

Aus dem Institut für Anatomie
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. J. Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLÜSSE DER PROINFLAMMATORISCHEN ZYTOKINE
TUMOR-NEKROSE-FAKTOR-ALPHA UND INTERLEUKIN-1
AUF MENISKUSGEWEBE VOM RIND**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
HENNING VOIGT
geboren in Henstedt-Ulzburg

Kiel, 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bodo Kurz
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Deike Varoga
Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.12.2010

gez.: Prof. Dr. Rolf Mentlein
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Inhaltsverzeichnis</u>	I
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	IV
<u>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</u>	VII
1 <u>Einleitung</u>	1
1.1 Die Bedeutung degenerativer und entzündlicher Gelenkerkrankungen	1
1.2 Grundlagen zu Aufbau und Funktion des Meniskus	2
1.2.1 Makroskopische Anatomie und Funktionalität der Menisken	2
1.2.2 Mikroskopische Anatomie und Funktionsweise der Menisken	3
1.3 Pathologie und Pathophysiologie der Menisken im Rahmen degenerativ entzündlicher Gelenkerkrankungen	6
1.3.1 Osteoarthrose (OA) und Rheumatoide Arthritis (RA)	6
1.3.2 Proinflammatorische Zytokine: TNF- α und IL-1	8
1.3.3 Matrixmetalloproteininasen: MMPs	9
1.3.4 Aggrekanasen: ADAMTS-4 und ADAMTS-5	11
1.3.5 Tissue inhibitors of metalloproteinases: TIMPs	13
1.3.6 Stickoxid (NO) und Stickoxid-Synthase-Hemmung	14
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
2 <u>Material und Methoden</u>	17
2.1 Material	17
2.2 Methoden	21
2.2.1 Gewebebeschaffung und –verarbeitung	21
2.2.2 Explantatkultivierung und prinzipieller Ablauf der Inkubierung	22
2.2.3 Messung von Glykosaminoglykanen in Überstand und Gewebe	23
2.2.4 Messung von Stickoxid (NO) im Kulturüberstand	24
2.2.5 Aufbereitung der Meniskusexplantate für die Histologie	25
2.2.6 Lichtmikroskopischer Nachweis von Zellkernveränderungen	26
2.2.7 Immunhistochemische Färbung von Meniskusgewebe	26

2.2.8 Untersuchungen zur Genexpression von Matrixmolekülen und Matrix abbauenden Proteasen auf mRNA-Ebene	27
2.2.8.1 Isolierung der RNA aus Meniskusgewebe	27
2.2.8.2 Bestimmung der isolierten RNA-Menge	28
2.2.8.3 Quantitative Real-time RT-PCR	29
2.2.8.4 Auswertung und Darstellung der Real-time RT-PCR-Daten	32
2.2.9 Zymografische Analysen	33
2.2.10 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Einfluss von TNF- α und IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus Meniskusgewebe	35
3.2 Einfluss von TNF- α und IL-1 auf die NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe	37
3.3 mRNA-Expression von Matrixmolekülen und Matrix abbauenden Enzymen aus Meniskusgewebe nach Stimulation mit TNF- α - bzw. IL-1	39
3.4 Einflüsse von TIMPs auf die zytokininduzierte GAG-Freisetzung	41
3.5 Allgemeine Histologie des Meniskusgewebes	43
3.6 Immunhistochemische Untersuchungen zu Veränderungen im Meniskusgewebe unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 und TIMPs bzw. L-NMMA	45
3.7 Histologische Untersuchungen zu Zellkernveränderungen im Meniskusgewebe unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1	47
3.8 Zymografische Analysen unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 und TIMP-3 bzw. L-NMMA	49
3.9 Einfluss von NO-Synthase-Hemmung auf GAG- und NO-Freisetzung	52
4 Diskussion	54
4.1 Diskussion des Versuchsmodells	54
4.1.1 Zeitlicher Rahmen	54
4.1.2 Wirkstoffkonzentrationen und Zusammensetzung des Kulturmödiums	54
4.1.3 Inkubationsschlüssel von Medium und Explantaten	55
4.1.4 Zusammenfassende Beurteilung des Versuchsmodells	56

4.2	Diskussion der Ergebnisse	56
4.2.1	Einflüsse von TNF- α und IL-1 auf bovines Meniskusgewebe in vitro	56
4.2.2	Bedeutung von MMPs und Aggrekanasen am Proteoglykanabbau	59
4.2.3	Zusammenhang zwischen TNF- α - bzw. IL-1-induziertem Proteoglykanabbau und induzierter NO-Freisetzung	63
4.3	Ausblick	64
5	<u>Zusammenfassung</u>	66
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	68

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
Abb.	Abbildung
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AK	Antikörper
APMA	4-Aminophenylmercuric-Acetat
β	beta
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CD120	cluster of differentiation 120
CF	cytotoxic factor
CS	Chondroitinsulfat
C _T	threshold cycle
CTX	cytotoxine
Δ	delta
dest.	destilliert
DIF	differentiation inducing factor
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethylmethyleneblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (cDNA)	Desoxyribonukleinsäure (komplementäre/complementary DNA)
DNase	Desoxyribonuklease
DS	Dermatansulfat
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethyldiamintetraacetatessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FG	Feuchtgewicht
G1	globuläre Domäne 1
GAG(s)	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

et al.	et alii
h	Stunde(n)
HA	Hyaluronan
HBSS	Hanks' Buffering Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
ICE	IL-1 β converting enzyme
IL	Interleukin
IL-1-RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
i. Vgl.	im Vergleich
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KP	Kernprotein
KS	Keratansulfat
Lig.	Ligamenta
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin-Monoacetat
M	molar
MCF	macrophage cytotoxic factor
MD-FGF	monocyte-derived fibroblast growth factor
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
MMP(s)	Matrixmetalloproteinase(n)
NED	Naphthyl-Ethylendiamin
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
NO	Stickoxid
NOS (e/i/nNOS)	NO-Synthase (endotheliale / induzierbare / neuronale NOS)
NTC	No Template Control
OA	Osteoarthrose

OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
PG	Proteoglykane
pmol	Picomol
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA (mRNA)	Ribonukleinsäure (Boten/messenger RNA)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
S	Svedberg
SD	standard deviation = Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	standard error of the mean = Standardfehler
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TACE	TNF- α converting enzyme
Taq	Thermophilus aquaticus
TIMP(s)	tissue inhibitor(s) of metalloproteinases
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TNFSF1A	TNF ligand superfamily member 1A
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
v.a.	vor allem
VP	Verbindungsprotein
v/v	Volumen / Volumen
WHO	World Health Organization
w/v	Gewicht / Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkerne

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tabellen	
Tab. 1: Chemische Substanzen und Reagenzien	17
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien und Geräte	19
Tab. 3: Medien für Gewebeschutz (A) und Kultur (B)	23
Tab. 4: Substanzen für Gewebefixierung (A) und Standardfärbung (B)	26
Tab. 5: Real-time RT-PCR	31
Tab. 6: Rechenschritte zur Bestimmung der relativen Zielgenmenge nach Real-time RT-PCR	33
Abbildungen	
Abb. 1: Übersicht über die Anatomie des Kniegelenks und der Menisken	2
Abb. 2: Schematische Darstellung von Bestandteilen des Meniskusgewebes	5
Abb. 3: Schema zur Herstellung von Meniskusexplantaten	22
Abb. 4: Zytokininduzierte GAG-Freisetzung aus Meniskusgewebe	36
Abb. 5: Zytokininduzierte NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe	38
Abb. 6: Untersuchungen zur Genexpression im Meniskusgewebe	40
Abb. 7: Einflüsse von TIMPs auf die zytokininduzierte GAG-Freisetzung	42
Abb. 8: Histologische Darstellung eines Meniskusexplantates	44
Abb. 9: Immunhistochemische Darstellung von Aggrekanspaltfragmenten (NITEGE) unter Einfluss von TNF- α und TIMP-3 bzw. L-NMMA	46
Abb. 10: Zellkernveränderungen im Meniskusgewebe unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1	48
Abb. 11: Zymografische Darstellung von (pro-)MMP-3 im Überstand	50
Abb. 12: Zymografische Darstellung von (pro-)MMP-3 im Überstand unter Einfluss von APMA	51
Abb. 13: Einfluss von NO-Synthase-Hemmung auf die zytokininduzierte NO- bzw. GAG-Freisetzung	53

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung degenerativer und entzündlicher Gelenkerkrankungen

Weltweit sind Erkrankungen und Verletzungen des Bewegungsapparates die häufigste Ursache für Behinderungen und chronische Schmerzen. Degenerative und entzündliche Gelenkerkrankungen spielen dabei eine große Rolle. Global sind über 135 Millionen Menschen an Osteoarrose (OA) und über 20 Millionen Menschen an Rheumatoider Arthritis (RA) erkrankt. Bereits im Jahre 2003 veröffentlichte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Daten, nach denen 40% der über 70-Jährigen von einer Osteoarrose der Kniegelenke betroffen sind [1]. Bis zu 30% der Menschen über 45 Jahre zeigen bereits radiologische Zeichen einer Kniegelenksarthrose [2]. Das Lebenszeitrisiko an einer symptomatischen Knie-OA zu erkranken beträgt etwa 45% [3]. Dabei weisen 80% der Osteoarrose-Patienten eine Einschränkung ihrer Bewegungsfähigkeit auf, 25% sind aufgrund ihrer Beschwerden nicht in der Lage, ihre Alltagsaktivitäten zu vollrichten [1]. In Bezug auf die Rheumatoide Arthritis führt die WHO an, dass knapp über die Hälfte der RA-Patienten in dem Jahrzehnt nach ihrem Erkrankungsbeginn arbeitsunfähig wird.

Medikamentöse und operative Therapien der degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen stellen bereits jetzt einen immensen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar. Durch den demografischen Wandel in der Bevölkerung mit immer mehr Älteren wird die Bedeutung von Gelenkerkrankungen weiter zunehmen und mit steigenden sozioökonomischen Belastungen einhergehen.

Diese Fakten führen zu einem stetigen Bemühen der Wissenschaft, pathophysiologische Zusammenhänge von Osteoarrose und Rheumatoider Arthritis besser zu verstehen, um frühzeitigere und verbesserte Konzepte für die Prävention und Behandlung dieser Erkrankungen zu entwickeln.

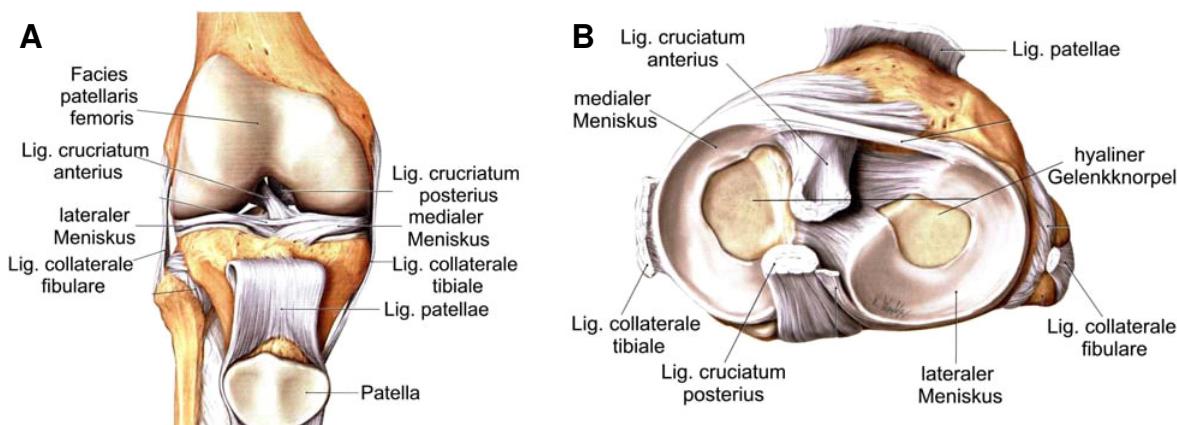
1.2 Grundlagen zu Aufbau und Funktion des Meniskus

1.2.1 Makroskopische Anatomie und Funktionalität der Menisken

Die Menisken sind integraler Bestandteil der Funktionseinheit Kniegelenk. Jedes Kniegelenk (Articulatio genus) beinhaltet zwei Menisken, die als Teil der Articulatio femorotibialis die Inkongruenz zwischen Oberschenkelknochen (Femur) und Schienbein (Tibia) ausgleichen [4].

Der mediale Meniskus (meniscus = Halbmond) hat eine semizirkuläre Form, der laterale Meniskus ist annähernd zirkulär [5]. Die dem Femur zugewandte Seite der Menisken weist eine Konkavität auf, während die Unterseite der Menisken der Tibia planar aufliegt. Dadurch ergibt sich im Querschnitt eine Keilform. Jeder Meniskus kann deskriptiv in ein Vorderhorn, eine Pars intermedia und ein Hinterhorn unterteilt werden. Befestigung finden die Menisken über Anheftung ihrer Basis an die Kniegelenkkapsel und zusätzlich über die Sicherung mit Bändern untereinander bzw. an weiteren Strukturen des Kniegelenks (s. **Abb. 1**). Der laterale Meniskus ist im Vergleich zum medialen Meniskus weniger stark über Bänder fixiert und dadurch insgesamt beweglicher und deutlich weniger verletzungsanfällig.

Abbildung 1: Übersicht über die Anatomie des Kniegelenks und der Menisken



Legende Abb. 1 (Schünke et al., 2005 [6]):

A) Abbildung eines von vorn eröffneten Kniegelenks. Zu sehen sind der Oberschenkelknochen (Femur) sowie der große bzw. kleine Unterschenkelknochen (Tibia bzw. Fibula) und die heruntergeklappte Kniestiefe (Patella). Des Weiteren sind ein Teil der Gelenkflächen von Femur und Patella sowie diverse Bänder (Ligamenta = Lig.) und die beiden Menisken zu erkennen.

B) Aufsicht auf den isolierten unteren Teil des Kniegelenks. Die Menisken liegen der Gelenkfläche der Tibia auf und sind über Bänder am Kapsel-Band-Apparat befestigt. Der mediale Meniskus hat die Form eines Halbkreises, der laterale Meniskus ist annähernd kreisförmig.

Die Blutversorgung der Menisken erfolgt vorwiegend durch Äste der Arteriae geniculares lateralis und medialis sowie durch die A. genicularis media [7].

Aufgrund ihrer Lage und biomechanischen Eigenschaften übernehmen die Menisken wichtige physiologische Funktionen [8]. Wie bereits beschrieben vergrößern sie durch Ausgleich der Inkongruenz im Femorotibialgelenk die Kraft aufnehmende Fläche und verbessern somit die Kraftübertragung. Bei mechanischer Belastung sind die Menisken an der Aufnahme von Stoßkräften beteiligt und tragen so etwa die Hälfte der zwischen Femur und Tibia einwirkenden Kompressionskräfte [9-11]. Dadurch tragen die Menisken insgesamt zum Schutz des Gelenkknorpels vor Verletzung und Degeneration bei [12]. Nach totaler Menisektomie, die bis vor etwa 35 Jahren als Standardtherapie bei Meniskusriss durchgeführt wurde [13], wird die tibiofemorale Kontaktfläche um bis zu 75% verringert und die Spitzenbelastung auf bis zu 235% gesteigert [14]. Weitere Funktionen der Menisken sind die Stabilisation bei Bewegungen des Kniegelenks v.a. während der Flexion [15] und die Förderung der Gelenkschmierung [8] sowie der Diffusionsvorgänge zur Ernährung des hyalinen Gelenkknorpels [16].

1.2.2 Mikroskopische Anatomie und Funktionsweise der Menisken

Die biomechanische Funktionalität der Menisken ist durch ihre feinstrukturelle Zusammensetzung und Funktionsweise begründet. Die Menisken sind ein visko-elastisches, faserknorpelartiges Gewebe und weisen als grundsätzliche Komponenten Zellen, Extrazellulärmatrix sowie Blutgefäße und Nervengewebe auf.

Das Meniskusgewebe enthält im Vergleich zum Gelenkknorpelgewebe relativ wenige Zellen, die historisch aufgrund der fibrösen Natur der Menisken als Fibroblasten bzw. Fibrozyten bezeichnet wurden [17]. Später erfolgten weitere Klassifizierungen als Chondrozyten [18] bzw. Fibrochondrozyten [19]. Dabei stellen die Meniskuszellen keine einheitliche Population dar, sondern weisen abhängig von ihrer Lage im Meniskus eine unterschiedliche Morphologie auf. Direkt an der Oberfläche, wo die Zelldichte am höchsten ist, sind die Zellen flach und spindelförmig, besitzen wenige Fortsätze und einen geringen Zytoplasmagehalt. Weiter tiefer im zentralen Bereich des Meniskusgewebes ist die Anzahl der Zellen geringer und die Zellform überwiegend rund oder polygonal [18]. Die Hauptaufgabe der Meniskuszellen besteht in der Synthese und dem Umsatz von Extrazellulärmatrix. Die Extrazellulärmatrix wiederum trägt durch ihre Zusammensetzung und Anordnung

wesentlich zur biomechanischen Funktionalität des Meniskus bei. Sie verfügt über folgende Bestandteile: Wasser (70-75% des Gesamtvolumens), kollagene Proteine (60-70% des Trockengewichtes), Proteoglykane (1-3% des Trockengewichtes) und nicht-kollagene Proteine (8-13%) wie Fibronectin, Thrombospondin und andere Zelladhäsionsmoleküle [5; 20; 21].

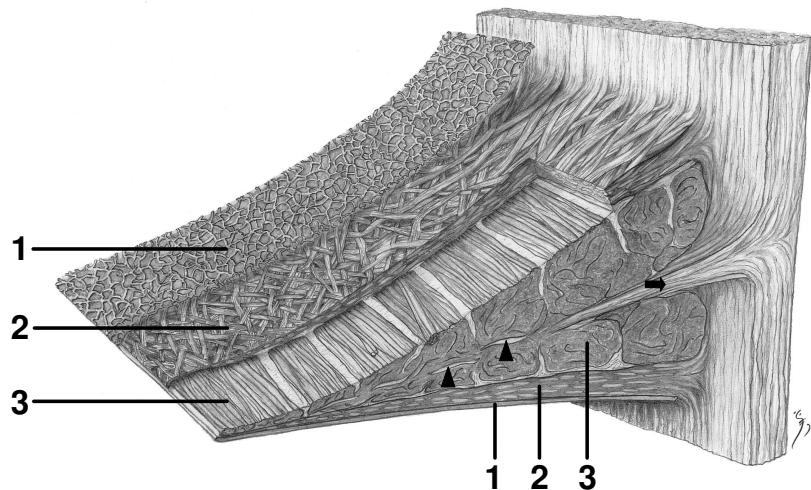
Unter den Proteinen der Kollagen-Familie überwiegt Kollagen Typ I (> 90%) [5; 22], daneben finden sich geringere Mengen von Kollagen Typ II, III, V und VI [23; 24] sowie von Elastin [15]. Die Zusammensetzung der Kollagene variiert je nach Lokalisation im Meniskus. So sind in den nicht-vaskularisierten faserknorpelartigen Anteilen des Gewebes beispielsweise Kollagen Typ I und II in Morphe eines gemeinsamen Netzwerkes koexprimiert [25]. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kollagenfasern entsprechend ihrer Beanspruchung in bestimmter Weise angeordnet sind [21] (s. **Abb. 2A**).

Eine besonders wichtige Aufgabe im Meniskusgewebe tragen trotz ihres geringen Anteils am Trockengewicht die Proteoglykane. Proteoglykane gehören zu einer Familie von Makromolekülen, die aus einem Kernprotein und aus einer variablen Zahl daran kovalent gebundener Polysaccharidseitenketten (Glykosaminoglykane) bestehen (s. **Abb. 2B**). Zu den Glykosaminoglykanen (GAGs) gehören Chondroitin-4-Sulfat (CS-4), Chondroitin-6-Sulfat (CS-6), Keratansulfat (KS) und Dermatansulfat (DS). Im Meniskusgewebe kommen große Proteoglykane wie Aggrekan und Versikan mit vielen CS- und KS-tragenden Seitenketten sowie kleine Proteoglykane wie Dekorin und Biglykan mit nur einer oder zwei GAG-tragenden Seitenketten vor [21; 26-31]. Durch ihren polyanionischen Charakter und die Anordnung zwischen den Kollagenen tragen die Proteoglykane zu den biomechanischen Eigenschaften des Meniskusgewebes bei. Aggrekan als häufigstes Proteoglykan im Meniskus bildet Aggregate mit Hyaluronan, einem aus vielen Disaccharideinheiten bestehenden GAG. Diese Aggregate ziehen aufgrund ihrer negativen Ladungen Kationen und nachgeschaltet per Osmose Wasser an, das zur Stoßdämpferfunktion der Menisken unerlässlich ist. Die kleineren Proteoglykane dienen der Organisation und mechanischen Stabilisierung der extrazellulären Matrix.

Abbildung 2: Schematische Darstellung von Bestandteilen des Meniskusgewebes

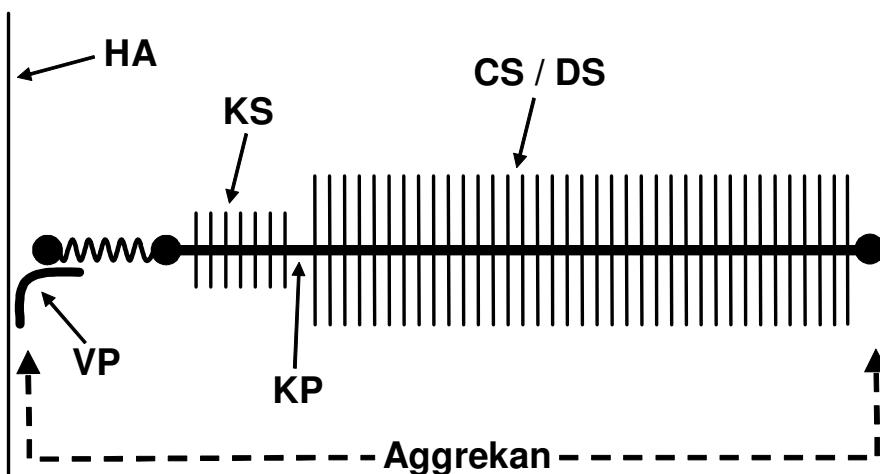
A)

Anordnung der Kollagene im Meniskusgewebe



B)

Struktur von Proteoglykanen am Beispiel des Aggerekans



Legende Abb. 2:

A) nach Petersen und Tillmann, 1998 [32]: Darstellung der dreischichtigen Anordnung der Kollagene im Meniskusgewebe (Querschnitt). Oberflächlich zeigt sich ein Netzwerk feiner Kollagenfibrillen (1), in der nächst tieferen Schicht verlaufen sich überkreuzende Lamellen von Kollagenfasern (2). In den zentralen Gewebeabschnitten zeigen sich überwiegend kräftige Kollagenbündel (3), deren zirkuläre Anordnung morphologisches Korrelat der hohen Zugspannungen im Meniskus ist. Die Kollagenbündel werden vereinzelt durch radiär angeordnete Kollagenfibrillen septenartig zusammengefasst (▲). Im Randbereich des Meniskus bestehen Anheftungen an die Gelenkkapsel (→).

B) nach Lüllmann-Rauch, 2003 [33]: Dargestellt ist ein Aggerekans-Monomer. Es setzt sich aus einem Kernprotein (KP) und daran gebundenen ca. 100 langen Glykosaminoglykan-Ketten aus Chondroitinsulfat (CS) bzw. Dermatansulfat (DS) sowie etwa 30 kürzeren GAG-Ketten aus Keratansulfat (KS) zusammen. Über Verbindungsproteine (VP) interagieren bis zu 100 Aggerekans-Monomere mit Hyaluronan (HA), einem aus vielen Disaccharideinheiten bestehenden GAG. Die so gebildeten Aggregate sind mit den Kollagenfibrillen des Meniskusgewebes in einem System supramolekularer Ordnung vernetzt und tragen so essentiell zur Festigkeit und Druckelastizität der Extrazellulärmatrix bei.

Die das Meniskusgewebe versorgenden Blutgefäße ziehen von der Meniskusbasis aus bis in das mittlere Drittel der Menisken hinein, so dass drei Zonen unterschiedlicher Durchblutung vorzufinden sind – eine äußere so genannte rot-rote Randzone (gut durchblutet), eine mittlere rot-weiße Übergangszone (mäßig durchblutet) und eine weiß-weiße Innenzone (nicht durchblutet). Die nutritive Versorgung der undurchbluteten Innenzone des Meniskus erfolgt durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit und mechanische Konvektion [21]. Neuroanatomische Studien haben zudem den Nachweis der Innervation von Meniskusgewebe erbracht. Dabei ermöglichen sensible Nervenendigungen die Schmerzwahrnehmung, Mechanorezeptoren sind für die Propriozeption zuständig [34].

Im Rahmen der physiologischen Gelenkbelastung findet im Meniskusgewebe ein permanenter regenerativer Umsatz von Extrazellulärmatrix statt. So wurde gezeigt, dass die Immobilisation des Kniegelenkes beispielsweise zu einer Abnahme der Genexpression von Aggukan, einer Abnahme des Proteoglykangehaltes insgesamt und einer Wasserzunahme im Meniskus führt [35]. Enzyme, die am physiologischen Umsatz der Extrazellulärmatrix beteiligt sind, sind katabole Proteasen wie Matrixmetalloproteininasen und anabole Enzyme wie beispielsweise die Kollagen-Synthasen.

1.3 Pathologie und Pathophysiologie der Menisken im Rahmen degenerativ entzündlicher Gelenkerkrankungen

1.3.1 Osteoarrose (OA) und Rheumatoide Arthritis (RA)

Meniskuserkrankungen können ätiologisch grob in traumatische, entzündliche, degenerative, metabolische, kongenitale und neoplastische Veränderungen eingeteilt werden [36]. Entzündliche und degenerative Veränderungen des Meniskusgewebes treten u.a. in Zusammenhang mit Erkrankungen wie Osteoarrose (OA) und Rheumatoider Arthritis (RA) auf.

Bei der Osteoarrose handelt es sich um eine polyätiologische, langsam progrediente, primär nicht entzündliche degenerative Erkrankung von Gelenkgeweben. Sie kann klinisch stumm, in phasenweise entzündlich aktiviertem Zustand mit akuten Schmerzen sowie mit dauerhaften Schmerzen und Funktionseinbußen einhergehen [37]. Im Rahmen der Erkrankung kommt es in den

Gelenken zum Abbau von Knorpelgewebe, Osteophytenbildung, subchondraler Knochenumbildung und im klinisch aktiven Zustand zur Entzündung der Synovialmembran [38].

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung, bei der es ausgehend von Gelenkschleimhautentzündungen (Synovitis) verschiedener Gelenke bei zum Teil schubweise progredientem Verlauf der Entzündung zu Gelenkdestruktion und Invalidität kommen kann. Die variabel ausgeprägte Symptomatik wird in den Diagnosekriterien des „American College of Rheumatology“ erfasst [39]. Dabei sind die Ursachen der Rheumatoiden Arthritis bis heute weitestgehend ungeklärt. Vermutet wird eine multifaktorielle Genese [40].

Konzepte zur Pathogenese von aktivierter OA und RA beinhalten eine gesteigerte Immunreaktion des Organismus mit vermehrter Produktion entzündungsfördernder Botenstoffe (proinflammatorischer Zytokine) wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) und IL-1 (Interleukin-1) [40; 41]. Folge der vermehrten Zytokinproduktion ist u.a. eine gesteigerte Aktivität der bereits am physiologischen Gewebeumsatz beteiligten katabolen Enzyme wie MMPs (Matrixmetalloproteininasen) und Aggrekanasen sowie die vermehrte Produktion diverser Botenstoffe wie z.B. NO (Stickoxid) [42]. Welche detaillierten Zusammenhänge zwischen den Kaskaden gesteigerter Enzymproduktion und Freisetzung endogener Mediatoren wie NO bestehen, ist weitestgehend unbekannt.

Die medikamentöse Therapie der RA umfasst in den letzten Jahren neben der standardisierten Schmerz- und immunsuppressiven Therapie zunehmend auch Behandlungen mit so genannten Biologicals. Dabei handelt es sich um Antikörper gegen körpereigene Botenstoffe, so z.B. gegen TNF- α (Infliximab, Adalimumab) und IL-1 (Anakinra). Die Effekte der Anti-TNF- α -Therapien bei RA zeigen sich in einer verbesserten Symptomkontrolle, der Verbesserung der physikalischen Funktion und dem verlangsamten Fortschreiten radiologisch erfassbarer Gelenkschäden [43]. Auch die Therapieerfolge mit Anakinra sind in Studien festgestellt worden [44; 45]. Um zukünftig noch spezifischere und möglichst nebenwirkungsarme Pharmaka entwickeln zu können, ist es Bemühen der aktuellen Forschung, die Signalkaskaden der entzündlich-destruktiven Prozesse bei Gelenkerkrankungen noch detaillierter zu entschlüsseln.

1.3.2 Proinflammatorische Zytokine: TNF- α und IL-1

TNF- α (TNF = Tumor-Nekrose-Faktor) und IL-1 (IL = Interleukin) spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl immunologischer Körperreaktionen und gehören wie z.B. auch IL-6 und IL-8 zu den entzündungsfördernden Mediatoren des menschlichen Immunsystems. Sie werden daher im Gegensatz zu den so genannten antiinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-4, IL-10 und IL-13) als proinflammatorische Zytokine bezeichnet [42; 46].

TNF- α wurde erstmals 1975 beschrieben [47] und ist als TNFSF1A (TNF ligand superfamily member 1A) Mitglied der „TNF ligand superfamily“, die eine Gruppe von Proteinen (u.a. TNF- β /TNFSF1) mit ähnlicher biologischer Wirkung umfasst [48]. In der Literatur existieren aufgrund der vielfältigen Wirkungen diverse Synonyme für TNF- α wie Kachektin, CF (cytotoxic factor), CTX (cytotoxine), MCF (macrophage cytotoxic factor), DIF (differentiation inducing factor) und MD-FGF (monocyte-derived fibroblast growth factor). Die Produktion von TNF- α wird v.a. durch Makrophagen [47; 49], aber auch durch eine Vielzahl anderer Zelltypen wie Neutrophile Granulozyten, T-Zellen und Natürliche-Killer-Zellen [50; 51] bewerkstelligt.

TNF- α ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, das aus einer Vorstufe durch das TNF- α converting enzyme (TACE/ADAM-17), einer membrangebundenen Disintegrin-Matrixmetalloproteinase [52], durch proteolytische Spaltung entsteht. Seine biologische Wirksamkeit erreicht TNF- α durch die Bildung von Trimeren [53; 54]. Vermittelt werden die Effekte v.a. über die membranständigen Rezeptoren TNF-R1 (CD120a) und TNF-R2 (CD120b) [55; 56]. Ferner gibt es lösliche Rezeptoren, die TNF- α binden können und als physiologische Modulatoren der TNF- α -Wirkung verstanden werden [57-59].

Interleukin-1 kommt im menschlichen Körper im Form zweier Agonisten, IL-1 α und IL-1 β , vor [60; 61]. Diese beiden Proteine werden zunächst als intrazelluläre Pro-Form von verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, Chondrozyten, Synovialozyten und Granulozyten produziert [62] und entfalten ihre Wirkung zum Teil intrazellulär (IL-1 α [63]) sowie nach Prozessierung durch Proteasen bzw. das spezifische IL-1 β -converting-enzyme (ICE) zu einem Protein von jeweils 17 kDa extrazellulär über die IL-1-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2. Gehemmt wird die Wirkung von IL-1 u.a. durch den IL-1-RA (Rezeptor-Antagonist) [60; 61], der kompetitiv an IL-Rezeptoren bindet [64].

TNF- α und IL-1 übernehmen als proinflammatorische Zytokine neben der Beteiligung an lokalen und systemischen Reaktionen des Immunsystems wie z.B. der Induktion von Fieber [65], der Wirkung als Wachstumsfaktor für verschiedene Zellen des körpereigenen Abwehrsystems und der Beteiligung am Septischen Schock [66; 67] auch eine wichtige Rolle im Rahmen degenerativ-entzündlicher Gelenkerkrankungen.

So wurden erhöhte TNF- α - und IL-1-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von OA- und RA-Patienten nachgewiesen [68; 69]. TNF- α wurde vermehrt in der Synovialmembran und am entzündeten Gewebe bei RA-Patienten gefunden [70] und auch *in vitro* spontan von RA-Synovialzellen produziert. Die transgene Expression von humanem TNF- α beispielsweise führte bei Mäusen klinisch zur Entwicklung einer Rheumatoide Arthritis und konnte durch die Gabe von TNF-Antikörpern komplett supprimiert werden [71]. Speziell an Knorpel- aber auch an Meniskusgewebe konnte in verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten ein durch TNF- α bzw. IL-1 induzierter Abbau von Proteoglykanen und Kollagenen sowie die Hemmung deren Syntheserate und somit ein verstärkter Gewebekatabolismus gezeigt werden [72; 73]. Ferner kam es durch TNF- α bzw. IL-1 im Meniskusgewebe zur vermehrten Produktion diverser Mediatoren wie Stickoxid (NO) und Prostaglandin E2 [74]. Durch erhöhte NO-Spiegel wiederum konnte *in vitro* eine vermehrte Apoptoserate von Chondrozyten induziert werden [75]. Des Weiteren scheinen TNF- α und IL-1 in der Lage zu sein, modulierenden Einfluss auf Meniskuszellen bzw. –gewebe im Rahmen mechanischer Belastung auszuüben. So war TNF- α in der Lage, die durch mechanischen Stress induzierbare Proteoglykansynthese von Meniskuszellen von Schweinen zu verhindern [76]. Im Sinne einer Hemmung der intrinsischen Reparaturmechanismen nach mechanischer Verletzung wurden auch in einem *In-vitro*-Modell mit Meniskusgewebe von Schweinen entsprechende Effekte der erwähnten Zytokine dokumentiert [77; 78].

1.3.3 Matrixmetalloproteinasen: MMPs

MMPs (Matrixmetalloproteinasen, Matrixine [79]) bilden eine Familie von zink- und calciumabhängigen Endopeptidasen, die proteolytische Funktionen bei vielen verschiedenen biologischen Abläufen im menschlichen Körper übernehmen [80]. Zu den Matrixmetalloproteinasen gehören neben den in dieser Arbeit gemessenen

MMP-1 (Kollagenase 1), MMP-2 (Gelatinase A), MMP-3 (Stromelysin 1) und MMP-13 (Kollagenase 3) auch MMP-7 bis -12 und MMP-14 bis -28 [81].

MMPs können von einem breiten Spektrum an Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen und Epithelzellen produziert werden [82; 83].

Die Mehrzahl der MMPs wird als Pro-Form (inaktives Zymogen) sezerniert und kann anschließend proteolytisch in die biologisch aktive Form überführt werden [80]. Die Regulation der MMP-Aktivität erfolgt auf verschiedenen Wegen. So kann die Expression transkriptional durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone, über Zell-Zell-Interaktionen und mittels Zell-Matrix-Interaktionen moduliert werden [84; 85], des Weiteren kann eine Hemmung der aktiven MMPs u.a. durch endogene Inhibitoren wie α 2-Makroglobulin und TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases, s. **Kap. 1.3.5**) oder mittels Spaltung durch endogene Proteasen erfolgen [81; 86].

Bei physiologischen Abläufen nehmen MMPs in der Beteiligung am Umsatz von Extrazellulärmatrix eine zentrale Rolle ein. Sie tun dies bereits in der embryonalen Morphogenese sowie zeitlebens im Rahmen des regulären Gewebeumsatzes und bei Prozessen wie z.B. der Wundheilung [85; 87]. Im Knorpel- und Meniskusgewebe zeigt sich die Wirkung der MMPs u.a. durch die Spaltung von Kollagenmolekülen (MMP-1, -2, -8, -13 und -14) [88] sowie durch den Abbau von Proteoglykanen wie Aggrekan und anderen nicht-kollagenen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (MMP-2, -3, -9, -10, -13 und -19) [89-92]. Im Rahmen verschiedener pathologisch degenerativer oder entzündlicher Prozesse (u.a. OA, RA, Arteriosklerose, Tumorerkrankungen) kann es aufgrund eines Ungleichgewichtes zwischen Hemmung und Aktivierung der MMPs zu einer vermehrten Aktivität dieser katabolen Enzyme kommen [89; 93-95].

So konnten z.B. in der Synovialflüssigkeit von RA- und OA- Patienten und in In-vitro-Modellen mit TNF- α und IL-1 erhöhte MMP-Spiegel nachgewiesen werden [96-98]. Hierbei waren vor allem MMP-3-Levels (bei RA stärker als bei OA) um ein Vielfaches erhöht. Zudem konnte eine Korrelation erhöhter MMP-3-Spiegel mit Erhöhung der Konzentrationen von TNF- α und den löslichen TNF- α -Rezeptoren in der Synovialflüssigkeit gezeigt werden [99]. Die Expression verschiedener MMPs scheint dabei zeitlich in Abhängigkeit vom Stadium der entzündlichen Prozesse zu variieren [100]. So konnte eine starke Erhöhung für MMP-3 im Knorpelgewebe in frühen

Phasen einer OA gezeigt werden, während die Levels im Langzeitverlauf wieder sanken. Nach Stimulation von gesundem bzw. osteoarthrotischem Gelenkknorpelgewebe mit Zytokinen (TNF- α und IL-1) kam es zudem zu einer erhöhten Nachweisbarkeit MMP-3-immunreaktiver Chondrozyten [82].

Untersuchungen an Meniskusgewebe von Kaninchen zeigten unterschiedliche Genexpressionsmuster von MMPs nach mechanisch induzierter OA. Während in einer Studie unter induzierter OA eine signifikant erhöhte Expression von MMP-13 bei bereits konsekutiv vorhandener Expression von MMP-1, -3 und -13 demonstriert werden konnte [101], kam es in einer anderen Studie zu keiner signifikanten Induktion der Gene von MMP-1, -3 und -13 [102].

In einem Mausmodell mit induzierter Arthritis konnte dagegen gezeigt werden, dass die in der frühen Phase der Entzündung deutlich erhöhte Proteoglykanfreisetzung mit einer deutlich erhöhten MMP-3-Expression einherging. Da hierbei eine Erhöhung MMP-spezifischer Aggrekanspaltfragmente jedoch erst in einer späteren Phase der Untersuchung bzw. nach Aktivierung der inaktiven MMP-Formen durch einen MMP-Aktivator (APMA) auftrat [103] und auch eine alleinige zusätzliche IL-1-Stimulation keinen steigernden Einfluss auf die MMP-spezifischen Aggrekanspaltfragmente zeigte, ergab sich die Vermutung, dass MMP-3 in der frühen Phase des induzierten Aggrekanmetabolismus überwiegend in seiner inaktiven Pro-Form und weniger in der bereits proteolytisch aktiven Form vorlag.

In zymografischen Analysen (Substrat-kombinierte Gelelektrophorese, s. **Kap. 2.2.9**) an tierischen und menschlichen Gelenkgeweben konnte zudem der indirekte Nachweis einer Beeinflussung von (pro-)MMPs (MMP-1, -2, -3, -9) auf Proteinebene durch TNF- α bzw. IL-1 geführt werden [104; 105].

1.3.4 Aggrekanasen: ADAMTS-4 und ADAMTS-5

Die Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 (ADAMTS = a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) sind Teil einer Gruppe von knapp 20 Metalloendopeptidasen, die als ADAMTS-Familie zusammengefasst werden [106]. Ihnen verwandt sind eine Reihe weiterer Enzyme wie die Vielzahl der größtenteils membrangebundenen Proteasen der ADAM-Familie, die z.B. an der Spaltung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen an Zelloberflächen beteiligt sind und aufgrund dieser Funktionen auch als Sheddasen (engl.: to shed sth. = etw. abwerfen/loswerden) bezeichnet werden [107]. So zeichnet ADAM-17

(TACE) beispielsweise zum einen durch Abspaltung für die Freisetzung des aktiven löslichen TNF- α s aus dem zellgebundenen Vorläufermolekül verantwortlich, zum anderen können durch ADAM-17 auch Zytokinrezeptoren wie die TNF- α -Rezeptoren 1 und 2 und der IL-1-Rezeptor 2 von Zelloberflächen abgespalten und dadurch inaktiviert werden [107; 108].

Die Wirkung der ADAMTS-Proteine zeigt sich in erster Linie in der Prozessierung von Proteoglykanen sowie bei weiteren biologischen Abläufen wie der Hemmung von Angiogenese und der Regulation der Blutgerinnung [106].

Zu der Untergruppe der Aggrekanasen, die in unterschiedlichem Maße Proteoglykane wie Aggrekan, Versikan und Brevikan spalten können [109; 110] werden je nach Definitionskriterien lediglich ADAMTS-4 (Aggrekanase 1) und ADAMTS-5 (Aggrekanase 2) [111] oder erweitert auch ADAMTS-1 (Aggrekanase 3), ADAMTS-8, -9 und -15 gezählt [106]. Die durch Aggrekanasen vermittelte Spaltung von Aggrekan läuft dabei an mehreren spezifischen Stellen des Aggrekan-Kernproteins (s. **Abb. 2B**) ab, sodass verschiedene Spaltfragmente entstehen können [112; 113]. Das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene G1-NITEGE-Spaltprodukt entsteht durch Spaltung zwischen den Aminosäuren Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ des Aggrekan-Kernproteins [114; 115]. Ein verstärktes Auftreten von verschiedenen Aggrekan-Spaltfragmenten sowie eine vermehrte Aggrekanfreisetzung konnte in vitro unter dem Einfluss von Zytokinen (IL-1 und TNF- α) auf Rinderknorpelgewebe sowie an menschlichem osteoarthrotischem Gelenkknorpel gezeigt werden [116; 117]. Die Aggrekan-Spaltung im Rinderknorpelgewebe wurde dabei zu 90% von ADAMTS-4 und -5 bewerkstelligt. Die GAG- und Aggrekan-Spaltfragment-Freisetzung am menschlichen Knorpelgewebe konnte dosisabhängig durch Einsatz eines ADAMTS-Inhibitors, nicht jedoch durch den spezifischen Einsatz eines MMP-Inhibitors reduziert werden. ADAMTS-4 und -5 konnte des Weiteren eine substratabhängig variable, hohe Spezifität für die Aggrekan-Spaltung attestiert werden [118]. Beide Enzyme waren ebenso wie ADAMTS-1 nicht in der Lage andere Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie z.B. Kollagen Typ I und II zu spalten.

Sehr unterschiedliche Forschungsergebnisse sind in Bezug auf die durch Zytokine induzierte Genexpression von ADAMTS-4 und -5 gesammelt worden. So konnte eine konstitutive Expression beider Gene in menschlichem Synovialgewebe und Synovialozyten von Gesunden bzw. RA- und OA-Patienten gezeigt werden, wobei die ADAMTS-4-Expression unter Zytokinstimulation zusätzlich angeregt werden

konnte [119]. In verschiedenen Studien an menschlichem und bovinem Knorpelgewebe war ADAMTS-5 sowohl konstitutiv als auch im Rahmen einer OA exprimiert, wohingegen ADAMTS-4 fast ausschließlich bei OA-Proben detektiert werden konnte [116; 117; 120]. Durch Zytokinstimulation von Knorpelgewebe kam es zum Teil zu einer erhöhten Expression von Aggrekanasen [116; 121-123], zum Teil blieben die mRNA-Levels dieser Enzyme unbeeinflusst [124; 125]. Auch die Angaben darüber, welche Aggrekanasen im Einzelnen (ADAMTS-4 und/oder ADAMTS-5) durch welche Zytokine Veränderungen auf der mRNA-Ebene erfahren, sind variierend [121; 123; 126]. Als eine mögliche Erklärung dieser heterogenen Ergebnisse wird die Möglichkeit angesehen, dass die Zytokinstimulation in erster Linie zur Aktivierung von bereits im Gewebe vorhandener Aggrekanasen führen könnte und die Zytokine somit vorrangig im Sinne einer posttranslationalen Regulierung Einfluss auf die Aggrekanaseaktivität im Rahmen degenerativer entzündlicher Prozesse nehmen [110].

1.3.5 **Tissue inhibitors of metalloproteinases: TIMPs**

Die so genannten TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) umfassen eine Familie von vier im menschlichen Körper vorkommenden Proteinen (TIMP-1, -2, -3 und -4), die innerhalb der letzten knapp 25 Jahre nach und nach entdeckt und charakterisiert wurden [127-131]. TIMPs werden von einer Vielzahl an Zellen produziert und tragen eine Vielzahl biologischer Funktionen. Eine Hauptaufgabe der TIMPs ist die Regulation der proteolytischen Aktivität von zinkhaltigen Enzymen (MMPs). Sie hemmen die aktiven MMPs über nicht-kovalente Bindung und sind in der Lage die Umwandlung von Pro-MMP-Formen in die aktiven Formen zu unterdrücken [132]. TIMP-3 hebt sich von den anderen TIMPs dadurch ab, dass es zusätzlich die Fähigkeit besitzt, neben MMPs auch Proteine aus der ADAM-Familie (s. **Kap. 1.3.4**) wie z.B. ADAM-10, ADAM-12, ADAM-17 (TACE = TNF- α converting enzyme), ADAM-19 und verschiedene Aggrekanasen zu hemmen [86; 133; 134]. Lediglich für TIMP-1 wurde ebenfalls ein hemmender Effekt auf ein ADAM-Protein (ADAM-10) nachgewiesen [134]. TIMP-3 verfügt zudem über eine besonders hohe Bindungssaffinität zur Extrazellulärmatrix [135-138], während die anderen TIMPs überwiegend in löslicher Form vorkommen [86].

In Bezug auf Gelenkerkrankungen sind bereits diverse Untersuchungen zu TIMPs erfolgt. An Gelenkknorpelgewebe von Schweinen wurde gezeigt, dass exogenes

TIMP-3 in der Lage ist, die IL-1-vermittelte Glykosaminoglykanfreisetzung dosisabhängig zu hemmen, während TIMP-1 und TIMP-2 diese Effekte nicht bewirken konnten [139]. Die gleichen Effekte zeigten sich auch an nasalem Knorpelgewebe von Rindern. Von der selben Arbeitsgruppe wurde bereits zuvor gezeigt, dass TIMP-3 hemmend auf die Aggrekanasen 1 und 2 (ADAMTS-4 und -5) [140] wirkt und insofern ein wichtiger inhibitorischer Mediator im Rahmen des durch Aggrekanasen vermittelten Aggrekanabbaus sein könnte.

1.3.6 Stickoxid (NO) und Stickoxid-Synthase-Hemmung

Stickoxid (NO) ist ein freies Radikal, das im Rahmen verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im menschlichen Körper eine Rolle spielt. Entdeckt wurde das ursprünglich als EDRF (endothelium-derived relaxing factor) bezeichnete Molekül durch seine tonusmindernde Wirkung auf die glatten Muskelzellen von Blutgefäßen [141-144]. NO kann durch eine Vielzahl an Zelltypen wie z.B. synoviale Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten produziert werden [144]. Die so genannten NO-Synthasen (NOS) führen mittels oxidativer Umsetzung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin zur Freisetzung von NO [145]. Derzeit sind drei Isoformen der NO-Synthasen bekannt. Die endotheliale NOS (eNOS/NOS-3) und neuronale NOS (nNOS/NOS-1) werden konstitutiv exprimiert und calcium- und calmodulin-abhängig aktiviert, die induzierbare NOS (iNOS/NOS-2) kann durch verschiedene Mediatoren wie z.B. auch IL-1 und TNF- α induziert werden [146] und so deutlich gesteigerte NO-Mengen produzieren [147]. Dabei hat NO als freies Radikal eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden [148] und entfaltet somit nur kurze Zeit direkte Wirkungen. Indirekt wirkt NO über stabilere Endprodukte wie Nitrit, Nitrat, Peroxynitrit und Nitro-Tyrosin, in die es umgewandelt wird [145; 149; 150]. Durch Reduktion von Nitrit bzw. Nitrat kann es auf einem zweiten Wege zu einer NO-Produktion kommen [151].

Zu den zahlreichen Effekten von NO zählen neben der Vasodilatation u.a. die Modulation von Zellen des Immunsystems wie T-Zellen, Leukozyten und Mastzellen [147; 150]. NO spielt somit eine wichtige Rolle im Rahmen physiologischer Prozesse wie Immunität und bei der Modulation von Entzündungsprozessen [148].

Auch im Rahmen entzündlicher und degenerativer Erkrankungen im Allgemeinen und auch bei Gelenkerkrankungen im Speziellen kommt es zu einer erhöhten NO-Produktion [148]. So wurden im Serum, in der Synovialflüssigkeit und in Synovial-

bzw. Knorpelgewebe von RA- bzw. OA-Patienten erhöhte Nitrit-Spiegel gemessen [68; 152-155]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass NO im Meniskusgewebe produziert werden kann. Sowohl im Rahmen experimenteller OA [156], als auch nach partieller Menisektomie [157], nach mechanischer Stimulation [158-161] und auch unter Einfluss der Zytokine IL-1 bzw. TNF- α [74; 162] konnte eine NO-Freisetzung gemessen werden.

Um die Effekte von NO auf Knorpel- und Meniskusgewebe genauer untersuchen zu können, sind bereits verschiedene Studien mit Hemmstoffen der NO-Produktion durchgeführt worden. Ein synthetischer Inhibitor der NO-Synthasen ist N^G-Monomethyl-L-Arginin-Monoacetat (L-NMMA). Bei L-NMMA handelt es sich um ein Analogon zu Arginin, das über Bindung an die NO-Synthasen zur Unterdrückung der NO-Produktion in der Lage ist [163; 164]. Die NO-Produktion konnte durch L-NMMA im Knorpel- und Synovialgewebe von RA-Patienten sowie bei mit IL-1 stimulierten menschlichen Knorpelzellen [165] bzw. IL-1- oder TNF- α -stimuliertem menschlichem Knorpelgewebe [166] reduziert werden. In einer Reihe verschiedener Tiermodelle mit Knorpelgewebe (Rind, Kaninchen) unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine (IL-1 bzw. TNF- α) wurde die NO-Freisetzung durch L-NMMA ebenfalls gesenkt [167-169]. Entsprechende Effekte wurden auch an Meniskusgewebe von Kaninchen [162] und Meniskuszellen von Schweinen [76] unter IL-1- bzw. TNF- α -Einfluss gefunden. Im Rahmen verschiedener dieser Studien kam es durch L-NMMA zu einer Steigerung der IL-1-induzierten GAG-Freisetzung [162; 168]. Auf der anderen Seite waren die durch IL-1 bewirkte Verminderung der Syntheseleistung für Kollagene und Proteoglykane unter L-NMMA-Einfluss abgeschwächt [162; 165; 167; 170].

Zusammenfassend ist nicht eindeutig geklärt, welche Rolle NO bei den Mechanismen des Abbaus von Meniskusgewebe im Rahmen degenerativer und entzündlicher Prozesse spielt. In einer Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten wurde NO eine katabole Funktion zugeordnet [75; 160; 171]. Andere Daten deuten jedoch auf einen schützenden Effekt von NO bei IL-1-induziertem Gewebeabbau hin [162].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Pathogenese degenerativer und entzündlicher Gelenkerkrankungen wie der Osteoarrose und der Rheumatoiden Arthritis spielen die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 eine wichtige Rolle. Während die

Effekte dieser Mediatoren bereits vielfach in Versuchmodellen mit Gelenkknorpelgewebe untersucht worden sind, liegen zum Meniskusgewebe verhältnismäßig wenige Daten vor. Da der Meniskus durch seine spezielle Beschaffenheit und Integration im Kniegelenk eine wichtige Rolle für die gesunde Funktion des Kniegelenks einnimmt, stellt gleichsam der Erhalt von Meniskusgewebe im Rahmen degenerativer Gelenkerkrankungen eine wichtige Aufgabe dar. Gegenstand dieser Arbeit sollten Untersuchungen zur Wirkung von TNF- α und IL-1 auf Meniskusgewebe sein, um diesbezügliche pathophysiologische Prozesse besser zu verstehen. Hierzu wurde ein im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel etabliertes In-vitro-Modell mit Rindermenisken und einer dreitägigen Inkubationszeit verwendet [172], mit dem eine frühe Phase der Entzündungsvorgänge am Gewebe simuliert werden sollte.

Um die Effekte von TNF- α bzw. IL-1 auf das Gewebe zu untersuchen wurden standardmäßig Untersuchungen zur Glykosaminoglykan(GAG)-Freisetzung und NO-Freisetzung aus Meniskusexplantaten durchgeführt. Weitere Ebenen, die erfasst werden sollten, waren die mRNA-Expression verschiedener gewebeständiger Proteine und kataboler Enzyme (MMPs, Aggrekanasen), morphologische Veränderungen im Gewebe (Immunhistochemie) und an Zellen (Histologie von Apoptosezeichen) sowie die Anreicherung von MMPs im Kulturüberstand. Bei den Untersuchungen zu den Wegen der durch TNF- α bzw. IL-1 vermittelten Effekte an Meniskusgewebe wurde der Fokus auf die Betrachtung der für Abbau bekannten Enzyme MMPs und Aggrekanasen gelegt. Zur Differenzierung dieser Abbauwege wurden Versuche mit TIMPs durchgeführt und auf verschiedenen Ebenen analysiert. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen NO-Freisetzung und GAG-Freisetzung zu untersuchen, wurden Versuche mit dem NO-Synthase-Inhibitior L-NMMA durchgeführt.

Nach Durchführung der Versuche sollten folgende Ziele erreicht worden sein:

- 1. Erfassung diverser Einflüsse von TNF- α bzw. IL-1 auf Meniskusgewebe von Rindern im Rahmen des vorliegenden In-vitro-Modells.**
- 2. Untersuchung der Beteiligung von MMPs und Aggrekanasen am TNF- α -bzw. IL-1-induzierten Proteoglykanabbau am bovinen Meniskusgewebe.**
- 3. Erfassung eines potentiellen Zusammenhangs zwischen zytokininduziertem Proteoglykanabbau und induzierter NO-Freisetzung.**

2 Material und Methoden

2.1 Material

Es folgen die tabellarischen Auflistungen für chemische Substanzen und Reagenzien bzw. Verbrauchsmaterialien und Geräte. Die für die Real-time RT-PCR benutzten Primerpaare stammen von der Firma MWG-Biotech AG und werden in dem entsprechenden Methodenkapitel gesondert aufgeführt.

Tabelle 1: **Chemische Substanzen und Reagenzien**

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	Merck
AK: ADAMTS4 rabbit	Affinity BioReagents
AK: ADAMTS5 rabbit	Affinity BioReagents
AK: Aggrecan Neo rabbit	Affinity BioReagents
AK: AlexaFluor® 488 Goat Anti-Rabbit SFX Kit	Invitrogen
Amphotericin	PAA
APMA	Sigma
Aqua dest.	Biochrom AG
Bisbenzimid	Sigma
Bromphenolblau	Promega
BSA	Sigma
Chloroform	Merck
Chondroitin-C-Sulfat	Sigma
Citronensäure	Merck
Coomassie-Brilliant-Blue-R-250	Severa
DePeX®	Serva
DMEM	Sigma
DMMB	Polysciences
DMSO	Sigma
EDTA	Fluka
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck

Fluorescent Mounting Medium	Dako
Glycerin	Fluka
Glycin	Roth
Griess-Reagenz	Sigma
HBSS	Biochrom AG
HCl	Merck
HEPES	Biochrom AG
Isopropanol	Merck
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
L-Cystein	Sarstedt
L-NMMA	Alexis Biochemicals
Mayer´s Hämalaunlösung	Merck
Methanol	Merck
Methylbenzoat	Roth
Na ₂ B ₄ O ₇ (Borax)	Sigma
Na ₂ EDTA	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Roth
NaNO ₂	Merck
NaOH	Merck
Na-Pyruvat	Biochrom AG
Papain	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast (Paraffin)	Sherwood Medical
PBS	Biochrom AG
Penicillin G	PAA
Prolin	Sigma
Propanol	Roth
Pyronin G	Merck
Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
Ready Gel Zymogram Gel 161-1168	Bio-Rad
Recombinant Human IL-1 α	R & D Systems
Recombinant Human TIMP-1	R & D Systems

Recombinant Human TIMP-2	R & D Systems
Recombinant Human TIMP-3	R & D Systems
Recombinant Human TNF- α /TNFSF1A	R & D Systems
SDS	Serva
Streptomycinsulfat	PAA
Toluidinblau	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris	Sigma
2 x Tris-Glycin-SDS Sammelpuffer	Novex
Tris-HCl	Merck
Tris-Acetat	Sigma
Triton-X-100	Roth
Trizol	Invitrogen
Tween-20	Merck
Vitamin C	Sigma
Xylol	Roth

Tabelle 2: **Verbrauchsmaterialien und Geräte**

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
24er-Wellplatte	Sarstedt
96er-Mikrotiterplatte	Sarstedt
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Dispergiergerät (Polytron PT 3000)	Kinematica AG
Elektrophoresekammer	Biometra
ELISA-Reader (SLT)	Labinstruments GmbH
Eppendorf-Caps	Eppendorf
Gefrierschrank (-70 °C)	Heraeus
Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT 2)	Heraeus
Glasplatten	Amersham Pharmacia
Kühlschrank/Gefrierschrank (-20 °C)	Privileg
Mikroskop Axioskop	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss

Mikrotom (RM 2165)	Leica
Netzanschlussgerät (Power Pac 200)	BioRad
O ₂ /CO ₂ -regulierter Brutschrank	Heraeus
Objektträger HistoBond	Marienfeld
Photometer Ultraspec II	Biochrom
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastibrand Einmalküvetten	Brand
Rüttler	Polzin Laborbedarf
Skalpell (Cutfix 10)	Aesculap AG
Skalpellklingen	Bayha
Stanzen (3 mm)	HEBUMedical
Stanzen (10 mm)	Arthrex
sterile Werkbank	Herasafe
Tischzentrifuge	Heraeus
Thermocycler (Primus 96)	Peqlab
Vortexer	Heidolph
Waage (Genius)	Sartorius
Wasserbäder	Gesellschaft für Labor- technik GmbH Memmert
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge	Heraeus
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt

2.2 Methoden

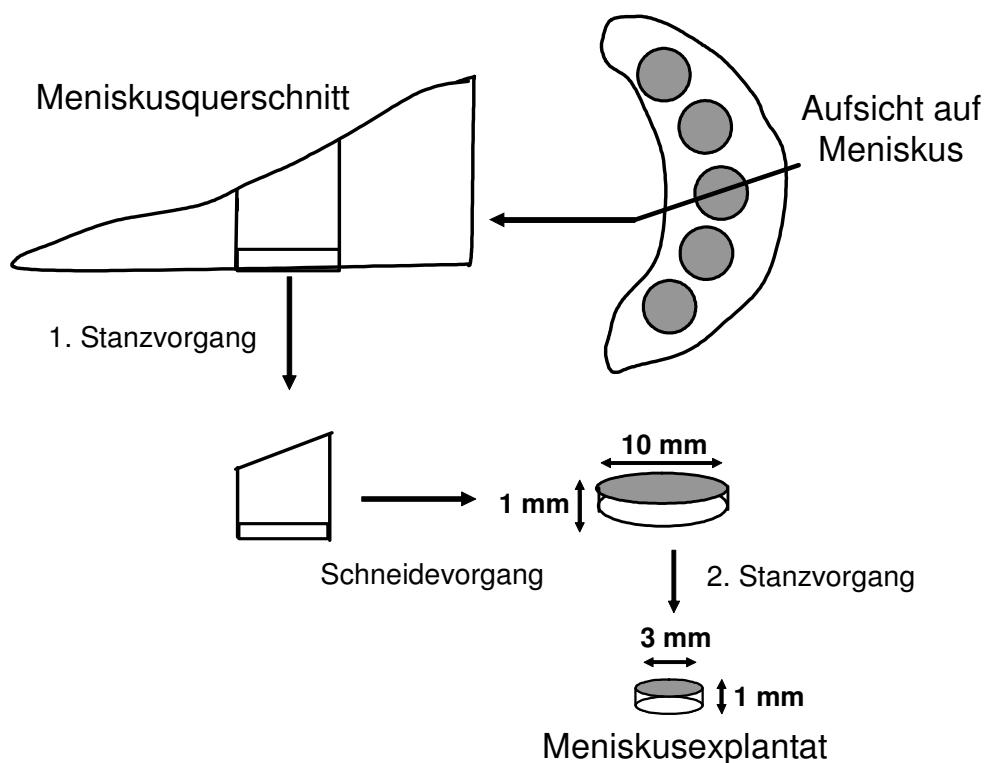
2.2.1 Gewebebeschaffung und -verarbeitung

In dieser Arbeit wurde mit einem im Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel etablierten In-vitro-Modell mit Rindermenisken gearbeitet [172]. Grundprinzip ist die Herstellung von Meniskusexplantaten sowie deren Kultivierung und Inkubation für 72 Stunden.

Verwendet wurde Meniskusgewebe von bis zu zwei Jahre alten Rindern aus dem Schlachtbetrieb „Fleischzentrale GmbH“ in Bad Bramstedt bzw. aus der Hofschlachterei „Muhs“ in Krummbek. Zu Beginn eines Arbeitszyklus wurden die Knie von am Vortage geschlachteten Kühen bei den Betrieben abgeholt. Bis zur Präparation wurden sie bei 6 – 8 °C gekühlt.

Im Labor erfolgte dann die Isolierung der Explantate. Zunächst wurden die Menisken einzeln aus dem Gelenk präpariert. Dazu wurden das Gelenk mit einem Skalpell eröffnet und die Menisken letztlich durch Durchtrennung der Kreuzbänder zugänglich gemacht. Durch Lösen der peripheren Anheftung an der Gelenkkapsel und Abtrennen der Verbindungen zwischen Vorder- bzw. Hinterhorn und Weichteilapparat, konnten Innen- und Außenmeniskus isoliert werden. Anschließend wurden sie in einem sterilen Gefäß mit HBSS-Lösung (s. **Tab. 3A**) zwischengelagert und vor Austrocknung bewahrt.

Im folgenden Arbeitsschritt wurden mit einer Stanze (Stanzöffnung: 10 mm Durchmesser) abhängig von der Meniskusgröße vier bis sechs Meniskuszyylinder unter Aussparung der vaskularisierten, außen gelegenen Anteile der Menisken herausgestanzt (s. **Abb. 3**). Von diesen wurde dann mit einem sterilen Skalpell je eine Gewebescheibe der planaren, ursprünglich der Gelenkfläche der Tibia zugewandten Meniskusoberfläche in einer speziellen Schneidevorrichtung abgetrennt. Die Scheiben bemaßen 10 mm im Durchmesser und 1 mm in der Dicke. Im letzten Arbeitsschritt der Gewebeisolierung wurden dann die zur Kultivierung verwendeten Explantate aus den Gewebescheiben gestanzt. Hierzu wurden kleine metallene Handstanzen eingesetzt, mit denen pro Scheibe bis zu fünf Explantate von je 1 mm Dicke und 3 mm Durchmesser gefertigt werden konnten.

Abbildung 3: Schema zur Herstellung von Meniskusexplantaten

Legende Abb. 3 (modifiziert nach Lemke et al., 2006 [172]):

Aus einem Meniskus wurden zunächst je nach Meniskusgröße vier bis sechs Gewebestanzen von 10 mm Durchmesser entnommen. Die so entstandenen runden Gewebestücke mit planarer Unter- und schräger Oberseite wurden in einem Schneidevorgang zur Herstellung von 1 mm hohen und 10 mm durchmessenden Meniskusscheiben verwendet. Abschließend wurden in einem zweiten Stanzvorgang die für die Kultivierung verwendeten Meniskusexplantate von 1 mm Höhe und 3 mm Durchmesser gewonnen.

2.2.2 Explantatkultivierung und prinzipieller Ablauf der Inkubierung

Nach Gewinnung der Meniskusexplantate wurde ihr jeweiliges Feuchtgewicht bestimmt. Anschließend wurden die Explantate systematisch gleichmäßig in eine Inkubationsplatte mit DMEM-Kulturmedium (s. **Tab. 3B**) verteilt. Je nach Versuchsmodell fanden hierbei 24er-Wellplatten (3 Explantate in 1 ml Inkubationslösung pro Well) oder 96er-Mikrotiterplatten (1 Explantat in 200 µl pro Well) Verwendung.

Dem prinzipiellen Versuchsaufbau folgend wurden dem Medium der einzelnen Versuchsgruppen entsprechende Stimulanten zugesetzt. Modellsubstanz dieser Arbeit war das Zytokin TNF- α , das regelhaft in der Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt wurde. Als Referenzsubstanz diente Interleukin-1 α (Recombinant Human IL-1 α), das in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet wurde. Als spezifische

Hemmstoffe wurden in bestimmten Experimenten Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren (TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3) sowie ein NO-Synthase-Inhibitor (L-NMMA) eingesetzt.

Die Inkubation erfolgte dann für 72 Stunden bei 37 °C und fünf prozentiger CO₂-Umgebung. Anschließend wurden die einzelnen Kulturüberstände aus den Wells abgezogen und für die vorgesehenen Messungen verwendet bzw. in Eppendorf-Caps bei -20 °C verwahrt. Die Explantate wurden zunächst in flüssigem Stickstoff bei -70 °C schockgefroren und so für nachfolgende Untersuchungen am Gewebe konserviert. Zum Abschluss des etablierten Versuchsmodells gehörten standardmäßig die Messungen der GAG- und NO-Konzentrationen im Überstand sowie die Einbettung von einigen Explantaten pro Versuchsgruppe für die histologische Aufbereitung.

Tabelle 3: Medien für Gewebeschutz (A) und Kultur (B)

A) HBSS-Lösung

- HBSS (Hanks' Buffering Salt Solution)
- 10.000 U/ml Penicillin G
- 10 mg/ml Streptomycinsulfat
- 25 µg/ml Amphotericin

B) Kulturmedium für Explantate

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- 10 mM HEPES
- 1 mM Na-Pyruvat
- 0,4 mM Prolin
- 50 µg/ml Vitamin C
- 10.000 U/ml Penicillin G
- 10 mg/ml Streptomycinsulfat
- 25 µg/ml Amphotericin

2.2.3 Messung von Glykosaminoglykanen in Überstand und Gewebe

Standardmethode der Arbeit zur Erfassung von Gewebedestruktion im Meniskus war die Messung von Glykosaminoglykanen (GAGs) im Überstand der Ansätze nach Inkubation. Das Prinzip ist die photometrische Messung von mit Dimethylmethyleneblau (DMMB) farbkomplexbildenden GAGs.

Dazu wurden 80 µl aus dem jeweiligen Überstand bzw. je nach Eichkurve auch eine mit PBE-Lösung (0,1 M Na₂HPO₄, 0,01 M Na₂EDTA, pH 6,5) verdünnte geringere Menge mit 800 µl DMMB-Lösung (0,04 M DMMB, 0,2 M Ethanol, 0,04 M NaCl, 0,04 M Glycin, 0,1 M HCl, pH 3) in einer Küvette versetzt und die Extinktion mit Hilfe eines Photometers (Ultrospec LKB, Biochrom) bei einer Wellenlänge von 525 nm

gemessen. Zusätzlich könnte der GAG-Gehalt der Explantate bestimmt werden. Hierzu wurden die Explantate über Nacht bei 65 °C in 1 ml Papain-Lösung (2,125 U/ml Papain, 0,01 M L-Cystein, 0,1 M Na₂HPO₄, 0,01 M Na EDTA, pH 6,0) verdaut. Bei der Anwendung des DMMB-Tests wurden in diesem Falle 20 µl Standard bzw. Probe (verdautes Explantat) und 2000 µl DMMB verwendet.

Der absolute Gehalt an GAGs im Kulturüberstand und in den Explantaten konnte durch die Umrechnung der gemessenen Werte anhand einer zuvor mit Chondroitin-C-Sulfat angesetzten Standardreihe ermittelt werden. Zuletzt wurden die ermittelten GAG-Konzentrationen eines jeden Überstandes bzw. der Explantate auf das Feuchtgewicht (FG) der entsprechenden Explantate (in µg / mg FG) bezogen.

2.2.4 Messung von Stickoxid (NO) im Kulturüberstand

Eine weitere standardmäßig angewandte Methode war die Erfassung der Stickoxid(NO)-Produktion in den Kulturüberständen. Da NO in biologischen Systemen eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, eignet sich zur Erfassung von Stickoxid besser die Messung seiner Reaktionsprodukte Nitrat oder Nitrit, die durch Oxidation mit freiem Sauerstoff entstehen.

In dieser Arbeit wurde die Nitritmenge mit dem so genannten Griess-Reagenz bestimmt. Prinzip der Griess-Methode ist die photometrische Erfassung eines stabilen rötlichen Azo-Farbkomplexes, zu dem sich das Nitrit (NO₂⁻) mit dem Reagenz umwandelt. Dabei läuft eine zweiphasige Reaktion ab, bei der ein diazotisierendes Reagenz (Sulfanilsäure) das Nitrit in saurem Milieu transient in ein Diazoniumsalz überführt, welches dann mit dem Bindungsreagenz Naphtyl-Ethylendiamin (NED) den stabilen Azo-Farbstoff bildet. Mit dem Griess-Reagenz können Nitrit-Konzentrationen von 0,43-65 µM erfasst werden.

Für die Messung wurden 100 µl des Reagenz und 100 µl der Probe zusammen in ein Well einer 96er-Mikrotiterplatte pipettiert und nach 15 Minuten die optische Dichte in einem ELISA-Reader (540 nm Wellenlänge) gemessen.

Zur Ermittlung der absoluten NO-Konzentrationen (in nmol / mg Feuchtgewicht) wurden die Messwerte in die Gleichung einer mit Natriumnitrit (NaNO₂) ermittelten Standardkurve eingesetzt und auf das jeweilige Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Die NO-Messungen erfolgten in der Regel nach 72 Stunden Inkubationszeit, in zwei unabhängigen Experimenten mit dem NO-Synthase-Inhibitor

L-NMMA wurden zusätzliche Messungen nach zwölf, 24 und 48 Stunden vorgenommen.

2.2.5 Aufbereitung der Meniskusexplantate für die Histologie

Im Rahmen der Arbeit wurden routinemäßig histologische Schnitte angefertigt. Hierzu wurden einige Explantate nach Ablauf der Inkubationszeit zunächst in frisch angesetztem Paraformaldehyd (4%ig in PBS, s. **Tab. 4A**) für mehrere Stunden fixiert und dann eine Stunde mit Leitungswasser gewässert. Es folgten die Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol), die dreimalige Behandlung für je zwei Stunden mit Methylbenzoat und die zweimalige Überführung für je zwei Stunden in Paraplast. Die Einbettung der Explantate erfolgte im Vakuumschrank.

Mit einem Mikrotom wurden nach Erhärten des Paraffins histologische Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt. Zu diesem Zweck wurden beschichtete Objektträger (HistoBond®) verwendet. Je nach Fragestellung wurden in der histologischen Aufbereitung der Explantate unterschiedliche Färbungen durchgeführt. Für die einfache lichtmikroskopische Darstellung der Explantate wurde eine Färbung mit Toluidinblau (s. **Tab. 4B**) vorgenommen, zur gezielten Darstellung der Zellkerne für die Untersuchungen zur Apoptose eine Färbung mit Mayer's Hämalaunlösung.

Für die Toluidinblaufärbung wurden die angefertigten, auf den Objektträgern paraformaldehydfixierten Paraffinschnitte zunächst in Xylol (3 x 5 min) entparaffiniert, je fünf Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült. Dann folgte eine fünfminütige Inkubation in der Toluidinblaufärbelösung und wiederum eine Spülung mit Aqua dest., bevor die weitere Behandlung mit Alkoholen (Eintauchen in 96%iges Ethanol, Propanol (3 x 3 min) und Xylol (3 x 5 min)) erfolgte. Schließlich wurde die Gewebeschnitte mit DePeX® eingedeckelt und konnten lichtmikroskopisch betrachtet werden.

Für die Färbung mit Mayer's Hämalaunlösung wurde zunächst identisch vorgegangen. Zu Beginn erfolgte die Entparaffinierung mit Xylol, die Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe und die Spülung mit Aqua dest. (s.o.). Dann erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit Mayer's Hämalaunlösung für sechs Minuten. Nach einem Spülen mit Aqua dest. und Eintauchen in 96%iges Ethanol wurden die Schnitte zehn Minuten in lauwarmem Leitungswasser stehen gelassen. Nach dem

Durchlaufen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min) und einer Behandlung mit Xylol (3 x 5 min) wurden die Schnitte mit DePeX® eingedeckelt und konnten nun ebenfalls begutachtet werden.

Tabelle 4: Substanzen für Gewebefixierung (A) und Standardfärbung (B)

A) Paraformaldehyd

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

B) Toluidinblaufärbelösung

- 0,0714% (w/v) Toluidinblau
- 0,0714% (w/v) Pyronin G
- 0,143% (w/v) Dinatriumtetraborat (Borax $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

2.2.6 Lichtmikroskopischer Nachweis von Zellkernveränderungen

Zum Nachweis von Veränderungen der Zellkerne im Meniskusgewebe wurden die konservierten Gewebeschnitte mit Mayer's Hämalaun-Lösung gefärbt, die zur Darstellung der Zellkernmorphologie geeignet ist. Die Zellkerne wurden hinsichtlich Kondensierung und des so genannten Blebbings begutachtet und anschließend einer statistischen Auswertung unterzogen. Die Beurteilung der Zellkerne erfolgte lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung, bei der vier Gesichtsfelder pro Gewebeschnitt ausgezählt werden konnten (40er Objektiv). Bei der Einstellung der Gesichtsfelder wurden stets zentral gelegene faserknorpelartige Gewebebereiche verwendet um die Erfassung von Artefakten, die im Randbereich der Explantate möglicherweise durch den Stanzvorgang induziert worden sein konnten, zu vermeiden. Pro Explantat wurden jeweils zwei Anschnitte und pro Versuch immer zwei Explantate jeder Versuchsgruppe ausgezählt. Die Beurteilung der Schnitte als solche erfolgte durch drei unabhängige verblindete Auszählungen, deren Werte für die statistische Auswertung auf Ebene der Zellzahlen eines einzelnen Gewebeanschnittes gemittelt wurden. Anschließend wurde der relative Anteil kondensierter Zellkerne bzw. von Zellkernen mit Blebbing an der durchschnittlichen Gesamtzellzahl der Gewebeschnitte einer Versuchsgruppe berechnet.

2.2.7 Immunhistochemische Färbung von Meniskusgewebe

Die Paraffinschnitte der Meniskusexplantate wurden auch für immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Es wurden dabei Versuche mit Antikörpern gegen

ADAMTS-4 (Aggrecanase 1), ADAMTS-5 (Aggrecanase 2) und gegen das Aggrecan-Neo-Epitop NITEGE (Spaltfragmente von Aggrecan) durchgeführt. Der prinzipielle methodische Ablauf für die Anfertigung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte war jeweils der gleiche.

Zunächst mussten die entparaffinierten Gewebeschnitte für 2,5 min in Citratpuffer (0,01 M; pH 6; Zusatz von Tween-20 0,05%ig) gekocht und dann für 20 min abgekühlt werden. Anschließend wurden sie mit Aqua dest. gespült und für 3 x 5 min mit Tris-Pufferlösung (Tris, 0,1 M HCl, 9 % NaCl, pH 7,5) behandelt.

Währenddessen erfolgte die Herstellung der verdünnten Antikörperlösung für die spezifische Gewebsdarstellung. Dazu wurde die ursprüngliche Antikörperlösung mit 1%igem BSA und Dako-Verdünnungslösung auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt.

Nun konnte die Inkubation der Gewebeschnitte mit der Antikörperlösung in einer Feuchtkammer durchgeführt werden. Sie erfolgte für mehrere Stunden bei 8 °C. Nach der so erfolgten Anreicherung des Gewebes mit den spezifischen Antikörpern wurde in einem zweiten Schritt die Inkubation mit einem Zweitantikörper vorgenommen um die Primärantikörper über Immunfluoreszenz sichtbar zu machen. Dazu wurden die Schnitte nach Ablauf der Erstinkubation zunächst erneut für 3 x 5 min mit Tris-Pufferlösung behandelt. Anschließend wurde die Inkubation mit der Lösung des Zweitantikörpers (Alexa Fluor 488; Verdünnung 1:500) in einer Feuchtkammer für eine Stunde bei Raumtemperatur vorgenommen. Es folgte die erneute Spülung mit Tris-Pufferlösung (s.o.).

Zusätzlich wurden die Gewebeschnitte nun noch einer spezifische Darstellung der Zellkerne mit Bisbenzimid und danach einer erneuten Behandlung mit Tris-Pufferlösung unterzogen. Abschließend erfolgte die Konservierung mit einem Eindeckmedium (Fluoreszenz Mounting Medium, Dako) und einem Abdeckglas.

Jetzt konnten die immunhistochemisch bearbeiteten Gewebeschnitte unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden.

2.2.8 Untersuchungen zur Genexpression von Matrixmolekülen und Matrix abbauenden Proteasen auf mRNA-Ebene

2.2.8.1 Isolierung der RNA aus Meniskusgewebe

Für die Isolierung von RNA aus den Explantaten wurden ca. 100 mg Meniskusgewebe (entspricht etwa 13 Meniskusexplantaten) verwendet. Nach

Beendigung der Inkubationszeit wurden die Explantate mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Gewinnung der RNA-Menge konnten die Proben so bei -70 °C gelagert werden.

Bei der weiteren Verarbeitung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zermörsert. Das pulverisierte Meniskusgewebe wurde dann in ein Röhrchen überführt und mit 1 ml Trizol versetzt. Anschließend wurden die Proben mit einem Dispergiergerät so lange homogenisiert, bis keine Gewebestückchen mehr zu erkennen waren. Die Lösung wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert um die restlichen Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, der Proteine, DNA und RNA enthielt, vorsichtig abgezogen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für die Isolierung der RNA wurden 200 µl Chloroform zugefügt. Die Lösung wurde 15 sec geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 2-3 min bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4 °C). Es konnten innerhalb der Lösung zwei Phasen beobachtet werden. Die obere Phase, die die RNA enthielt, war farblos und wässrig, während die untere rötliche Phenol-Chloroformphase Proteine und DNA beinhaltete. Die farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abgezogen, ohne dass die Interphase berührt wurde. So konnte das Risiko einer Verunreinigung der RNA minimiert werden. Die RNA wurde mit 500 µl Isopropylalkohol gefällt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4 °C war die RNA als ein kleines gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der darin enthaltenen RNA in 1 ml 75%igem Ethanol gelöst und 5 min bei 7.500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2-3 mal wiederholt, um mögliche Phenolrückstände zu eliminieren. Im Anschluss daran wurde das Ethanol verworfen und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl RNAsfreiem Wasser resuspendiert und für 10 min bei 55-60 °C inkubiert. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Mengen (siehe **2.2.8.2**) wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C eingefroren.

2.2.8.2 Bestimmung der isolierten RNA-Menge

Das Prinzip für die Quantifizierung der isolierten RNA-Menge war die photometrische Messung ihrer optischen Dichte (OD). Dafür wurden 5 µl Probe und 495 µl Aqua bidest. in eine Quarzküvette gegeben und bei einer Wellenlänge von 260 nm

(Absorptionsmaximum von RNA) gemessen. Um die Qualität der Probe zu überprüfen und eine mögliche Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, wurde zusätzlich die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) erfasst. Als Reinheitskriterium wurde ein Wert > 1,8 für das Verhältnis von OD260 zu OD280 angelegt.

2.2.8.3 Quantitative Real-time RT-PCR

Zur Bestimmung der durch verschiedene Stimuli bewirkten mRNA-Expression in den Meniskusexplantaten wurde in dieser Arbeit die Methode der quantitativen Real-time RT-PCR angewendet. Prinzip ist die Amplifikation einzelner Genprodukte mittels RT-PCR (RT = Reverse Transkriptase; PCR = Polymerase Chain Reaction = Polymerasekettenreaktion) und die dabei (Real-time = Echtzeit) erfolgende relative Quantifizierung dieser Produkte. Für die Quantifizierung wurde ein Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR-Kit benutzt, dessen Funktionsweise die Anlagerung eines fluoreszierenden Farbstoffes (SYBR® Green) an doppelsträngige DNA ist. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit zunehmender Menge des PCR-Produktes zu.

Vor Beginn der eigentlichen Real-time RT-PCR wurden die aus dem Meniskusgewebe isolierten RNA-Proben zunächst einem DNase-Verdau unterzogen, um potentielle Verunreinigungen mit DNA zu beseitigen. In dieser Arbeit wurde der Verdau nach den Angaben der Firma Promega durchgeführt. Zu jeder Probe von 1-8 µl RNA wurden 1 µl „RQ1 DNase 10 x Reaktionspuffer“ sowie 1 µl RQ1 DNase hinzugefügt und durch x µl Nuklease-freies H₂O bis auf 10 µl ergänzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in einem Thermocycler für 30 min bei 37 °C. Zur Inaktivierung der DNase wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA, pH 8,0) beigefügt und der Ansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Nach dem DNase-Verdau konnte die verdaute RNA jedes einzelnen Zielgens als Reaktionsansatz verwendet und zur Bestimmung der Expression benutzt werden. Als Referenzgene für die relative Mengenerfassung der Genprodukte wurde das „Housekeeping“-Gen von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) bzw. das Gen der 18S RNA verwendet, wobei für spätere Berechnungen standardmäßig die Werte für GAPDH eingesetzt wurden. Außerdem wurde für jeden Primer (s. **Tab. 5A**) zusätzlich eine „No Template Control“ (NTC) hergestellt. Der Reaktionsansatz dieser Kontrolle enthielt im Vergleich zu den Proben keine

„Template“-RNA, sodass in diesem Ansatz keine Amplifikate gebildet werden durften und daher kein PCR-Produkt detektierbar sein sollte.

Die eigentliche Real-time RT-PCR umfasste mehrere Einzelschritte (s. **Tab. 5B**), die im Folgenden beschrieben werden: Im Ansatz für die Real-time RT-PCR waren $25 \mu\text{l}$ $2 \times$ QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix, $x \mu\text{l}$ (100 pmol) Primer (Sense), $x \mu\text{l}$ (100 pmol) Primer (Antisense), $0,5 \mu\text{l}$ QuantiTect RT Mix, $x \mu\text{l}$ Template RNA ($x \mu\text{l} = 50 \text{ ng verdaute RNA}$) und $x \mu\text{l}$ RNase-freies H_2O enthalten, so dass sich ein Endvolumen von $50 \mu\text{l}$ ergab. Zu Beginn der Methode musste die im Ansatz enthaltene mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Es folgte der initiale Aktivierungsschritt der PCR, bei dem durch Temperaturerhöhung auf 95°C eine Trennung der DNA-Doppelstränge vorgenommen wurde. Die Denaturierung der DNA erfolgte direkt im Anschluss innerhalb von 15 sec bei konstanten 95°C . In der nächsten Phase kam es durch ein Senken der Temperatur auf 60°C zur Anlagerung (Annealing) der spezifischen Primer an die Einzelstränge. Dann wurde die Temperatur wieder erhöht (72°C), so dass mit Hilfe einer Taq-Polymerase die Verlängerung (Extension) der Basenstränge erreicht werden konnte. Zur Datenaufnahme wurde die Temperatur anschließend auf eine für die einzelnen Zielgene variable Temperatur x erhöht, die oberhalb der Schmelztemperatur von unspezifisch fluoreszierenden Primer-Dimeren, aber unterhalb der Schmelztemperatur des spezifischen Genproduktes lag. Die jeweiligen Temperaturen wurden mittels Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse einmalig bestimmt. Dabei wurde im Anschluss an die PCR die Temperatur langsam von 60°C kontinuierlich bis auf 95°C erhöht und die Schmelztemperatur der einzelnen PCR-Produkte ermittelt (für GAPDH: 78°C ; 18S RNA: 78°C ; Aggrekan: 78°C ; Kollagen II: 81°C ; MMP-2: 78°C ; MMP-3: 77°C ; MMP-13: 70°C ; ADAMTS-5: 73°C). Für MMP-1, Kollagen I und ADAMTS-4 war dieser Zusatzschritt nicht notwendig, da die Fluoreszenzen nicht durch Primer-Dimere beeinflusst wurden und die Datenaufnahme daher bei 72°C erfolgen konnte. Im Rahmen eines PCR-Zyklus von Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung wurde die DNA-Menge verdoppelt. Um die DNA um ein Vielfaches amplifizieren zu können, wurden insgesamt 40 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 5:**Real-time RT-PCR****A)****Primer für die Real-time PCR**

<u>Name</u>	<u>Primer-Sequenz (5' > 3')</u>	<u>Produkt</u>
GAPDH Sense	ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG G	101 bp
GAPDH Antisense	TGA GTG TCG CTG TTG AAG TCG	
18S RNA Sense	TCG AGG CCC TGT AAT TGG AA	
18S RNA Antisense	GCT ATT GGA GCT GGA ATT ACC G	
Aggrekan Sense	CCT GAA CGA CAA GAC CAT CGA	101 bp
Aggrekan Antisense	TGG CAA AGA AGT TGT CAG GCT	
Kollagen I Sense	AAT TCC AAG GCC AAG AAG CAT G	
Kollagen I Antisense	GGT AGC CAT TTC CTT GGT GGT T	
Kollagen II Sense	AAG AAG GCT CTG CTC ATC CAG G	124 bp
Kollagen II Antisense	TAG TCT TGC CCC ACT TAC CGG T	
MMP-1 Sense	GGA CTG TCC GGA ATG AGG ATC T	
MMP-1 Antisense	TTG GAA TGC TCA AGG CCC A	
MMP-2 Sense	GTA CGG GAA TGC TGA CGG GGA ATA	93 bp
MMP-2 Antisense	CCA TCG CTG CGG CCT GTG TCT GT	
MMP-3 Sense	CAC TCA ACC GAA CGT GAA GCT	109 bp
MMP-3 Antisense	CGT ACA GGA ACT GAA TGC CGT	
MMP-13 Sense	TCT TGT TGC TGC CCA TGA GT	
MMP-13 Antisense	GGC TTT TGC CAG TGT AGG TGT A	
ADAMTS-4 Sense	GCG CCC GCT TCA TCA CTG	101 bp
ADAMTS-4 Antisense	TTG CCG GGG AAG GTC ACG	
ADAMTS-5 Sense	AAG CTG CCG GCC GTG GAA GGA A	196 bp
ADAMTS-5 Antisense	TGG GTT ATT GCA GTG GCG GTA GG	

B)**Ablauf der Real-time RT-PCR**

<u>Schritt</u>		<u>Zeit</u>	<u>Temperatur</u>
- Reverse Transkription		30 min	50 °C
- Initiale Aktivierung		15 min	95 °C
- Denaturierung		15 sec	94 °C
- Anlagerung		30 sec	60 °C
- Verlängerung	40 Zyklen	30 sec	72 °C
- Optionsschritt zur Datenaufnahme		30 sec	x °C

Legende Tab. 5:

A) Auflistung der für die Real-time RT-PCR verwendeten Primer (Sense und Antisense) mit Gliederung in Basentriplets. bp:= Basenpaare, Einheit für die Größe des Genproduktes.

B) Chronologischer Ablauf der Real-time RT-PCR. x °C: = variable Temperatur für jedes einzelne Zielgen, die im Optionsschritt zur Datenaufnahme eingestellt wurde. Die Temperatur x lag dabei jeweils zwischen der Schmelztemperatur von unspezifisch fluoreszierenden Primer-Dimeren und der Schmelztemperatur des spezifischen Genproduktes.

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

Bei der Auswertung der PCR-Daten wurde eine relative Quantifizierung der einzelnen Genprodukte vorgenommen. Die grundsätzliche Möglichkeit zur Quantifizierung beruhte auf der Messbarkeit der durch SYBR® Green-Farbstoff bewirkten Fluoreszenz der DNA. Voraussetzung für die relative Darstellung war die Verwendung eines Referenzgens (Gen von GAPDH bzw. 18S RNA) im Rahmen der Real-time RT-PCR.

Die quantitative Erfassung der Fluoreszenz erfolgte durch Bestimmung des so genannten C_T -Wertes (C_T = threshold cycle). Dieser Wert beziffert die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen, die zum Erreichen eines festgelegten Schwellenwertes (threshold) von Fluoreszenz-Intensität erforderlich waren. Umso mehr Zyklen nötig waren, umso höher war der C_T -Wert und umso niedriger die Konzentration der detektierten DNA. So entsprach dabei z.B. ein um eins erhöhter C_T -Wert einer halbierten Menge an eingesetzter cDNA.

Für die relative Darstellung der so erfassten Genmengen wurde die so genannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet, bei der für jede Probe (Ansätze der z.B. mit TNF- α stimulierten Versuchsgruppen) vier Rechenschritte erforderlich waren. Hierbei wurden zunächst die ΔC_T -Werte der einzelnen Proben sowie der Kontrollgruppe berechnet, indem die Differenz der einzelnen C_T -Werte mit dem C_T -Wert des jeweiligen Referenzgens gebildet wurde. Dann wurde für jede einzelne Probe der $\Delta\Delta C_T$ -Wert durch Subtraktion des ΔC_T -Wertes der Kontrolle von dem ΔC_T -Wert der jeweiligen Probe berechnet. Um letztlich die relative Menge der untersuchten Zielgene (Aggrekan, Kollagen I, Kollagen II, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 und ADAMTS-5) zu ermitteln, wurde folgende Formel verwendet:

Relative Zielgenmenge = $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$. Sie trägt der Tatsache Rechnung, dass pro PCR-Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge erfolgt und dass ein geringerer bzw. höherer $\Delta\Delta C_T$ -Wert einer Probe Ausdruck des relativen Erreichens des Fluoreszenz-Schwellenwertes ist und somit der Erfassung einer größeren bzw. kleineren Zielgenmenge entspricht.

Tabelle 6: Rechenschritte zur Bestimmung der relativen Zielgenmenge nach Real-time RT-PCR

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 (Probe) - ΔC_T (Kontrolle)
4. Relative Zielgenmenge = $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$

Legende Tab. 6:

C_T = threshold cycle:= Anzahl benötigter PCR-Zyklen bis zum Erreichen einer vorgegebenen Fluoreszenz-Intensität; ΔC_T = delta C_T := Differenz zweier C_T -Werte; $\Delta\Delta C_T$:= entsprechend Differenz zweier ΔC_T -Werte.

2.2.9 Zymografische Analysen

Zum Nachweis enzymatisch aktiver Proteine (MMPs) und deren Pro-Formen in den Kulturüberständen wurden in dieser Arbeit zymografische Analysen durchgeführt. Prinzip der Zymogramme ist die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in einem Gel und die Erfassung der katalytischen Aktivität dieser Proteine durch Spaltung von speziellen in den Gelen enthaltenen Substraten. In dieser Arbeit wurden SDS-Polyacrylamid-Fertiggele mit Casein als Substrat verwendet.

Die Kulturüberstände (50 µl) wurden mit dem gleichen Volumen eines 2 x Probenpuffers (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 20% (w/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, pH 8) versetzt. Anschließend wurden je 5 µl dieses Ansatzes für jede Versuchsgruppe in je zwei Geltaschen eingebracht. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsstandard als Kontrolle auf das Gel aufgetragen, mit Hilfe dessen die Erfassung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine möglich wurde. Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze.

Hierzu wurden die Proben in einer Elektrophoresekammer zunächst bei einer Spannung von 100 V und einer Temperatur von 4 °C von den Geltaschen über den ersten Teil des Geles zum eigentlichen Trengel geführt und anschließend darin bei 110 V und 4 °C so lange (etwa 2 h) aufgetrennt, bis die kleinsten Proteine das komplette Gel durchwandert hatten. Nach der Elektrophorese wurde das Trengel 2 x 30 min in 2,5%igem (v/v) Triton-X-100 gewaschen, um das denaturierende SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) aus dem Gel zu entfernen und die katalytisch wirksame Tertiärstruktur der Proteasen wiederherzustellen. Das Gel wurde anschließend in

Aqua dest. gespült und 16 h bei 37 °C in einer Pufferlösung unter leichter Bewegung auf einem Schüttler inkubiert, damit das Substrat durch die Proteasen umgesetzt werden konnte. Im Anschluss daran folgte die Färbung des Gels mit 0,1%iger Coomassie-Blau-Färbelösung (0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue-R-250, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) für 20-30 min bei Zimmertemperatur. Das Gel wurde zunächst mit einer ersten Entfärbungslösung (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) und anschließend mit einer zweiten Entfärbelösung (10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) entfärbt, bis an den Stellen, wo das Substrat von den Proteasen umgesetzt wurde, weiße Banden gegen den blauen Hintergrund abgrenzbar waren. So konnten die proteolytisch aktiven Matrixmetalloproteininasen qualitativ detektiert werden. Zur Konservierung wurden die Gele in 1%iger Glycerinlösung fixiert und luftdicht zwischen zwei Zellulosefolien eingeschweißt. Zur digitalen Darstellung der Zymogramme wurden diese anschließend eingescannt. In einer bestimmten Versuchsreihe wurden zymografische Analysen unter Einfluss des Enzymaktivators APMA (4-Aminophenylmercuric-Aacetat) durchgeführt. APMA ist in der Lage latente MMPs (Pro-Formen) durch Abspaltung der Pro-Peptidsequenz zu aktivieren [173]. Hierzu wurden die Überstände mit 2 mM APMA (in DMSO gelöst) für 3 h bei 37 °C inkubiert, bevor die zymografischen Analysen durchgeführt wurden.

2.2.10 Statistische Auswertung

Bei der Auswertung der Messergebnisse dieser Arbeit wurden Mittelwert und Standardfehler (SEM) bzw. Standardabweichung (SD) vom Mittelwert ermittelt. Als statistisches Werkzeug wurde der so genannte Student's T-Test (zweiseitig bei ungleicher Varianz) eingesetzt. Die Zuverlässigkeit einer Aussage wurde als signifikant angenommen und entsprechend in der Ergebnisdarstellung markiert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Wenn $p < 0,01$ war, wurde dies in den Grafiken gesondert abgebildet.

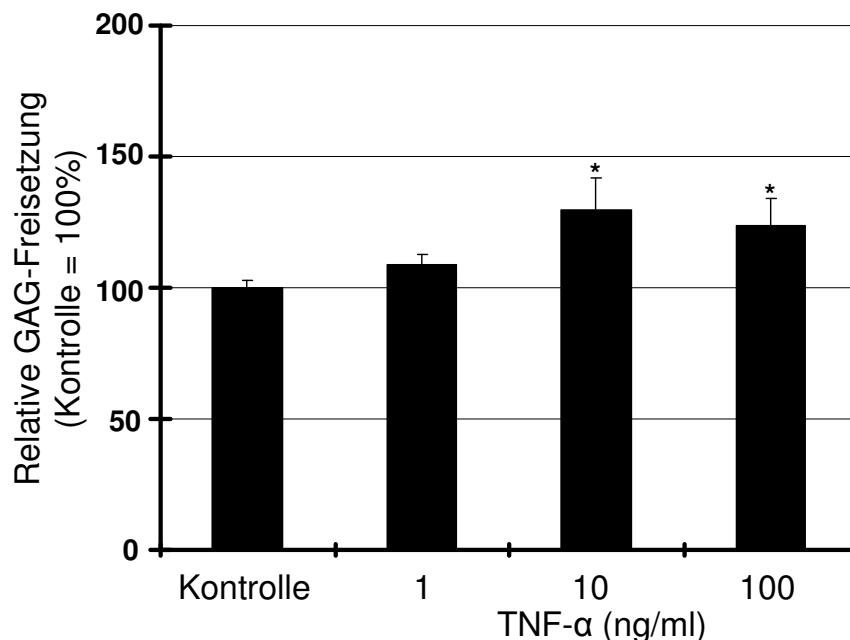
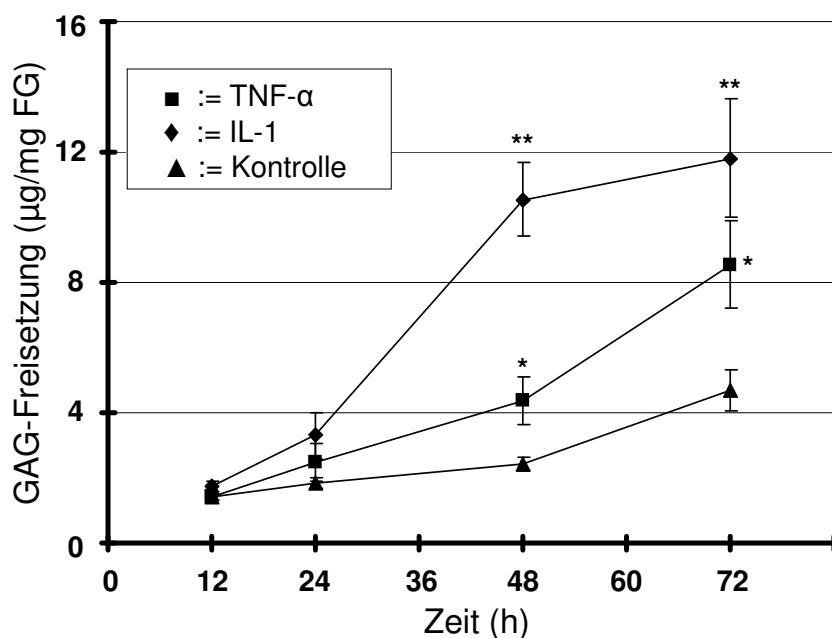
3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von TNF- α und IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus Meniskusgewebe

In dieser Arbeit wurden Meniskusexplantate mit den Zytokinen TNF- α bzw. IL-1 stimuliert. Um einen dadurch induzierten Abbau von Proteoglykanen im Gewebe zu erfassen, wurden nach Inkubationsende die kumulativen Konzentrationen von Glykosaminoglykanen (GAGs) in den Kulturüberständen sowie die GAG-Gehalte der Explantate selbst mit Hilfe des DMMB-Tests gemessen und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

Der durchschnittliche GAG-Gehalt eines frisch isolierten Explantates von 1 mm Dicke und 3 mm Durchmesser betrug $14,2 \pm 0,8 \mu\text{g}/\text{mg}$ Feuchtgewicht (FG) ($n = 8$). Nach drei Tagen Inkubationszeit wurden davon bei Explantaten der Kontrollgruppe 34% der GAGs ($4,8 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ FG) in das Kulturmedium freigesetzt. In Versuchreihen mit TNF- α und IL-1 konnte eine signifikant erhöhte Freisetzung an GAGs in den Überständen gemessen werden. Eine Dosis-Wirkungs-Kurve für TNF- α ergab eine dosisabhängig gesteigerte Freisetzung nach dreitägiger Inkubation ($n = 11$; 3 Explantate in 1 ml Medium, s. **Abb. 4A**). Bei einer TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml war bereits eine zusätzliche GAG-Freisetzung um 8,8% ($\pm 3,7$) messbar, bei 10 bzw. 100 ng TNF α /ml entstand eine signifikant erhöhte GAG-Freisetzung von weiteren 30% (± 12) bzw. 24% (± 10) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In einem weiteren Versuchsmodell wurde die zeitabhängige GAG-Freisetzung unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 ermittelt ($n = 6$; 1 Explantat pro 200 μl Medium; s. **Abb. 4B**). Dabei wurden Messungen nach 12, 24, 48 und 72 Stunden vorgenommen. Nach 48 Stunden und zum Ende Inkubationszeit zeigte sich sowohl für TNF- α als auch für IL-1 eine signifikant gesteigerte GAG-Freisetzung. Die relative Erhöhung der Freisetzung an GAGs in den mit 100 ng/ml TNF- α stimulierten Proben betrug in dieser Versuchsreihe 83% (± 28) (vgl. **Abb. 4A**). Um grundsätzlich nachzuweisen, dass es sich bei den vermehrt freigesetzten GAGs um einen induzierten GAG-Verlust aus dem Gewebe handelte und nicht um eine möglicherweise durch Zytokine bewirkte Mehrproduktion, wurde nach Inkubationsende der GAG-Gehalt der Explantate bestimmt. Hierbei zeigte sich in den zytokinstimulierten Explantaten ein im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderter GAG-Gehalt (nicht abgebildet).

Abbildung 4: Zytokininduzierte GAG-Freisetzung aus Meniskusgewebe**A) Dosis-Wirkungs-Kurve: TNF- α -abhängige GAG-Freisetzung****B) Zeitabhängige GAG-Freisetzung unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1****Legende Abb. 4:**

A) Es wurden 3 Meniskusexplantate in 1 ml Medium ohne bzw. mit TNF- α (1, 10 oder 100 ng/ml) inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der kumulative GAG-Gehalt in den Überständen bestimmt und auf das Feuchtgewicht (FG) der Explantate bezogen ($n = 11$).

B) Inkubation von 1 Explantat in 200 μ l Medium ohne bzw. mit TNF- α (100 ng/ml) oder IL-1 (10 ng/ml). GAG-Messungen nach 12, 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit ($n = 6$).

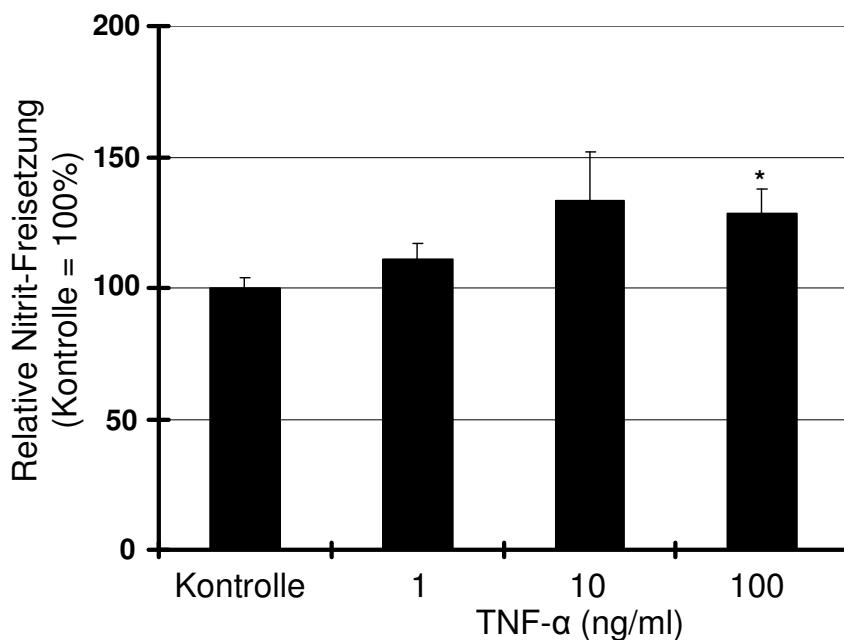
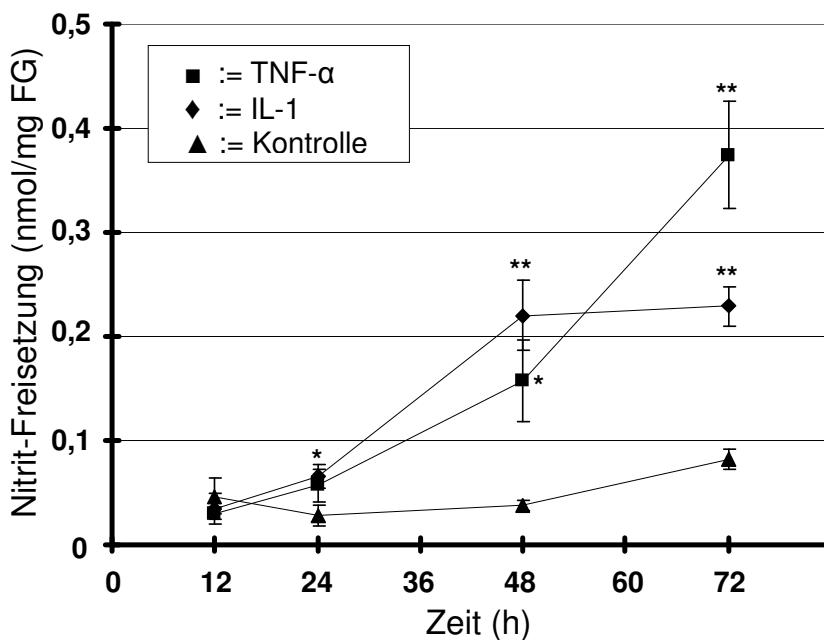
T-TEST (Stimulus i. Vgl. zur Kontrolle zum selben Zeitpunkt): * := $p \leq 0,05$ und ** := $p \leq 0,01$;
[:= Standardfehler.

3.2 Einfluss von TNF- α und IL-1 auf die NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe

Entsprechend der Untersuchungen zur GAG-Freisetzung wurde in dieser Arbeit die NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren untersucht. Dazu wurden die Nitritkonzentrationen in den Kulturüberständen mit Hilfe des Griess-Reagenz photometrisch erfasst, mit Hilfe einer Standardkurve berechnet und auf das Feuchtgewicht (FG) der Explantate bezogen.

Entsprechend den Studien zur GAG-Freisetzung wurde in einer ersten Untersuchung eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für die NO-Freisetzung in Abhängigkeit von der TNF- α -Konzentration erstellt ($n = 5$; 3 Explantate in 1 ml Medium; s. **Abb. 5A**). Die absolute NO-Freisetzung in der Kontrollgruppe betrug im Durchschnitt 0,38 nmol/mg FG. Durch Stimulation mit TNF- α wurde eine verstärkte Freisetzung bewirkt. Bei einer TNF- α -Konzentration von 1 ng/ml kam es durchschnittlich zu einer um 10,8% ($\pm 6,3$) erhöhten Freisetzung an NO im Vergleich zu unstimulierten Kontrollgruppe. Für 10 ng TNF- α pro ml wurde ein Anstieg um 33,5% ($\pm 18,4$) gemessen, in den Versuchsgruppen mit 100 bzw. 200 ng TNF- α pro ml belief sich die Erhöhung auf 28,5% ($\pm 9,0$) bzw. 37,5% ($\pm 10,7$) und war signifikant.

Bei einer weiteren Versuchreihe wurde die zeitabhängige NO-Freisetzung unter TNF- α - bzw. IL-1-Einfluss untersucht ($n = 6$; 1 Explantat in 200 μ l Medium; s. **Abb. 5B**). Durch TNF- α (100 ng/ml) kam es nach 48 und 72 Stunden zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von NO im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe, bei IL-1 (10 ng/ml) trat eine Signifikanz bereits nach 24 Stunden auf. In dieser Versuchreihe betrug die NO-Freisetzung nach Inkubationsende (72 h) in der Kontrollgruppe durchschnittlich 0,08 nmol/mg FG ($\pm 0,01$). Die im Vergleich zum Messzeitpunkt nach 12 Stunden erhöhte basale Freisetzung an NO war nicht signifikant. In den mit TNF- α stimulierten Proben kam es im Mittel zu einer NO-Freisetzung von 0,37 nmol/mg FG ($\pm 0,05$), in den mit IL-1 kultivierten Proben betrug der Wert 0,23 nmol/mg FG ($\pm 0,05$) zum Ende der Inkubationszeit. Die relativen Erhöhungen für TNF- α bzw. IL-1 beliefen sich in dieser Versuchreihe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 360% (± 64) bzw. 181% (± 24).

Abbildung 5: Zytokininduzierte NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe**A) Dosis-Wirkungs-Kurve: TNF- α -abhängige NO-Freisetzung****B) Zeitabhängige NO-Freisetzung unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1****Legende Abb. 5:**

A) Es wurden 3 Meniskusexplantate in 1 ml Medium ohne bzw. mit TNF- α (1, 10, 100 ng/ml) inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der kumulative Nitrit-Gehalt in den Überständen bestimmt und auf das Feuchtgewicht (FG) der Explantate bezogen ($n = 5$).

B) Inkubation von 1 Explantat in 200 μ l Medium ohne bzw. mit TNF- α (100 ng/ml) oder IL-1 (10 ng/ml). Nitrit-Messungen nach 12, 24, 48 und 72 Stunden Inkubationszeit ($n = 6$).

T-TEST (Stimulus i. Vgl. zur Kontrolle zum selben Zeitpunkt): * := $p < 0,05$ und ** := $p < 0,01$;
[:= Standardfehler.

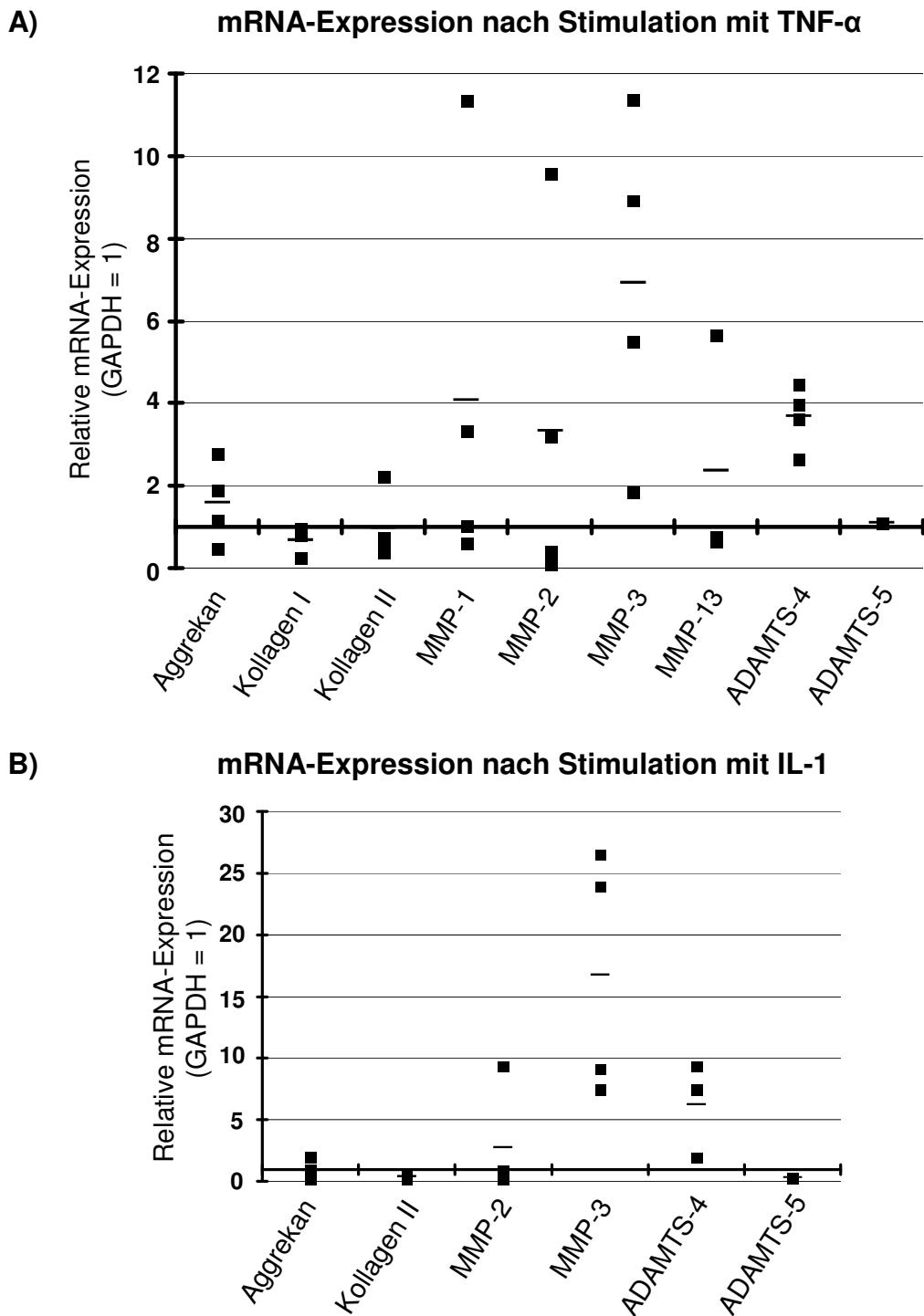
3.3 mRNA-Expression von Matrixmolekülen und Matrix abbauenden

Enzymen aus Meniskusgewebe nach Stimulation mit TNF- α - bzw. IL-1

Um zusätzliche Informationen darüber zu erhalten, welche Einflüsse proinflammatorische Zytokine auf das bovine Meniskusgewebe ausüben können, wurden die mRNA-Levels verschiedener Matrixproteine und Matrix abbauender Enzyme unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 mittels Real-time RT-PCR detektiert. Es erfolgte eine relative Darstellung der mRNA-Mengen in Bezug auf das Gen GAPDH (= 1) mit Hilfe der $\Delta\Delta_{CT}$ -Methode. Um zu zeigen, dass GAPDH in der Verwendung als Referenzgen geeignet war, wurden die mRNA-Levels von GAPDH unter Zytokineinfluss mit der $\Delta\Delta_{CT}$ -Methode ins Verhältnis zur Menge von 18S RNA, einem anderen gängigen Referenzgen, gesetzt. Hierbei zeigten sich keine relativen Veränderungen der GAPDH-Expression, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die ermittelten Effekte für die einzelnen untersuchten Gene real induzierte Veränderungen durch den Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 abbildeten (nicht grafisch dargestellt).

Unter Einfluss von TNF- α wurden folgende Effekte beobachtet (s. **Abb. 6A**): Auf Seiten der Matrixmoleküle wurde Kollagen Typ I leicht vermindert (0,7-fach) exprimiert, Kollagen Typ II zeigte keine Veränderung und die mRNA-Menge des Aggrekan-Kernproteins war leicht (1,6-fach) erhöht. Auf Seiten der untersuchten Matrix abbauenden Enzyme kam es durchweg zu einer durchschnittlich erhöhten Genexpression in den TNF- α -stimulierten Proben. Bei z.T. sehr heterogenen Einzelmesswerten ergab sich eine gemittelte Erhöhung der mRNA-Menge von MMP-1 um Faktor 4,1, bei MMP-2 um Faktor 3,3, bei MMP-3 um den Faktor 6,9 und bei MMP-13 um Faktor 2,4. Bei den Aggrekanasen konnten nur für ADAMTS-4 ausreichend Daten gesammelt werden, die mRNA-Mengen für ADAMTS-5 waren zum Teil undetektierbar. Die mRNA-Menge von ADAMTS-4 war unter TNF- α -Einfluss bei homogenen Einzelmesswerten durchschnittlich um das 3,7-fache gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe erhöht.

Für IL-1 wurden folgende Gene mit folgenden Veränderungen in ihrer Expression gemessen (s. **Abb. 6B**): Das Aggrekan-Kernprotein zeigte keine Veränderungen während Kollagen Typ II vermindert (0,4-fach) exprimiert wurde. Auf Seiten der katabolen Enzyme waren die mRNA-Levels für die Matrixmetalloproteininasen MMP-2 (2,7-fach) und MMP-3 (16,8-fach) sowie für die Aggrekanase ADAMTS-4 (6,2-fach) gesteigert, für ADAMTS-5 konnte nur ein einzelner Wert detektiert werden.

Abbildung 6: Untersuchungen zur Genexpression im Meniskusgewebe**Legende Abb. 6:**

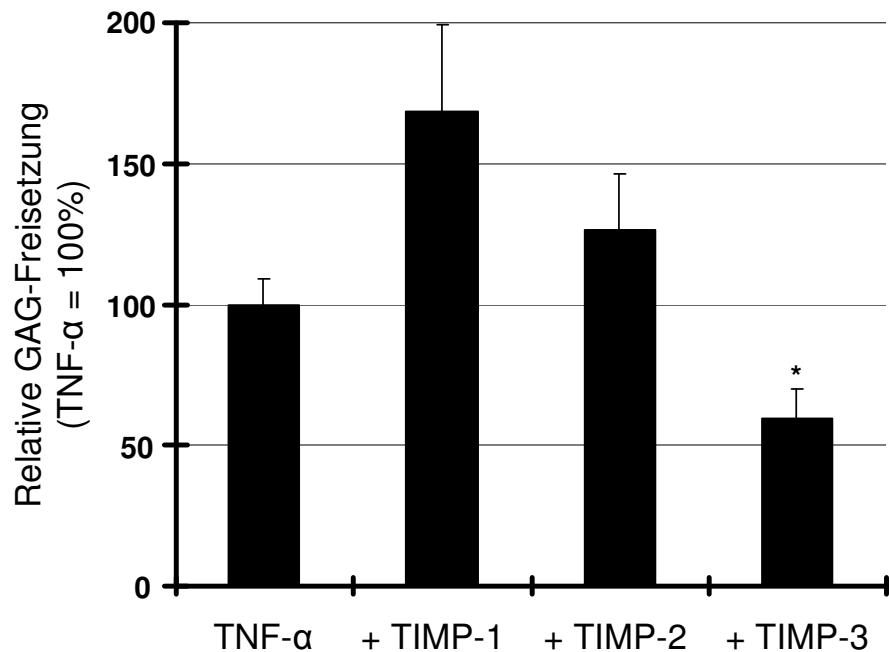
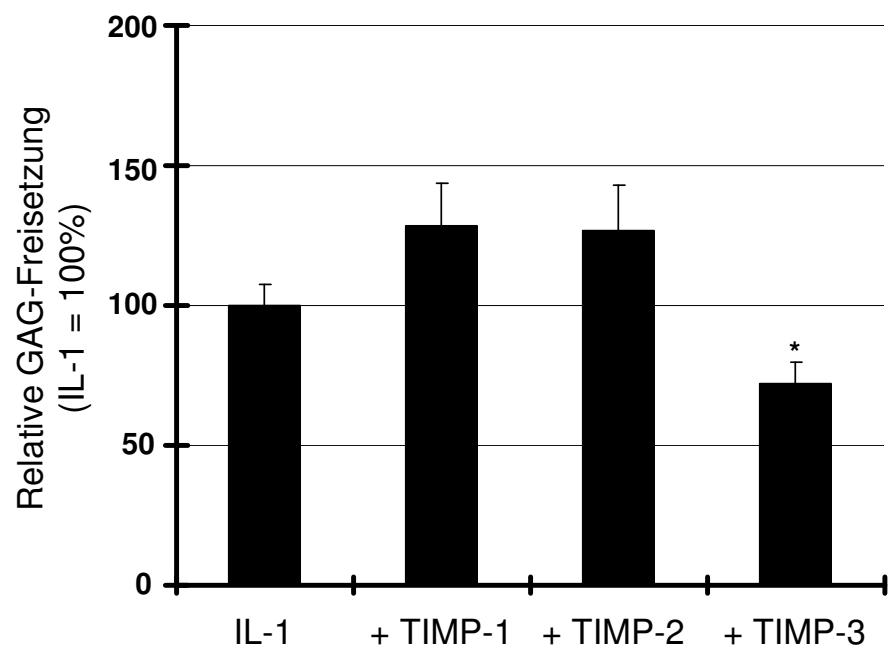
Die Meniskusexplantate wurden für 72 Stunden unter Einfluss von **A)** 100 ng TNF- α pro ml oder **B)** 10 ng IL-1 pro ml inkubiert. Anschließend wurde die mRNA aus dem Gewebe isoliert und ihr Gehalt für die verschiedenen Zielgene bzw. das Referenzgen GAPDH mittels Real Time RT-PCR quantitativ erfasst. In der grafischen Darstellung finden sich die mit der $\Delta\Delta_{CT}$ -Methode berechneten relativen mRNA-Werte nach Zytokinstimulation im Vergleich zu unstimulierten Kontrollproben von dem jeweiligen Zielgen im Verhältnis zu GAPDH (= 1) wieder. Jedes Viereck (■) bildet den Wert eines unabhängigen Experiments ab, jeder Strich (—) den Mittelwert der Einzelwerte für ein jedes Zielgen.

3.4 Einflüsse von TIMPs auf die zytokininduzierte GAG-Freisetzung

Um weitergehend zu untersuchen, in welchem Maße MMPs und Aggrekanasen an der durch TNF- α und IL-1 bewirkten Erhöhung der Glykosaminoglykanfreisetzung aus Meniskusgewebe beteiligt sind, wurden in dieser Arbeit Versuche mit Hemmstoffen verschiedener Matrix kataboler Enzyme durchgeführt. Die Tissue inhibitors of metalloproteinases 1 und 2 (TIMP-1 und -2) sind dafür bekannt Matrixmetalloproteinasen wie z.B. MMP-3 zu hemmen. Neben der Verwendung dieser beiden Inhibitoren wurden TIMP-3 eingesetzt, das zusätzlich zu MMPs auch Aggrekanasen wie ADAMTS-4 und -5 hemmen kann [139; 140].

In den Kontrollgruppen bewirkten die eingesetzten TIMPs keine signifikanten Veränderungen der GAG-Freisetzung (nicht grafisch dargestellt). In den mit TNF- α und IL-1 stimulierten Gruppen waren für die beiden Zytokine jeweils tendenziell einheitliche Veränderungen unter Zugabe der unterschiedlichen TIMPs zu beobachten (s. **Abb. 7A** i. Vgl. zu **Abb. 7B**). Sowohl für TNF- α als auch für IL-1 kam es bei Ko-Stimulation mit TIMP-1 bzw. TIMP-2 zu einer Erhöhung der GAG-Freisetzung. In den mit TNF- α stimulierten Proben kam es durch TIMP-1 zu einer zusätzlichen GAG-Freisetzung von 69% (± 31), unter Einfluss von TIMP-2 zu einer Erhöhung um 26% (± 20) gegenüber der lediglich mit TNF- α stimulierten Gruppe. Für IL-1 beliefen sich die Werte für die zusätzliche Erhöhung der GAG-Freisetzung bei TIMP-1 auf 28% (± 15) und bei TIMP-2 auf 27% (± 16).

Unter Einfluss von TIMP-3 zeigte sich bei beiden Zytokingruppen eine signifikante Reduktion der GAG-Freisetzung. Unter Ko-Stimulation mit TNF- α und TIMP-3 kam es zu einer signifikanten Reduktion der GAG-Freisetzung um 52% (± 13) im Vergleich zur TNF- α -Gruppe. Für IL-1 betrug die Reduktion der Freisetzung an GAGs unter zusätzlichem TIMP-3-Einfluss 28% (± 7) im Vergleich zur nur mit IL-1 stimulierten Gruppe.

Abbildung 7: Einflüsse von TIMPs auf die zytokininduzierte GAG-Freisetzung**A) Einfluss von TIMP-1, -2 bzw. -3 auf die TNF- α -induzierte GAG-Freisetzung****B) Einfluss von TIMP-1, -2 bzw. -3 auf die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung****Legende Abb. 7:**

Es wurde eine Ko-Inkubation (1 Explantat in 200 μ l Medium, $n = 5$) von TNF- α (100 ng/ml, **A**) bzw. IL-1 (10 ng/ml, **B**) mit TIMP-1, -2 oder -3 (je 0,1 μ M) durchgeführt. GAG-Messung im Überstand nach 72 Stunden Inkubationszeit.

T-TEST (jew. TIMP i. Vgl. zu TNF- α bzw. IL-1): * := $p < 0,05$; [:= Standardfehler.

3.5 Allgemeine Histologie des Meniskusgewebes

Neben den Untersuchungen an Inkubationsüberständen und verdautem Meniskusgewebe wurden in dieser Arbeit auch Beobachtungen an histologischen Gewebeschnitten der Meniskusexplantate vorgenommen, um gegebenenfalls gewebestrukturrell wirksame Veränderungen durch den Einfluss der Zytokine erfassen zu können. Hierfür wurden nach jedem einzelnen Experiment einzelne Meniskusexplantate konserviert, so dass in der Folge Gewebeschnitte entsprechend einer bestimmten Fragestellung gefärbt und beurteilt werden konnten.

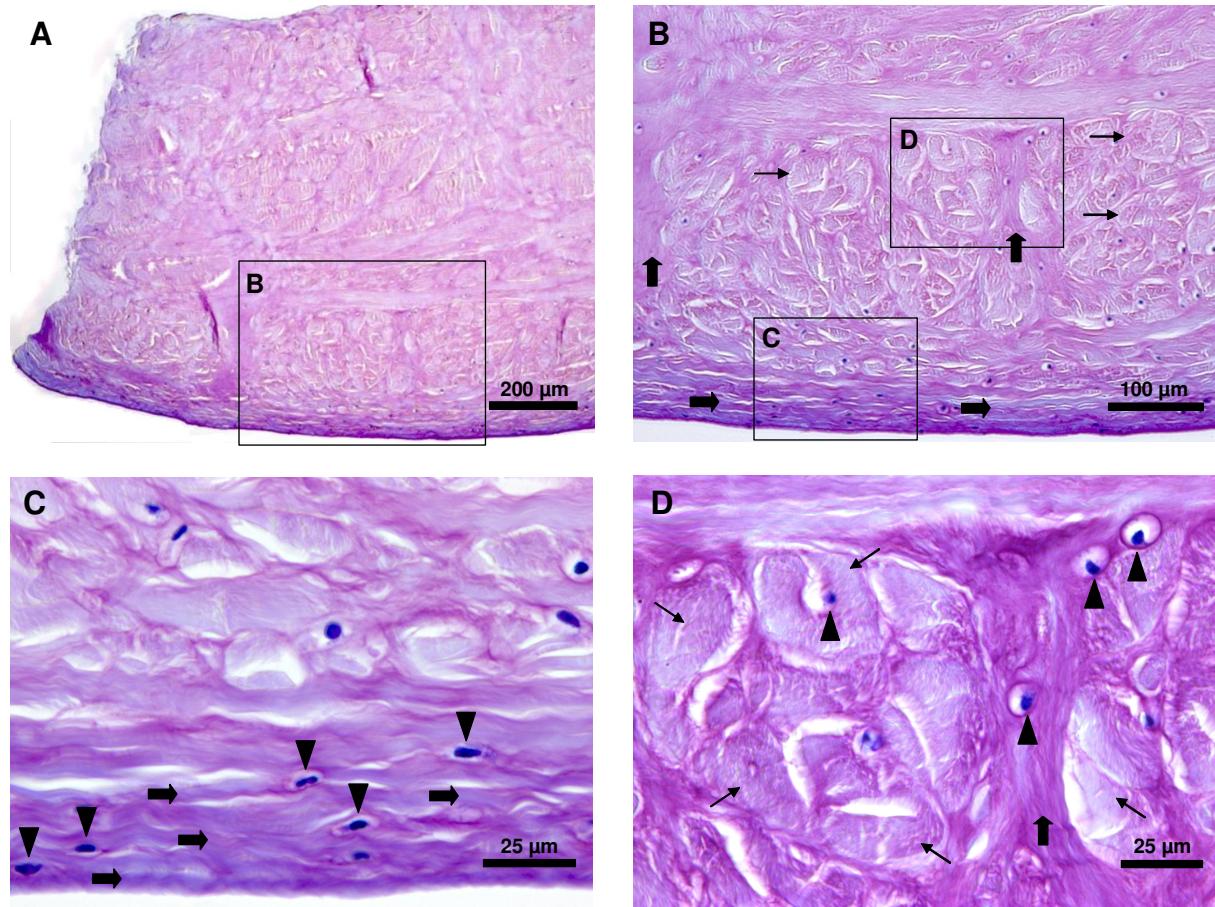
Um zunächst eine Beschreibung der Struktur von Meniskusgewebe vorzunehmen wurden Explantate der Kontrollgruppe mit Toluidinblau gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch begutachtet (s. **Abb. 8**).

Da die Explantate stets aus dem Bereich der Menisken entnommen wurden, die im Kniegelenk der Rinder der Tibiaoberfläche anlagen, konnte bei einem jeden Gewebeschnitt dieser Oberflächenbereich als strukturell glatt berandet ausgemacht werden, während die übrigen Ränder des Schnittes durch den Stanzvorgang verursacht wurden und somit keine originäre Oberflächenstruktur aufwiesen. Auffällige Unterschiede in der Zellstruktur und Gewebearchitektur waren im Vergleich zwischen der oberflächlichen (der Tibia anliegenden) Gewebeschicht und weiter tiefer/zentral gelegenen Schichten zu beobachten. Während die Zellen und Zellkerne im oberflächennahen Bereich meist spindelförmig waren und wenig zytoplasmatischen Querschnitt aufwiesen, zeigten sie weiter zentral eine ovale bis runde Form mit einer größeren Anschnittsfläche des Zytosplasmas. Die Zellen in Randbereich gaben so das Bild von Fibroblasten ab, während die tiefer liegenden Zellen als Chondrozyten charakterisiert werden konnten. Unmittelbar um die Chondrozyten zeigte sich in dieser Färbung häufig ein stark blau angefärbter Saum, der die Basophilie der dort angesiedelten polyanionischen Proteoglykane widerspiegelte und als so genannter Knorpelhof bezeichnet wird.

Die bindegewebigen Fasern waren im Randbereich überwiegend dünn und zeigten einen parallelen Verlauf zur Oberfläche. Hin zu tieferen Gewebeschichten verliefen kräftige vertikal zur Oberfläche angeordnete Bindegewebssepten, an die wiederum in feinere Septen eingegliedert dazu orthogonal verlaufende kräftige Kollagenbündel angeschlossen waren. In Kombination mit den runden Chondrozyten wiesen die tieferen Gewebeschichten so die histologischen Charakteristika von Faserknorpelgewebe auf.

Zwischen dieser Faserknorpelschicht und dem oberflächlichen Randbereich war eine Übergangszone zu beobachten, in der die Ausrichtung der Bindegewebsfasern sowie die Zellmorphologie weniger einheitlich waren.

Abbildung 8: Histologische Darstellung eines Meniskusexplantates



Legende Abb. 8:

Histologische Darstellung eines Meniskusexplantates einer Kontrollgruppe (Färbung: Toluidinblau).

A) Übersicht über einen Gewebeschnitt eines 1 mm dicken Explantates: Die glatte Oberfläche (im Bild unten) war im Kniegelenk ursprünglich dem Tibiaplateau zugewandt.

B) Vergrößerter Ausschnitt aus **A**: Erkennbar ist die unterschiedliche Anordnung der bindegewebigen Fasern. Im unteren Randbereich längs angeschnittene, überwiegend parallel zur Oberfläche verlaufende Fasern (→), weiter zentral kräftige vertikale Septen (↑) und quer angeschnittene Kollagenfaserbündel (→).

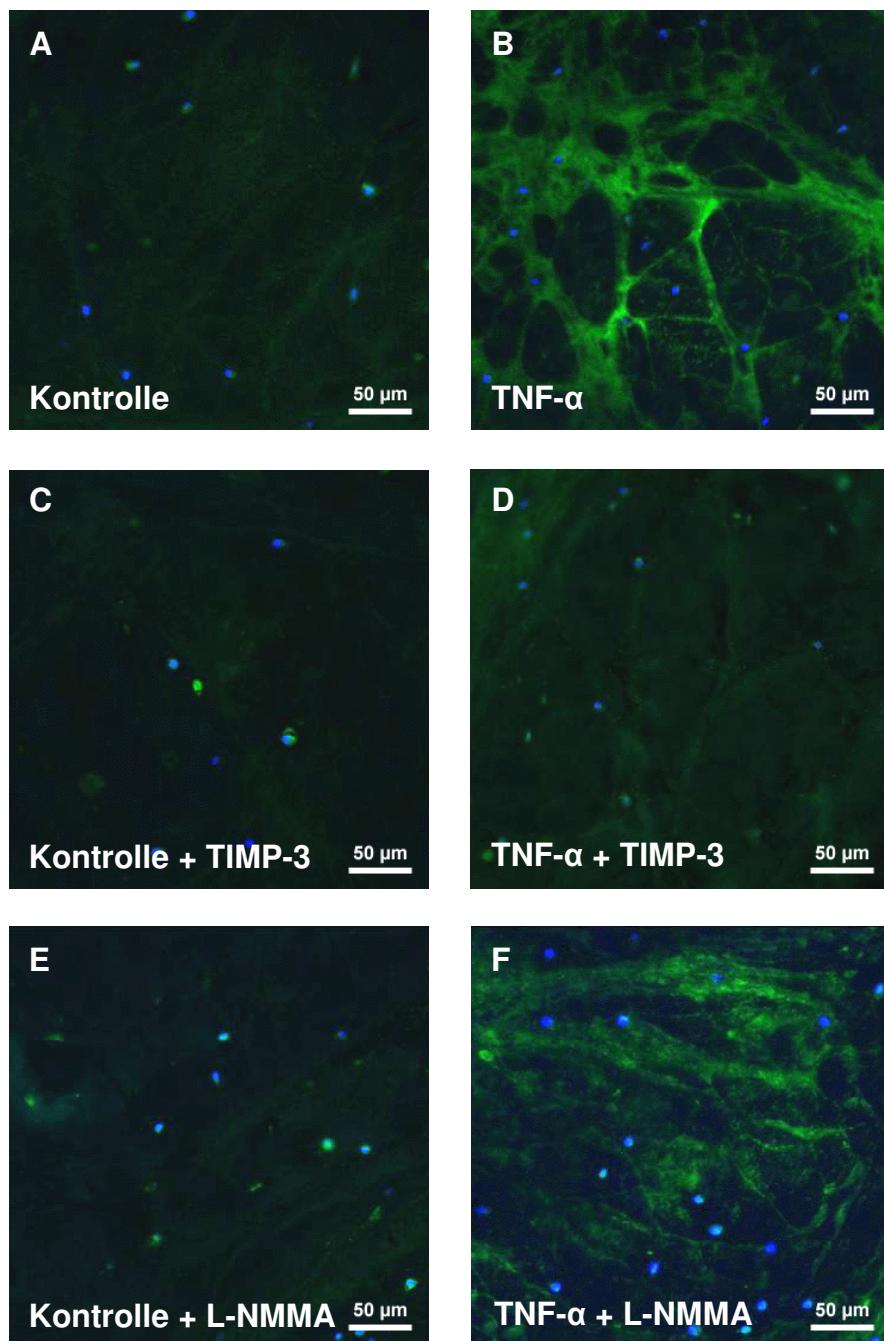
C) Vergrößerter Ausschnitt aus **B**, Darstellung der Oberfläche und unmittelbaren Randbereiches des Explantatanschnittes: Die Bindegewebsfasern verlaufen überwiegend parallel zur Oberfläche (→). Die Zellen und Zellkerne sind in diesem Bereich zum Großteil spindelförmig (▼).

D) Vergrößerter Ausschnitt aus **B**, Darstellung eines weiter zentral gelegenen Bereiches: Es ist ein kräftiges vertikales Septum erkennbar (↑) und septenhaft zusammengefasste quer angeschnittene Bündel von Kollagenfasern (→). Die Zellen und Zellkerne haben hier überwiegend eine ovale bis runde Form (▲).

3.6 Immunhistochemische Untersuchungen zu Veränderungen im Meniskusgewebe unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 und TIMPs bzw. L-NMMA

Um Einflüsse von TNF- α bzw. IL-1 auf Meniskusgewebe auf morphologischer Ebene nachweisen zu können, wurden zunächst immunhistochemische Anfärbungen von Gewebeschnitten der verwendeten Meniskusexplantate angefertigt und diese anschließend mikroskopisch analysiert. Dabei wurden zur Beurteilung von Matrixveränderungen für Aggrecanaseaktivität spezifische Aggrecanspaltfragmente (NITEGE-Neoepitope) mit Hilfe fluoreszierender Antikörper angefärbt, um den durch die Zytokine verstärkten Proteoglykankatabolismus wenn möglich auch in seinen gewebestrukturrellen Veränderungen zu detektieren. In zwei weiteren Färbereihen wurden spezifische Antikörper gegen ADAMTS-4 bzw. ADAMTS-5 verwendet, um ein potentiell verändertes Auftreten dieser Proteine in Zellnähe als Reaktion auf den Zytokineinfluss zu erfassen. Neben den Einflüssen von TNF- α und IL-1 auf das Meniskusgewebe wurden die zusätzlichen Effekte nach Verwendung der Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 (MMP-Hemmung) bzw. TIMP-3 (MMP- und Aggrecanasehemmung) bzw. L-NMMA (NO-Synthase-Hemmung) untersucht. Da die Effekte für die beiden verwendeten Zytokine TNF- α und IL-1 in allen Versuchsreihen identisch waren, wird im Folgenden exemplarisch nur von den Beobachtungen über den Einfluss von TNF- α die Rede sein. In der NITEGE-Färbereihe (s. **Abb. 9**) zeigten sich in den Kontrollgruppen sehr gering fluoreszierende Signale in der Extrazellulärmatrix. In den Gewebeschnitten der TNF- α -Gruppe war hingegen eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz in den faserknorpeligen Gewebeanteilen zu beobachten. Dieser Einfluss von TNF- α war in den Gewebeschnitten der zusätzlich mit TIMP-3 stimulierten Proben revidiert, während die Signale in den Schnitten der mit TIMP-1 oder -2 zusätzlich inkubierten Versuchsgruppen denen der TNF- α -Gruppe entsprachen. Die Zugabe von L-NMMA bewirkte keine Veränderung der TNF- α -induzierten Fluoreszenz. Bei den Untersuchungen mit Antikörpern gegen ADAMTS-4 bzw. ADAMTS-5 wurde die Fluoreszenz der Meniskuszellen bzw. der Zellkerne begutachtet (nicht grafisch abgebildet). Hierbei zeigten sich in den Gewebeschnitten der unstimulierten Kontrollgruppe schwach ausgeprägte punktuell fluoreszierende Signale im Bereich der Zellkernmembranen. Diese Signale waren in sämtlichen stimulierten Gruppen ebenfalls zu erkennen, jedoch kam es in keiner dieser Gruppen zu einer wesentlichen Veränderung dieses Basiseffektes.

Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung von Aggrekanspaltfragmenten (NITEGE) unter Einfluss von TNF- α und TIMP-3 bzw. L-NMMA



Legende Abb. 9:

Für die fluoreszenzmikroskopische Begutachtung stimulierten Meniskusgewebes wurden Explantate der verschiedenen Versuchsgruppen am Ende der 72-stündigen Inkubationszeit histologisch aufbereitet und immunhistochemisch angefärbt. Darstellung von Aggrekanspaltfragmenten (grün) in den bindegewebigen Septen durch primäre Inkubation der Schnitte mit NITEGE-Antikörper und anschließender Anfärbung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper, Anfärbung der Zellkerne (blau) mit Bisbenzimid.

- | | |
|--|--|
| A) Kontrolle | B) TNF- α (100 ng/ml) |
| C) Kontrolle + TIMP-3 (0,1 μ M) | D) TNF- α (100 ng/ml) + TIMP-3 (0,1 μ M) |
| E) Kontrolle + L-NMMA (1 mM) | F) TNF- α (100 ng/ml) + L-NMMA (1 mM). |

3.7 Histologische Untersuchungen zu Zellkernveränderungen im Meniskusgewebe unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1

In Rahmen einer weiteren Versuchsreihe wurden Gewebeschnitte hinsichtlich ihrer Zellkernmorphologie begutachtet, um neben den gewebestrukturrellen Veränderungen auch sichtbare Einflüsse von TNF- α bzw. IL-1 auf zellulärer Ebene zu erfassen. Hierzu erfolgte eine Färbung der konservierten Schnitte mit Mayer's Hämalaun-Lösung, die für die gesonderte Beurteilung von Zellkernveränderungen geeignet ist. Bei der lichtmikroskopischen Analyse wurden stets zentral gelegene faserknorpelartige Gewebebereiche beurteilt, um die Erfassung von Artefakten, die im Randbereich der Explantate möglicherweise durch den Stanzvorgang induziert worden sein konnten, zu vermeiden. Bei der Analyse der Zellkerne wurde eine Einteilung in drei Gruppen vorgenommen. Neben den als morphologisch unauffällig eingestuften runden Zellkernen mit lockerem Chromatin wurden in jedem Gewebeschnitt die kondensierten Zellkerne mit verdichtetem Chromatin sowie die Zellkerne, die ein so genanntes Blebbing (engl. bleb = Bläschen) aufwiesen (s. **Abb. 10A**), gezählt. Die Kondensation eines Zellkerns kann Zeichen eines beginnenden Zelluntergangs sein und das Blebbing ist sichtbares Korrelat einer Abschnürung von Zellkernfragmenten und gilt als Zeichen einer sich ereignenden Apoptose („selbst programmierter“ Zelltod).

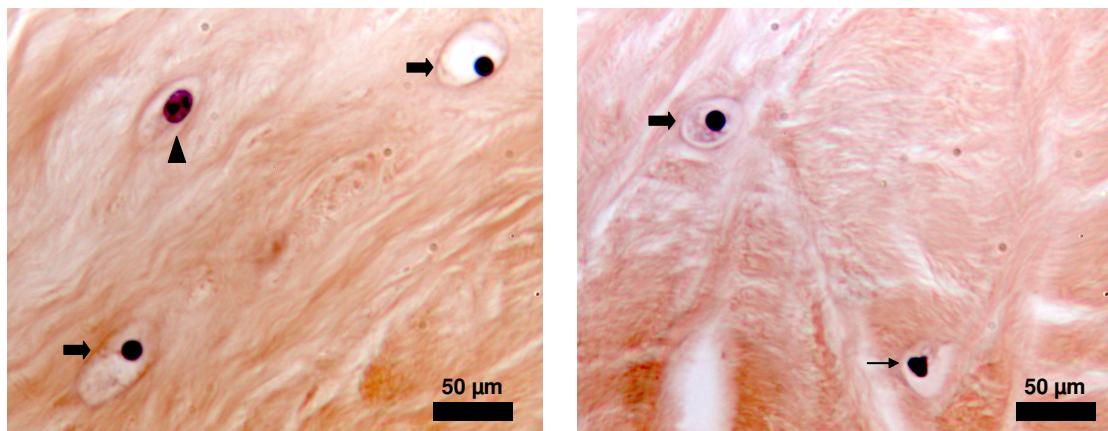
Bei der statistischen Auswertung der Schnitte wurde eine durchschnittliche Gesamtzellzahl pro Gewebeschnitt von 35,68 ($\pm 3,29$) ermittelt. Die Anzahl der Zellen in den Gewebeschnitten der verschiedenen Versuchsgruppen wichen dabei nicht signifikant voneinander ab (nicht abgebildet). Sowohl bei der Auszählung des Anteils kondensierter Zellkerne an der Gesamtzellzahl pro Schnitt als auch des Anteils von Zellkernen mit Blebbing zeigten sich weder in der TNF- α - noch in der IL-1-Gruppe signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe (s. **Abb. 10B**). Jedoch waren die relativen Mittelwerte für IL-1 tendenziell erhöht, während die Werte für TNF- α nahezu identisch mit denen der Kontrollgruppe waren.

In einer parallel durchgeführten Versuchsreihe mit 1, 10 und 100 ng/ml TNF- α konnten keine dosis-abhängigen Effekte hinsichtlich der Anteile kondensierter Zellkerne bzw. von Zellkernen mit Blebbing beobachtet werden.

Hinsichtlich zellmorphologischer Veränderungen konnten im Rahmen der 72-stündigen Inkubationszeit also keine eindeutigen Einflüsse durch die Zytokine TNF- α bzw. IL-1 auf die bovinen Meniskusexplantate festgestellt werden.

Abbildung 10: Zellkernveränderungen im Meniskusgewebe unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1

A) Histologische Darstellung der Zellkernmorphologie



B) Statistische Auswertung zu Zellkernveränderungen unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1

	Kondensierte ZK [%]	SEM	T-TEST
Kontrolle	22,80	5,75	
TNF- α	22,75	5,62	0,87
IL-1	29,14	6,44	0,77

	ZK mit Blebbing [%]	SEM	T-TEST
Kontrolle	2,71	1,19	
TNF- α	2,45	0,61	0,68
IL-1	3,03	0,97	0,85

Legende Abb. 10:

Zur Begutachtung der gewebeständigen Meniskuszellen wurden paraffineingebettete histologische Schnitte mit Mayer's Hämalaun-Lösung gefärbt. Es erfolgte eine Beurteilung und statistische Erfassung der Zellkerne hinsichtlich ihrer Morphologie.

A) Histologische Darstellung zweier Anschnitte von Meniskusgewebe mit insgesamt einem morphologisch unauffälligen Zellkern (\blacktriangle), drei kondensierten Zellkernen (\Rightarrow) und einem Zellkern mit Blebbing als Zeichen einer beginnenden Apoptose (\rightarrow).

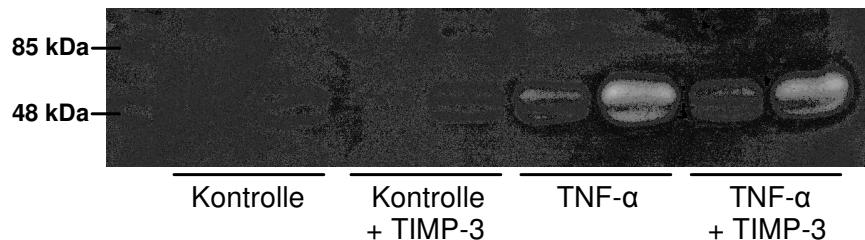
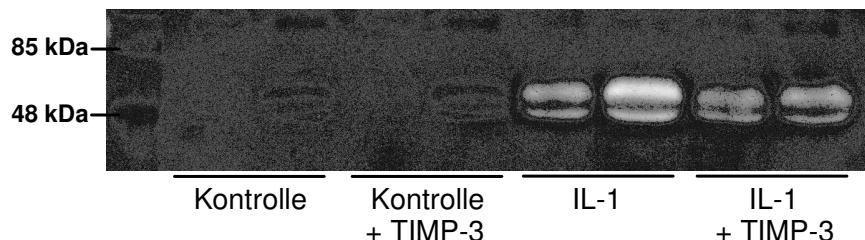
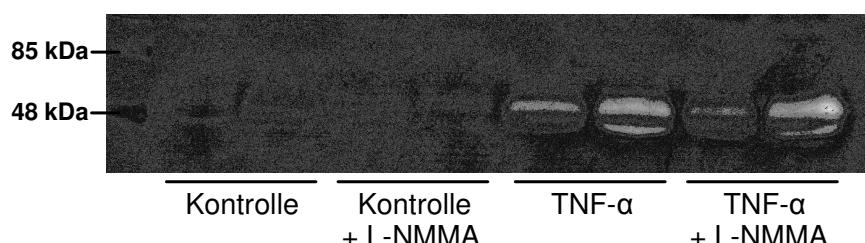
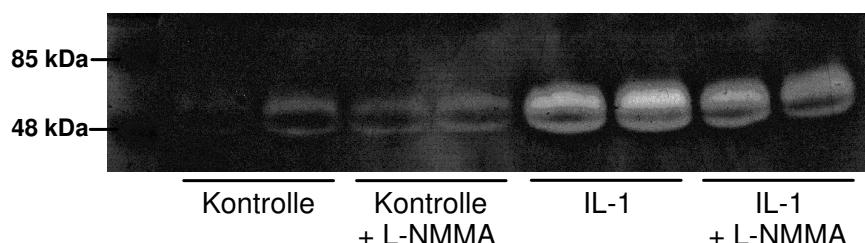
B) Statistische Auswertung der Auszählung von Gewebeschnitten aus Meniskusexplantaten, die unstimuliert bzw. mit TNF- α (100 ng/ml) oder IL-1 (10 ng/ml) inkubiert worden waren. Für kondensierte Zellkerne (ZK) bzw. Zellkerne mit Blebbing sind die relativen Mittelwerte im Verhältnis zur durchschnittlich ausgezählten Gesamtzellzahl der Gewebeschnitte jeder Versuchsgruppe angegeben ($n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen).

SEM:= Standardfehler der relativen Einzelwerte; T-TEST: Gruppe i. Vgl. zur Kontrolle.

3.8 Zymografische Analysen unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 und TIMP-3 bzw. L-NMMA

Eine Überprüfung zytokinvermittelter Effekte im Meniskusgewebe auf Protein-Ebene wurde mit Hilfe zymografischer Analysen durchgeführt. Prinzip der Zymogramme ist die elektrophoretische Auftrennung von in Proben enthaltenen Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und die anschließende Detektion der enzymatischen Aktivität dieser Proteine. Dabei wird ein spezielles Substrat im Elektrophoresegel von Proteinen mit entsprechend spezifischer Bindungsaffinität gespalten und als aufgehelle Bande im Gel sichtbar. Das im Rahmen dieser Arbeit als Substrat verwendete Casein kann u.a. von dem in dieser Arbeit untersuchten Enzym MMP-3 bzw. dessen in vivo inaktiver Form pro-MMP-3 sowie von pro-MMP-13 gespalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zymogramme mit Kulturüberständen von TNF- α bzw. IL-1-stimulierten Versuchsgruppen mit/ohne zusätzlicher TIMP-3- bzw. L-NMMA-Inkubation durchgeführt (s. **Abb. 11**)

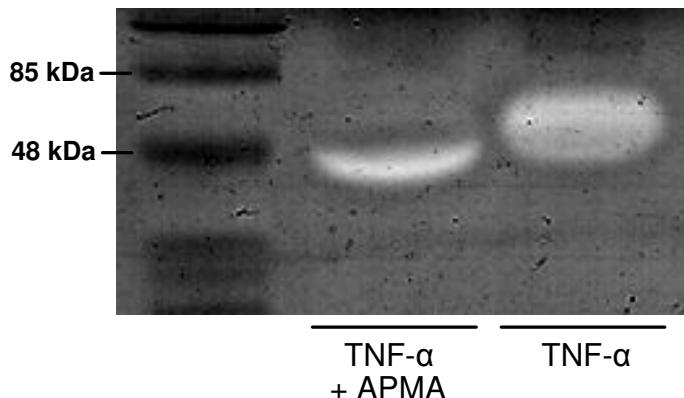
Als konstante Beobachtung zeigte sich das Auftreten einer deutlich aufgehellten Bande in sämtlichen Ansätzen der Zytokinspuren für TNF- α (s. **Abb. 11A** und **C**) bzw. IL-1 (s. **Abb. 11B** und **D**), die sich um den Molekulargewichtsbereich von etwa 50 kDa und darüber hinaus ausdehnte. Dies sprach für das Vorhandensein von pro-MMP-3 (57 kDa) und/oder MMP-3 (48 kDa) in den Überständen. In jeder Aufhellung war zudem eine verdunkelte Zone erkennbar, die sich quer durch die ganze Bande zog. Hierbei handelte es sich um die Ansammlung der enzymatisch aktiven Proteine selbst. In allen Spuren der Kontrollproben zeigte sich nur eine sehr geringe oder gar keine erfassbare aufgehelle Bande. Der Einfluss der Inhibitoren TIMP-3 (s. **Abb. 11A** und **B**) bzw. L-NMMA (s. **Abb. 11C** und **D**) auf Zytokin- und Kontrollgruppen führte in keinem der Zymogramme zu eindeutigen Veränderungen. Im Vergleich der Zymogramme für TNF- α bzw. IL-1 war auffällig, dass die Aufhellungen der Banden für IL-1 relativ stärker waren. Dies könnte für einen größeren Gehalt an (pro-)MMP-3 in den IL-1-Überständen im Vergleich zu den TNF- α -Proben sprechen und deckt sich mit Ergebnissen zur mRNA-Expression von MMP-3 unter Einfluss der Zytokine. Dabei kam es für IL-1 (16,8-fach) zu einer stärkeren Erhöhung der Expression als für TNF- α (6,9-fach, vgl. **Abb. 6A** und **B**).

Abbildung 11: Zymografische Darstellung von (pro-)MMP-3 im Überstand**A)****Zymogramm nach Stimulation mit TNF- α und TIMP-3****B)****Zymogramm nach Stimulation mit IL-1 und TIMP-3****C)****Zymogramm nach Stimulation mit TNF- α und L-NMMA****D)****Zymogramm nach Stimulation mit IL-1 und L-NMMA****Legende Abb. 11:**

Die zymografischen Analysen wurden nach dem Ende der 72-stündigen Inkubationszeit unter Einfluss der Zytokine (TNF- α : 100 ng/ml; IL-1: 10 ng/ml) bzw. Inhibitoren (TIMP-3: 0,1 μ M; L-NMMA: 1 mM) durchgeführt. Hierzu wurden Überstände aus Ansätzen mit jeweils Kontrolle \pm Inhibitor und in **A**) TNF- α \pm TIMP-3, in **B**) IL-1 \pm TIMP-3, in **C**) TNF- α \pm L-NMMA bzw. in **D**) IL-1 \pm L-NMMA verwendet. In jedem Zymogramm sind eine Spur mit einem Molekulargewichtsstandard (links) und acht weitere Spuren zu sehen. Dabei handelt es sich stets um unabhängige Proben aus einem gemeinsamen Experiment. Die Proben wurden in einem speziellen Zymogrammgel nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Enzymatisch aktive Proteine waren in der Lage das im Gel enthaltene Substrat Casein zu spalten und wurden darauf hin als aufgehelle Bände im Gel sichtbar. Sämtliche in dieser Abbildung sichtbaren Banden liegen bei einem Molekulargewicht nahe 50 kDa und spiegeln das Vorhandensein von (pro-)MMP-3 in den Überständen wider.

Um zu differenzieren, ob es sich bei den ausgedehnten aufgehellten Banden um ein Signal für pro-MMP-3 und/oder für MMP-3 handelte, wurden in einer zweiten Versuchsreihe zymografische Analysen mit einem Pro-MMP-Aktivator (APMA) durchgeführt. Hierzu wurden exemplarisch TNF- α -Proben verwendet. Durch Vorinkubation der TNF- α -Proben mit APMA kam es bei den zymografischen Analysen zu einer Veränderung der aufgehellten Bande (s. **Abb. 12**). Während sich die Aufhellung in der TNF- α -Spur wie in den vorhergehenden Untersuchungen über einen ausgedehnten Bereich um 50 kDa herum erstreckte, kam es unter Zugabe von APMA zu einer auf den Bereich um 48 kDa beschränkten Aufhellung. Diese isolierte Aufhellung spiegelte die durch APMA induzierte Spaltung der pro-MMP-3-Formen zu MMP-3 wider. Ob es sich in der TNF- α -Spur um eine ausschließlich durch pro-MMP-3 induzierte Bande oder um eine durch pro-MMP-3 und MMP-3 induzierte konfluierende Bande handelte, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Abbildung 12: Zymografische Darstellung von (pro-)MMP-3 im Überstand unter Einfluss von APMA



Legende Abb. 12:

Ausschnitt eines Zymogrammes für Überstände von mit TNF- α (100 ng/ml) stimulierten Meniskusexplantaten, in denen eine Aktivierung latenter MMPs (Pro-Formen) mittels des MMP-Aktivators APMA durchgeführt wurde. Für die Aktivierung der pro-MMP-3-Proteine im Überstand wurde ein Teil der Kulturüberstände nach Versuchende drei Stunden mit APMA (2 mM) inkubiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auf trennung im Casein-Zymogramm gel. Abgebildet sind die Spuren für den Molekulargewichtsstandard, für TNF- α + APMA und für TNF- α .

Für TNF- α zeigte sich eine deutlich aufgehellte Bande in einem Bereich um 50 kDa. Durch Addition von APMA zur TNF- α -Probe kam es zum Auftreten einer dünneren intensiven Bande, die auf den Molekulargewichtsbereich von 48 kDa beschränkt war. Dies spiegelte die Aktivierung der in den TNF- α -Überständen enthaltenen pro-MMP-3-Proteine zu MMP-3 wider.

3.9 Einfluss von NO-Synthase-Hemmung auf GAG- und NO-Freisetzung

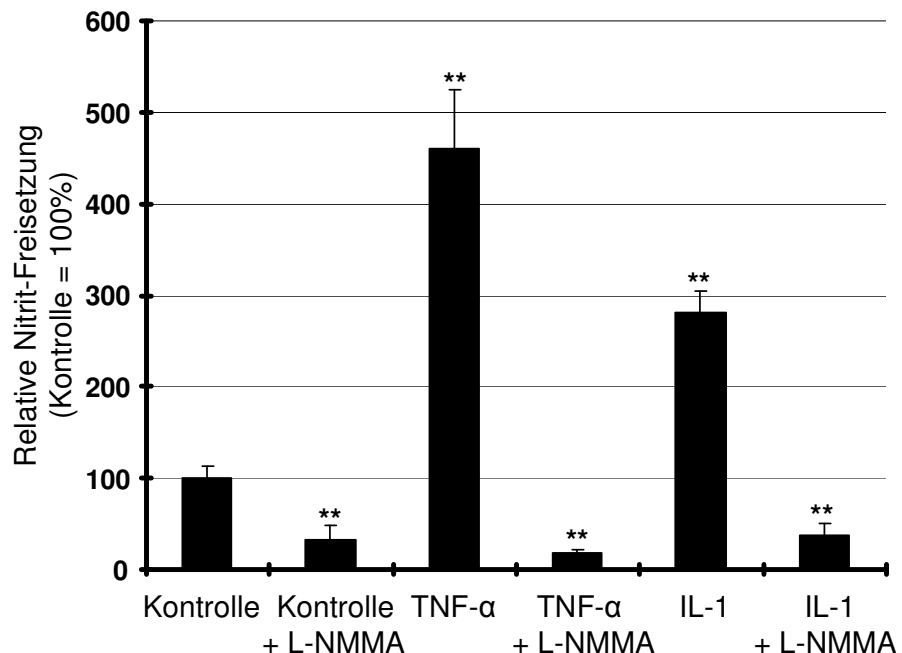
Nachdem in dieser Arbeit eine Erhöhung von GAG- und NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe unter Einfluss von IL-1 bzw. unter Einfluss von TNF- α gezeigt werden konnte, sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden, in welcher Beziehung die zytokininduzierte GAG-Freisetzung zu der zytokininduzierten NO-Freisetzung steht. Daher wurden in dieser Arbeit auch in Bezug auf die Effekte zur GAG- und NO-Freisetzung Untersuchungen mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA durchgeführt.

Erwartungsgemäß zeigte sich unter Einfluss von L-NMMA in allen Versuchsgruppen eine signifikante Hemmung der NO-Freisetzung (s. **Abb. 13A**). In den Überständen einzelner Proben waren die Nitrit-Spiegel unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. In der Kontrollgruppe wurde die NO-Freisetzung durch den Einfluss von L-NMMA um 68% (± 17) gesenkt. Die durch TNF- α gegenüber der Kontrollgruppe bewirkte Steigerung der NO-Freisetzung um 360% (± 64) war unter dem Einfluss von L-NMMA komplett unterdrückt. Es zeigte sich eine im Vergleich zur nicht mit L-NMMA stimulierten Kontrollgruppe um 82% (± 24) verminderte NO-Freisetzung. Für IL-1 waren vergleichbare Effekte zu beobachten. Die alleinige Stimulation mit IL-1 führte zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe um 181% (± 24) gesteigerte Freisetzung von NO, durch Ko-Stimulation mit L-NMMA kam es zu einer signifikant reduzierten Freisetzung um 63% (± 14) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

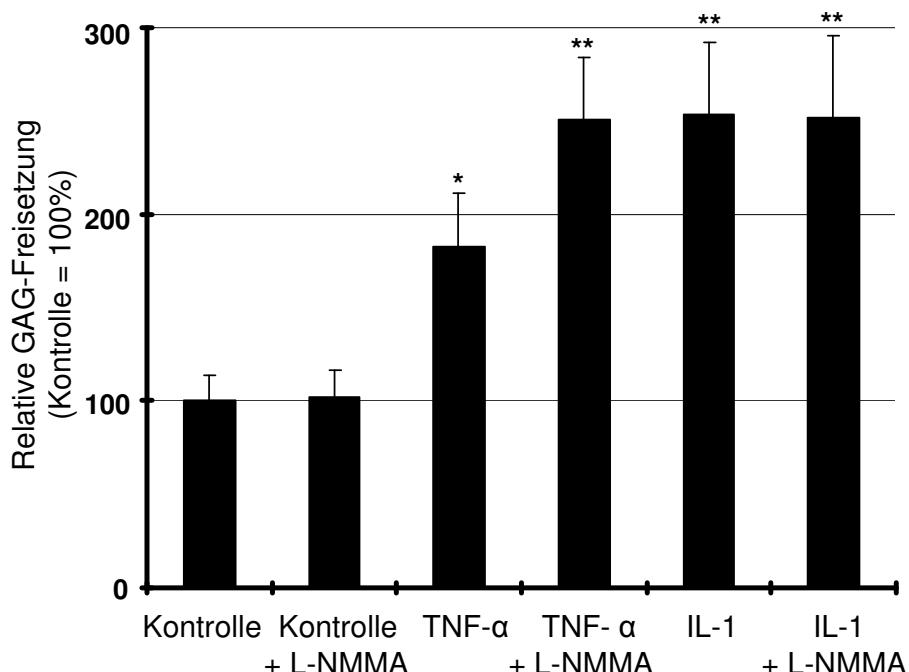
Parallel wurden die Effekte des NO-Synthase-Inhibitors auf die Glykosaminoglykanfreisetzung untersucht (s. **Abb. 13B**). In der Kontrollgruppe führte die zusätzliche Stimulation mit L-NMMA zu keiner Veränderung der GAG-Freisetzung. In den zytokinstimulierten Proben kam es ebenfalls zu keinen signifikanten Änderungen. Die in der TNF- α -Gruppe um 83% (± 28) gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte GAG-Freisetzung wurde unter Einfluss von L-NMMA um weitere 67% (± 33) gesteigert. Unter Stimulation mit IL-1 kam es zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe um 153% (± 39) gesteigerten GAG-Freisetzung. Die Ko-Stimulation mit IL-1 und L-NMMA bewirkte nahezu keine Veränderung dieses Effektes. Die zusätzliche GAG-Freisetzung im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe betrug 151% (± 44).

Abbildung 13: Einfluss von NO-Synthase-Hemmung auf die zytokininduzierte NO- bzw. GAG-Freisetzung

A) Einfluss von L-NMMA auf die TNF- α - und IL-1-induzierte NO-Freisetzung



B) Einfluss von L-NMMA auf die TNF- α - und IL-1-induzierte GAG-Freisetzung



Legende Abb. 13:

Neben der Inkubation von Kontroll-, TNF- α - (100 ng/ml) und IL-1- (10 ng/ml) Gruppe wurde jeweils eine Ko-Inkubation mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA (1 mM) vorgenommen (1 Explantat in 200 μ l Medium, $n = 6$). Nitrit-Messung (A) und GAG-Messung (B) jeweils nach 72 Stunden.

T-TEST (Gruppe i. Vgl. zur Kontrolle): * := $p < 0,05$ und ** := $p < 0,01$; [] := Standardfehler.

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Versuchsmodells

4.1.1 Zeitlicher Rahmen

Innerhalb der 72-stündigen Inkubationszeit von Meniskusgewebe mit den Zytokinen TNF- α bzw. IL-1 kam es bei verschiedenen Messverfahren zu erfassbaren Effekten. Auf den Ebenen der Syntheseleistung, der Expression von Enzymen, der Produktion von Proteinen und der Struktur der Extrazellulärmatrix waren nach dieser Zeitspanne Veränderungen beobachtbar. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der verwendete zeitliche Rahmen geeignet war, um bereits strukturell wirksame Veränderungen am Meniskusgewebe durch Zytokine in vitro zu induzieren. Im Fokus dieser Arbeit stand die Simulation und Erfassung der degenerativen Veränderungen am Meniskusgewebe in einer frühen Entzündungsphase. Hierfür erwies sich das Versuchsmodell prinzipiell als geeignet. Da die entzündlichen Prozesse bei Gelenkerkrankungen allerdings häufig chronisch verlaufen, sollten in weitergehenden Studien zusätzlich Versuchsreihen mit längeren Inkubationszeiten angestrebt werden.

4.1.2 Wirkstoffkonzentrationen und Zusammensetzung des Kulturmediums

Nachdem zu Beginn der Arbeit Dosis-Wirkungs-Kurven für GAG- und NO-Freisetzung in Abhängigkeit von der TNF- α -Konzentration ermittelt wurden, wurden anschließend sämtliche folgende Versuchsreihen regelhaft mit einer TNF- α -Konzentration von 100 ng/ml durchgeführt. Bei dieser Konzentration zeigten sich reproduzierbar signifikante Veränderung der GAG- und NO-Freisetzung. IL-1 kam stets in einer Dosis von 10 ng/ml zum Einsatz, nachdem sich in vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe reproduzierbare Effekte unter Verwendung dieser Konzentration gezeigt hatten [172]. Die verwendeten Konzentrationen für TNF- α und die eingesetzten Inhibitoren (TIMPs und L-NMMA) decken sich mit verwendeten Konzentrationen im Rahmen von In-vitro-Modellen anderer Studiengruppen [116; 139; 169]. Die Zytokinkonzentrationen erwiesen sich für das angewendete In-vitro-Modell mit Fokus auf die initialen Veränderungen am Meniskusgewebe im Rahmen entzündlicher Prozesse als geeignet. In vivo sind die entsprechenden Zytokine zwar

in geringeren Konzentrationen nachweisbar [68; 69], sie können dort allerdings über längere Zeiträume produziert werden und ihre Wirkung entfalten.

In dieser Arbeit wurde stets serumfreies Medium eingesetzt um die prinzipiellen Wirkmuster der Zytokine TNF- α und IL-1 möglichst unbeeinflusst darzustellen. Aus Studien ist bekannt, dass Serumbestandteile in der Lage sind, die messbaren Effekte im Rahmen von In-vitro-Modellen zu beeinflussen [174-176].

4.1.3 Inkubationsschlüssel von Medium und Explantaten

Bei der Inkubation der Explantate wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze gewählt. In einem Teil der Experimente wurden je drei Explantate in 1 ml Medium inkubiert, während in einem anderen Teil der Versuche stets ein Explantat in 200 μ l Medium kultiviert wurde. Die erste Variante wurde als etablierte Methode übernommen, die zweite wurde im Rahmen der Studien mit den Inhibitoren TIMP-1, -2 und -3 bzw. L-NMMA angewendet, da diese Substanzen sehr teuer sind und daher sparsam eingesetzt werden mussten.

Bei den verschiedenen Messergebnissen nach Verwendung der verschiedenen Inkubationsschlüssel zeigten sich für beide verwendeten Ansätze tendenziell einheitliche Veränderungen. Allerdings waren im Rahmen der standardmäßig durchgeführten Messungen für GAG- und NO-Freisetzung die in Relation zum Feuchtgewicht der Explantate berechneten Konzentrationen im Überstand in dem Modell mit einem Explantat in 200 μ l Medium fast durchgängig höher im Vergleich zu dem Modell mit drei Explantaten in 1 ml Medium. Ein Grund hierfür könnte gewesen sein, dass es durch Verdunstungseffekte von Inkubationsflüssigkeit in dem Modell mit 200 μ l Medium zu einem relativ höheren Verlust an Medium über die Zeitspanne der Inkubation kam und somit eine relativ stärkere Aufkonzentrierung der zu messenden Substanzen die Folge war. Zudem war auffällig, dass die relativen Veränderungen zwischen Kontrollgruppe und Zytokingruppen in dem Modell mit weniger Inkubationsmedium zum Teil erheblich stärker ausgeprägt waren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass für einen Teil der Versuche mit Inhibitoren aus organisatorischen Gründen Menisken von Rindern aus ökologisch wertvoller Haltung (Biobauer „Muhs“) verwendet wurden. In den Versuchsreihen mit diesem biologisch hochwertigen Gewebe zeigten sich in den Kontrollgruppen überwiegend gering ausgeprägte Effekte bei GAG- und NO-Messung. Dahingegen kam es unter

Verwendung von Gewebe aus dem Schlachthof Bad Bramstedt im Vergleich dazu zu bereits relativ erhöhten Signalen in den Kontrollgruppen.

4.1.4 Zusammenfassende Beurteilung des Versuchsmodells

Bei dem prinzipiellen Versuchsmodell dieser Arbeit handelte es sich um ein In-vitro-Modell mit 72-stündiger Inkubationszeit von Meniskusexplantaten von bis zu zwei Jahre alten Rindern unter Einfluss der Zytokine TNF- α und IL-1. Dieses Modell wurde zuvor unter Verwendung von IL-1 in unserer Arbeitsgruppe etabliert und zeigte in verschiedenen Experimentreihen reproduzierbare Versuchsergebnisse. Das Versuchsmodell erwies sich mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zytokin- und Inhibitorkonzentrationen als grundsätzlich geeignet, um die prinzipiellen Effekte von TNF- α und IL-1 auf Meniskusgewebe von Rindern in vitro zu simulieren. Um die chronischen Effekte proinflammatorischer Zytokine am Meniskusgewebe besser beurteilen zu können, sollten in zukünftigen Untersuchungen Versuche mit längeren Inkubationszeiträumen durchgeführt werden. Dabei sollten zur zuverlässigeren Vergleichbarkeit der Ergebnisse stets Versuche mit einheitlichen Inkubationsschlüsseln von Medium zu Explantaten sowie die Verwendung von Meniskusgewebe identischer Herkunft erfolgen. Um sich im Rahmen der In-vitro-Bedingungen des Versuchsmodells bei der Darstellung der Pathophysiologie am Meniskusgewebe den In-vivo-Bedingungen des Menschen anzunähern, sollten in Zukunft auch Versuche an humanem Meniskusgewebe durchgeführt werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einflüsse von TNF- α und IL-1 auf bovines Meniskusgewebe in vitro

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 im Rahmen eines dreitägigen In-vitro-Modells zu einer reproduzierbaren Erhöhung der Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus bovinem Meniskusgewebe in der Lage sind. Die gemessenen GAG-Freisetzungen waren dabei dosis- und zeitabhängig gesteigert. Diese Ergebnisse reihen sich in andere Studien mit proinflammatorischen Zytokinen ein, in denen gesteigerte GAG-Freisetzungen am Meniskusgewebe von Kaninchen und Schweinen beobachtet wurden [160; 162]. Aus Studien an Knorpelgewebe ist bekannt, dass in der frühen

Phase entzündlicher Prozesse der Abbau von Proteoglykanen im Gegensatz zum Abbau von kollagenen Matrixproteinen im Vordergrund steht [177]. Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zur GAG-Freisetzung sprechen dafür, dass es am bovinen Meniskusgewebe initial ebenfalls zu einem gesteigerten Katabolismus von Proteoglykanen kommt. In zukünftigen Studien sollte der unmittelbar katabole Einfluss von TNF- α und IL-1 auf die kollagenen Matrixproteine des Meniskusgewebes vergleichend hierzu untersucht werden.

Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien kam es nach Stimulation durch TNF- α bzw. IL-1 regelhaft zu einer Erhöhung der NO-Freisetzung aus Meniskusgewebe. Diese war im Rahmen des Versuchsmodells ebenfalls dosis- und zeitabhängig zu beobachten. Die Befunde zur NO-Freisetzung decken sich mit Forschungsergebnissen an Knorpel- und Meniskusgewebe [74; 162].

Auf der Ebene der mRNA-Expression diverser Gene konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch TNF- α und IL-1 zu einer gesteigerten Produktion von Matrixmetalloproteinases und Aggrekanasen kommt. Diese Befunde ergänzen sich grundsätzlich mit Angaben aus der Literatur, nach denen erhöhte Levels dieser Enzyme bereits in Tiermodellen, in denen OA induziert wurde, in menschlichem Knorpelgewebe von OA-Patienten und in der Synovialflüssigkeit von OA- bzw. RA-Patienten nachgewiesen werden konnten [96; 101; 178; 179]. In diesem Zusammenhang ist bisher kaum bekannt, in welchem Maße der Meniskus an der Synthese dieser Enzyme beteiligt ist. Somit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Meniskus unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 eine zusätzliche Quelle für die Produktion von MMPs und Aggrekanasen darstellen könnte. In der vorliegenden Arbeit waren unter den MMPs im Durchschnitt alle untersuchten Gene unter Einfluss von TNF- α und IL-1 erhöht, wobei es jeweils für MMP-3 am deutlichsten zu einer Induktion kam. Unter den Aggrekanasen konnten für ADAMTS-5 zu wenige Messwerte detektiert werden, für ADAMTS-4 zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Genexpression sowohl unter TNF- α - als auch unter IL-1-Einfluss. Diese Befunde zur Genexpression deuten darauf hin, dass sowohl MMPs als auch Aggrekanasen (ADAMTS-4) zytokinabhängig am bovinen Meniskusgewebe vermehrt produziert werden und somit eine wichtige Rolle beim Abbau von Proteoglykanen spielen könnten.

Während die Genexpressionsdaten für die katabolen Enzyme unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 deutliche Beeinflussungen zeigten, waren die Werte für die Gene

der gewebeständigen Proteine Kollagen Typ I und Typ II bzw. Aggrekan nur geringgradig beeinflusst. Diese Befunde könnten als Hinweis dafür gewertet werden, dass sich Wirkung von TNF- α und IL-1 unmittelbar in erster Linie auf die Aquierierung kataboler Enzyme richtet, während die Syntheseleistung im Meniskusgewebe zunächst weniger beeinflusst wird.

Auf der Ebene eines gesteigerten Vorkommens der Enzyme im Kulturüberstand konnte mit Hilfe der Caseingelzymografie der Hinweis auf eine vermehrte Produktion von MMP-3 bzw. seiner inaktiven Pro-Form geliefert werden. Durch Gelatinegelzymografien (MMP-2, MMP-9) oder Westernblots (MMPs, Aggrekanasen) könnten in zukünftigen Untersuchungen weitere Daten zum gesteigerten Vorkommen der katabolen Enzyme im Kulturüberstand gesammelt werden.

Bei histologischen Untersuchungen am Meniskusgewebe konnten ebenfalls Nachweise eines Abbaus von Proteoglykanen unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 geführt werden. So zeigten sich sowohl für TNF- α als auch IL-1 immunhistochemisch deutlich vermehrte Aggrekanspaltfragmente (NITEGE) im Meniskusgewebe. NITEGE-Spaltfragmente konnten zuvor von anderen Arbeitsgruppen bereits vermehrt im Knorpelgewebe und auch in der Synovialflüssigkeit von OA- und RA-Patienten detektiert werden [180-183]. Neben den Befunden zur GAG-Freisetzung und der bereits erhobenen gesteigerten Genexpression von MMPs und Aggrekanasen liefern die immunhistochemischen Befunde einen weiteren Nachweis für den TNF- α - bzw. IL-1-induzierten Proteoglykanabbau am bovinen Meniskusgewebe.

Bei histologischen Untersuchungen zur Apoptose der gewebeständigen Meniskuszellen konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Einflüsse von TNF- α bzw. IL-1 beobachtet werden. Aus der Literatur geht hervor, dass Meniskuszellen im Rahmen von induzierter OA vermehrt Apoptose zeigen [156; 157; 184]. In verschiedenen Studien konnte jedoch durch die Wirkung von TNF- α bzw. IL-1 selbst in vitro kein direkt apoptotischer Effekt auf Chondrozyten beobachtet werden [75; 185]. Eine mögliche Erklärung für die Befunde der vorliegenden Arbeit könnte also sein, dass die proinflammatorischen Zytokine in vitro keinen direkten apoptotischen Effekt an Meniskuszellen ausüben. Da IL-1 und TNF- α in der vorliegenden Arbeit allerdings zu einer erhöhten Produktion von NO führten und NO als proapoptotischer Mediator bekannt ist [171; 185], wäre es auch möglich, dass es durch TNF- α und IL-1 indirekt zur Induktion von Apoptose an Meniskuszellen kommen kann. Zur

besseren Beurteilung dieses Effektes wären daher die Ausweitung des Versuchszeitrahmens in Kombination mit vergleichender Beobachtung des Einflusses der proinflammatorischen Zytokine auf Apoptose mit und ohne zusätzliche NO-Synthase-Hemmung sinnvoll.

4.2.2 Bedeutung von MMPs und Aggrekanasen am Proteoglykanabbau

Nachdem in dieser Arbeit der Nachweis eines erhöhten Proteoglykanabbaus sowie einer erhöhten Genexpression für MMPs und Aggrekanasen unter Einfluss von TNF- α und IL-1 gezeigt werden konnte, wurden im Folgenden Untersuchungen darüber durchgeführt, welchen Enzymen eine tragende Rolle im Rahmen des frühen zytokininduzierten Proteoglykanabbaus am bovinen Meniskusgewebe zugeordnet werden kann.

Die Expressionsanalysen zeigten in erster Linie für MMP-3 und ADAMTS-4 deutlich bzw. regelhaft erhöhte Werte unter Einfluss von TNF- α und IL-1. Zur Differenzierung der Bedeutung von MMPs und Aggrekanasen beim Abbau von GAGs wurden Versuche mit diversen TIMPs durchgeführt. Hierbei zeigte sich nur unter Einfluss von TIMP-3 eine Reduktion der zytokininduzierten GAG-Freisetzung. Da TIMP-3 im Gegensatz zu TIMP-1 und TIMP-2 auch in der Lage ist, Aggrekanasen zu hemmen [140], deuten diese Befunde daraufhin, dass der Katabolismus der Proteoglykane in der frühen Phase der Degeneration vorrangig durch Aggrekanasen bewerkstelligt wird. Warum sich unter Einfluss von TIMP-1 bzw. TIMP-2 dagegen eine tendenzielle Erhöhung der zytokininduzierten GAG-Freisetzung zeigte, ist unklar. Ähnliche Befunde bezüglich TIMP-1 und -2 zeigten sich in einer Studie mit Aggrekanpaltfragmentdetektion mittels Westernblot-Analysen [186]. Hierbei kam es unter Inkubation mit TIMP-1 bzw. -2 zu einer verstärkten Aggrekanaseaktivität, wohingegen diese unter Einfluss von TIMP-3 nahezu komplett gehemmt wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass TIMP-1 und -2 im Sinne einer ausgleichenden Funktion als Modulatoren des Gewebekatabolismus bei Hemmung von MMPs indirekt zu einer Aktivierung von Aggrekanasen führen könnten.

Die wichtige Rolle von TIMP-3 beim Schutz vor Proteoglykanabbau am Knorpel- und Meniskusgewebe konnte im Rahmen eines TIMP-3-Knockout-Mausmodells dokumentiert werden, bei dem es unter TIMP-3-Defizienz zu verstärktem Aggrekanmetabolismus kam [187]. Da TIMP-3 neben der Hemmung von katabolen

Proteasen auch in der Lage ist, andere Enzyme wie z.B. das TNF- α converting enzyme (TACE) und somit die Produktion aktiven TNF- α s zu hemmen, scheint es ein wichtiger inhibitorischer Modulator im Rahmen entzündlich degenerativer Prozesse zu sein. In zukünftigen Studien wäre es sinnvoll, potentielle indirekte Effekte von TIMP-3 auf diversen zusätzlichen Ebenen wie z.B. der Genexpression von Aggrekanasen zu untersuchen.

Weitere Bestätigung der Aktivität von Aggrekanasen beim Proteoglykanabbau am bovinen Meniskusgewebe lieferten die immunhistochemischen Untersuchungen zur Detektion Aggrekanase-spezifischer Spaltfragmente von Aggrekan (NITEGE). Unter Einfluss von TNF- α und IL-1 kam es in den Gewebeschnitten zu einer deutlichen Fluoreszenz von NITEGE-Fragmenten. Passend zu den Einflüssen auf die GAG-Freisetzung ließen sich diese Signale unter Ko-Inkubation mit TIMP-3 deutlich reduzieren. In weiteren Untersuchungen wäre es sinnvoll, neben der Anfärbung Aggrekanase-spezifischer Spaltfragmente auch eine Darstellung MMP-spezifischer Spaltfragmente vorzunehmen, da sich durch die durchgeführten Untersuchungen auf immunhistochemischer Ebene zwar eine aktive Rolle der Aggrekanasen dokumentieren ließ, die Beteiligung von MMPs jedoch nicht spezifisch beurteilt werden konnte. Aus der Literatur gehen zu diesem Thema verschiedene Befunde hervor. Zum Teil wurde postuliert, dass die TNF- α - und IL-1-induzierte GAG-Freisetzung aus Knorpelzellkulturen mit der Produktion aggrekanase-generierter, nicht jedoch MMP-generierter Aggrekanfragmente korreliere [116]. Im primären Widerspruch zu diesen Daten und den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden stehen andere Untersuchungsergebnisse, die im Rahmen einer Studie mit IL-1-induziertem GAG-Abbau bei Menisken von jungen Kälbern durch Einsatz eines MMP-Inhibitors, nicht aber unter Einsatz eines ADAMTS-4/ADAMTS-5-Inhibitors eine Reduktion der GAG-Freisetzung aus dem Gewebe zeigten [188]. Bei dieser Studie betrug die Inkubationszeit allerdings zwölf Tage, so dass möglicherweise ein (in der vorliegenden Arbeit mit dreitägiger Inkubationszeit nicht erfassbarer) später eintretender und absolut stärkerer Effekt durch MMPs auf die GAG-Freisetzung beobachtet wurde. Von derselben Arbeitsgruppe wurde nachfolgend in Bezug auf bovinen Gelenkknorpelgewebe gezeigt, dass der diesbezügliche IL-1-induzierte Aggrekanmetabolismus sowohl durch Aggrekanase- sowie MMP- als auch durch nicht-spezifische Enzyminhibitoren verzögert (allerdings nicht komplett gehemmt) werden konnte [189]. Dies spricht für eine effektive Beteiligung von Aggrekanasen

und MMPs sowie eventuell weiteren katabolen Enzymen beim Aggrekanmetabolismus von Knorpelgewebe.

Zur Frage, welche der Aggrekanasen genau für den in der frühen Phase des zytokininduzierten Metabolismus an bovinem Meniskusgewebe beobachteten Aggrekanabbau hauptverantwortlich zeichnen, konnte in der vorliegenden Arbeit kein eindeutiger Beweis geliefert werden. Die Befunde der mRNA-Expression sprechen in erster Linie für eine gesteigerte Aktivität von ADAMTS-4. Dass ADAMTS-5 nur in einem Teil der Proben detektierbar war, könnte für eine untergeordnete Rolle dieses Enzyms sprechen. Allerdings konnten durch die mRNA-Messungen keine protranskriptionalen Einflüsse von TNF- α und IL-1 erfasst werden, so dass die alleinige Betrachtung der mRNA-Daten nur einen Teilaспект zur Beurteilung der Enzymaktivität von ADAMTS-4 bzw. -5 liefern konnte. Durch die immunhistochemischen Untersuchungen konnte keine weitere Differenzierung zwischen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 vorgenommen werden, da sowohl ADAMTS-4 als auch ADAMTS-5 in der Lage sind, NITEGE-Spaltfragmente zu erzeugen [186]. In der Literatur lassen sich zu der Fragestellung der Aktivität von ADAMTS-4 bzw. -5 in erster Linie Daten zu Knorpelgewebe finden. So liegen beispielsweise diverse Studien mit Knockout-Mausmodellen zu diesen Enzymen vor. In einer Arbeit konnte bei ADAMTS-4-Knockout-Mäusen kein gehemmter Effekt in Bezug auf Fortschreiten einer chirurgisch induzierten OA, GAG-Freisetzung nach Zytokinstimulation und NITEGE-Freisetzung beobachtet werden [190]. Ein weiteres Modell zeigte bei Tieren, bei denen ADAMTS-4 und -5 ausgeknockt waren, im Vergleich zu Wildtypmäusen histologisch ein wesentliche geringere Ausprägung von OA nach chirurgisch induzierter Gelenkinstabilität [191]. Auch die GAG-Freisetzung und die Nachweisbarkeit von NITEGE-Fragmenten nach Zytokinstimulation von Knorpelgewebe dieser Tiere waren bei den Knockoutmäusen deutlich reduziert. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich GAG-Freisetzung und NITEGE-Fragmenten brachten Untersuchungen mit Knockout-Mäusen, denen lediglich das ADAMTS-5-Gen fehlte. Bei einer weiteren Untersuchung zeigten sich bei ADAMTS-4-, ADAMTS-5- und ADAMTS-4+5-defizienten Tieren in der genannten Reihenfolge zunehmende protektive Effekte in Bezug auf den Aggrekanverlust gegenüber Wildtypmäusen [192].

In der Zusammenschau fehlen in der Literatur ausreichende Daten, um die Befunde der vorliegenden Arbeit zur Differenzierung der Aggrekanaseaktivität in Bezug auf

bovines Meniskusgewebe umfassend einordnen zu können. Die bisher veröffentlichten Daten sprechen für eine spezies- und gewebeabhängig unterschiedliche Bedeutung von ADAMTS-4 und ADAMTS-5 am Proteoglykanabbau. Im Rahmen von Versuchen an Mäusen und Gelenkknorpelgewebe scheint ADAMTS-5 dabei die größere Rolle im Vergleich zu ADAMTS-4 zu spielen, während die Befunde der vorliegenden Arbeit mit Meniskusgewebe von Rindern in erster Linie eine gesteigerte Aktivität von ADAMTS-4 abbilden konnten. Weitere Knockout-Mausmodelle mit spezieller Betrachtung von Meniskusgewebe und adäquate Untersuchungen an menschlichem Meniskusgewebe sollten in Zukunft bezüglich der Differenzierung zwischen ADAMTS-4- und ADAMTS-5-Aktivität folgen.

Zur weiteren Beurteilung der Rolle von MMP-3 wurde in dieser Arbeit der indirekt qualitative Nachweis von MMP-3 bzw. seiner inaktiven Pro-Form im Kulturüberstand mittels Caseingelzymografie geführt. Hierbei zeigten sich unter Einfluss von TNF- α bzw. IL-1 deutliche Signale für (pro-)MMP-3. Um zu differenzieren, ob es sich dabei um die aktive oder inaktive Form von MMP-3 handelte, wurden zusätzliche Untersuchungen mit dem Enzymaktivator APMA durchgeführt. Hierdurch kam es zu einem singulären Signal für das Vorliegen der aktiven Form von MMP-3. Im Rückschluss konnte somit gezeigt werden, dass MMP-3 in den Kulturüberständen zu großem Maße in der inaktiven Pro-Form vorlag. Diese Befunde könnten dafür sprechen, dass MMP-3 im Gegensatz zu den Aggrekanasen eine relativ untergeordnete Bedeutung beim durch TNF- α und IL-1 induzierten frühen Proteoglykanabbau am bovinen Meniskusgewebe hat.

In der Zusammenschau können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in der Form gewertet werden, dass Aggrekanasen (insbesondere ADAMTS-4) eine wichtige Rolle beim frühen Proteoglykanabbau am bovinen Meniskusgewebe spielen, wohingegen MMPs zu diesem Zeitpunkt eine untergeordnete Rolle einzunehmen scheinen. Spezifischere Untersuchungen zur MMP-Aktivität bei Patho- und Salutogenese von Meniskusgewebe, auch hinsichtlich des Metabolismus der kollagenen Matrixproteine, sollten allerdings folgen. Denn in In-vitro-Modellen konnte bereits gezeigt werden, dass MMPs zum Teil für die Hemmung von Reparaturmechanismen an Meniskusgewebe von Schweinen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich zeichnen [193].

4.2.3 Zusammenhang zwischen TNF- α - bzw. IL-1-induziertem Proteoglykanabbau und induzierter NO-Freisetzung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 neben einer Steigerung der GAG-Freisetzung auch zu einer erhöhten Freisetzung von NO aus Meniskusgewebe von Rindern führen. Da die Rolle des NO beim zytokininduzierten Proteoglykanabbau in der Literatur nicht eindeutig geklärt ist, wurden in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen Proteoglykanmetabolismus und NO-Freisetzung auf verschiedenen Ebenen mit Hilfe des NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA untersucht.

Während durch L-NMMA die TNF- α bzw. IL-1-induzierte NO-Freisetzung komplett unterdrückt werden konnte, kam es zu keiner signifikanten Veränderung der GAG-Freisetzung unter NO-Synthase-Hemmung. Diese Befunde sprechen dafür, dass die durch TNF- α und IL-1 bewirkte Erhöhung der GAG-Freisetzung aus bovinem Meniskusgewebe nicht unmittelbar NO-abhängig ist. Auch auf immunhistochemischer Ebene konnte keine Verbindung zwischen NO-Produktion und der Spaltung von Aggrecan gefunden werden. Durch Zugabe von L-NMMA war keine Reduktion der durch TNF- α bzw. IL-1 bewirkten Fluoreszenzsteigerung von NITEGE-Fragmenten im Gewebe festzustellen. Auch in Bezug auf die zytokininduzierte Produktion von (pro)-MMP-3 konnte im Rahmen der zymografischen Analysen kein eindeutiger Effekt durch NO-Synthase-Hemmung beobachtet werden. Unbeantwortet bleibt die Frage, ob sich im Rahmen eines verlängerten Versuchszeitrahmens NO-abhängige Apoptosezeichen am Meniskusgewebe einstellen würden (s. auch **Kap. 4.2.1**).

Vor dem Hintergrund der in der Literatur uneinheitlichen Angaben über die Beteiligung von NO am zytokinabhängigen Metabolismus von Meniskusgewebe ist es in der Zusammenschau nicht möglich einheitliche Schlussfolgerungen über die Rolle von NO als potentiellem Mediator im Rahmen der Meniskusdegeneration zu treffen. Obwohl NO in verschiedenen Studien als ein wichtiger Mediator der Zerstörung von Meniskusgewebe angesehen wird [74; 156; 157; 159-162; 171; 194], sprechen die in dieser Arbeit ermittelten Daten dafür, dass NO kein entscheidend fördernder Mediator des durch die Zytokine TNF- α und IL-1 bewirkten Proteoglykanabbaus im Rahmen der frühen Meniskusdegeneration darstellt. Da im Rahmen der Untersuchungen zur GAG-Freisetzung unter NO-Synthase-Hemmung eine tendenzielle Erhöhung der GAG-Werte beobachtet werden konnte, sollte in zukünftigen Analysen im Detail auch der Frage nachgegangen werden, ob NO unter

Einfluss von Zytokinen ein protektiven Einfluss vor übersteigertem Katabolismus haben könnte. Neuere Studien anderer Arbeitsgruppen weisen ebenfalls auf eine möglicherweise auch protektive Funktion des NO hin [195]. Daher sollten zukünftig weitere Studien in Bezug auf die Wirkungen von NO am Meniskusgewebe, z.B. anhand der Einflüsse einer NO-Synthase-Hemmung auf die Genexpression von katabolen sowie anabolen Enzymen, folgen.

4.3 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit generierten Daten konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-1 zu einem verstärkten Abbau von Proteoglykanen am Meniskusgewebe von Rindern führen. Aggrekanasen (insbesondere ADAMTS-4) scheinen dabei eine tragende Rolle zu spielen, während Matrixmetalloproteininasen in der frühen Phase der entzündlichen Prozesse in untergeordneter Rolle beteiligt zu sein scheinen. In zukünftigen Studien sollte die Beteiligung der Aggrekanasen bzw. MMPs über einen verlängerten Versuchszeitrahmen hin beobachtet werden. Mit Fokus auf die Hemmung der Enzymaktivität insbesondere von Aggrekanasen aber auch auf die inhibitorischen Einflüsse auf die Aktivierung von inaktiven Formen proinflammatorischer Zytokine (TNF- α) stellt sich TIMP-3 als wichtiger und weiter zu untersuchender Faktor dar. Weiterhin wird die komplexe Rolle von NO als vermehrt produziertem Mediator im Rahmen der entzündlichen Prozesse Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwar die Effekte von IL-1 und TNF- α auf Meniskusgewebe isoliert voneinander untersucht und dabei prinzipiell einheitliche Veränderungen am Meniskusgewebe beobachtet, es erfolgte jedoch keine Untersuchung darüber, ob es eine direkte Koppelung der Signalwege und somit eine Abhängigkeit der Wirkungen untereinander gibt. Erste Studien zu diesem Thema deuten darauf hin, dass die TNF- α -induzierte Degeneration von Knorpelgewebe IL-1-vermittelt sein könnte [196].

Grundsätzlich konnte durch das Versuchsmodell an Rindermenisken nur eine Simulation der Effekte an menschlichem Gewebe unternommen werden. Daher sollen in zukünftigen Analysen entsprechende Versuche auch an humanem Gewebe durchgeführt werden um sich unter In-vitro-Bedingungen den physiologischen

Konditionen *in vivo* in Hinblick auf die Beurteilung der pathophysiologischen Prozesse von Erkrankungen wie OA und RA möglichst dicht annähern zu können.

Für die therapeutischen Ansätze mit Biologicals wird in Zukunft neben den schon in der Praxis angewendeten Antikörpern gegen TNF- α und IL-1 auch die spezifische Hemmung von MMPs und Aggrekanasen Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Forschung sein. Bisherige klinische Studien beispielsweise mit MMP-Inhibitoren verliefen jedoch mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen [197].

Weitere Versuche zur Verbindung von TNF- α - und IL-1-abhängigen Stoffwechsel am Meniskus- und Knorpelgewebe sowie zum grundlegenden Verständnis der spezifischen Einflüsse von Aggrekanasen und MMPs auf diese Gewebe werden also vonnöten sein, um bei der Frage nach noch spezifischeren Therapiekonzepten für die Prävention und Behandlung degenerativer und entzündlicher Gelenkerkrankungen wie Osteoarrose und Rheumatoide Arthritis weiteren wissenschaftlichen Fortschritt zu erzielen.

5 Zusammenfassung

Degenerative und entzündliche Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrose und Rheumatoide Arthritis spielen in der Gesellschaft gerade auch vor dem Hintergrund der demografischen Entwicklung eine immer größere Rolle. Das Knie mit den für seine biomechanische Funktionalität wichtigen Menisken ist ein häufig von diesen Erkrankungen betroffenes Gelenk. Dabei ist bekannt, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α wichtige Mediatoren im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem In-vitro-Modell mit dreitägiger Inkubationszeit gezeigt werden, dass IL-1 und TNF- α zu einem verstärkten Metabolismus von Proteoglykanen am Meniskusgewebe von Rindern führen. Sie führten dosis- und zeitabhängig zu einer gesteigerten Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe. Des Weiteren konnte unter Einfluss der Zytokine eine vermehrte Spaltung von Aggrekan (NITEGE-Spaltfragmente) und eine gesteigerte Expression kataboler Enzyme (ADAMTS-4 sowie MMP-1, -2, -3 und -13) beobachtet werden.

Durch Versuche mit Enzyminhibitoren (TIMPs) konnte gezeigt werden, dass Aggrekanasen (insbesondere ADAMTS-4) im Rahmen des Versuchszeitrahmens eine wichtige Rolle beim Proteoglykanabbau spielen. Durch zymografische Analysen konnte zudem Anhalt dafür gefunden werden, dass die in den Expressionsanalysen am stärksten heraufregulierte Matrixmetalloproteinase MMP-3 zunächst in erster Linie in ihrer biologisch inaktiven Pro-Form vorliegt und daher zu diesem Zeitpunkt der entzündlichen Prozesse am Meniskusgewebe eine untergeordnete Rolle spielen könnte.

Neben dem gesteigerten Proteoglykanmetabolismus konnte unter Einfluss von TNF- α und IL-1 ebenfalls eine regelhaft gesteigerte Freisetzung von Stickoxid (NO) erfasst werden. Durch Versuche mit einem NO-Synthase-Inhibitor (L-NMMA) konnte für den vorliegenden Versuchszeitrahmen von drei Tagen keine unmittelbare Abhängigkeit des Proteoglykanmetabolismus von der NO-Freisetzung detektiert werden. Sowohl die zytokininduziert gesteigerte GAG-Freisetzung als auch die gesteigerte Spaltung von Aggrekan blieb unter gehemmter NO-Produktion erhöht.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte zusammenfassend also bestätigt werden, dass TNF- α und IL-1 vergleichbar zu Forschungsergebnissen an Gelenkknorpelgewebe in wesentlichem Maße an der Induktion des Proteoglykanmetabolismus an Meniskusgewebe von Rindern beteiligt sind. Dabei scheint der gesteigerte Abbau von Proteoglykanen in der simulierten frühen entzündlichen Phase in erster Linie durch Aggrekanasen (ADAMTS-4) bewerkstelligt zu werden und von der ebenfalls gesteigerten NO-Freisetzung unabhängig zu sein. TNF- α und IL-1 im Allgemeinen bzw. Aggrekanasen (ADAMTS-4) im Speziellen könnten also zukünftig weiterhin bzw. zusätzlich wichtige Angriffspunkte für die Intervention bei Erkrankungen wie Osteoarrose und Rheumatoide Arthritis darstellen. Weitere Untersuchungen an menschlichem Meniskusgewebe sollten folgen, um die pathophysiologischen Zusammenhänge von OA und RA noch detaillierter zu entschlüsseln und um so noch spezifischere Präventions- und Behandlungskonzepte entwickeln zu können.

6 Literaturverzeichnis

- [1] WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium, NetLibrary, I. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium report of a WHO scientific group, World Health Organization, Geneva, 2003.
- [2] Spector,T.D., Hart,D.J., Byrne,J., Harris,P.A., Dacre,J.E., Doyle,D.V. Definition of osteoarthritis of the knee for epidemiological studies, Ann. Rheum. Dis. 52 (1993) 790-794.
- [3] Murphy,L., Schwartz,T.A., Helmick,C.G., Renner,J.B., Tudor,G., Koch,G., Dragomir,A., Kalsbeek,W.D., Luta,G., Jordan,J.M. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis, Arthritis Rheum. 59 (2008) 1207-1213.
- [4] Leonhardt,H., Rauber,A., Kopsch,F. Anatomie des Menschen Lehrbuch und Atlas, Georg Thieme, Stuttgart, 1987.
- [5] McDevitt,C.A., Webber,R.J. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage, Clin. Orthop. Relat Res.(1990) 8-18.
- [6] Schünke,M., Schulte,E., Schumacher,U., Rude,J. Prometheus Lernatlas der Anatomie, Georg Thieme, Stuttgart, 2005.
- [7] Arnoczky,S.P., Warren,R.F. Microvasculature of the human meniscus, Am. J. Sports Med. 10 (1982) 90-95.
- [8] Fithian,D.C., Kelly,M.A., Mow,V.C. Material properties and structure-function relationships in the menisci, Clin. Orthop. Relat Res.(1990) 19-31.
- [9] Voloshin,A.S., Wosk,J. Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study, J. Biomed. Eng 5 (1983) 157-161.
- [10] Ahmed,A.M., Burke,D.L. In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints--Part I: Tibial surface of the knee, J. Biomech. Eng 105 (1983) 216-225.
- [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) 283-290.
- [12] Walker,P.S., Erkman,M.J. The role of the menisci in force transmission across the knee, Clin. Orthop. Relat Res.(1975) 184-192.
- [13] Jackson,J.P. Degenerative changes in the knee after meniscectomy, Br. Med. J. 2 (1968) 525-527.
- [14] Baratz,M.E., Fu,F.H., Mengato,R. Meniscal tears: the effect of meniscectomy and of repair on intraarticular contact areas and stress in the human knee. A preliminary report, Am. J. Sports Med. 14 (1986) 270-275.

- [15] Ghosh,P., Taylor,T.K. The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction, *Clin. Orthop. Relat Res.*(1987) 52-63.
- [16] Macconail,M.A. The Function of Intra-Articular Fibrocartilages, with Special Reference to the Knee and Inferior Radio-Ulnar Joints, *J. Anat.* 66 (1932) 210-227.
- [17] Moon,M.S., Kim,J.M., Ok,I.Y. The normal and regenerated meniscus in rabbits. Morphologic and histologic studies, *Clin. Orthop. Relat Res.*(1984) 264-269.
- [18] Ghadially,F.N., Thomas,I., Yong,N., Lalonde,J.M. Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages, *J. Anat.* 125 (1978) 499-517.
- [19] Webber,R.J., Harris,M.G., Hough,A.J., Jr. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate, *J. Orthop. Res.* 3 (1985) 36-42.
- [20] Adams,M.E., Muir,H. The glycosaminoglycans of canine menisci, *Biochem. J.* 197 (1981) 385-389.
- [21] Proctor,C.S., Schmidt,M.B., Whipple,R.R., Kelly,M.A., Mow,V.C. Material properties of the normal medial bovine meniscus, *J. Orthop. Res.* 7 (1989) 771-782.
- [22] Eyre,D.R., Wu,J.J. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus, *FEBS Lett.* 158 (1983) 265-270.
- [23] Cheung,H.S. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci, *Connect. Tissue Res.* 16 (1987) 343-356.
- [24] Wildey,G.M., Billetz,A.C., Matyas,J.R., Adams,M.E., McDevitt,C.A. Absolute concentrations of mRNA for type I and type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay, *J. Orthop. Res.* 19 (2001) 650-658.
- [25] Kambic,H.E., McDevitt,C.A. Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus, *J. Orthop. Res.* 23 (2005) 142-149.
- [26] McNicol,D., Roughley,P.J. Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus, *Biochem. J.* 185 (1980) 705-713.
- [27] Roughley,P.J., McNicol,D., Santer,V., Buckwalter,J. The presence of a cartilage-like proteoglycan in the adult human meniscus, *Biochem. J.* 197 (1981) 77-83.
- [28] Adams,M.E., Billingham,M.E., Muir,H. The glycosaminoglycans in menisci in experimental and natural osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 26 (1983) 69-76.
- [29] Valiyaveettil,M., Mort,J.S., McDevitt,C.A. 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.* 46 (2005) 83-91.
- [30] Roughley,P.J., White,R.J. The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus, *J. Orthop. Res.* 10 (1992) 631-637.
- [31] Scott,P.G., Nakano,T., Dodd,C.M. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus, *Biochim. Biophys. Acta* 1336 (1997) 254-262.
- [32] Petersen,W., Tillmann,B. Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci, *Anat. Embryol. (Berl)* 197 (1998) 317-324.
- [33] Lüllmann-Rauch,R. *Histologie*
Verstehen - Lernen - Nachschlagen, Georg Thieme, Stuttgart, 2003.
- [34] Zimny,M.L., Albright,D.J., Dabezies,E. Mechanoreceptors in the human medial meniscus, *Acta Anat. (Basel)* 133 (1988) 35-40.
- [35] Djurasovic,M., Aldridge,J.W., Grumbles,R., Rosenwasser,M.P., Howell,D., Ratcliffe,A. Knee joint immobilization decreases aggrecan gene expression in the meniscus, *Am. J. Sports Med.* 26 (1998) 460-466.
- [36] Hough,A.J., Jr., Webber,R.J. Pathology of the meniscus, *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1990) 32-40.
- [37] Herold,G. *Innere Medizin*
eine vorlesungsorientierte Darstellung
unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung
mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, Gerd Herold, Köln, 2006.
- [38] Martel-Pelletier,J., Boileau,C., Pelletier,J.P., Roughley,P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions, *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 22 (2008) 351-384.
- [39] Peterson,L.S., Mason,T., Nelson,A.M., O'Fallon,W.M., Gabriel,S.E. Juvenile rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota 1960-1993. Is the epidemiology changing?, *Arthritis Rheum.* 39 (1996) 1385-1390.
- [40] Harris,E.D., Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy, *N. Engl. J. Med.* 322 (1990) 1277-1289.
- [41] Martel-Pelletier,J., Alaaeddine,N., Pelletier,J.P. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis, *Front Biosci.* 4 (1999) D694-D703.
- [42] Fernandes,J.C., Martel-Pelletier,J., Pelletier,J.P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology, *Biorheology* 39 (2002) 237-246.
- [43] Chen,Y.F., Jobanputra,P., Barton,P., Jowett,S., Bryan,S., Clark,W., Fry-Smith,A., Burls,A. A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and

- an economic evaluation of their cost-effectiveness, *Health Technol. Assess.* 10 (2006) iii-xiii, 1.
- [44] Bresnihan,B. The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis, *Semin. Arthritis Rheum.* 30 (2001) 17-20.
- [45] Bresnihan,B., Cobdy,M. Clinical and radiological effects of anakinra in patients with rheumatoid arthritis, *Rheumatology. (Oxford)* 42 Suppl 2 (2003) ii22-ii28.
- [46] Martel-Pelletier,J. Pathophysiology of osteoarthritis, *Osteoarthritis. Cartilage.* 7 (1999) 371-373.
- [47] Carswell,E.A., Old,L.J., Kassel,R.L., Green,S., Fiore,N., Williamson,B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72 (1975) 3666-3670.
- [48] Cosman,D. A family of ligands for the TNF receptor superfamily, *Stem Cells* 12 (1994) 440-455.
- [49] Green,S., Dobrjansky,A., Carswell,E.A., Kassel,R.L., Old,L.J., Fiore,N., Schwartz,M.K. Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73 (1976) 381-385.
- [50] Deglantoni,G., Murphy,M., Kobayashi,M., Francis,M.K., Perussia,B., Trinchieri,G. Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon, *J. Exp. Med.* 162 (1985) 1512-1530.
- [51] Peters,P.M., Ortaldo,J.R., Shalaby,M.R., Svedersky,L.P., Nedwin,G.E., Bringman,T.S., Hass,P.E., Aggarwal,B.B., Herberman,R.B., Goeddel,D.V., . Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF-alpha but not TNF-beta (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes, *J. Immunol.* 137 (1986) 2592-2598.
- [52] Moss,M.L., Jin,S.L., Milla,M.E., Bickett,D.M., Burkhardt,W., Carter,H.L., Chen,W.J., Clay,W.C., Didsbury,J.R., Hassler,D., Hoffman,C.R., Kost,T.A., Lambert,M.H., Leesnitzer,M.A., McCauley,P., McGeehan,G., Mitchell,J., Moyer,M., Pahel,G., Rocque,W., Overton,L.K., Schoenen,F., Seaton,T., Su,J.L., Becherer,J.D., . Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha, *Nature* 385 (1997) 733-736.
- [53] Smith,R.A., Baglioni,C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 6951-6954.
- [54] Eck,M.J., Beutler,B., Kuo,G., Merryweather,J.P., Sprang,S.R. Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin), *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 12816-12819.

- [55] Hohmann,H.P., Remy,R., Brockhaus,M., van Loon,A.P. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha), *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 14927-14934.
- [56] Brockhaus,M., Schoenfeld,H.J., Schlaeger,E.J., Hunziker,W., Lesslauer,W., Loetscher,H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87 (1990) 3127-3131.
- [57] Peetre,C., Thysell,H., Grubb,A., Olsson,I. A tumor necrosis factor binding protein is present in human biological fluids, *Eur. J. Haematol.* 41 (1988) 414-419.
- [58] Engelmann,H., Aderka,D., Rubinstein,M., Rotman,D., Wallach,D. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11974-11980.
- [59] Nophar,Y., Kemper,O., Brakebusch,C., Englemann,H., Zwang,R., Aderka,D., Holtmann,H., Wallach,D. Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell surface and a soluble form of the receptor, *EMBO J.* 9 (1990) 3269-3278.
- [60] Dinarello,C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism, *Blood* 77 (1991) 1627-1652.
- [61] Dinarello,C.A. The biological properties of interleukin-1, *Eur. Cytokine Netw.* 5 (1994) 517-531.
- [62] Nashan,D., Luger,T.A. [Interleukin 1. 1: Basic principles and pathophysiology], *Hautarzt* 50 (1999) 680-688.
- [63] Mosley,B., Dower,S.K., Gillis,S., Cosman,D. Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and 1 beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84 (1987) 4572-4576.
- [64] Arend,W.P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family, *J. Clin. Invest* 88 (1991) 1445-1451.
- [65] Dinarello,C.A., Cannon,J.G., Wolff,S.M., Bernheim,H.A., Beutler,B., Cerami,A., Figari,I.S., Palladino,M.A., Jr., O'Connor,J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1, *J. Exp. Med.* 163 (1986) 1433-1450.
- [66] Tracey,K.J., Fong,Y., Hesse,D.G., Manogue,K.R., Lee,A.T., Kuo,G.C., Lowry,S.F., Cerami,A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia, *Nature* 330 (1987) 662-664.
- [67] Beutler,B., Milsark,I.W., Cerami,A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin, *Science* 229 (1985) 869-871.

- [68] Schlaak,J.F., Pfers,I., Meyer Zum Buschenfelde,K.H., Marker-Hermann,E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies, *Clin. Exp. Rheumatol.* 14 (1996) 155-162.
- [69] Westacott,C.I., Whicher,J.T., Barnes,I.C., Thompson,D., Swan,A.J., Dieppe,P.A. Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 49 (1990) 676-681.
- [70] Chu,C.Q., Field,M., Feldmann,M., Maini,R.N. Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 34 (1991) 1125-1132.
- [71] Keffer,J., Probert,L., Cazlaris,H., Georgopoulos,S., Kaslaris,E., Kioussis,D., Kollias,G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis, *EMBO J.* 10 (1991) 4025-4031.
- [72] Bertolini,D.R., Nedwin,G.E., Bringman,T.S., Smith,D.D., Mundy,G.R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors, *Nature* 319 (1986) 516-518.
- [73] Saklatvala,J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage, *Nature* 322 (1986) 547-549.
- [74] LeGrand,A., Fermor,B., Fink,C., Pisetsky,D.S., Weinberg,J.B., Vail,T.P., Guilak,F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 2078-2083.
- [75] Lotz,M., Hashimoto,S., Kuhn,K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis, *Osteoarthritis. Cartilage.* 7 (1999) 389-391.
- [76] Fermor,B., Jeffcoat,D., Hennerbichler,A., Pisetsky,D.S., Weinberg,J.B., Guilak,F. The effects of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus, *Osteoarthritis. Cartilage.* 12 (2004) 956-962.
- [77] Hennerbichler,A., Moutos,F.T., Hennerbichler,D., Weinberg,J.B., Guilak,F. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha inhibit repair of the porcine meniscus in vitro, *Osteoarthritis. Cartilage.* (2007).
- [78] McNulty,A.L., Moutos,F.T., Weinberg,J.B., Guilak,F. Enhanced integrative repair of the porcine meniscus in vitro by inhibition of interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 3033-3042.
- [79] Nagase,H., Fields,G.B. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides, *Biopolymers* 40 (1996) 399-416.
- [80] Nagase,H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *Biol. Chem.* 378 (1997) 151-160.

- [81] Nagase,H., Visse,R., Murphy,G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs, *Cardiovasc. Res.* 69 (2006) 562-573.
- [82] Okada,Y., Shinmei,M., Tanaka,O., Naka,K., Kimura,A., Nakanishi,I., Bayliss,M.T., Iwata,K., Nagase,H. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium, *Lab Invest* 66 (1992) 680-690.
- [83] Dreier,R., Wallace,S., Fuchs,S., Bruckner,P., Grassel,S. Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9), *J. Cell Sci.* 114 (2001) 3813-3822.
- [84] Benbow,U., Brinckerhoff,C.E. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?, *Matrix Biol.* 15 (1997) 519-526.
- [85] Nagase,H., Woessner,J.F., Jr. Matrix metalloproteinases, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21491-21494.
- [86] Baker,A.H., Edwards,D.R., Murphy,G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 3719-3727.
- [87] Visse,R., Nagase,H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ. Res.* 92 (2003) 827-839.
- [88] Murphy,G., Lee,M.H. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage?, *Ann. Rheum. Dis.* 64 Suppl 4 (2005) iv44-iv47.
- [89] Murphy,G., Knauper,V., Atkinson,S., Butler,G., English,W., Hutton,M., Stracke,J., Clark,I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease, *Arthritis Res.* 4 Suppl 3 (2002) S39-S49.
- [90] Somerville,R.P., Oblander,S.A., Apte,S.S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks, *Genome Biol.* 4 (2003) 216.
- [91] Cawston,T.E., Wilson,A.J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease, *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20 (2006) 983-1002.
- [92] Murphy,G., Nagase,H. Progress in matrix metalloproteinase research, *Mol. Aspects Med.* 29 (2008) 290-308.
- [93] Dean,D.D., Martel-Pelletier,J., Pelletier,J.P., Howell,D.S., Woessner,J.F., Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage, *J. Clin. Invest* 84 (1999) 678-685.
- [94] Brinckerhoff,C.E., Rutter,J.L., Benbow,U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 4823-4830.

- [95] Elkington,P.T., O'Kane,C.M., Friedland,J.S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease, *Clin. Exp. Immunol.* 142 (2005) 12-20.
- [96] Lohmander,L.S., Hoerrner,L.A., Lark,M.W. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 36 (1993) 181-189.
- [97] Sasaki,S., Iwata,H., Ishiguro,N., Obata,K., Miura,T. Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Clin. Rheumatol.* 13 (1994) 228-233.
- [98] Walakovits,L.A., Moore,V.L., Bhardwaj,N., Gallick,G.S., Lark,M.W. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury, *Arthritis Rheum.* 35 (1992) 35-42.
- [99] Ribbens,C., Andre,B., Jaspar,J.M., Kaye,O., Kaiser,M.J., De,G.D., Malaise,M.G. Matrix metalloproteinase-3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis, *J. Rheumatol.* 27 (2000) 888-893.
- [100] Tchetina,E.V., Squires,G., Poole,A.R. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions, *J. Rheumatol.* 32 (2005) 876-886.
- [101] Bluteau,G., Conrozier,T., Mathieu,P., Vignon,E., Herbage,D., Mallein-Gerin,F. Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis, *Biochim. Biophys. Acta* 1526 (2001) 147-158.
- [102] Robertson,C.M., Pennock,A.T., Harwood,F.L., Pomerleau,A.C., Allen,R.T., Amiel,D. Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits, *Osteoarthritis. Cartilage.* 14 (2006) 471-476.
- [103] van Meurs,J.B., van Lent,P.L., van de Loo,A.A., Holthuysen,A.E., Bayne,E.K., Singer,I.I., van den Berg,W.B. Increased vulnerability of postarthritic cartilage to a second arthritic insult: accelerated MMP activity in a flare up of arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 58 (1999) 350-356.
- [104] 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* 1094 (1991) 8-18.
- [105] Chu,S.C., Yang,S.F., Lue,K.H., Hsieh,Y.S., Wu,C.L., Lu,K.H. Regulation of gelatinases expression by cytokines, endotoxin, and pharmacological agents in the human osteoarthritic knee, *Connect. Tissue Res.* 45 (2004) 142-150.

- [106] Porter,S., Clark,I.M., Kevorkian,L., Edwards,D.R. The ADAMTS metalloproteinases, *Biochem. J.* 386 (2005) 15-27.
- [107] Seals,D.F., Courtneidge,S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.* 17 (2003) 7-30.
- [108] White,J.M. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 598-606.
- [109] Gao,G., Westling,J., Thompson,V.P., Howell,T.D., Gottschall,P.E., Sandy,J.D. Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11034-11041.
- [110] Nagase,H., Kashiwagi,M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation, *Arthritis Res. Ther.* 5 (2003) 94-103.
- [111] Tortorella,M.D., Malfait,A.M. Will the real aggrecanase(s) step up: evaluating the criteria that define aggrecanase activity in osteoarthritis, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9 (2008) 16-23.
- [112] Tortorella,M.D., Burn,T.C., Pratta,M.A., Abbaszade,I., Hollis,J.M., Liu,R., Rosenfeld,S.A., Copeland,R.A., Decicco,C.P., Wynn,R., Rockwell,A., Yang,F., Duke,J.L., Solomon,K., George,H., Bruckner,R., Nagase,H., Itoh,Y., Ellis,D.M., Ross,H., Wiswall,B.H., Murphy,K., Hillman,M.C., Jr., Hollis,G.F., Newton,R.C., Magolda,R.L., Trzaskos,J.M., Arner,E.C. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins, *Science* 284 (1999) 1664-1666.
- [113] Tortorella,M.D., Pratta,M., Liu,R.Q., Austin,J., Ross,O.H., Abbaszade,I., Burn,T., Arner,E. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 18566-18573.
- [114] Sandy,J.D., Neame,P.J., Boynton,R.E., Flannery,C.R. Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 8683-8685.
- [115] Arner,E.C., Pratta,M.A., Decicco,C.P., Xue,C.B., Newton,R.C., Trzaskos,J.M., Magolda,R.L., Tortorella,M.D. Aggrecanase. A target for the design of inhibitors of cartilage degradation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878 (1999) 92-107.
- [116] Tortorella,M.D., Malfait,A.M., Deccico,C., Arner,E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation, *Osteoarthritis. Cartilage.* 9 (2001) 539-552.
- [117] Malfait,A.M., Liu,R.Q., Ijiri,K., Komiya,S., Tortorella,M.D. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22201-22208.
- [118] Tortorella,M.D., Liu,R.Q., Burn,T., Newton,R.C., Arner,E. Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4), *Matrix Biol.* 21 (2002) 499-511.

- [119] Yamanishi,Y., Boyle,D.L., Clark,M., Maki,R.A., Tortorella,M.D., Arner,E.C., Firestein,G.S. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta, *J. Immunol.* 168 (2002) 1405-1412.
- [120] Naito,S., Shiomi,T., Okada,A., Kimura,T., Chijiwa,M., Fujita,Y., Yatabe,T., Komiya,K., Enomoto,H., Fujikawa,K., Okada,Y. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage, *Pathol. Int.* 57 (2007) 703-711.
- [121] Caterson,B., Flannery,C.R., Hughes,C.E., Little,C.B. Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism, *Matrix Biol.* 19 (2000) 333-344.
- [122] Little,C.B., Hughes,C.E., Curtis,C.L., Jones,S.A., Caterson,B., Flannery,C.R. Cyclosporin A inhibition of aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage, *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 124-129.
- [123] Patwari,P., Gao,G., Lee,J.H., Grodzinsky,A.J., Sandy,J.D. Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolysis in interleukin-1-treated bovine cartilage, *Osteoarthritis. Cartilage.* 13 (2005) 269-277.
- [124] Flannery,C.R., Little,C.B., Hughes,C.E., Caterson,B. Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (1999) 318-322.
- [125] Pratta,M.A., Scherle,P.A., Yang,G., Liu,R.Q., Newton,R.C. Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein, *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 119-133.
- [126] Pattoli,M.A., MacMaster,J.F., Gregor,K.R., Burke,J.R. Collagen and aggrecan degradation is blocked in interleukin-1-treated cartilage explants by an inhibitor of IkappaB kinase through suppression of metalloproteinase expression, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 (2005) 382-388.
- [127] Blenis,J., Hawkes,S.P. Transformation-sensitive protein associated with the cell substratum of chicken embryo fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80 (1983) 770-774.
- [128] Docherty,A.J., Lyons,A., Smith,B.J., Wright,E.M., Stephens,P.E., Harris,T.J., Murphy,G., Reynolds,J.J. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity, *Nature* 318 (1985) 66-69.
- [129] Stetler-Stevenson,W.G., Krutzsch,H.C., Liotta,L.A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 17374-17378.
- [130] Silbiger,S.M., Jacobsen,V.L., Cupples,R.L., Koski,R.A. Cloning of cDNAs encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family, *Gene* 141 (1994) 293-297.

- [131] Greene,J., Wang,M., Liu,Y.E., Raymond,L.A., Rosen,C., Shi,Y.E. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 30375-30380.
- [132] Brew,K., Dinakarpandian,D., Nagase,H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim. Biophys. Acta* 1477 (2000) 267-283.
- [133] Amour,A., Slocombe,P.M., Webster,A., Butler,M., Knight,C.G., Smith,B.J., Stephens,P.E., Shelley,C., Hutton,M., Knauper,V., Docherty,A.J., Murphy,G. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3, *FEBS Lett.* 435 (1998) 39-44.
- [134] Amour,A., Knight,C.G., Webster,A., Slocombe,P.M., Stephens,P.E., Knauper,V., Docherty,A.J., Murphy,G. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3, *FEBS Lett.* 473 (2000) 275-279.
- [135] Staskus,P.W., Masiarz,F.R., Pallanck,L.J., Hawkes,S.P. The 21-kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 449-454.
- [136] Yang,T.T., Hawkes,S.P. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 (1992) 10676-10680.
- [137] Pavloff,N., Staskus,P.W., Kishnani,N.S., Hawkes,S.P. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 17321-17326.
- [138] Leco,K.J., Khokha,R., Pavloff,N., Hawkes,S.P., Edwards,D.R. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9352-9360.
- [139] Gendron,C., Kashiwagi,M., Hughes,C., Caterson,B., Nagase,H. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors, *FEBS Lett.* 555 (2003) 431-436.
- [140] 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.* 276 (2001) 12501-12504.
- [141] Furchtgott,R.F., Zawadzki,J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288 (1980) 373-376.
- [142] Palmer,R.M., Ferrige,A.G., Moncada,S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* 327 (1987) 524-526.

- [143] Ignarro,L.J., Buga,G.M., Wood,K.S., Byrns,R.E., Chaudhuri,G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84 (1987) 9265-9269.
- [144] Grabowski,P.S., Macpherson,H., Ralston,S.H. Nitric oxide production in cells derived from the human joint, *Br. J. Rheumatol.* 35 (1996) 207-212.
- [145] Marletta,M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis, *Cell* 78 (1994) 927-930.
- [146] Sasaki,K., Hattori,T., Fujisawa,T., Takahashi,K., Inoue,H., Takigawa,M. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes, *J. Biochem. (Tokyo)* 123 (1998) 431-439.
- [147] Garcia,X., Stein,F. Nitric oxide, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 17 (2006) 55-57.
- [148] Clancy,R.M., Amin,A.R., Abramson,S.B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity, *Arthritis Rheum.* 41 (1998) 1141-1151.
- [149] Stamler,J.S., Singel,D.J., Loscalzo,J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science* 258 (1992) 1898-1902.
- [150] Feelisch,M. The chemical biology of nitric oxide--an outsider's reflections about its role in osteoarthritis, *Osteoarthritis. Cartilage.* 16 Suppl 2 (2008) S3-S13.
- [151] Lundberg,J.O., Weitzberg,E., Gladwin,M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 7 (2008) 156-167.
- [152] Farrell,A.J., Blake,D.R., Palmer,R.M., Moncada,S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases, *Ann. Rheum. Dis.* 51 (1992) 1219-1222.
- [153] Sakurai,H., Kohsaka,H., Liu,M.F., Higashiyama,H., Hirata,Y., Kanno,K., Saito,I., Miyasaka,N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides, *J. Clin. Invest* 96 (1995) 2357-2363.
- [154] Karan,A., Karan,M.A., Vural,P., Erten,N., Tascioglu,C., Aksoy,C., Canbaz,M., Oncel,A. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis, *Clin. Rheumatol.* 22 (2003) 397-399.
- [155] Weinberg,J.B., Lang,T., Wilkinson,W.E., Pisetsky,D.S., St Clair,E.W. Serum, urinary, and salivary nitric oxide in rheumatoid arthritis: complexities of interpreting nitric oxide measures, *Arthritis Res. Ther.* 8 (2006) R140.
- [156] Hashimoto,S., Takahashi,K., Ochs,R.L., Coutts,R.D., Amiel,D., Lotz,M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 42 (1999) 2123-2131.

- [157] Kobayashi,K., Mishima,H., Hashimoto,S., Goomer,R.S., Harwood,F.L., Lotz,M., Moriya,H., Amiel,D. Chondrocyte apoptosis and regional differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy, *J. Orthop. Res.* 19 (2001) 802-808.
- [158] Fink,C., Fermor,B., Weinberg,J.B., Pisetsky,D.S., Misukonis,M.A., Guilak,F. The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus, *Osteoarthritis. Cartilage.* 9 (2001) 481-487.
- [159] Fermor,B., Weinberg,J.B., Pisetsky,D.S., Misukonis,M.A., Banes,A.J., Guilak,F. The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants, *J. Orthop. Res.* 19 (2001) 729-737.
- [160] Shin,S.J., Fermor,B., Weinberg,J.B., Pisetsky,D.S., Guilak,F. Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide, *J. Appl. Physiol* 95 (2003) 308-313.
- [161] Gupta,T., Zielinska,B., McHenry,J., Kadmiel,M., Haut Donahue,T.L. IL-1 and iNOS gene expression and NO synthesis in the superior region of meniscal explants are dependent on the magnitude of compressive strains, *Osteoarthritis. Cartilage.* 16 (2008) 1213-1219.
- [162] Cao,M., Stefanovic-Racic,M., Georgescu,H.I., Miller,L.A., Evans,C.H. Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine, *J. Orthop. Res.* 16 (1998) 104-111.
- [163] Rees,D.D., Palmer,R.M., Hodson,H.F., Moncada,S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation, *Br. J. Pharmacol.* 96 (1989) 418-424.
- [164] Olken,N.M., Marletta,M.A. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase, *Biochemistry* 32 (1993) 9677-9685.
- [165] Hauselmann,H.J., Stefanovic-Racic,M., Michel,B.A., Evans,C.H. Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases, *J. Immunol.* 160 (1998) 1444-1448.
- [166] Amin,A.R., Di Cesare,P.E., Vyas,P., Attur,M., Tzeng,E., Billiar,T.R., Stuchin,S.A., Abramson,S.B. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 2097-2102.
- [167] Taskiran,D., Stefanovic-Racic,M., Georgescu,H., Evans,C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200 (1994) 142-148.
- [168] Stefanovic-Racic,M., Mollers,M.O., Miller,L.A., Evans,C.H. Nitric oxide and proteoglycan turnover in rabbit articular cartilage, *J. Orthop. Res.* 15 (1997) 442-449.

- [169] Badger,A.M., Cook,M.N., Swift,B.A., Newman-Tarr,T.M., 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.* 290 (1999) 587-593.
- [170] Fukuda,K., Kumano,F., Takayama,M., Saito,M., Otani,K., Tanaka,S. Zonal differences in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1, *Inflamm. Res.* 44 (1995) 434-437.
- [171] Amin,A.R., Abramson,S.B. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 10 (1998) 263-268.
- [172] Lemke,A.K. Untersuchungen zu den Pathomechanismen der Destruktion von Faserknorpelgewebe am Beispiel des Meniskus. 2006. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Kiel.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- [173] Galazka,G., Windsor,L.J., Birkedal-Hansen,H., Engler,J.A. APMA (4-aminophenylmercuric acetate) activation of stromelysin-1 involves protein interactions in addition to those with cysteine-75 in the propeptide, *Biochemistry* 35 (1996) 11221-11227.
- [174] Webber,R.J., Hough,A.J., Jr. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes II. Sulfated proteoglycan synthesis, *Biochimie* 70 (1988) 193-204.
- [175] Webber,R.J., Zitaglio,T., Hough,A.J., Jr. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response, *J. Orthop. Res.* 6 (1988) 13-23.
- [176] Nakata,K., Shino,K., Hamada,M., Mae,T., Miyama,T., Shinjo,H., Horibe,S., Tada,K., Ochi,T., Yoshikawa,H. Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering, *Clin. Orthop. Relat Res.*(2001) S208-S218.
- [177] Pratta,M.A., Yao,W., Decicco,C., Tortorella,M.D., Liu,R.Q., Copeland,R.A., Magolda,R., Newton,R.C., Trzaskos,J.M., Arner,E.C. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 45539-45545.
- [178] Pelletier,J.P., Faure,M.P., DiBattista,J.A., Wilhelm,S., Visco,D., Martel-Pelletier,J. Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study, *Am. J. Pathol.* 142 (1993) 95-105.
- [179] Yoshihara,Y., Nakamura,H., Obata,K., Yamada,H., Hayakawa,T., Fujikawa,K., Okada,Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 59 (2000) 455-461.
- [180] Sandy,J.D., Flannery,C.R., Neame,P.J., Lohmander,L.S. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain, *J. Clin. Invest.* 89 (1992) 1512-1516.

- [181] Lohmander,L.S., Neame,P.J., Sandy,J.D. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 36 (1993) 1214-1222.
- [182] Fosang,A.J., Last,K., Maciewicz,R.A. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent, *J. Clin. Invest* 98 (1996) 2292-2299.
- [183] Lark,M.W., Bayne,E.K., Flanagan,J., Harper,C.F., Hoerrner,L.A., Hutchinson,N.I., Singer,I.I., Donatelli,S.A., Weidner,J.R., Williams,H.R., Mumford,R.A., Lohmander,L.S. Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints, *J. Clin. Invest* 100 (1997) 93-106.
- [184] Hellio Le Graverand,M.P., Vignon,E., Otterness,I.G., Hart,D.A. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part II: molecular alterations, *Osteoarthritis. Cartilage.* 9 (2001) 65-72.
- [185] Blanco,F.J., Ochs,R.L., Schwarz,H., Lotz,M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 75-85.
- [186] Westling,J., Fosang,A.J., Last,K., Thompson,V.P., Tomkinson,K.N., Hebert,T., McDonagh,T., Collins-Racie,L.A., LaVallie,E.R., Morris,E.A., Sandy,J.D. ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16059-16066.
- [187] Sahebjam,S., Khokha,R., Mort,J.S. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3(-/-) mice, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 905-909.
- [188] Wilson,C.G., Zuo,F., Sandy,J.D., Levenston,M.E. Inhibition of MMPs, but not of ADAMTS-4, reduces IL-1 -stimulated fibrocartilage degradation [abstract], *Transactions of the Orthopaedic Research Society* 31 (2006).
- [189] Wilson,C.G., Palmer,A.W., Zuo,F., Eugui,E., Wilson,S., Mackenzie,R., Sandy,J.D., Levenston,M.E. Selective and non-selective metalloproteinase inhibitors reduce IL-1-induced cartilage degradation and loss of mechanical properties, *Matrix Biol.* 26 (2007) 259-268.
- [190] Glasson,S.S., Askew,R., Sheppard,B., Carito,B.A., Blanchet,T., Ma,H.L., Flannery,C.R., Kanki,K., Wang,E., Peluso,D., Yang,Z., Majumdar,M.K., Morris,E.A. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 2547-2558.
- [191] Majumdar,M.K., Askew,R., Schelling,S., Stedman,N., Blanchet,T., Hopkins,B., Morris,E.A., Glasson,S.S. Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 3670-3674.

- [192] Illic,M.Z., East,C.J., Rogerson,F.M., Fosang,A.J., Handley,C.J. Distinguishing aggrecan loss from aggrecan proteolysis in ADAMTS-4 and ADAMTS-5 single and double deficient mice, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 37420-37428.
- [193] Wilusz,R.E., Weinberg,J.B., Guilak,F., McNulty,A.L. Inhibition of integrative repair of the meniscus following acute exposure to interleukin-1 in vitro, *J. Orthop. Res.* 26 (2008) 504-512.
- [194] Murrell,G.A., Doland,M.M., Jang,D., Szabo,C., Warren,R.F., Hannafin,J.A. Nitric oxide: an important articular free radical, *J. Bone Joint Surg. Am.* 78 (1996) 265-274.
- [195] Abramson,S.B. Osteoarthritis and nitric oxide, *Osteoarthritis. Cartilage.* 16 Suppl 2 (2008) S15-S20.
- [196] Zwerina,J., Redlich,K., Polzer,K., Joosten,L., Kronke,G., Distler,J., Hess,A., Pundt,N., Pap,T., Hoffmann,O., Gasser,J., Scheinecker,C., Smolen,J.S., van den,B.W., Schett,G. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104 (2007) 11742-11747.
- [197] Burrage,P.S., Brinckerhoff,C.E. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors, *Curr. Drug Targets.* 8 (2007) 293-303.