min. Mit der Denaturierung der DNA für 15 s bei 94°C folgte der erste von drei sich wiederholenden Schritten des PCR-Zyklus. Anschließend wurde die Temperatur für die Anlagerung der spezifischen Oligonukleotid-Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing) für 30 s auf 60°C gesenkt. Für die enzymatische Verlängerung der Primer durch die thermostabile Taq-Polymerase komplementär zur vorliegenden template DNA (Elongation) wurde die Temperatur für 30 s auf 72°C erhöht. Zur anschließenden Datenaufnahme bzw. Fluoreszenz-Messung wurde eine für die verschiedenen Zielgene variable Temperatur x eingestellt. Diese Temperatur lag oberhalb der Schmelztemperatur (T_m) von unspezifisch fluoreszierenden Primer-Dimeren, aber unterhalb der Schmelztemperatur des spezifischen Genproduktes. Die Schmelztemperaturen

wurden durch eine Schmelzkurvenanalyse einmalig bestimmt. Hierzu wurde im Anschluss an die RT-PCR die Temperatur gleichmäßig von 60°C auf 95°C erhöht und die Produkte der Amplifikation aufgeschmolzen.

Für MMP-1, MMP-9 und ADAMTS-4 erfolgte die Datenaufnahme im Anschluss an einen PCR-Zyklus bei 72°C nach der Elongation, da hier eine Beeinflussung der Datenaufnahme durch Fluoreszenzen von Primer-Dimeren beobachtet werden konnte.

Zielgen	Schmelztemperaturen: T _m (°C)
MMP-1	-
MMP-2	78
MMP-3	78
MMP-9	-
MMP-13	70
Aggrekan	78
ADAMTS-4	-
Kollagen Typ II	81
GAPDH	78
18S rRNA	78
iNOS	-

Tabelle 2.3| Schmelztemperaturen (T_m) der RT-PCR-Produkte

Im Rahmen eines RT-PCR-Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation wurde die Anzahl der Gen-Produkte verdoppelt. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt.

Schritt	Dauer	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50°C
Initialisierung	15 min	95°C
Denaturierung	15 s	94°C
Annealing	30 s	60°C
Elongation	30 s	72°C
Datenaufnahme	30 s*	x°C* (s. Tabelle 2.3)

Tabelle 2.4| Schematischer Ablauf der SYBR® Green Real-time RT-PCR

*Entfällt für die Datenaufnahme von MMP-1, MMP-9, iNOS und ADAMTS-4. Die Datenaufnahme erfolgte in diesen Fällen direkt nach der Elongation.

Primer-Name	Primer-Sequenz (5'- ... -3')	Produkt
ADAMTS-4 Sense	GCG CCC GCT TCA TCA CTG	101bp
ADAMTS-4 Antisense	TTG CCG GGG AAG GTC ACG	101bp
MMP-2 Sense	GTA CGG GAA TGC TGA CGG GGA ATA	93bp
MMP-2 Antisense	CCA TCG CTG CGG CCT GTG TCT GT	93bp
Kollagen-2 Sense	AAG AAG GCT CTG CTC ATC CAG G	
Kollagen-2 Antisense	TAG TCT TGC CCC ACT TAC CGG T	
Aggrekan Sense	CCT GAA CGA CAA GAC CAT CGA	101bp
Aggrekan Antisense	TGG CAA AGA AGT TGT CAG GCT	
MMP-1 Sense	GGA CTG TCC GGA ATG AGG ATC T	
MMP-1 Antisense	TTG GAA TGC TCA AGG CCC A	
MMP-3 Sense	CAC TCA ACC GAA CGT GAA GCT	109bp
MMP-3 Antisense	CGT ACA GGA ACT GAA TGC CGT	
MMP-9 Sense	TCC CTT CCT TGT CAA GAG CAA	
MMP-9 Antisense	TAC TTG GCG CCC AGA GAA GAA	
MMP-13 Sense	TCT TGT TGC TGC CCA TGA GT	
MMP-13 Antisense	GGC TTT TGC CAG TGT AGG TGT A	
GAPDH Sense	ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG G	
GAPDH Antisense	TGA GTG TCG CTG TTG AAG TCG	
18S rRNA Sense	TCG AGG CCC TGT AAT TGG AA	
18S rRNA Antisense	GCT ATT GGA GCT GGA ATT ACC G	
iNOS Sense	CCC GCA TGC AAC TCC AA	
iNOS Antisense	TCG TAA GTC ATG AAC TGC CAC TTC	

Tabelle 2.5| Primer-Sequenzen für Real-time RT-PCR

Auflistung der für die Real-time RT-PCR verwendeten Sense-/Antisense-Primer, der entsprechenden Primer-Sequenz mit Gliederung in Triplets und der Größe des Genproduktes in Basenpaaren (bp)

2.9.4 Auswertung und Darstellung der Real-time RT-PCR Daten

Durch Messung der Fluoreszenz-Signale konnte eine relative Quantifizierung der Gen-Produkte am Anschluss an die Real-time RT-PCR Daten erfolgen. Die Fluoreszenz des Komplexes aus SYBR Green-DNA-Farbstoff und doppelsträngiger DNA steigt proportional zur Menge des amplifizierten Gen-Produktes an.

Die Fluoreszenz-Stärke der zu untersuchenden Ziel-Gene wurde auf die des Housekeeping-Gens (Referenz-Gen) GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) bezogen unter der Annahme, dass dieses Gen unabhängig von der Stimulation des Gewebes mit IL-1 konstant exprimiert wird.

Für die Fluoreszenz-Stärke wurde zu Beginn der Messung ein Schwellenwert (threshold) festgelegt, der die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Anschließend wurde der C_T -Wert ($C_T = \text{threshold cycle}$) bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals den Schwellenwert übersteigt. Ein Ziel-Gen mit einem hohen C_T -Wert lag somit in der untersuchten Probe in einer geringeren Konzentration vor, als ein Ziel-Gen mit einem kleineren C_T -Wert. Daraus leitet sich ab, dass eine Probe mit einem um eine Einheit geringerer C_T -Wert eine ursprünglich doppelt so hohen Konzentration an cDNA enthielt als eine Probe mit einem höheren C_T -Wert.

Die relative Berechnung der exprimierten Gene wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt. Hierbei wurde zunächst der ΔC_T -Wert der Proben aus der mit IL-1 stimulierten Gruppe und der ΔC_T -Wert der Proben aus der unstimulierten Kontrollgruppe berechnet. Nachfolgend wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert durch die Subtraktion des ΔC_T -Werts der Kontrollgruppe vom ΔC_T -Wert der stimulierten Proben.

Mit jedem RT-PCR-Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Stränge. Aufgrund dieses exponentiellen Anstiegs wurde abschließend die Relative Zielmenge durch folgende Formel berechnet: $\text{Relative Zielmenge} = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$

Die Relative Zielmenge gibt relativ den Expressionsunterschied zwischen stimulierten Proben und Kontrollproben in Bezug zu dem Referenzgen GAPDH an.

1.	ΔC_T (Probe)	= C_T (Probe; Zielgen) - C_T (Probe; Referenzgen)
2.	ΔC_T (Kontrolle)	= C_T (Kontrolle; Zielgen) - C_T (Kontrolle; Referenzgen)
3.	$\Delta\Delta C_T$	= ΔC_T (stimulierte Probe) - ΔC_T (Kontrolle)
4.	Relative Zielmenge	= $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$

Tabelle 2.6| Rechenschritte zur Bestimmung der Relativen Zielmenge nach Real-time RT-PCR

C_T = threshold cycle, Anzahl der RT-PCR Zyklen bis zum Überschreiten des Fluoreszenz-Schwellenwertes; Probe = IL-1 stimulierte Proben; Kontrolle = Probe der Kontrollgruppe; Zielgen = MMP-1, -2, -3, -9, -13, Aggrekan, ADAMTS-4, Kollagen Typ II; Referenzgen = GAPDH

2.10 Untersuchungen zur Genexpression von matrixdegradierenden Enzymen auf Proteinebene

Für den qualitativen Nachweis von Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren Pro-Formen (pro-MMPs) in den Kulturüberständen wurde das Verfahren der SDS-Gel-Zymografie verwendet. Bei der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden die durch das Gel wandernden Proteine mit dem negativ geladenen SDS (Natrium dodecylsulfate = Natriumdodecylsulfat) beladen und so ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt. Die Gele enthielten zusätzlich 10% Gelatine bzw. 12% Casein als Substrat, welches durch spezifische MMPs enzymatisch abgebaut werden kann. Wurde das Substrat abgebaut, konnte man abschließend in dem blauen Gel an den Stellen weiße Banden erkennen, an denen sich die MMPs befanden. Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers konnten die MMPs dann identifiziert werden.

2.10.1 Zymografische Analysen mit SDS-Polyacrylamidgelen mit Casein

Die SDS-Polyacrylamidgele mit Casein als Substrat waren kommerzielle Fertiggele. Für die zymografische Analyse wurden 30µl der Zellkulturüberstände mit 10µl eines kommerziellen Probenpuffers auf einem Parafilmstreifen versetzt. Dann wurden 6µl dieser Probe in eine Geltasche pipettiert. In die erste Geltasche am linken Rand des Casein-Gels wurde der Molekulargewichtsmarker eingebracht. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde an das Gel dann in einer auf 4°C gekühlten, mit einem Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer zunächst eine Spannung von 100V angelegt. Nachdem die Probe über den ersten Teil des Gels (=Sammelgel) in das eigentliche Trenngel gelaufen war, wurde sie bei einer Spannung von 150V für ca. 70 min aufgetrennt, bis die erste Bande des Molekulargewichtsmarkers bzw. dessen kleinste Proteine das andere Ende des Gels erreicht hatten. Nach der Elektrophorese wurden das Casein-Gel 3 x 20 min in 2,5% (v/v) Triton X-100 gewaschen, um das denaturierende SDS zu entfernen und so die katalytische Aktivität der MMPs wiederherzustellen. Nach dem Spülen mit Aqua bidest und der

Inkubation des Gels in einem Proteolysispuffer für 16h bei 37°C bewegt durch einen Rüttler, wurde das Gel angefärbt. Hierzu wurde es nach 2 x Spülen mit einer PBS-Lösung für 30-60 min bei Raumtemperatur in eine Coomassie-Blau-Färbelösung gelegt. Anschließend wurde das Gel mittels einer Entfärbe-Lösung entfärbt sowie zur Konservierung in 1%iger Glycerin-Lösung fixiert und luftdicht in eine Zellulosefolie eingeschweißt. In dem blauen Gel konnte man nun an den Stellen weiße Banden beobachten, an denen die MMPs das Substrat enzymatisch umgesetzt hatten. Durch Vergleich mit dem Molekulargewichtsmarker und der in der Literatur beschriebenen Größe der untersuchten MMPs, konnten den weißen Banden entsprechende MMPs bzw. pro-MMPs zugeordnet werden.

Zur Dokumentation wurden die eingeschweißten Gele mittels Farbscanner eingescannt und der Farbkontrast digital verstärkt.

Probenpuffer	Laufpuffer
<ul style="list-style-type: none"> - 62,5mM Tris-HCl - 25% (w/v) Glycine - 4% (w/v) SDS - 0,01% (w/v) Bromphenolblau - pH=6,8 	<ul style="list-style-type: none"> - 250mM Tris - 1,92M Glycine - 1% (w/v) SDS - pH=8,3
Proteolysispuffer	Coomassie-Blau-Färbelösung
<ul style="list-style-type: none"> - 50mM Tris-HCl - 50mM CaCl₂ - 0,5M NaCl - 0,05% (v/v) Triton X-100 - pH=7,8 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,1% (w/v) Coomassieblau - 50% (v/v) Methanol - 5% (v/v) Essigsäure
Entfärbe-Lösung	
<ul style="list-style-type: none"> - 10% (v/v) Methanol - 7% (v/v) Essigsäure - 	

Tabelle 2.7| Zusammensetzung Probenpuffer, Laufpuffer, Proteolysispuffer, die Coomassie-Blau-Färbelösung und die Entfärbe-Lösung

2.10.2 Zymografische Analysen mit SDS-Polyacrylamidgelen mit Gelatine

Die SDS-Polyacrylamidgele mit Gelatine als Substrat stammten aus eigener Herstellung. Zur Herstellung eines Gels mussten zuerst Lösungen für das Trenngel

und das Sammelgel angesetzt werden. Das Sammelgel, welches 5% Acrylamid enthält, sammelt am Anfang der Elektrophorese die Proteine vor dem Übergang ins Trenngel, sodass die Auftrennung gleichzeitig beginnen kann. Im Trenngel, wo die Proteine dann ihrer molekularen Größe nach aufgetrennt werden, sind 10% Acrylamid enthalten. Zur dessen Herstellung wurden zuerst 5mg Gelatine mit 5ml Aqua bidest vermennt und bis zum Erzeugen einer homogen Lösung erwärmt. Dann wurden 2ml Acrylamid, 1,5ml Trenngelpuffer, 2,5ml erkaltete Gelatine-Lösung, 30µl APS und 10µl TEMED vermischt und zügig vor Beginn der Polymerisierung zwischen zwei parallele, fixierte Glasplatten gegossen. Für den Zeitraum der Polymerisation wurde auf die Lösung zwischen die Platten noch eine ca. 1cm hohe Schicht Isopropanol gegossen. Anschließend wurde die Isopropanol-Schicht abgegossen und eine Sammelgel-Lösung durch Mischen von 335µl Acrylamid, 625µl Sammelgelpuffer, 1,5ml Wasser, 25µl APS und 5µl TEMED hergestellt. Diese Lösung wurde dann in den ca. 1cm breiten Freiraum gegossen und ein spezieller Plastikamm eingeführt, der den Raum für die Taschen zu Probenaufnahme ausformt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel zwischen den Glasplatten in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebaut.

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
- 1,5M Tris-HCl	- 0,5M Tris-HCl
- 0,4% (w/v) SDS	- 0,4% (w/v) SDS
- pH = 8,8	- pH = 6,8

Tabelle 2.8| Zusammensetzung der Trenngelpuffer, Sammelgelpuffer

Dann wurden 30µl der zu untersuchenden Zellkulturüberstände mit 10µl des kommerziellen Probenpuffers vermischt und 6µl dessen in eine Geltasche pipettiert. In die erste Geltasche am linken Rand des Gelatine-Gels wurden 6µl des Molekulargewichtsmarker eingebracht. Der Ablauf der anschließenden Elektrophorese, Proteolysisinkubation, Coomassieblau Färbung und Endfärbung entsprach dem für die Casein-Gele beschriebenen Schema.

2.11 Statistische Auswertung

Zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bzw. Standardfehler ermittelt.

Die Signifikanz der Untersuchungsergebnisse wurde mit dem zweiseitigen T-Test bei unabhängigen Stichproben mittels des Programms SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc.) berechnet. Für das Signifikanzniveau α wurde zuvor der Wert 0,05 festgelegt. Damit wurde die Zuverlässigkeit einer Aussage als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Untersuchungen

3.1.1 Allgemeine lichtmikroskopische Histologie

Für die lichtmikroskopische Betrachtung der Gewebe wurden Schnitte von Meniskus- und Gelenkknorpelimplantaten der unstimulierten Kontrollgruppe wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben mit Toluidinblau angefärbt.

3.1.1.1 Meniskusgewebe

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der Meniskusimplantate konnte eine Gliederung in 3 unterschiedliche Schichten beobachtet werden. Die erste Schicht hatte eine Dicke von bis zu 60µm und stellte die der Tibia zugewandte, glatte Oberfläche der Meniskusimplantate dar. Dicht gelagerte Bindegewebsfasern verliefen hier parallel zu Oberfläche. Es zeigten sich überwiegend fibroblastenartige, spindelförmige Zellen mit einem ovalen Zellkern und wenig Zytoplasma. Vereinzelt waren in dieser Schicht auch runde Zellen zu finden. Dieser Zelltyp überwiegte in der zweiten Schicht, die sich unterhalb der ersten Schicht befand und über eine Höhe von ca. 250µm erstreckte. Die Zellen hatten einen maximalen Durchmesser von 12µm und zeigten eine charakteristische Morphologie von runden Knorpelzellen. Saumartig um die Zellen herum war ein basophiler, auf polyanionische PGs hindeutender Knorpelhof erkennbar. Die dritte Schicht bildete ca. $\frac{3}{4}$ der Implantatdicke. Die Extrazellulärmatrix wies Bindegewebssepten auf, die zahlreiche, quer angeschnittene Kollagenfaserbündel zusammenfassten. In feinerer Form war eine vergleichbare Struktur der Matrix auch in der zweiten Schicht zu erkennen. In den Septen der dritten Schicht befanden sich vereinzelt runde Knorpelzellen. Die zweite und dritte Schicht wiesen damit die charakteristischen Merkmale des Faserknorpels auf (s. Abb. 3.1).

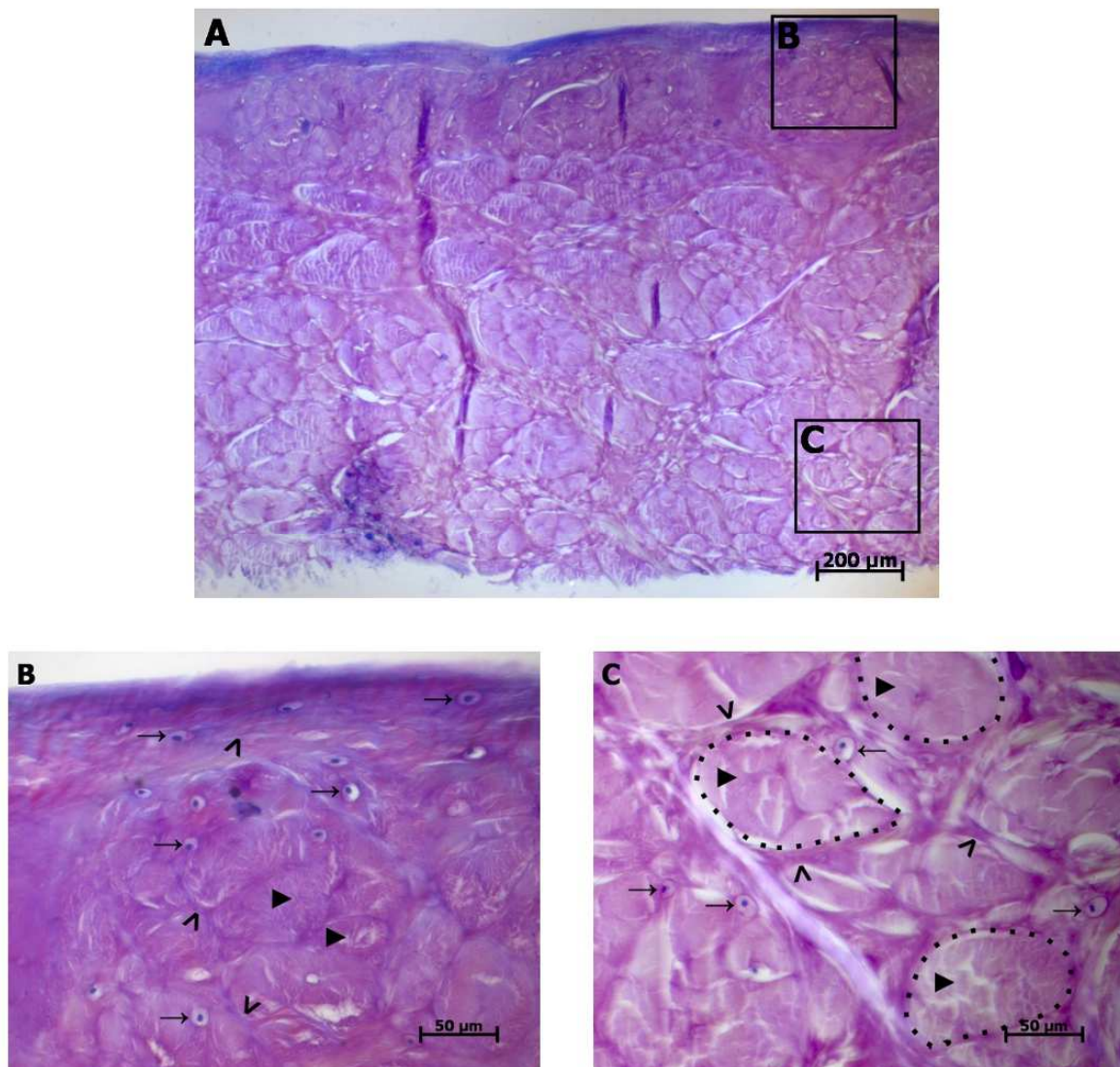


Abb. 3.1| Lichtmikroskopische Darstellung eines Meniskusexplantates (Toluidinblau-Färbung)

- A)** Übersichtliche histologische Darstellung eines Meniskusexplantates. Die ursprünglich dem Tibiaplateau zugewandte Oberfläche des Explantates zeigt im Bild nach oben.
- B)** Ausschnitt aus A: Exemplarisch sind in der ersten und zweiten Schicht einzeln auftretende runde bzw. an der Oberfläche ovale Zellen mit einem Knorpelhof (→) sowie in Längsrichtung (>) und quer (▶) angeschnittene Bündel von Kollagenfasern gekennzeichnet.
- C)** Ausschnitt aus A aus der tiefen Schicht des Meniskusexplantates: Es sind quer angeschnittene Bündel von Kollagenfasern (▶ und gepunktete Umrandung) gekennzeichnet, die septenartig von längs angeschnittenen Kollagenfasern (>) umgeben sind. Dazwischen liegen einzeln runde Knorpelzellen mit einem basophilen Knorpelhof (→).

3.1.1.2 Gelenknorpelgewebe

Die lichtmikroskopische Betrachtung der Gelenknorpelimplantate zeigte eine basophile, zellreiche Knorpeloberfläche. Hier fanden sich in ein bis zwei Lagen über ca. 20µm eng benachbart ovoide Chondrozyten. Sie traten in Chondronen auf und waren in eine stark basophile interterritoriale Extrazellulärmatrix eingebettet.

Das darunter liegende hyaline Knorpelgewebe war im Vergleich dazu hypozellulär. Die im Durchmesser bis zu 12µm großen Chondrozyten traten in Chondronen auf und hatten perizellulär den charakteristischen basophilen Knorpelhof. Die Matrix zwischen den Chondronen war im Vergleich dazu schwächer angefärbt. Die Ausrichtung/Aneinanderlagerung der Chondrozyten erfolgte in dem tieferen Abschnitt des Implantates überwiegend in Längsrichtung zur Oberfläche. Dies kann als Anzeichen für die charakteristische arkadenartige Anordnung der Kollagenfibrillen im Gelenknorpel gewertet werden (s. Abb. 3.2).

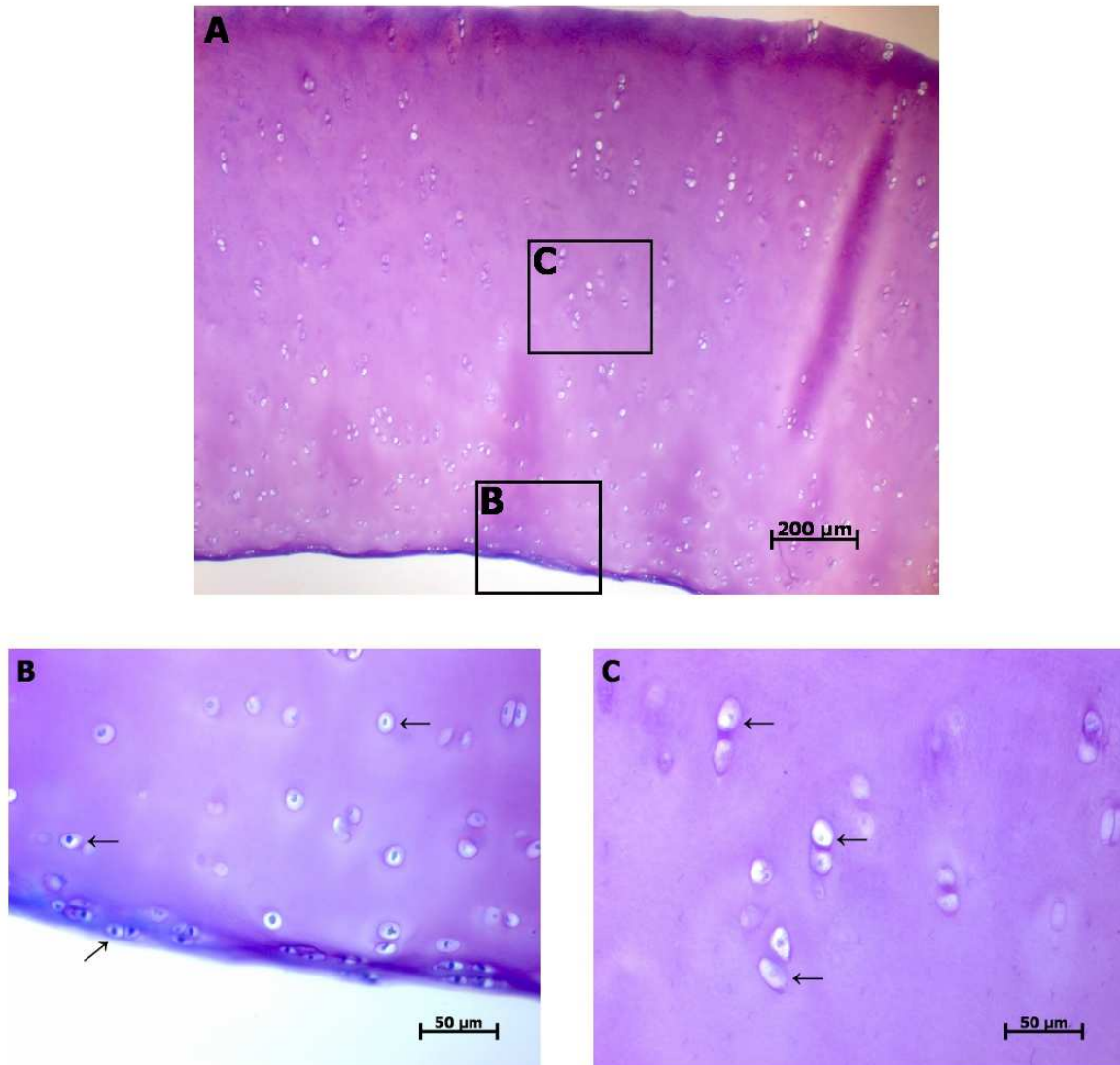


Abb. 3.2| Lichtmikroskopische Darstellung eines Gelenkknorpelimplantates (Toluidinblau-Färbung)

- A)** Übersichtlicher histologischer Schnitt eines Gelenkknorpelimplantates. Die ursprünglich dem Meniskus/Tibiaplateau zugewandte Oberfläche des Gelenkknorpelimplantates zeigt im Bild nach unten.
- B)** Ausschnitt aus A aus der oberflächlichen Schicht des Gelenkknorpelimplantates: Exemplarisch sind runde bzw. an der Oberfläche ovale Chondrozyten mit einem basophilen Knorpelhof (→) markiert. Die oberflächliche Extrazellulärmatrix ist ungleichmäßig deutlich basophiler angefärbt als die hyaline Grundsubstanz.
- C)** Ausschnitt aus A aus der tiefen Schicht des Gelenkknorpelimplantates: Exemplarisch sind runde Chondrozyten mit einem basophilen Knorpelhof (→) und territorialer Matrix markiert, die einzeln oder als isogene Gruppen sog. Chondrone bzw. Territorien auftreten. Die interterritoriale Matrix ist heller angefärbt.

3.1.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf apoptotische Prozesse im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe

Der Einfluss von IL-1 auf apoptotische Prozesse in den beiden Gewebetypen wurde durch die histologische Beurteilung der Zellkernmorphologien untersucht. Hierzu wurden konservierte Gewebeschnitte mit Mayer's Hämalaun-Lösung angefärbt und anschließend der Anteil von kondensierten Zellkernen und derer mit Kernblebbing (morphologisches Korrelat der Apoptose) an der Gesamtzellzahl bestimmt (s. Abb. 3.3).

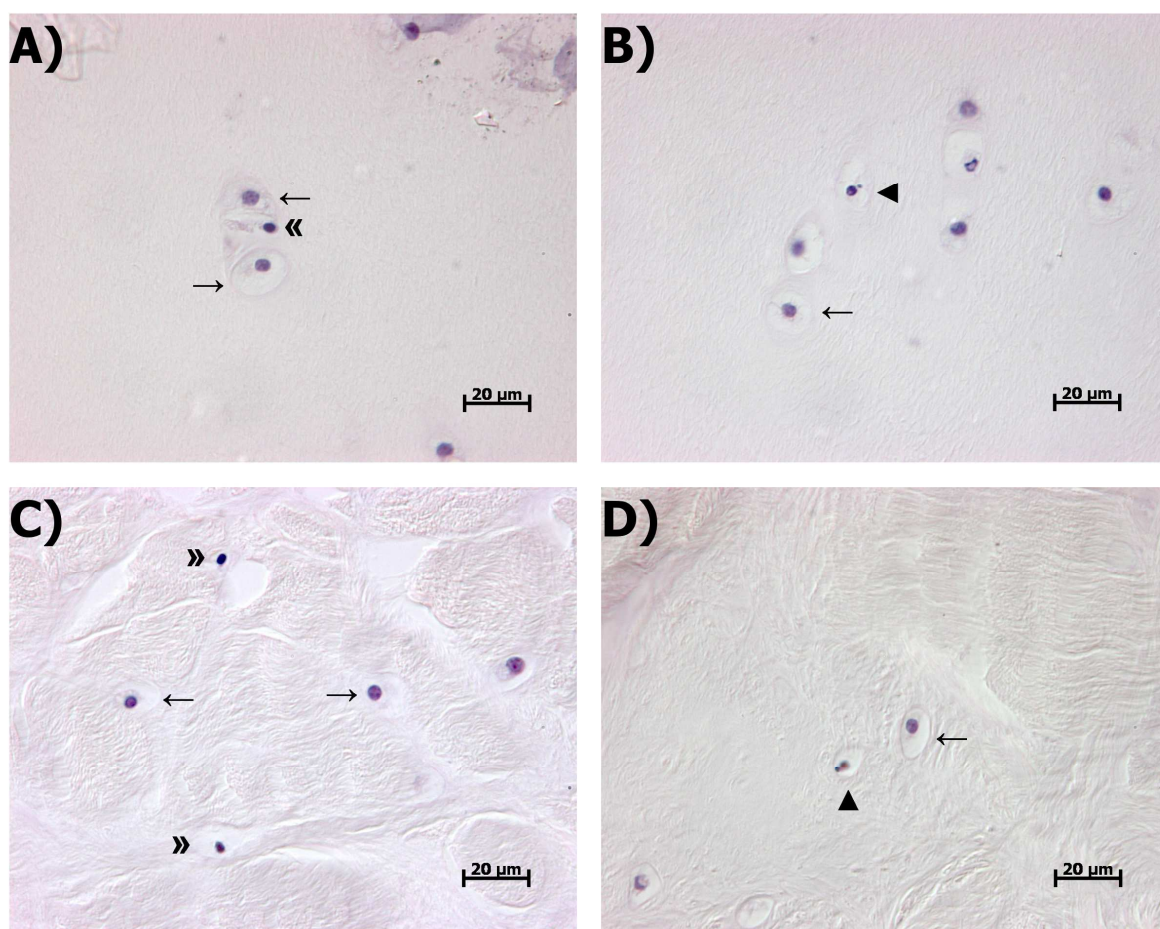


Abb. 3.3| Lichtmikroskopische Darstellung von Beispielen normaler, kondensierter und im Prozess des Kernblebbings befindlicher Zellkerne im Gelenkknorpel- und Meniskusgewebe (Färbung mit Mayer's Hämalaun-Lösung)

Histologischer Schnitte von Gelenkknorpel- (A+B) und Meniskus- (C+D) Geweben mit morphologisch unauffälligen Zellkernen (→), kondensierten Zellkernen (») sowie Zellkernen mit Kernblebbing (▲).

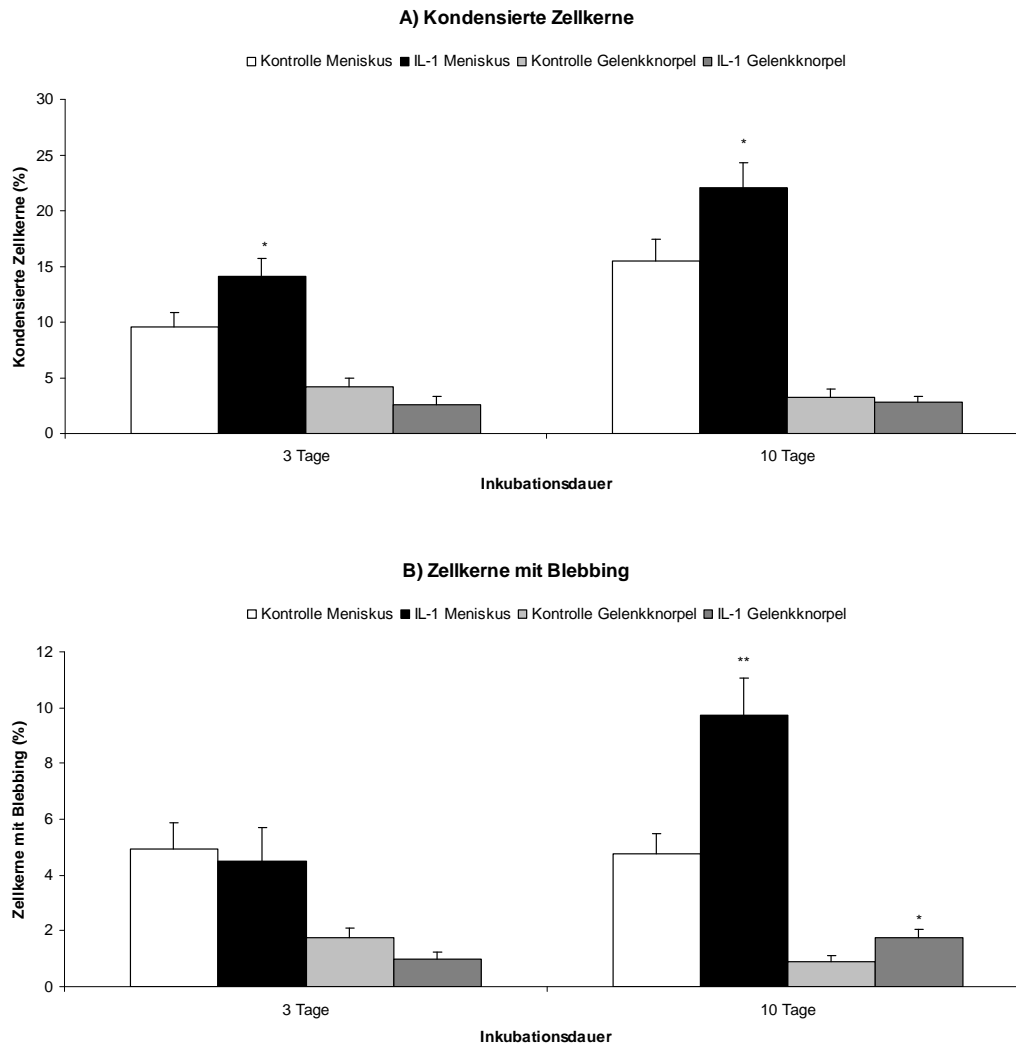


Abb. 3.4| Einfluss von IL-1 auf apoptotische Prozesse im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe

Meniskus- und Gelenkknorpel explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert. Nach der Stimulation wurde histologisch der Anteil von kondensierten (A) und Zellkernen mit Blebbing (B) als Anzeichen der Apoptose bestimmt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 12; aus 3 unabhängigen Experimenten)

*/**: Signifikanz aus T-Test (Vergleich zwischen Kontrolle und IL-1 zum selben Zeitpunkt); *:= p<0,05 und **:= p<0,001

Die Auswertung ergab, dass bereits im Kontrollgewebe ein Teil der Zellen kondensierte Zellkerne aufwies. In IL-1-stimulierten Meniskusexplantaten war bereits nach 3 Tagen der Anteil kondensierter Zellkerne mit 14% gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei zehntägiger Stimulation steigerte sich der Anteil auf 22%, war aber auch in der Kontrolle entsprechend um 5,9% gestiegen. Im Gelenkknorpel konnte nach den beiden Stimulationszeiträumen keine signifikanten Unterschiede im Anteil der kondensierten Zellkerne erfasst werden. Nach dreitägiger

IL-1-Stimulation lag der Anteil kondensierter Zellkerne bei 2,6% und war damit 1,5% geringer als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Bei zehntägiger Stimulation gab es einen 2,8%igen Anteil an kondensierten Zellkernen. Die entsprechende Kontrollgruppe wies mit 3,3% einen leicht höheren Wert auf (s. Abb. 3.4 **A**).

Bei der Auszählung der Zellkerne mit Blebbing zeigte sich in der dreitägigen Kontrollgruppe des Meniskusgewebes ein 4,9%iger Anteil an apoptotischen Zellen. Dieser Anteil blieb nach 10 Tagen mit 4,8% auf vergleichbarem Niveau, wohingegen sich bei Stimulation mit IL-1 im Meniskusgewebe der Anteil von 4,5% nach drei Tagen auf 9,7% nach zehntägiger Stimulation steigerte. Im Gelenkknorpelgewebe sank im Verlauf der Stimulation der Anteil apoptotischer Zellkerne in den Kontrollgruppen von 1,8% auf 0,8%. Dazu gegensätzlich stieg der Anteil in den stimulierten Gruppen von 1,0% auf 1,7% (s. Abb. 3.4 **B**).

3.2 Einfluss von IL-1 auf den GAG-Verlust

Um den durch IL-1 induzierten Abbau von Proteoglykanen im Meniskus- und Gelenkknorpel zu untersuchen, wurden die Gewebeexplantate mit 10ng IL-1/ml Kulturmedium stimuliert. Nach 3, 6 und 10 Tagen wurden die Kulturmedien gewechselt und mittels des DMMB-Tests (s. Kapitel 2.5) die freigesetzte Menge an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG in μg) bestimmt. Anschließend wurde die ermittelte GAG-Menge relativ zum Feuchtgewicht der Explantate (in mg) dargestellt. Frisch nach Probenentnahme aus den Rinderknien hatten die drei Meniskus- und die drei Gelenkknorpel-Explantate pro Reaktionsansatz durchschnittlich ein Gesamtfeuchtgewicht von $31,1 \pm 0,6$ mg und $28,7 \pm 0,3$ mg (Mittelwert + SF, je Gewebetyp n=128).

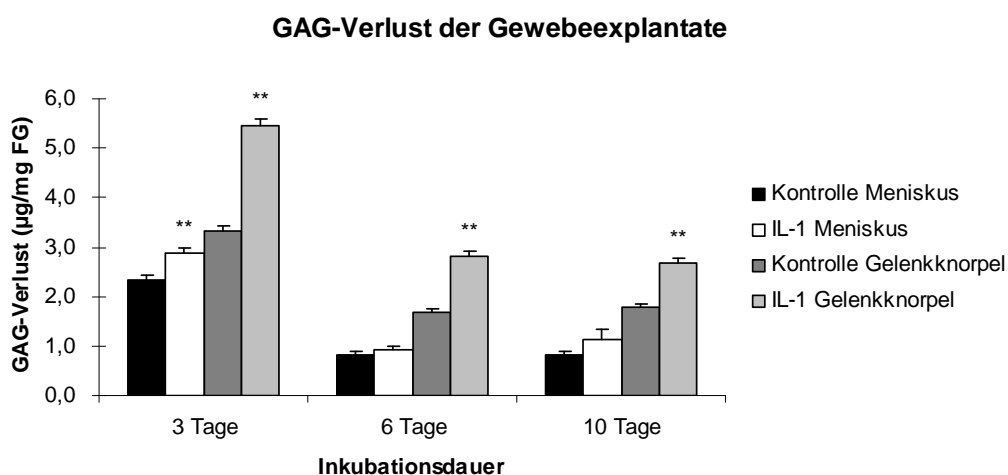


Abb. 3.5| GAG-Verluste von Meniskus- und Gelenkknorpel-Explantaten nach Stimulation mit IL-1
 Gewebeexplantate wurden 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3, 6 und 10 Tagen wurde die Menge an GAGs im Überstand photometrisch mittels DMMB-Reaktion bestimmt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 32; aus 8 unabhängigen Experimenten)

*/**: Signifikanz aus T-Test (Vergleich zwischen Kontrolle und IL-1 zum selben Zeitpunkt); *:= $p < 0,05$ und **:= $p < 0,001$

Nach dreitägiger Inkubation wiesen die mit IL-1 stimulierten Meniskusexplantate einen GAG-Verlust von $2,9 \pm 0,1 \mu\text{g GAG/mg FG}$ auf, der im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem GAG-Verlust von $2,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mg}$ signifikant erhöht war.

Die stimulierten Gelenkknorpel-explantate hatten nach drei Tagen bereits $5,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mg}$ verloren und damit einen 61%ig höheren GAG-Verlust als die Kontrollgruppe mit $3,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mg}$.

Nach 6 und 10 Tagen konnte in den stimulierten Proben mit $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mg}$ bzw. $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g/mg}$ nur eine geringe, unsignifikante Steigerung der GAG-Verlust im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemessen werden. Bei den Messungen in den Gelenkknorpelproben zeigte sich hingegen ein deutlich höherer, signifikanter GAG-Verlust von $1,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mg}$ in der Kontrollgruppe zu $2,8 \pm 0,1 \mu\text{g/mg}$ in der mit IL-1 stimulierten Probe. Nach 10 Tagen war der GAG-Verlust in der stimulierten Gruppe mit $2,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mg}$ im Hinblick auf die Kontrollgruppe um 66% erhöht.

Somit zeigten die Gelenkknorpel-explantate eine generell signifikant höhere Basisfreisetzung von GAG und die Steigerung derselben durch IL-1 war ebenfalls signifikant höher und länger andauernd (s. Abb. 3.5).

3.3 Histochemische Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf die Aggrecanase-Aktivität im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe

Fluoreszierende Antikörper gegen ein spezifisches Aggrecan-spaltfragment (NITEGE-Neoepitop) wurden genutzt, um den Einfluss von IL-1 auf den Proteoglykankatabolismus in den Geweben zu studieren. Dazu wurden aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen histologische Schnitte immunhistochemisch angefärbt (s. Kapitel 2.8.4) und mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Beurteilung und zum Vergleich der Fluoreszenzstärke erfolgten alle Aufnahmen bei gleicher Belichtungszeit (70 ms). Im Gelenkknorpel zeigten sich unabhängig von Stimulation und Inkubationsdauer keine bis sehr schwache, gesprenkelte Fluoreszenzen in der Extrazellulärmatrix. Deutlich fluoreszierende Signale konnten im Zytosol der Chondrozyten um die mit Bisbenzimid blau angefärbten Zellkerne beobachtet werden (s. Abb. 3.6).

Das Meniskusgewebe wies leicht verstärkte Fluoreszenzen im extrazellulären Gewebe in den IL-1-stimulierten Gruppen auf (s. Abb. 3.7). Es zeigte sich dabei eine Steigerung nach zehntägiger Inkubation. Die fluoreszierenden Signale waren gesprenkelt verteilt. Deutlichere Fluoreszenzen wurden wie im Gelenkknorpel im Zytoplasma der Zellen detektiert.

Da die Fluoreszenzstärken im Meniskusgewebe im Vergleich zu einer vorangegangenen Untersuchung mit IL-1 unerwartet gering waren, wurden ebenfalls Schnitte aus dieser Voruntersuchung, die jedoch mit einem ITS-freien Kulturmedium durchgeführt worden waren, gefärbt und fotografiert (s. Abb. 3.7 **E+F**). Die IL-1-stimulierte Gruppe zeigte hier sehr deutliche Fluoreszenzen im Extrazellulärraum um die quer angeschnittenen Kollagenfasern. Eine derartige Fluoreszenz konnte in der Kontrollgruppe nicht detektiert werden. In beiden Gruppen wurden deutliche Fluoreszenzsignale im Zytoplasma der Zellen beobachtet.

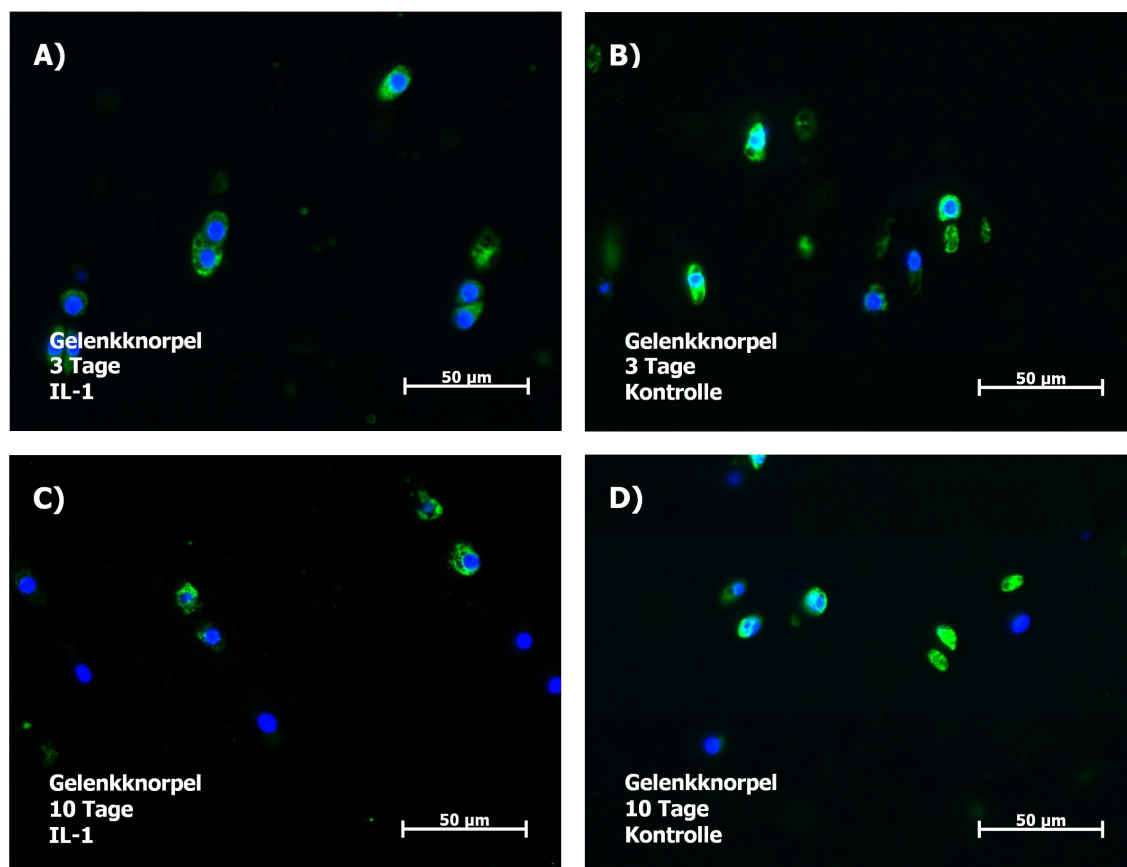


Abb. 3.6| Immunhistochemische Darstellung des Aggrekanase-spezifischen Aggrekanneo-epitops NITEGE in Gelenkknorpel-explantaten

Gelenkknorpel-explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3 und 10 Tagen immunhistochemisch auf die Existenz des Aggrekanspaltfragments NITEGE (grün) untersucht. Anfärbung der Zellkerne (blau) mit Bisbenzimid

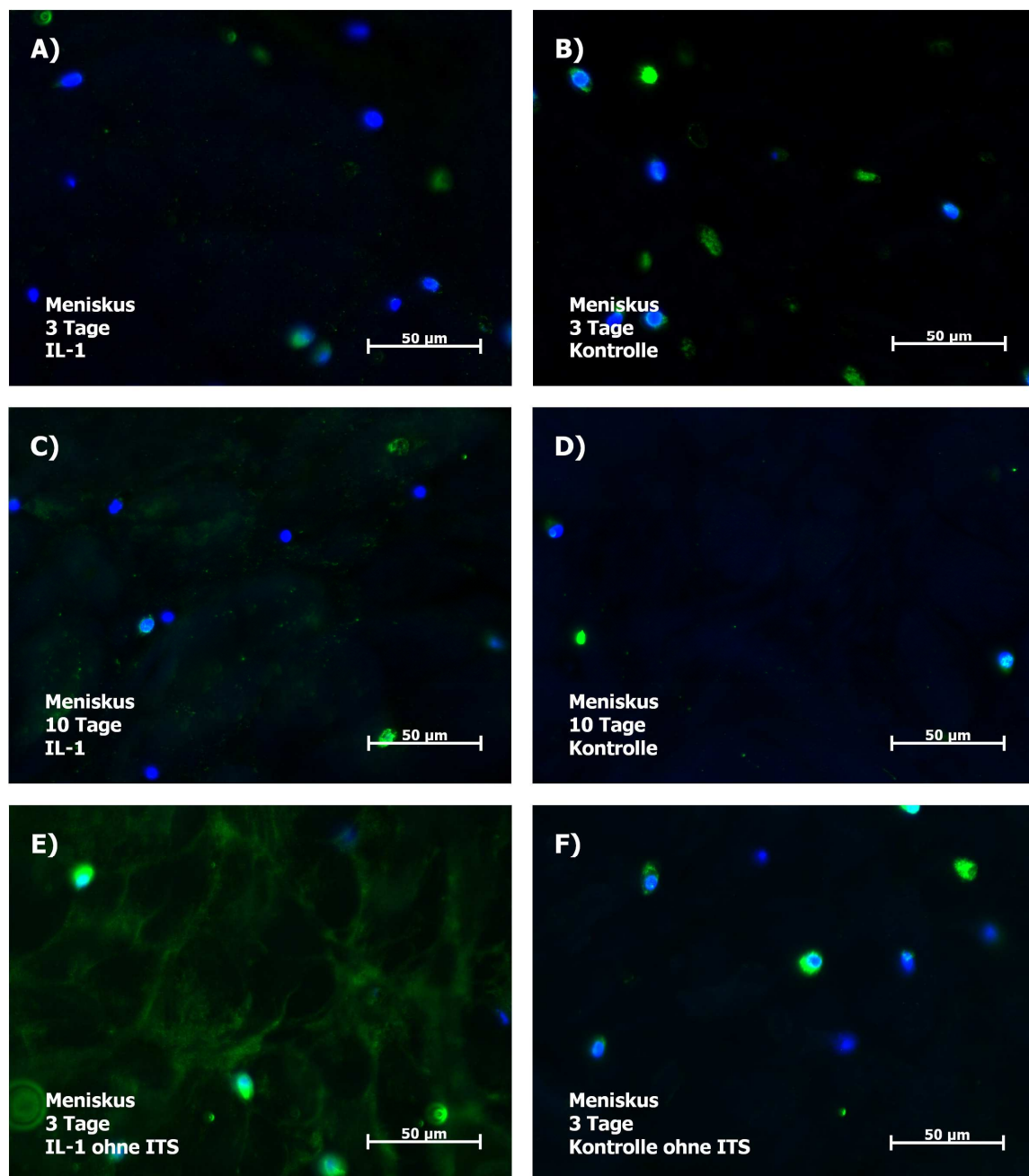


Abb. 3.7| Immunhistochemische Darstellung des Aggrekanase-spezifischen Aggrekanneoepitops NITEGE in Meniskusexplantaten

Meniskusexplantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3 und 10 Tagen immunhistochemisch auf die Existenz des Aggrekanspaltfragments NITEGE (grün) untersucht. (A-D) Zusätzlich wurden Meniskusexplantate, die in vorangegangenen Experimenten 3 Tage mit und ohne IL-1 in einem ITS-freien Kulturmedium inkubiert wurden, auf NITEGE-Neoepitope untersucht. (E+F). Anfärbung der Zellkerne (blau) mit Bisbenzimid

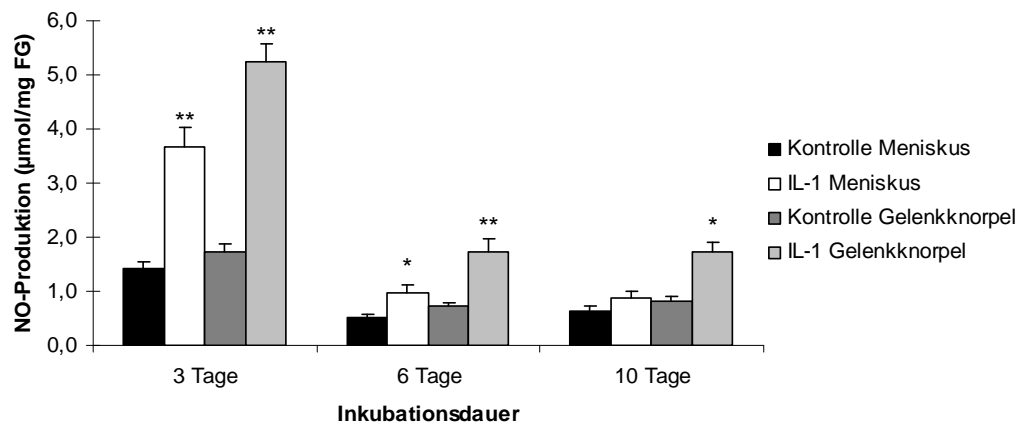
3.4 Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion im Gewebe

Stickstoffmonoxid (NO) gilt als ein wichtiger Mediator innerhalb der IL-1 Signalkaskade. Daher wurde der Einfluss der IL-1 Stimulation auf die NO-Produktion in den Gewebetypen durch Nachweis des stabilen Reaktionsproduktes Nitrit (NO_2^-) mit Hilfe des Griess-Reagenz untersucht (s. Kapitel 2.6). Die in den Kulturüberständen ermittelten Nitritkonzentrationen bzw. ursprünglichen NO-Konzentrationen wurden relativ zum Feuchtgewicht der Explantate dargestellt.

Nach dreitägiger Inkubation zeigte die mit IL-1 stimulierte Gruppe der Meniskusexplantate mit $3,7 \pm 0,4 \mu\text{mol Nitrit} / \text{mg Feuchtgewicht}$ eine um den Faktor 2,6 erhöhte NO-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $1,4 \pm 0,1 \mu\text{mol/mg}$ (Mittelwert \pm SF). Untersuchte Proben nach sechstägiger Stimulationsdauer waren mit $1,0 \pm 0,2 \mu\text{mol/mg}$ deutlich niedriger, wiesen aber immer noch eine signifikante Erhöhung in Bezug zur Kontrollgruppe auf. Nach 10 Tagen war in der stimulierten Gruppe mit Meniskusexplantaten ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol/mg}$) und der Kontrolle ($0,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/mg}$) kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar.

Die Untersuchung der Kulturüberstände der Gelenkknorpel-explantate zeigte im Verhältnis zum Meniskusgewebe generell höhere Werte. Nach 3 Tagen IL-1-Stimulation war die NO-Produktion mit $5,2 \pm 0,3 \mu\text{mol/mg}$ im Hinblick auf die Kontrollgruppe ($1,7 \pm 0,2 \mu\text{mol/mg}$) signifikant erhöht. Auch in den Kulturüberständen nach sechstägiger und zehntägiger Stimulation konnte mit jeweils $1,7 \pm 0,2 \mu\text{mol/mg}$ eine mehr als doppelt so hohe NO-Produktion im Vergleich zu den Kontrollgruppen gemessen werden, wenn auch – wie im Meniskusgewebe – die Konzentration mit der Kultivierungszeit abnahm. Im Bezug zu den Meniskusexplantaten war die NO-Produktion in den stimulierten Gelenkknorpel-explantaten nach 3 Tagen um 40% und nach 10 Tagen um 88% erhöht (s. Abb. 3.8).

Einfluss von IL-1 auf NO-Produktion

**Abb. 3.8| Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion in Meniskus- und Gelenkknorpel-explantaten**

Gewebeexplantate wurden 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3, 6 und 10 Tagen die Produktion von Nitrit in den Kulturüberständen mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 12; aus 3 unabhängigen Experimenten)

*/**: Signifikanz aus T-Test (Vergleich zwischen Kontrolle und IL-1 zum selben Zeitpunkt); *:= p<0,05 und **:= p<0,001

3.5 Einfluss von IL-1 auf den Gehalt von Hydroxyprolin im Kulturüberstand

Um den Einfluss von IL-1 auf den Kollagenabbau und die damit verbundene Freisetzung von Kollagenfragmenten in die Kulturüberstände zu bestimmen, wurde ein Test etabliert, der mittels der pDMBA-Reaktion, wie in Kapitel 2.7 beschrieben, die Konzentration der Kollagen-spezifischen Aminosäure Hydroxyprolin bestimmt.

Nach Lösen von 5mg Hydroxyprolin in 5ml frisch angesetzttem Kulturmedium und Herstellung einer Verdünnungsreihe konnte eine lineare Dosis-Wirkungskurve für den Hydroxyprolintest erstellt werden, womit die Reliabilität des Tests belegt war (s. Abb. 3.9).

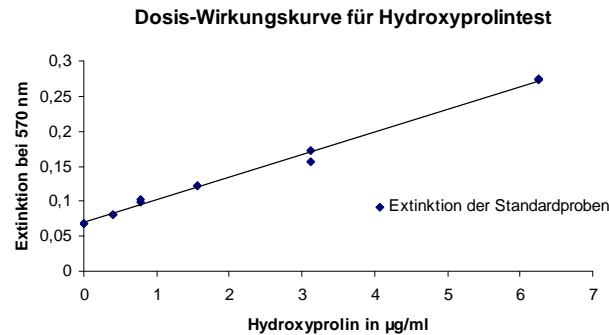


Abb. 3.9| Standard-Wirkungskurve für Hydroxyprolintest

5mg Hydroxyprolin wurden in 5ml Kulturmedium gelöst und eine Verdünnungsreihe bis auf eine Konzentration von 0,39 µg Hydroxyprolin / ml Kulturmedium hergestellt. Nach Durchführung der pDMBA-Reaktion wurde die Extinktion der Standardproben photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

Die Untersuchung der Kulturüberstände der kultivierten Meniskus- und Gelenkknorpel explantate zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten Proben und der jeweiligen Kontrollgruppe (s. Tabelle 3.1).

Inkubationsdauer	Probentyp	Meniskus	Gelenkknorpel
3 Tage	Kontrolle	19,4	15,8
	IL-1	7,9	11,1
10 Tage	Kontrolle	24,5	18,8
	IL-1	12,6	14,9

Tabelle 3.1| Kumulative Hydroxyprolinmenge in Kulturüberstand / Feuchtwicht (ng/mg FG)

Meniskus- und Gelenkknorpel explantate wurden 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3 und 10 Tagen wurde die Menge an Hydroxyprolin im Überstand mittels pDMBA-Reaktion photometrisch bestimmt.

Mittelwerte (n = 9; aus 3 unabhängigen Experimenten)

3.6 Zymografische Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf die Expression von Matrixmetalloproteasen in den Gewebeproben auf Proteinebene

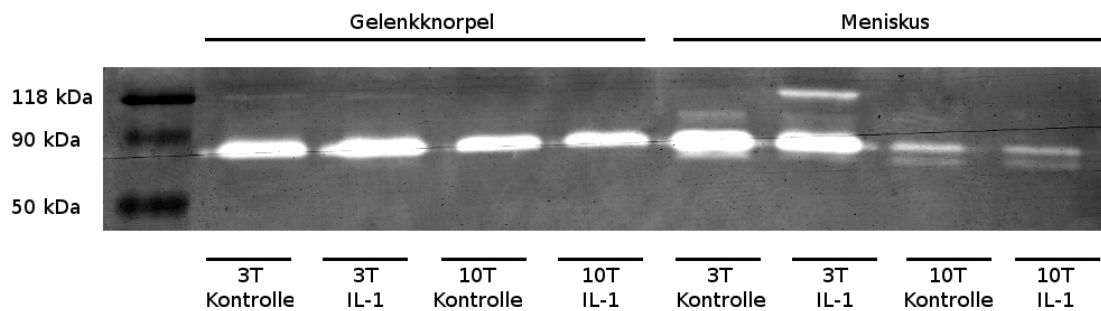
Die potentielle Aktivierung bzw. Induktion der Expression von MMPs auf Proteinebene wurde mittels zymografischer Analysen untersucht. Die in den Überständen befindlichen Proteine wurden dafür elektrophoretisch ihrer Molekülgröße entsprechend aufgetrennt. Gleichzeitig wurde ihre enzymatische

Aktivität durch die Beisetzung eines speziellen Substrates (in diesen Fällen Gelatine und Casein) zu dem Elektrophoresegel studiert. Alle in dieser Arbeit untersuchten MMPs (MMP-1, -2, -3, 9, -13) sind in ihrer aktiven Form und inaktiven Pro-Form in der Lage Gelatine enzymatisch zu verdauen. Casein kann dagegen nur durch (pro-) MMP-1 und -3 sowie pro-MMP-13 gespalten werden.[75, 94, 95]

Die Gelatine-Zymogramme wiesen in allen Probenotypen eine deutliche Aufhellung im Molekulargewichtsbereich von pro-MMP-2 (66 kDa) und darüber auf (Abb. 3.10). Bei den 3 Tage stimulierten Gelenkknorpel-Proben als auch bei allen Proben vom Meniskus konnte weiterhin eine zarte weiße Band darunter beobachtet werden, die MMP-2 (62 kDa) zugeschrieben wurde. Das Bandenmuster der 10 Tage stimulierten Meniskusproben und das der dazugehörigen Kontrollgruppe war im Bereich von pro-MMP-2 verglichen zu den anderen Proben abgeschwächt und das MMP-2 zugeordnete Bandenmuster von allen Proben das markanteste. Dies wurde als Anzeichen für eine möglicherweise zeitabhängige und IL-1-unabhängige Aktivierung von MMP-2 im Meniskusgewebe gewertet. Die weiteren Aufhellungen im Gelatine-Zymogramm im Molekulargewichtsbereich von 107 kDa und 120 kDa konnten keinem der untersuchten MMPs zugeordnet werden, zeigten aber, dass es im Meniskusgewebe nach 10 Tagen zur Expression eines Gelatine-spaltenden Enzyms kommt, die im Gelenkknorpel nicht entsprechend vorliegt (s. Abb. 3.10 **A**).

In dem Casein-Zymogramm zeigten sich nur bei den mit IL-1 stimulierten Gelenkknorpel-Proben im Gel zwei sehr helle Banden getrennt von einem dunklen Zentrum bei ca. 55 kDa. Diese ließen auf das Vorhandensein von MMP-3 (57 kDa) und pro-MMP-3 (45 kDa) schließen. Bei der verdunkelten Zone handelte es sich vermutlich um eine Ansammlung von noch aktiven Enzymen zwischen dem gespaltenen Substrat. Entgegen den Proben aus den Kontrollgruppen wiesen auch Proben mit zehntägiger IL-1-Stimulationsdauer etwas abgeschwächt dieses Bandenmuster auf. Bei stimulierten Proben aus Meniskusgewebe konnte eine vergleichbare Aufhellung im Gel nur sehr abgeschwächt beobachtet werden (s. Abb. 3.10 **B**).

A) Gelatine-Zymogramm



B) Casein-Zymogramm

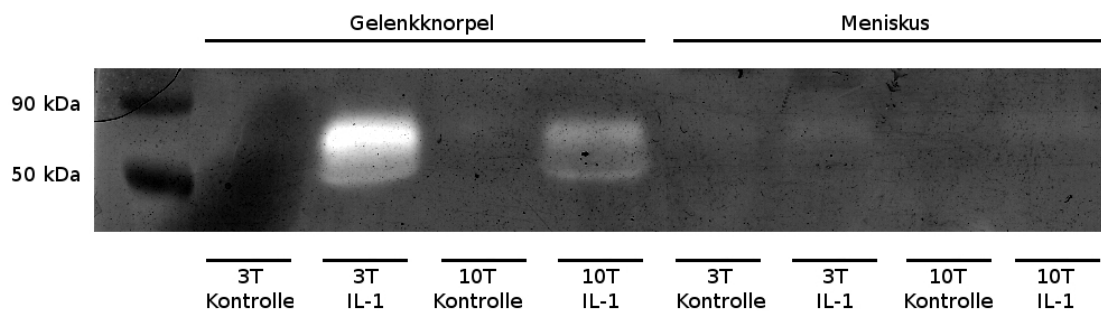


Abb. 3.10| Zymografische Analyse der Kulturüberstände von Gewebeexplantaten

Gelenkknorpel- und Meniskus-explantate wurden 10 Tage (T) ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert. Nach jeweils 3 und 10 Tagen wurden Proben der Kulturüberstände mit Gelatine-Zymogrammen (A) und Casein-Zymogrammen (B) auf matrixabbauende Enzyme untersucht. Die schwarzen Banden im linken Rand der Abbildung stellen den Molekulargewichtsstandard dar.

3.7 Einfluss von IL-1 auf die Transkription von matrixdegradierenden Enzymen und deren Substraten

Mittels der SYBR® Green Real-time RT-PCR (s. Kapitel 2.9) wurde die Transkription der matrixdegradierenden Enzyme MMP-1, -2, -3, -9, -13 sowie ADAMTS-4 und deren Substrate Aggrekan und Kollagen Typ II untersucht. Des Weiteren wurde die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in den Gewebeproben bestimmt. Unter der ursprünglichen Annahme, dass das Housekeeping-Gen GAPDH in den Gewebetypen unabhängig von der Stimulation mit IL-1 konstant exprimiert wird, wurde in der Auswertung die Fluoreszenzstärke der zu untersuchenden Ziel-Gene auf die des GAPDHs bezogen.

Die Betrachtung der C_T -Werte von GAPDH zeigte einen Anstieg in den 10 Tage inkubierten Explantaten der Gelenkknorpel-Kontrollgruppen (s. Abb. 3.11). Dieser

erhöhte C_T -Wert hatte bei der Berechnung der Relativen Zielmengen einen verkleinernden Einfluss auf die Werte der 10 Tage Gelenkknorpel-Proben. Für die Abbildung der errechneten Relativen Zielmengen der untersuchten Gene wurden die Werte im Verhältnis zu dem Housekeeping-Gen GAPDH (=1) logarithmisch dargestellt.

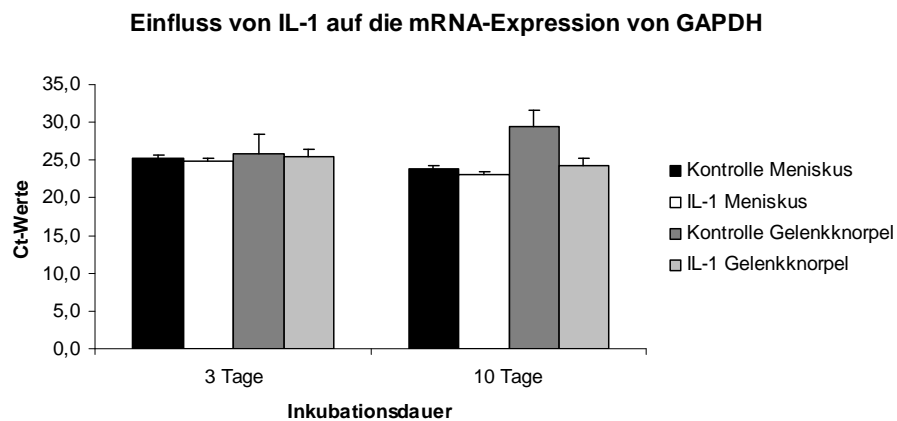


Abb. 3.11| C_T -Werte des Housekeeping-Gens GAPDH und dem Einfluss von IL-1 in den Gewebeproben

Meniskus- und Gelenkknorpel-explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3 und 10 Tagen die mRNA-Expression mittels Real-time RT-PCR untersucht.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 5; aus 5 unabhängigen Experimenten)

Aufgrund der Auffälligkeit bei der Expression von GAPDH wurde zur Kontrolle die Expression von 18S rRNA, eines weiteren etablierten Housekeeping-Gens, bestimmt. Auch hier zeigten die C_T -Werte einen Anstieg in den 10 Tage inkubierten Explantaten der Gelenkknorpel-Kontrollgruppen (s. Abb. 3.12).

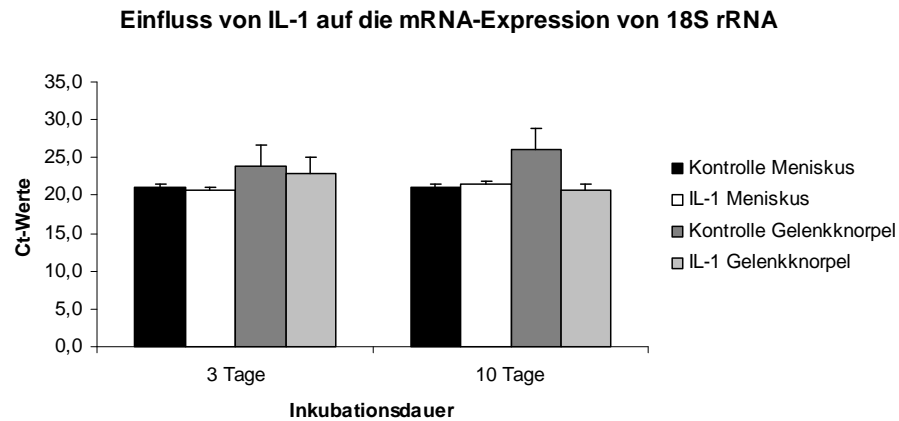
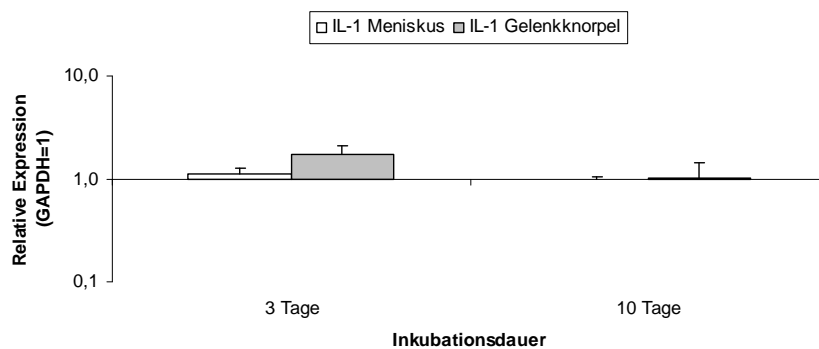


Abb. 3.12| CT-Werte des Housekeeping-Gens 18S rRNA und dem Einfluss von IL-1 in den Gewebeproben

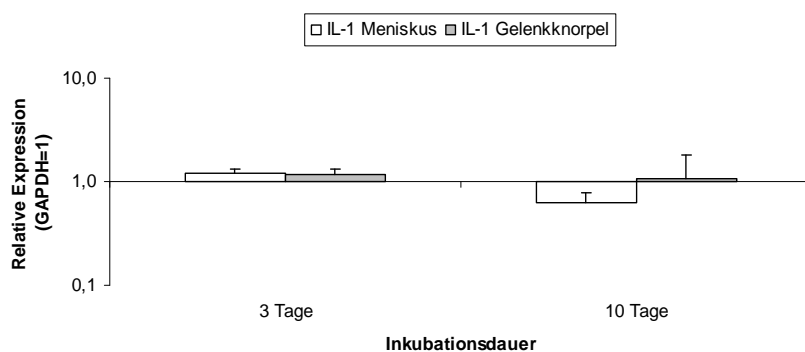
Meniskus- und Gelenkknorpel explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3 und 10 Tagen die mRNA-Expression mittels Real-time RT-PCR untersucht.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 5; aus 5 unabhängigen Experimenten)

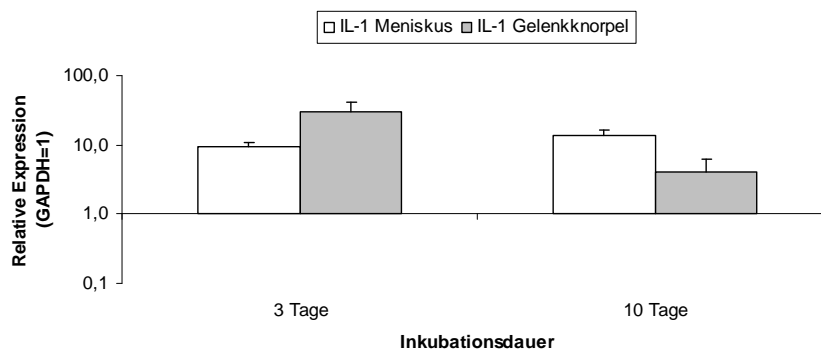
A) Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Expression von MMP-1



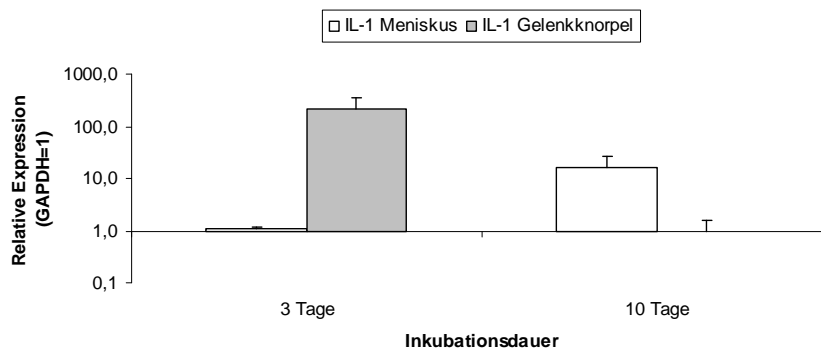
B) Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Expression von MMP-2



C) Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Expression von MMP-3



D) Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Expression von MMP-13



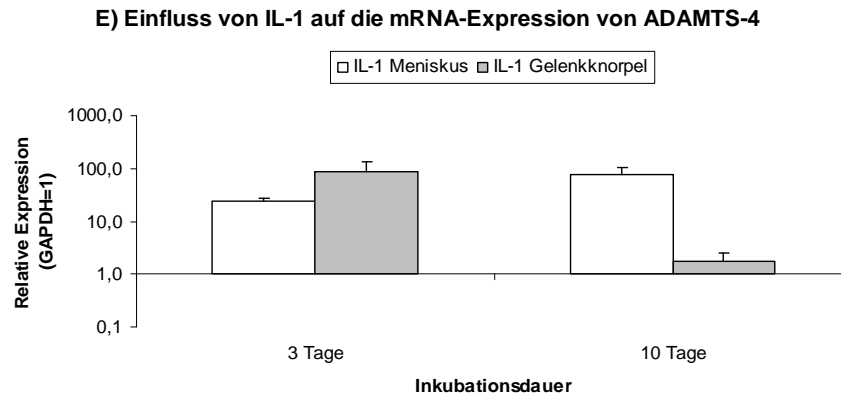


Abb. 3.13| Einfluss von IL-1 auf die Transkription von matrixdegradierenden Enzymen

Meniskus- und Gelenkknorpel-explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils nach 3 und 10 Tagen die mRNA-Expression der matrixabbauenden Enzyme MMP-1 (A), MMP-2 (B), MMP-3 (C), MMP-13 (D) und ADAMTS-4 (E) mittels Real-time RT-PCR untersucht. Die Relative Zielmenge der exprimierten Gene in den stimulierten Gewebeproben wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet und im Verhältnis zu GAPDH (=1) dargestellt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 5; aus 5 unabhängigen Experimenten)

Bei der Untersuchung der IL-1-abhängigen Transkription von MMP-1 konnte für beide Gewebetypen nach drei Tagen eine leichte Erhöhung gemessen werden. IL-1 bewirkte bei zehntägiger Kultivierung im Meniskusgewebe eine leicht reduzierte Transkription von MMP-2. Bei kürzerer Inkubation und im Gelenkknorpel war die Transkription hingegen gering erhöht. Ubiquitär konnte für MMP-3 eine erhöhte Gentranskription detektiert werden. Das Maximum lag bei einer 29-fach erhöhten Zielmenge für MMP-3 im Gelenkknorpel nach dreitägiger Stimulation. Eine Transkription von MMP-9 konnte nur sehr vereinzelt gemessen werden. Aufgrund dessen konnte keine Berechnung der Zielmengen durchgeführt werden. Eine extrem verstärkte Transkription von MMP-13 (218-fach) wurde nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen im Gelenkknorpel festgestellt. Nach 10 Tagen konnten hingegen keine Transkriptionsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Im Meniskusgewebe war MMP-13 nach zehntägiger Kultivierung um das 17-Fache hochreguliert. Die Untersuchung von ADAMTS-4 ergab eine IL-1-erhöhte Transkriptionsrate im Meniskus für beide Stimulierungszeiträume. Dabei war die Erhöhung nach 10 Tagen deutlich stärker. In den Gelenkknorpel-explantaten konnte eine deutlich verstärkte Expression lediglich nach 3 Tagen festgestellt werden (s. Abb 3.13).

Die Proteine Aggrekan und Kollagen Typ II sind wichtige Bestandteile der Extrazellulärmatrix im Gelenk- und Faserknorpel. Zugleich sind sie Substrate der untersuchten MMPs und von ADAMTS-4. Die mRNA für Aggrekan wurde in beiden Geweben vermindert exprimiert. Lediglich nach 10 Tagen konnten im Gelenkknorpel zwischen Stimulation und Kontrolle keine Unterschiede festgestellt werden. Auch für Kollagen Typ II wurde eine reduzierte Transkription in beiden Gewebearten detektiert. Die geringste Expression wiesen hier Proben aus dem Meniskus nach zehntägiger Stimulation auf (s. Abb 3.14).

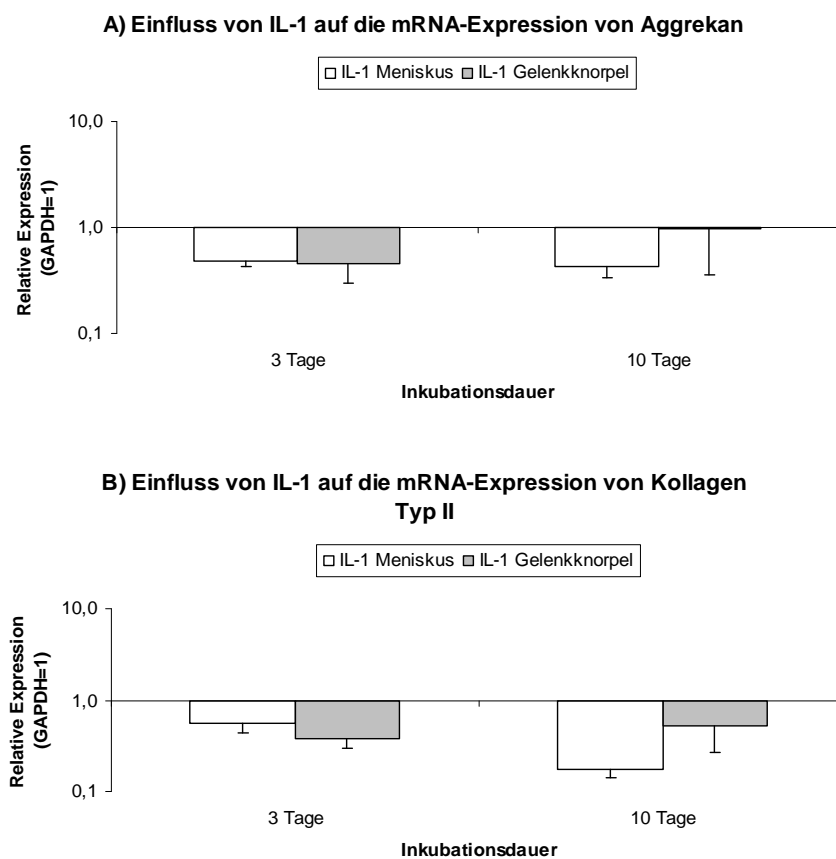


Abb. 3.14| Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Transkription von ausgewählten Matrix-Proteinen

Meniskus- und Gelenkknorpel explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils nach 3 und 10 Tagen die mRNA-Transkription der prädominanten Matrixproteine Aggrekan (A) und Kollagen Typ II (B) mittels Real-time RT-PCR untersucht. Die Relative Zielmenge der exprimierten Gene in den stimulierten Gewebeprobe wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet und im Verhältnis zu GAPDH (=1) dargestellt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 5; aus 5 unabhängigen Experimenten)

Die Untersuchung der iNOS zeigte nach 3 Tagen in beiden Gewebetypen eine erhöhte Expression, die sich im Verlauf der Inkubation insbesondere im Gelenkknorpel verringerte (s. Abb. 3.15).

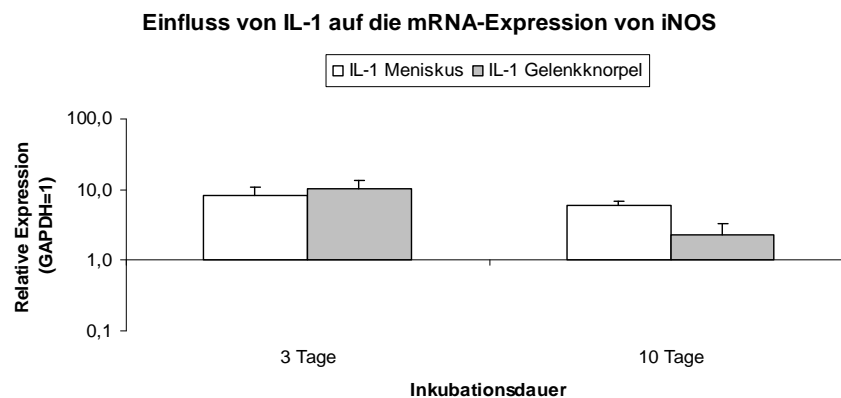


Abb. 3.15| Einfluss von IL-1 auf die mRNA-Transkription der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Meniskus- und Gelenkknorpel explantate wurden 3 und 10 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils nach 3 und 10 Tagen die mRNA-Transkription der iNOS mittels Real-time RT-PCR untersucht. Die Relative Zielmenge der exprimierten Gene in den stimulierten Gewebeproben wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet und im Verhältnis zu GAPDH (=1) dargestellt. Mittelwerte + Standardfehler (n = 5; aus 5 unabhängigen Experimenten)

4 Diskussion

Die Menisken haben im Kniegelenk eine maßgebliche Funktion bei der tibiofemuralen Gewichtsübertragung, Stoßabsorption und der Schmierung des Gelenkes. Sie verteilen die Kraftübertragung und entlasten somit den Gelenkknorpel. In Kniegelenken, in denen die Menisken entfernt wurden, erhöhte sich der Druck auf den Gelenkknorpel um das Zwei- bis Dreifache. Langfristig führt dies zu einer Schädigung und Funktionseinschränkung des Gelenkes. Es ist daher von großem Interesse die strukturelle und damit funktionelle Integrität der Menisken und des Gelenkknorpels zu erhalten. Um dies zu erreichen müssen unter anderem die Pathomechanismen von degenerativen Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrose und rheumatoider Arthritis besser verstanden werden. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 hat als Mediator einen zentralen Einfluss auf die Degeneration. Es bewirkt im Gewebe den Wechsel von der Produktion von Matrixmolekülen hin zu matrixdegradierenden Enzymen.

Um diese Prozesse zu untersuchen und dabei die beiden zentralen artikulierenden Gewebearten, Meniskusgewebe und hyalinen Gelenkknorpel, zu vergleichen sowie anhand des bereits genauer untersuchten Gelenkknorpels Rückschlüsse auf das Meniskusgewebe zu ziehen, wurden die Gewebe im Rahmen dieser Arbeit mit IL-1 stimuliert.

Einfluss von IL-1 auf die Apoptoserate im Gewebe

Mehrere in vivo-Studien haben die Zunahme von apoptotischen Chondrozyten im Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Osteoarthrose beschrieben.[96–98] Eine erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellen konnte Hashimoto et al. auch im Meniskus und Gelenkknorpel mit einem experimentellen OA-Modell zeigen.[57, 99] In vitro-Studien mit IL-1 β haben dessen apoptotischen Effekt auf humane Chondrozyten gezeigt.[100–102] Es ist noch nicht ausreichend geklärt, wie das erhöhte, IL-1-induzierte NO für die gesteigerte Apoptoserate in Chondrozyten verantwortlich ist. Untersuchungen mit einer Kombination aus TNF- α /IL-1 führten zu der Folgerung, dass erhöht endogen produziertes NO die

Anfälligkeit der Zellen für oxidative Verletzungen erhöht.[103] Da im Rahmen dieser Arbeit erhöhte Menge an NO nachgewiesen wurden und auch der apoptotische Einfluss von NO [104] bereits bekannt ist, wurde ein möglicherweise (in)direkter proapoptotischer Effekt von IL-1 untersucht.

Im Meniskusgewebe zeigte sich dabei im Gegensatz zum Gelenkknorpel ein signifikant erhöhter Anteil von kondensierten Zellkernen nach drei- und zehntägiger Inkubation sowie ein signifikant deutlich erhöhter Anteil von Zellkernen mit Blebbing nach zehntägiger Inkubation. Damit konnte erstmals ein durch IL-1 induzierter, proapoptotischer Effekt im Meniskusgewebe gezeigt werden. Die verfügbaren Daten erklären jedoch nicht, weshalb nach dreitägiger Inkubation in den stimulierten Meniskusexplantaten keine Erhöhung des Anteils von Zellkernen mit Blebbing nachzuweisen ist und weshalb die Kontrollgruppen zunehmend kondensierte Zellkerne aufweisen. Es hat hier den Anschein, als wenn das Meniskusgewebe unter den Versuchsbedingungen mehr strapaziert wird als der Gelenkknorpel. Aufzuklären ist zudem, in welchem Zusammenhang die Zunahme des Zelltods mit der Abnahme der NO-Produktion im zeitlichen Verlauf steht.

Einfluss der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die Untersuchungsergebnisse

Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen zur Matrixdegeneration im Meniskusgewebe in unserer Arbeitsgruppe [75] wurde bei den Versuchen ein serumfreies Kulturmedium genutzt. Aufgrund der Kultivierungsdauer von bis zu 10 Tagen wurde im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen dem Medium ITS Liquid Media Supplement (100x) hinzugefügt. ITS enthält laut Herstellerangaben 1,0 mg/ml rekombinantes humanes Insulin, 0,55mg/ml humanes Transferrin sowie 0,5µg/ml Natriumselenit.[105] ITS erhöht die Zellaktivität und Proliferation im serumfreien Medium. Der Einsatz dieses Zusatzes ist bei der Langzeitkultivierung von Knorpelxplantaten und Chondrozyten etabliert.[106, 107] Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe, bei denen das gleiche Kulturmedium ohne ITS-Zusatz genutzt wurde, dass ITS die IL-1-induzierten Effekte minimiert. Deutlich stellte sich dies unter anderem bei den Untersuchungen zu Expression von

matrixdegradierenden Enzymen auf Proteinebene mittels Casein- und Gelatine-Zymogrammen sowie bei den histochemischen Untersuchungen zur Aggrecanase-Aktivität im Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe dar.

Es bleibt zu klären, welcher der drei Inhaltsstoffe von ITS für diesen Effekt verantwortlich ist. Möglicherweise hat das enthaltene Spurenelement Selen über die Glutathionperoxidase durch die Reduzierung des oxidativen Stress einen protektiven Einfluss auf das Gewebe.[108] Diese Hypothese unterstützen auch Forschungsergebnisse zur Pathogenese der Kaschin-Beck-Krankheit (nutritive Gelenkknorpeldegeneration). Selen verringerte hier die mRNA-Expression von MMP-13 und senkte des Weiteren die Expression von Kollagen Typ II in Chondrozyten.[109] Ein anti-inflammatorischer Effekt des Selens wird auch von Cheng et al. diskutiert. Diese zeigten, dass Selen in isolierten Chondrozyten die Expression der IL-1-induzierten iNOS inhibiert und korrespondierend dazu auch die NO-Freisetzung senkt.[110] Zuvor war beschrieben worden, dass Selen in Chondrozyten die IL-1-induzierte Expression von MMP-1 und ADAMTS-4 unterdrückt und auf mRNA-Level den inhibitorischen Effekt von IL-1 auf Kollagen Typ II und Aggrecan vermindert.[111] Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass der Zusatz von Selen in Chondrozyten die Aggrecan-Expression unterstützt und die Expression von ADAMTS-5 vermindert.[112] Untersuchungen an Ratten und Mäusen mit experimenteller, Antikörper-induzierter Arthritis haben gezeigt, dass eine selenreiche Ernährung die Anzahl der proinflammatorischen Zellen im Kniegelenk signifikant senkt. Auch wurde das Level an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β im periartikulären Gewebe durch die Selensubstitution bei Mäusen gesenkt.[113] Gräser et al. beschrieben einen protektiven Effekt von Selen in Kombination mit α -Tocopherol und Ascorbinsäure auf den mit Peroxiden induzierten Zelltod von Chondrozyten.[114]

Einfluss von IL-1 auf Degeneration der Extrazellulärmatrix

Die Untersuchungen zum GAG-Verlust der Meniskus- und Gelenkknorpelimplantate zeigten eine zeitabhängige und durch IL-1 verstärkte Freisetzung von GAGs aus den Geweben. In den ersten 3 Tagen war der GAG-Verlust am stärksten. Diese Daten stehen in Einklang mit anderen Studien, die die Auswirkungen einer IL-1-Stimulation

auf Meniskusgewebe [75, 86] und Gelenkknorpelgewebe [115–119] untersuchten. Das erhöhte Level an GAG-Verlusten im Gelenkknorpel im Vergleich zum Meniskus basiert vermutlich auf der Tatsache, dass der Gelenkknorpel einen weit höheren Gehalt an PGs hat.[12, 19, 120] Auch könnte die erhöhte Zelldichte und unterschiedliche Zellpopulation im Gelenkknorpel verglichen zum Meniskusgewebe eine Erklärung für die stärkere Reaktion auf IL-1-Stimulation im Gelenkknorpel sein. Pratta et al. haben am bovinen Knorpel gezeigt, dass der enzymatische Abbau von Aggrecan dem von Kollagen zeitlich vorausgeht und dass Aggrecan daher eine protektive Funktion bei der Degradation des Knorpels übernimmt. Ab dem 12. Tag der Kultivierung wurde eine deutliche Zunahme an Hydroxyprolin im Kulturmedium als Anzeichen für die Degradierung von Kollagen beschrieben.[121] Palmer et al. zeigten bereits ab dem 4. Tag einen Beginn des Kollagenabbaus. Mit einer im Vergleich zweifach erhöhten IL-1-Konzentration (20ng/ml) wurden z.B. am zehnten Inkubationstag eine Kollagenfreisetzung von ca. 60µg pro Explantat gemessen.[122] Im Meniskusgewebe von ein bis zwei Wochen alten Rindern zeigten Wilson et al. ab dem 4. Kultivierungstag einen erhöhten Kollagenabbau.[86] In der vorliegenden Arbeit konnten in dem zehntägigen Untersuchungszeitraum keine Anzeichen für einen erhöhten Kollagenabbau in beiden Geweben in den Kulturüberständen nachgewiesen werden. Die gemessenen Hydroxyprolinmengen lagen um oder auch unterhalb des Detektionslimits von 15ng/Probe des photometrischen Nachweisverfahrens. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen am hyalinen Knorpel, welche in den ersten zwei Wochen der Kultivierung keine nachweisbare Freisetzung von Kollagen Typ II beschreiben. Erst ab der 3. Woche zeigte sich hier ein schneller Abbau der kollagenen Matrix.[117] Das im Meniskusgewebe anders als bei Wilson et al. kein Kollagenabbau nachgewiesen wurde, kann möglicherweise auch aus dem Altersunterschied der Meniskusproben resultieren. Die für die diese Arbeit verwendeten Rindermenisken stammten von deutlich älteren Tieren. Wilson et al. stimulierten die Meniskusexplantate zudem mit einer deutlich höheren IL-1-Konzentration von 20ng/ml und verwendeten ein DMEM-Kulturmedium ohne ITS-Zusatz. Die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zum Kollagenabbau lassen vermuten, dass die Kombination von ITS im Kulturmedium und IL-1 einen hemmenden Einfluss auf die Neusynthese und den enzymatischen Abbau von Kollagen hat. In weiterführenden Untersuchungen müsste die Kultivierungszeit eventuell noch verlängert werden, um bei einer IL-1-

Konzentration von 10ng/ml einen signifikanten Kollagenabbau in den Geweben zu detektieren.

Der immunhistochemisch untersuchte Abbau von Aggrekan durch die Enzyme ADAMTS-4 und ADAMTS-5, die das G1-Neoepitop NITEGE mit Glu³⁷³ am C-Terminus generieren [123], konnte in den mit IL-1 stimulierten Meniskusexplantaten nur gering erhöht beobachtet werden. Auch bei verlängerter Inkubationszeit zeigte sich nur eine geringe Mehransammlung von NITEGE-Fragmenten im Meniskusgewebe trotz stetiger Expression von ADAMTS-4 auf mRNA-Ebene. Lemke et al. und Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass bei dreitägiger Inkubation ohne ITS-Zusatz im Meniskus eine deutlich stärkere NITEGE-Ansammlung im Gewebe zu finden war.[75] Unter Umständen bewirkt im Meniskusgewebe der ITS-Zusatz eine Hemmung von ADAMTS-4 auf posttranslationaler Ebene. Die leichte Zunahme an Fluoreszenz nach zehntägiger Stimulation steht im Widerspruch zur abnehmenden GAG-Freisetzung. Eventuell ist die geringere GAG-Freisetzung durch ein vermehrtes Verbleiben von NITEGE im Gewebe erklärbar. Im Gegensatz zum Gelenkknorpel konnte eine Aggrekanase-Aktivität auch in der zellfernen Matrix beobachtet werden. Im Gelenkknorpelgewebe konnte zeit- und stimulationsunabhängig keine signifikanten NITEGE-Akkumulationen extrazellulär festgestellt werden. Die Beobachtungen im Gelenkknorpel unter dem Einfluss von IL-1 decken sich mit Ergebnissen von Fosang et. al, die bei dreitägiger Inkubation intrazellulär und perizellulär ebenfalls Fluoreszenzen beschreiben.[124] Allerdings konnten extrazellulär keine NITEGE-Ansammlungen detektiert werden, wie sie von Wilson et al. beschrieben wurden.[125] Der Selenzusatz im Kulturmedium könnte eine Erklärung für diese Diskrepanz liefern. Gestützt wird diese Hypothese durch bereits erwähnte Ergebnisse von Andriamanalijaona et al., die beschrieben, dass Selen in Chondrozyten die IL-1-induzierte Expression von MMP-1 und ADAMTS-4 unterdrückt und auf mRNA-Level den inhibitorischen Effekt von IL-1 Aggrekan vermindert.[111] Möglich ist auch, dass der Altersunterschied zwischen den von Wilson et al. und den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geweben einen Einfluss auf die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse hat.

Aufschlussreich wären weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Menge und Lokalisation von G1-DIPEN³⁴¹-Fragmente im Gewebe. G1-DIPEN³⁴¹, ein durch MMPs erzeugtes Aggrekan-Neoepitop, kann möglicherweise aus G1-NITEGE³⁷³ generiert werden.[124] Studien haben das Vorhandensein von Aggrekan-

Ansammlungen mit langer und kurzer Halbwert-Zeit belegt. Dabei ist das Aggrekan mit erhöhtem Metabolismus perizellulär und interterritorial lokalisiert.[126] Aggrekan mit einem verringerten Metabolismus liegt dagegen in weiterer Entfernung von der Zelle.[127] In der vorliegenden Arbeit fand sich im Gelenkknorpel die NITEGE-Fragmente überwiegend intra- und perizellulär. Im Gegensatz zum Gelenkknorpel erscheint die Existenz von aktiven Aggrekanasen hier auf die perizelluläre Region begrenzt zu sein. Sie könnten damit dem zellassozierten, verstärkten Aggrekan-Metabolismus zugezählt werden. Diese zellnahe Aggrekanase-Aktivität erhöht unter Umständen die Möglichkeit, dass NITEGE-Fragmente in die Zelle aufgenommen werden, was die starken intrazellulären Fluoreszenzen erklären könnte. Die Fähigkeit von Chondrozyten G1-NITEGE-Fragmente zu internalisieren, wurde bereits immunhistochemisch durch Fosang et al. und Embry et al. belegt.[124, 128] Die Aufnahme der Fragmente in die Chondrozyten ist CD44-vermittelt und scheint einer der Hauptmechanismen bei der Entfernung von G1-NITEGE-Fragmenten aus der Extrazellulärraum nach Aggrekan-Spaltung zu sein.[129] Der Mangel an Fluoreszenz im zellfernen, extrazellulären Gelenkknorpelgewebe schließt aber eine dortige Existenz von NITEGE-Fragmenten nicht zwingend aus, da es sich bei der genutzten Methode allenfalls um ein semi-quantitatives Untersuchungsverfahren handelt.

Die Real-time RT-PCR-Analysen zeigten für die Matrixproteine Aggrekan und Kollagen Typ II unter dem Einfluss von IL-1 in beiden Geweben eine reduzierte Expression. Für Kollagen Typ II verringerte sich im zeitlichen Verlauf die Expression im Meniskusgewebe stark. Auch über längere Kultivierungszeit hat IL-1 damit im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch im Vergleich mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen [130] über die Hemmung der Expression essentieller Matrixproteine einen indirekten Effekt auf die Degeneration der Extrazellulärmatrix. In unbehandelten, kurzzeitig inkubierten Gewebeexplantaten vom Gelenkknorpel und Meniskus werden Kollagen Typ II und Aggrekan deutlich stärker exprimiert.[130, 131]

Einfluss von IL-1 auf MMPs und ADAMTS-4

Zu Beurteilung der Rolle von MMP-1, -2, -3, -9 und -13 sowie ADAMTS-4 im zeitlichen Verlauf bei der Degeneration des Gewebes unter dem Einfluss von IL-1 wurden die Expressionsstärken dieser Enzyme auf mRNA-Ebene untersucht. Die

Werte für die dreitägig inkubierten Gewebeexplantate dienten dabei wie bei allen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit als Referenz zum Vergleich der erhobenen Befunde mit der einschlägigen Literatur. Des Weiteren sollten somit mögliche Expressionsunterschiede der einzelnen Enzyme im zeitlichen Verlauf der Stimulation aufgedeckt werden, die Aufschluss auf die Bedeutung von ADAMTS-4 und der verschiedenen MMPs in späteren Phasen der IL-1 induzierten Gewebedegeneration geben. Ein unerwarteter Befund bei diesen Untersuchungen war, dass das Housekeeping-Gen GAPDH in den Chondrozyten des Gelenkknorpels nach zehntägiger Stimulierung einen signifikant erhöhten C_T -Wert aufwies. Dieser Befund beschreibt eine verminderte Expression von GAPDH unter dem Einfluss von IL-1, was sich deutlich hemmend auf die nachfolgende Berechnung der relativen Zielmengen für die 10 Tage Proben des Gelenkknorpels auswirkte. Es ist bekannt, dass die Expression von GAPDH durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann und abhängig von der Proliferationsrate der Zellen ist.[132] Die genauen Umstände für die verminderte Expression in den unstimulierten Chondrozyten bleiben jedoch unklar.

Zur mRNA-Expression von Meniskuszellen im zeitlichen Verlauf unter dem Einfluss von IL-1 liegen derzeit keine Studien vor. Langzeituntersuchungen mit IL-1 β stimulierten Chondrozyten von Aida et al. können nur zum groben Vergleich herangezogen werden.[133] Aus in vitro-Studien ist bekannt, dass die Chondrozyten des Gelenkknorpels durch IL-1 beeinflusst verstärkt MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 [74, 133–136] und ADAMTS-4 [137] exprimieren. Ausgenommen für MMP-9 konnte dies in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, wobei jedoch die Expression für MMP-1 und -2 nur schwach erhöht war. In beiden Gewebearten war die mRNA-Menge für MMP-9 zu gering um die relative Zielmenge zu bestimmen.

Auch für die Zellen des Meniskusgewebes konnte die Expression von Matrixproteasen sowie Expressionsunterschiede im zeitlichen Verlauf der Stimulation gezeigt werden. Lemke et al. hatte nach dreitägiger Inkubation die Expression von MMP-1, -2 und -3 sowie ADAMTS-4 beschrieben.[87] Die Stimulation mit IL-1 bewirkte dabei eine verstärkte Expression für MMP-2 und -3 sowie ADAMTS-4. Diese Beobachtungen konnten mit den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Des Weiteren zeigte sich im Meniskusgewebe, dass nach zehntägiger Stimulation die Expression von MMP-3 sowie -13 als auch ADAMTS-4 zunahm. Bei einer zehntägigen Inkubation hatte IL-1 auf die Expression von MMP-2 einen

hemmenden Effekt. Mit IL-1 lassen sich somit im Meniskus offensichtlich nicht alle Matrixproteasen heraufregulieren.

Dies zeigten auch die zymografischen Analysen auf Matrixproteasen in den Kulturüberständen. Während mittels Casein-Zymogramm deutliche Mengen an (pro-)MMP-3 in den Kulturüberständen der mit IL-1 stimulierten Gelenkknorpelimplantate nachgewiesen wurden, war ein Nachweis beim Meniskusgewebe nur sehr schwach möglich. Dies ist nicht nur mit der verringerten Zelldichte im Meniskusgewebe zu erklären, da Lemke et al. zuvor unter ähnlichen Bedingungen den Nachweis von (pro-)MMP-3 nach Stimulation von Meniskusgewebe mit IL-1 über drei Tage erbracht hatten. Der einzige Unterschied im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit war der Zusatz von ITS zum Kulturmedium. Dies bekräftigt erneut die zuvor erwähnte Hypothese, dass ITS die durch IL-1 hervorgerufenen Effekte minimiert. Es scheint sich dabei um eine posttranslationale Beeinflussung zu handeln, da eine erhöhte mRNA-Expression von MMP-3 gemessen wurde.

Die Untersuchungen mit Gelatine-Zymogrammen zeigten im Gelenkknorpel in beiden Gruppen erhöhte Mengen an pro-MMP-2. In Überständen von 3 Tage stimulierten Gelenkknorpelimplantaten und allen Meniskusproben konnten zudem geringe Mengen an aktivem MMP-2 gefunden werden. Diese Befunde spiegeln nicht die beschriebene Dynamik bei der mRNA-Expression von MMP-2 wieder. Die Verringerung der (pro-)MMP-2 Mengen in den Meniskusproben beider Gruppen nach zehn Tagen ist vermutlich ein Effekt der Kultivierung. Diese Ergebnisse in Kombination mit der schwachen mRNA-Expression führen zu der Annahme, dass MMP-2 im Bezug zum IL-1 induzierten GAG-Verlust nur eine untergeordnete Rolle spielt. Da jedoch nur die Kulturüberstände und nicht die Zellen und Gewebeexplantate auf Enzymproteine untersucht wurden, besteht die Möglichkeit, dass diese dort vorhanden sind, ohne vermehrt in die Kulturüberstände abgegeben worden zu sein.

Einfluss von IL-1 auf die NO-Freisetzung

Die Stimulation der NO-Produktion im Gelenkknorpel ist einer der Mechanismen über die IL-1 seine proinflammatorische Wirkung ausübt.[60] Ähnliche Mechanismen werden auch für das Meniskusgewebe vermutet. Der Nachweis von Nitrit in den

Kulturüberständen mit Hilfe des Griess-Reagenz zeigte nach dreitägiger Inkubation in den stimulierten Gruppen eine deutlich erhöhte NO-Freisetzung aus den Geweben. Zu den nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten war die NO-Abgabe deutlich reduziert. Das Meniskusgewebe zeigte damit auf verringertem Level, welches vermutlich auf die geringere Zelldichte im Gewebe zurückzuführen ist, gleiche relative NO-Freisetzungen wie Gelenkknorpelgewebe. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Hashimoto et al., die die Freisetzung von NO aus Meniskusgewebe und Gelenkknorpelgewebe nach Stimulation mit IL-1 β (1 ng/ml) untersucht haben.[57] Die reduzierte NO-Freisetzung im Verlauf der Inkubation korrelieren allerdings nicht mit den Untersuchungsergebnissen zur Expression der iNOS, die auch nach zehntägiger IL-1 Inkubation noch eine erhöhte Expression zeigten. Die Verhältnismäßigkeiten bei der NO-Freisetzung im Verlauf der Inkubation weisen Ähnlichkeiten zu denen der GAG-Freisetzungen auf, was zunächst vermuten lässt, dass NO ein Mediator der GAG-Freisetzung in Knorpel- und Meniskusgewebe ist. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer Studie von Shin et al., die mittels eines NO-Synthase-Inhibitors die durch IL-1 erhöhte PG-Freisetzung aus Meniskusgewebe signifikant reduzieren konnten.[138] Genau das Gegenteil zeigten jedoch Voigt et al., bei denen die Hemmung der TNF- α -induzierten NO-Produktion mittels L-NMMA keinen Auswirkungen auf die IL-1-abhängige GAG-Freisetzung hatte.[139] Im Gegensatz zum bovinen Meniskusgewebe bei Voigt et al., deren Versuchsaufbau dem der vorliegenden Arbeit glich, wurden die Untersuchungen von Shin et al. an porcinen Menisken mit serumhaltigen (10%) Kulturmedium durchgeführt. Die IL-1 Konzentration war hier mit 1ng/ml verringert und es wurde der NO-Synthase-Inhibitor 1400W verwendet.[138] Cao et al. konnten zeigen, dass die aus dem Meniskusgewebe gewonnenen Zellen genau wie im Gelenkknorpelgewebe in der Lage sind, NO zu produzieren.[140] Das endogene NO unterdrückte die Produktion von Kollagen und PGs, hatte allerdings im Gegensatz zu Shin et al. einen protektiven Effekt auf den IL-1 induzierten Abbau der PGs in der Extrazellulärmatrix.[56, 141] Des Weiteren wurde beschrieben, dass die durch IL-1 hervorgerufene Hemmung der Kollagen Typ II mRNA-Expression, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit für Gelenkknorpel sowie Meniskusgewebe gezeigt wurde, in Chondrozyten unabhängig von NO ist. Dies weist auf einen posttranslationalen Wirkmechanismus hin.[59] Ob dies auch für das Meniskusgewebe gilt und um Fragestellungen zur eventuellen katabolen oder protektiven Funktion von NO auf die Extrazellulärmatrix, die aus

uneinheitlichen Aussagen in der Literatur resultieren, zu klären, sollten in Langzeitversuchen mit NO-Synthase-Hemmstoffen die Auswirkungen von endogenem NO auf den Matrixmetabolismus noch genauer geklärt werden.

Hinweise auf eine Beeinflussung der NO-Freisetzung durch den ITS-Zusatz im Kulturmedium eröffneten die Untersuchungsergebnisse nicht.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals einen proapoptotischen Einfluss von IL-1 auf das Meniskusgewebe zeigen. Die Rolle von NO, welches als proapoptotischer Mediator aus dem Gelenkknorpelgewebe bekannt ist, bleibt dabei unklar. In zukünftigen Studien sollten daher die Einflüsse von IL-1 auf die GAG/NO-Freisetzung im Meniskusgewebe mit und ohne Verwendung eines iNOS-Hemmstoffes (z.B. L-NMMA) gemessen werden. Insbesondere die Untersuchungen zur Expression von matrixdegradierenden Enzymen auf Proteinebene und die histochemischen Untersuchungen zur Aggrecanase-Aktivität im Gelenkknorpel- und Meniskusgewebe haben im Vergleich mit vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, dass der ITS-Zusatz im Kulturmedium einen minimierenden Einfluss auf IL-1-induzierte Effekte hat. Es bedarf Klärung, ob die Kombination oder ein einzelner der drei Inhaltsstoffe von ITS für diesen Effekt verantwortlich ist. Aktuelle Untersuchungen an Chondrozyten weisen allerdings darauf hin, dass Selen die IL-1-induzierten inflammatorischen Effekte hemmt. Nachfolgende Untersuchungen mit/ohne Selenzusatz sollten daher angestrebt werden. Es konnte gezeigt werden, dass der IL-1-abhängige GAG-Verlust im Meniskusgewebe wie auch im Gelenkknorpelgewebe in den ersten drei Tagen der Inkubation am höchsten ist. Mittels eines Hydroxyprolin-Nachweisverfahrens konnte allerdings im untersuchten Zeitrahmen nicht wie in anderen Studien beschrieben, ein dem GAG-Verlust folgender Abbau der kollagenen Matrix nachgewiesen werden. Untersuchungen über einen längeren Zeitraum müssen klären, wann/ob dieser Kollagen-Abbau unter den beschriebenen Versuchsbedingungen einsetzt. Unter dem Einfluss von IL-1 werden im Meniskusgewebe die essentiellen Matrixproteine Aggrecan und Kollagen Typ II verringert exprimiert. Passend dazu wurden im Meniskus die Matrixproteasen MMP-3, -13 und ADAMTS-4 im zeitlichen Verlauf zunehmend verstärkt exprimiert. MMP-2

hingegen wurde nach zehn Tagen vermindert exprimiert. Es lassen sich im Meniskus somit nicht alle aus dem Gelenkknorpel bekannten MMPs mit IL-1 heraufregulieren. Mittels Casein-Zymogrammen konnten in den Kulturüberständen des Meniskusgewebes gegensätzlich zu Gelenkknorpelgewebe nur sehr geringe Mengen an (pro-)MMP-3 gezeigt werden. Möglicherweise hat der ITS-Zusatz zum Kulturmedium im Meniskusgewebe eine stärkere, posttranslational hemmende Wirkung auf dieses Enzym. Das Meniskusgewebe zeigte nach Stimulation mit IL-1 im zeitlichen Verlauf auf verringertem Niveau eine vergleichbare Freisetzung von NO, wie sie aus dem Gelenkknorpelgewebe bekannt ist. Zu klären bleibt, ob die Ähnlichkeiten in der zeitlichen Dynamik zwischen der GAG-Freisetzung und der NO-Freisetzung auf einen Zusammenhang zurückzuführen sind. Die vorliegende Arbeit hat somit gezeigt, dass trotz vieler Gemeinsamkeiten in der IL-1-induzierten Schädigung des Gewebes im Gelenkknorpel und Meniskus, die beiden Gewebearten deutliche Unterschiede zeigen und somit differenziert betrachtet werden müssen. Die längere Kultivierungszeit in dem in vitro-Modell hat noch keine klaren Anzeichen zum Abbau des Kollagennetzwerks gezeigt, es wird aber vermutet, dass der Zusatz von Selen (und/oder Insulin/Transferrin) einen entscheidenden Einfluss auf die IL-1-vermittelten Abbauprozesse hat, was in weiterführenden Untersuchungen näher geklärt werden muss.

5 Zusammenfassung

Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 (IL-1) hat als Mediator in den frühen Phasen sowie in der Progredienz von degenerativen Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrose und rheumatoider Arthritis einen entscheidenden Einfluss. Das Kniegelenk mit seinen artikulierenden Gewebetypen ist dabei mit am häufigsten betroffen. Anders als im hyalinen Gelenkknorpelgewebe ist zu den IL-1-vermittelten Pathomechanismen, die an der Zerstörung der faserknorpeligen Menisken beteiligt sind, noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden daher Gewebeproben (Durchmesser 3mm, Höhe 1mm) vom bovinen Meniskus und Gelenkknorpel aus dem gleichen Gelenk und unter gleichen Bedingungen 3 und 10 Tage lang mit IL-1 stimuliert. Das verwendete in vitro-Modell ermöglichte einen qualitativen und quantitativen Vergleich des Einflusses von IL-1 auf die unterschiedlichen und doch ähnlichen Gewebetypen. Die Kultivierung der Gewebeproben erfolgte in einem serumfreien DMEM-Kulturmedium bei 37°C. Zur Steigerung der Zellaktivität und Proliferation bei der Kultivierungsdauer von bis zu 10 Tagen wurde dem Medium ITS Liquid Media Supplement (enthält 1,0mg/ml Insulin, 0,55mg/ml Transferrin, 0,5µg/ml Natriumselenit) hinzugefügt. Nach Beendigung der Kultivierung wurden Untersuchungen an den Kulturüberständen und den Gewebeproben durchgeführt.

Lichtmikroskopische Untersuchungen wiesen dabei auf einen proapoptotischen Einfluss von IL-1 im Meniskusgewebe hin. Untersuchungen der Überstände zum Proteoglykan-Abbau zeigten im Gelenkknorpel eine generell höhere Basisfreisetzung von GAGs und eine höhere und länger andauernde Steigerung derselben durch IL-1 verglichen zum Meniskusgewebe. Histochemische Untersuchungen der Aggrecanase-Aktivität zeigten im extrazellulären Meniskusgewebe leicht verstärkten Aggrecan-Abbau nach IL-1 Stimulation mit Steigerung nach zehntägiger Inkubation. Voruntersuchungen mit ITS-freiem Kulturmedium hatten schon nach dreitägiger IL-1 Stimulation eine deutlich höhere Aggrecanase-Aktivität gezeigt. Unter dem Einfluss von IL-1 steigerte sich die Produktion von NO in beiden Gewebetypen in den ersten drei Tagen deutlich, nahm im zeitlichen Verlauf jedoch wieder ab. Die Untersuchung

der Kulturüberstände auf Hydroxyprolin zeigte in beiden Gewebetypen keine Anzeichen für einen durch IL-1 gesteigerten Kollagenabbau. Die Untersuchung matrixdegradierender Enzyme auf Proteinebene mittels Gelatine-Zymogrammen wiesen Anzeichen für eine möglicherweise zeitabhängige und IL-1-unabhängige Aktivierung von MMP-2 im Meniskusgewebe auf. Untersuchungen der Kulturüberstände mit Casein-Zymogrammen ließen auf das IL-1-abhängige Vorhandensein von (pro-)MMP-3 im Gelenkknorpel schließen. Gleiches ließ sich beim Meniskus wenn dann nur sehr abgeschwächt beobachten.

Mittels Real-time RT-PCR-Analysen konnte die gewebsspezifisch (meist gesteigerte), zeitlich unterschiedliche Expression der matrixabbauenden Enzyme MMP-1, -2, -3, -13 und ADAMTS-4 aufgezeigt werden.

Passend dazu zeigten die wichtigen Matrixmoleküle Aggrekan und Kollagen Typ II im zeitlichen Verlauf eine IL-1-abhängige, verminderte Expression.

Mit den Untersuchungen konnte somit erstmals ein durch IL-1-induzierter, proapoptotischer Effekt im Meniskusgewebe gezeigt werden, wie er bereits von Chondrozyten bekannt ist. Dabei ist noch zu klären, in welchem Zusammenhang die Zunahme des Zelltods mit der Abnahme der NO-Produktion im zeitlichen Verlauf steht. Die Ergebnisse dieser Arbeit wiesen im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen in der Arbeitsgruppe darauf hin, dass der Medium-Zusatz ITS den IL-1 induzierten Effekt in den Geweben minimiert. Möglicherweise hat das darin enthaltene Selen einen anti-inflammatorischen Effekt. Dies wird auch von anderen Forschungsgruppen aktuell diskutiert. Ein dem IL-1-induzierten GAG-Verlust folgender Abbau der kollagenen Matrix konnte entgegen anderer Forschungsberichte unter den Versuchsbedingungen im untersuchten Zeitrahmen nicht nachgewiesen werden. Die Real-time RT-PCR-Ergebnisse zeigen, dass IL-1 über die Expression von matrixdegradierenden Enzymen und indirekt über die gehemmte Expression von essentiellen Matrixproteinen einen degenerativen Effekt auf beide Gewebetypen hat. Jedoch lassen sich im Meniskus mit IL-1 nicht alle der aus dem Gelenkknorpel bekannten Matrixproteasen heraufregeln. Dies wurde durch die zymografischen Analysen zur Enzymaktivität auf Proteinebene bekräftigt.

Trotz vieler Gemeinsamkeiten in der IL-1-induzierten Schädigung des Gelenkknorpels und Meniskus zeigten die Untersuchungen deutliche Unterschiede

auf. Daher müssen diese Gewebe differenziert betrachtet werden. Die kontrovers diskutierte Rolle von NO als proapoptotischer Mediator und im Zusammenhang mit dem gesteigerten GAG-Abbau soll zukünftig bei Versuchen mit iNOS-Hemmstoffen genauer untersucht werden. Weiterführende Untersuchungen mit längerer Kultivierungszeit sollen zudem klären, wann der vermutete Kollagenabbau einsetzt und ob bzw. welcher Inhaltsstoff von ITS einen maßgeblichen Einfluss auf die IL-1-vermittelten Abbauprozesse hat.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Koch-Institut R. Gesundheit in Deutschland.
- [2] Schiebler TH, Korf H. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs. 10th ed. Darmstadt: Steinkopff; 2007.
- [3] Witt M. Anatomie - GK 1: Mit 59 Tabellen ; [+ IMPP-Fragen online 2002 - heute]. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl; 2007.
- [4] Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: LernAtlas der Anatomie. 3rd ed. Stuttgart: Thieme; 2011.
- [5] Chivers M, Howitt S. Anatomy and physical examination of the knee menisci: a narrative review of the orthopedic literature. *J Can Chiropr Assoc* 2009;53(4):319–33.
- [6] Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 1998;193 (Pt 2):161–78.
- [7] Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982;10(2):90–5.
- [8] Rath E, Richmond JC. The menisci: basic science and advances in treatment. *Br J Sports Med* 2000;34(4):252–7.
- [9] Krause WR, Pope MH, Johnson RJ, Wilder DG. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(5):599–604.
- [10] Fukubayashi T, Kurosawa H. The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints. *Acta Orthop Scand* 1980;51(6):871–9.
- [11] Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res* 1980(149):283–90.
- [12] Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 1984;43(4):635–40.
- [13] Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. 11th ed. Stuttgart ;, New York: Thieme; 2002.
- [14] Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 2nd ed. Stuttgart: Thieme; 2006.
- [15] Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 2006;12:92–101.
- [16] Hedlund H, Hedbom E, Heineg r, Mengarelli-Widholm S, Reinholt FP, Svensson O. Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J Biol Chem* 1999;274(9):5777–81.
- [17] Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(19-20):2241–56.
- [18] Clark JM. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J Anat* 1990;171:117–30.
- [19] AufderHeide A, Athanasiou K. Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. *Ann Biomed Eng* 2004;32(8):1161–74.
- [20] Brindle T, Nyland J, Johnson DL. The meniscus: review of basic principles with application to surgery and rehabilitation. *J Athl Train* 2001;36(2):160–9.
- [21] Ghadially FN, Thomas I, Yong N, Lalonde JM. Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages. *J Anat* 1978;125(Pt 3):499–517.
- [22] Bullough PG, Munuera L, Murphy J, Weinstein AM. The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg Br* 1970;52(3):564–7.
- [23] Petersen W, Tillmann B. Struktur und Blutgefassversorgung der Kniegelenkmenisken. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999;137(1):31–7.
- [24] Eyre DR, Wu JJ. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett* 1983;158(2):265–70.
- [25] Valiyaveetil M, Mort J, McDevitt C. The concentration, gene expression, and spatial distribution of aggrecan in canine articular cartilage, meniscus, and anterior and posterior cruciate ligaments: a new molecular distinction between hyaline cartilage and fibrocartilage in the knee joint. *Connect Tissue Res* 2005;46(2):83–91.
- [26] Gerd Herold. Herold: Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung. 2011st ed.: Herold.
- [27] Felson DT. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev* 1988;10:1–28.

- [28] Woolf A, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003;81(9):646–56.
- [29] Michael J, Schluter-Brust K, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107(9):152–62.
- [30] Fernandes J, Martel-Pelletier J, Pelletier J. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39(1-2):237–46.
- [31] Goldring MB. Anticytokine therapy for osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1(5):817–29.
- [32] Baenkler H. *Kurzlehrbuch Innere Medizin: 163 Tabellen*. Stuttgart ;, New York: Thieme; 2007.
- [33] McInnes I, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7(6):429–42.
- [34] Firestein G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423(6937):356–61.
- [35] Königshoff M, Brandenburger T. *Kurzlehrbuch Biochemie: 80 Tabellen*. 2nd ed. Stuttgart ;, New York: Thieme; 2007.
- [36] Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(4):253–65.
- [37] Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16(5-6):457–99.
- [38] Nashan D, Luger TA. Interleukin 1. Teil 1: Grundlagen und Pathophysiologie. *Hautarzt* 1999;50(9):680–8.
- [39] Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 1994;370(6487):270–5.
- [40] Arend W. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(4-5):323–40.
- [41] Fontana A, Hengartner H, Weber E, Fehr K, Grob PJ, Cohen G. Interleukin 1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1982;2(2):49–53.
- [42] van d, van d. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 1990;49(4):238–45.
- [43] Schlaak JF, Pfers I, Meyer Z, Marker-Hermann E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14(2):155–62.
- [44] Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ et al. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37(5):644–52.
- [45] Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL, Beginnen K, Nelson-Cox. *Lehninger Biochemie: Mit 40 Tabellen*. 3rd ed. Berlin: Springer; 2005.
- [46] Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(22):8664–7.
- [47] Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994;343(8907):1199–206.
- [48] Habib S, Ali A. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem* 2011;26(1):3–17.
- [49] Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993;108(3):833–7.
- [50] Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles RG, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2007;36(4):247–58.
- [51] Stichtenoth DO, Fauler J, Zeidler H, Frolich JC. Urinary nitrate excretion is increased in patients with rheumatoid arthritis and reduced by prednisolone. *Ann Rheum Dis* 1995;54(10):820–4.
- [52] Wigand R, Meyer J, Busse R, Hecker M. Increased serum NG-hydroxy-L-arginine in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as an index of an increased nitric oxide synthase activity. *Ann Rheum Dis* 1997;56(5):330–2.
- [53] Hilliquin P, Borderie D, Hervann A, Menkes CJ, Ekindjian OG. Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40(8):1512–7.
- [54] Loeser R, Carlson C, Del C, Cole A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* 2002;46(9):2349–57.
- [55] Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41(12):2165–74.
- [56] Cao M, Stefanovic-Racic M, Georgescu HI, Miller LA, Evans CH. Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine. *J Orthop Res* 1998;16(1):104–11.

- [57] Hashimoto S, Takahashi K, Ochs RL, Coutts RD, Amiel D, Lotz M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(10):2123–31.
- [58] Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI et al. Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991;147(11):3915–20.
- [59] Cao M, Westerhausen-Larson A, Niyibizi C, Kavalkovich K, Georgescu HI, Rizzo CF et al. Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J* 1997;324 (Pt 1):305–10.
- [60] Murrell GA, Jang D, Williams RJ. Nitric oxide activates metalloproteinase enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206(1):15–21.
- [61] Amalinei C, Caruntu I, Giusca S, Balan R. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51(2):215–28.
- [62] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006;69(3):562–73.
- [63] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92(8):827–39.
- [64] Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995;270(11):5872–6.
- [65] Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990;29(44):10261–70.
- [66] Maskos K, Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol* 2003;25(3):241–66.
- [67] Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie* 2005;87(3-4):249–63.
- [68] Gomis-Ruth F. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem* 2009;284(23):15353–7.
- [69] Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997;389(6646):77–81.
- [70] Page-McCaw A, Ewald A, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(3):221–33.
- [71] Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein-Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39(9):1576–87.
- [72] Gruber BL, Sorbi D, French DL, Marchese MJ, Nuovo GJ, Kew RR et al. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;78(2):161–71.
- [73] Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G. Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochim Biophys Acta* 1991;1094(1):8–18.
- [74] Flannery CR, Little CB, Caterson B, Hughes CE. Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix Biol* 1999;18(3):225–37.
- [75] Lemke A, Sandy J, Voigt H, Dreier R, Lee J, Grodzinsky A et al. Interleukin-1alpha treatment of meniscal explants stimulates the production and release of aggrecanase-generated, GAG-substituted aggrecan products and also the release of pre-formed, aggrecanase-generated G1 and m-calpain-generated G1-G2. *Cell Tissue Res* 2010;340(1):179–88.
- [76] Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(1):33–44.
- [77] Jones G, Riley G. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7(4):160–9.
- [78] Malfait A, Liu R, Ijiri K, Komiya S, Tortorella M. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002;277(25):22201–8.
- [79] Porter S, Clark I, Kevorkian L, Edwards D. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 2005;386(Pt 1):15–27.

- [80] Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I et al. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000;275(24):18566–73.
- [81] Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, Flannery CR. Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem* 1991;266(14):8683–5.
- [82] Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem* 2001;276(16):12501–4.
- [83] Vankemmelbeke M, Jones G, Fowles C, Ilic M, Handley C, Day A et al. Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters. *Eur J Biochem* 2003;270(11):2394–403.
- [84] Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9(6):539–52.
- [85] Pratta M, Scherle P, Yang G, Liu R, Newton R. Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum* 2003;48(1):119–33.
- [86] Wilson C, Vanderploeg E, Zuo F, Sandy J, Levenston M. Aggrecanolytic and in vitro matrix degradation in the immature bovine meniscus: mechanisms and functional implications. *Arthritis Res Ther* 2009;11(6):R173.
- [87] Lemke A, Sandy J, Voigt H, Dreier R, Lee J, Grodzinsky A et al. Interleukin-1alpha treatment of meniscal explants stimulates the production and release of aggrecanase-generated, GAG-substituted aggrecan products and also the release of pre-formed, aggrecanase-generated G1 and m-calpain-generated G1-G2. *Cell Tissue Res* 2010;340(1):179–88.
- [88] Patwari P, Gao G, Lee JH, Grodzinsky AJ, Sandy JD. Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolytic in interleukin-1-treated bovine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(4):269–77.
- [89] Nemethy G, Scheraga HA. Stabilization of collagen fibrils by hydroxyproline. *Biochemistry* 1986;25(11):3184–8.
- [90] Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem* 1996;29(3):225–9.
- [91] Creemers LB, Jansen DC, van Veen-Reurings A, van den Bos T, Everts V. Microassay for the assessment of low levels of hydroxyproline. *BioTechniques* 1997;22(4):656–8.
- [92] Kurz B, Lemke A, Kehn M, Domm C, Patwari P, Frank E et al. Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. *Arthritis Rheum* 2004;50(1):123–30.
- [93] Dini L, Coppola S, Ruzittu MT, Ghibelli L. Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp Cell Res* 1996;223(2):340–7.
- [94] Manicourt DH, Lefebvre V. An assay for matrix metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycans, casein, or gelatin. *Anal Biochem* 1993;215(2):171–9.
- [95] Cowell S, Knauper V, Stewart ML, D'Ortho MP, Stanton H, Hembry RM et al. Induction of matrix metalloproteinase activation cascades based on membrane-type 1 matrix metalloproteinase: associated activation of gelatinase A, gelatinase B and collagenase 3. *Biochem J* 1998;331 (Pt 2):453–8.
- [96] Kim HA, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42(7):1528–37.
- [97] Kouri JB, Aguilera JM, Reyes J, Lozoya KA, Gonzalez S. Apoptotic chondrocytes from osteoarthrotic human articular cartilage and abnormal calcification of subchondral bone. *J Rheumatol* 2000;27(4):1005–19.
- [98] Kirsch T, Swoboda B, Nah H. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthrotic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8(4):294–302.
- [99] Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41(7):1266–74.
- [100] Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 2008;75(3):677–87.
- [101] Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1426–39.

- [102] Kim J, Xu M, Xo R, Mates A, Wilson GL, Pearsall AW, et al. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(3):424–32.
- [103] Clancy RM, Abramson SB, Kohne C, Rediske J. Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. *J Cell Physiol* 1997;172(2):183–91.
- [104] Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995;146(1):75–85.
- [105] Sigma-Aldrich. ITS Liquid Media Supplement (100x) liquid, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture | Sigma-Aldrich. [March 01, 2012]; Available from: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=I3146|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.
- [106] Burton-Wurster N, Lust G. Fibronectin and proteoglycan synthesis in long term cultures of cartilage explants in Ham's F12 supplemented with insulin and calcium: effects of the addition of TGF-beta. *Arch Biochem Biophys* 1990;283(1):27–33.
- [107] Chua KH, Aminuddin BS, Fuzina NH, Ruzzymah BH. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater* 2005;9:58-67; discussion 67.
- [108] Klotz L, Kroncke K, Buchczyk D, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr* 2003;133(5 Suppl 1):1448S-51S.
- [109] Chen J, Chu Y, Cao J, Wang W, Liu J, Wang J. Effects of T-2 toxin and selenium on chondrocyte expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-13), alpha2-macroglobulin (alpha2M) and TIMPs. *Toxicol In Vitro* 2011;25(2):492–9.
- [110] Cheng AWM, Stabler TV, Bolognesi M, Kraus VB. Selenomethionine inhibits IL-1beta inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX2) expression in primary human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2011;19(1):118–25.
- [111] Andriamanalijaona R, Kyriotou M, Bauge C, Renard E, Legendre F, Raoudi M et al. Comparative effects of 2 antioxidants, selenomethionine and epigallocatechin-gallate, on catabolic and anabolic gene expression of articular chondrocytes. *J Rheumatol* 2005;32(10):1958–67.
- [112] Li S, Cao J, Shi Z, Chen J, Zhang Z, Hughes C et al. Promotion of the articular cartilage proteoglycan degradation by T-2 toxin and selenium protective effect. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008;9(1):22–33.
- [113] Vieira AT, Silveira KD, Arruda MC, Fagundes CT, Goncalves JL, Silva TA et al. Treatment with Selemax(R), a selenium-enriched yeast, ameliorates experimental arthritis in rats and mice. *Br J Nutr* 2012:1–10.
- [114] Graeser A, Giller K, Wiegand H, Barella L, Boesch Saadatmandi C, Rimbach G. Synergistic chondroprotective effect of alpha-tocopherol, ascorbic acid, and selenium as well as glucosamine and chondroitin on oxidant induced cell death and inhibition of matrix metalloproteinase-3--studies in cultured chondrocytes. *Molecules* 2010;15(1):27–39.
- [115] Bonassar LJ, Sandy JD, Lark MW, Plaas AH, Frank EH, Grodzinsky AJ. Inhibition of cartilage degradation and changes in physical properties induced by IL-1beta and retinoic acid using matrix metalloproteinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 1997;344(2):404–12.
- [116] Torzilli PA, Bhargava M, Park S, Chen CT. Mechanical load inhibits IL-1 induced matrix degradation in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18(1):97–105.
- [117] Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP. Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum* 1997;40(1):164–74.
- [118] Ratcliffe A, Tyler JA, Hardingham TE. Articular cartilage cultured with interleukin 1. Increased release of link protein, hyaluronate-binding region and other proteoglycan fragments. *Biochem J* 1986;238(2):571–80.
- [119] Patwari P, Cook M, DiMicco M, Blake S, James I, Kumar S et al. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. *Arthritis Rheum* 2003;48(5):1292–301.
- [120] Adams ME, Muir H. The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem J* 1981;197(2):385–9.
- [121] Pratta M, Yao W, Decicco C, Tortorella M, Liu R, Copeland R et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003;278(46):45539–45.
- [122] Palmer AW, Wilson CG, Baum EJ, Levenston ME. Composition-function relationships during IL-1-induced cartilage degradation and recovery. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(8):1029–39.

- [123] Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, Rosenfeld SA, Ross OH, Link JR et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 1999;274(33):23443–50.
- [124] Fosang AJ, Last K, Stanton H, Weeks DB, Campbell IK, Hardingham TE et al. Generation and novel distribution of matrix metalloproteinase-derived aggrecan fragments in porcine cartilage explants. *J Biol Chem* 2000;275(42):33027–37.
- [125] Wilson C, Palmer A, Zuo F, Eugui E, Wilson S, Mackenzie R et al. Selective and non-selective metalloproteinase inhibitors reduce IL-1-induced cartilage degradation and loss of mechanical properties. *Matrix Biol* 2007;26(4):259–68.
- [126] Quinn TM, Maung AA, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD. Physical and biological regulation of proteoglycan turnover around chondrocytes in cartilage explants. Implications for tissue degradation and repair. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:420–41.
- [127] Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ. Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem* 1994;269(52):33021–7.
- [128] Embry F, Fosang A, Knudson W. The accumulation of intracellular ITEGE and DIPEN neoepitopes in bovine articular chondrocytes is mediated by CD44 internalization of hyaluronan. *Arthritis Rheum* 2006;54(2):443–54.
- [129] Ariyoshi W, Knudson C, Luo N, Fosang A, Knudson W. Internalization of aggrecan G1 domain neoepitope ITEGE in chondrocytes requires CD44. *J Biol Chem* 2010;285(46):36216–24.
- [130] Kisiday J, Vanderploeg E, McIlwraith C, Grodzinsky A, Frisbie D. Mechanical injury of explants from the articulating surface of the inner meniscus. *Arch Biochem Biophys* 2010;494(2):138–44.
- [131] Lee J, Fitzgerald J, DiMicco M, Grodzinsky A. Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression. *Arthritis Rheum* 2005;52(8):2386–95.
- [132] Colell A, Green DR, Ricci J. Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ* 2009;16(12):1573–81.
- [133] Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Shiratsuchi H, Motohashi M, Matsumura H. The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci* 2005;77(25):3210–21.
- [134] Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C et al. Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* 1999;344 Pt 1:61–8.
- [135] Bau B, Gebhard P, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2648–57.
- [136] Mohtai M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI et al. Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *J Clin Invest* 1993;92(1):179–85.
- [137] Patwari P, Gao G, Lee JH, Grodzinsky AJ, Sandy JD. Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolysis in interleukin-1-treated bovine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(4):269–77.
- [138] Shin S, Fermor B, Weinberg J, Pisetsky D, Guilak F. Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide. *J Appl Physiol* 2003;95(1):308–13.
- [139] Voigt H. Einflüsse der proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha und Interleukin-1 auf Meniskusgewebe vom Rind; 2010.
- [140] Badger AM, Cook MN, Swift BA, Newman-Tarr TM, Gowen M, Lark M. Inhibition of interleukin-1-induced proteoglycan degradation and nitric oxide production in bovine articular cartilage/chondrocyte cultures by the natural product, hymenialdisine. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290(2):587–93.
- [141] Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200(1):142–8.

7 Danksagungen

Ich danke Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Michael Schünke und Prof. Dr. rer. nat. Bodo Kurz für die Aufnahme in ihre Forschungsgruppe und die Möglichkeit der Nutzung aller Geräte und Räumlichkeiten, die für die Erstellung dieser Dissertation notwendig waren. Mein besonders herzlicher Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Bodo Kurz für das Vertrauen in mich, die Bereitstellung meines Dissertationsthemas und die exzellente, persönliche Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit trotz interkontinental getrennter Arbeitsplätze.

Rita Kirsch und Frank Lichte aus der Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die Einführung in die verschiedenen labortechnischen Methoden und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Ohne sie und ihre Erfahrung wäre vieles nicht möglich gewesen. Es hat mir immer Freude bereitet mit ihnen im Labor zusammenzuarbeiten.

Mein Dank auch an Otfried Frandsen für EDV-technische Hilfestellungen und Olaf Schwiedeps für seine fachmännische Hilfe beim Umbau der Geräte für die Hydroxyprolin-Analyse.

Dr. Kirsten Hattermann möchte ich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie danken.

Schlussendlich gilt mein größter Dank meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer liebevoll und mit viel Verständnis unterstützt haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Conrad
Vorname: Jonas
Geburtsdatum: 21. März 1987
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung

1993 – 1997 Falkenberg Grundschule, Flensburg
1997 – 2006 Altes Gymnasium, Flensburg
06/2006 Abitur / Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr im Ausland

07/2006 – 07/2007 FSJ in der Bo'ness Academy, Bo'ness, Großbritannien

Studium

09/2007 Immatrikulation an der CAU Kiel
Studiengang: Zahnmedizin (Staatsexamen)
09/2008 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
03/2010 Zahnärztliche Vorprüfung
06/2013 Zahnärztliche Prüfung

Berufliche Tätigkeit

Seit 09/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie

Praktika

06/2006	Praxis Dr. Henning Brock, Flensburg
07/2006	Praxis Dr. Heiko Steffens, Harrislee
04/2011	Praxis Dr. Christian Friedrichs, Kiel

Tätigkeiten neben dem Studium

11/2008 – 01/2009	Studentische Hilfskraft,
04/2009 – 05/2009	CAU Kiel, Anatomisches Institut, Kursus der Mikroskopischen Anatomie I & II
01/2009 – 02/2009	Studentische Hilfskraft, CAU Kiel, Anatomisches Institut, Kursus der Makroskopischen Anatomie für Zahnmediziner
seit 09/2009	Studentische Hilfskraft, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Klinik für Innere Medizin I

Poster

30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg

Conrad J, Schünke M, Kurz B, Kiel (2013)

The impact of interleukin-1 (IL-1) on cell death, nitric oxide (NO) production and proteoglycan degradation in meniscal and articular cartilage tissue: a comparative study