



# **Der Einfluss von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ auf die Knorpeldestruktion durch synoviale Fibroblasten**

Untersuchungen in einem *in vitro*-Knorpeldestruktions-Assay als Modell für die  
Gelenkzerstörung bei der rheumatoiden Arthritis

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt**

**dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät**

**der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl.-Ökotroph. David Pretzel

geboren am 15. Juni 1976

in Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. S. Reißmann, Jena

2. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. R. W. Kinne, Jena

3. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. G. R. Burmester, Berlin

Datum der öffentlichen Disputation: 23.06.2008

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>III</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	
<b>IV</b>	<b>Zusammenfassung</b>	
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Die rheumatoide Arthritis</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Die Pathogenese der RA	2
1.1.2.	Die Bedeutung der SM für die Pathogenese der RA	3
1.1.3.	Die Bedeutung der SFB für die Pathogenese der RA	4
<b>1.2.</b>	<b>Aufbau des Gelenkknorpels</b>	<b>5</b>
1.2.1.	Die Chondrozyten	5
1.2.2.	Die extrazelluläre Matrix	7
1.2.2.1.	Kollagene	7
1.2.2.2.	Proteoglykane	7
1.2.2.3.	COMP	9
<b>1.3.</b>	<b>Wichtige Mediatoren der Gelenkzerstörung</b>	<b>9</b>
1.3.1.	Matrix-Metalloproteinasen	10
1.3.2.	Aggrekanasen	13
<b>1.4.</b>	<b>Pro-inflammatorische Zytokine in der Pathogenese der RA</b>	<b>14</b>
1.4.1.	TNF- $\alpha$	15
1.4.2.	IL-1 $\beta$	16
1.4.3.	Kooperation von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ bei der Gelenkdestruktion	17
<b>1.5.</b>	<b>Knorpeldestruktions-Modelle</b>	<b>18</b>
1.5.1.	<i>In vivo</i> -Knorpeldestruktions-Modelle	18
1.5.2.	<i>In vitro</i> -Knorpeldestruktions-Modelle	19
1.5.2.1.	Modelle mit <i>in vitro</i> generierten Matrices	19
1.5.2.2.	Modelle mit Knorpel	20
<b>1.6.</b>	<b>Ziele und Fragestellung</b>	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1.</b>	<b>Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmittel, Medien und Lösungen</b>	<b>24</b>
<b>2.2.</b>	<b>Patienten</b>	<b>24</b>
<b>2.3.</b>	<b>Kultur und Reinigung von SFB</b>	<b>24</b>
<b>2.4.</b>	<b>Etablierung des <i>in vitro</i>-Destruktionssystems</b>	<b>25</b>
2.4.1.	Präparation des Rinderknies	25
2.4.2.	Plattenherstellung	27
2.4.3.	Kokultur von bovinem Knorpel mit humanen SFB	27

---

2.4.4.	Stimulation mit TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$	28
2.4.5.	Fluoreszenzmarkierung der SFB	29
2.4.6.	Inaktivieren der Chondrozyten durch Schockgefrieren	29
<b>2.5.</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	29
2.5.1.	Aufbereitung der Knorpelscheiben für histologische Untersuchungen	29
2.5.2.	Histologische Färbungen	30
2.5.3.	Immunhistologische Färbungen	30
2.5.4.	Dokumentation der histologischen Präparate und Vermessung der Knorpelscheibenhöhe	31
2.5.5.	Quantifizierung des PG-Verlustes in den histologischen Schnitten	31
2.5.6.	Präparation der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie	31
2.5.7.	Präparation der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie	31
2.5.8.	Probenvorbereitung für die konfokale Laserscanningmikroskopie	32
<b>2.6.</b>	<b>mRNA-Analyse im Knorpel und den SFB</b>	32
2.6.1.	RNA-Isolierung aus kokultivierten SFB	32
2.6.2.	RNA-Isolierung aus Knorpelgewebe	33
2.6.3.	Synthese von cDNA mittels reverser Transkription	34
2.6.4.	Analyse der Genexpression mittels „real-time“ RT-PCR	34
<b>2.7.</b>	<b>GAG-Bestimmung mittels DMB-Assay</b>	36
<b>2.8.</b>	<b>Gesamt-MMP-Assay</b>	36
<b>2.9.</b>	<b>Zymografie</b>	37
2.9.1.	Gelatine- und Casein-Zymografie	37
2.9.3.	Reverse Zymografie	38
2.9.4.	<i>In situ</i> -Zymografie	38
<b>2.10.</b>	<b>Bestimmung der Proteinexpression mittels ELISA</b>	39
2.10.3.	ELISA für MMP-1, MMP-3, IL-6 und IL-8	39
2.10.4.	Bestimmung der Aggrekanase-Aktivität	40
2.10.5.	Bestimmung des COMP-Gehaltes	40
2.10.6.	Bestimmung von Kollagenfragmenten	41
<b>2.11.</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	41
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	42
<b>3.1.</b>	<b>Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpel-SFB Kokultur</b>	42
<b>3.2.</b>	<b>Einfluss von TNF-<math>\alpha</math> und IL-1<math>\beta</math> auf die Knorpeldestruktion durch SFB</b>	43
<b>3.2.1.</b>	<b>Proteoglykane</b>	43
3.2.1.1.	PG-Freisetzung aus dem Knorpel	43
3.2.1.2.	mRNA-Expression und Aktivität von Aggrekanasen	45
3.2.1.3.	Aggrekan-Neosynthese	48
3.2.1.4.	PG-Verlust in Abwesenheit vitaler Chondrozyten	49

---

<b>3.2.2.</b>	<b>COMP</b>	50
<b>3.2.3.</b>	<b>Kollagene</b>	51
3.2.3.1.	Kollagenabbau	51
3.2.3.2.	Kollagen-Neosynthese	52
<b>3.2.4.</b>	<b>MMP</b>	53
3.2.4.1.	Gesamt MMP-Aktivität	53
3.2.4.2.	<i>In situ</i> gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität	54
3.2.4.3.	MMP-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene	56
3.2.4.4.	MMP-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene	57
3.2.4.5.	MMP-3-Expression auf mRNA- und Proteinebene	59
3.2.4.6.	MMP-9-Expression auf mRNA- und Proteinebene	61
3.2.4.7.	MMP-13-Expression auf mRNA-Ebene	63
3.2.4.8.	TIMP-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene	64
<b>3.2.5.</b>	<b>Pro-inflammatorische Zytokine</b>	66
3.2.5.1.	IL-6-Expression auf mRNA- und Proteinebene	66
3.2.5.2.	IL-8-Expression auf mRNA- und Proteinebene	67
<b>3.2.6.</b>	<b>Morphologie der Destruktion</b>	69
3.2.6.1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen	69
3.2.6.2.	REM Untersuchungen	70
3.2.6.3.	TEM Untersuchungen	72
3.2.6.4.	LSM Untersuchungen	74
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	76
<b>4.1.</b>	<b>Vorteile des entwickelten <i>in vitro</i>-Knorpeldestruktions-Modells</b>	76
<b>4.2.</b>	<b>Proteoglykan</b>	77
4.2.1.	PG-Verlust	77
4.2.2.	Aggrekanasen	80
<b>4.3.</b>	<b>COMP</b>	82
<b>4.4.</b>	<b>Kollagen</b>	83
4.4.1.	Kollagenabbau	83
4.4.2.	MMP	85
4.4.2.1.	Unspezifische MMP-Nachweise	85
4.4.2.2.	Spezifische MMP-Nachweise	87
4.4.3.	TIMP-1	90
<b>4.5.</b>	<b>Matrix-Neosynthese</b>	91
4.5.1.	Aggrekan	91
4.5.2.	Kollagen	92
<b>4.6.</b>	<b>Differentieller Beitrag der SFB und der Chondrozyten zum Matrixabbau</b>	93
<b>4.7.</b>	<b>Pro-inflammatorische Zytokine IL-6 und IL-8</b>	94

4.7.1.	IL-6	94
4.7.2.	IL-8	95
<b>4.8.</b>	<b>Morphologische Destruktion</b>	95
4.8.1.	Lichtmikroskopie	95
4.8.2.	Elektronenmikroskopie	96
<b>4.9.</b>	<b>Relativer Einfluss von TNF-<math>\alpha</math> und IL-1<math>\beta</math> im <i>in vitro</i>-Destruktions-Modell</b>	98
<b>4.10.</b>	<b>Unterschiede zwischen RA- und OA-SFB</b>	99
<b>4.11.</b>	<b>Beitrag der SFB zur Knorpeldestruktion</b>	100
<b>5.</b>	<b>AUSBLICK</b>	100
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	
<b>Anhang zu Material und Methoden</b>		I-X
<b>Danksagung</b>		
<b>Lebenslauf</b>		
<b>Publikationsverzeichnis</b>		
<b>Selbständigkeitserklärung</b>		
<b>Erklärung zur Dissertation</b>		

## II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	<i>engl.</i> American College of Rheumatism
ADAM	<i>engl.</i> a disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS	<i>engl.</i> a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif
AEC	3-Amino-9 Ethylcarbazol
AK	Antikörper
AP-1	<i>engl.</i> activator protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
bidest.	zweifach destilliert
BSA	<i>engl.</i> bovine serum albumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>engl.</i> Cluster of differentiation
cDNA	<i>engl.</i> copy-DNA
CFSE	Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-Ester
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CS	Chondroitinsulfat
D10F+	Fibroblastenmedium
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4', 6- Diamidino-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DMB	Dimethylenblau
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiotreitol
EB	Probenkürzel für Orthopädische Klinik, Eisenberg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

---

ELISA	<i>engl.</i> enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>engl.</i> fluorescence-activated cell-sorting
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	(G1, G2, G3) globuläre Domäne
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GT	Gelenktrauma
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HLA	<i>engl.</i> human leukocyte antigen
HRP	<i>engl.</i> „horseradish peroxidase“
Hsp	Hitzeschockprotein
ICE	<i>engl.</i> IL-1 $\beta$ converting enzyme
IGD	Interglobuläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1-RA	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
IL-1-RAcP	<i>engl.</i> IL-1 receptor accessory protein
IL-1-RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1-RII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
KK	Kokultur
KS	Keratansulfat
LSM	konfokale Laserscanningmikroskopie
MAPK	<i>engl.</i> mitogen activated protein kinase
M $\phi$	Makrophage(n)
MHC	<i>engl.</i> major histocompatibility complex
MK	Monokultur
MMP	Matrix-Metalloproteinase(n)
mRNA	<i>engl.</i> messenger-RNA
MW	Mittelwert



---

MT-MMP	<i>engl.</i> membrane-type MMP
n	Anzahl
NFκB	<i>engl.</i> nuclear factor κB
ng	Nanogramm
OA	Osteoarthrose
OD	Optische Dichte
OF	Oberfläche
OPD	Ortho-Phenylendiamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>engl.</i> phosphate-buffered saline
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween-20
PCR	<i>engl.</i> polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PG	Proteoglykan(e)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	rheumatoide Arthritis
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SCID	<i>engl.</i> severe combined immunodeficiency
SDS	<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
SEM	<i>engl.</i> standard error of the mean
SFB	synoviale Fibroblasten
SM	Synovialmembran
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TIMP	<i>engl.</i> tissue inhibitor of matrix-metalloproteinases

TMB 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin  
TNF Tumor-Nekrose-Faktor  
TNF-R TNF-Rezeptor  
Tris Tris-hydroxymethyl-aminoethan  
TS Thrombospondin

U *engl.* units  
u. a. unter anderem  
ü. N. über Nacht

v. a. vor allem  
z. B. zum Beispiel

### III      **Abbildungsverzeichnis- und Tabellenverzeichnis**

	Seite
<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Knorpelaufbaus zur Veranschaulichung der zonalen Gliederung, der Chondrozytenarchitektur und von Matrixbesonderheiten.	6
<b>Abbildung 2:</b> Vereinfachte Darstellung eines Aggrekanaggregates (A) und des Aufbaus eines Aggrekanmonomers (B).	9
<b>Abbildung 3:</b> Domänen-Struktur der verschiedenen MMP-Gruppen.	12
<b>Abbildung 4:</b> Darstellung der Spaltstellen im Aggrekan mit den Bruchstückenden (Neopepitopen), die durch die Aktivität von Aggrekanasen und MMP entstehen.	14
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Übersicht der pathogenetisch relevanten Zellen in der RA und der aus der Interaktion der Zellen resultierenden Zytokin-Netzwerke.	15
<b>Abbildung 6:</b> Vereinfachte Darstellung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -abhängigen Signaltransduktionswege.	18
<b>Abbildung 7:</b> Anatomische Lage und Aufbau des Rinderkniegelenks.	26
<b>Abbildung 8:</b> Präparation der Knorpelstanzen aus dem bovinen Kniegelenk.	26
<b>Abbildung 9:</b> Einbettung der Knorpelstanzen und Besiedlung mit SFB.	28
<b>Abbildung 10:</b> Beispiel der cDNA-Normalisierung durch experimentelles Einstellen der Proben.	35
<b>Abbildung 11:</b> Beispiel einer Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primerpaare	36
<b>Abbildung 12:</b> Histologische Darstellung der SFB-Knorpel KK und immunhistochemische Färbungen für Thy-1 und Prolyl-4-hydroxylase als Beleg für die Vitalität und zur Zelltyp-Charakterisierung der SFB	42
<b>Abbildung 13:</b> GAG-Freisetzung in den Überstand.	44
<b>Abbildung 14:</b> Histologische Analyse des PG-Verlustes mittels Safranin-O-/Lichtgrün-Färbung der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB nach 14 d Kultur.	45
<b>Abbildung 15:</b> Aggrekanase I-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	46
<b>Abbildung 16:</b> Aggrekanase II-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	47

---

<b>Abbildung 17:</b>	Aggrecanase I- und II-Aktivität im Überstand.	48
<b>Abbildung 18:</b>	Immunhistochemische Darstellung von intaktem neugebildeten Aggrecan und histologische PG-Färbung in Knorpelproben.	49
<b>Abbildung 19:</b>	Einfluss der An- bzw. Abwesenheit vitaler Chondrozyten auf den PG-Abbau	50
<b>Abbildung 20:</b>	Immunhistologische Darstellung von humanem und bovinem COMP in der Knorpel MK und KK mit RA-SFB	51
<b>Abbildung 21:</b>	Immunhistologischer Nachweis der Kollagen II-Degradation in der Knorpel MK und der Knorpel KK mit RA-SFB.	52
<b>Abbildung 22:</b>	Kollagen II-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3).	53
<b>Abbildung 23:</b>	MMP-Gesamt-Aktivität der Kulturüberstände der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ nach 14 d Kultur	53
<b>Abbildung 24:</b>	<i>In situ</i> -zymografische Darstellung von gelatinolytischer und kollagenolytischer Aktivität im histologischen Schnittpräparat.	55
<b>Abbildung 25:</b>	MMP-1-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	56
<b>Abbildung 26:</b>	MMP-1-Proteinexpression in RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.	57
<b>Abbildung 27:</b>	MMP-2-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	58
<b>Abbildung 28:</b>	Zymografische Analyse der MMP-2-Aktivität in den Kulturüberständen der Knorpel MK (n = 5) und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ nach 14 d Kultur.	59
<b>Abbildung 29:</b>	MMP-3-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	59
<b>Abbildung 30:</b>	MMP-3-Proteinexpression in RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.	60
<b>Abbildung 31:</b>	Zymografische Analyse der Gesamt-MMP-3-Aktivität der Kulturüberstände der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ nach 14 d Kultur.	60
<b>Abbildung 32:</b>	Immunhistologische Darstellung humaner und boviner MMP-3 in Knorpel MK und KK mit RA-SFB.	61

---

<b>Abbildung 33:</b>	MMP-9-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	62
<b>Abbildung 34:</b>	Zymografische Analyse der MMP-9-Aktivität der Kulturüberstände der Knorpel MK (n = 5) und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ nach 14 d Kultur.	63
<b>Abbildung 35:</b>	Immunhistologische Darstellung humaner und boviner MMP-9 in Knorpel MK und KK mit RA-SFB.	63
<b>Abbildung 36:</b>	MMP-13-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	64
<b>Abbildung 37:</b>	TIMP-1-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	65
<b>Abbildung 38:</b>	Zymografische Analyse des TIMP-1 Gehaltes der Kulturüberstände der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ nach 14 d Kultur.	65
<b>Abbildung 39:</b>	IL-6-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	66
<b>Abbildung 40:</b>	IL-6-Proteinexpression von RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.	67
<b>Abbildung 41:</b>	IL-8-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).	68
<b>Abbildung 42:</b>	IL-8-Proteinexpression in RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.	68
<b>Abbildung 43:</b>	Invasive Destruktion des Knorpels durch RA-SFB nach 42 d KK.	69
<b>Abbildung 44:</b>	Invasives Wachstum von RA-SFB in die Knorpelmatrix von Knorpel ohne vitale Chondrozyten.	70
<b>Abbildung 45:</b>	REM Aufnahmen der Knorpel-OF und der kokultivierten RA-SFB nach einer Kulturdauer von 14 d.	71
<b>Abbildung 46:</b>	TEM-Aufnahmen der Knorpel MK und der KK Knorpel mit RA-SFB.	73
<b>Abbildung 47:</b>	LSM zur Untersuchung der Morphologie der RA-SFB und des Knorpels in einer unstimulierten KK mit RA-SFB	74

<b>Tabelle 1:</b>	Klinische Daten der Gewebespende	VIII
<b>Tabelle 2:</b>	Bedingungen und Primersequenzen für die „real-time“ RT-PCR der humanen Gene.	IX
<b>Tabelle 3:</b>	Bedingungen und Primersequenzen für die „real-time“ RT-PCR der bovinen Gene.	X
<b>Tabelle 4:</b>	Zusammenstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären AK/Isotyp-AK für immunhistochemische Darstellungen.	31
<b>Tabelle 5:</b>	K <sub>cat</sub> /k <sub>M</sub> Werte (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ) verschiedener MMP für das Substratpeptid	37
<b>Tabelle 6:</b>	AK und Standards für MMP-ELISA	39
<b>Tabelle 7:</b>	AK und Standards für IL-ELISA	40

## IV ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung mit charakteristischer Hyperplasie der Synovialmembran und Zerstörung der befallenen Gelenke.

Hierbei wird den aktivierten synovialen Fibroblasten (SFB) eine besondere pathogenetische Bedeutung zugeschrieben, da sie durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und matrixdegradierenden Enzymen maßgeblich an der Gelenkentzündung und der Knorpeldestruktion in der RA beteiligt sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die relative Bedeutung von RA-SFB und Chondrozyten bei der Knorpeldestruktion zu untersuchen. Dabei war von besonderem Interesse, welche biochemischen und zellbiologischen Prozesse zur Destruktion des meist noch nicht geschädigten Gelenkknorpels in den frühen Stadien der RA beitragen. Durch die Verwendung von kurz-kultivierten SFB, den Einsatz intakten Gelenkknorpels mit vitalen Chondrozyten und durch den Zusatz der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  /IL-1 $\beta$  zu den *in vitro*-Kulturen erreichte das hier vorgestellte Modell eine große Nähe zu den *in vivo*-Bedingungen. Es repräsentiert somit eine initiale Schädigung des intakten Gelenkknorpels in einem stark entzündeten Gelenk.

In dem Modell wurde das destruktive Potential von SFB aus Patienten mit RA bzw. mit Osteoarthritis (OA, als primär nicht-entzündliche Kontrolle) vergleichend untersucht. Dazu wurden die SFB mit vitalen bzw. avitalen bovinen Gelenkknorpelimplantaten über einen Zeitraum von 14 d bzw. 42 d unter Zusatz von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder der Kombination von TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  kokultiviert. Zur Analyse der induzierten Vorgänge wurde eine Vielzahl von Parametern des Knorpeldestruktionsprozesses im Knorpel bzw. in den SFB untersucht (Matrixabbau und -Neosynthese, matrixdegradierende Proteasen und ihre Inhibitoren, pro-inflammatorische Zytokine, morphologische Veränderungen).

Die Ergebnisse der Analyse der 14-tägigen Kokultur (KK) von SFB mit vitalem Knorpel lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1.) Bezüglich der **Matrixdegradation** konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des Knorpels mit TNF- $\alpha$ , v. a. aber mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  bereits in den Monokulturen (MK) ein massiver Abbau der Knorpel-EZM verursachte. Dies wurde durch einen massiven Proteoglykan (PG)-Verlust sowie durch die vermehrte Detektion von COMP und Kollagenabbauprodukten deutlich. Durch die KK mit SFB wurde dieser zytokinvermittelte Effekt noch einmal deutlich gesteigert. Auch wenn die stärksten Knorpelabbauprozesse in den Zytokin-stimulierten Proben der MK und KK beobachtet wurden, waren bereits unstimulierte RA-SFB konstitutiv in der Lage, die Knorpelmatrix nachweisbar zu schädigen (PG-Depletion, COMP-Nachweis und Kollagendegradation). Diese Befunde konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt werden, die auf einen massiven PG-Verlust bzw. einen beginnenden Kollagenabbau hindeuten.

2.) Neben dem Knorpelabbau stellte die durch Zytokinstimulation verursachte **Verminderung der Matrixsynthese** eine weitere Komponente der Knorpelzerstörung dar. So wurde sowohl in den MK als auch in den KK mit RA-SFB die Aggrekan-Bildung (immunhistologische Darstellung) v. a. durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  gehemmt. Der durch die verminderte

Aggrecansynthese forcierte Aggrecanverlust führt zu einer beschleunigten Demaskierung der Kollagenfasern und macht diese für einen proteolytischen Angriff zugänglich. Der dabei erfolgende Kollagenabbau kann nicht kompensiert werden, da die Kollagen II-Neosynthese (mRNA) v. a. im Knorpel der TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulierten KK mit SFB stark inhibiert wurde.

3.) Die für den Abbau der Knorpelmatrix verantwortlichen **Proteasen** und ihre Inhibitoren wurden im Knorpel und den SFB (auf mRNA- und Proteinebene) analysiert. Im Knorpel wurde v. a. durch IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  (teilweise auch durch TNF- $\alpha$ ) die mRNA-Expression von Aggrecanase I und II, MMP-1, -2, -3, -9, -13 und TIMP-1 massiv gesteigert. In den kokultivierten RA- bzw. OA-SFB erhöhte sich unter Zytokinstimulation dagegen lediglich die mRNA-Expression für MMP-1 und MMP-3. Die Proteinresultate wichen zwar z. T. von den mRNA-Resultaten ab, mit Ausnahme von MMP-2 und TIMP-1 (kein Effekt durch Stimulation) konnte jedoch für alle Proteasen sowohl in der MK als auch der KK eine deutliche Induktion durch die Stimulierung mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ermittelt werden (Analysen der Kulturüberstände bzw. immunhistologische Färbungen). Soweit parallele Untersuchungen möglich waren (Aggrecanase-Aktivität, Gesamt-MMP, *in situ*-Zymografie, MMP-2, -3, -9) zeigte sich in den meisten KK mit SFB eine deutliche und teilweise signifikante Erhöhung gegenüber den entsprechenden MK.

4.) Weiterhin wurde die mRNA-Expression der **pro-inflammatorischen Zytokine** IL-6 und IL-8 im Knorpel besonders durch IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  und in den kokultivierten SFB durch alle Zytokinstimulationen massiv induziert. Dieser Befund konnte für die SFB auch auf der Proteinebene reproduziert werden.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Chondrozyten auf die SFB-vermittelte Matrixdestruktion zeigte die avitale Knorpelmatrix bereits nach 14-tägiger KK mit RA-SFB ohne zusätzliche Stimulation einen massiven PG-Verlust. Durch zusätzliche TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation verursachten die RA-SFB sogar eine komplette PG-Depletion und erodierten den Knorpel invasiv. Da diese Effekte bei der KK mit vitalem Knorpel wesentlich schwächer waren, deuten die Ergebnisse auf protektive Mechanismen der Chondrozyten hin.

Bei der 42-tägigen Langzeit-KK mit vitalem Knorpel unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  wurde ebenfalls eine beginnende Erosion der Knorpelmatrix durch RA-SFB beobachtet – ein Befund, der das destruktive Potential von RA-SFB auch gegenüber vitalem Knorpel belegt.

Das Modell stellt insgesamt ein geeignetes Werkzeug dar, um die Wechselwirkungen zwischen SFB, Chondrozyten und der Knorpelmatrix *in vitro* zu untersuchen und die Mechanismen des *in vivo* ablaufenden Destruktionsprozesses in den betroffenen rheumatischen Gelenken besser zu verstehen. Es stellt eine wirkungsvolle Alternative zu experimentell sehr aufwendigen und tierschutzrechtlich problematischen *in vivo*-Transfer-Modellen von SFB in SCID-Mäuse dar. Zukünftige Modifikationsmöglichkeiten des Modells beinhalten den Zusatz von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren bzw. den entsprechenden Inhibitoren. Außerdem könnte durch die KK des Knorpels mit SFB und weiteren synovialen Entzündungszellen das Ziel einer kompletten *in vitro*-Rekonstitution des entzündlich-destruktiven Pannusgewebes verfolgt werden.



# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Die rheumatoide Arthritis

Das Wort „Rheuma“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „fließen/strömen“. Ursprünglich wurde das Wort benutzt, um den fließenden und ziehenden Schmerz zu beschreiben, der bei Erkrankungen des Bewegungssystems entsteht. Heute werden unter dem Begriff „Rheuma“ eine Vielzahl von Krankheitsbildern zusammengefasst. So sind nach der internationalen Klassifikation („International Classification of Diseases“, ICD) mehr als 100 Erkrankungsformen dem „rheumatischen Formenkreis“ zuzuordnen.

Generell werden degenerativ-rheumatische und entzündlich-rheumatische Krankheitsbilder unterschieden. Bei degenerativ-rheumatischen Erkrankungen, wie z. B. der Osteoarthritis (OA), führt eine Fehlsteuerung der Knorpelhomöostase zu pathologischen Veränderungen der Gelenke, wobei es im Laufe der Krankheit oft zum Auftreten sekundärer Entzündungen kommt. Bei der rheumatoiden Arthritis (RA), auch chronische Polyarthritits genannt, einer entzündlich-rheumatischen Krankheit, bestimmen die initiale Entzündung der Gelenkinnenhaut (Synovialmembran, SM), die synoviale Hyperplasie und die Zerstörung der betroffenen Gelenke das Krankheitsbild {1}.

Die RA tritt mit einer Prävalenz von ca. 1-4% in der Bevölkerung westlicher Industriestaaten auf und ist damit eine der häufigsten entzündlichen Gelenkerkrankungen {2}. Sie betrifft alle Altersgruppen, wobei die Inzidenz im 4. bis 6. Lebensjahrzehnt am höchsten ist. Die Tatsache, dass ca. dreimal mehr Frauen als Männer von der RA betroffen sind {3}, legt die Annahme eines hormonellen Einflusses auf die Entstehung der Krankheit nahe {4}, zumal bei Frauen mit RA während der Schwangerschaft durch den veränderten Hormonhaushalt die Krankheit oft milder verläuft {5}. Die Lebenserwartung der Patienten mit rheumatoider Arthritis ist im Vergleich zur Normalbevölkerung statistisch um fünf bis zehn Jahre vermindert {6}. Verantwortlich für die erhöhte Mortalität sind neben der eingeschränkten Beweglichkeit und starken Schmerzen auch Infekte, sowie Nieren-, Atemwegs- und Magen-Darm-Erkrankungen. Diese wiederum werden durch die Grundkrankheit und/oder die Folgen der notwendigen therapeutischen Interventionen verursacht.

Der Krankheitsverlauf unterteilt sich in unterschiedliche klinische Stadien, deren zeitlicher Verlauf und Schwere individuell stark abweichen können. Er kann akut oder schleichend sein und ist häufig chronisch-progredient mit teilweise ausgeprägten Krankheitsschüben {7}. In der RA ist in den meisten Fällen eine typische Abfolge des entzündlichen Befalls mehrerer Gelenke zu erkennen. Grundsätzlich können alle peripheren Gelenke betroffen sein, die am häufigsten beteiligten Gelenke sind die der Hände, der Füße und der Knie. Durch die dauerhafte und fortschreitende Entzündung der gelenknahen Gewebe kommt es oft auch zur Ausbildung einer systemischen Entzündung, u. a. durch Abgabe von pro-inflammatorischen Zytokinen aus der SM in den Blutkreislauf. Diese systemische Entzündung führt zu einer verstärkten Synthese von Akutphase-Proteinen, wie dem C-reaktiven Protein (CRP), welches seinerseits die Blutkörperchengeschwindigkeit erhöht und einen klinischen Parameter für den aktuellen systemischen Entzündungsstatus liefert. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien können auch extraartikuläre Organe betroffen sein. Die Bandbreite reicht

hier von auftretenden Rheumaknoten bis hin zu lebensbedrohlichen Vaskulitiden {8}. Von der „American Rheumatism Association“ (ARA, heute „American College of Rheumatology“) wurden die sog. ARA-Richtlinien zur einheitlichen Diagnosestellung und Abgrenzung zu anderen Krankheitsbildern des rheumatischen Formenkreises entwickelt {9}. Dazu gehören Morgensteifigkeit und Schwellungen der Gelenke, symmetrischer Befall von Gelenkregionen, Rheumaknoten, positiver Rheumafaktornachweis und radiologische Veränderungen der Gelenkzwischenräume im Bereich der Hände.

### 1.1.1. Die Pathogenese der RA

Trotz intensiver Forschung in den letzten 20 Jahren konnten die genauen pathogenetischen Ursachen der RA bis heute nicht eindeutig geklärt werden {10}. Die Ätiologie dieser systemischen Autoimmunerkrankung beruht auf einer Vielzahl genetischer und umweltbedingter Faktoren in Kombination mit einer immunologisch begründeten, dauerhaft gestörten Zytokinproduktion (sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase) im Rahmen einer immunologischen Reaktion auf ein bislang unbekanntes Antigen {11}. Verschiedene Prozesse sowohl der unspezifischen wie auch der spezifischen Immunantwort führen schließlich zum klinischen Bild der RA und potentiell zur Zerstörung von Gelenken.

Den ersten Hinweis auf eine pathologische Reaktion des Immunsystems lieferte die Entdeckung der Rheumafaktoren, Immunglobulinen, die gegen die konstante Region der körpereigenen IgG-Antikörper (AK) gerichtet sind, bei 80% der RA-Patienten (aber auch bei 5% der Gesunden) vorkommen und bei seropositiven RA-Patienten mit einem aggressiven und destruktiven Krankheitsverlauf korrelieren {12}. Die in der SM gebildeten Immunkomplexe aus Rheumafaktoren induzieren eine Aktivierung des Komplementsystems, durch sezernierte Chemokine werden Entzündungszellen zu den betroffenen Gelenken gelockt und initiieren dort eine Destruktionskaskade. Auf eine Autoimmunreaktion gegen ein arthritogenes Antigen deutet die Anreicherung von T-Lymphozyten im betroffenen Gelenk {10} und die von B-Lymphozyten lokal sezernierten Immunglobuline hin {13}. Im Rahmen der RA wurden zahlreiche Antigene charakterisiert, die arthritogenes Potential besitzen und die von Auto-AK erkannt werden können. Dazu gehören z. B. das Chondrozytenmembranprotein CH65 {14}, Kollagen II, das Hitzeschockprotein HsP65, Aggrekan und andere Proteoglykane (PG). Das vermehrte Vorkommen von Auto-AK gegen zyklische zitrinulierte Peptide deutet ebenfalls auf eine autoimmune Komponente bei der RA hin {15}. Das Zytokinprofil in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten zeigt dabei einen Überschuss an makrophagen- und fibroblastentypischen Zytokinen (TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bzw. IL-6 und IL-8) im Vergleich zu den in relativ geringen Konzentrationen vorkommenden T-Zell-spezifischen Zytokinen, wie z. B. IL-2, IL-17 und IFN- $\gamma$  {16}. Die Fibroblasten und Makrophagen (M $\phi$ ) können sich dabei T-Zell-unabhängig kostimulieren und durch Abgabe pro-inflammatorischer Zytokine zur Anlockung von entzündungsfördernden Monozyten und T-Zellen beitragen {17}. Die erfolgreiche Therapie mit Anti-TNF- $\alpha$ -AK in der RA deutet auf eine zentrale Rolle der M $\phi$  im Krankheitsverlauf und u.U. auch in der Pathogenese der RA hin. Die Auslösung einer RA durch infektiöse Erreger oder deren Produkte wird diskutiert, aber bisher konnte noch kein infektiöses Agens aus der RA-SM isoliert werden. Wahrscheinlicher ist eine immunologische Kreuzreaktion mit körpereigenen Antigenen als

Folge eines Kontaktes mit bakteriellen oder viralen Antigenen {18}. Für diese Hypothese spricht die Korrelation zwischen dem Auftreten und der Schwere der RA und der Überrepräsentation bestimmter, zum „major histocompatibility complex“ (MHC) gehörenden „human leukocyte antigen“ (HLA) Subtypen {4}. MHC-Moleküle befinden sich auf der Oberfläche (OF) nahezu aller Zellen und werden in Verbindung mit einem Antigen von T-Lymphozyten erkannt. In den HLA-Gensequenzen wurde die stark konservierte Aminosäuresequenz QKRAA identifiziert, die nicht nur in den HLA-Subtypen, sondern auch in viralen und bakteriellen Proteinen zu finden ist und aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens auch als „shared epitope“ bezeichnet wird. Die Präsentation eines Peptides bakterieller/viraler Herkunft mit dieser Aminosäuresequenz könnte also zu einer Autoimmunantwort führen, da diese Sequenz sowohl in Bakterien/Viren als auch in humanen Proteinen kreuzreaktiv erkannt wird {1}. Besonders der HLA-DRB1 Genlocus korreliert mit der RA, hier treten v. a. die Allele HLA-DRB1\*0404 und \*0401 in der RA häufiger auf als in gesunden Kontrollen.

Neben der Assoziation mit den HLA-DR-Allelen werden zahlreiche andere genetische Komponenten für die Pathogenese der RA diskutiert. Dazu zählen Polymorphismen in Promotoren von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , den kodierenden Regionen anderer relevanter Effektormoleküle {19} und in regulatorischen Genen, wie z. B. p53 {20}.

### **1.1.2. Die Bedeutung der SM für die Pathogenese der RA**

Die gesunde SM wird an ihrer gelenknahen OF durch eine ein bis zwei Zell-Lagen dicke Deckzellschicht (Intima) begrenzt. Die Zellen dieser Deckschicht lassen sich aufgrund ihrer OF-Marker in M $\phi$ -ähnliche Typ A-Zellen und fibroblastenähnliche Typ B-Zellen unterscheiden. Unterhalb dieser Zellschicht befindet sich die Subintima, ein zellarmes Bindegewebe, in dem synoviale Fibroblasten (SFB), Neuronen sowie Blut- und Lymphgefäße vorkommen {21,22}. Darüber hinaus lässt sich eine erhöhte Anzahl von T-Zellen und M $\phi$  nachweisen, die lymphoide Aggregate bzw. diffuse Infiltrate bilden {23-25}.

Im Rahmen der RA wandelt sich die Intima zu einer bis zu zehn Zell-Lagen dicken Gewebeschicht mit einer großen Zahl von infiltrierenden, inflammatorischen Zellen um. Etwa zwei Drittel dieser Zellen sind M $\phi$ , die eine wichtige Quelle pro-inflammatorischer Zytokine sind. Diese Zytokine haben die Fähigkeit, die zu einem Drittel in der Deckzellschicht vorkommenden SFB zu aktivieren {26,27}. Ob für die Zellzunahme die Immigration von M $\phi$  oder aber die Proliferation/gestörte Apoptose von ortsständigen SFB verantwortlich ist, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden {28-30}. Charakteristika der akut entzündeten Subintima sind eine massive Akkumulation von Entzündungszellen, wie M $\phi$  und Lymphozyten, und die verstärkte Bildung diffuser entzündlicher Infiltrate und lymphoider Aggregate {13,30}. Zusätzlich wird eine verstärkte Angiogenese und Neovaskularisation beobachtet. In der Intima lässt sich im Vergleich zur darunterliegenden Subintima eine signifikant erhöhte Konzentration von Serin-, Cystein- und Metalloproteinasen feststellen. Für die Knorpel- und Knochendestruktion werden allgemein die aktivierten Fibroblasten der Intima verantwortlich gemacht {31}. Die M $\phi$  dieser Schicht fallen durch eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf {32}. Das allgemein

entzündliche Milieu wird zusätzlich durch von Endothelzellen sezernierte Zytokine (z. B. IL-15) und Wachstumsfaktoren (z. B. „vascular endothelial growth factor“, VEGF) aufrechterhalten und verstärkt {33-35}. Diese akut entzündlich veränderte SM, auch Pannus genannt, ist ein charakteristisches Merkmal der RA {21}. Das Pannusgewebe, das für die Gelenkdestruktion verantwortlich gemacht wird, schiebt sich vom Gelenkrezessus bzw. von den Kreuzbänderansätzen über den Knorpel. Am Insertionsbereich der Gelenkkapsel, einem Bereich, in dem der Knochen nicht durch Knorpel überdeckt und geschützt ist, kann es zum destruktiven Einwachsen des Pannusgewebes unter den Knorpel kommen. Die gleichzeitige Aktivierung von Chondrozyten im hyalinen Knorpel resultiert in einer Hemmung der Kollagen- und PG-Synthese und einer Zunahme der Sekretion von gewebsdestruktiven Proteasen. Gleichzeitig bewirkt die Stimulation der gelenknahen Osteoklasten zusätzlich zum Knorpel- auch einen Knochenabbau und induziert eine lokale Osteoporose {36}. In fortgeschrittenen Stadien kann der Knorpelabbau durch eine Abnahme des Knorpelraumes und der hervorgerufene Knochenabbau durch eine gelenknahe Knochendemineralisation infolge der Osteoklastentätigkeit röntgendiagnostisch beurteilt werden. Die entzündliche Veränderung der SM kann durch histologische Bewertung von Biopsien analysiert werden. Untersuchungen zur Pathogenese der RA beschäftigen sich extensiv mit allen am Aufbau der SM beteiligten oder im Verlauf der Erkrankung in der SM akkumulierten Zelltypen.

### **1.1.3. Die Bedeutung der SFB für die Pathogenese der RA**

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich RA-SFB von normalen bzw. von OA-SFB unterscheiden und Zeichen einer stabilen Aktivierung zeigen {22,37,38}. Die Ursache dieser Teilentartung der RA-SFB ist bislang noch nicht geklärt, doch werden aktuell zwei kontroverse Theorien diskutiert. Die erste begründet eine Aktivierung der RA-SFB durch exogene Stimulierung mit Mediatoren von M $\phi$ , T-Zellen oder Neuronen {13}, während die zweite eine Aktivierung infolge einer endogenen Stimulierung durch permanente genetische Veränderungen (Mutationen von Schlüsselsequenzen, Integration retroviraler Sequenzen) oder eine veränderte Signaltransduktion als eine mögliche Erklärung favorisiert {20,39}. So konnte gezeigt werden, dass isolierte RA-SFB bei Koimplantation mit humanem Knorpel in immundefiziente SCID (Severe Combined Immune Deficiency)-Mäuse die Knorpelmatrix auch in Abwesenheit menschlicher Entzündungszellen zerstören können {40}. RA-SFB können dementsprechend ihre krankheitsspezifischen Eigenschaften selbst dann beibehalten, wenn sie aus dem pathologisch veränderten Gewebe herausgelöst und dem kontinuierlichen Einfluss von Entzündungsmediatoren entzogen werden {4,41}. Die RA-SFB sind durch die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6; IL-8) und pro-destruktiver Proteasen (Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Kathepsine, Komponenten des Plasminsystems) maßgeblich an der Gelenkentzündung und -zerstörung beteiligt {40}. Dabei können kultivierte RA-SFB pro-inflammatorische Zytokine (wie TNF- $\alpha$  und IL-6) und Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ ) ohne exogene Stimulation durch andere Zytokine produzieren {42,43}. Gleichzeitig ist in der RA-SM und in den isolierten RA-SFB das physiologische Gleichgewicht von den MMP zu ihren natürlichen Inhibitoren, den „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP), zugunsten der MMP verschoben {22}. Desweiteren wurden

Veränderungen in der Expression von Proto-Onkogenen (c-myc, c-jun, c-fos, junB {44-47}) und Tumorsuppressorgenen (p53, PTEN {48}) gefunden, die u. a. zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) {49}, zur Produktion von matrixzerstörenden Enzymen und zur Veränderung in der Apoptose-Empfindlichkeit führen. Weitere Hinweise auf einen aktivierten, aggressiv-destruktiven Phänotyp der RA-SFB sind deren morphologische Ähnlichkeiten mit entarteten Zellen in malignen Bindegewebstumoren {50}, numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen {51-53}, sowie das tumorzellartige Wachstum ohne Kontaktinhibierung {54}. Ein weiteres Phänomen ist die unkontrollierte Synthese von Kollagen I und III durch RA-SFB, die im Verlauf der fortschreitenden Gelenkdestruktion zur Fibrosierung der Gelenke führt {45}.

Die RA-SFB sind aufgrund ihrer aggressiven Eigenschaften maßgeblich am Abbau der Knorpelmatrix beteiligt. Für die Analyse der Mechanismen der Knorpelzerstörung und des relativen Beitrages der RA-SFB ist die Berücksichtigung der speziellen Eigenschaften des Gelenkknorpels von Relevanz.

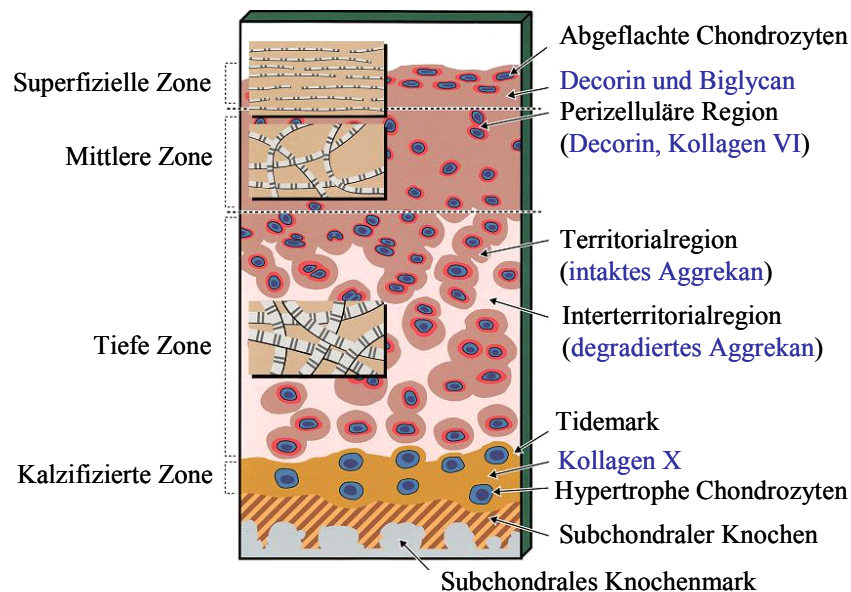
## **1.2. Aufbau des Gelenkknorpels**

Der makroskopisch glatt erscheinende, hyaline Knorpel überzieht die beiden das Gelenk bildenden knöchernen Skelettelemente. In Verbindung mit der von der SM gebildeten Synovialflüssigkeit (eine viskose proteinreiche Flüssigkeit mit hohem Hyaluronsäuregehalt) ist im gesunden Gelenk eine nahezu reibungsfreie Bewegung der Gelenkflächen möglich. Aufgrund der fehlenden Vaskularisierung ist der Knorpel auf die Ernährung durch die Synovialflüssigkeit angewiesen {55}. Die fehlende Innervation macht den Knorpel zu einem schmerzunempfindlichen Gewebe {55,56}. Die Elastizität des Knorpels ist durch seine Zusammensetzung aus fibrillärem Kollagen und vernetzenden PG sowie dem hohen Wasseranteil zu erklären (normaler Gelenkknorpel enthält über 70% Wasser) {57}. Das an die PG gebundene Wasser bzw. sein Verdrängen aus der Bindung bei gleichzeitiger Anwesenheit zugfester elastischer Kollagenfibrillen, ist maßgeblich für die biomechanischen, stoßdämpfenden und gewichtsverteilenden Eigenschaften des Knorpels verantwortlich. Der Gelenkknorpel besteht aus der extrazellulären Matrix (EZM) und den darin eingebetteten Chondrozyten. Der Gelenkknorpel ist ein relativ zellarmes Gewebe, da die Chondrozyten als einziger in diesem Gewebe vorkommender Zelltyp beim Erwachsenen nur ca. 2-5% des Knorpelvolumens ausmachen {58,59}.

### **1.2.1. Die Chondrozyten**

Die Anordnung und Morphologie der Chondrozyten folgt einer dreistufigen zonalen Struktur im Knorpel [Abb. 1]. In der oberflächlichen, gelenkhöhlennahen Zone haben die Chondrozyten eine abgeflachte Morphologie und sind perlschnurartig parallel zur OF angeordnet. Diese Zellen produzieren das sog. OF-Zonenprotein, welches analog zu dem von Synovialzellen gebildeten Lubricin ist {60,61}. Dieses Molekül bildet zusammen mit Hyaluronsäure den Hauptbestandteil der Lamina splendens, einer filmartigen Ablagerung auf der Knorpel-OF, welche die reibungslose Bewegung der Gelenkflächen ermöglicht {61-64}. Die OF-nahen Chondrozyten sind dabei von ebenfalls parallel zur OF laufenden

Kollagenfibrillen umschlossen {65}. Der Aggrekangehalt ist hier am niedrigsten {66}, während die fibrillenassoziierten kleinen PG Decorin und Biglykan hier hochkonzentriert anzutreffen sind {67}. Die oberflächliche Knorpelzone hat aufgrund des engmaschigen Kollagennetzes die höchste Zug- und Druckfestigkeit im Knorpel {68,69}. In der mittleren, etwas zellärmeren Zone zeigen die Chondrozyten eine runde Gestalt. Die sie umgebende Matrix ist reich an Aggrekan und die Kollagenfibrillen sind wesentlich dicker und eher netzartig angeordnet. In der tiefen Zone sind die Chondrozyten säulenförmig angeordnet und von einer EZM mit besonders hohem Aggrekangehalt und dicken Kollagenfibrillen umgeben {66}. In der tiefsten, kalzifizierten Zone liegen hypertrophe Chondrozyten vor, die Kollagen X synthetisieren und die umgebende Knorpelmatrix kalzifizieren. Die die Chondrozyten umgebende Matrix zeigt eine regionale Organisation: in der perizellulären Region (Umkreis von ca. 2  $\mu\text{m}$  um die Chondrozyten) findet sich das feine fibrilläre Kollagen VI-Netzwerk mit einem hohen Gehalt an den PG Decorin und Aggrekan, welches die Chondrozyten „korbartig“ umfasst {70-73}. Dieses Gebiet grenzt sich scharf von den Fibrillen der territorialen EZM ab {74}. In tieferen Gebieten des Knorpels wird die territoriale Region von einer weiteren Zone, der sog. interterritorialen Zone umgeben. Dieser Teil der Matrix ist am weitesten von den Chondrozyten entfernt und mit Abbauprodukten von Aggrekan und anderen Matrixbestandteilen angefüllt {75} [Abb. 1].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Knorpelaufbaus zur Veranschaulichung der zonalen Gliederung, der Chondrozytenarchitektur und von Matrixbesonderheiten.** Die relativen Durchmesser und die Organisation der Kollagenfibrillen in den verschiedenen Zonen werden durch die eingefügten Grafiken verdeutlicht (abgewandelt nach {76}).

## 1.2.2. Die extrazelluläre Matrix

Die Hauptbestandteile der EZM sind die Kollagene und die PG.

### 1.2.2.1. Kollagene

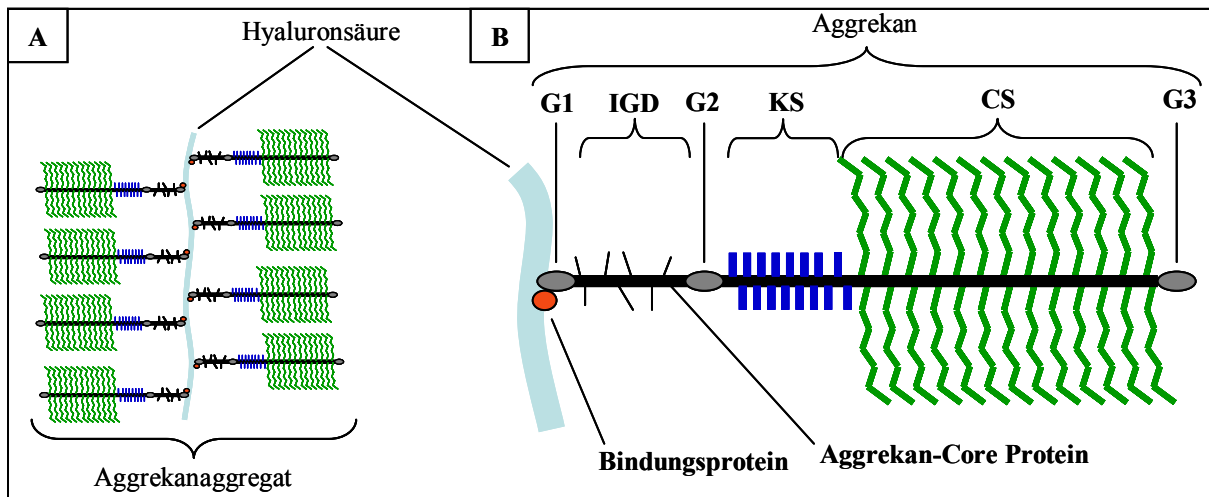
Wie auch in anderen Bindegeweben ist die EZM des hyalinen Knorpels aus einem hochorganisierten Netzwerk von Kollagenfibrillen aufgebaut. Diese Fibrillen variieren in ihrem Durchmesser zwischen 20 nm (in der superfiziellen Knorpelschicht) und bis zu 120 nm (in der tiefen Zone) [Abb. 1]. Dabei stellt Kollagen II mit 90% den Hauptteil der Fibrillen. Desweiteren finden sich auch Kollagene der Typen I, III, IV, V, IX, X und XI. Diese spielen im gesunden Knorpel wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle und werden erst bei pathogenen Zuständen vermehrt gebildet {77}. Das Kollagen II-Molekül besteht aus drei identischen  $\alpha 1$  (II)-Ketten, die zusammen eine Triplehelix bilden, an deren N- bzw. C-terminalen Enden sich kurze Telozeptiddomänen befinden. Über diese Domänen erfolgt die versetzte Aneinanderlagerung von Kollagenmolekülen, wodurch eine Querstreifung in den so zusammengefügt Mikrofibrillen entsteht. Die Kollagenfibrillen werden von den Chondrozyten als Prokollagen mit N- und C-terminalen Propeptiden sezerniert, welche bei der Fibrillenformierung enzymatisch entfernt werden. Für die Fibrillenassoziation ist COMP („cartilage oligomeric protein“) ein wichtiger Katalysator, da ein pentameres COMP-Molekül fünf Kollagenmoleküle binden {78} und die Bildung einer Mikrofibrille induzieren kann {79,80}. Kollagen IX (ca. 2% des Gesamtkollagens) ist hauptsächlich im perizellulären Knorpelgewebe mit der Fibrillen-OF assoziiert und bildet kovalente Quervernetzungen (sog. „Crosslinks“) zwischen den Fibrillen {81,82}. Kollagen Typ XI ist in die Kollagen II-Fibrillen eingelagert und scheint eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Fibrillenbildung zu spielen {83}. Die kleinen PG Decorin, Fibromodulin und Lumican können während der Fibrillenbildung an Kollagen binden und somit den Durchmesser der entstehenden Fibrillen beeinflussen {84,85}. In den oberflächlichen und perizellulären Knorpelregionen, in denen Decorin konzentriert vorkommt, befinden sich demnach auch die dünnsten Kollagenfibrillen [Abb. 1].

### 1.2.2.2. Proteoglykane

Zwischen den Kollagenfasern liegen die PG. Diese überlagern die Faserstruktur des Kollagengerüsts und verursachen die lichtmikroskopisch sichtbare homogene Textur bei histologischen Knorpelübersichtsfärbungen {86,87}. Die PG-Konzentration im Gelenkknorpel wird mit bis zu 100 mg/ml angegeben {88}. Sie besitzen eine oder mehrere negativ geladene Polysaccharidketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (Glykosaminoglykan (GAG) -Seitenketten), die kovalent an ein Kernprotein gebunden sind. Die GAG-Ketten sind stark sulfatiert und besitzen zahlreiche negative Ladungen, die Wasser sowie freie Kationen binden. Die wichtigsten GAG der PG-Moleküle sind Chondroitin-4-Sulfat (CS-4), Chondroitin-6-Sulfat (CS-6), Keratansulfat (KS) und Dermatansulfat (DS) {89,90}. Im Knorpelgewebe kommen neben den großen PG mit vielen CS- und KS-tragenden Seitenketten (Aggrecan) auch die kleinen PG mit nur einer oder zwei GAG-tragenden Seitenketten (z. B. Decorin, Biglykan) vor, die über ihre Leucin-reichen Wiederholungen mit Kollagenen interagieren können {91}. Die beiden kleinen Leucin-reichen PG Decorin und

Biglykan gehören zur Gruppe der CS/DS-PG. Beide PG dienen der Organisation und mechanischen Stabilisierung der EZM. Im Knorpelgewebe bindet Decorin an Kollagenfibrillen in der interterritorialen Matrix und ist an der Regulation der Faserdicke beteiligt {76,92}. Biglykan ist an der OF des Gelenkknorpelgewebes und in der perizellulären Matrix lokalisiert und schützt vermutlich die Zellen bei Belastungen {93}. Das größte und am häufigsten vorkommende PG ist das Aggrekan, das aufgrund seiner vielen GAG-tragenden Seitenketten für die stoßdämpfenden Eigenschaften des Gewebes verantwortlich ist {77,91}. Es bildet sehr große Aggregate, die aus bis zu 800 Aggrekanmonomeren bestehen können {94}. Zentraler Bestandteil der Aggregate ist die Hyaluronsäure, an die die Aggrekanmoleküle in einem Abstand von ca. 40 nm binden {88,94}. Diese Bindung wird über ein zusätzlich koordiniertes Bindungsglykoprotein stabilisiert. Das Aggrekanmolekül besteht aus einem Proteinkern („core-Protein“) und den über Verbindungszucker gebundenen KS- und CS-Ketten. Das Core-Protein besitzt drei globuläre Domänen: der N-Terminus des Core-Proteins bildet die globuläre Domäne G1, die die hochaffine Bindung zur Hyaluronsäure vermittelt. Daran schließt sich die G2-Domäne an, deren genaue Funktion noch nicht bekannt ist. Sie ist trotz hoher Sequenzhomologie zur G1-Domäne nicht an der Bindung zur Hyaluronsäure beteiligt {91}. Nach der G2-Domäne folgt der stark glykosylierte Teil des Aggrekans, an den die GAG gebunden sind. Im ersten, der Hyaluronsäure am nächsten liegenden Abschnitt, werden über Verbindungszucker die nur relativ kurzen KS-Reste (20 – 40mere) an das Core-Protein gebunden. Im folgenden Abschnitt werden dann lange Ketten von CS (> 250mere) wiederum über Verbindungszucker gebunden {91}. Die große Zahl von OH-Gruppen und Sulfatresten in den Glykosylierungsketten verleiht Aggrekan die Fähigkeit, große Mengen von Wasser zu binden. Die Funktion der C-terminalen G3-Domäne ist ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Ihr werden Funktionen bei der Protein-Protein-Interaktion, der Matrixorganisation und der Aggrekansynthese zugeschrieben {91} [Abb. 2]. Das Aggrekan unterliegt während der gesamten Lebenszeit des Menschen einem stetigen Umsatz, wobei seine Halbwertszeit beim Menschen in Abhängigkeit vom untersuchten Gelenk zwischen 300 und 800 d liegt {65}. Der Aggrekan-Abbau wird hauptsächlich durch Aggrekanasen und MMP katalysiert {95}. In der Folge kommt es zur PG-Freisetzung aus dem Aggrekanaggregat und somit zum Verlust der Knorpelintegrität. Der Verlust von PG aus der Knorpelmatrix wird als einer der ersten Vorgänge im Verlauf der RA beschrieben. Dies ist von besonderer Bedeutung, da Aggrekan aufgrund seiner maskierenden Eigenschaften *in vitro* den proteolytischen Abbau von Kollagen II verhindern kann {96}. Beim Verlust der schützenden PG ist dann auch das Kollagengerüst für matrixdegradierende Enzyme zugänglich. Neben ihrer Beteiligung am Aufbau der EZM üben PG noch verschiedene andere Funktionen aus (Adhäsion, Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen; Bindung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren) {97}.





**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung eines Aggrekanaggregates (A) und des Aufbaus eines Aggrekanmonomers (B).** Aggrekan besteht aus drei globulären Domänen (N-terminale G1, G2, und C-terminale G3) (B). Durch Bindung von Aggrekanmonomeren an Hyaluronsäure über die G1 Domäne und das assoziierte Bindungsprotein entstehen große Aggrekanaggregate (A). Zwischen G2 und G3 liegen Bindungsstellen für KS- und CS-tragende GAG-Seitenketten (modifiziert nach {96}).

### 1.2.2.3. COMP

COMP („cartilage oligomeric matrix protein“, ein Mitglied der Thrombospondin-Familie {98}, wurde erstmalig 1992 beschrieben {99}. Es ist ein pentameres Protein mit einem Molekulargewicht von 524 kD {78}, das aus fünf identischen Untereinheiten besteht {98}. COMP wurde bisher in Knorpel {99}, Sehnen {100} und auch in der SM {101} nachgewiesen. Natives COMP bindet mit hoher Affinität an Kollagen I/II und Pro-Kollagen I/II, wobei ein COMP-Molekül mit jeder der fünf Untereinheiten ein unterschiedliches Kollagen-Molekül binden kann. COMP spielt eine wichtige Rolle bei der Organisation der Kollagen-Moleküle zu Mikrofibrillen {80}, in dem es als eine Art Katalysator der Fibrillen-Formation fungiert. Die Menge von COMP sowie seine Produktion sind in der OA stark hochreguliert, was als Zeichen für einen Reparaturversuch der Chondrozyten gedeutet wird. Beim krankhaften Abbau von Gelenkknorpel entstehen Fragmente des Matrixproteins, die in die Gelenkflüssigkeit abgegeben werden {102} und allmählich im Blutkreislauf auftauchen. COMP-Serumspiegel werden teilweise zur Diagnose des Knorpelabbaues bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wie RA {103,104} und OA {105-107} eingesetzt.

## 1.3. Wichtige Mediatoren der Gelenkerstörung

Bei der RA treten verschiedene Prozesse auf, die zu einem enzymatischen Angriff auf intaktes Knorpelgewebe führen. An der Degradation sind im wesentlichen MMP, Aggrekanasen, Elastasen und Kathepsine beteiligt, deren Expression/Aktivität im Gelenk v. a. durch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  induziert werden. Diese Proteasen spielen sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind sie als proteolytisch aktive Enzyme an Auf- und Umbauprozessen von Geweben sowie an der Zerstörung und Beseitigung von Bestandteilen der EZM (Kollagen, PG, Glykoproteine) beteiligt {108}. Sie erfüllen im Rahmen der Neubildung und Strukturhaltung bei der Embryonalentwicklung, Zellproliferation, Zellmigration, Osteogenese, Angiogenese und Wundheilung eine wichtige Funktion {109}.

Die Aktivität der MMP wird einerseits durch spezifische endogene Inhibitoren wie TIMP sowie andererseits durch unspezifische Inhibitoren wie  $\alpha$ 2-Makroglobulin reguliert {110}. Bei pathologischen Prozessen ist das Gleichgewicht zwischen den MMP und deren Inhibitoren gestört, so dass es durch eine vermehrte Anreicherung bzw. Aktivierung von MMP im Gewebe zu einem verstärkten Abbau der EZM kommt {111}. Die Abbauprodukte der Matrix wiederum können die Entzündungs- und Degradationsprozesse aufrechterhalten oder weiter forcieren. Zum Beispiel induzieren Hyaluronsäurefragmente die NO-Synthese in M $\phi$  {112}, Fibronectinfragmente induzieren die Kollagenase-Expression in Fibroblasten {113,114} sowie die Synthese von Kollagenase und Stromelysin-1 in Chondrozyten {115,116}. Kollagenfragmente wiederum können zur Steigerung der Gelatinaseaktivität und zur Inhibierung der Kollagensynthese und Zelladhäsion beitragen {117}. Die involvierten Enzyme und ihre Inhibitoren stehen hierbei in enger wechselseitiger Beziehung, so dass der Degradationsprozess durch das verstärkte Ungleichgewicht von Inhibitoren zu Proteasen zusätzlich vorangetrieben wird.

### 1.3.1. Matrix-Metalloproteinasen

Die MMP gehören zur Familie der Zink ( $Zn^{2+}$ )- und Kalzium ( $Ca^{2+}$ )-abhängigen Endopeptidasen. Bisher sind in Vertebraten 24 MMP beschrieben worden, von denen 23 in humanen Geweben vorkommen {109}. MMP werden aufgrund ihrer bevorzugten Substratspezifität und strukturellen Merkmale in vier Klassen eingeteilt: Kollagenasen (MMP-1, -8, 13, -18), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, -10, -11) und membrangebundene MMP („membrane-type“ MMP, MT-MMP: MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) {109}.

MMP werden von einer Vielzahl von Zellen (M $\phi$ , Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen {118,119}) als inaktive Proenzyme (Pro-MMP oder Zymogene) in den extrazellulären Raum sezerniert {120}. Sie sind aus folgenden Strukturdomänen aufgebaut: ein Signalpeptid, eine Pro-Domäne, eine katalytische Domäne, eine „hinge“-Region und (bis auf MMP-7 und -26) eine zwischen den einzelnen MMP variierende Hämopexin-ähnliche Domäne [Abb. 3]. Die am N-terminalen Ende lokalisierte Signalpeptid-Domäne (Prä-Domäne) ist für den Transport in das endoplasmatische Retikulum und die extrazelluläre Sekretion verantwortlich und wird nach der Synthese der Proteinasen abgespalten {121}. Das Propeptid interagiert mit dem  $Zn^{2+}$  der katalytischen Domäne und hemmt die Aktivität des sezernierten Produktes. Für die Aktivierung der MMP muss dieses Propeptid abgespalten werden. Bei Abspaltung des Propeptids kommt es zum sog. Cystein-Switch, was eine Aktivierung des Enzyms zur Folge hat. Die Spaltung kann über Proteasen (Serin-, Cystein-Proteasen, MMP, Plasminsystem) oder chemisch (z. B. durch Quecksilberverbindungen wie APMA) erfolgen. Eine Ausnahme bilden die MT-MMP, sowie MMP-11, -23 und -28, die intrazellulär durch Furinproteasen aktiviert werden {122}. Erst nach der Entfaltung der enzymatischen Aktivität sind MMP in der Lage, Substrate zu spalten. In der katalytischen Domäne besitzen die MMP im aktiven Zentrum ein  $Zn^{2+}$ -bindendes Motiv (HEXXH Sequenz). Die katalytische Domäne weist bei den Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) drei Wiederholungen eines Fibronectin Typ II-Motivs auf, die für die Substratspezifität der Gelatine-spaltenden Enzyme verantwortlich sind. Die Hämopexin-

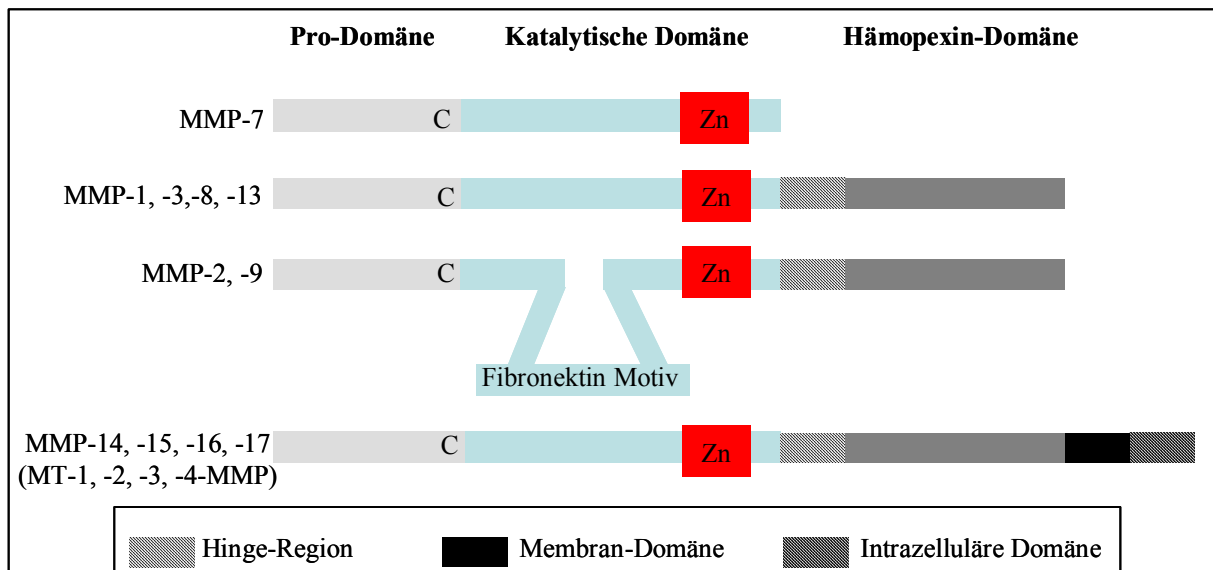
ähnliche Domäne am C-terminalen Ende ist für die katalytische Substratspezifität wichtig und kann die Bindung von TIMP an die Domäne beeinflussen. Die Hämapexin-ähnliche Domäne und katalytische Domäne sind über eine Prolin-reiche „hinge“-Region miteinander verbunden, deren Funktion bisher unbekannt ist. Die membrangebundenen MMP (MT-MMP) sind an der OF von Zellmembranen gebunden und besitzen eine zytoplasmatische und eine Transmembran-Domäne. Sie dienen der Aktivierung von anderen Enzymen. So spielen alle membranständigen MMP mit Ausnahme von MT4-MMP {123} eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Pro-MMP-2 {124}.

Die transkriptionale Regulation von MMP erfolgt durch inflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), Wachstumsfaktoren, Hormone und Veränderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen {125}.

Die Kollagenasen MMP-1 und MMP-13 spielen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung des Kollagengerüsts im Gelenkknorpel, wobei MMP-13 eine zehnmal stärkere Zerstörung von Kollagen II induzieren kann als MMP-1 {126}. Kollagenasen spalten fibrilläre Kollagene (Typ I, II, III) an spezifischen Stellen ihrer tripel-helikalen Domäne, so dass zwei Fragmente mit  $\frac{3}{4}$  und  $\frac{1}{4}$  der ursprünglichen Molekülgröße entstehen. Die dabei generierten Kollagenschnittstellen können anhand spezifischer AK nachgewiesen werden (z. B. mit den AK Col 2-3/4 (long/short)) {127,128}. Die Spaltung durch Kollagenasen entwindet Teile der Kollagenmoleküle und macht die nicht-helikalen Gelatinderivate für die weitere Spaltung durch Gelatinasen (konstitutiv exprimierte MMP-2 und induzierbare MMP-9 {129}) zugänglich. Auch PG können von MMP-1 und MMP-13 gespalten werden {130}.

Die MMP-vermittelte Spaltung von Aggrekan findet dabei in der interglobulären Domäne (IGD) und zwischen der G2- und der G3-Domäne statt und die entstehenden Bruchstücke können anhand der terminalen Epitopesequenzen spezifisch nachgewiesen werden {95} [Abb. 4]. Neben MMP-1 und -13 können auch MMP-2, -3, -7, -8, -9, und MT1-MMP an dieser Spaltung beteiligt sein {28,29,131-133}. Die MMP sind jedoch nur zu 1-3% an der Freisetzung der GAG-tragenden Aggrekanfragmente beteiligt {134,135}. Die MMP wirken überwiegend an bereits (durch Aggrekanasen) gespaltenem Aggrekan {136} und beschleunigen durch zusätzliche Spaltung die Fragmentierung des Aggrekans. Durch die MMP-vermittelte Zerstörung des Kollagennetzes wird das Grundgerüst der Matrix zusätzlich gelockert, so dass die Vergrößerung der Matrixporen im Gewebe ein Abdiffundieren von Matrixbestandteilen erleichtert.

Stromelysine, speziell MMP-3, weisen eine breite Substratspezifität auf. Sie können verschiedene Kollagentypen, PG und Glykoproteine spalten {137}.



**Abbildung 3: Domänen-Struktur der verschiedenen MMP-Gruppen.** MMP sind aus einer Prodomäne, einer katalytischen Domäne mit dem zinkhaltigen katalytischen Zentrum und (bis auf MMP-7) einer Hämopexin-Domäne, die eine Affinität zum Substrat aufweist, aufgebaut. Die Hämopexin-Domäne ist über die „hinge“-Region mit der katalytischen Domäne verbunden. Die membranständigen MT-MMP haben zusätzlich eine Membran- und eine intrazelluläre Domäne (abgewandelt nach {138}).

Die katalytische Aktivität der MMP kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden: die Aktivierung von inaktiven Proenzymen (oben beschrieben), die Kontrolle der Transkription und die Inhibition des aktiven Enzyms durch TIMP. Die MMP-Expression wird sehr stark von den stimulierenden Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beeinflusst. Durch Bindung der Zytokine an ihren jeweiligen Membranrezeptor wird die TGF- $\beta$ -aktivierende Kaspase (TAK-1) aktiviert {139}. Diese hat eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung zweier Hauptsignaltransduktionswege. Zum einen wird über eine Aktivierung des I $\kappa$ -B-Kinase-Wegs der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert. Zum anderen führt die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges über die Phosphorylierung unterschiedlicher Kinasen (JNK, ERK, p38-MAPK {140,141}) letztendlich zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 (bzw. der AP-1 bildenden Untereinheiten Jun und Fos) {142,143}. Über das Bindungsverhalten der Transkriptionsfaktoren an die Promotoren entsprechender MMP-Gensequenzen wird ihr Expressionniveau maßgeblich gesteuert {141,144-147}. Andererseits kann die Aktivität der MMP unter normalen physiologischen Bedingungen durch TIMP gehemmt werden, indem diese nicht-kovalent an das aktive Zentrum der katalytischen Domäne binden {148}. Zurzeit sind vier Formen der Inhibitoren bekannt (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4), die ein Molekulargewicht von 21-28 kD aufweisen {110}. Sie bestehen aus einer inhibitorischen N-terminalen Domäne, welche mit der Zn<sup>2+</sup>-Bindungsstelle der aktiven MMP in Wechselwirkung treten kann, und einer C-terminalen Domäne, welche an die Hämopexin-ähnliche Domäne der Proteasen bindet und deren Aktivierung vermittelt. TIMP sind in der Lage, die Aktivität von nahezu allen MMP zu hemmen {109}. TIMP-3 unterscheidet sich in seiner inhibitorischen Fähigkeit von den anderen Inhibitoren, da es überwiegend die Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 hemmt {149-151}.

Unter physiologischen Bedingungen verhindert das Gleichgewicht zwischen TIMP und MMP einen unkontrollierten Abbau der EZM. Eine Störung dieser Balance ist ein wichtiges

Charakteristikum für die umfassende Gewebserstörung in rheumatischen/degenerativen Erkrankungen wie der RA und der OA {110,137,152,152}.

### 1.3.2. Aggrekanasen

Die Aggrekanasen gehören ebenfalls wie die MMP zu den  $Zn^{2+}$ -abhängigen Metalloendopeptidasen. Sie werden den ADAMTS („a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif“) zugeordnet, die zur Zeit aus 19 Mitgliedern bestehen und eine Untergruppe der Adamalysine (ADAM, „a disintegrin and metalloproteinase“) bilden {152,153}. Zu den Aggrekanasen gehören ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 und -15 {153}.

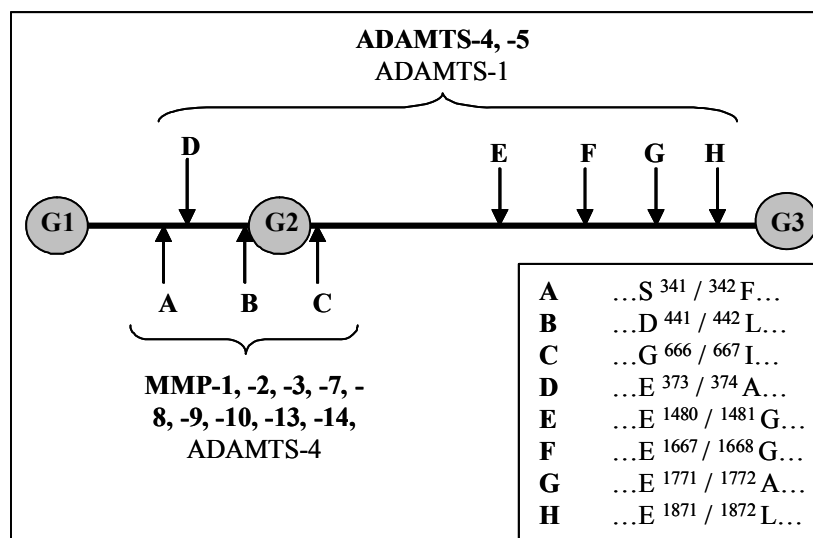
Ähnlich wie die MMP sind auch die Aggrekanasen aus mehreren Domänen aufgebaut. Sie bestehen aus einem Signalpeptid, einer Propeptid-Domäne, einer katalytischen Domäne, einer Disintegrin-ähnlichen Domäne, einem Thrombospondin (TS) Typ I-Motiv, einer cysteinreichen Domäne, einer Spacer-Domäne und einer weiteren TS-Domäne mit einer variablen Anzahl von TS-Wiederholungen. Am N-terminalen Ende liegt die Prodomäne, die die Enzyme in ihrer inaktiven Form hält und zur Aktivierung abgespalten werden muss. In der katalytischen Domäne besitzen die Aggrekanasen ein  $Zn^{2+}$ -bindendes Motiv im aktiven Zentrum. Die Funktion der Disintegrin-ähnlichen Domäne ist unbekannt, während die zentrale TS-Domäne vermutlich an der Substraterkennung beteiligt ist und eine Bindung an Bestandteile der EZM ermöglicht {154}. ADAMTS-4 bindet über diese TS-Domäne an die sulfatierten GAG der CS-reichen Region von Aggrekan {154}. Am C-terminalen Ende liegt die Spacer-Domäne mit einer variablen Länge, gefolgt von einer weiteren TS-Domäne, mit einer unterschiedlichen Anzahl von TS-Wiederholungen {153}. Bei der Aggrekanase ADAMTS-4 findet man hier keine weiteren TS-Wiederholungen.

Während MMP verschiedene Komponenten der EZM umsetzen können, sind Aggrekanasen ausschließlich an der Spaltung von aggregierenden PG und dabei im Besonderen von Aggrekan beteiligt. Als einzige Ausnahme kann ADAMTS-4 zusätzlich auch noch COMP spalten {155}. Die Aggrekanasen ADAMTS-1, -4 und -5 werden als inaktive Proenzyme von Chondrozyten und SFB synthetisiert {156-159}. Sie sind unter normalen physiologischen Bedingungen am Turnover des Aggrekans beteiligt, bei der Entstehung von Gelenkerkrankungen und der Destruktion des Gelenkknorpels wird ihnen aber eine besonders große pathologische Bedeutung zugeschrieben {160-162}. Aggrekan ist im Verlauf der RA eine der ersten Matrixkomponenten, die dem proteolytischen Abbau unterliegen (v. a. durch Aggrekanasen) und eine Änderung der funktionellen Eigenschaften des Gewebes bedingen. Erst im weiteren Verlauf wird das Kollagenetzwerk zerstört {96,163}.

Die Aggrekanase-vermittelte Spaltung des Aggrekans erfolgt ausschließlich an den globulären Domänen des zentralen Core-Proteins, an dem die sulfatierten GAG-Seitenketten kovalent gebunden sind. Die Zerstörung des Aggrekans erfolgt im Bereich der IGD und zwischen den Domänen G2 und G3 {135,162}. Innerhalb der IGD wird durch proteolytischen Angriff der ADAMTS-4 und -5 an der Stelle E<sub>373</sub> - A<sub>374</sub> das Aggrekan gespalten, wobei die G1-Domäne an die Hyaluronsäure gebunden bleibt. Die entstandenen Spaltfragmente des Aggrekans können mit den GAG-tragenden Seitenketten aus dem Gewebe hinausdiffundieren und haben einen Verlust der Funktionseigenschaften des Gewebes zur Folge. Ein weiterer Angriff zur Spaltung von Aggrekan kann an vier weiteren Stellen zwischen der G2- und G3-Domäne

innerhalb der CS-reichen Region erfolgen ( $E_{1480} - G_{1481}$ ,  $E_{1667} - G_{1668}$ ,  $E_{1771} - A_{1772}$ ,  $E_{1871} - L_{1872}$ ) {154,157,160,164-166} [Abb. 4]. Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von Aggrecan an diesen Stellen im Gelenkknorpel hauptsächlich (zu 90%) durch ADAMTS-4 und -5 vermittelt wird {162,167,168}. Auch ADAMTS-1 wird ein destruktives Potential durch die Spaltung von Aggrecan an den Stellen  $E_{373} - A_{374}$ ,  $E_{1771} - A_{1772}$  {169} und  $E_{1871} - L_{1872}$  {161} zugeschrieben, jedoch benötigt es eine deutlich höhere Wirkkonzentration als ADAMTS-4 und -5 {162} [Abb. 4].

Über die Regulation von Aggrecanasen ist bisher wenig bekannt. Ihre Aktivität kann durch den hochaffinen endogenen Inhibitor TIMP-3 gehemmt werden {149-151}. TIMP-3 ist in der EZM des Knorpels vorwiegend an die sulfatierten GAG gebunden {170}. ADAMTS-1 kann zusätzlich auch durch TIMP-1 inhibiert werden {167}.

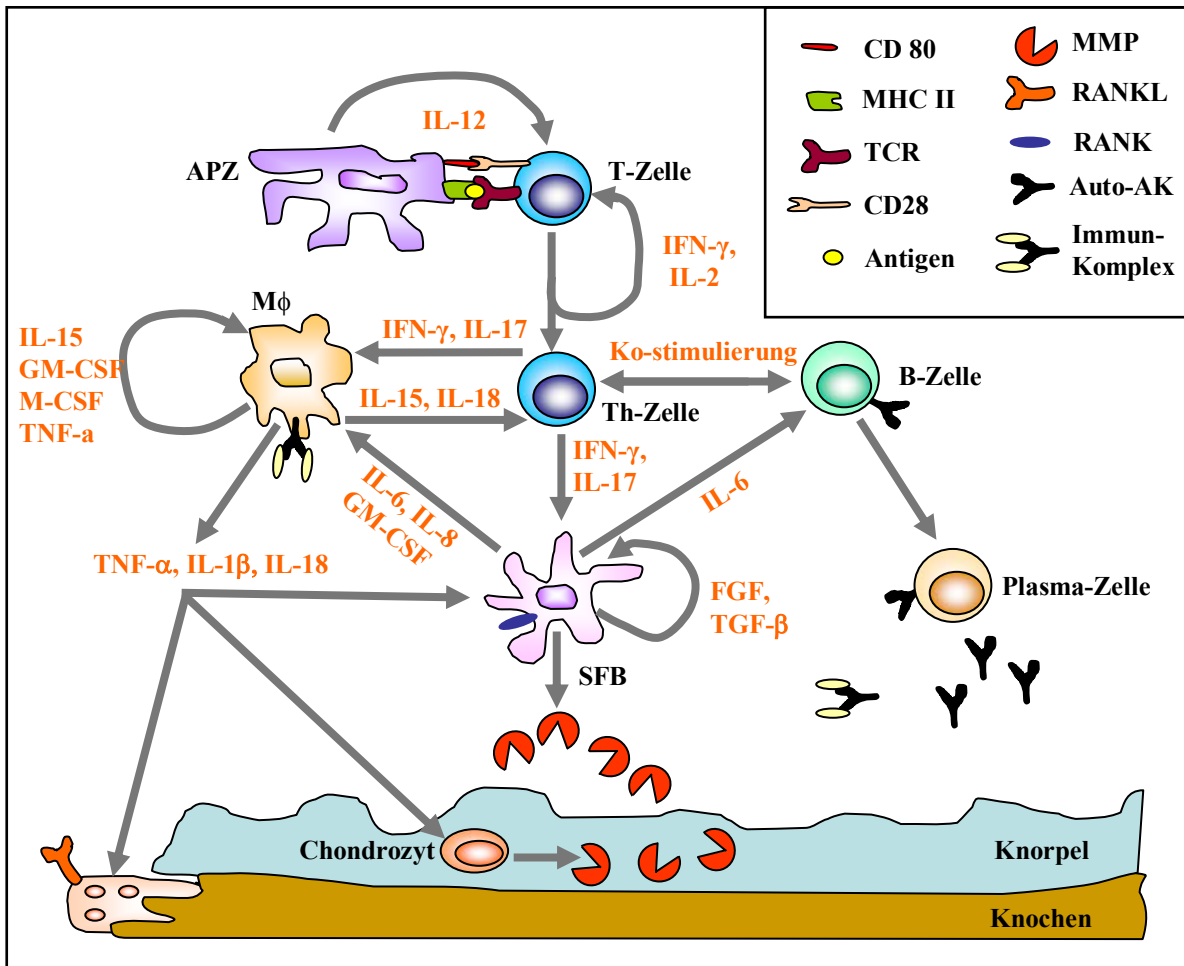


**Abbildung 4: Darstellung der Spaltstellen im Aggrecan mit den Bruchstückenden (Neoepitopen), die durch die Aktivität von Aggrecanasen und MMP entstehen.** Zwischen den Domänen G1 und G2 finden sich wichtige Angriffsstellen für Aggrecanasen (D) und MMP (A und B). Zwischen der G2- und G3-Domäne innerhalb der CS-reichen Region finden sich vier weitere Angriffsstellen für Aggrecanasen (E, F, G, H) und eine weitere für MMP (C); (modifiziert nach {95,171}).

#### 1.4. Pro-inflammatorische Zytokine in der Pathogenese der RA

Zytokine sind lösliche regulatorische Peptide oder Proteine, die bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen an der intrazellulären Kommunikation beteiligt sind und ihr Signal über spezifische Rezeptoren vermitteln. Sie werden aufgrund ihrer Wirkung in pro-inflammatorische (z. B. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) und anti-inflammatorische Zytokine (z. B. IL-4, IL-10, IL-13) eingeteilt {172,173}. In der SM sind die T-Zellzytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  in relativ geringen Konzentrationen vorhanden (im Vergleich zu anderen Antigen-vermittelten Entzündungsvorgängen z. B. in entzündeten Lymphknoten). M $\phi$  und SFB dagegen produzieren hohe Mengen von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15, IL-18, TNF- $\alpha$  und GM-CSF (Granulozyten-M $\phi$  stimulierender Faktor) {17,174} [Abb. 5]. Die erfolgreiche Anwendung von sog. „Biologicals“, wie Anti-TNF- $\alpha$ -AK und IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1-RA), zur Behandlung in Tiermodellen und in der Klinik am RA-Patienten zeigen die Bedeutung dieser Zytokine in der RA {175}. In der entzündeten RA-SM werden die Zellen der SM, des

Knorpels und auch des Knochens durch infiltrierende immunkompetente Zellen stimuliert. Dabei können sie sich sowohl autokrin als auch exokrin kostimulieren. Die Induktion der pro-inflammatorischen Mediatoren erfolgt vermutlich hauptsächlich durch die Wechselwirkung mit IL-2, IL-17 und IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen {176} [Abb. 5].



**Abbildung 5: Schematische Übersicht der pathogenetisch relevanten Zellen in der RA und der aus der Interaktion der Zellen resultierenden Zytokin-Netzwerke.** Die SM wird vorwiegend von CD4+ T-Zellen infiltriert, die IL-2, IL-17 und IFN- $\gamma$  produzieren. Diese sind entweder schon voraktiviert oder werden durch 1.) Kontakt mit dem MHC II von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ, in Verbindung mit einem arthritogenen (Auto-) Antigen), 2.) Kostimulation über CD80/CD28 oder 3.) Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-18) aktiviert. Durch Zell-Zell-Kontakt und Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) aktivieren diese T-Zellen Monozyten, M $\phi$  und SFB. M $\phi$  und SFB produzieren darauf hin verstärkt pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-15, IL-18), welche eine chronische Entzündung verursachen. Durch komplexe Signaltransduktionskaskaden aktivieren diese Zytokine matrixdegradierende Proteasen (MMP, Aggrecanasen, Kathepsine) sowohl in SFB, als auch in Chondrozyten, die zu einer Destruktion des Knorpels führen. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren die Expression von RANK auf der M $\phi$ -OF. Bei Kontakt mit RANKL-exprimierenden Zellen (T-Zellen, SFB) differenzieren die M $\phi$  dann zu Osteoklasten, die den subchondralen Knochen resorbieren/zerstören (modifiziert nach {8}).

### 1.4.1. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  spielt als pro-inflammatorisches Zytokin eine grundlegende Rolle in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen wie der RA {177} und wird hauptsächlich durch Monozyten/M $\phi$  produziert. Es wird als bioaktives, 26 kD großes, membrangebundenes Vorläufer-Molekül sezerniert und kann durch MMP-vermittelte Abspaltung als lösliches Molekül mit einem Molekulargewicht von 17 kD freigesetzt werden {178}. Die Wirkung von

TNF- $\alpha$  wird über die Bindung an den spezifischen OF-Rezeptor entfaltet. Der Rezeptor wird in zwei Varianten (55-60 kD TNF-R55 und 75-80 kD TNF-R75) auf der OF von vielen Zelltypen (Monozyten/M $\phi$ , SFB, T-Lymphozyten, Neutrophilen) exprimiert, wobei jeder Rezeptortyp einen anderen Signaltransduktionsweg induziert. Die Aktivierung des TNF-R55 initiiert Signale für Zytotoxizität, Fibroblastenproliferation sowie Zell-Adhäsion {179}. Membrangebundenes TNF- $\alpha$  spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des TNF-R75 bei Zell-Zell-Kontakt mit anderen Zellen, wie z. B. bei der T-Zellaktivierung {180-184}. Beide Rezeptortypen konnten auf SFB nachgewiesen werden, wobei der TNF-R55 stärker exprimiert wird {185}. Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten sind stark erhöht und korrelieren mit dem Schweregrad der Gelenkerstörung {186}. Durch TNF- $\alpha$  wird die Synthese weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren wie IL-6, IL-8 und PGE<sub>2</sub> in SFB induziert, wobei die Sekretion dieser Zytokine durch Zugabe von Anti-TNF- $\alpha$ -mAK gehemmt werden kann {185,187}. Weiterhin konnten Tiermodelle zeigen, dass TNF- $\alpha$  die Proteoglykanresorption erhöht und die Proteoglykansynthese aus dem Knorpel blockieren kann {188}. Die zentrale Rolle von TNF- $\alpha$  in der RA wird auch durch experimentelle Daten und Studien gestützt, die einen eindrucksvollen Erfolg von selektiven Immuntherapien mit Anti-TNF- $\alpha$ -AK oder rekombinantem TNF-R-Fusionsproteinen belegen {187,189}.

#### 1.4.2. IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  wird bei entzündlichen Prozessen in Gelenken hauptsächlich von M $\phi$  und Monozyten freigesetzt {190,191}. Es wird in der Zelle als Vorläufermolekül (Pro-IL-1 $\beta$ ) mit einem Molekulargewicht von 33 kD synthetisiert. Das biologisch inaktive Pro-IL-1 $\beta$  wird im Zytosol durch das spezifische „IL-1 $\beta$  converting“ Enzym (ICE, Cysteinprotease, Caspase-1) in die aktive Form (17 kD) gespalten und sezerniert {192}. Der IL-1-RA wird von M $\phi$ , Monozyten, Neutrophilen, Fibroblasten und Chondrozyten als ein 18-23 kD großes Protein gebildet {193}. Im Sinne eines kompetitiven Inhibitors bindet er an die IL-1-Rezeptoren und ist durch die Unterdrückung der Signalauslösung in der Lage, die Effekte von IL-1 $\beta$  zu hemmen {194}. IL-1 $\beta$  bindet an einen Komplex aus dem IL-1-Rezeptor I (IL-1-RI), dem IL-1-Rezeptor II (IL-1-RII) und dem IL-1-Rezeptor assoziierten Protein (IL-1-RAcP). Der Signal-übertragende IL-1-RI wird u. a. von T-Lymphozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und Endothelzellen exprimiert {195}, während der als regulatorische Untereinheit (sog. „decoy“-Rezeptor) dienende IL-1-RII vorwiegend auf B-Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen gefunden wird {190,196-198}. Bei RA-Patienten korreliert die IL-1 $\beta$ -Menge im Blut bzw. in der SM mit der aktuellen Krankheitsaktivität und mit radiologischen Veränderungen der Gelenke {199,200}. IL-1 $\beta$  trägt maßgeblich zum Fortschreiten der degenerativen Veränderungen in der RA bei, indem gewebstestruierende Enzyme (MMP-1 und MMP-3), chemotaktische Zytokine (IL-8) und weitere Entzündungsmediatoren (NO, PGE<sub>2</sub>) induziert werden {201-204}. Therapeutische Ansätze mit IL-1-RA in Tiermodellen und auch humanen Studien resultierten in einer verminderten Knorpel- und Knochenerosion und damit einem Rückgang der fortschreitenden Gelenkerstörung {205-208}. So konnte z. B. der Gentransfer in RA-SFB die Knorpelerosion in SCID-Mäusen vollständig verhindern {207,209}.



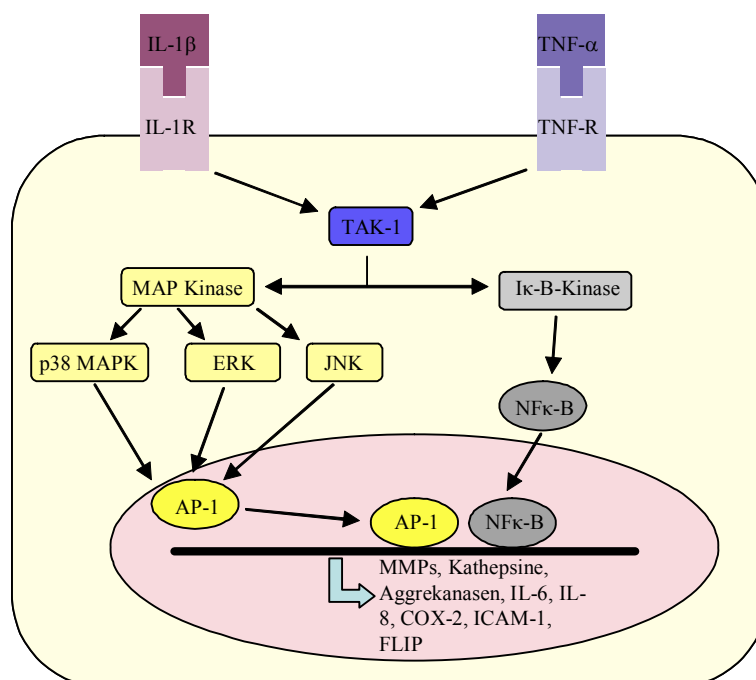
Während man normalerweise IL-1 $\beta$  in der Gelenkflüssigkeit in einer Konzentration von ca. 10 pg/ml findet {207,210}, konnten bei Patienten mit RA im Vergleich dazu mehr als 100 pg/ml nachgewiesen werden {211}. In der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten finden sich dagegen im Mittel IL-1 $\beta$ -Konzentrationen von 28 pg/ml {212}.

### 1.4.3. Kooperation von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ bei der Gelenkdestruktion

Durch Bindung der Zytokine an ihren jeweiligen Membranrezeptor wird die TAK-1 („transforming growth factor  $\beta$  activated kinase 1“) aktiviert {139}. Diese besitzt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung zweier Hauptsignaltransduktionswege {139,213}. Zum einen wird über den I $\kappa$ B-Kinase-Weg die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B induziert {214-216}. Zum anderen führt die Aktivierung des MAPK-Weges über die Phosphorylierung unterschiedlicher Kinasen (c-Jun N-terminal Kinase, JNK; extracellular signal-regulated kinase, ERK; p38-MAPK) {140,141} zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors AP-1 {142}. Über diese Signaltransduktionswege erfolgt die Aufrechterhaltung eines chronischen pro-inflammatorischen Zytokin-Milieus in der RA-SM, welches die Produktion von katabolischen Enzymen und pro-inflammatorischen Zytokinen auslöst und eine Apoptoseresistenz induziert [Abb. 6]. So führt die Stimulierung von RA-SFB mit IL-1 $\beta$  zur Induktion von NF- $\kappa$ B, welcher für die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6 und IL-8), Chemokinen und MMP verantwortlich ist {217-220}. In mit TNF- $\alpha$  stimulierten RA-SFB wurde über NF $\kappa$ B die Expression von anti-apoptotischem FLIP (Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$  converting enzyme-inhibitory protein) induziert und somit die Apoptose von SFB verhindert {221}. NF- $\kappa$ B ist in der SM von RA-Patienten aktiviert und reguliert entzündungsfördernde Gene (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, Cyclooxygenase-2, intercellular adhesion molecule) {222}. Auch die MAPK sind Schlüsselregulatoren der Zytokin- und MMP-Produktion. Alle drei (ERK, JNK und p38-MAPK) sind in der rheumatischen SM stark aktiviert {223}, mit der Konsequenz einer hohen AP-1-Bindungsaktivität bzw. einer Induktion seiner Bestandteile c-Jun und c-Fos {45}. AP-1 reguliert u. a. die Expression von MMP und Zytokinen, außerdem beeinflusst es auch die Zellproliferation in RA-SFB. So konnte durch Ausschaltung von c-Fos die Proliferation von SFB gestoppt werden {224}.

TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren über o.g. Signaltransduktionskaskaden die Expression von MMP, Aggrekanasen und Kathepsinen in M $\phi$ , SFB und Chondrozyten {225-230}. MMP und Kathepsine können ihrerseits Zytokine und Chemokine aktivieren und teilweise auch inaktivieren. Unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wird nicht nur die PG-Resorption durch Proteasen induziert, sondern gleichzeitig die PG- und Kollagensynthese des Knorpels reduziert {188,231,232}. Neben der Knorpelzerstörung kommt es auch zur Knochenerosion, indem TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Expression von RANK (Receptor activator of NF- $\kappa$ B) auf der M $\phi$ -OF induzieren. Bei Kontakt mit RANKL (RANK-Ligand)-exprimierenden Zellen (T-Zellen, SFB) differenzieren sie zu Osteoklasten, die den subchondralen Knochen resorbieren/zerstören können. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  können sich gegenseitig und andere Zytokine induzieren. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  können einzeln oder in Kombination mit IFN- $\gamma$  die Proliferation von SFB induzieren, welche wiederum entzündungsfördernde Prostaglandine produzieren können {233-236}. Durch TNF- $\alpha$  werden Chondrozyten zur Synthese von ROS

(reactive oxygen species) angeregt, wodurch der destruktive Prozess verstärkt wird {237}. Die erfolgreiche Anwendung von sog. „Biologicals“, wie Anti-TNF- $\alpha$ -AK, TNF-R-Fusionsproteinen und IL-1-RA in Tiermodellen der RA und auch in klinischen Studien am Patienten zeigen die Bedeutung von Zytokinen in der RA {175,189,238,239}. In tierexperimentellen Untersuchungen zeigte sich, dass der von TNF- $\alpha$  vermittelte Effekt v. a. in der Aufrechterhaltung der Entzündung liegt. IL-1 $\beta$  hingegen wird für die Gelenkzerstörung verantwortlich gemacht {240}.



**Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -abhängigen Signaltransduktionswege.** Nach Stimulierung mit TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  aktivieren die Multiproteinkomplexe der jeweiligen Receptoren TAK-1, welche ihrerseits die beiden Hauptsignalwege I $\kappa$ B-Kinase und MAP-Kinase aktivieren kann. Deren Aktivierung führt (bei der MAPK über p38-MAPK, ERK oder JNK) zur Rekrutierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder NF- $\kappa$ B. Diese können durch Bindung an Promotoren die Transkription von matrixdestruierenden Enzymen, pro-inflammatorischen Zytokinen und apoptoseregulierenden Faktoren steuern (nach {138}).

## 1.5. Knorpeldestruktions-Modelle

### 1.5.1. *In vivo*-Knorpeldestruktions-Modelle

Für die Untersuchung der Prozesse bei der Gelenkdestruktion wurden in der Vergangenheit zahlreiche *in vivo*-Tier-Modelle entwickelt. So kann bei der Adjuvansarthritis in geeigneten Rattenstämmen durch Injektion öligere Suspensionen verschiedener Mykobakterien eine schwere, symmetrische Polyarthrit in den Gelenken der Extremitäten induziert werden {241}. Neben einer starken Entzündungsreaktion kommt es durch ein aggressives Pannusgewebe zur massiven Knorpel- und Knochenerosion und schließlich zu einer völligen Versteifung der betroffenen Gelenke. Die Kollagen-induzierte Arthritis ist eines der ersten antigenspezifischen Tiermodelle der RA {242,243}. Die Immunisierung bestimmter Ratten- oder Mäusestämmen mit heterologem Kollagen II in komplettem Freund'schen Adjuvans induzierte (nach dem Auslösen mit einer Booster-Dosis) hierbei eine Arthritis. Es wurden

noch eine Vielzahl anderer Proteine identifiziert, die eine Arthritis induzieren können, wie z. B. Kollagen IX/XI, COMP und Aggrecan {244-246}. Durch gentechnische Methoden wurden in den letzten Jahren auch viele transgene Tiermodelle entwickelt, wobei entweder bestimmte relevante Gene ausgeknockt oder überexprimiert werden können. So entwickeln transgene Mäuse, die das humane TNF- $\alpha$  überexprimieren, eine schwere Arthritis, die unabhängig von T- und B-Zellen ist {247}. Eine spontane Arthritis entwickeln z. B. transgene Mäuse, die einen T-Zellrezeptor exprimieren, der ein Epitop der Glukose-6-phosphat-Isomerase erkennt {248,249}. Im SCID-Maus-Modell ist es möglich, das destruktive Potential von humanen Zellen und Gewebe zu untersuchen. Aufgrund eines fehlentwickelten Immunsystems haben diese Mäuse weder B- noch T-Lymphozyten und zeigen keine immunologischen Reaktionen gegenüber körperfremden Substanzen. Auf dieser Basis wurden unterschiedliche Transfer- und Koimplantations-Modelle zur Untersuchung der Knorpeldestruktion entwickelt. Hierfür werden humane SFB oder auch SM-Stücke zusammen mit humanem Knorpel unter die Nierenkapsel von SCID-Mäusen implantiert. Nach mehreren Wochen konnte die Matrixdestruktion histologisch beurteilt werden {40,250-252}. Es zeigte sich, dass isolierte RA-SFB bzw. SM den koimplantierten Knorpel wesentlich stärker zerstören, als dies bei Proben von OA-Patienten der Fall war.

Im Vergleich zu den *in vitro*-Modellen ist bei den *in vivo*-Modellen eine wesentlich längere Kulturdauer möglich, da die komplexe Versorgung von Matrix und Zellen wesentlich besser gewährleistet ist. So kann sich bereits die unterschiedliche Zusammensetzung der Kulturmedien (verschiedene Serumanteile) gegenüber der *in vivo* vorhandenen Synovialflüssigkeit entscheidend auf den Matrixmetabolismus auswirken {253}. Trotz der vielversprechenden Resultate, die mit *in vivo*-Modellen erbracht werden können, sind *in vitro*-Modelle außerordentlich wertvoll. *In vivo*-Modelle zeichnen sich durch einen hohen Zeit- und Kostenaufwand aus und sind nicht zuletzt auch ethisch problematisch. *In vitro*-Knorpeldestruktions-Modelle dienen dazu, Tiermodelle möglichst zu ersetzen und damit den Zeit- und Kostenaufwand zu reduzieren bzw. Tierexperimente zu vermeiden.

### 1.5.2. *In vitro*-Knorpeldestruktions-Modelle

In der Literatur sind bereits verschiedene *in vitro*-Knorpeldestruktions-Modelle zur Untersuchung von Gelenkkrankheiten beschrieben worden. Neben Variationen bezüglich der kokultivierten Zellen (komplette SM-Stücke, isolierte SFB unterschiedlicher Passagen und Reinheit, mit/ohne M $\phi$ ), der KK-Dauer und der ermittelten Destruktionsparameter, unterscheiden sich die einzelnen Modelle vor allem in der jeweils verwendeten Matrix.

#### 1.5.2.1. Modelle mit *in vitro* generierten Matrices

Von Tolboom et al. wurde in einem Transwellssystem die Invasion von RA-, OA- und Gelenkrauma (GT)-SFB entlang eines Serum- bzw. Synovialflüssigkeits-Gradienten in eine zellfreie Matrigel<sup>TM</sup>-Matrix untersucht {254}. Es wurden auch Modelle entwickelt, die auf dem Einsatz von Matrices beruhen, die von Chondrozyten generiert wurden.

Neidhardt et al. verwendeten eine Matrix, die durch dreidimensionale Vorkultur von isolierten Chondrozyten in Kollagen I-Schwämmen gebildet wurde {255}. Diese Matrix wurde mit SFB von RA- und OA-Patienten mit oder ohne M $\phi$  besiedelt und kokultiviert.

Eine weitere artifizielle Matrix wurde ebenfalls von Neidhardt et al. entwickelt. Dafür wurde boviner Knorpel in flüssigem Stickstoff pulverisiert, in einer Agaroselösung suspendiert und nach Polymerisation der Knorpel-Agarose-Matrix mit fibroblastenähnlichen Zellen aus der Synovialflüssigkeit kokultiviert {250}.

In dem Modell von Schultz et al. wurden die Chondrozyten in einem Fibringel vorkultiviert und die entstandene Matrix mit SM-Proben oder isolierten Synovialzellen von RA-, OA- oder GT-Patienten kokultiviert, wobei die KK-Konstrukte ebenfalls in ein Fibringel eingebettet waren {256}.

Die in den Modellen für die Gelenkknorpeldestruktion verwendeten Matrices weisen aufgrund der geringen Nähe zum nativen Knorpel zahlreiche Nachteile auf. Die Matrigel<sup>TM</sup>-Matrix enthält weder Knorpelmatrix-bildende Chondrozyten, noch entspricht deren Zusammensetzung (56% Laminin, 31% Kollagen IV, 8% Entactin) den Verhältnissen im natürlichen Knorpels (siehe Abschnitt 1.1.4.2). Zusätzlich besitzt Matrigel<sup>TM</sup>, wie auch die Matrices auf Fibrin- bzw. Kollagen I-Basis eine im Vergleich zum Knorpel geringere Dichte. Matrigel<sup>TM</sup> und Fibrin enthalten außerdem noch zahlreiche Wachstumsfaktoren oder Zellaktivatoren, die allgemein eine Matrixinvasion durch Zellen begünstigen können. Im Gegensatz zur zellfreien Matrigel<sup>TM</sup>-Matrix arbeiteten Schultz et al. und Neidhardt et al. mit *in vitro* von Chondrozyten gebildeter Matrix bzw. mit aus pulverisiertem Knorpel rekonstituierter Matrix, die jedoch im Vergleich zum nativen Knorpel weder einen zonalen Aufbau noch eine knorpelcharakteristische Verteilung und Ausrichtung von Matrixmolekülen aufzeigte. Sie sind daher als Modelle für die Destruktion von nativem Knorpel durch SFB wenig geeignet.

### 1.5.2.2. Modelle mit Knorpel

Im Destruktions-Modell von Wang et al. wurden 30 µm Kryostatschnitte von bovinem Knorpel als Trennmembran zwischen zwei Kammern verwendet, wobei in der oberen Kammer SFB von RA-, OA- und GT-Patienten in An- und Abwesenheit verschiedener Zytokine, MMP-Inhibitoren und Zytokin-Rezeptor-Antagonisten kultiviert wurden {257}.

In dem von Scott et al. publizierten Modell wurde ebenfalls mit nicht vitalem Knorpel gearbeitet {258}. Die humanen Knorpelproben wurden vor der KK mit SFB bzw. Haut-FB (mit oder ohne Mφ) eingefroren und auf 65°C erhitzt, um die Chondrozyten abzutöten.

Es wurden auch Destruktions-Modelle mit vitalem Knorpel entwickelt. Der eindeutige Vorteil bei der Verwendung von nativem Knorpelmaterial ist seine große Nähe zur *in vivo*-Situation. Die Chondrozyten sind in ihrer natürlichen Matrix eingebettet, wo sie in direktem Kontakt mit Makromolekülen und zellgebundenen Proteinen stehen und auf diese Weise ihren Phänotyp stabil beibehalten {259}. So benutzten Ermis et al. humane vitale, OF-begradigte Knorpelproben und kokultivierten diese mit Sphroiden aus synovialen Zellen {260}. Mit lebendem bovinen und humanem Knorpel arbeitete Schultz et al., indem Explantate aus dem Gelenkknorpel (bovin und human) oder dem nasalen Septum (bovin) mit SM-Proben in ein Fibringel einpolymerisiert wurden {256}. In einem ähnlichen Modell von Halliday et al. wurden bovine Gelenkknorpel-explantate mit hitzeaggregiertem IgG beschichtet und anschließend mit Granulozyten, Mφ und bovinen SFB kokultiviert {261}.

Humaner Knorpel ist meist nur aus Gelenkersatzoperationen bei schwerer OA oder RA erhältlich {65,77,262}. Die meist starke Schädigung der Knorpel-OF des humanen

Knorpelmaterials von OA-Patienten wirkt sich jedoch nachteilig auf die entsprechenden Destruktions-Modelle aus. So ist es bei der Verwendung solcher Gelenkknorpelimplantate unmöglich, durch histologische Analysen sicher zu unterscheiden, ob eine beobachtete Destruktion primär durch die KK mit SFB entstanden ist oder die SFB in eine bereits vorgeschädigte Zone des Knorpels eingewandert sind. Desweiteren besteht eine hohe Variabilität der Knorpelproben zwischen den einzelnen Knorpelimplantaten und Patienten z. B. bezüglich der OF-Qualität. Dies verhindert die notwendige Standardisierung des Destruktions-Modells. Durch eine OF-Begradigung (Modelle von Ernis et al. und Schultz et al.) bzw. eine KK auf den Schnittkanten lässt sich zwar dieses Problem umgehen, gleichzeitig ist es dann aber nicht möglich, die Destruktion der intakten OF zu untersuchen. Bei Modellen, in denen keine vitalen Chondrozyten vorhanden sind (Wang et al., Scott et al.) ist es nicht möglich, den in der *in vivo*-Situation maßgeblichen Beitrag der Chondrozyten zur Knorpeldestruktion zu erfassen. Insgesamt bestehen die grundlegenden Mängel der vorgestellten Matrices in der geringen Nähe zur *in vivo*-Situation.

Die kritische Betrachtung der bekannten Modelle und der verwendeten Matrices führte zur Entwicklung eines neuen *in vitro*-Knorpeldestruktionssystems in der AG Experimentelle Rheumatologie. Im Rahmen einer Diplomarbeit {263} wurden dafür die grundlegenden Bedingungen etabliert.

## 1.6. Ziele und Fragestellung

Entzündliche Gelenkerkrankungen wie die RA sind durch eine Zerstörung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und den Abbau des Gelenkknorpels gekennzeichnet. Bei der RA sind aktivierte SFB des Pannusgewebes wichtige Mediatoren der Gelenkdestruktion. Ihre genaue Rolle bei den Knorpelabbauprozessen im Gelenk ist jedoch nicht eindeutig geklärt, da auch eine intrinsische Zerstörung der EZM des Knorpels durch die ortsständigen Chondrozyten diskutiert wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die relative Bedeutung von RA-SFB und Chondrozyten bei der Knorpeldestruktion zu untersuchen. Dafür sollte ein in den Grundlagen etabliertes *in vitro*-Knorpeldestruktions-Modell modifiziert/optimiert und bezüglich der Anwendbarkeit verschiedener Parameter der Destruktion analysiert werden. Weiterhin war für das zu entwickelnde Modell bedeutsam, dass möglichst frühe, initiale Stadien der Gelenkdestruktion simuliert werden können. Deshalb wurde ungeschädigte Knorpelmatrix eingesetzt und mit entsprechend sensitiven Methoden nach der KK mit SFB untersucht. Dabei sollte die Kultivierungsdauer möglichst kurz gehalten werden, um eine potenzielle Anwendung als Screening System zu ermöglichen. Um eine Standardisierung zu gewährleisten, sollte die Besiedlungsfläche des Knorpels normiert werden und durch die Einbettung des Knorpels sollten die kokultivierten SFB vor auftretenden Scherkräften beim Mediumwechsel geschützt werden.

Die den Destruktionsprozess der RA begleitende starke Entzündung sollte durch den Zusatz der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zu den *in vitro*-Kulturen simuliert werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Untersuchung des Zusammenwirkens von SFB und Knorpel in der KK gerichtet werden, die sich auch *in vivo* in enger räumlicher Nähe befinden sowie wahrscheinlich beide maßgeblich an der Destruktion beteiligt sind.

Als Kontrollgruppe für die RA-SFB sollten SFB aus einer degenerativen Gelenkerkrankung ohne primäre Entzündung (OA-SFB) untersucht werden.

Zum Erreichen der o. g. Ziele sollte ein *in vitro*-Knorpeldestruktions-Assay mit isolierten SFB von RA- und OA-Patienten sowie bovinem Gelenkknorpel etabliert und die Kultur mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimuliert werden. Um eine möglichst umfassende Analyse der induzierten Vorgänge zu gewährleisten, sollte eine Vielzahl von Parametern des Knorpeldestruktionsprozesses untersucht werden:

- Proteoglykan-Abbau – Nachweis im Knorpel und im Kulturüberstand
- Expression von Aggrekan-degradierenden Proteasen (Aggrekanasen)
- Neosynthese von Aggrekan (dem Hauptproteoglykan des Knorpels)
- Kollagen-Abbau - Nachweis im Knorpel und im Kulturüberstand

- Expression von Kollagen- bzw. Matrix-degradierenden MMP und ihren Inhibitoren (TIMP)
- Neosynthese von Kollagen
- Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen
- Morphologische Veränderungen der Knorpelintegrität und der SFB
- Matrixerosion (Invasion durch RA-SFB)

Das entwickelte *in vitro*-Modell sollte unter standardisierten Bedingungen die Untersuchung der Wirkung von SFB auf den Knorpel mit oder ohne Stimulation ermöglichen. Dabei gewonnene Kenntnisse über die Prozesse in SFB und Knorpelgewebe und deren Interaktionen sollten die Basis für gezielte Modulation der Funktion von SFB bilden (z. B. durch Transfektion mit inhibitorischen Molekülen, durch siRNA-Technik zur Hemmung pro-inflammatorischer/pro-destruktiver Moleküle sowie durch Applikation von Wirkstoffen). Die mögliche Anwendung des Modells im Hochdurchsatz-Verfahren soll langfristig die Überprüfung neuer therapeutischer Ansatzpunkte zur Behandlung der Knorpelerosion bei der RA ermöglichen.

## 2. MATERIAL UND Methoden

### 2.1. Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmittel, Medien und Lösungen

Die Listen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmittel, Medien und Lösungen befinden sich im Anhang (Seiten I bis VII).

### 2.2. Patienten

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben von RA- und OA-Patienten wurden im Verlauf von Gelenkersatzoperationen, arthroskopischen Eingriffen oder Synovektomien in der Orthopädischen Klinik des Waldkrankenhauses „Rudolf Elle“ in Eisenberg gewonnen. Die Patienten erklärten sich im Vorfeld mit der weiteren Verwendung des Zellmaterials für wissenschaftliche Zwecke einverstanden. Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt (Bearbeitungs-Nr. 0256-5/99).

Die Klassifizierung der Patienten erfolgte nach den Kriterien des American College of Rheumatology für die RA {9} und den entsprechenden Kriterien für die OA {264}.

In der im Anhang auf Seite VIII befindlichen Tabelle 1 sind die klinischen Daten der Patienten zusammengefasst, deren Proben in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden.

### 2.3. Kultur und Reinigung von SFB

Die Aufarbeitung der Gewebeproben wurde routinemäßig in der AG Experimentelle Rheumatologie durchgeführt. Nach der Entnahme der SM im Operationsaal wurde die zerkleinerte Probe sequentiell mit Trypsin und Kollagenase-P verdaut und die vereinzelt Zellen für 24 h kultiviert. Die nicht-adhärenenten Zellen, hauptsächlich bestehend aus T- und B-Zellen, wurden mit dem ersten Mediumwechsel entfernt. Die Primärkultur, bestehend aus SFB und M $\phi$ , wurde nach 7-tägiger Kultur mit Trypsin abgelöst und es erfolgte die Negativreinigung der SFB. Dazu wurden Magnetobeads-gekoppelte AK gegen das M $\phi$ -spezifische OF-Molekül CD 14 eingesetzt. Auf diese Weise wurden die SFB sehr effizient von den CD 14-positiven M $\phi$  getrennt und eine zu 98% reine SFB-Negativfraktion aus der Primärkultur gewonnen {31}. Die Population der Magnetobeads-gebundenen Zellen enthielt ca. 95% M $\phi$  und wurde zum Einsatz in anderen Projekten eingefroren. Die Reinheit der isolierten Fibroblastenpopulation wurde routinemäßig durch FACS-Analysen überprüft und dokumentiert. {265}.

#### *Mycoplasmentest*

Alle angelegten Zellkulturen wurden nach Standardprotokoll mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI auf im Cytoplasma vorliegende Mycoplasmen-DNA getestet. In nicht eindeutig DAPI-negativen Fällen wurde DNA aus dem Überstand von Zellkulturen gewonnen und eine mycoplasmaspezifische PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Primer upstream: CC(A/T)A(C/T)(A/T/C)GTTC(G/T)(A/T)CCACCTTCAC-G(A/G)AT

Primer downstream: AC(A/T/C)GG(A/T)GCTGC(A/T/C)CAA-ATGGA(C/T)GG

initiale Denaturierung: 3 min/95°C; 40 Zyklen: Denaturierung: 1 min/94°C - Annealing: 1 min/50°C - Elongation: 2 min/72°C. Die Ergebnisse dieses Mycoplasmen-Nachweises waren



für alle verwendeten Kulturen negativ.

### **Einfrieren und Auftauen der SFB für die Zellkultur**

Da das Versuchsdesign und die zeitliche Planung der Experimente es notwendig machte, mehrere SFB-Populationen gleichzeitig zur Verfügung zu haben, wurde die Verwendung zwischenzeitlich eingefrorener SFB favorisiert. Zum Einfrieren wurden die SFB nach der Negativreinigung bei 197 x g für 3 min abzentrifugiert, in 1 ml fötalem Kälberserum (FKS)/10% DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Versuche wurden die Kryoröhrchen nach kurzem Abdampfen des flüssigen Stickstoffs bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und dann langsam über 10 min mit 10 ml angewärmtem D10F+ verdünnt. Die Zellsuspension wurde darauf hin zweimal durch Zentrifugation bei 197 x g für 3 min und Resuspension in 15 ml D10F+ gewaschen. Die SFB wurden mit einer Zellzahl von  $0,7 \times 10^6$  in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ausgesät und bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> weiter kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium erstmals gewechselt, später dreimal wöchentlich. Um SFB zu erhalten, die möglichst nahe dem *in vivo*-Phänotyp im Synovialgewebeverband entsprechen, wurden ausschließlich hochreine SFB der 1. bzw. 2. Passage verwendet.

## **2.4. Etablierung des *in vitro*-Destruktionssystems**

### **2.4.1. Präparation des Rinderknies**

Zur Gewinnung des bovinen Knorpelmaterials wurden Rinderkniegelenke der Agrargenossenschaftsfleischerei Walpernhain verwendet. Bei den Rindern handelte es sich um die Rasse „Schwarzbunte“ mit einem Alter zwischen zwei und drei Jahren. Alle Rinder wurden am Vortag der Präparation im Schlachthof Jena geschlachtet. Die Rinderhälften wurden dann im Kühlraum gelagert. Alle Rinder wurden negativ auf das Prion-Protein Prp<sub>sc</sub> getestet und zum Verzehr freigegeben.

Der von Muskelfleisch grob gereinigte Femur wurde in einen Kettenschraubstock eingespannt, die Gewinnung des Knorpelmaterials erfolgte dann mit einem sterilen Präparierbesteck. Mit einem Skalpell wurden die Seitenbänder (*Ligamentum collaterale laterale*) und die Patellarsehnen (*Ligamentae patellae* und *Ligamentum femoropatellare laterale*) durchtrennt. Nach Entfernen des übrigen Gewebes um den Gelenkspalt konnte nun die Tibia mitsamt der Patella nach hinten weggeklappt werden. Nach dem Durchtrennen der dann zugänglichen Kreuzbänder (*Ligamentum cruciatum anterius & - posterius*) wurde das Tibiaplateau vom Femur getrennt. Für die Präparation der Knorpelstanzen wurden die seitlichen Bereiche der Patella-Lauffläche (*Facies patellaris*, FP) gewählt. Aufgrund häufig auftretender arthrotischer Veränderungen (faseriger Knorpel) wurden die Mittelspalte der *Facies patellaris*, das Tibiaplateau und die Femurkondylen nicht als Knorpelquelle verwendet [Abb. 7 und 8].

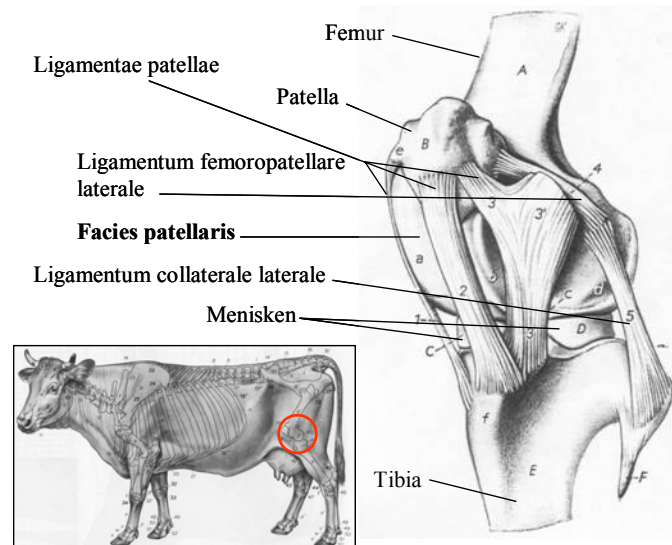


Abbildung 7: Anatomische Lage und Aufbau des Rinderkniegelenks aus {266}

Aus der FP wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze (Innendurchmesser: 3 mm) mehrere Knorpelzylinder gestanzt. Diese Zylinder wurden dann mit einem Skalpell in einer Tiefe von ca. 1 mm parallel zur OF vom darunter liegenden Knorpel abgeschnitten und in eine Petrischale mit sterilem PBS überführt [Abb. 8]. Mit einer Präparation konnten bis zu 85 Knorpelscheiben gewonnen werden.

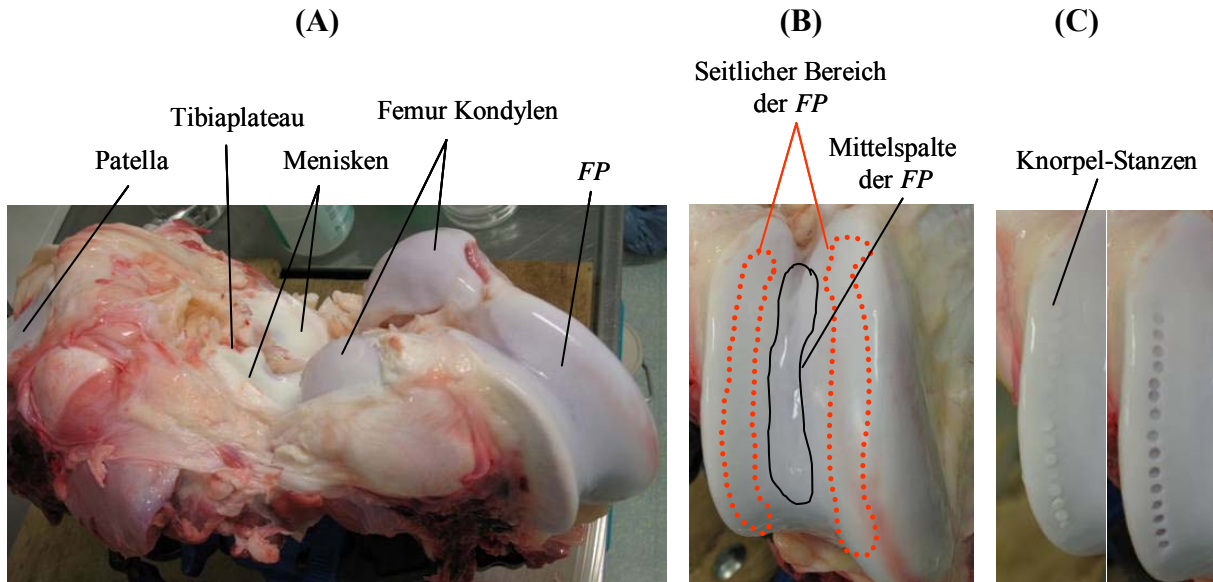


Abbildung 8: Präparation der Knorpelstanzen aus dem bovinen Kniegelenk. Für die Knorpelpräparation wurde das Gelenk eröffnet (A) und aus dem seitlichen Bereich der FP (B) mithilfe einer Biopsiestanze Knorpelzylinder entnommen (C). Die Mittelspalte der FP (B), die Femur-Kondylen und das Tibiaplateau (A) wurden aufgrund von häufigen arthrotischen Knorpelveränderungen nicht zur Knorpelgewinnung genutzt.

### 2.4.2. Plattenherstellung

Die präparierten Knorpelscheiben wurden bezüglich des Entnahmeortes auf der FP randomisiert, um Unterschiede zwischen den Entnahmestellen wie z. B. die Chondrozytendichte bzw. die Knorpelscheibendicke gleichmäßig über alle Probengruppen zu verteilen. Um ein verlässliches und standardisiertes Destruktions-Modell zu entwickeln, wurden folgende Anforderungen an das System gestellt:

- Gelenkknorpel ohne OF-Schädigung, d. h. mit intakter OF
- Zuverlässige Fixierung des Knorpelimplantats
- KK mit SFB ausschließlich auf der Knorpel-OF (nicht auf den Schnittkanten)
- Normierte/definierte Besiedlungsfläche
- Schutz der kokultivierten SFB vor Scherkräften beim Mediumwechsel
- Ausreichende Nährstoffversorgung des Knorpels und der SFB

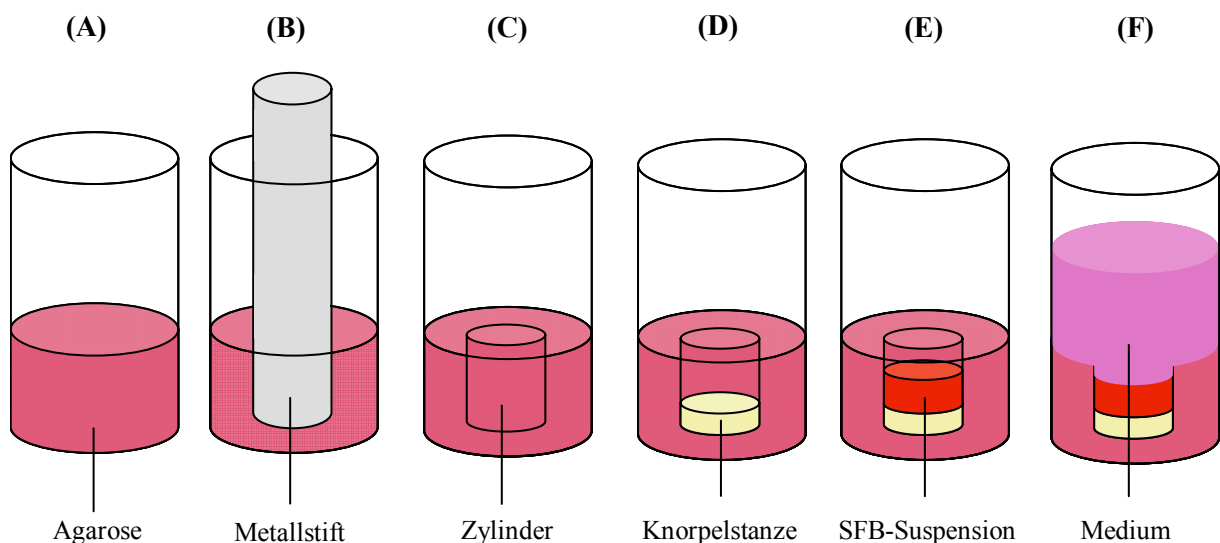
Durch die Präparationstechnik konnten Knorpelzylinder mit einem definierten Durchmesser und einer intakten OF gewonnen werden. Für die Einbettung der Knorpelimplantate wurde eine Metallstiftplatte entworfen und in der Zentralwerkstatt der FSU Jena angefertigt, mit deren Hilfe eine optimale Einbettung der Knorpelstanzen möglich wurde. Auf der Basis einer 48-Lochplatte wurden Metallstifte mit einem Durchmesser von 2,8 mm ( Durchmesser der präparierten Knorpelstanzen: 3 mm) in eine Plexiglasplatte eingearbeitet und so positioniert, dass sie exakt in die Mitte der Löcher der 48-Lochplatte ragten, wobei 2 mm Freiraum zwischen dem planen Kopf der Metallstifte und dem Lochboden blieben.

Zum Einbetten der Knorpelstanzen wurden in jedes Loch 450 µl einer 2%-igen Agaroselösung gefüllt (50% Wasser und 50% KK-Medium). Anschließend wurden die Metallstifte in die heiße Agarose getaucht und nach Polymerisieren der Agarose senkrecht entnommen, wobei ein definierter Zylinder (d: 2,8 mm h: 6 mm) in der verfestigten Agarose entstand. In diesen konnten die präparierten Knorpelstanzen mit der intakten OF nach oben orientiert eingebettet werden. Auf diese Weise waren die Knorpelstanzen fixiert, die Schnittkanten durch die Agarose abgedichtet und es entstand ein definierter Zylinder über den eingebetteten Knorpelscheiben für die Besiedlung mit SFB [Abb. 9]. Die bestückten 48-Lochplatten wurden dann für 48 h bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> mit jeweils 450 µl KK-Medium kultiviert.

### 2.4.3. Kokultur von bovinem Knorpel mit humanen SFB

Zur Vorbereitung auf die KK mit dem Knorpel wurden die SFB für 24 h in einem Medium kultiviert, welches zu gleichen Teilen aus dem Fibroblasten-Medium (D10F+) und dem für die anschließende KK verwendeten KK-Medium bestand. Die Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von 80–100% kultiviert, einmal mit PBS gewaschen, für 5 min in 0,25%-iger Trypsin-Lösung von der Kulturschale abgelöst und dann in KK-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, die Zellsuspension anschließend bei 197 x g für 3 min zentrifugiert und durch Zugabe von KK-Medium auf eine Konzentration von  $2 \times 10^4$  SFB/25 µl eingestellt. Nach Einbettung der Knorpelscheiben in den 48-Lochplatten und 48-stündiger Vorkultivierung wurde das KK-Medium über dem Knorpel entfernt. Dann wurden 25 µl der Fibroblastensuspension direkt in den Zylinder über der eingebetteten Knorpelscheibe auf die nun freiliegenden, feuchten Knorpelscheiben pipettiert.

Die Zellsuspension wurde dann für 3 h bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> vorkultiviert, um den SFB Gelegenheit zur initialen Adhärenz auf den Knorpelscheiben zu geben. Danach wurde das Loch mit 550 µl KK-Medium aufgefüllt [Abb. 9]. Dies stellte den Zeitpunkt 0 der KK dar. Im Weiteren wurden die SFB auf den Knorpelscheiben kultiviert, das Medium erstmalig nach 72 h abgenommen und bei -70°C eingefroren. Der Versuchsbeginn war nach 48 h Vorkultur ohne Zellen jeweils freitags. Jeweils montags, mittwochs und freitags wurde der Kulturüberstand entweder durch 450 µl/Loch (montags und mittwochs) oder 550 µl/Loch (freitags) frisches, vorgewärmtes KK-Medium ersetzt. Die Kultur wurde bei 37°C und 5% (v/v) CO<sub>2</sub> über die entsprechenden Versuchszeiträume fortgeführt. Die Überstände der jeweiligen Kulturen wurden wochenweise vereinigt (insgesamt 1450 µl Überstand) und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C eingefroren und gelagert.



**Abbildung 9: Einbettung der Knorpelstanzen und Besiedlung mit SFB.** In das Loch einer 48-Lochplatte wurde heiße, flüssige 2%-ige Agarose gefüllt (A); durch Eintauchen des Metallstiftes (B) entstand nach Verfestigung der Agarose und dem Entnehmen des Metallstiftes ein Zylinder (C), in welchen die präparierten Knorpelstanzen eingebettet wurden. Die Applikation der SFB-Suspension erfolgte ausschließlich über der Knorpelstanze (E). Nach Absetzen und Adhärenz der SFB für 3 h wurde das Loch mit Medium aufgefüllt (F).

#### 2.4.4. Stimulation mit TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$

Die SFB wurden für 14 d bzw. 42 d (für die Langzeit-KK) auf den ausgestanzten Rinderknorpelscheiben kultiviert, und zwar entweder unstimuliert oder unter Zugabe von IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) oder der Kombination von IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml). Die zur Stimulation benutzte Konzentration der Zytokine wurde in Anlehnung an Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe gewählt. Bei entzündlichen Prozessen werden normalerweise geringere Konzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen freigesetzt. Diese wirken jedoch über Jahre hinweg und können so eine degenerative Zerstörung des Knorpelgewebes verursachen. Um Effekte in einem Kurzzeit-*in vitro*-Modell zu beobachten, wurden die eingesetzten Zytokine in wesentlich höheren Konzentrationsbereichen eingesetzt. Die Zytokinstimulation der SFB wurde über die gesamte KK-Dauer hinweg durchgeführt. Die verwendeten Zytokine können spezieübergreifend sowohl auf die humanen SFB als auch auf die bovinen Chondrozyten wirken {267}.

#### **2.4.5. Fluoreszenzmarkierung der SFB**

Die SFB wurden 24 h vor Beginn des KK-Experiments mit dem intrazellulären Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) markiert. CFSE ist ein unpolares Molekül, welches spontan die Zellmembran passiert, intrazellulär durch Esterasen in anionisches CFSE konvertiert wird und anschließend irreversibel an zelluläre Proteine bindet. Das Fluoreszenzsignal der markierten Zellen ist über mehrere Monate stabil, wobei proliferierende Zellen die Markierung unter den Tochterzellen gleichmäßig aufteilen. Zur Markierung wurden die SFB bis zu einer Konfluenz von 80-90% kultiviert, mit PBS gewaschen und mit 5  $\mu$ M CFSE in PBS bei 37°C für 15 min inkubiert. Die CFSE-Lösung wurde dann durch frisches Medium ersetzt und die SFB für weitere 24 h bis zum Beginn des KK-Experiments kultiviert. Während dieser Zeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff intrazellulär hydrolysiert und membran-impermeabel. Die CFSE-Markierung der SFB Monolayerkultur konnte am Fluoreszenzmikroskop überprüft werden.

#### **2.4.6. Inaktivieren der Chondrozyten durch Schockgefrieren**

Durch einmaliges Einfrieren der frisch präparierten Knorpelimplantate bei -70°C für 12 h wurden die Chondrozyten schockgefroren und damit abgetötet. Die so behandelten Knorpelproben wurden nach dem Auftauen mit SFB besiedelt und wie für die Stimulationsexperimente beschrieben über 14 d kultiviert. Die Abwesenheit vitaler Chondrozyten konnte histologisch durch die fehlende Anfärbung der Chondrozytenkerne mit Hämatoxylin nachgewiesen werden.

### **2.5. Histologische Untersuchungen**

#### **2.5.1. Aufbereitung der Knorpelscheiben für histologische Untersuchungen**

Der gesamte, die Knorpelscheibe umgebende Agarose-Zylinder wurde mit Hilfe einer Federstahlpinzette aus der 48-Lochplatte entnommen. Nach dem Aufschneiden der Seitenkanten konnte der Agarosezylinder aufgeklappt und die Knorpelscheibe von der Unterseite mit einem Feinwägespatel aufgenommen werden. Die auf der Knorpel-OF befindliche Fibroblastenschicht blieb somit unversehrt. Die Knorpelscheibe wurde dann in Cryomold-Formen (1 x 1 cm) mit Einbettmedium überführt. Die Form wurde anschließend in mit Flüssigstickstoff gekühltem Isopentan eingefroren. Die Gefrierschnittblöcke wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert. Von den in Einbettmedium eingefrorenen Knorpelscheiben wurden mit Hilfe eines Kryostat-Mikrotoms 8-12  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte hergestellt. Die Knorpelscheiben wurden von den Seitenflächen der Knorpelscheibe in senkrechter Orientierung zur Knorpel-OF geschnitten, da bei einer parallel zur OF orientierten Schnittrichtung eine starke artifizielle Spaltbildung zwischen Fibroblastenschicht und Knorpel-OF zu beobachten war. Die Schnitte wurden auf Objektträger übertragen und für die histologischen und immunhistologischen Färbungen luftgetrocknet. Wenn die histologische Aufarbeitung nicht innerhalb von 24 h nach dem Anfertigen der Gefrierschnitte erfolgte, wurden diese bei -20°C gelagert.

## 2.5.2. Histologische Färbungen

### Safranin-O-/Lichtgrün-Färbung

Zur lichtmikroskopischen Darstellung des PG-Gehaltes der Knorpelimplantate wurden die getrockneten Schnitte bei Raumtemperatur für 10 min mit Safranin-O-Lösung gefärbt. Nach einem Waschschriff in destilliertem Wasser wurden die Präparate für 15 min in Lichtgrün-Lösung gegengefärbt.

### Hämatoxylin-/Eosin-Färbung

Die Präparate wurden bei Raumtemperatur für 10 min in einer Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Sie wurden dann in fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend für 10 min in Leitungswasser gebläut. Es folgte eine Gegenfärbung für 3 min bei Raumtemperatur mit einer Eosin-Lösung.

Die Safranin-O/Lichtgrün und Hämatoxylin/Eosin gefärbten Knorpelschnitt-Präparate wurden anschließend durch 30-sekündige Schritte in einer aufsteigendem Alkoholreihe (70%, 96%, 96%) entwässert. Nach drei weiteren Bädern in Xylol wurden die Präparate mit Xylol-verdünntem Kanadabalsam eingedeckt.

## 2.5.3. Immunhistologische Färbungen

Die über Nacht (ü. N.) getrockneten Gefrierschnitte wurden in Abhängigkeit vom verwendeten AK entweder in frisch angesetztem 4%-igen Paraformaldehyd/PBS oder aber in Aceton für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Bei Verwendung der Peroxidase-Technik wurde die endogene Peroxidase-Aktivität des Probenmaterials durch 10-minütige Inkubation mit 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol geblockt. Überschüssiges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol wurde durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt. Für die Detektion von COMP, Aggrecan und dem Kollagenabbau-Neoepitop wurden die Proben mit 0,25 U/ml Chondroitinase ABC für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Der partielle Verdau der chondroitinsulfathaltigen PG-Seitenketten führte zur Freilegung der Epitope, welche im Anschluss durch die spezifischen AK detektiert werden konnten. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden die Gefrierschnitte mit einem Fettstift (Dako-Pen) eng umrahmt, um den Bedarf an AK zu minimieren und das Abfließen von Inkubationslösungen zu verhindern. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 10% Serum/PBS für 15 min blockiert. Dafür wurde das Serum der Spezies verwendet, aus der der Sekundär-AK stammte. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit 30 µl primärem AK bzw. Isotypkontroll-AK überschichtet (Verdünnungen in Tabelle 4) und dann für 1 h bei RT bzw. ü. N. bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS. Die Schnitte wurden dann mit 50 µl Sekundär-AK bedeckt und erneut für 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundär-AK war entweder mit HRP oder mit AP konjugiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBS wurden die Enzyme mit einer Färbelösung entwickelt. Für die Peroxidasetechnik wurde entweder DAB (Diaminobenzidin; braune Farbreaktion) oder AEC (3-Amino-9 Ethylcarbazol; rote Farbreaktion) als Substrat verwendet. Für AP konjugierte Sekundär-AK wurde das Substrat FastBlue-BB eingesetzt (blaue Farbreaktion). Nach ausreichender Farbentwicklung unter Sichtkontrolle wurden die Schnitte nochmals mit PBS gewaschen und nach einer Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin mit dem wässrigem Eindeckmittel Aquatex eingedeckt.

**Tabelle 4: Zusammenstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären AK/Isotyp-AK für immunhistochemische Darstellungen.**

Antigen	Isotyp	Klon	Angewandte Konzentration
Anti-human Thy-1 (CD90); Fibroblastenmarker	Maus IgG <sub>1</sub>	AS02	20 µg/ml
Anti-human Prolyl-4-hydroxylase; Kollagen-produzierende Zellen; u. a. SFB	Maus IgG <sub>2a</sub>	3-2B12	15 µg/ml
Anti-Neoaggrekan	Maus IgG <sub>1</sub>	HAG7D4	10 µg/ml
Anti-COMP, Knorpelabbaumarker	Kaninchen IgG		20 µg/ml
Anti-C12C; Kollagen-Neoepitop	Kaninchen IgG		20 µg/ml
Anti-human-MMP-3	Maus IgG <sub>1</sub>	50647	10 µg/ml
Anti-human-MMP-9	Kaninchen IgG		10 µg/ml
Anti-human-Glukoseoxidase (Isotyp-Kontrolle)	IgG <sub>1</sub>	DAK-GO1	10-20 µg/ml
Anti-human-Glukoseoxidase (Isotyp-Kontrolle)	IgG <sub>2a</sub>	DAK-GO2	15 µg/ml
unspezifisch	Kaninchen IgG		10-20 µg/ml

#### 2.5.4. Dokumentation der histologischen Präparate und Vermessung der Knorpelscheibenhöhe

Die gefärbten Präparate wurden mit einem Axiophot-Mikroskop begutachtet und mit Hilfe einer AxioCam HRC-Digitalkamera und der AxioVision Software dokumentiert und ausgewertet. Mit Hilfe der AxioVision Software wurde in Aufnahmen von Hämatoxylin/Eosin gefärbten Proben die Knorpelscheibenhöhe vermessen, um die jeweilige Dicke der Knorpelscheibe für die Normalisierung der PG-Verluste aus den Knorpelscheiben zu benutzen, die durch den DMB-Assay (s. 2.7.) bestimmt wurden.

#### 2.5.5. Quantifizierung des PG-Verlustes in den histologischen Schnitten

Die mit Safranin-O/Lichtgrün gefärbten Gefrierschnitte wurden mit einer Übersichtsaufnahme in 40 x Vergrößerung fotografiert und anschließend mit der Software DatInf.measure im Hinblick auf den PG-Verlust aus den Knorpelproben ausgewertet. Dazu wurde für jeden histologischen Schnitt individuell die Gesamtfläche des Präparates und die Fläche der Safranin-O-positiven Areale vermessen und aus beiden Werten der prozentuale Anteil Safranin-O-negativer Fläche als Ausdruck des relativen PG-Verlustes berechnet.

#### 2.5.6. Präparation der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Knorpelproben wurden entweder sofort nach der Entnahme oder nach der Kultur mit 2% Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,2 für 72 h fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Cacodylatpuffer wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und für die REM Aufnahmen präpariert. Dazu wurden die Präparate in der Kammer eines Kritischpunkttrockners mit CO<sub>2</sub> getrocknet und in einem „Sputter coater“ unter Argon 20-40 nm dick mit Gold beschichtet. Die Objekte wurden im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

#### 2.5.7. Präparation der Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Knorpelproben wurden nach der Kultur mit 4% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 bei RT für 72 h fixiert. Anschließend erfolgte die erste Kontrastierung der Proben mit

1% Osmium(VIII)-oxid in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,2 für 2 h. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,2 für jeweils 20 min wurden die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert. Die zweite Kontrastierung erfolgte durch die Inkubation der Proben mit 2% Uranylazetat in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,2 für 2 h und anschließendem Waschen mit Propylenoxid. Durch die Anwendung einer aufsteigenden Araldit-Reihe (Araldit in Propylenoxid) wurden die Proben mit Araldit infiltriert. Die in Araldit eingebetteten Proben polymerisierten im Brutschrank bei 60°C für 48 h. Zum Auffinden interessanter Bereiche für die Elektronenmikroskopie wurden am Ultramikrotom 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und für 15 min in Richardson-Färbelösung (0,25% Periodsäure; 0,25% Azur II, 0,5% Methylenblau) bei 60°C im Brutschrank gefärbt. Durch Trimmen des Probekästchens und Anfertigen von 60 µm Ultradünnschnitten wurden ausgewählte Bereiche der Probe für die Elektronenmikroskopie herausgearbeitet und auf Kupfer-Gitter überführt. Eine dritte Kontrastierung der Probe erfolgte durch die fünfminütige Inkubation der Ultradünnschnitte mit einem Mix aus 80 mM Na-Zitrat, 40 mM Bleinitrat und 40 mM NaOH. Die Proben konnten anschließend an einem Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden.

### **2.5.8. Probenvorbereitung für die konfokale Laserscanningmikroskopie (LSM)**

Die LSM ermöglicht hochauflösende Aufnahmen von Strukturen und Zellen ohne eine vorherige Fixierung. Dadurch ist es möglich, lebende Zellen zu visualisieren sowie Zell-Adhäsion, Zellform, Vitalität der Zellen bzw. deren invasives Wachstum in bestimmte Matrices zu untersuchen.

Nach dem KK-Experiment wurden die Proben in kleine mit PBS gefüllte Petrischalen überführt und am LSM untersucht. Hierbei wurde das Fluoreszenzsignal der (mit CFSE markierten) kokultivierten SFB bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von  $530 \pm 30$  nm detektiert. Im gleichen Messvorgang wurde mit Hilfe eines Spiegel-Splitters auch das Reflektionssignal des nicht fluoreszenzmarkierten Knorpels in einem zweiten Detektorkanal gemessen. Anschließend konnte durch die Gerätesoftware eine dreidimensionale Darstellung der Messdaten generiert werden, wobei sowohl Fluoreszenz- als auch Reflektionssignal integriert wurden.

## **2.6. mRNA-Analyse im Knorpel und den SFB**

### **2.6.1. RNA-Isolierung aus kokultivierten SFB**

Für die RNA-Isolation aus der mit dem Knorpel kokultivierten SFB-Schicht wurden initial Versuche durchgeführt, die SFB mittels Laser-Mikrodissektion zu gewinnen. Auf diese Weise konnte erfolgreich RNA der SFB-Schicht isoliert werden. Allerdings mussten dazu große Mengen an Serienschnitten (30-40 Schnitte pro Probe) mit entsprechend hohem Zeitaufwand verarbeitet werden. Diese Technik ist für einzelne ausgewählte Proben äußerst interessant (z. B. um Zellen aus unterschiedlichen Zonen der SFB-Schicht zu isolieren), für statistisch auswertbare Versuche war diese Technik jedoch zu aufwendig. Daher wurde für die Gewinnung von RNA für die „real-time“ RT-PCR-Analyse eine alternative Strategie verfolgt.



### **RNA-Isolierung aus der SFB-Schicht**

Die Isolation von RNA aus den SFB ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, da nur aktuell in der Zelle transkribierte Gene in diesem Moment als mRNA vorliegen. Da RNA im Gegensatz zu DNA sehr instabil ist, müssen die sehr stabilen RNasen möglichst schnell von der RNA getrennt werden. Alle Methoden zur RNA Isolierung beruhen darauf, die Zellen in einer chemischen Umgebung zu lysieren und weiterzuverarbeiten, in der die RNasen möglichst schnell denaturiert werden. Anschließend wird die RNA von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt (Proteine, DNA). Aufgrund der geringen Ausgangsmenge an Zellmaterial ( $2-4 \times 10^4$  Zellen pro Knorpelscheibe) wurde die RNA-Isolation mit dem speziell für kleine RNA-Mengen entwickelten RNeasy Micro Kit durchgeführt. Nach Beendigung der KK wurden jeweils zwei Knorpelscheiben mit den darauf kultivierten SFB in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Lysispuffer überführt. Dem Lysispuffer wurden vorher 40 ng carrier-tRNA beigelegt, um einen Verlust von RNA durch unspezifische Bindung an die Gefäßwände zu vermeiden. Nach 30 s Vortexen wurde die Knorpelscheibe mit einer Pinzette entnommen und dreimal mit PBS gewaschen, um ein Verschleppen von RNA der SFB in die Knorpel-RNA zu verhindern (die Knorpelproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt). Anschließend wurden 200 µl 70%-iger Ethanol zum Zelllysat pipettiert und die Probe gemischt. Nach dem Überführen in eine RNeasy MinElute Spin Column wurde die Probe für 15 s mit  $8000 \times g$  zentrifugiert. Dabei bindet sämtliche in der Probe enthaltene RNA an das Material der Säule. Das Eluat wurde verworfen und die Säule wurde mit 350 µl Waschpuffer und anschließender Zentrifugation gereinigt. Um DNA-Kontaminationen zu eliminieren, wurden die isolierten säulengebundenen Nukleinsäuren für 15 min bei RT mit RNase-freier DNase I behandelt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Säule durch die Zugabe und Abzentrifugation von 500 µl 80% EtOH getrocknet. Die isolierte RNA wurde mit 14 µl RNase-freiem Wasser eluiert, woraus 12 µl finales Eluatvolumen resultierten.

Aufgrund des geringen RNA-Volumens konnte die Qualität und Menge der gewonnenen RNA Menge nur exemplarisch für einige Parallelproben überprüft werden. Dazu wurden 10 µl der RNA auf ein 0,8%-iges denaturierendes (formaldehydhaltiges) Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen und bei 65 V 45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurde die RNA für 10 min bei  $65^\circ\text{C}$  denaturiert. Das Auftreten von zwei scharf getrennten Banden, die den 28s und 18s rRNAs entsprechen, zeigte die intakte RNA an.

#### **2.6.2. RNA-Isolierung aus Knorpelgewebe**

Initial wurden unterschiedliche Versuchsprotokolle zur RNA-Isolation aus Knorpelproben getestet. Dies war notwendig, da etablierte Protokolle stets von recht hohen Ausgangsmengen an Gewebe/Knorpel ausgingen (mind. 40-50 mg), die zur Verfügung stehenden Knorpelproben aber nur durchschnittlich 5 mg Nassgewicht aufwiesen. Die Knorpelproben aus der SFB-KK und der Knorpel-MK wurden mit einem Mikrodismembrator zerkleinert. Dabei wurde die gefrorene Knorpelprobe in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten, zweiteiligen Edelstahlschüttelbehälter und einer Mahlkugel ( $d = 10\text{mm}$ ) aus Chromstahl für 30 s bei einer Schüttelfrequenz von  $2000 \text{ min}^{-1}$  und einer Schüttelamplitude von 16 mm zu einem feinen Pulver verarbeitet. Dieses wurde in 400 µl Lysispuffer aufgenommen und das Lysat

anschließend abzentrifugiert. Da der Überstand noch einen Großteil der Matrixbestandteile (PG und Kollagen) enthielt, wurde das Lysat nach Zugabe von 800 µl RNase-freien Wassers für 10 min bei 55°C mit 5 µl Proteinase K (20 mg/ml) verdaut. Dadurch wurden die bei der folgenden Säulenaufreinigung störenden PG abgebaut und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt erfolgte die weitere RNA Isolation mit dem RNeasy Micro-Kit wie für die SFB (unter 2.6.1.) beschrieben.

### **2.6.3. Synthese von cDNA mittels reverser Transkription**

Mit der PCR lässt sich die Genexpression einer Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Isolation nachweisen. Da die DNA-Polymerase keine RNA amplifizieren kann, muss die RNA zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben werden. Die erhaltene cDNA kann als Vorlage in der anschließenden PCR zur linearen Amplifikation spezifischer Sequenzen verwendet werden, was zur Bestimmung der Expressionsstärke des untersuchten Gens benutzt werden kann.

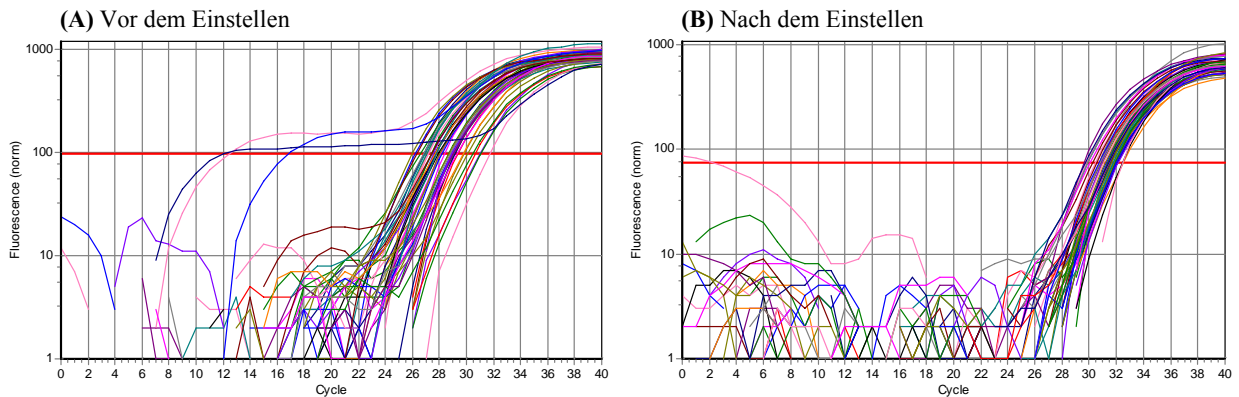
Je 10 µl Gesamt-RNA wurden mit 20 pmol Oligo-(dT)-Primer versetzt und der Ansatz mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt. Eine Inkubation für 10 min bei 70°C mit folgender Inkubation auf Eis für 5 min ermöglichte die Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur. Anschließend wurden 4 µl 5 x First-strand-buffer, 2 µl DTT, je 25 mM dNTPs und 200 Units Superscript II reverse Transkriptase zugesetzt. Die reverse Transkription erfolgte beim Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase (42°C) für 70 min. Nach der Reaktion wurde die synthetisierte cDNA entweder bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR eingesetzt.

### **2.6.4. Analyse der Genexpression mittels „real-time“ RT-PCR**

Die „real-time“ RT-PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung laserinduzierter Fluoreszenzsignale. Zum PCR-Ansatz wurde neben den spezifischen Primern auch der mit der DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green zugegeben. Dadurch ist es möglich, im Verlauf der PCR die Menge der amplifizierten DNA als Maß für die Menge des exprimierten Gens in der untersuchten Probe zu bestimmen. Durch die Verwendung einer externen Standardkurve, die aus einer Verdünnungsreihe eines PCR-Produktes oder eines Plasmides bekannter Konzentration bestand, ließ sich die Ausgangskopienzahl des entsprechenden Gens der Probe berechnen. Die Spezifität der DNA-Vervielfältigung wurde anhand einer (an den letzten Amplifikationszyklus anschließenden) Schmelzkurven-Analyse sowie durch initiale Gelelektrophorese und Sequenzierung des Produktes untersucht. Für die Genexpressionsanalyse mittels „real-time“ RT-PCR wurde mit Ansätzen von jeweils 20 µl Volumen gearbeitet. Jeweils 1 µl der cDNA-Probe bzw. des Standards wurden in die 96 Loch-PCR-Microtiterplatte vorgelegt. Der Reaktionsansatz des Mastermixes enthielt je nach Probenanzahl das Vielfache von: je 0,5 µl der Primer (100 ng/µl), 2 µl 10 x Puffer HotMT mit 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µl BSA (100 ng/µl), 0,4 µl dNTP, 13,7 µl H<sub>2</sub>O bidest. 1 µl SYBR-Green (1:1250 verdünnt) und 0,1 µl HotMaster-Taq-Polymerase. In jedem Experiment wurde eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) mitgeführt.

### Normalisierung der mRNA-Konzentration in den einzelnen Proben

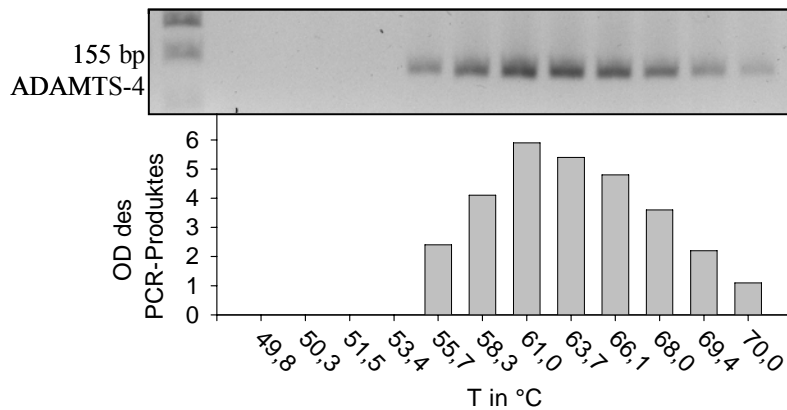
Zur Normalisierung der einzelnen Proben auf den gleichen cDNA-Gehalt wurde der cDNA-Gehalt des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens Aldolase in den Proben mittels „real-time“ RT-PCR ermittelt. Daraus ergaben sich entsprechende Verdünnungsfaktoren, mit denen es möglich war, die Proben auf einen nahezu identischen cDNA Gehalt einzustellen. Verbleibende Abweichungen wurden anschließend mathematisch korrigiert.



**Abbildung 10: Beispiel der cDNA-Normalisierung durch experimentelles Einstellen der Proben.** Gezeigt ist die mRNA-Expression des Haushaltsgens Aldolase in RA-SFB (n = 3) und OA-SFB (n = 3) vor (A) und nach Verdünnung anhand der errechneten Verdünnungsfaktoren (B).

### Etablierung der PCR-Bedingungen für bovine Zielgene

Für fast alle in dieser Arbeit untersuchten humanen Gene konnte mit dem Primerbestand und den etablierten „real-time“ RT-PCR-Protokollen der Arbeitsgruppe gearbeitet werden [Tab. 2, im Anhang auf Seite IX]. Für die humanen Gene ADAMTS-4 und ADAMTS-5 und alle bovinen Zielgene wurden neue Primer ausgewählt und die optimalen PCR-Bedingungen ermittelt [Tab. 2 und 3, im Anhang auf Seiten IX und X]. Zur Bestimmung geeigneter Primersequenzen wurden die mRNA-Sequenzen der Gene aus Datenbanken (Entrez Nucleotide, NCBI) zugrunde gelegt. Das Primerdesign wurde mit Hilfe der Software „Primer3“ (SourceForgeNet) durchgeführt, wobei die endgültige Auswahl der Primerpaare manuell anhand von Kriterien wie Schmelzpunkt des Produktes/der Primer, GC-Gehalt der Primer, Vorkommen kumulativer Basensequenzen und Produktgröße des amplifizierten Genabschnittes erfolgte. Um die Spezifität der ausgewählten Primer bezüglich Spezies und Zielgen zu überprüfen, wurden die Primersequenzen mit den in den Datenbanken vorhandenen speziesübergreifenden Gensequenzen verglichen (Blast, NCBI). Mit Hilfe einer Temperaturgradienten-PCR wurden die optimalen Anlagerungstemperaturen für die Primerpaare ermittelt. Die Amplifikationsprodukte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und quantifiziert (Beispiel in [Abb. 11]). Hierzu wurden die Reaktionsansätze mit 1/5 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und je 10 µl Produkt auf ein 2%-iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 130 V für ca. 30-40 min. Abschließend wurden die Gele mit Hilfe eines digitalen Geldokumentationssystems aufgenommen und mit Hilfe der Grafiksoftware Scion-Image quantifiziert



**Abbildung 11: Beispiel einer Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primerpaare.** Dargestellt ist die Produktmenge (OD) in Abhängigkeit von der jeweiligen Anlagerungstemperatur. Bei 61°C ist die maximale Produktmenge für das Gen humane ADAMTS-4 zu finden.

## 2.7. GAG-Bestimmung mittels DMB-Assay

Die Freisetzung von sulfatierten GAG aus den Knorpelimplantaten in den Kulturüberstand wurde mit Hilfe des Dimethylenblau (DMB)-Tests bestimmt.

Diese Methode basiert auf der Eigenschaft anionischer PG/sulfatierter GAG, den kationischen Farbstoff DMB zu binden. Die Anwendung von Guanidinium-HCl verhinderte die Messung von anderen anionischen Molekülen (z. B. DNA) und stabilisierte den Farbstoff-PG-Komplex für längere Zeit {268}. Aufgrund der großen Streuung der GAG-Konzentration in den Mediumüberständen wurden für die Messung jeweils 50 µl der wochenweise gepoolten Überstände in mehreren Verdünnungen (1:2; 1:4; 1:8) in NaAc-Puffer in 96-Lochplatten pipettiert (Doppelbestimmung). Dadurch war garantiert, dass mindestens ein Messwertepaar im Bereich der mitgeführten Verdünnungsreihe des Standards aus bovinem nasalem Septum lag. Anschließend wurden in jedes der Löcher 15 µl einer Guanidinhydrochlorid-Lösung pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl/Loch DMB-Reagenz wurde die Absorption der Platten bei einer Wellenlänge von 525 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Von den drei Verdünnungen wurde dann die Verdünnung ausgewählt, deren Absorption im linearen Bereich der Standardkurve lag. Zur Berechnung des PG-Verlustes der Knorpelscheiben (angegeben als µg sulfatiertes GAG im Überstand/mm Knorpelscheibenhöhe) wurde der in 50 µl Überstand ermittelte Wert auf die Gesamtmenge der jeweils über eine Woche gesammelten 1450 µl hochgerechnet.

## 2.8. Gesamt-MMP-Assay

Um die Gesamt-Aktivität aller MMP in den Kulturüberständen zu bestimmen, wurde ein Fluoreszenzassay mit künstlichem Substrat (Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-) eingesetzt. Mit diesem Test werden aktive MMP und, nach Aktivierung mit APMA, auch Pro-MMP erfasst. Als Substrat wurde ein gequenes Peptid eingesetzt, das nach erfolgter Spaltung durch MMP und entsprechender Anregung Fluoreszenzsignale emittiert. Die Fluoreszenzzunahme wurde über einen Zeitraum von 120 min mit einem Fluoreszenzreader gemessen (Excitation 330 nm; Emission 390 nm). Das Substratpeptid wird von vielen MMP gespalten, jedoch haben die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) die höchste Umsatzgeschwindigkeit {269,270} (Tab. 5).

**Tabelle 5: Kcat/kM Werte ( $s^{-1}M^{-1}$ ) verschiedener MMP für das Substratpeptid**

	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13
Substratumsatz-Geschwindigkeit Kcat/kM Werte ( $s^{-1}M^{-1}$ )	14 800	5 160 000	23 000	4 420 000	757 000

Für den Test wurden 70  $\mu$ l Reaktionspuffer und 10  $\mu$ l Probe in schwarze 96-Loch Microtiterplatten pipettiert und der Start des Assays erfolgte durch Zugabe von 20  $\mu$ l 25  $\mu$ M Peptidlösung. Vor der Substratzugabe und während der Messung wurde die Platte auf 37°C temperiert. Auf diese Weise waren jedoch meist keine Substratumsätze messbar, da nur freie (nicht durch TIMP inhibierte), aktiv vorliegende MMP-Formen nachgewiesen werden konnten. Nach Aktivierung der Proformen durch Inkubation mit 2 mM APMA im Reaktionspuffer bei 37°C konnten die gesamten freien MMP-Formen nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Proben in EDTA-Puffer mitgeführt. Diese zeigten aufgrund der Hemmung der MMP-Aktivität durch  $Ca^{2+}$ -Entzug keinen Substratumsatz.

## 2.9. Zymografie

### 2.9.1. Gelatine- und Casein-Zymografie

Die Zymografie ist eine modifizierte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli, bei der ein Proteasesubstrat in das Trenngel einpolymerisiert wird. Für den Nachweis der Gelatinasen wurde Gelatine als Substrat benutzt, während caseinolytisch aktive Proteasen mit Casein als Substrat nachgewiesen wurden. Für die Gelatine-Zymogramme wurden 1 mg/ml Gelatine in ein 7,5%-iges Polyacrylamidgel eingebettet, für die Casein-Zymogramme 0,5 mg/ml Casein in ein 10%-iges Gel. Da Casein auch niedermolekulare Bestandteile enthält, die bei der Elektrophorese mitwandern, wurde für die Casein-Gele ein „Pre-run“ durchgeführt, bei dem das Trenngel ohne Proben für 2 h und 40 mA einer Elektrophorese unterzogen wurde und erst im Anschluss das Sammelgel hinzugefügt wurde. Die Proben wurden mit nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt und direkt auf das Gel aufgetragen. In jedem Zymogramm wurden aliquotierte Überstände der Zelllinie HT1080 als Standard mitgeführt, um die semiquantitative Auswertung und Vergleichbarkeit unterschiedlicher Gele zu gewährleisten. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Marker mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA/Gel. Die Gele wurden dann für  $2 \times 20$  min mit 2,5% Triton X-100 gewaschen (um das SDS, welches die Enzymaktivität hemmen würde, zu entfernen) und bei 37°C ü. N. in Inkubationspuffer inkubiert. Danach wurden die Gele für 45 min mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend solange entfärbt, bis die enzymatisch aktiven Bereiche als klare Banden sichtbar wurden. Da das SDS während der Elektrophorese zur Umfaltung der MMP führt, wurden auch die MMP-Proformen aktiviert und waren dann als Banden mit einem gegenüber den aktiven MMP leicht erhöhten Molekulargewicht im Gel sichtbar.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den sichtbaren Banden um Metalloproteasen handelt, wurden parallel Gele nach der Elektrophorese bis zur Färbung mit 10 mM EDTA behandelt. Der dadurch erfolgende  $Ca^{2+}$ -Entzug führt zur Inaktivierung der MMP. Das Auftreten von Serin-Proteasen wurde durch Zugabe des Inhibitors PMSF (Phenylmethyl-sulfonylfluorid, 2 mM) in

den Parallel-Ansätzen überprüft.

### 2.9.2. Reverse Zymografie

Zum Nachweis von TIMP, den natürlichen Inhibitoren von MMP, wurde eine reverse Zymografie durchgeführt. Dazu wurde in ein 15%-iges Polyacrylamidgel mit 1,5 mg/ml Gelatine zusätzlich konditionierter HT1080-Kulturüberstand (frisch, serumfrei) als Quelle von MMP einpolymerisiert. Die Kulturüberstände wurden mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge vierfach aufkonzentriert, dann mit 5 x Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die weiteren Schritte erfolgten wie bei der Gelatine- und Casein-Zymografie (s. o.). Nach der Färbung wurden die TIMP als dunkelblau gefärbte Banden vor einem hellen Hintergrund sichtbar, welcher durch den Abbau der Gelatine durch die einpolymerisierten MMP entstand.

### 2.9.3. *In situ*-Zymografie

Die *in situ*-Zymografie ist ein Verfahren, welches neben der Darstellung von Enzymaktivitäten auch Aussagen zur Lokalisation der Enzymaktivität ermöglicht. Für die Darstellung der Enzymaktivitäten im histologischen Schnittpräparat wurden unterschiedliche Methoden der *in situ*-Zymografie getestet. Dazu gehörten u. a. das Überschichten der Schnittpräparate mit gelatine- oder caseinhaltigen Gelen auf Polyacrylamid- oder auch Agarosebasis, wobei die Gele bei 37°C in einer feuchten Kammer unterschiedlich lange inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Gele mit Coomassie-Blau-Lösung für 45 min gefärbt und anschließend solange entfärbt, bis die enzymatisch aktiven Bereiche sichtbar wurden. Die mit diesen Methoden erfassten Aktivitäten waren sehr diffus verteilt und ließen sich nicht einzelnen Zellen zuordnen.

Die Inkubation der Gefrierschnitte mit fluoreszenzmarkierten Substraten erwies sich als wesentlich sensitivere Methode [271]. Hierfür wurde mit Fluorescein konjugierte Gelatine zum Nachweis von Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und Fluorescein-konjugiertes Kollagen I und Kollagen IV zum Nachweis von Kollagenasen (MMP-1 und MMP-13) verwendet. Es wurden 50 µl Reaktionspuffer mit 0,1 mg/ml DQ-Gelatine-Fluorescein für den Nachweis von Gelatinasen bzw. 0,1 mg/ml DQ-Kollagen I-Fluorescein oder DQ-Kollagen IV-Fluorescein für den Nachweis von Kollagenasen auf für 15 min luftgetrocknete, 8 µm dicke Gefrierschnitte appliziert. Parallel wurden Serienschnitte zusätzlich mit 50 mM EDTA zur Hemmung von MMP oder 20 mM APMA zur Aktivierung von latenten MMP behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 24 h bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS zum Entfernen des ungebundenen Substrates wurden die Gefrierschnitte mit dem Kern-Farbstoff DAPI (1 µg/ml) für 3 min gefärbt. Nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die vollständig getrockneten Objektträger mit dem „Prolong-Antifade Reagenz“ eingedeckt. Dies ermöglichte eine gründliche Auswertung der Objektträger, da ein zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzintensität verzögert wurde.

Das Substrat (Gelatine/Kollagen I und IV) war so stark mit Fluorescein beladen, dass das Fluoreszenzsignal im intakten Substrat gequenchet wurde. Durch den Abbau der Gelatine bzw. des Kollagens kam es in den Gebieten mit enzymatischer Aktivität zur einer entsprechenden Fluoreszenzzunahme. Diese Beobachtungen waren im Gegensatz zu den o. a. Methoden bis auf die zelluläre Ebene auflösbar und konnten mit entsprechenden Vergrößerungen am

Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

## 2.10. Bestimmung der Proteinexpression mittels ELISA

### 2.10.1. ELISA für MMP-1, MMP-3, IL-6 und IL-8

Die Protein-Konzentrationen von MMP-1, MMP-3, IL-6 und IL-8 in den Kulturüberständen wurden mit einem Sandwich-ELISA bestimmt.

Prinzipiell wird bei einem ELISA ein Antigen-spezifischer AK an die ELISA-Platte gebunden. Durch die Inkubation mit dem Antigen in der untersuchten Probe entstehen Immunkomplexe, die mit einem weiteren Antigen-spezifischen, Enzym-gekoppelten AK markiert werden können. Nach Zugabe eines chromogenen Substrates wird die Extinktion bestimmt, die direkt proportional zur Menge des gebundenen Antigens ist. Durch den Vergleich mit einer Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins kann die Konzentration des Antigens der untersuchten Probe berechnet werden.

Für die Analyse der Kulturüberstände wurden 96-Loch Platten ü. N. bei 4°C mit 100 µl Capture-AK/Loch (Tab. 6 und 7) in Bikarbonatpuffer beschichtet. Die Platten wurden dreimal mit PBS-T (PBS mit 0,05% Tween-20) gewaschen, unspezifische Bindungsstellen wurden mit 300 µl 3%-igem BSA/PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Dem anschließenden dreimaligen Waschen mit PBS-T folgte die Inkubation mit Proben, Standards und Leerwerten (Kulturmedium) in Duplikaten für 2 h bei Raumtemperatur oder ü. N. bei 4°C. Die Platten wurden fünfmal mit PBS-T gewaschen und für 2 h bei Raumtemperatur mit je 100 µl Detektor-AK/Loch in 1%-iger BSA/PBS inkubiert (Konzentration in Tab.6 und 7). Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden die Platten für 20 min mit 100 µl Streptavidin-HRP/Loch inkubiert (1:200 verdünnt in 1%-iger BSA/PBS), achtmal gewaschen und anschließend mit 100 µl Substratlösung versetzt (30 mg OPD in 15 ml Zitratpuffer mit 30 µl 30%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Der Farbumsatz erfolgte im Dunkeln und wurde nach 30 min durch Zugabe von 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Loch gestoppt. Die Extinktion wurde im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Die Daten wurden mit der Gerätesoftware anhand der Standardkurve in Konzentrationen umgerechnet.

**Tabelle 6: AK und Standards für MMP-ELISA**

	MMP-1		MMP-3	
		Endkonz.		Endkonz.
Capture-AK	Maus-Anti-Human MMP-1	1 µg/ml	Ziege-Anti-Human MMP-3	0,8 µg/ml
Detektor-AK	Ziege-Anti-Human MMP-1 (biotinyliert)	200 ng/ml	Ziege-Anti-Human MMP-3 (biotinyliert)	200 ng/ml
Standard	rekombinantes humanes MMP-1	39 pg/ml bis 5000 pg/ml	rekombinantes humanes MMP-3	15,63 pg/ml bis 2000 pg/ml

**Tabelle 7: AK und Standards für IL-ELISA**

	IL-6		IL-8	
		Endkonz.		Endkonz.
Capture-AK	Maus-Anti-Human IL-6	1:250 verdünnt	Maus-Anti-Human IL-8	1:250 verdünnt
Detektor-AK	Maus-Anti-Human IL-6 (biotinyliert)	1:250 verdünnt	Maus-Anti-Human IL-8 (biotinyliert)	1:250 verdünnt
Standard	rekombinantes humanes IL-6	4,7 pg/ml bis 300 pg/ml	rekombinantes humanes IL-8	3,125 pg/ml bis 200 pg/ml

### 2.10.2. Bestimmung der Aggrekanase-Aktivität

Der für diese Versuche verwendete Aggrekanase-Aktivitäts-Assay ist spezifisch für Proteinasen, die an der interglobulären Domäne (IGD) von Aggrekan schneiden. Dabei entsteht ein Peptid mit der N-terminalen Sequenz ARGSVIL. Als Aggrekanase-Standard diente hierbei rekombinante humane ADAMTS-4, wobei der Assay auch ADAMTS-1 und ADAMTS-5 detektieren kann. Proteinase, die die interglobuläre Domäne des Aggrekans an anderen, Aggrekanase-unspezifischen Stellen schneiden (z. B. MMP-13 und MMP-14) werden dabei nicht detektiert.

Der Aggrekanase-Aktivitäts-Assay besteht aus zwei Modulen: dem Aggrekanase-Modul und dem ELISA-Modul. Das Substrat (eine modifizierte IGD des Aggrekans) wird zuerst durch die in den Mediumüberständen bzw. im Standard befindlichen Aggrekanasen verdaut, wobei durch die proteolytische Spaltung des Substrates das Aggrekan-Neoepitop mit der N-terminalen Sequenz ARGSVIL freigesetzt wird. Dieses Spaltprodukt wird im anschließenden Sandwich-ELISA über zwei monoklonale Anti-ARGSVIL-AK quantifiziert. Dabei bindet das ARGSVIL-Peptid der Proben an den Capture-AK. Ein HRP-konjugierter AK detektiert dann das durch Spaltung des Peptids entstandene Neoepitop. Nach der Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB) wird die Reaktion mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im Spektrometer gemessen.

Für die Bestimmung der Aggrekanase-Aktivität mussten die Kulturüberstände fünffach aufkonzentriert werden. Um die hitzelabilen Enzyme nicht zu schädigen, wurden die bei -70°C gelagerten Überstände lyophilisiert und anschließend in einem entsprechenden Volumen von H<sub>2</sub>O bidest. rekonstituiert.

### 2.10.3. Bestimmung des COMP-Gehaltes

Der bovine COMP-ELISA ist ein Festphasen-Enzym-Immunoassay basierend auf der o. a. Sandwich-Technik. Während der Inkubation in der Mikrotiterplatte reagiert COMP aus dem Probenüberstand sowohl mit dem festphasengebundenen Anti-bovin-COMP-AK als auch mit dem zugefügten HRP-konjugierten Anti-bovin-COMP-AK. Durch einfaches Waschen werden ungebundene, HRP-konjugierte AK entfernt. Die gebundenen HRP-konjugierten AK werden durch eine Substratreaktion mit TMB nachgewiesen. Durch Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird die Reaktion gestoppt und die Absorption bei 450 nm im Spektrometer gemessen.

Die Kulturüberstände mussten aufgrund der zu hohen Ausgangskonzentration 1:20 mit Assaypuffer verdünnt werden. Durch die Verwendung eines für bovines COMP spezifischen



AK wurde ausschließlich aus den Knorpelscheiben freigesetztes COMP detektiert und nicht das von SFB sezernierte humane COMP.

#### **2.10.4. Bestimmung von Kollagenfragmenten**

Der C2C-AK (COL2-3/4C (long)) detektiert das Neoepitop, das durch die Spaltung von knorpelspezifischem Kollagen II durch Kollagenasen entsteht. Dieses Epitop befindet sich am C-Terminus des „3/4 length“-Kollagen II-Spaltprodukts.

Der C12C-AK (COL2-3/4C (short)) detektiert das Neoepitop, das vorwiegend durch die Spaltung von Kollagen II-, aber auch von Kollagen I durch Kollagenasen entsteht. Dieses Epitop befindet sich ebenfalls am C-Terminus des „3/4 length“-Kollagen II-Spaltprodukts. Beide ELISA funktionieren nach dem Prinzip des kompetitiven ELISA. Die ELISA-Platte wird dabei zunächst mit einem Neoepitop-haltigen Peptid beschichtet. Die Proben bzw. der Neoepitop-Standard werden mit dem anti-Neoepitop-AK inkubiert, anschließend wird der Antigen-AK-Mix auf die vorbeschichtete Platte aufgetragen. Dabei binden die noch freien anti-Neoepitop-AK an die mit dem Neoepitop beschichtete Platte. Bei hohem Neoepitopgehalt der Probe/des Standards sind die meisten AK jedoch abgesättigt und binden daher nicht. Anschließend wird der HRP-konjugierte Sekundär-AK zugegeben; nach der Inkubation mit TMB wird die Reaktion mit 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption bei 450 nm im Spektrometer gemessen. Die Extinktion verhält sich dabei umgekehrt proportional zum Gehalt an Neoepitop.

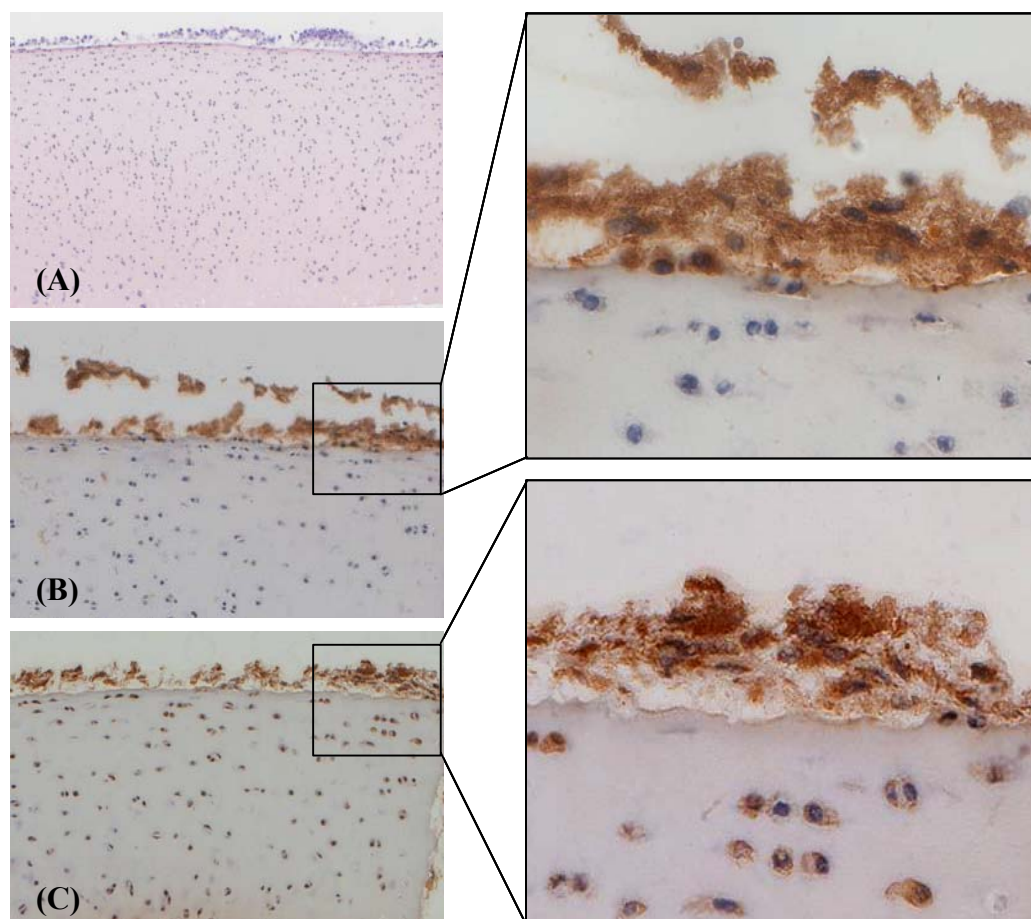
#### **2.11. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse wurde mit dem Software-Programm SPSS 13.0 durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) dargestellt. Zum Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test verwendet. Dabei wurden Unterschiede mit einem *P*-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant bewertet. Die Darstellung der Daten erfolgte mit der Grafiksoftware SigmaPlot 2001 V. 7.0.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpel-SFB Kokultur

Für die KK wurden  $2 \times 10^4$  SFB auf den Knorpelscheiben kultiviert. Dadurch ergibt sich eine relative Dichte von ca. 2800 SFB/mm<sup>2</sup> (bei 7,1 mm<sup>2</sup> Knorpelscheiben-OF). Dies entspricht in etwa dem 11-fachen einer konfluenten Zellkultur von SFB in konventionellen Kulturgefäßen ( $2 \times 10^6$  SFB/75 cm<sup>2</sup>; 266 SFB/mm<sup>2</sup>). Während der KK bildete sich zwar eine mehrlagige SFB-Schicht auf der Knorpel-OF aus, die jedoch in ihrer Ausprägung bei weitem nicht den initial applizierten Zellzahlen entsprach. Dies ist dadurch zu erklären, dass ein Großteil der Zellen während der ersten 3 d der Kultur (nach 3 d erfolgte der erste Mediumwechsel) nicht adhärierte und durch den ersten Mediumwechsel entfernt wurde. Der relativ hohe Überschuss an SFB war jedoch notwendig, um eine konfluente Besiedlung des Knorpels zu erreichen, da in Vorversuchen eine Verringerung der Zellzahl zu einer unvollständigen Besiedlung der Knorpel-OF führte. Nach 14 d Kultur konnte die Vitalität der SFB und Chondrozyten durch den immunhistochemischen Nachweis von Prolyl-4-hydroxylase und für die SFB zusätzlich von Thy-1 bestätigt werden [Abb. 12].



**Abbildung 12: Histologische Darstellung der SFB-Knorpel KK und immunhistochemische Färbungen für Thy-1 und Prolyl-4-hydroxylase als Beleg für die Vitalität und zur Zelltyp-Charakterisierung der SFB.** Nach 14 d KK von SFB mit der Knorpelscheibe kommt es zur Ausbildung einer mehrlagigen SFB-Schicht (A). Die SFB weisen eine positive Färbung mit dem Anti-THY-1-AK (B) und dem Anti-Prolyl-4-Hydroxylase-AK (C) auf. Die bovinen Chondrozyten sind in der immunhistochemischen Färbung negativ für Thy-1 (B), zeigen aber eine kreuzreaktive positive Färbung für Prolyl-4-hydroxylase (C). Vergrößerung: (A) 40 x, (B) und (C) 100 x; Ausschnitte 400 x.

## 3.2. Einfluss von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ auf die Knorpeldestruktion durch SFB

### 3.2.1. Proteoglykane

PG sind wichtige Bestandteile der EZM des Knorpelgewebes und neben anderen Proteinen für die funktionellen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung von PG aus der Knorpelmatrix und die Expression der daran beteiligten Proteasen untersucht. Desweiteren wurde die Neubildung von Aggrekan, dem dominanten Knorpel-PG, analysiert.

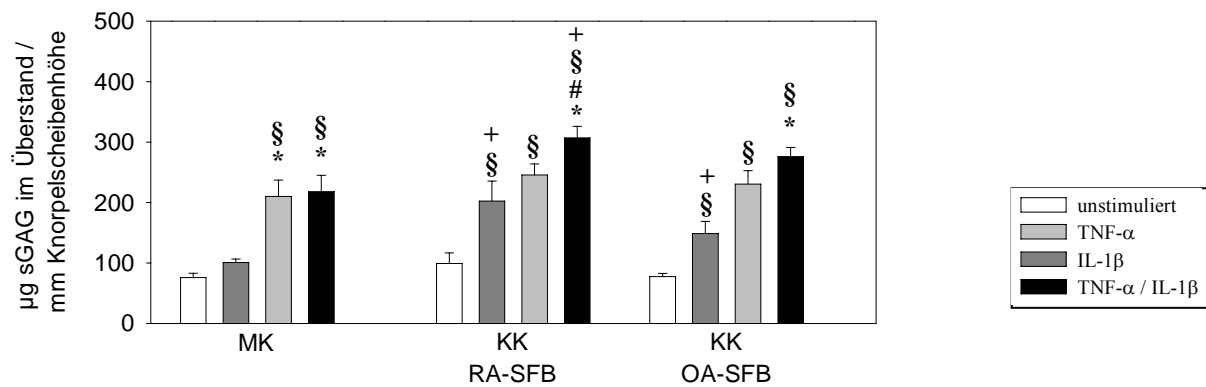
#### 3.2.1.1. PG-Freisetzung aus dem Knorpel

##### *Freisetzung in den Überstand*

Mithilfe des DMB-Assays wurde die Menge an freigesetzten GAG im Überstand der Knorpel MK und der SFB KK untersucht. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die kumulative GAG-Freisetzung aus dem Knorpel nach insgesamt 14 d Kultur verwendet. Aufgrund der leicht variierenden Knorpelstanzenhöhe ( $1378,8 \pm 311$  mm) wurden die Einzelmesswerte des DMB-Assays anhand der Höhe der dazugehörigen Knorpelprobe normalisiert.

Bereits bei den unstimulierten Knorpel MK konnte ein basaler GAG-Verlust in das umgebende Medium gemessen werden ( $75 \mu\text{g}$ ). Unter alleiniger TNF- $\alpha$ -Stimulation wurde die GAG-Freisetzung nicht signifikant erhöht. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  allein induzierte jedoch eine signifikante Steigerung (2,8-fach) der GAG-Freisetzung (auf  $200 \mu\text{g}$ ), die sich in Kombination mit TNF- $\alpha$  nicht weiter erhöhte.

Die KK des Knorpels mit SFB ohne exogene Stimulation führte im Vergleich zur MK nicht zu einer erhöhten GAG-Freisetzung in den Zellkulturüberstand. Die Zytokinstimulation führte bei der KK mit RA-SFB zu einer signifikant höheren GAG-Freisetzung (zwischen  $200$  und  $300 \mu\text{g}$ ) als in der unstimulierten KK mit RA-SFB ( $100 \mu\text{g}$ ). Bei der Stimulation mit TNF- $\alpha$  allein bzw. in Kombination mit IL-1 $\beta$  (aber nicht mit IL-1 $\beta$  allein) war die GAG-Freisetzung auch gegenüber den entsprechenden zellfreien Knorpel MK signifikant erhöht. Im Gegensatz zur Knorpel MK ist bei der KK mit RA-SFB der Effekt der Doppelstimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  signifikant höher als beide Einzelstimulationen (höchster numerischer Wert von allen KK). Wie aus Abb. 13 zu entnehmen ist, zeigt sich für die KK mit OA-SFB ein ähnliches, von der Stimulation abhängiges Profil der GAG-Freisetzung wie für die RA-SFB, wenngleich nicht alle Messwerte Signifikanzniveau erreichen. Zwischen den verschiedenen SFB aus RA- und OA-Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 13: GAG-Freisetzung in den Überstand.** Dargestellt ist der Vergleich zwischen SFB von RA- und OA-Patienten sowie der Knorpel MK. Mittelwerte  $\pm$  SEM der kumulativen GAG-Freisetzung nach einer Gesamtkultivierungszeit von 14 d (Quadruplikate von 5 unabhängigen Experimenten mit SFB von insgesamt 5 RA-, 5 OA-Patienten und der dazugehörigen Knorpel MK).  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\S}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ;  $^{\#}p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

### ***PG-Verlust aus dem Knorpel***

Zusätzlich zur Bestimmung der freigesetzten GAG in den Überstand wurden die mit Safranin-O/Lichtgrün gefärbten histologischen Knorpelproben bezüglich des Verlustes an PG analysiert. Dabei sind rotgefärbte Areale durch einen hohen Gehalt an negativ geladenen Gruppen gekennzeichnet (v. a. sulfatierte Seitenketten der PG). Bei Verlust der PG wird das vorher maskierte Kollagengerüst für die Gegenfärbung mit Lichtgrün zugänglich und färbt sich in diesen Zonen grün/türkis. Die quantitative Auswertung der PG-Färbung erfolgte mithilfe der Software DatInf.measure. Dazu wurden die Gesamtfläche des histologischen Präparates sowie die Safranin-O-positiven Areale vermessen und das Ergebnis als prozentualer PG-Verlust dargestellt [Abb. 14].

Die unstimulierten Knorpel MK zeigten nach der 14-tägigen Kulturdauer noch eine starke Safranin-O-Positivität (PG-Verlust 1%), ein Hinweis auf den hohen PG-Gehalt. Mit TNF- $\alpha$  stimulierte Knorpel MK waren durch einen geringen, OF-nahen PG-Verlust (10%) gekennzeichnet, der gegenüber der unstimulierten Knorpel MK jedoch bereits signifikant erhöht war. IL-1 $\beta$  hingegen führte zu einer massiven und signifikanten Verstärkung der PG-Freisetzung (50%) sowohl im Vergleich zur unstimulierten, als auch zur mit TNF- $\alpha$  stimulierten Knorpel MK. Dieser Effekt wurde in TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Knorpel MK noch einmal deutlich gesteigert (80%).

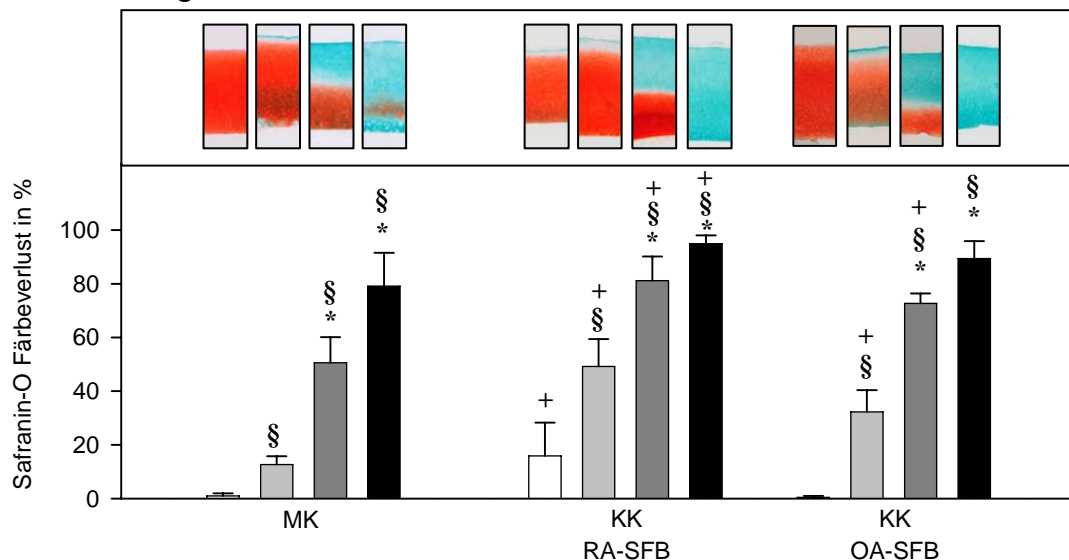
Die KK mit RA-SFB führte im Gegensatz zur Knorpel MK bereits ohne Stimulation zu einer signifikant erhöhten PG-Freisetzung (15%). Der nach Zytokinstimulation der KK beobachtete, gesteigerte PG-Verlust wies ein ähnliches Profil wie in der Knorpel MK auf. Zur Induktion des PG-Verlustes gegenüber der unstimulierten Kontrolle trug TNF- $\alpha$  mit einer 3-fachen (50%), IL-1 $\beta$  mit einer 5-fachen (80%) und die Kombination von TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  mit einer 6-fachen (95%) Steigerung bei. Interessanterweise wurde bei allen stimulierten KK mit RA-SFB signifikant höhere PG-Verluste als in den entsprechenden Knorpel MK induziert.

Der PG-Verlust begann dabei bei allen Proben in OF-nahen Bereichen und setzte sich dann in tiefer liegende Regionen der Knorpelstanzen fort. Dieser Effekt war unabhängig von der Orientierung der eingebetteten Knorpelscheibe, da er auch bei absichtlich mit der Oberseite

nach unten orientiert eingebetteten Proben beobachtet werden konnte (nicht gezeigt).

Die für die KK mit RA-SFB beschriebenen Auswirkungen auf den PG-Verlust wurden auch in ähnlicher Weise für die KK mit OA-SFB reproduziert. Im Gegensatz zu den RA-SFB konnte für die unstimulierte KK mit OA-SFB jedoch kein erhöhter PG-Verlust dokumentiert werden.

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den SFB aus RA- und OA-Patienten festgestellt.



**Abbildung 14: Histologische Analyse des PG-Verlustes mittels Safranin-O-/Lichtgrün-Färbung der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB nach 14 d Kultur.** Mittelwerte ± SEM des durch Vermessen der Safranin-O-positiven bzw. Safranin-O-negativen Areale im histologischen Schnittpräparat quantifizierten PG-Verlustes (Quadruplikate von 5 unabhängigen Experimenten mit SFB von insgesamt 5 RA-, 5 OA-Patienten und der dazugehörigen Knorpel MK). Im oberen Teil sind repräsentative histologische Befunde der einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Legende wie in Abb. 13. +  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK; §  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

### 3.2.1.2. mRNA-Expression und Aktivität von Aggrekanasen

Um zu untersuchen, welche proteolytischen Enzyme am Matrixabbau und damit an der Freisetzung der GAG aus dem Knorpel beteiligt waren, wurde die Wirkung der KK mit SFB und der Zytokinstimulation auf die mRNA- und Proteinexpression der Aggrekanase I (ADAMTS-4) und Aggrekanase II (ADAMTS-5) in den Chondrozyten und kokultivierten RA- und OA-SFB untersucht.

#### *mRNA-Expression*

Mit Hilfe der „real-time“ RT-PCR wurde sowohl der Einfluss der KK mit RA- und OA-SFB, als auch der Einfluss der Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  auf die Genexpression der Aggrekanasen I (ADAMTS-4) und II (ADAMTS-5) in den SFB und Chondrozyten untersucht. Nach 14 d Kultur wurden die Proben aus den Kulturplatten entnommen, die RNA der SFB und der Chondrozyten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels „real-time“ RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse der mRNA-Expression der Chondrozyten aus der MK und nach der KK mit SFB wurden prozentual auf den Mittelwert der unstimulierten Knorpel MK (= 100%) bezogen. In den isolierten RA- und OA-SFB wurde die Kopienzahl der mRNA (ermittelt durch den mitgeführten Standard) dargestellt, um den

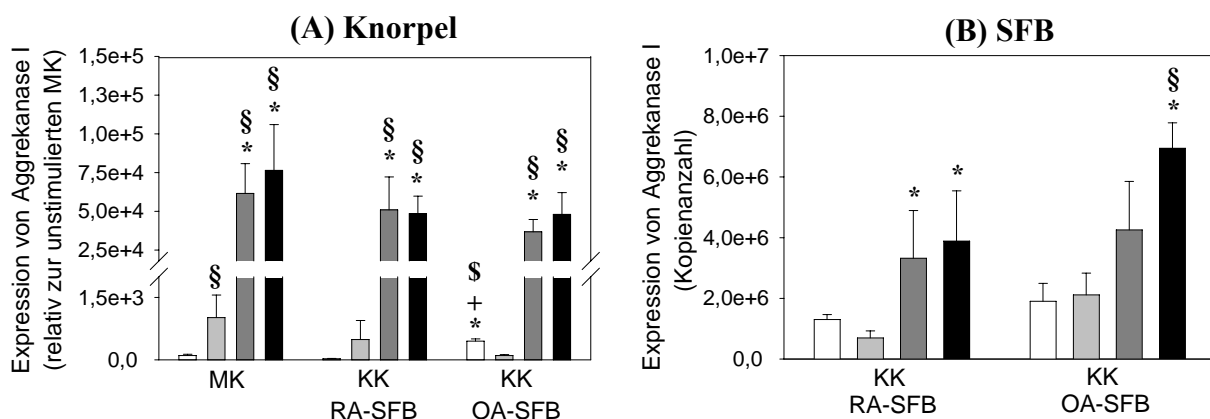
direkten Vergleich zwischen RA- und OA-SFB zu ermöglichen.

**Aggrecanase I im Knorpel:** In den Knorpel MK bewirkte TNF- $\alpha$  eine signifikant gesteigerte Genexpression der Aggrecanase I (ca. 10-fach) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Am stärksten wurde Aggrecanase I-mRNA jedoch durch IL-1 $\beta$  (600-fach) und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  (750-fach) induziert, beide signifikant sowohl gegenüber der unstimulierten als auch der mit TNF- $\alpha$  stimulierten Knorpel MK.

Bei den KK mit RA- bzw. OA-SFB zeigte sich im Knorpel nach Zytokinstimulation ein ähnliches Expressionsmuster. Im Vergleich zu den MK waren jedoch, mit Ausnahme der unstimulierten KK mit OA-SFB, alle Proben durch eine numerische (um 20-90%), aber nicht signifikante Abnahme der Expression gekennzeichnet. Bei der unstimulierten KK mit OA-SFB hingegen zeigte sich im Knorpel eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur MK (4,5-fache Erhöhung) [Abb. 15 A].

**Aggrecanase I in SFB:** Die Expression von Aggrecanase I der RA- und OA-SFB in den KK war im Gegensatz zur Expression im Knorpel (MK und KK) wesentlich schwächer reguliert. So hatte die alleinige Stimulierung mit TNF- $\alpha$  keinen regulierenden Einfluss auf die Expression der Aggrecanase I in RA- und OA-SFB.

Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  führte in RA-SFB zu einer signifikanten und in OA-SFB zu einer numerischen Erhöhung der Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stieg die Expression sowohl in RA-SFB als auch in OA-SFB signifikant an [Abb. 15 B].

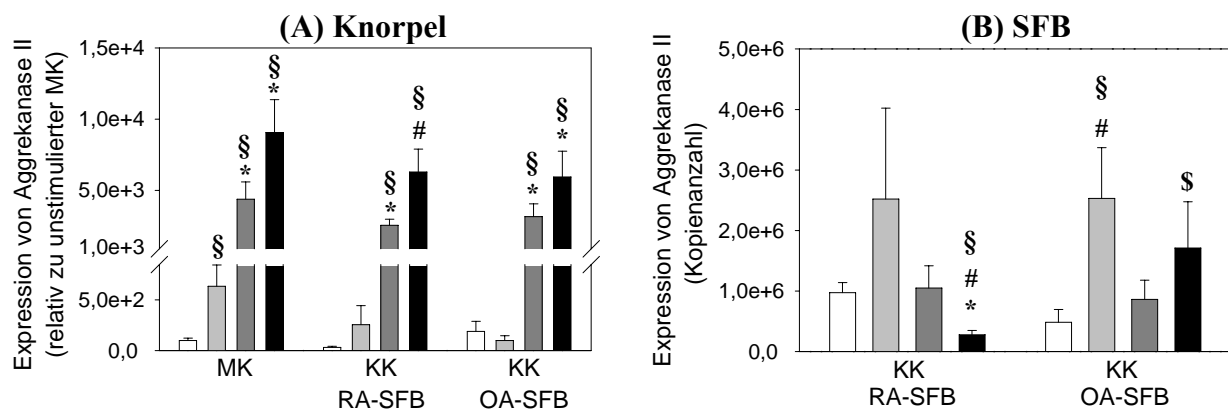


**Abbildung 15: Aggrecanase I-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. **Legende wie in [Abb. 13].**  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur KK mit RA-SFB.

**Aggrecanase II im Knorpel:** Die Regulation der Aggrecanase II war ebenso wie die Regulation der Aggrecanase I durch eine starke Abhängigkeit von den eingesetzten Stimuli gekennzeichnet. In den Knorpel MK induzierte TNF- $\alpha$  eine signifikant gesteigerte Expression der Aggrecanase II (6-fach) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Die Aggrecanase II-Expression wurde am stärksten durch IL-1 $\beta$  (45-fach) und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  (90-fach) hochreguliert, wobei beide Stimulationsarten im Vergleich zum unstimulierten bzw. dem mit TNF- $\alpha$  stimulierten Knorpel zu einer signifikant höheren Expression führten.

Bei den KK mit RA- bzw. OA-SFB zeigte sich im Knorpel ein ähnliches Expressionsmuster. Wie im Falle der Aggrekanase I war, mit Ausnahme der unstimulierten OA-SFB (1,9-fach erhöht), eine numerisch verringerte Expression (um 30 bis 80%) von Aggrekanase II in den KK zu beobachten [Abb. 16 A].

**Aggrekanase II in SFB:** Die Aggrekanase II-Expression der RA- und OA-SFB in den KK zeigte ein von der Aggrekanase I verschiedenes Bild. Während TNF- $\alpha$  eine 2,6-fache numerische Erhöhung in RA-SFB und eine 5-fache signifikante Erhöhung in OA-SFB induzierte, hatte IL-1 $\beta$  keine regulierende Wirkung. Die Doppelstimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  führte in RA-SFB zu einer signifikanten Reduktion um 70%, in OA-SFB dagegen zu einer numerischen, 3,5-fachen Induktion [Abb. 16 B].

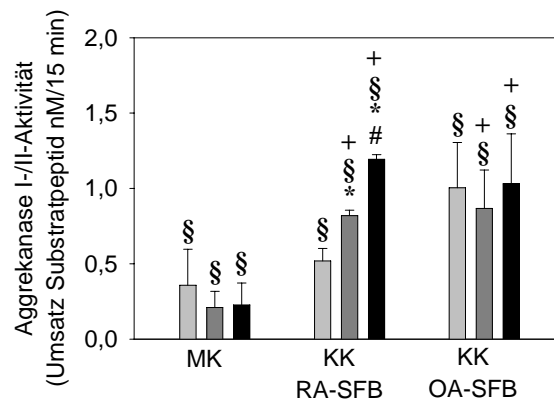


**Abbildung 16: Aggrekanase II-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. Legende wie in [Abb. 13]. § $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ; # $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ ; § $p \leq 0,05$  im Vergleich zur KK mit RA-SFB.

### Aggrekanase I- und II-Aktivität

Durch den Einsatz eines spezifischen Aktivitäts-ELISA konnte in den Überständen die proteolytische Aktivität der Matrix-abbauenden Aggrekanasen untersucht werden. Als Positivkontrolle für die Untersuchung der Überstände wurde der mitgelieferte Standard aus rekombinanter humaner Aggrekanase I mit bekannter Konzentration verwendet, und die ermittelten Messwerte der Proben auf den Umsatz des Substrates (modifizierte IGD des Aggrekans) durch den Enzym-Standard bezogen. Da sowohl Aggrekanase I als auch Aggrekanase II das Substrat spalten, ermöglichte dieser Assay eine Aussage über die Gesamt-Aggrekanase-Aktivität im Überstand. Dafür wurde der während der 14-tägigen Kultur gesammelte Überstand der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB untersucht.

In den unstimulierten Knorpel MK und KK mit RA- und OA-SFB wurde keine Aggrekanase-Aktivität nachgewiesen. Nach der Stimulation der Knorpel MK mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  war eine erhöhte Aggrekanase-Aktivität von 0,23-0,36 nM/15min messbar. Die stimulierten KK mit RA-SFB und OA-SFB wiesen eine deutliche, nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  sogar signifikante Erhöhung der Aggrekanase-Aktivität im Vergleich zur Knorpel MK auf. Die durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  in der KK mit RA-SFB beobachtete Aktivität war dabei gegenüber beiden Einzelstimuli signifikant erhöht [Abb. 17].



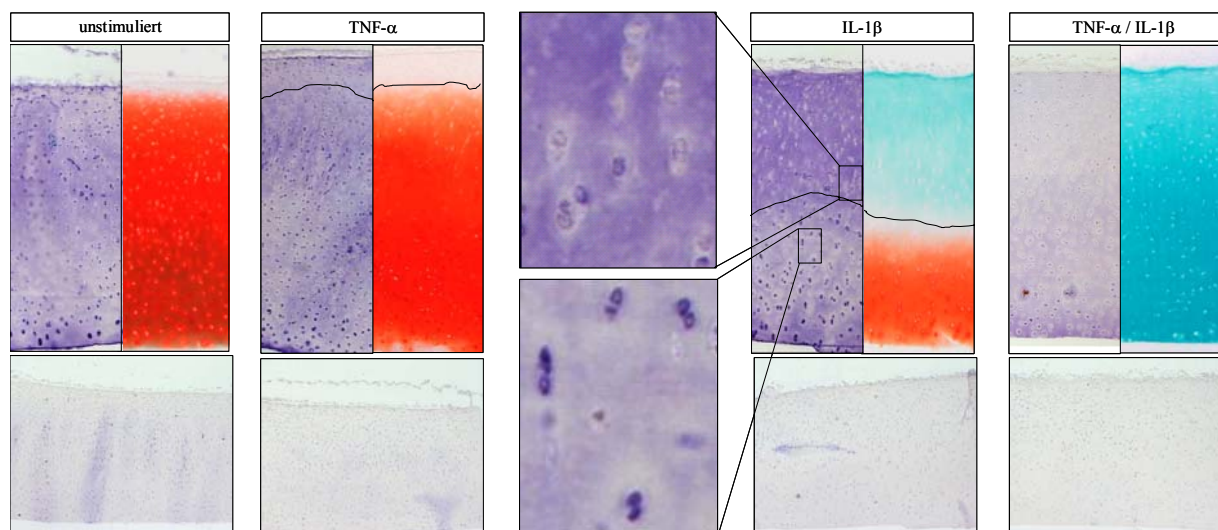
**Abbildung 17: Aggrekanase I- und II-Aktivität im Überstand.** Dargestellt sind die Aktivitäten im Überstand der Knorpel MK und der KK mit RA-SFB und OA-SFB als Mittelwerte  $\pm$  SEM nach einer Gesamtkultivierungszeit von 14 d (Quadruplikate von 5 unabhängigen Experimenten mit SFB von insgesamt 5 RA-, 5 OA-Patienten und der dazugehörigen Knorpel MK). Legende wie in [Abb. 13].  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ;  $^{\#}p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

### 3.2.1.3. Aggrekan-Neosynthese

Durch die immunhistologische Darstellung der Aggrekan-Neosynthese wurde überprüft, ob der Knorpel auf die unter den Kulturbedingungen stattfindenden katabolen Prozesse mit anabolen bzw. regenerativen Vorgängen reagiert. Dazu wurden sowohl Knorpel MK als auch KK mit RA-SFB untersucht, wobei letztere für die Darstellung der Ergebnisse ausgewählt wurden (vergleichbare Ergebnisse für die Knorpel MK, Daten nicht gezeigt). Bei den immunhistologisch gefärbten Schnitten wurde auf eine Kernfärbung mit Hämatoxylin verzichtet, um die Kernlokalisierung des Aggrekanepitops besser darzustellen. Zur Untersuchung der Vitalität der Chondrozyten wurden in den Isotypkontrollen die Zellkerne mit Hämatoxylin gefärbt. Es zeigte sich, dass unter unstimulierten Bedingungen v. a. die Chondrozyten (aller Knorpelschichten) stark positiv für neugebildetes Aggrekan gefärbt waren. Die interterritoriale Matrix hingegen war deutlich schwächer gefärbt als die Chondrozyten. Nach der Stimulierung mit TNF- $\alpha$  konnte in den OF-nahen Chondrozyten kein neugebildetes Aggrekan nachgewiesen werden. Tiefer liegende Chondrozyten zeigten jedoch noch eine ähnlich stark ausgeprägte Aggrekanfärbung wie die unstimulierten Proben. In IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben war der Effekt der ausbleibenden Aggrekan-Neosynthese auch auf die Chondrozyten tieferer Knorpelregionen ausgeweitet. Dabei waren die Knorpelregionen, in denen kein neugebildetes Aggrekan unmittelbar in Chondrozytennähe detektierbar war, durch eine (im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle) verstärkte Aggrekanfärbung der interterritorialen Knorpelzone gekennzeichnet. Bei TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben konnte in den Chondrozyten aller Knorpelschichten keine Aggrekan-Neosynthese nachgewiesen werden. Auch die interterritoriale Knorpelmatrix zeigte nur einen geringen Gehalt an neugebildetem Aggrekan. Beim Vergleich mit Safranin-O-gefärbten Serienschnitten der gleichen Proben konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten, die kein neues Aggrekan produzieren, sich ausschließlich in PG-depletierten Knorpelregionen befinden. Dieser Effekt ließ sich gut beobachten, da in den zytokinstimulierten Proben die PG-Depletion an der Knorpel-OF beginnt (TNF- $\alpha$ ), dann in tiefere Knorpelregionen vordringt (IL-1 $\beta$ ) und bei TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation den gesamten Knorpel betrifft [Abb. 18]. Die Abnahme der



Aggrecan-Synthese ist nicht durch Apoptose/Nekrose der Chondrozyten bedingt, da die Aggrecan-negativen Chondrozyten intakte Kerne aufwiesen (ersichtlich in der Hämatoxylin-Färbung der Isotypkontrollen) [Abb. 18 unten]. Die kokultivierten RA-SFB zeigten v. a. bei den unstimulierten und den TNF- $\alpha$ -stimulierten Proben eine markante Aggrecanfärbung, welche in IL-1 $\beta$  nahezu und in TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben völlig ausblieb [Abb.18].



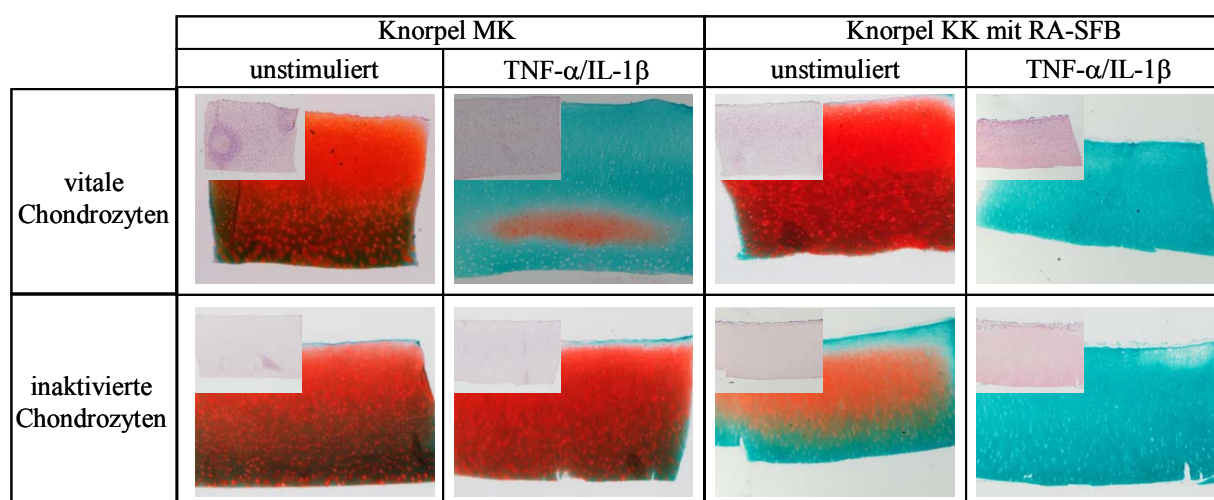
**Abbildung 18: Immunhistochemische Darstellung von intaktem neugebildeten Aggrecan und histologische PG-Färbung in Knorpelproben.** Dargestellt sind histologische Schnittpräparate von Knorpelproben nach 14 d KK mit RA-SFB. Im jeweils linken Bildausschnitt ist die immunhistologische Färbung für intaktes neugebildetes Aggrecan und im rechten Bildausschnitt der dazugehörige Serienschchnitt des gleichen Präparates mit Safranin-O/Lichtgrün Färbung abgebildet. Bei der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Probe sind zusätzlich digitale Ausschnittsvergrößerungen dargestellt. Die Isotypkontrolle ist als verkleinerte Aufnahme unter den immunhistologischen Färbungen abgebildet. Originalvergrößerungen: 40 x für die immunhistologische Aggrecanfärbung, die Safranin-O-Färbung und die Hämatoxylin-Färbung der Isotypkontrollen; die digitale Ausschnittsvergrößerung entspricht einer 300 x Originalvergrößerung. **Eine vergrößerte Darstellung befindet sich im Anhang auf Seite XI.**

#### 3.2.1.4. PG-Verlust in Abwesenheit vitaler Chondrozyten

In den zuvor beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bereits in der Knorpel MK durch Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und besonders durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ein massiver PG-Verlust des Knorpels induziert wurde. Durch das Inaktivieren der Chondrozyten vor dem Versuchsbeginn (Einfrieren/Auftauen der Knorpelstanzen) wurde untersucht, inwieweit die beobachteten Effekte durch vitale Chondrozyten vermittelt und beeinflusst wurden. Die Abwesenheit vitaler Chondrozyten konnte durch eine schwache bzw. fehlende Färbung der Zellkerne mit Hämatoxylin-Färbung belegt werden. Nachfolgend wird der Knorpel ohne vitale Chondrozyten als „Knorpel-†“ und der Knorpel mit vitalen Chondrozyten als „Knorpel-vital“ bezeichnet.

Die unstimulierte Knorpel-† MK und die Knorpel-vital MK zeigten nach 14 d keinen spontanen, durch den Einfrierprozess bzw. die Basiskulturbedingungen verursachten PG-Verlust. Eine Stimulation der Knorpel-vital MK mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  führte zum erwarteten fast vollständigen PG-Verlust aus dem Knorpel. In der Knorpel-† MK hingegen hatte die Stimulation keine Auswirkung. Das zeigt, dass der stimulationsbedingte PG-Verlust definitiv Chondrozyten-vermittelt ist und nicht etwa durch chemische Wechselwirkung der Zytokine

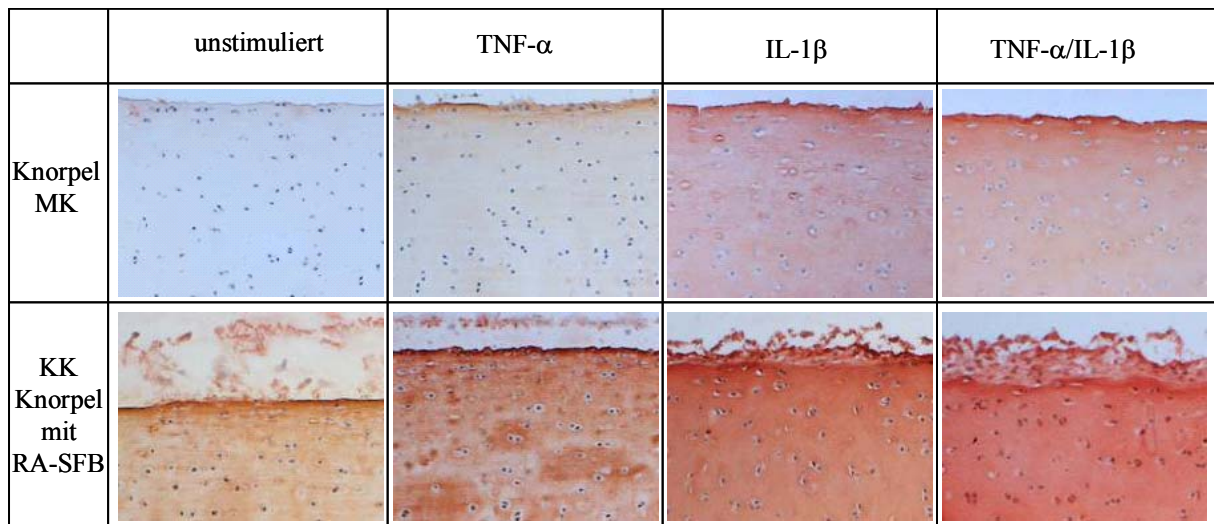
mit der Matrix begründet ist. Bei der Untersuchung der unstimulierten KK von Knorpel-vital mit RA-SFB wurde kein substanzieller PG-Verlust beobachtet, bei der KK mit Knorpel-† hingegen kam es zu einer deutlichen PG-Depletion. Dieser Effekt kann aufgrund des Fehlens vitaler Chondrozyten nur durch die RA-SFB hervorgerufen worden sein und verdeutlicht damit die Fähigkeit der kokultivierten RA-SFB zum PG-Abbau. Bei Anwesenheit vitaler Chondrozyten wird dieser Effekt in den unstimulierten KK mit RA-SFB nicht sichtbar, da die Chondrozyten vermutlich mit einer verstärkten Matrixsynthese oder durch die Expression protektiver Substanzen dem SFB vermittelten PG-Abbau entgegenwirken. Nach TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulierung der Knorpel-† KK mit RA-SFB induzierten die stimulierten RA-SFB sogar einen kompletten PG-Verlust im Knorpel [Abb. 19].



**Abbildung 19: Einfluss der An- bzw. Abwesenheit vitaler Chondrozyten auf den PG-Abbau.** Histologische Analyse des PG-Verlustes mittels Safranin-O-/Lichtgrün-Färbung der Knorpel MK und der KK mit RA-SFB mit vitalem sowie eingefrorenem Knorpel nach einer Gesamtkultivierungszeit von 14 d. **Eine vergrößerte Darstellung befindet sich im Anhang auf Seite XII.**

### 3.2.2. COMP

Die Konzentration des aus dem Knorpel in den Überstand freigesetzten COMP wurde durch Verwendung eines spezifischen ELISA für bovines COMP bestimmt. Die Analyse ergab sowohl für die Knorpel MK als auch für die KK mit RA- und OA-SFB bezüglich der COMP-Freisetzung weder eine Regulation durch die unterschiedlichen Zytokinstimulationen noch durch die KK mit SFB (Ergebnisse nicht dargestellt). Um zu überprüfen, ob die ausbleibende Regulierung der COMP-Freisetzung in den Überstand auf der fehlenden Freisetzung aus der Knorpelmatrix beruht, wurden histologischen Präparate durch immunhistologische Färbungen auf das Vorkommen von COMP analysiert. In der unstimulierten Knorpel MK war nahezu keine COMP-Färbung ersichtlich. Die Stimulierung mit TNF- $\alpha$  und v. a. IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  führte zu einem starken Anstieg der Farbintensität der Knorpel MK. In der KK mit RA-SFB zeigte bereits die unstimulierte Probe eine deutliche COMP-Färbung sowohl der Knorpelmatrix als auch der SFB. Dieser Effekt wurde durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , insbesondere jedoch durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  massiv verstärkt. Die Färbung für COMP war in allen KK mit RA-SFB wesentlich ausgeprägter als in den dazugehörigen Knorpel MK [Abb. 20].



**Abbildung 20: Immunhistologische Darstellung von humanem und bovinem COMP in der Knorpel MK und KK mit RA-SFB.** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von unstimulierten bzw. mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Proben nach einer Kultur von 14 d (Vergrößerung 200-fach).

### 3.2.3. Kollagene

#### 3.2.3.1. Kollagenabbau

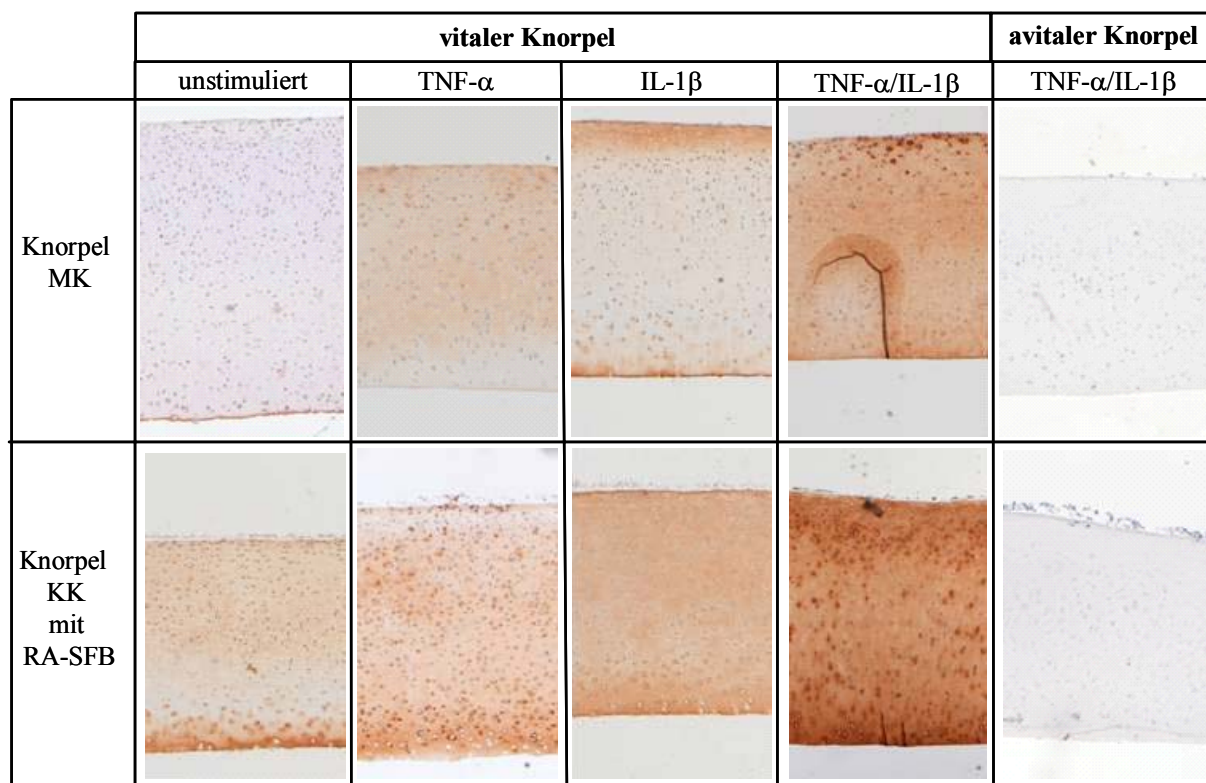
Die Konzentration von aus dem Knorpel freigesetzten Kollagenabbauprodukten im Überstand wurde mit spezifischen ELISA nach 14 d Knorpel MK und KK mit RA- und OA-SFB bestimmt. Mithilfe des C2C-ELISA wurde das Vorkommen des Neoepitops COL2-3/4C (long) untersucht. Dieses entsteht durch die Spaltung von knorpelspezifischem Kollagen II durch Kollagenasen und befindet sich am C-Terminus des „3/4 length“-Kollagen II-Spaltprodukts. Der C12C-ELISA wurde zur Untersuchung des Neoepitops COL2-3/4C(short) genutzt, dass durch die Kollagenasen-vermittelte, sekundäre Spaltung des langen C2C-Spaltprodukts entsteht. Dieses Epitop befindet sich ebenfalls am C-Terminus des „3/4 length“-Kollagen II-Spaltprodukts.

Die Analyse ergab keine messbare Abgabe der Kollagenabbau-Metaboliten in den Überstand, weder für die Knorpel MK noch für die KK mit RA- und OA-SFB. Die Messwerte lagen unter den Nachweisgrenzen der Assays.

Aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit von Kollagenabbauprodukten im Überstand wurde in den Knorpelproben immunhistologisch die Anwesenheit des Kollagen-Neoepitops C12C (COL2-3/4C (short)) untersucht. Der C2C (COL2-3/4C (long))-AK für die primäre Kollagenschnittstelle im Kollagen II eignete sich nicht für die Immunhistologie.

In unstimulierten Knorpel MK war das C12C-Neoepitop nicht nachweisbar. Nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und besonders mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  wurde eine starke Anreicherung des Neoepitops in der Knorpelmatrix beobachtet. Durch die KK mit RA-SFB wurde dieser stimulationsvermittelte Effekt noch einmal erhöht und auch die unstimulierte KK mit RA-SFB zeigte bereits das Auftreten von Kollagen II-Spaltprodukten. Für die KK mit OA-SFB wurden diese Ergebnisse ebenfalls beobachtet (nicht gezeigt). Der maßgebliche Beitrag der Chondrozyten zur Degradation der Kollagenmatrix wird dadurch deutlich, dass in TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben ohne vitale Chondrozyten (Knorpel MK und KK mit RA-SFB;

Knorpel vor der Kultur schockgefroren) immunhistologisch kein Kollagenabbau nachweisbar war [Abb. 21].

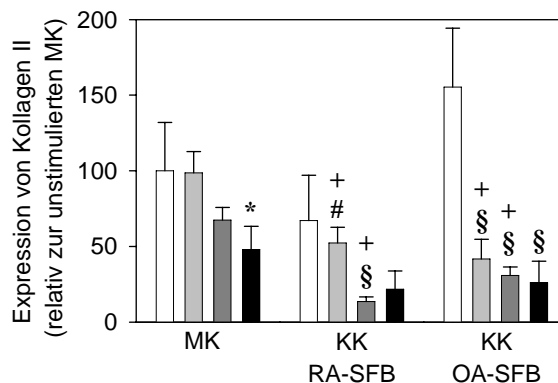


**Abbildung 21: Immunhistologischer Nachweis der Kollagen II-Degradation in der Knorpel MK und der Knorpel KK mit RA-SFB.** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von unstimulierten bzw. mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben nach einer Kultur von 14 d (Vergrößerung 40-fach).

### 3.2.3.2. Kollagen-Neosynthese

Die mRNA-Expression von Kollagen II wurde in der Knorpel MK und den Knorpelproben der KK mit RA- bzw. OA-SFB ermittelt. In der Knorpel MK fiel eine numerische Verringerung der Kollagen II-mRNA bei den IL-1 $\beta$  und den TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Proben auf, die mittlere Kollagen II-mRNA-Expression der TNF- $\alpha$  stimulierten Proben hingegen lag auf dem gleichen Niveau wie die unstimulierten Knorpelproben.

In den Knorpelproben der KK mit RA-SFB konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden, wobei durch IL-1 $\beta$ -Stimulation eine signifikante Verminderung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle induziert wurde. In den Knorpelproben der KK mit OA-SFB wurde die Kollagen II-Expression durch alle Zytokine signifikant im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle inhibiert. Interessanterweise war die Kollagen II-mRNA-Expression im Knorpel von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulierten KK mit RA- bzw. OA-SFB signifikant niedriger als in den entsprechenden MK [Abb. 22].

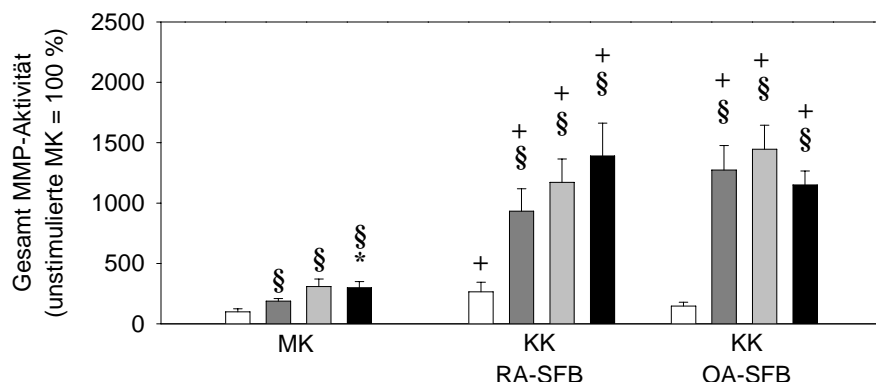


**Abbildung 22: Kollagen II-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3).** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, dabei entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%. Legende wie in [Abb. 13].  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ;  $^{\#}p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

### 3.2.4. MMP

#### 3.2.4.1. Gesamt-MMP-Aktivität

Mithilfe des angewendeten MMP-Assays kann ein Rückschluss auf das MMP-Gesamt-Aktivitätspotential im Kulturüberstand gezogen werden. Die erst nach Aktivierung der MMP mit APMA nachweisbare Aktivität weist darauf hin, dass im Kulturüberstand die MMP überwiegend in der latenten Form vorlagen. Die Grundaktivität der unstimulierten Knorpel MK (= 100%) lag im Fluoreszenzassay relativ niedrig, wurde jedoch durch alle Stimulationen signifikant um das 2-bis 3-fache gesteigert. In den Überständen der KK mit RA-SFB zeigte sich bereits in den unstimulierten Proben eine signifikant erhöhte MMP-Aktivität im Vergleich zur Knorpel MK. Die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  führte bei den KK mit RA- und OA-SFB zu signifikant höheren Gesamt MMP-Aktivitäten gegenüber der Knorpel MK (um das 3-bis 7-fache) [Abb. 23]. Es ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RA- und OA-Patienten.

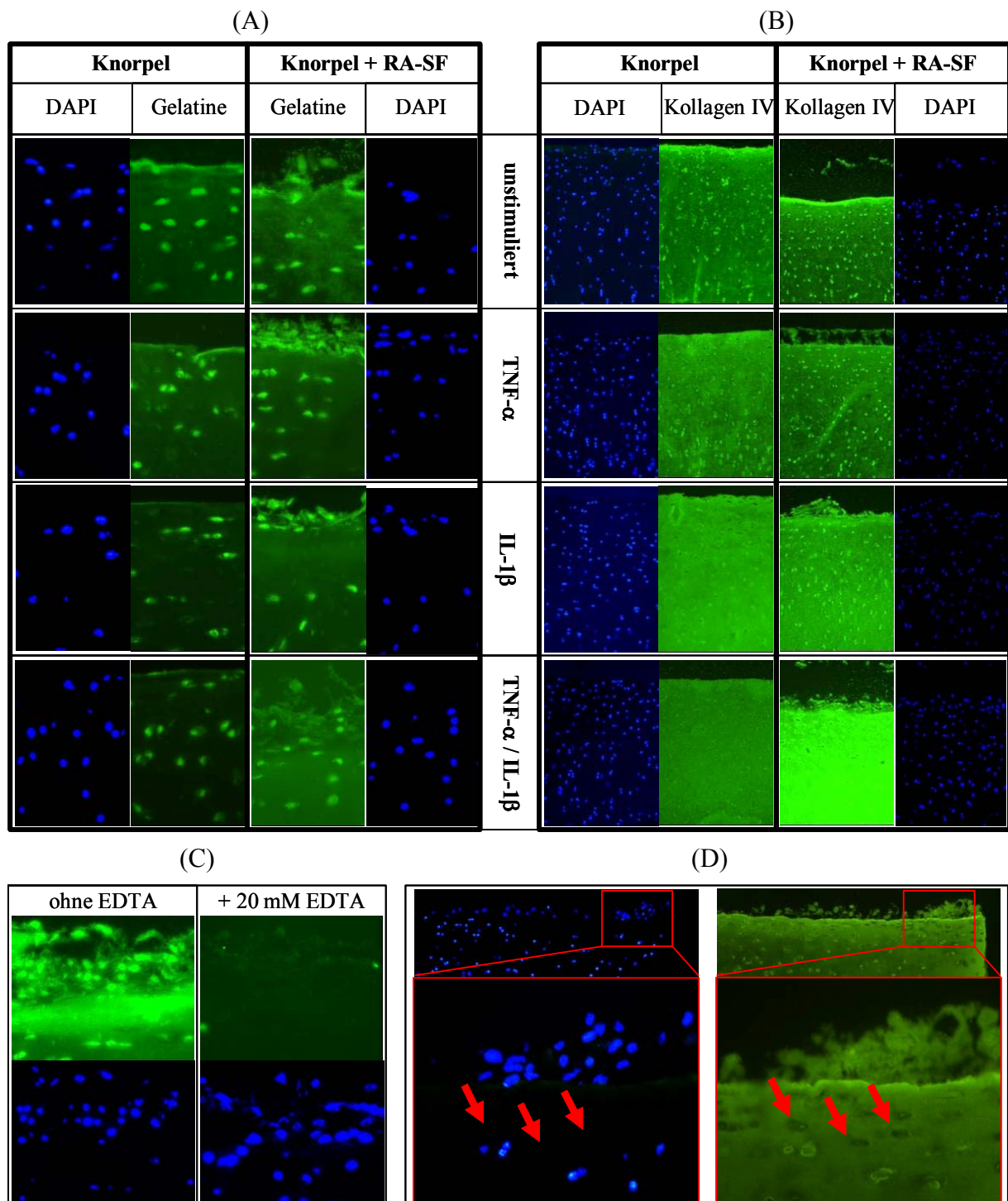


**Abbildung 23: MMP-Gesamt-Aktivität der Kulturüberstände der Knorpel MK und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  nach 14 d Kultur.** Die MMP-Gesamt-Aktivität in den Kulturüberständen wurde nach APMA-Aktivierung der latenten MMP-Formen mittels Fluoreszenzassay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Fluoreszenzintensität, wobei der Messwert der unstimulierten MK 100% entspricht. Legende wie in [Abb. 13].  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

### 3.2.4.2. *In situ* gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität

Durch die *in situ*-Zymografie ist es möglich, zusätzlich zur Aktivitätshöhe auch die Lokalisation der MMP-Enzymaktivität zu untersuchen. Die *in situ*-zymografische Analyse wurde exemplarisch an der KK mit RA-SFB eines Patienten und der dazugehörigen Knorpel MK durchgeführt. Die Inkubation der Proben mit Fluorescein-gekoppelter Gelatine ermöglichte eine Aktivitätsbestimmung gelatinolytisch aktiver Proteasen (v. a. MMP-2 und MMP-9). Durch Verwendung von Fluorescein-gekoppeltem Kollagen I bzw. Kollagen IV wurde die kollagenolytische Aktivität dargestellt (v. a. MMP-1 und 13). Eine Diskriminierung bzw. Zuordnung zu einer bestimmten MMP war durch diese Methode jedoch nicht möglich. Alle Aufnahmen erfolgten unter identischen Bedingungen (d. h. identische Belichtungszeit), um die Vergleichbarkeit des Fluoreszenzsignals zu gewährleisten.

In den *in situ*-Zymogrammen ist deutlich zu erkennen, dass der Knorpel und die RA-SFB sowohl gelatinolytische [Abb. 24 A] als auch kollagenolytische Aktivität [Abb. 24 B] aufweisen. Die gelatinolytische Aktivität der Knorpel MK war konstitutiv ausgeprägt und veränderte sich nicht unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ . Die stärkste Aktivität im Knorpel war dabei in der Umgebung der Chondrozyten zu beobachten. Durch die KK mit RA-SFB kam es zu einer leichten Zunahme der Aktivität in der Knorpelmatrix, wobei der deutlichste Effekt in mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Proben sichtbar war [Abb. 24 A]. In den mit Fluorescein-Kollagen IV bzw. Fluorescein-Kollagen I (nicht gezeigt) inkubierten Proben zeigte sich eine starke Induktion der enzymatischen Aktivität v. a. durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ . Dabei kam es v. a. im interzellulären Bereich zu einem Anstieg der kollagenolytischen Aktivität. Dieser Effekt konnte auch in den KK mit RA-SFB nachgewiesen werden, wobei es bei der TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten KK mit RA-SFB zu einer massiven Steigerung der Aktivität im Knorpel gegenüber der Knorpel MK und auch der mit IL-1 $\beta$  stimulierten KK kam [Abb. 24 B]. Durch den Zusatz von EDTA bzw. PMSF (nicht gezeigt) zum Inkubationspuffer konnte die nachgewiesene Aktivität im Knorpel und den RA-SFB komplett inhibiert werden [Abb. 24 C]. Somit handelt es sich bei den detektierten Aktivitäten um MMP-vermittelten Substrat-Abbau. Knorpelzonen ohne vitale Chondrozyten, ersichtlich durch fehlende DAPI-Färbung, zeigten keine enzymatische Aktivität [Abb. 24 D]; der in der interzellulären Matrix beobachtete Substratumsatz erfolgte vermutlich durch matrix-assoziierte MMP. Eine Aktivierung der latenten MMP durch Zusatz von APMA zum Reaktionspuffer resultierte lediglich in einer leichten Zunahme der gelatinolytischen bzw. kollagenolytischen Aktivität sowohl im Knorpel als auch in den kokultivierten SFB (nicht gezeigt).



**Abbildung 24: *In situ*-zymografische Darstellung von gelatinolytischer und kollagenolytischer Aktivität im histologischen Schnittpräparat.** Nach 14 d Kultur wurden die Gefrierschnitte der Proben mit Fluorescein-gekoppelter Gelatine bzw. Kollagen IV und Kollagen I (nicht gezeigt) bei 37°C inkubiert und anschließend die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Analyse der Enzymaktivität in den histologischen Präparaten erfolgte unter identischen Aufnahmebedingungen für die Probenreihen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops unter Verwendung der spezifischen Filter für die Anregung (490 nm) und die Emission (für Fluorescein 520-530 nm und für DAPI 460 nm Wellenlänge). In (A) und (B) sind Beispiele von der Knorpel MK und der KK mit RA-SFB unter unstimulierten und stimulierten Bedingungen abgebildet. Die Inhibierbarkeit des enzymatischen Abbaus durch Zugabe von EDTA zum Inkubationspuffer (C) zeigt, dass es sich um MMP handelt. Der Abbau des fluoreszenzgekoppelten Substrates (in diesem Fall Fluorescein-Gelatine) findet nur in Gebieten vitaler Chondrozyten statt (D), Zonen mit leeren Chondrozytenhöhlen (rote Pfeile) ohne Substratabbau. Vergrößerung in (A) und (C) 400 x, in (B) 100 x, in (D) 100 x bzw. im Ausschnitt 400 x.

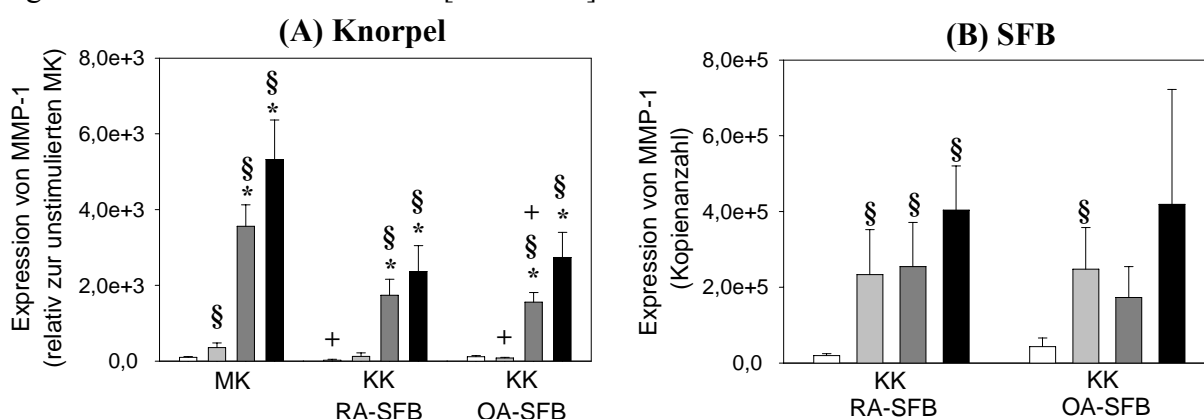
### 3.2.4.3. MMP-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Die Genexpression von MMP-1 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

**MMP-1-mRNA im Knorpel:** In der Knorpel MK führten alle Stimulationen zu einer signifikant gesteigerten Genexpression von MMP-1 (um das 3,5 bis 50-fache), wobei die stärkste Erhöhung des Expressionsniveaus durch IL-1 $\beta$  und durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  induziert wurde.

In den Knorpelproben der KK mit RA- oder OA-SFB führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  (aber nicht mit TNF- $\alpha$ ) ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von MMP-1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Das Expressionsniveau lag jedoch bei allen Stimulationen numerisch bzw. signifikant (IL-1 $\beta$ /OA-SFB) unter dem der Knorpel MK (um 48 bis 77% vermindert) [Abb. 25 A].

**MMP-1-mRNA in den SFB:** Bei den KK mit RA-SFB induzierten alle Stimulationsarten einen signifikanten Anstieg der MMP-1-Expression der SFB um das 12- bis 20-fache im Vergleich zur unstimulierten KK. In den KK mit OA-SFB war aufgrund der großen Streuung der Messwerte für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  die MMP-1-mRNA nur nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  signifikant um das 6-fache erhöht [Abb. 25 B].



**Abbildung 25:** MMP-1-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B). Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienanzahl angegeben. **Legende wie in [Abb. 13].** +  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK; §  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

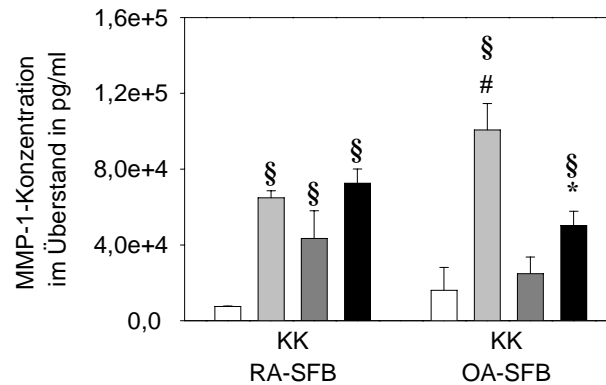
**MMP-1-Protein in den SFB:** Durch die Verwendung eines human-spezifischen MMP-1-ELISA wurde ausschließlich das von den SFB sezernierte MMP-1-Protein im Überstand der Kulturen detektiert.

Die Ausgangsproteinkonzentration von MMP-1 im Überstand der unstimulierten KK mit RA- und OA-SFB lag bei 7422 pg/ml bzw. 16048 pg/ml. Unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  erhöhte sich die MMP-1-Proteinkonzentration signifikant 9-fach (RA-SFB) bzw. 6-fach (OA-SFB) gegenüber den unstimulierten KK. IL-1 $\beta$  induzierte interessanterweise ausschließlich in den RA-SFB, aber nicht in den OA-SFB, eine Steigerung der MMP-1-Proteinkonzentration um das 6-fache gegenüber der unstimulierten KK. Durch Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stieg die



MMP-1-Konzentration im Überstand von RA-SFB um das 10-fache und in OA-SFB um das 3-fache im Vergleich zur unstimulierten KK [Abb. 26].

Zwischen RA- und OA-SFB traten keine signifikanten Unterschiede in der MMP-1-Proteinexpression auf.



**Abbildung 26: MMP-1-Proteinexpression in RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Überständen gemessenen Konzentrationen. § $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ; # $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

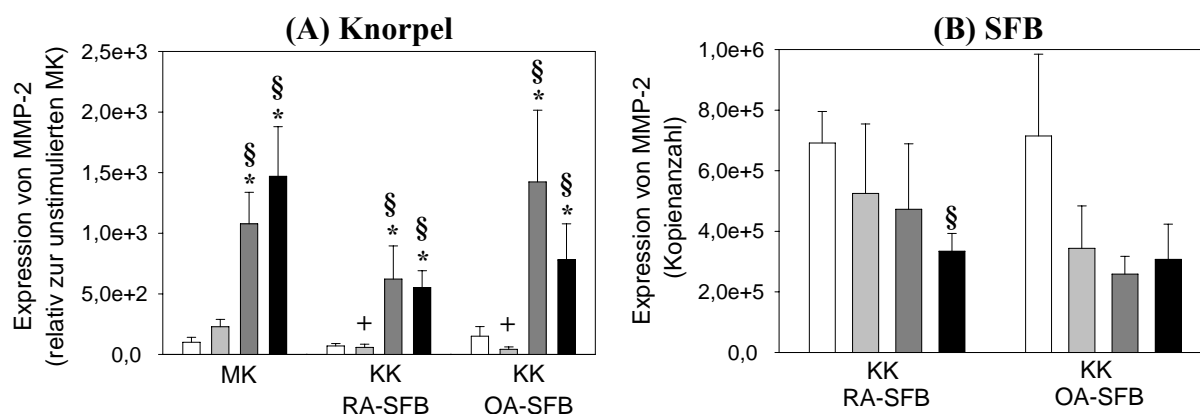
#### 3.2.4.4. MMP-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Die Genexpression von MMP-2 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

**MMP-2-mRNA im Knorpel:** In der Knorpel MK führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , aber nicht mit TNF- $\alpha$ , zu einer signifikant (um das 10- bis 15-fache) gesteigerten Genexpression von MMP-2.

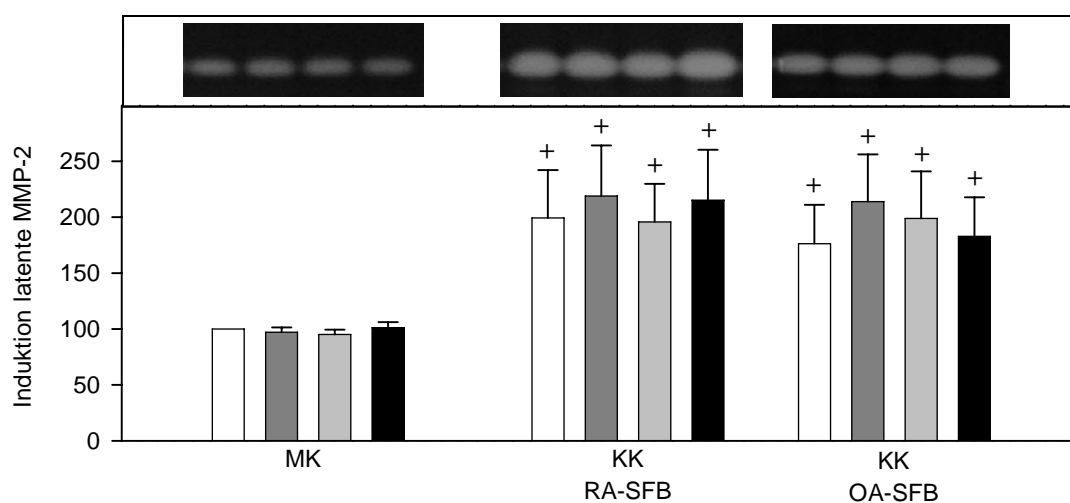
In den Knorpelproben der KK mit RA- oder OA-SFB führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von MMP-2 im Vergleich zur unstimulierten KK. Das Expressionsniveau lag jedoch bei allen Stimulationen (mit Ausnahme von IL-1 $\beta$ -stimulierten KK mit OA-SFB) numerisch unter dem der Knorpel MK (um 30 bis 80% vermindert). Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte in den Knorpelproben der KK mit RA- oder OA-SFB sogar zu einer signifikant verringerten Genexpression von MMP-2 im Vergleich zur entsprechenden Knorpel MK [Abb. 27 A].

**MMP-2-mRNA in den SFB:** Bei den KK mit RA-SFB und OA-SFB war im Gegensatz zum Knorpel in den SFB keine Hochregulation der MMP-2-mRNA-Expression zu beobachten. Bei Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  war bei den KK mit RA-SFB sogar eine signifikante Verminderung der Genexpression für MMP-2 um 48% zu beobachten [Abb. 27 B].



**Abbildung 27: MMP-2-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. Legende wie in [Abb. 13].  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

**MMP-2-Protein im Knorpel und den SFB:** Die Proteinmengen bzw. Aktivitäten der in den Überstand sezernierten MMP-2 wurden zymografisch nachgewiesen. In Gelatine-Zymogrammen wurde die latente Form der MMP-2 (Gelatinase A) bei 72 kD detektiert. Die aktive Form des Enzyms mit einem ca. 6 kD geringeren Molekulargewicht war nicht nachweisbar. MMP-2 wurde sowohl von den Chondrozyten als auch - auf signifikant höherem Niveau - in den KK mit SFB beider Patientengruppen konstitutiv exprimiert und durch die Zytokinstimulation nicht wesentlich verändert [Abb. 28]. Die Aktivität der latenten MMP-2 ließ sich spezifisch durch Inkubation mit EDTA, jedoch nicht mit dem Serinprotease-Inhibitor PMSF hemmen (nicht gezeigt). Das Fehlen aktivierter MMP-2-Formen in den Zymogrammen deutet darauf hin, dass im Kulturüberstand keine Faktoren vorkommen, die zu einer Aktivierung der MMP führen.



**Abbildung 28: Zymografische Analyse der MMP-2-Aktivität in den Kulturüberständen der Knorpel MK (n = 5) und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  nach 14 d Kultur.** Die MMP-2 Aktivität in den Kulturüberständen wurde mittels Gelatine-Zymografie erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Zymogrammen auftretenden MMP-2-Banden, wobei der Messwert (Bandenintensität) der unstimulierten MK 100% entspricht. Legende wie in [Abb. 13].  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK.

### 3.2.4.5. MMP-3-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Die Genexpression von MMP-3 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

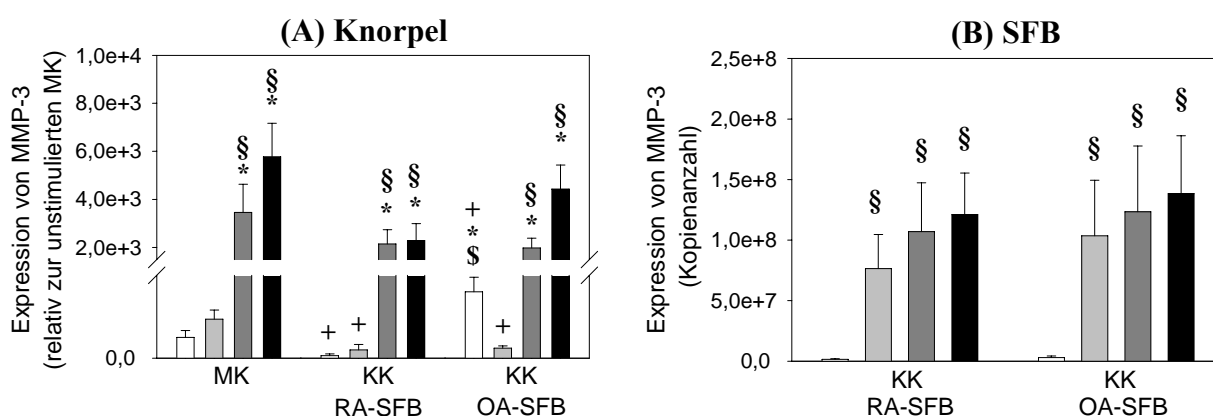
**MMP-3-mRNA im Knorpel:** In der Knorpel MK führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , aber nicht mit TNF- $\alpha$ , zu einer signifikant (um das 35- bis 58-fache) gesteigerten Genexpression von MMP-3.

In den Knorpelproben der KK mit RA- oder OA-SFB führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von MMP-3 im Vergleich zur unstimulierten KK, wenngleich die Mittelwerte numerisch unter dem Expressionsniveau der Knorpel MK lagen (23 bis 88% vermindert).

Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte dagegen zu einer signifikant verringerten Genexpression von MMP-3 in den Knorpelproben der KK mit RA-SFB und OA-SFB (je 78%) im Vergleich zu der entsprechenden Knorpel MK.

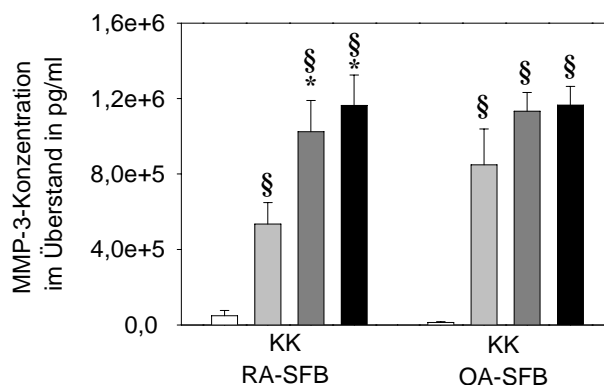
Im Vergleich zur Knorpel MK wies die unstimulierte KK mit RA-SFB eine signifikante Verringerung, die unstimulierte KK mit OA-SFB hingegen eine signifikante Erhöhung (3,2 fach) der MMP-3-Expression auf [Abb. 29 A].

**MMP-3-mRNA in den SFB:** Bei den KK mit RA-SFB und OA-SFB wurde durch alle Stimuli eine signifikante Erhöhung der MMP-3-Expression in den SFB um das 35- bis 78-fache induziert [Abb. 29 B].



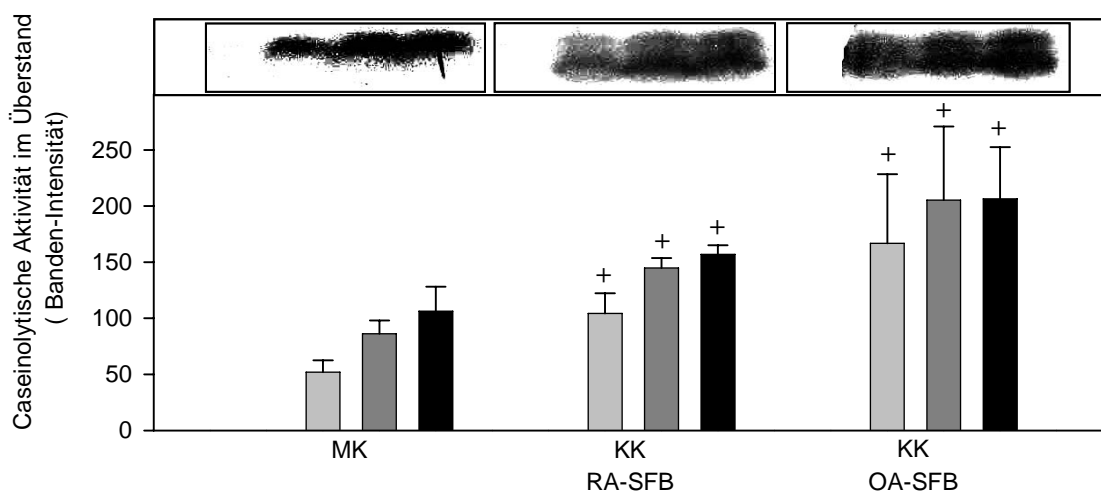
**Abbildung 29: MMP-3-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. Legende wie in [Abb. 13].  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $^*p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur KK mit RA-SFB.

**MMP-3-Protein in den SFB:** Durch die Verwendung eines human-spezifischen MMP-3-ELISA wurde ausschließlich die von den SFB sezernierte MMP-3 im Überstand der Kulturen detektiert. Die MMP-3-Ausgangsproteinkonzentration im Überstand der unstimulierten KK mit RA- und OA-SFB lag bei 48664 pg/ml bzw. 12568 pg/ml. Durch alle Stimulationsarten erhöhte sich die MMP-3-Proteinkonzentration im Überstand der SFB beider Patientengruppen signifikant um das 10- bis 93-fache. Zwischen RA- und OA-SFB traten keine signifikanten Unterschiede in der MMP-3-Proteinexpression auf [Abb. 30].



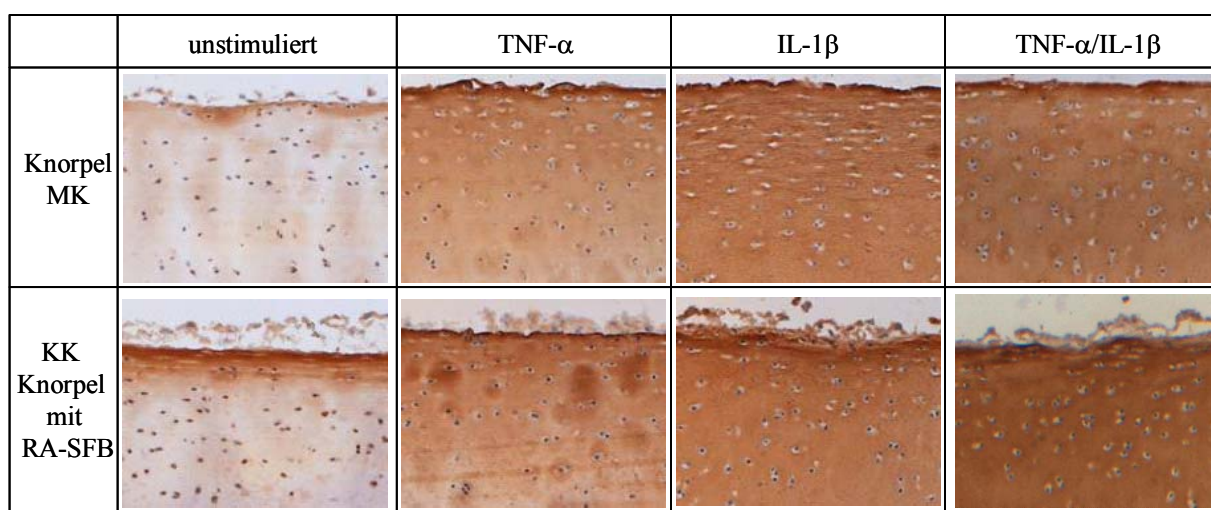
**Abbildung 30: MMP-3-Proteinexpression in RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Überständen gemessenen Konzentrationen. Legende wie in [Abb. 13]. §  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

**MMP-3-Protein im Knorpel und den SFB:** Die Proteinmengen bzw. Aktivitäten der in den Überstand sezernierten MMP-3 wurden zusätzlich zymografisch nachgewiesen. Dies ermöglichte einen direkten Vergleich des MMP-3-Gehaltes der Knorpel MK und der KK mit SFB. In den Casein-Zymogrammen wurde die latente Form der caseinolytisch aktiven MMP-3 bei 57 kD und die aktive Form des Enzyms mit einem Molekulargewicht von 45 kD detektiert. Aktive und latente Form von MMP-3 wurden nicht separiert sondern zusammen als Total-MMP-3 in die Auswertung aufgenommen. In den Überständen der Knorpel MK konnte die latente Form der MMP-3 nur nach Stimulation nachgewiesen werden. In gleichem Maße wie in der Knorpel MK konnte die latente Form der MMP-3 in den Überständen der KK mit RA- und OA-SFB nur nach Stimulation detektiert werden. In den KK war die aktive Form der MMP-3 zusätzlich zu beobachten [Abb. 31]. Bei ca. 72 kD erschien in allen Proben die Bande der ebenfalls caseinolytisch aktiven MMP-2 mit der bereits in der Gelatine-Zymografie ermittelten Aktivität (nicht gezeigt; s. o. 3.2.4.4). Die Identifizierung als MMP-3 konnte zusätzlich zum Molekulargewicht durch Inhibition mit EDTA bzw. fehlende Inhibition durch PMSF bestätigt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 31: Zymografische Analyse der Gesamt-MMP-3-Aktivität in den Kulturüberständen der Knorpel MK (n = 5) und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d Kultur.** Die MMP-3-Aktivität (latente und aktive Form) in den Kulturüberständen wurde mittels Casein-Zymografie erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte der Bandenintensität  $\pm$  SEM der in den Zymogrammen auftretenden MMP-3 Banden. Legende wie in [Abb. 13]. +  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK.

Die immunhistochemische Analyse der MMP-3-Proteinexpression im Knorpel und den kokultivierten RA-SFB zeigte, dass MMP-3 bereits in der unstimulierten Knorpel MK exprimiert wurde, wenngleich deutlich schwächer als in den mit Zytokinen stimulierten Knorpel MK. Durch Stimulation der Knorpel MK mit TNF- $\alpha$  wurde eine deutliche Erhöhung der MMP-3-Proteinexpression im gesamten Knorpel induziert. Dieser Effekt wurde durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  noch einmal leicht verstärkt. In der KK mit RA-SFB waren die unstimulierten Knorpelproben in den tieferen Bereichen der Knorpelmatrix durch eine mit der Knorpel MK vergleichbare MMP-3-Expression gekennzeichnet, in der OF-nahen Zone kam es jedoch zu einer deutlichen MMP-3-Expression unterhalb der SFB-Schicht. Die RA-SFB waren ebenfalls für MMP-3 positiv. Durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und insbesondere TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  wurde die MMP-3-Expression in den KK ebenso wie in der MK gesteigert [Abb. 32].



**Abbildung 32: Immunhistologische Darstellung humaner und boviner MMP-3 in Knorpel MK und KK mit RA-SFB.** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von unstimulierten bzw. mit TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Proben nach einer Kultur von 14 d (Vergrößerung 200 x).

### 3.2.4.6. MMP-9-Expression auf mRNA- und Proteinebene

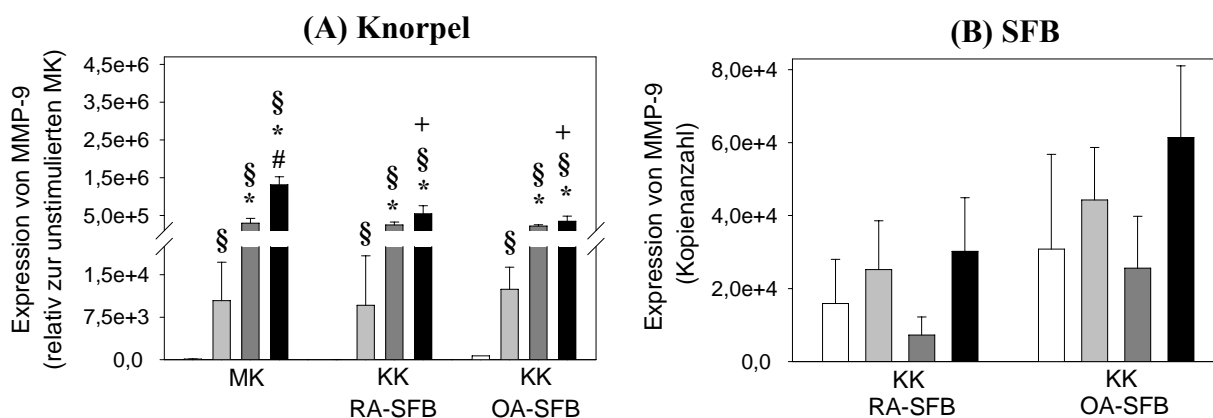
Die Genexpression von MMP-9 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

MMP-9-mRNA im Knorpel: In der Knorpel MK konnte für alle Stimulationen eine signifikante (100- bis 13.000-fache) Zunahme der MMP-9-Expression festgestellt werden, wobei der stärkste Effekt durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation vermittelt wurde.

In den Knorpelproben der KK mit RA- oder OA-SFB führten die Stimulationen mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu einer signifikant erhöhten MMP-9-Genexpression auf gleichem Niveau wie die entsprechenden Knorpel MK. Nach TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  Stimulation der KK mit RA-SFB oder OA-SFB war die MMP-9-Genexpression ebenfalls signifikant erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle, jedoch signifikant vermindert im Vergleich mit der entsprechenden Knorpel MK [Abb. 33 A].

MMP-9-mRNA in den SFB: Bei den KK mit RA- und OA-SFB bewirkte die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  keine signifikante Änderung der MMP-9-Expression in den SFB [Abb. 33 B]. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die in der „real-time“ RT-

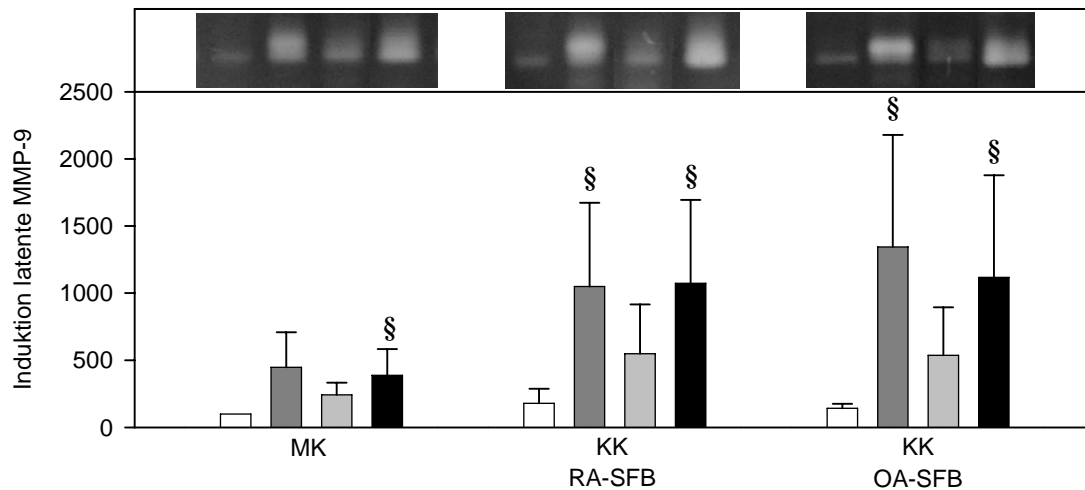
PCR gemessenen PCR-Produkte im Bereich der Nachweisgrenze lagen und somit vermutlich die Sensitivität der PCR nicht ausgereicht hat, um eventuelle Unterschiede zu detektieren. Aufgrund der geringen Menge zur Verfügung stehender cDNA konnte die cDNA-Konzentration nicht wesentlich erhöht werden.



**Abbildung 33: MMP-9-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. *Legende wie in [Abb. 13].*  $^+p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK;  $^{\$}p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle;  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ;  $^{\#}p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

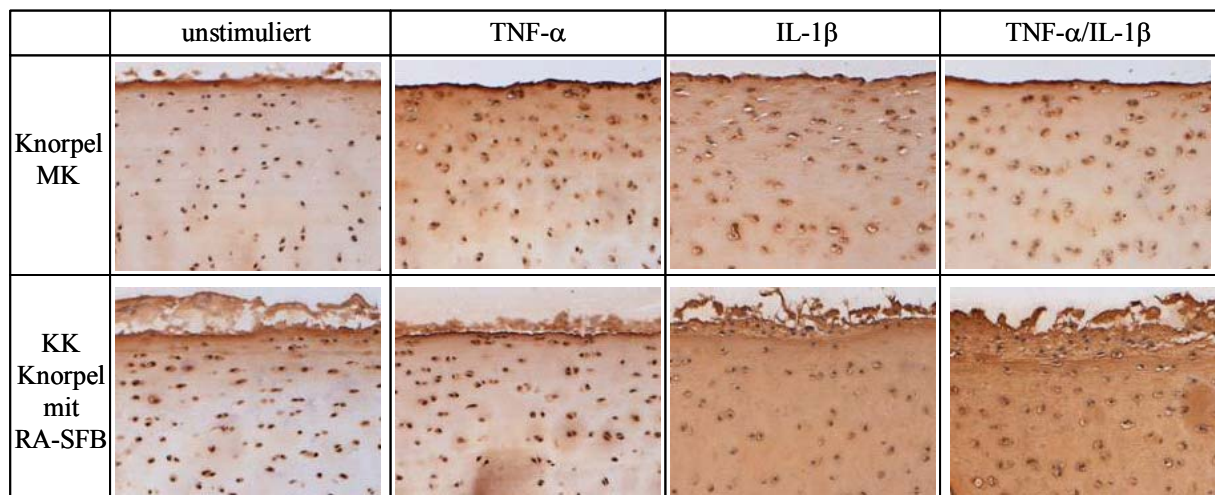
**MMP-9-Protein im Knorpel und den SFB:** Die Proteinmengen bzw. Aktivitäten der sezernierten MMP-9 wurden zymografisch nachgewiesen. In den Gelatine-Zymogrammen wurde die latente Form der MMP-9 (Gelatinase B) bei 92 kD detektiert. Die aktive Form des Enzyms mit einem ca. 6 kD geringem Molekulargewicht war nicht nachweisbar. In den unstimulierten Knorpel MK konnte eine schwache Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität der latenten MMP-9 wurde durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  numerisch um das 5-fache und mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  signifikant um das 4-fache gesteigert. Die Stimulation mit IL-1 $\beta$  hingegen bewirkte keine erhöhte Aktivität der latenten MMP-9 in der Knorpel MK. In den KK mit RA- und OA-SFB konnte ein ähnliches Profil der stimulationsabhängigen Aktivität der latenten MMP-9 wie in der Knorpel MK beobachtet werden [Abb. 34].

Die Spezifität der Bande für die latente MMP-9 konnte zusätzlich zum Molekulargewicht durch Inhibition mit EDTA bzw. fehlende Inhibition durch PMSF bestätigt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 34: Zymografische Analyse der MMP-9-Aktivität in den Kulturüberständen der Knorpel MK (n = 5) und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d Kultur.** Die MMP-9-Aktivität in den Kulturüberständen wurde mittels Gelatine-Zymografie erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Zymogrammen auftretenden MMP-9 Banden, wobei der Messwert (Bandenintensität) der unstimulierten MK 100% entspricht. Legende wie in [Abb. 13].  $\S p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Die immunhistochemische Analyse der MMP-9-Expression im Knorpel und den kokultivierten RA-SFB zeigte, dass MMP-9 bereits in der unstimulierten Knorpel MK exprimiert wurde. Eine Stimulation der Knorpel MK mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  führte zu einer leichten Erhöhung der MMP-9 Proteinexpression im gesamten Knorpel. In der KK mit RA- SFB konnte eine deutliche Steigerung der MMP-9-Expression im Knorpel durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  induziert werden. Die kokultivierten RA-SFB zeigten unabhängig von der Stimulation eine starke MMP-9-Färbung [Abb. 35].



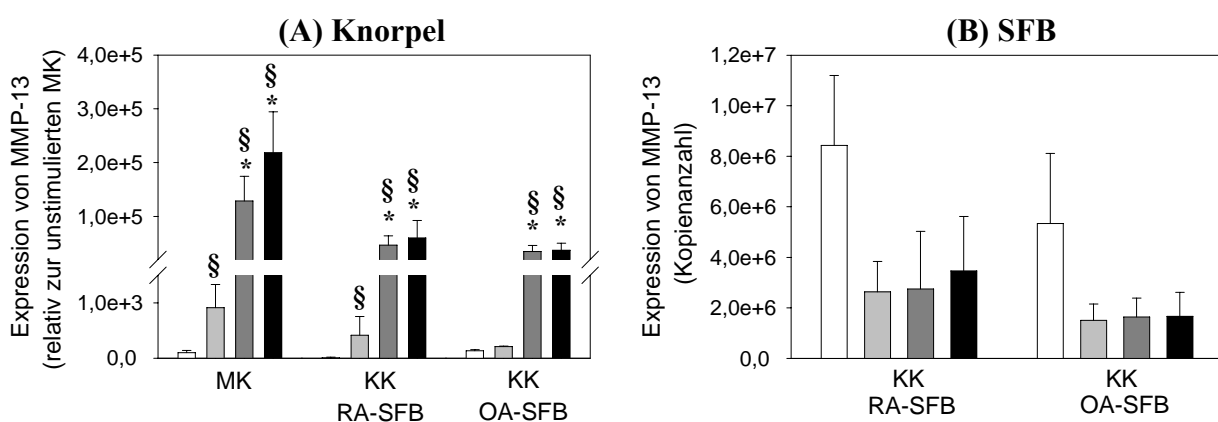
**Abbildung 35: Immunhistologische Darstellung humaner und boviner MMP-9 in Knorpel MK und KK mit RA-SFB.** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von unstimulierten bzw. mit TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Proben nach einer Kultur von 14 d (Vergrößerung 200 x).

### 3.2.4.7. MMP-13-Expression auf mRNA-Ebene

Für MMP-13 wurde die mRNA-Expression im Knorpel und den KK mit SFB ermittelt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

**MMP-13-mRNA im Knorpel:** In der Knorpel MK konnte für alle Stimulationen signifikant (um das 9- bis 2.200-fache) erhöhte MMP-13 mRNA-Expression gemessen werden, wobei die stärkste Steigerung des Expressionsniveaus durch IL-1 $\beta$  und v. a. durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation induziert wurde. Vergleichbare Effekte wurden auch in den Knorpelproben der KK mit RA- oder OA-SFB beobachtet, mit der Ausnahme, dass in der KK mit OA-SFB TNF- $\alpha$  keinen Effekt hatte. Jedoch fiel auch hier die numerische Verringerung (um 64 bis 83%) der mittleren Expressionswerte im Vergleich zur Knorpel MK auf [Abb. 36 A].

**MMP-13-mRNA in den SFB:** Bei den KK mit RA- und OA-SFB bewirkte die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  keine signifikante Veränderung der MMP-13-Genexpression, obwohl die mittleren Expressionswerte der stimulierten RA- und OA-SFB numerisch deutlich (59 bis 72%) unter den Werten der unstimulierten Kontrolle lagen und tendenziell auf eine Unterdrückung der MMP-13-mRNA-Expression hindeuten [Abb. 36 B].



**Abbildung 36: MMP-13-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. Legende wie in [Abb. 13]. § $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

### 3.2.4.8. TIMP-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Da das Verhältnis zwischen den MMP und ihren natürlichen Inhibitoren, den TIMP von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der MMP ist, wurde die mRNA-Expression von TIMP-1 mittels „real-time“ RT-PCR und die Proteinexpression durch reverse Zymografie bestimmt.

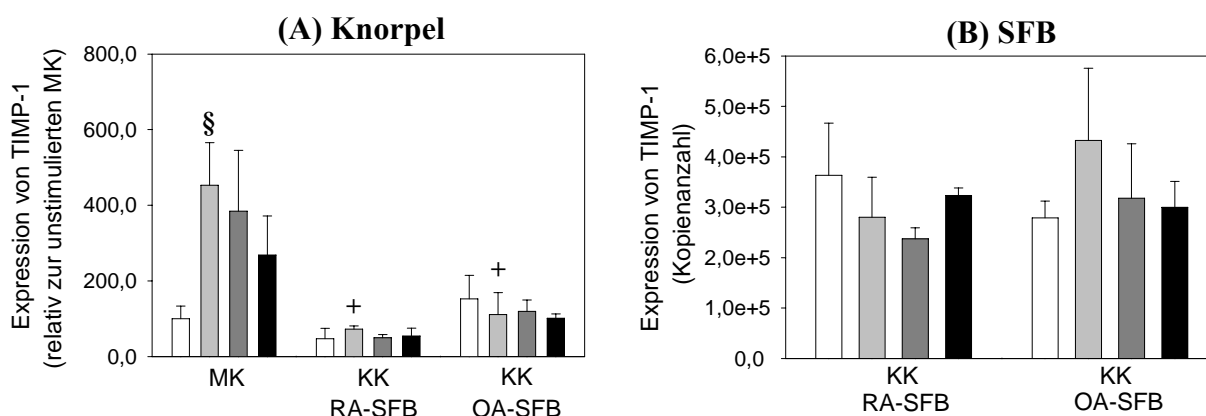
Die Genexpression von TIMP-1 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

**TIMP-1-mRNA im Knorpel und den SFB:** In der Knorpel MK stieg die TIMP-1-Expression nach allen Stimulierungen signifikant (um das 2,7- bis 4,5-fache) an. In den Knorpelproben der KK mit RA- und OA-SFB hingegen änderte sich die TIMP-1-Expression nicht durch Stimulation. Bei den stimulierten KK mit RA- und OA-SFB konnte eine im Vergleich zu den entsprechenden Knorpel MK numerische (bei TNF- $\alpha$  sogar signifikante) Verringerung der TIMP-1-Expression beobachtet werden (um das 3- bis 8-fache verringert) [Abb. 37 A].

Bei den KK mit RA- und OA-SFB bewirkte die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF-

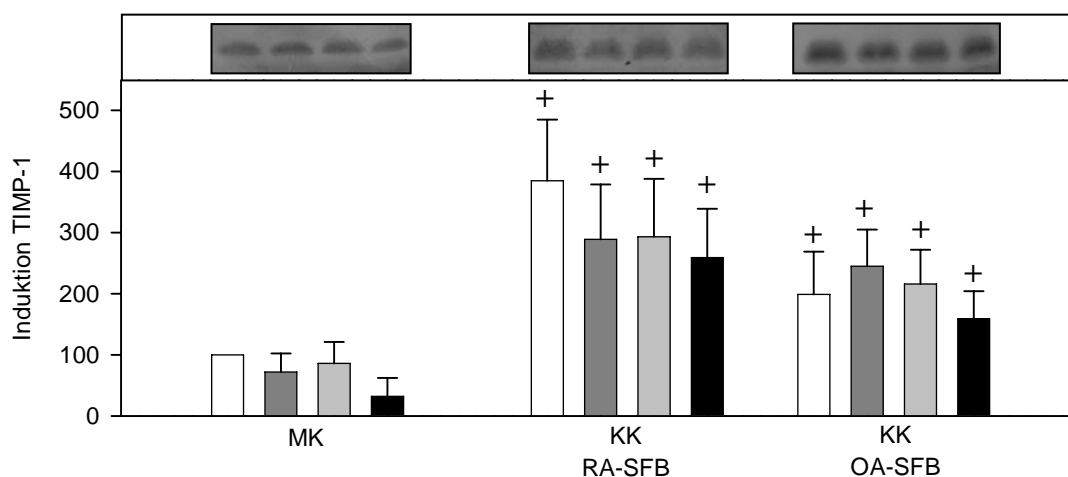


$\alpha$ /IL-1 $\beta$  keine signifikante Veränderung der TIMP-1-Genexpression [Abb. 37 B].



**Abbildung 37: TIMP-1-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. Legende wie in [Abb. 13]. <sup>+</sup> $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK; <sup>§</sup> $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

**TIMP-1-Protein im Knorpel und den SFB:** Im reversen Zymogramm zeigte sich ausschließlich TIMP-1 mit einer Größe von ca. 28 kD, TIMP-2, -3 und -4 wurden hingegen nicht detektiert. Der TIMP-1-Gehalt in den Überständen wurde weder in der Knorpel MK noch in den KK mit RA- oder OA-SFB durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  signifikant beeinflusst. Durch die KK mit SFB wurde jedoch bei beiden Patientengruppen eine signifikante Steigerung (2 bis 8-fach) des TIMP-1-Gehaltes im Kulturüberstand im Vergleich zu den entsprechenden Knorpel MK induziert. Interessanterweise betraf dies sowohl die unstimulierten als auch alle stimulierten KK mit SFB [Abb. 38].



**Abbildung 38: Zymografische Analyse des TIMP-1-Gehaltes der Kulturüberstände der Knorpel MK (n = 5) und der KK mit RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach Stimulierung mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  nach 14 d Kultur.** Der TIMP-1-Gehalt in den Kulturüberständen wurde zymografisch erfasst und quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Zymogrammen auftretenden TIMP-1 Banden, wobei der Messwert (Bandenintensität) der unstimulierten MK 100% entspricht. Legende wie in [Abb. 13]. <sup>+</sup> $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK.

### 3.2.5. Pro-inflammatorische Zytokine

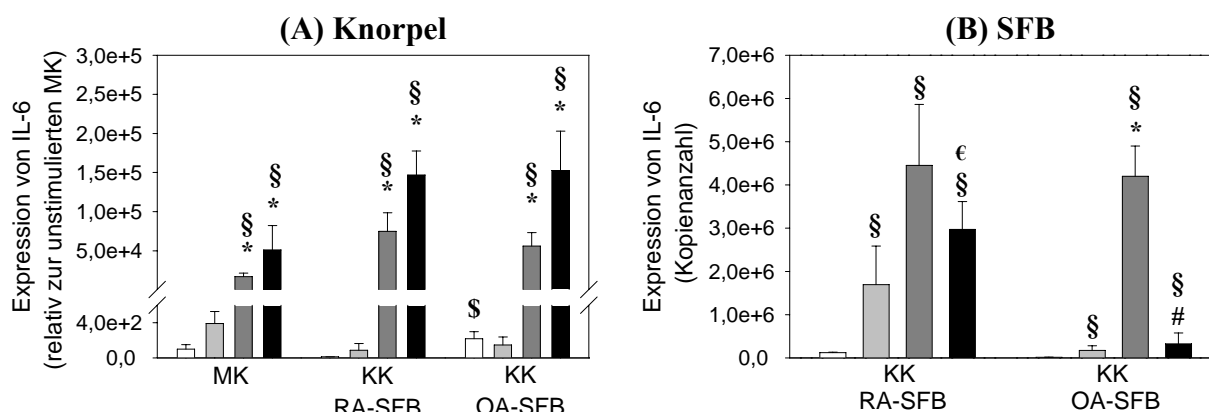
#### 3.2.5.1. IL-6-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Die Genexpression von IL-6 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

**IL-6-mRNA im Knorpel:** In der Knorpel MK wurde die Genexpression von IL-6 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , aber nicht mit TNF- $\alpha$ , signifikant (um das 170- bis 500-fache) erhöht.

In den Knorpelproben der KK wurde die IL-6-Genexpression durch IL-1 $\beta$  und auch durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  signifikant gegenüber der jeweiligen unstimulierten Kontrolle gesteigert (250 bis 12.000-fach). Hierbei lag jedoch die mittlere Expression der Knorpelproben der KK mit RA- und OA-SFB numerisch (3- bis 4,5-fach) über dem Niveau der entsprechenden Knorpel MK [Abb. 39 A].

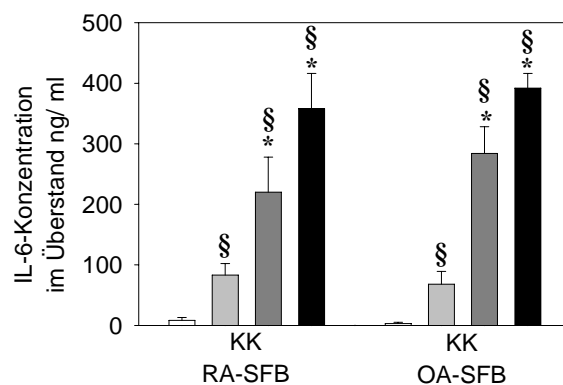
**IL-6-mRNA in den SFB:** Bei den KK mit RA- und OA-SFB führten alle Stimulierungen zu signifikant erhöhten IL-6-Expressionen in RA- und OA-SFB gegenüber der jeweiligen unstimulierten KK. Die stärkste Induktion erfolgte in beiden Patientengruppen durch Stimulierung mit IL-1 $\beta$  [Abb. 39 B].



**Abbildung 39: IL-6-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. **Legende wie in [Abb. 13].** §  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ; #  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ ; §  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur KK mit RA-SFB; €  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur KK mit OA-SFB.

**IL-6-Protein in den SFB:** Durch die Verwendung eines human-spezifischen IL-6-ELISA wurde ausschließlich das von den SFB sezernierte IL-6 im Kulturüberstand detektiert. Die IL-6-Ausgangskonzentration im Überstand der unstimulierten RA- und OA-SFB lag zwischen 3 bis 8 ng/ml. Durch alle Stimulationen erhöhte sich der IL-6-Gehalt im Überstand beider Patientenkollektive drastisch und signifikant (um das 10- bis 130-fache), wobei die stärkste Induktion durch IL-1 $\beta$  bzw. durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation erfolgte [Abb. 40].

Zwischen den KK mit RA- und OA-SFB traten keine signifikanten Unterschiede in der IL-6 Proteinexpression auf.



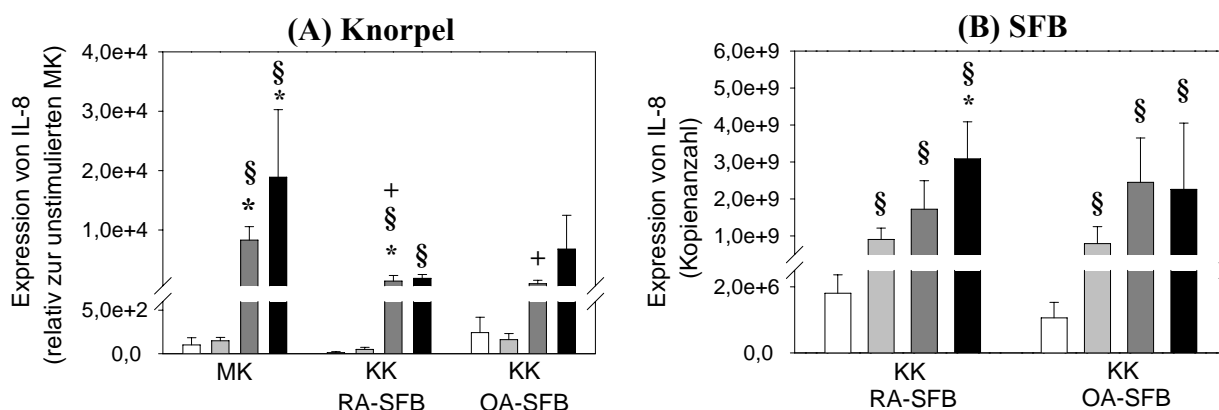
**Abbildung 40: IL-6-Proteinexpression von RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Überständen gemessenen Konzentrationen. Legende wie in [Abb. 13]. § $p \leq 0,05$  im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

### 3.2.5.2. IL-8-Expression auf mRNA- und Proteinebene

Die Genexpression von IL-8 wurde im Knorpel und in den SFB der MK bzw. der KK bestimmt. Die RNA wurde nach Beendigung des Versuches getrennt aus Knorpel und SFB isoliert und die mRNA-Expression mit „real-time“ RT-PCR analysiert.

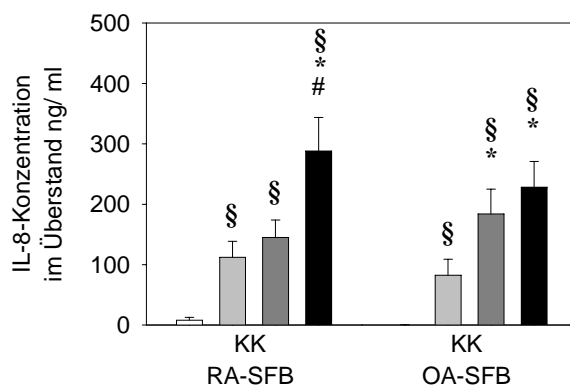
IL-8-mRNA im Knorpel: In der Knorpel MK wurde die IL-8-Genexpression nur durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , aber nicht TNF- $\alpha$ , signifikant (um das 83- bis 189-fache) erhöht. In den Knorpelproben der KK mit RA-SFB erfolgte eine erhöhte Induktion von IL-8-mRNA ebenfalls nur durch IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  (120 bis 157-fach), in den Knorpelproben der KK mit OA-SFB blieb ein signifikanter Effekt aus. Das durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  erreichte mRNA-Expressionsniveau lag in den Knorpelproben der KK mit RA- und OA-SFB signifikant unter den Werten der Knorpel MK und die Werte der TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation zeigten zumindest eine numerische (um das 3- bis 10-fache) Verringerung der Expression gegenüber der Knorpel MK [Abb. 41 A].

IL-8-mRNA in den SFB: Im Gegensatz zur IL-8-Expression im Knorpel wurde bei den KK mit RA- und OA-SFB eine Zunahme der IL-8-mRNA-Expression (um das 500- bis 2100-fache) für alle Stimulierungen beobachtet [Abb. 41 B].



**Abbildung 41: IL-8-mRNA-Expression im Knorpel der Knorpel MK (n = 3) bzw. nach der KK mit RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) (A) sowie in RA-SFB (n = 4) oder OA-SFB (n = 3) nach der KK mit dem Knorpel (B).** Die Proben für die Daten der Knorpel-mRNA und der SFB-mRNA entstammen einem KK-Experiment. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression, in (A) entspricht die unstimulierte Knorpel MK 100%, in (B) ist die Kopienzahl angegeben. Legende wie in [Abb. 13]. + $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Knorpel MK; § $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

***IL-8-Protein in den SFB:*** Durch die Verwendung eines human-spezifischen IL-8-ELISA wurde ausschließlich das von den SFB sezernierte IL-8 im Kulturüberstand detektiert. Die IL-8-Ausgangskonzentration im Überstand der unstimulierten KK mit RA- und OA-SFB wies große Unterschiede auf und lag zwischen 0,3 - 7 ng/ml. Durch alle Stimulationen erhöhte sich der IL-8-Gehalt im Überstand der SFB beider Patientengruppen drastisch und signifikant um das 15- bis 1000-fache (man beachte dabei die stark variierenden Konzentrationen der unstimulierten KK) [Abb. 42]. Zwischen RA- und OA-SFB traten keine signifikanten Unterschiede in der IL-8-Proteinexpression auf.



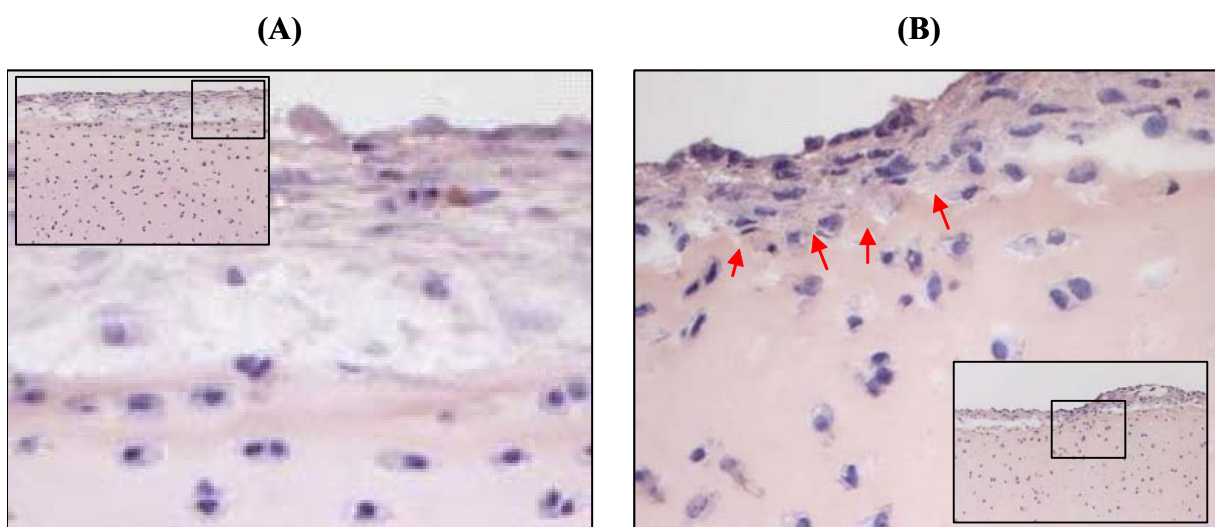
**Abbildung 42: IL-8-Proteinexpression in RA- und OA-SFB (jeweils n = 5) nach 14 d KK mit Knorpel.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der in den Überständen gemessenen Konzentrationen. Legende wie in [Abb. 13]. § $p \leq 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; \* $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit TNF- $\alpha$ ; # $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Stimulation mit IL-1 $\beta$ .

### 3.2.6. Morphologie der Destruktion

#### 3.2.6.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

##### *Langzeitkultur*

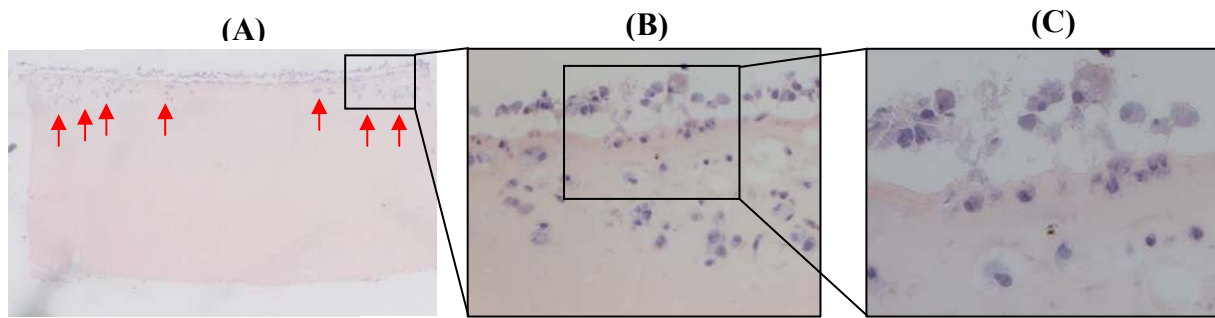
Eine lichtmikroskopisch nachweisbare Destruktion der Knorpelmatrix durch die kokultivierten SFB im Sinne eines invasiven Wachstums der SFB konnte nach den 14-tägigen Stimulationsexperimenten noch nicht beobachtet werden. Eine Verlängerung der Kulturdauer auf 42 d resultierte hingegen bei den mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Proben in einer deutlichen Destruktion der oberflächlichen Knorpelschicht mit gleichzeitigem Einwandern der RA-SFB in den Knorpel an der Invasionsfront [Abb. 43 B]. In den unstimulierten KK konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden [Abb. 43 A].



**Abbildung 43: Invasive Destruktion des Knorpels durch RA-SFB nach 42 d KK.** (A) zeigt die mehrlagige RA-SFB Schicht auf der Knorpel-OF einer unstimulierten KK, wobei eine klare Abgrenzung des Übergangs von SFB zur Knorpel-OF erkennbar ist. In der mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten Kultur (B) konnte eine Invasion der RA-SFB in die oberflächlichen Knorpelschichten beobachtet werden (rote Pfeile). Vergrößerung: Eingeblenndete Aufnahmen 100 x, Ausschnitte 400 x.

##### *Invasion der RA-SFB in den Knorpel bei Abwesenheit vitaler Chondrozyten*

Bei der Beschreibung des PG-Verlustes (3.2.1.1) wurde bereits belegt, wie wichtig die Rolle der Chondrozyten bei der SFB-vermittelten Knorpeldestruktion ist. Neben dem Abbau von Matrixbestandteilen wird auch das invasiv-destruktive Verhalten der kokultivierten RA-SFB durch die An- bzw. Abwesenheit vitaler Chondrozyten beeinflusst. So ist bereits nach 14 d KK von RA-SFB und Knorpel† bei Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  eine massive Invasion der RA-SFB in die Knorpelmatrix zu beobachten [Abb. 44 A-C]. In Proben, die unter gleichen Bedingungen, jedoch mit vitalem Knorpel kultiviert wurden, konnte eine derart starke Invasion nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

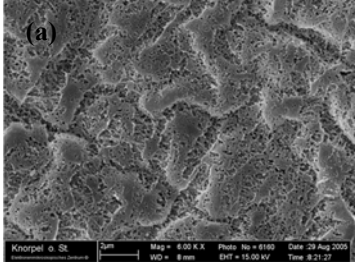
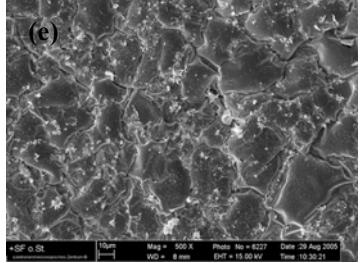
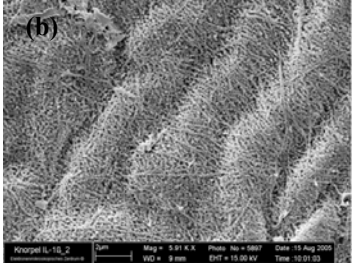
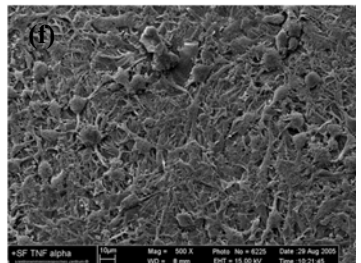
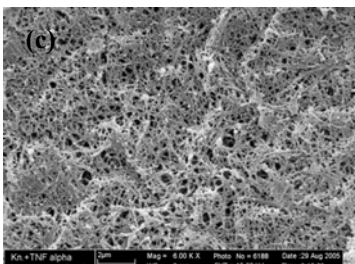
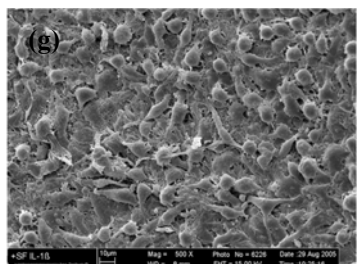
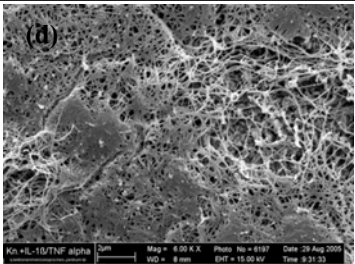
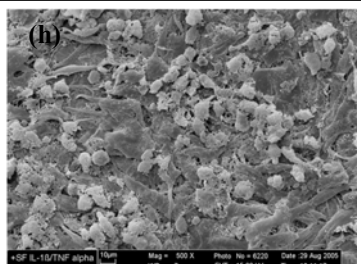
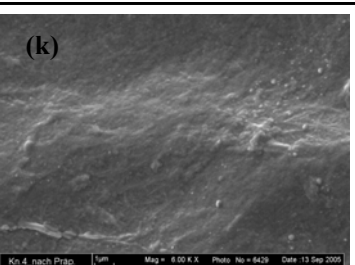
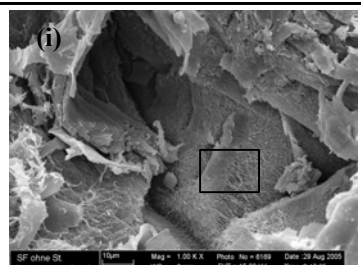
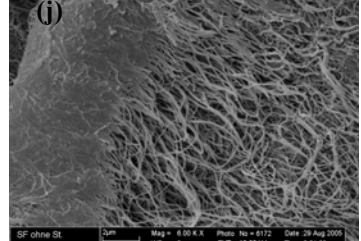


**Abbildung 44: Invasives Wachstum von RA-SFB in die Knorpelmatrix von Knorpel ohne vitale Chondrozyten.** Der Knorpel wurde vor der KK schockgefroren, um die Chondrozyten abzutöten. Nach dem Auftauen wurde der Knorpel mit RA-SFB besiedelt und 14 d unter Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  kultiviert. (A) zeigt eine HE-Übersichtsfärbung, in der die Abwesenheit vitaler Chondrozyten durch fehlende Hämatoxylin-Anfärbung der Chondrozyten-Kerne ersichtlich ist. (B) und (C) zeigen vergrößerte Ausschnitte aus (A), in denen ein Einwachsen der RA-SFB in die Knorpelmatrix erkennbar ist. Vergrößerungen: (A) 40 x, (B) 200 x, (C) 400 x.

### 3.2.6.2. REM-Untersuchungen

Die Effekte der 14-tägigen Zytokinstimulation auf die Knorpel MK und die kokultivierten RA-SFB wurden mithilfe der REM dargestellt. Frisch präparierter Knorpel hatte eine gleichmäßige, intakte OF [Abb.45 k]. Diese äußere, zellfreie Schicht der extrazellulären Knorpelmatrix (*lamina splendens*), besteht aus einer Lage von granulärem Material mit fibrillären Elementen und einer elektronendichten OF-Schicht aus Proteinen (z. B. Lubricin) und Phospholipiden. Diese glatte und dichte OF bestimmt die Gleiteigenschaften des Gelenkknorpels maßgeblich. Der Abbau und das Fehlen dieser Schicht stellt den initialen Schritt zur Freilegung und Degeneration des Kollagenetzwerkes dar. Nach 14 d *in vitro*-Kultur löste sich diese oberflächliche Mucoproteinschicht teilweise ab und die darunterliegende Knorpelmatrix mit dem charakteristisch dichten Netzwerk aus Kollagenfibrillen wurde sichtbar [Abb. 45 a]. TNF- $\alpha$ -Stimulation verstärkte diesen Effekt noch weiter, so dass die Knorpel-OF mit dem charakteristisch dichten fibrillären Kollagenetzwerk nun vollständig freigelegt wurde. Mit Ausnahme der OF-nahen Kollagenfibrillen waren die tiefer liegenden Kollagenfibrillen von den PG kaschiert [Abb. 45 b]. Durch IL-1 $\beta$ -Stimulation kam es zur fortschreitenden Depletion von PG, wodurch eine massive Freilegung des Kollagenfibrillengerüsts zu beobachten war [Abb. 45 c]. In TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben kam es neben der ausgeprägten Demaskierung der Kollagenfibrillen punktuell zum kompletten Kollaps des Kollagengerüsts, in dessen Folge kraterähnliche Vertiefungen in der Knorpelmatrix zu beobachten waren [Abb. 45 d]. Für die kokultivierten RA-SFB konnten ebenfalls starke morphologische Veränderungen durch die Zytokinstimulation beobachtet werden. Die kokultivierten RA-SFB hatten unter unstimulierten Bedingungen ein fibroblastentypisches Aussehen (flache, plattenartige, und konfluent gewachsene Zellen mit glatter OF) [Abb. 45 e]. Nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und insbesondere nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zeigten die RA-SFB einen stark aktivierten Phänotyp (abgerundete, kondensierte Zellen mit kaulifloren Ausstülpungen, langen zytoplasmatischen Fortsätzen zu den anderen SFB sowie teilweise Granula-artigen Absonderungen) [Abb. 45 f-h]. Da die REM eher der Analyse der OF-Struktur des Knorpels und der RA-SFB diente und die RA-SFB einen vollständig konfluenten Zellrasen auf der Knorpel-OF bildeten, konnte die RA-SFB-vermittelte Matrixdegradation nicht systematisch

untersucht werden. An ausgewählten Stellen (Randbereiche/Präparationsartefakte) konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits unter unstimulierten Bedingungen eine deutliche Matrixdegradation durch die SFB verursacht wurde [Abb. 45 i-j].

Knorpel MK			KK Knorpel mit RA-SFB
	<b>unstimuliert</b>		
	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>		
	<b>IL-1<math>\beta</math></b>		
	<b>TNF-<math>\alpha</math>/IL-1<math>\beta</math></b>		
	<b>Frischer Knorpel</b>	<b>unter SFB-Schicht</b>	
			

**Abbildung 45: REM-Aufnahmen der Knorpel-OF und der kokultivierten RA-SFB nach einer Kulturdauer von 14 d.** (a)-(d) Knorpel MK, (k) frischer Knorpel direkt nach der Präparation, (e)-(h) kokultivierte RA-SFB, (i) Aufnahme durch RA-SFB-Schicht auf die darunterliegende Knorpelmatrix, (j) Ausschnitt aus (i). Vergrößerungen: (a)-(d), (k), (j): 6000 x; (e)-(h) 500 x; (i)-1000 x

### 3.2.6.3. TEM-Untersuchungen

Das Kollagengerüst des Knorpels wurde mittels TEM-Analyse nach 14 d Kultur untersucht. Eine Darstellung der PG der Knorpelmatrix war nicht möglich, da durch die Behandlung der Proben sämtliche PG der Matrix kollabieren und nicht kontrastierbar sind. Durch Analyse der Knorpel MK konnte der Einfluss der unterschiedlichen Zytokinstimulationen auf die Beschaffenheit der Kollagenfibrillen untersucht werden. Der unstimulierte Knorpel zeichnet sich durch ein kontrastreiches, dichtes Kollagenfibrillennetz aus, in dem quer- und längsgeschnittene Kollagenfibrillen und teilweise zu Fasern zusammengelagerte Kollagenfibrillen erkennbar sind. Unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  kam es zu einem Verlust der starken Kontrastierbarkeit der Kollagenfibrillen in der OF-nahen Region, tiefer gelegene Knorpelschichten hingegen zeigten noch eine deutliche Struktur und Kontrastierung des Kollagengerüsts. Eine Abnahme der optischen Dichte der OF-nahen Kollagenstrukturen ließ sich auch für die Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  beobachten.

Durch TEM-Analyse der Knorpel/RA-SFB Proben konnte bereits in der unstimulierten KK eine fortschreitende Veränderung der Kollagenfibrillen unter der RA-SFB Schicht festgestellt werden. Die in der unstimulierten Knorpel MK stark kontrastierten Kollagenfibrillen waren in der KK mit RA-SFB deutlich struktur- bzw. konturloser. Eine unfokussierte Aufnahme konnte im abgebildeten Beispiel anhand des scharf dargestellten SFB als „Positivkontrolle“ ausgeschlossen werden. Die RA-SFB vermittelte Destruktion der Kollagenmatrix ließ sich auch in den mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten KK reproduzieren. Der Verlust der optischen Dichte der Kollagenfibrillen war in den KK mit RA-SFB deutlich stärker gegenüber der kontrastreichen Darstellung in der unstimulierten Knorpel MK, aber auch gegenüber der verminderten Kontrastschärfe in der mit Zytokinen stimulierten Knorpel MK [Abb. 46].



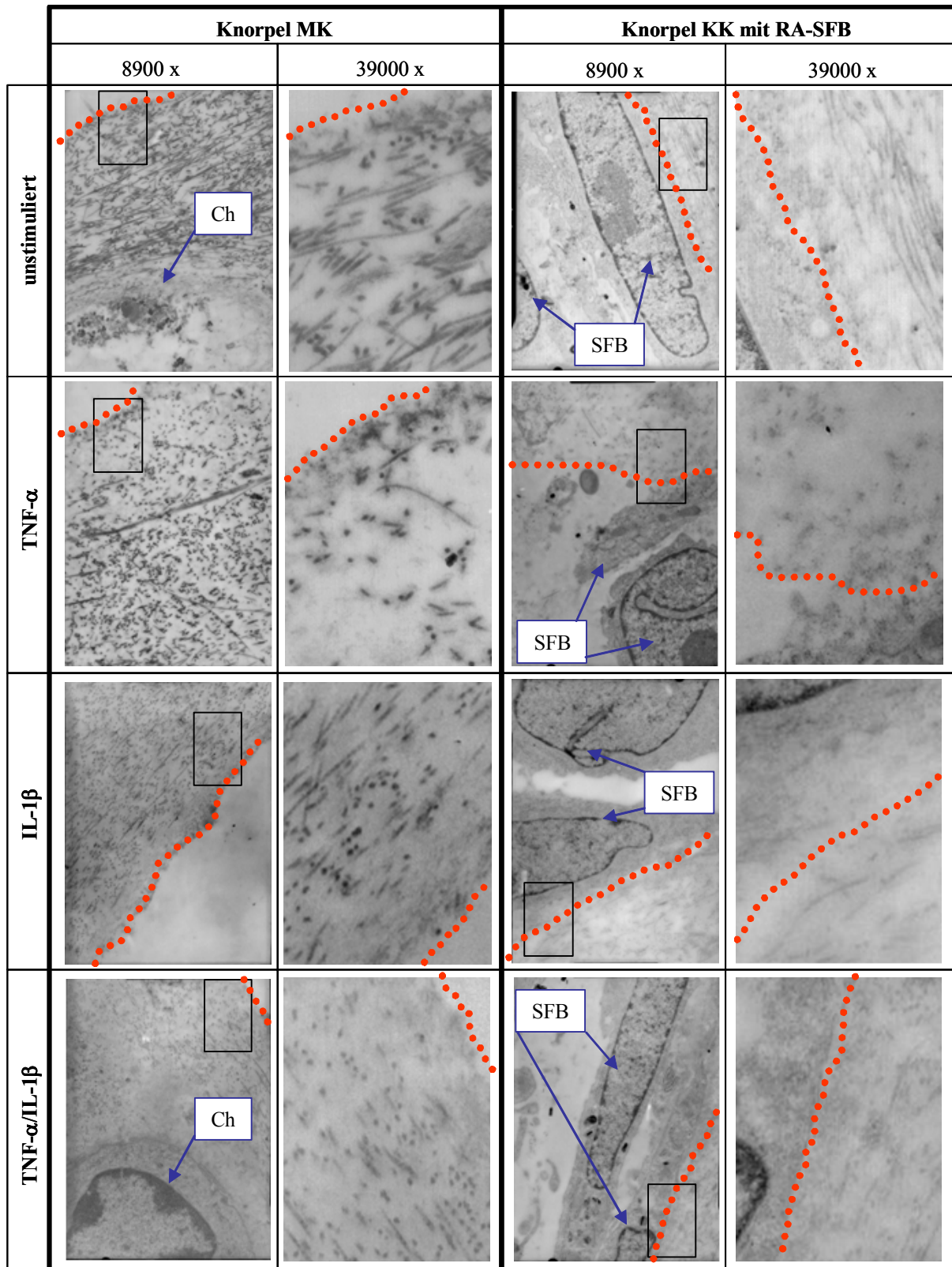
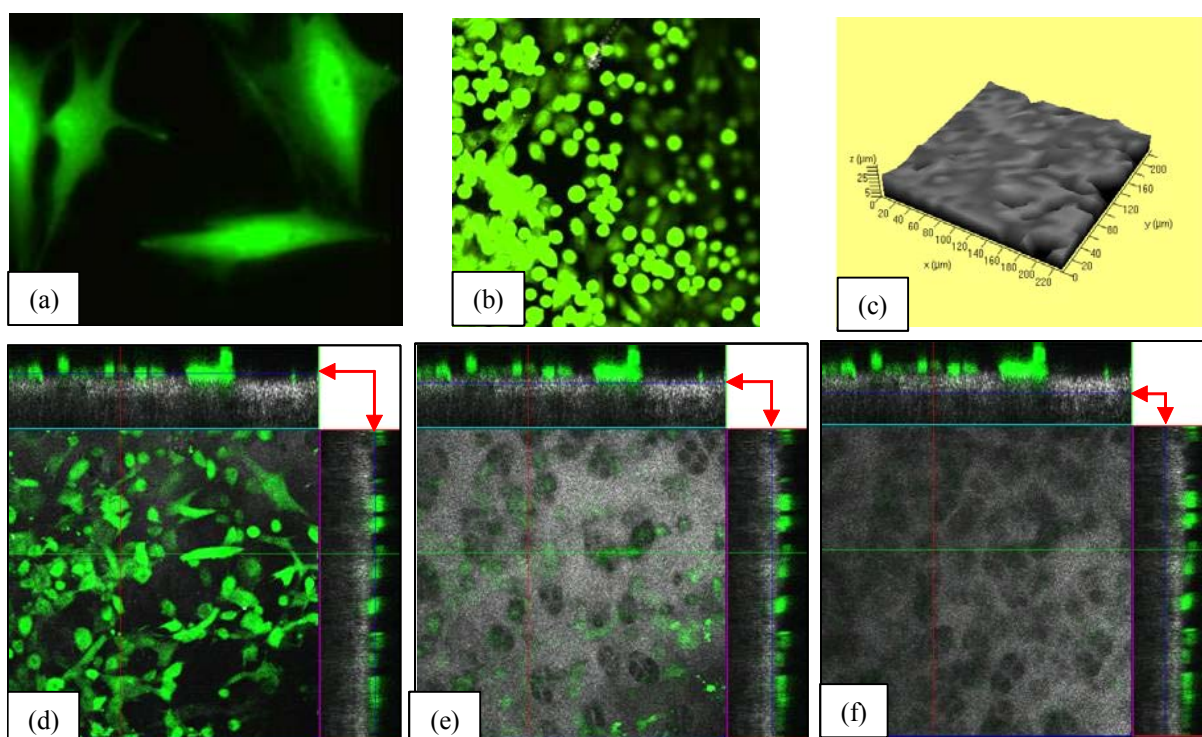


Abbildung 46: TEM-Aufnahmen der Knorpel MK und der Knorpel KK mit RA-SFB. Vergrößerungen 8900 x und Ausschnitte 39000 x; SFB = RA SFB; Ch = Chondrozyt; rot gepunktete Linie: Knorpel-OF

### 3.2.6.4. LSM-Untersuchungen

Für die Untersuchung des Einflusses der RA-SFB auf die Destruktion der Knorpelmatrix wurden die RA-SFB vor der KK mit dem intrazellulären Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert [Abb. 47 a]. Einen Tag nach der Besiedlung des Knorpels konnte die noch stark abgerundete Morphologie der initial adhärennten Zellen beobachtet werden [Abb. 47 b]. Nach 14 d KK waren die RA-SFB in einer fibroblastentypischen Weise abgeflacht, konfluent und teilweise in mehreren Zellschichten über die Knorpel-OF verteilt [Abb. 47 d]. Durch sequentielle Aufnahmen in verschiedenen Schichten der Probe konnten an der SFB/Knorpel-Kontaktzone erste Zeichen einer Invasion der RA-SFB in die superfizielle Knorpelschicht beobachtet werden [Abb. 47 e-f]. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass bei Aufnahmen, deren Schnittebene bereits in der Knorpelmatrix lag, noch ein deutliches Fluoreszenzsignal der kokultivierten RA-SFB detektiert werden konnte. Dieser Effekt wurde jedoch durch die Stimulation mit TNF, IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  nicht verstärkt/beeinflusst (nicht gezeigt). Neben dem Fluoreszenzsignal der markierten RA-SFB wurde durch die Software aus dem gleichzeitig aufgenommenen Reflektionssignal des Knorpels ein dreidimensionales Bild der Knorpel-OF generiert [Abb. 47 c]. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der OF-Beschaffenheit zwischen der MK und der KK mit RA-SFB festgestellt werden.



**Abbildung 47: LSM zur Untersuchung der Morphologie der RA-SFB und des Knorpels in einer unstimulierten Knorpel RA-SFB KK;** Vor der KK wurden die RA-SFB mit CFSE fluoreszenzmarkiert (a) und anschließend auf die Knorpel-OF appliziert (b). Nach 14 d Kultur wurden die Proben im wässrigen Milieu mittels LSM untersucht. Das Fluoreszenzsignal der RA-SFB konnte in unterschiedlichen Ebenen aufgenommen und mit dem Reflektionssignal des Knorpels integriert werden. Mit den im Reflektionsmodus erhaltenen Messwerten konnten dreidimensionale Aufsichten (c) des Knorpels generiert werden. (d)-(e) zeigen Aufnahmen von einem Scan durch unterschiedliche Ebenen der RA-SFB KK.

Die LSM wurde als Methode für die Darstellung des Destruktions-Modells gewählt, weil sie eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften vereint: Die Untersuchung der Proben kann in wässrigem Milieu (z. B. in PBS oder physiologischer Kochsalzlösung) an den vitalen Proben ohne deren Zerstörung vollzogen werden. Dadurch ist es grundsätzlich möglich, während der *in vitro*-Kultur eine morphologische Charakterisierung der Proben vorzunehmen. Da die Fluoreszenzmarkierung über mehrere Wochen stabil bleibt und bei Proliferation der Zellen weitergegeben wird, kann bei Anwendung einer sterilen Aufnahmetechnik {272} eine zeitabhängige Beschreibung der *in vitro*-Kultur ohne die Notwendigkeit vieler Parallelansätze vorgenommen werden bzw. die Proben können unversehrt bleiben und damit für andere Untersuchungstechniken weiterverwendet werden. Im Gegensatz zu histologischen oder elektronenmikroskopischen Techniken treten bei dieser Methode keine Aufarbeitungsartefakte (Schrumpfung der Probe, artifizielle Spaltbildung) auf.

Für zukünftige Untersuchungen stellt diese Methode ein hilfreiches Instrument dar, um während der laufenden *in vitro*-Kultur eine Invasion der kokultivierten SFB in die Knorpelmatrix und damit verbundene Veränderung der Knorpel-OF-Morphologie zu untersuchen. In ähnlicher Weise, jedoch in einem Kurzzeitmodell über 18 h, konnten Wang et al. eine Invasion von fluoreszenzmarkierten RA-SFB in Knorpelmatrix demonstrieren {257}.

## 4. DISKUSSION

Die RA ist eine chronisch entzündliche Gelenkerkrankung, die zu einer fortschreitenden Zerstörung des Gelenkknorpels und des angrenzenden Knochens führt.

Grundlegende Mechanismen der Knorpeldestruktion wurden bisher mit Hilfe verschiedener Arthritis-Tiermodelle untersucht. Aufgrund der Speziesunterschiede ist jedoch die Übertragbarkeit der dabei gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Rolle der humanen SFB *in vivo* problematisch. Zudem zeichnen sich *in vivo*-Modelle generell durch eine hohe Komplexität, einen hohen Kosten- und Zeitaufwand und ethische Probleme aus. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternatives *in vitro*-Modell entwickelt, mit dem Ziel, ein standardisiertes und robustes System zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SFB und nativem Knorpel zu schaffen.

### 4.1. Vorteile des entwickelten *in vitro*-Knorpeldestruktions-Modells

Das entwickelte Destruktions-Modell unterscheidet sich in einigen wesentlichen Punkten von bereits publizierten Modellen. Dies betrifft zum einen die verwendete Knorpelmatrix, zum anderen die mit dem Knorpel kokultivierten Zellen.

Die in den letzten Jahren publizierten KK-Modelle zur Knorpeldestruktion verwendeten meist artifizielle, vorgeschädigte oder nicht vitale Knorpelmatrices und konnten deshalb die Prozesse der Knorpeldestruktion am natürlichen ungeschädigten Knorpel nicht untersuchen {250,254-258}. Es ist daher relativ wenig darüber bekannt, welchen Beitrag SFB zur Zerstörung des gesunden, noch intakten Knorpels leisten.

Um dies zu untersuchen, wurde bovines Knorpelmaterial als Quelle gewählt. Die Verwendung von bovinem Knorpel bietet eine Reihe von Vorteilen. Der Knorpel stammt von jungen, aber ausgewachsenen Rindern (zwei bis drei Jahre) und ist - in gleichbleibend homogener Qualität - regelmäßig verfügbar. Dies ermöglicht den Einsatz als standardisierte Probenmatrix mit einer hohen Probenanzahl. Der bovine Knorpel ist durch eine vollständig intakte Matrix und Knorpel-OF gekennzeichnet, zeigt keinen primären PG-Verlust, keine oberflächlichen Fissuren oder arthrotische Veränderungen. Bei dem vorgeschädigten Knorpelmaterial von OA-Patienten dagegen kann eine bereits vorhandene Schädigung die durch die SFB *in vitro* verursachte Destruktion verschleiern. In einigen Modellen, die Knorpel von OA-Patienten verwendeten, wurde dieses Problem durch eine Begradigung der OF umgangen {256,260}. Die dabei entstandenen Schnittflächen stellen jedoch durch die exponierte Matrixstruktur bereits eine deutliche Schädigung des Knorpels dar. Deshalb eignen sich diese Modelle eher zur Untersuchung der Progression eines bereits vorhandenen Schadens. Erst die Verwendung von Knorpel mit einer intakten OF und Matrixintegrität ermöglicht die eindeutige Zuordnung SFB-vermittelter initialer Knorpelschäden. Obwohl es sich um eine bovine und damit xenogene Matrix handelt, ist diese für die KK mit humanen SFB geeignet, da wichtige Matrixmoleküle (z. B. Kollagen II und Aggrecan) aufgrund der engen entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaft zwischen Rind und Mensch eine hohe Sequenzhomologie zeigen. Deshalb können auch humane Zytokine/Proteasen auf bovine Chondrozyten des eingesetzten Knorpels wirken {267}.

Die kreuzreaktive Wirkung humaner Zytokine/Proteasen ist aus mehreren Gründen von

entscheidender Bedeutung: 1.) Der *in vivo* vorhandene, aktivierende Einfluss von M $\phi$  auf SFB und Chondrozyten kann im hier angewendeten Modell durch den Einsatz M $\phi$ -spezifischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) simuliert werden; 2.) Die humanen SFB können ihrerseits durch die Freisetzung von Zytokinen auf die bovinen Chondrozyten wirken {273-275}; 3.) Proteasen humanen und bovinen Ursprungs können zur Destruktion der bovinen Matrix beitragen. Aus diesen Gründen lässt sich mit diesem Modell neben der SFB-vermittelten Knorpeldestruktion auch der Einfluss der Chondrozyten auf die Matrixdestruktion untersuchen.

Im Gegensatz zu bisher beschriebenen Knorpeldestruktions-Modellen {250,254-258,261}, die grundsätzlich SFB späterer Passagen (ab Passage 5) oder frühe Passagen mit einem hohen M $\phi$ -Anteil verwendeten, war das Ziel dieser Arbeit, das destruktive Potential hochreiner SFB früher Passagen zu analysieren. Da sich SFB späterer Passagen (5-10.) von den SFB früher Passagen (1-4) hinsichtlich der Expression von Zytokinen und anderer Proteine deutlich unterscheiden {276}, wurden für die Untersuchungen zur *in vitro*-Knorpeldestruktion SFB verwendet, die dem *in vivo*-Phänotyp in der SM sehr ähnlich sind. Dies wurde durch die Negativreinigung der SFB aus der Primärkultur von synovialen Zellen der SM erreicht (siehe 2.3.), die hochreine (ca. 98%) SFB-Populationen liefert, welche in den Passagen 1 bis 2 verwendet wurden {31}.

Insofern unterscheidet sich unser Modell deutlich von anderen KK-Modellen, die meist heterogene Zellgemische (SFB-reiche Fraktionen mit hohem M $\phi$ -Anteil, komplette SM (SFB, M $\phi$ , T- und B-Zellen) verwendeten oder die Knorpelmatrix mit löslichen Mediatoren (konditionierter Überstand von SFB, Spheroide) inkubierten (siehe 1.5.2.).

Da bei RA-Patienten die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in erhöhten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit vorkommen und von Bedeutung für die Zerstörung des Gelenkknorpels sind {172}, wurde ihr Einfluss auf die SFB und den Knorpel in dem *in vitro*-Knorpeldestruktions-Modell untersucht. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei in der Darstellung/Simulation der Destruktion in frühen Krankheitsstadien sowie in der Weiterentwicklung zu einem Screening-Modell. Aufgrund der kurzen Versuchsdauer (14 d) wurden zur Analyse der initialen Schädigung des Knorpels neben histologischen Untersuchungsverfahren v. a. sensitive Methoden zur Analyse der mRNA- und Proteinexpression und zur Untersuchung morphologischer Veränderungen eingesetzt.

## 4.2. Proteoglykane

### 4.2.1. PG-Verlust

Der auf der Bildung eines metastabilen Komplexes zwischen dem Farbstoff DMB und den GAG-Ketten basierende DMB-Assay {268} diente der sensitiven Quantifizierung der aus dem Knorpel freigesetzten PG. Dabei wird vorwiegend das Aggrekan detektiert, da dieses in relativ hohen Konzentrationen im Gelenkknorpel vorliegt und zudem über eine hohe Anzahl langkettiger GAG verfügt {88}. Zusätzlich zur Bestimmung der in den Kulturüberstand

freigesetzten GAG wurden die Knorpelproben durch Safranin-O-Färbung bezüglich ihres PG-Verlustes analysiert.

Für die Beurteilung der Knorpeldestruktion ist in erster Linie der PG-Gehalt des Knorpels von Bedeutung. Deshalb stellt die Safranin-O-Färbung trotz der geringeren Sensitivität {277} die aussagekräftigere Methode dar, da nur damit der aus Abbau und Neubildung resultierende PG-Nettogehalt erfasst werden kann. Der DMB-Assay hingegen detektiert lediglich abgebaute und freigesetzte GAG.

#### Unstimulierte MK und KK

Bereits in der unstimulierten Knorpel MK konnte eine geringe PG-Freisetzung in das Kulturmedium beobachtet werden, die sich vermutlich auf die Schädigung des Knorpels an den bei der Präparation entstandenen Schnittkanten zurückführen lässt. Durch die lokal gestörte Verankerung innerhalb des Knorpels können die PG während der Kultur ins Medium diffundieren. Dabei liegt diese Basis-Freisetzung in der unstimulierten Knorpel MK auf ähnlich niedrigem Niveau wie bei literaturbekannten, vergleichbar kultivierten Knorpelproben {278,279}. Der marginale PG-Verlust des unstimulierten Knorpels zeigt, dass die Basis-Kulturbedingungen den PG-Haushalt während der *in vitro*-Kultur nicht negativ beeinflussen. Dies bildet eine geeignete Grundlage für die Untersuchung von Effekten, die durch die KK mit SFB und die Zytokinstimulation verursacht werden.

Die unstimulierte KK mit RA-SFB, jedoch nicht mit OA-SFB, führte in der histologischen Auswertung bereits zu einem signifikant erhöhten PG-Verlust aus dem Knorpel – dies ist ein deutlicher Beleg für das destruktive Potential der RA-SFB.

#### Stimulierte MK und KK

In den histologischen Präparaten konnte demonstriert werden, dass die Stimulation der MK und KK mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zu einem signifikant erhöhten PG-Verlust als Zeichen einer zytokin-induzierten Gewebedestruktion führte. Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  hatte eine vergleichsweise schwache Wirkung auf den PG-Verlust (10%-ige Steigerung), was auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie an bovinen Knorpelimplantaten beobachtet wurde {279}. Den stärkeren Einfluss auf die Depletion von PG hatte IL-1 $\beta$ , das sich bereits in anderen Studien als potenter Induktor des PG-Abbaus erwies {138,280}. Die Kombination von IL-1 $\beta$  mit TNF- $\alpha$  zeigte folgerichtig keine signifikant additive Wirkung, was den geringen Einfluss von TNF- $\alpha$  auf den PG-Abbau bestätigt (s. o.).

Die Ergebnisse belegen, dass die humanen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auch auf bovine Chondrozyten wirken und einen deutlichen PG-Verlust schon in der SFB-freien MK induzieren können. Der drastische Effekt insbesondere der Stimulierung mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  auf den PG-Verlust beruht vermutlich auf der schon in der Literatur beschriebenen, starken Induktion der Aggrekanfragmentierung nach der Stimulation mit IL-1 $\beta$ , die zu einer hohen passiven Diffusion der Bruchstücke aus der Matrix führt {281-283}.

Wie auch bei der histologischen Auswertung der unstimulierten KK zu beobachten war, induzierte die Anwesenheit von RA-SFB einen gesteigerten PG-Verlust in allen stimulierten Proben. Dieser Effekt konnte teilweise auch mit den OA-SFB nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen RA- und OA-SFB konnte nicht beobachtet werden, was mit den Ergebnissen in einer *in vivo*-Studie zum GAG-Gehalt der Synovialflüssigkeit von RA- und OA-Patienten übereinstimmt {284}. Dies könnte darin begründet liegen, dass sich die PG-Freisetzung der einzelnen Patientenkollektive im *in vitro*-Modell aufgrund der identischen Kultur- und Stimulationsbedingungen annähert, während sich die SFB *in vivo* je nach Krankheitsart und -stadium in unterschiedlichen entzündlichen Milieus befinden. Dabei könnte für die Effekte der SFB in den verschiedenen rheumatischen Krankheitsformen der Zell-Zell-Kontakt, z. B. mit M $\phi$  und T-Zellen, eine Rolle spielen, da diese Zellen in der SM oft kolokalisiert vorkommen.

### ***Lokaler Verlauf des PG-Verlustes im Knorpel***

Die histologische Analyse der Knorpel MK und KK zeigte, dass die PG-Depletion grundsätzlich an der Knorpel-OF begann, unabhängig von der Orientierung der Knorpel-OF zum Mediumüberstand. Somit lässt sich eine mangelnde Versorgung mit Nährstoffen als Ursache ausschließen. Eine mögliche Erklärung könnte in der regionalen und zonalen Änderung der EZM-Zusammensetzung sowie der Anzahl und Ausrichtung der Zellen in Abhängigkeit von der Knorpelzone liegen (siehe 1.2.1.). So steigt z. B. die PG-Konzentration im Knorpel mit zunehmender Tiefe deutlich an {285} - auf diese Weise würde eine PG-Freisetzung aus den OF-nahen Schichten schneller zum beobachteten Verlust der Safranin-O-Färbung führen.

Auch eine zonal unterschiedlich ausgeprägte Inhibierbarkeit der Matrixneosynthese kann für diese lokalen Effekte verantwortlich sein. So werden mit IL-1 ( $\alpha/\beta$ ) stimulierte humane Chondrozyten aus dem superfiziellen Knorpelgewebe in ihrer PG-Synthese stärker gehemmt als Zellen aus tieferen Schichten {286} und können dadurch den induzierten PG-Verlust weit schlechter kompensieren. Diese Zonen-abhängige Unterdrückung der Neosynthese durch IL-1 $\beta$  wurde auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt – So wurde die Aggrekansynthese der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Knorpelproben in den OF-nahen Schichten weit stärker gehemmt als in tieferen Bereichen (siehe auch 3.2.1.3. und 4.5.1.).

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Intensität des PG-Abbaus könnte eine zonenspezifische Expression von Aggrekanasen und MMP sein, die im gesunden Knorpel bisher jedoch nicht untersucht wurde. Lediglich in degeneriertem Knorpelgewebe wurde in den oberflächlichen Schichten eine stärkere immunhistochemische Färbung verschiedener MMP beobachtet {137,287}.

Insgesamt stellt der PG-Verlust im Knorpelgewebe einen initialen Schritt der Gelenkdestruktion dar {163,288}. Die damit verbundene Freisetzung von PG-gebundenen Chemokinen und Zytokinen führt dabei durch die zusätzliche Aktivierung ortsständiger Zellen (z. B. Chondrozyten, SFB) zu einer Progression des Knorpelabbaus. Diese Abbauprozesse können durch eine Vielfalt von Proteasen verursacht werden, wobei Aggrekanasen die Hauptmediatoren des PG-Abbaus sind {289-291}.

#### 4.2.2. Aggrekanasen

Im normalen Gelenkknorpel wurden die Aggrekanasen I (ADAMTS-4) und II (ADAMTS-5) sowie ADAMTS-1 nachgewiesen {159,292}, während in RA- und OA-SFB bisher nur das Vorkommen von Aggrekanase I und Aggrekanase II beschrieben wurde {158}. Alle Aggrekanasen sind dabei in der Lage, Knorpel-PG zu degradieren {153,154,161,165,168,169,293}.

##### Genexpression im Knorpel

In den MK und KK zeigte sich nach Zytokinstimulation eine Erhöhung der Genexpression für Aggrekanase I und II im Knorpel. TNF- $\alpha$  war dabei im Vergleich zu IL-1 $\beta$  ein relativ schwacher Induktor. Durch IL-1 $\beta$  wurde die Genexpression massiv erhöht, durch zusätzliche Stimulierung mit TNF- $\alpha$  wurde dieser Effekt nicht verstärkt.

In der Literatur gibt es sehr kontroverse Aussagen zur zytokinabhängigen Induzierbarkeit der Aggrekanasen im Gelenkknorpel. So konnte in einer Studie an bovinen Knorpelimplantaten gezeigt werden, dass sowohl TNF- $\alpha$  als auch IL-1 $\beta$  zu einer starken Induktion der Aggrekanase I und II führen {280}. Die IL-1-abhängige Aggrekanase I-Induktion konnte auch in bovinen Knorpelimplantaten {162} und in isolierten bovinen {294} bzw. humanen {295} Chondrozyten bestätigt werden. Für die Aggrekanase II wurde nach IL-1-Stimulation eine gesteigerte Expression in bovinen Knorpelimplantaten nachgewiesen {278}.

Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keinen Einfluss von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf die Aggrekanaseexpression in humanen Knorpelimplantaten {159} bzw. auf die Aggrekanase II-Expression in bovinen Knorpelimplantaten belegen {162}.

Diese widersprüchlichen Aussagen zur Zytokin-induzierten Aggrekanase-Genexpression könnten zumindest z.T. den unterschiedlichen Versuchsbedingungen geschuldet sein, die die Vergleichbarkeit der Literaturdaten untereinander und mit den Ergebnissen dieser Arbeit erschweren. So haben die Herkunft des untersuchten Knorpels (Gelenkknorpel, nasaler Knorpel), die Verwendung von Explantaten bzw. isolierten Zellen, die untersuchte Spezies, das Alter des Knorpels und nicht zuletzt die Kulturbedingungen (Mediumzusammensetzung, Zytokinkonzentrationen und Stimulationsdauer) offensichtlich einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse.

##### Genexpression in SFB

Das Expressionsprofil der mit dem Knorpel kokultivierten RA- bzw. OA-SFB wurde im Gegensatz zum Knorpel durch die Zytokinstimulation kaum beeinflusst. Da es nur in Ausnahmefällen zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression von Aggrekanase I und II kam, kann man - im Vergleich zur starken Regulation im Knorpel - von einer nahezu konstitutiven Expression bei den RA- und OA-SFB ausgehen. Diese Beobachtung wird zumindest teilweise durch eine kürzlich veröffentlichte Studie an humanen SFB bestätigt, die zwar eine leichte Induktion der Aggrekanase I, jedoch nicht der Aggrekanase II durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zeigt {296}. Auch in Untersuchungen an isolierten RA- und OA-SFB wurde durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  keine Aggrekanaseexpression induziert {158}.



### Proteinexpression

Der Aggrekanase-Aktivitäts-ELISA detektierte die Summe der aktiven Aggrekanase I und II, weshalb im Folgenden nur die Gesamt-Aggrekanase-Aktivität im Kulturüberstand betrachtet wird.

In den unstimulierten MK und KK konnte keine Aggrekanase-Aktivität nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit einer aktuellen Studie, in der in unstimulierten bovinen Knorpelimplantaten keine Aggrekanase I- und II-Aktivität detektiert wurde {280}.

In den MK wurde nach allen Stimulationen eine verstärkte Aggrekanase-Aktivität beobachtet. Im Unterschied zur mRNA kam es in diesem Fall auch durch TNF- $\alpha$  zu einer ähnlich hohen Steigerung der Aggrekanase-Aktivität in den Überständen wie durch IL-1 $\beta$  allein oder durch die Kombination von IL-1 $\beta$  mit TNF- $\alpha$ .

Die stimulierten KK mit RA-SFB und OA-SFB wiesen hingegen eine deutliche, nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  sogar signifikante Erhöhung der Aggrekanase-Aktivität im Vergleich zur Knorpel MK auf. Dieser auf der KK mit SFB beruhende Effekt ließ sich jedoch auf der mRNA-Ebene in SFB nicht nachvollziehen (keine Regulation nach Stimulation).

Die erhöhte Proteinkonzentration könnte daher auf einem anderen Mechanismus beruhen: So wurde beobachtet, dass ein Aggrekanabbau nicht von einer erhöhten Neosynthese der Aggrekanase I sondern durch Aktivierung bereits vorhandener matrixgebundener Aggrekanasen verursacht wurde. Diese Aktivierung kann z. B. durch (membran-gebundene) MMP erfolgen, die in SFB nach Stimulation mit Zytokinen vermehrt produziert werden {282}.

Andere Mechanismen, die zu den auftretenden Diskrepanzen zwischen mRNA- und der Proteinexpression führen können, sind vielfältige Möglichkeiten der posttranskriptionellen Modifikation auf dem Level der Translation oder durch posttranslationale Modifikation wie z. B. Proteolyse, die die Bindungsaffinität und die proteolytische Spezifität der Aggrekanasen für die Aggrekanschnittstelle ändern könnten {165,297}.

Fraglich ist der relative Beitrag der beiden im ELISA nachgewiesenen Aggrekanasen (I und II). Da Aggrekanase II-Knock-out-Mäuse vor einem Aggrekan-Verlust und einem Abbau des Gelenkknorpels geschützt sind {298}, während Aggrekanase I-defiziente Tiere Aggrekan weiterhin spalten {299,300}, wird vermutet, dass im Maussystem lediglich Aggrekanase II an der Zerstörung des Aggrekans beteiligt ist. In humanen SFB wird jedoch nur Aggrekanase I durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert {296}, während Aggrekanase II in humanem Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten nicht reguliert, sondern konstitutiv exprimiert wird {301}. Vermutlich ist daher die in der vorliegenden Studie beobachtete Erhöhung der Gesamttaggrekanase-Aktivität in den stimulierten Kulturen hauptsächlich auf die Aktivität der Aggrekanase I zurückzuführen.

Die Frage des relativen Beitrages der Aggrekanasen und MMP (s. u.; 4.4.2.) bei dem durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermittelten Matrixabbau des Knorpels bzw. dessen Regulation im vorliegenden System bleibt ungeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Knorpeldestruktion mit dem Aggrekanase-vermittelten Aggrekanabbau beginnt und erst wesentlich später der Abbau

durch MMP hinzukommt {96}. Analysen der beim Zytokin-induzierten Abbau entstandenen Aggrekanfragmente zeigten weiterhin, dass nur Aggrekanase- und nicht MMP-vermittelte Spaltprodukte auftraten {135}. Auch Untersuchungen an humanem Knorpel von OA-Patienten zeigten, dass hauptsächlich die Aktivität von Aggrekanasen für den Abbau des Aggrekans verantwortlich war {135}. Diese Befunde sprechen insgesamt dafür, dass der hier beobachtete PG-Abbau vornehmlich auf die Aktivität der Aggrekanasen zurückzuführen ist. Insofern erscheint eine gezielte Hemmung bzw. Neutralisierung von Aggrekanasen ein interessanter Therapieansatz bei der Behandlung von entzündlich destruktiven Gelenkkrankheiten wie der RA.

### 4.3. COMP

COMP spielt durch seine Interaktion mit Fibronectin und den Kollagenen I, II und IX eine wichtige Rolle bei der Bildung und dem Erhalt der Knorpelmatrix und des Knochens {79,302,303}. Im adulten Knorpel ist COMP v. a. in der interterritorialen Matrix lokalisiert {304}, wobei ein Teil des COMP als degradiertes/fragmentiertes COMP (vergleichbar den Aggrekanfragmenten) vorliegt und nur sehr langsam abgebaut wird {305-308}. Neben Chondrozyten sind auch SFB in der Lage, beträchtliche Mengen an COMP zu sezernieren {99,101,309-313}. In dieser Arbeit wurde das aus dem Knorpel in den Kulturüberstand freigesetzte COMP mittels ELISA (bovinspezifisch) bestimmt, zusätzlich erfolgte die Darstellung der COMP-Lokalisation in immunhistologischen Schnitten (kreuzreaktiv für humanes und bovines COMP). Bei der Bewertung der immunhistologischen Ergebnisse und der Analysen der Kulturüberstände kann über den Zustand des detektierten COMP nur spekuliert werden. Eine Unterscheidung von intaktem und fragmentiertem COMP ist mit den durchgeführten Untersuchungen nicht möglich, da die verwendeten AK sowohl das intakte pentamere COMP (524 kDa) bzw. das intakte Monomer (120 kDa) als auch die fragmentierten COMP-Moleküle erkennen {313,314}. Der in der Immunhistologie verwendete AK erkennt sowohl humanes als auch bovines COMP, insofern konnte man das detektierte COMP nicht eindeutig den bovinen Chondrozyten oder humanen SFB zuordnen.

Das bovine, demnach knorpelspezifische COMP wurde in allen Kulturen unabhängig von der Stimulation in ähnlich großen Mengen in das Kulturmedium freigesetzt. Diese konstitutive COMP-Freisetzung unter *in vitro*-Bedingungen beruht wahrscheinlich auf der lockeren Bindung der COMP-Moleküle an die Matrix {155}, wodurch die Diffusion aus der Matrix v. a. an den präparationsbedingten Schnittkanten der Knorpelzylinders erleichtert wird. Der ausbleibende Effekt der Zytokinstimulation auf die Freisetzung von COMP aus Gelenkknorpel in den Kulturüberstand ist literaturbekannt. So zeigte sich, dass sowohl in unstimulierten als auch in IL-1 $\alpha$ -stimulierten Proben von bovinem Gelenkknorpel innerhalb der ersten Woche über 50% des im Knorpel enthaltenen COMP in den Kulturüberstand freigesetzt wurden {155}. Die Induzierbarkeit der COMP-Freisetzung ist jedoch gewebeabhängig, da die durch IL-1 $\alpha$  induzierte COMP-Freisetzung aus nasalen Septumknorpel wesentlich geringer war als aus Gelenkknorpel {155}.

Im Gegensatz zur Analyse der Kulturüberstände konnte bei der immunhistologischen Darstellung von COMP im Knorpel eine deutliche Regulation sowohl durch die

Zytokinstimulation als auch durch die KK mit RA-SFB dokumentiert werden. In der unstimulierten MK war kein COMP immunhistologisch nachweisbar, bei der KK mit RA-SFB konnte jedoch bereits eine leichte COMP-Färbung des Knorpels dokumentiert werden.

Bei der MK und der KK wurde durch Stimulation mit TNF- $\alpha$ , besonders deutlich aber durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ein verstärktes Vorkommen von COMP in der Knorpelmatrix beobachtet. Dabei waren die stimulationsbedingten Effekte in der KK mit RA-SFB noch ausgeprägter.

Eine derartige Zunahme der COMP-Färbung wurde bereits in der Literatur beschrieben, allerdings nicht unter Stimulationsbedingungen, sondern an degenerativ verändertem Knorpel (OA) {315}. Als Erklärung wird dabei neben einer vermehrten Neosynthese als Zeichen regenerativer Prozesse der Chondrozyten auch eine verstärkte Demaskierung der COMP-Moleküle durch den fortschreitenden Verlust an PG diskutiert, wodurch eine bessere Zugänglichkeit des AK zum Epitop ermöglicht wird.

Da beide Erklärungen das vermehrte Auftreten von COMP auf die arthrotische Veränderung des Knorpels zurückführen, könnte auch der in diesem Modell durch Zytokine und insbesondere durch die KK mit SFB verursachte Matrixabbau ursächlich für die Zunahme der COMP-Färbung sein. Dieser Befund der KK unterstreicht noch einmal die Bedeutung der SFB für den Prozess der destruktiven Veränderungen des Knorpels im Rahmen arthritischer Erkrankungen.

## 4.4. Kollagen

### 4.4.1. Kollagenabbau

#### Freisetzung von Kollagenabbauprodukten in den Überstand

Der initiale Verlust der PG (siehe 4.2.1.) und die damit verbundene erhöhte Zugänglichkeit für Proteasen ermöglicht im weiteren Verlauf einen verstärkten Kollagenabbau. Eine Schädigung des Kollagennetzwerkes gilt als wichtigstes Kennzeichen vieler Gelenkerkrankungen und stellt im Gegensatz zu moderaten PG-Verlusten meist eine irreversible Schädigung der Knorpelintegrität dar. *In vitro* konnte beobachtet werden, dass der Kollagenabbau erst nach fundamentaler Schädigung der PG-Matrix erfolgt und somit einen späteren Zeitpunkt der Knorpeldestruktion darstellt {163}. Das intakte Kollagen II-Molekül wird durch verschiedene MMP in ein  $\frac{3}{4}$  und ein  $\frac{1}{4}$  Bruchstück gespalten {316}. Die dabei entstehenden Neoepitope können durch die spezifischen AK C12C und C2C nachgewiesen werden {128}. C12C erkennt dabei spezifisch gespaltenes Kollagen I und II, während C2C ausschließlich gespaltenes Kollagen II detektiert {127,316-318}. Diese AK erkennen die ersten Abbauprodukte, die während der Degradation der Kollagen-Triplehelix entstehen, der auf die primäre Spaltung nach dem Entwinden der Triplehelix noch zahlreiche Kollagen-denaturierende proteolytische Angriffe folgen.

Nach 14 d Kultur konnten weder in den Kulturüberständen der unstimulierten noch der stimulierten MK und KK mit RA- und OA-SFB Kollagenabbauprodukte detektiert werden. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass die Kulturdauer von 14 d vermutlich zu kurz ist, um einen im Kulturüberstand messbaren Abbau des Kollagengerüsts zu induzieren. Weil in

diesen frühen Stadien die Kollagenfasern durch den hohen Gehalt an Aggrekanen der EZM noch gegen den Abbau durch bereits präsente MMP geschützt sind {96}, ermöglicht erst ein massiver PG-Verlust den proteolytischen Angriff von MMP auf die Kollagene. Die molekulare Basis dafür liegt in der Interaktion der Kollagenfasern mit den keratansulfathaltigen Regionen des Aggrekans, bei der die chondroitinsulfathaltigen Regionen des Aggrekans die Kollagenfasern überlagern und den Zugang von MMP verhindern {96}. Die beim Abbau schließlich entstehenden Kollagenfragmente verbleiben größtenteils noch in der Knorpelmatrix und diffundieren erst bei weiterer Auflockerung des Matrixgerüsts bzw. nach sekundären Spaltungen (z. B. durch Gelatinasen) aus dem Knorpel heraus. Dieser Prozess benötigt vermutlich selbst unter stark katabolen Bedingungen mehr als 14 d, zumal es sich bei dem verwendeten Knorpel um komplett intaktes, nicht vorgeschädigtes Knorpelgewebe handelte. Auch in anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass für die Detektion von Kollagenabbauprodukten im Kulturüberstand von *in vitro*-Knorpelkulturen längere Inkubationszeiträume und eine starke Stimulation des Knorpels notwendig ist. So führte die Stimulation von bovinen Knorpelimplantaten mit Oncostatin M/TNF- $\alpha$  erst nach 16 d zu einer nachweisbaren Freisetzung in den Kulturüberstand {279} bzw. bewirkte eine 28- {163} oder 35-tägige Stimulation {155} mit IL-1 $\alpha$  keinen im Medium nachweisbaren Kollagenabbau.

#### Kollagenabbau im Knorpel

Immunhistologisch konnte im Knorpel bereits in der unstimulierten KK mit RA-SFB ein gegenüber der MK erhöhter Kollagenabbau beobachtet werden. Dieser spezifisch durch die KK mit RA-SFB erreichte Effekt wurde ebenfalls bei den Untersuchungen zum PG-Verlust und des COMP-Gehaltes beobachtet und unterstreicht erneut die Bedeutung der SFB für die Destruktion des Knorpels.

In den MK wurde der Kollagenabbau durch TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und besonders durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  induziert. Diese Zytokin-vermittelten Effekte waren durch die KK deutlich verstärkt, was die wichtige Funktion der SFB für den fortschreitenden Kollagenabbau während der Arthritis demonstriert.

Der Kollagenabbau im Knorpel ist sehr wahrscheinlich durch die Aktivität von MMP verursacht, da Aggrekanasen (ADAMTS-4 und 5) Kollagen II nicht spalten können {165}, und der Kollagenabbau *in vitro* durch Zugabe von Breitband-MMP-Inhibitoren komplett verhindert werden kann {279}. Dies wird durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, die einen deutlichen Anstieg der MMP-Gesamtaktivität bzw. der Expression von MMP-1-mRNA (MK und KK) und -Protein (KK) nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  bzw. deren Kombination zeigen (siehe 3.2.4.1 bzw. 3.2.4.3). Desweiteren konnten klare Parallelen zwischen dem immunhistologischen Nachweis des Kollagenabbaus und der mittels *in situ*-Zymografie nachgewiesenen Kollagenase-Aktivität festgestellt werden, was insbesondere bei der Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  im Vergleich eindrucksvoll demonstriert wurde (siehe 3.2.4.2).

Die durch die proteolytische Wirkung der MMP entstandenen Kollagenfragmente induzieren ihrerseits die MMP-Expression in den Chondrozyten, d. h. der Destruktionsprozess wird

durch die Abbauprodukte der Matrix potenziert. So erhöhen z. B. Kollagenfragmente die Expression von MMP-2, -3, -9, -13 in Chondrozyten auf der mRNA- und Proteinebene {319}. Der starke Einfluss der Zytokinstimulation und der KK mit RA-SFB auf die Degradation des Kollagengerüsts konnte auch sehr eindrucksvoll durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Knorpel MK und KK mit RA-SFB belegt werden (s. u.; 4.9.2.).

#### 4.4.2. MMP

MMP nehmen eine Schlüsselrolle bei der Zerstörung der Knorpelmatrix ein. Die Expression der meisten MMP im Knorpel und im Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten ist stark erhöht {137,320,321}. Auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Gelenkerkrankungen wurden erhöhte MMP-Konzentration nachgewiesen {95,322,323}. Da sowohl Chondrozyten als auch SFB MMP sezernieren, sind beide Zelltypen mit ihren Protease-Produkten potenzielle Mediatoren der Gelenkzerstörung {118}. Die Expression von verschiedenen MMP wurde in der vorliegenden Arbeit auf mRNA-, Protein- und Aktivitäts-Ebene untersucht und wird im Folgenden anhand der verwendeten Methode (Gesamt-MMP-Assay, *in situ*-Zymografie) bzw. für die einzelnen MMP detailliert diskutiert.

##### 4.4.2.1. Unspezifische MMP-Nachweise

###### MMP-Gesamt-Aktivitätsassay

Die in den Kulturüberständen ermittelte Gesamt-MMP-Aktivität zeigt neben der Induzierbarkeit durch die Zytokine v. a. den erheblichen Beitrag der SFB im KK-System. Während in den MK die Aktivität durch alle Stimulierungen nur leicht erhöht wurde, zeigte sich bereits in den unstimulierten KK eine deutliche und in den stimulierten KK eine massive Steigerung der Gesamt-MMP-Aktivität im Vergleich zu den Knorpel MK. Obwohl das verwendete Substrat von allen bekannten MMP umgesetzt werden kann, werden die gemessenen Aktivitäten hauptsächlich durch MMP-2 und MMP-9 verursacht, da sie die mit Abstand höchsten Umsatzgeschwindigkeiten für das Substratpeptid aufweisen {269,270}(Tabelle 5, Seite 37). Der Großteil der im Kulturüberstand vorhandenen MMP-2 und MMP-9 lag dabei als Proform vor, da nur nach Zugabe von APMA (führt zur Entfaltung und Aktivierung der Proform) Substratumsätze messbar waren. Dieser Befund konnte mittels Gelatine-Zymografie reproduziert werden, bei der ausschließlich Banden für die latenten Formen von MMP-2 und MMP-9 detektiert wurden.

###### In situ-Zymografie

Die *in situ*-Zymografie kombiniert die Techniken der Zymografie mit der Histologie und liefert damit Informationen zur Lokalisation und regionalen Stärke der MMP-Aktivität. Der proteolytische Abbau des Substrates ist an Stellen hoher Enzymaktivität durch eine Zunahme des Fluoreszenzsignals detektierbar, die Spaltprodukte des Substrates verbleiben am Ort und ermöglichen so eine präzise Lokalisation. Aufgrund der breiten Substratspezifität der MMP und dem Mangel an spezifischen MMP-Inhibitoren ist eine eindeutige Zuordnung der Aktivität zu einer bestimmten MMP jedoch nicht möglich.

Mit der *in situ*-Zymografie konnte sowohl im Knorpel als auch in den kokultivierten RA-SFB

eine gelatinolytische und kollagenolytische Aktivität nachgewiesen werden. Diese konnte durch Inkubation mit APMA nur leicht erhöht werden, was darauf hindeutet, dass ein Großteil der proteolytischen Aktivität auf bereits in situ aktivierten (d. h. prozessierten) MMP beruht. Bei beiden Substraten (Gelatine und Kollagen I/IV) fiel auf, dass ein starker Substratabbau im Bereich der Chondrozytenkerne stattfand (vollständige Überlagerung der DAPI-Kernfärbung mit der Aktivität; nicht gezeigt). Die Präsenz aktiver MMP-2, -3 und -9 in Zellkernen konnte bereits in Untersuchungen an Maus-Chondrozyten {324} bzw. Ratten-Herzmuskelzellen {325} demonstriert werden und dieser zunächst überraschende Befund wird durch unsere Untersuchung bestätigt. Der Substratabbau durch Kern-assoziierte MMP war dabei von vitalen Chondrozyten abhängig, da die proteolytische Aktivität immer mit vitalen Chondrozyten kolokalisiert war und in Arealen mit DAPI-negativen Chondrozytenhöhlen keine Fluoreszenzsignale als Zeichen eines Substratabbaus sichtbar waren.

Während sich die gelatinolytische Aktivität des Knorpels in den MK durch die Zytokin-Stimulation nicht veränderte, führte die KK mit RA-SFB zu einer leichten und die TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierte KK zu einer deutlichen Zunahme der gelatinolytischen Aktivität im Knorpel. Die RA-SFB zeigten dabei ebenfalls eine deutliche Umsetzung des Gelatine-Substrates, die von der Stimulation jedoch nicht beeinflusst war. Bekannterweise besitzen MMP-2, MMP-3 und MMP-9 gelatinolytische Aktivität {326}. Im Gegensatz zu MMP-2 und -9 ist der Substratumsatz durch MMP-3 jedoch vergleichsweise gering {171,290,327,328}, weshalb die Aktivität im Knorpel wahrscheinlich hauptsächlich durch MMP-2 und -9 vermittelt wurde. Ein Beitrag der MMP-9 kann jedoch ausgeschlossen werden, da im Gegensatz zur gelatinolytischen Aktivität die MMP-9-Aktivität durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (siehe 3.2.4.6.) reguliert wird. Klare Parallelen bestehen dagegen zwischen der unveränderten gelatinolytischen Aktivität des Knorpels (s. o.) und der ebenfalls unveränderten MMP-2-Aktivität in den zymografisch untersuchten Kulturüberständen (s. Zymografie unter 3.2.4.4), was auf MMP-2 als hauptsächliche gelatinolytisch aktive Protease hinweist.

Im Gegensatz zu der gelatinolytischen wurde die kollagenolytische Aktivität bereits in den MK durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , insbesondere aber durch IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  induziert. Die durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  vermittelte Steigerung in den MK konnte durch die KK mit RA-SFB noch einmal deutlich erhöht werden.

Insgesamt fiel auf, dass es v. a. in der interterritorialen Matrix (und nicht in den Chondrozyten) zu einer Zunahme der gelatinolytischen und kollagenolytischen Aktivitäten kam. Dies stimmt mit der ebenfalls diffusen Verteilung der Kollagenfragmente überein (siehe Abb. 21) und macht damit einen ursächlichen Zusammenhang zwischen MMP-Aktivität und Kollagenabbau wahrscheinlich. Dass die dargestellten proteolytischen Aktivitäten durch MMP verursacht wurden, konnte durch die vollständige Hemmung der Aktivität mit EDTA und den fehlenden Einfluss von PMSF (Serin-Proteaseinhibitor) bewiesen werden.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass: 1.) im Knorpel und in SFB Kollagen-abbauende Proteasen aktiv sind; 2.) deren Aktivität durch Zytokine stimuliert werden kann und 3.) deren Aktivität durch die KK mit RA-SFB gesteigert werden kann.

#### 4.4.2.2. Spezifische MMP-Nachweise

##### MMP-1 (Kollagenase I)

Die MMP-1-mRNA-Expression des Knorpels wurde in der MK und in der KK mit RA- oder OA-SFB weniger durch TNF- $\alpha$ , sondern v. a. durch IL-1 $\beta$  bzw. die Kombination von IL-1 $\beta$  mit TNF- $\alpha$  induziert. Parallel dazu wurden die MMP-1-mRNA-Mengen in den kokultivierten RA-SFB durch alle Stimulierungen erheblich gesteigert, was auch bei der Proteinexpression bestätigt wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass MMP-1 in RA-SFB exprimiert wird und durch TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  und besonders durch die Kombination beider Zytokine induziert wird {204,329-332}. MMP-1 übernimmt als Kollagenase eine wichtige Rolle beim physiologischen Um- und Abbau der EZM, trägt aber v. a. in pathologisch veränderten Situationen zum gesteigerten Abbau der Kollagenmatrix bei {333}. Dabei stehen chronisch erhöhte MMP-1 Level im Zusammenhang mit Prozessen, die initiale Gelenkerosionen auslösen {333}.

IL-1 $\beta$  induzierte zwar in RA-SFB, aber nicht in OA-SFB signifikant erhöhte Mengen an MMP-1 (mRNA und Protein), was Literaturbefunde bestätigt {334} und die differentielle Bedeutung von IL-1 $\beta$  für die Knorpeldegradation in RA versus OA unterstreicht.

##### MMP-2 (Gelatinase A)

Im Knorpel der MK und der KK mit RA- oder OA-SFB führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zu einer signifikanten Erhöhung der MMP-2-mRNA-Expression, die sich jedoch nicht in der Proteinexpression widerspiegelte. Eine erhöhte mRNA-Expression von MMP-2 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  konnte z. B. auch an isolierten humanen Chondrozyten beobachtet werden {335}, während andere Studien dies nicht bestätigen konnten {295,336}. Daten zur TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -induzierten mRNA-Expression von MMP-2 im Knorpel wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals erhoben. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen Transkription und Translation im Knorpel könnten z. B. posttranskriptionelle oder posttranslationale Modifikationen sein, die eine adäquate Übersetzung der mRNA in Protein verhindern.

Im Gegensatz zum Knorpel war in den SFB eine Regulation durch die Zytokinstimulation weder auf mRNA- noch auf Proteinebene erkennbar (Ausnahme: signifikante Verringerung der mRNA bei TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten RA-SFB). Dieser Befund erscheint aufgrund der Literaturdaten und der Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe nicht überraschend {331,332,337}. Trotz der fehlenden Regulierung ist die Rolle von MMP-2 im Rahmen der Gelenkerstörung zu beachten, da RA-SFB wesentlich mehr MMP-2 produzieren als normale SFB {338,339}. Die Bedeutung von MMP-2 als wichtige Gelatinase wird auch dadurch gestützt, dass sie in RA-SFB erheblich stärker exprimiert wird als MMP-9 {339}.

Die (im Vergleich zur MK) in der KK nachweisbare, erhöhte Menge an MMP-2 im Überstand ist auf die konstitutive MMP-2-Sekretion in den SFB zurückzuführen. Unsere Resultate bestätigen daher die Ergebnisse der *in situ*-Zymografie mit dem Gelatine-Substrat, da auch dort eine erhöhte gelatinolytische Aktivität in den KK im Vergleich zu den MK nachgewiesen wurde.

Im Gegensatz zur *in situ*-Zymografie (bei der die aktive/prozessierte Form detektiert wurde) konnte in den zymografischen Untersuchungen der Kulturüberstände lediglich die (inaktive) Proform von MMP-2 detektiert werden. Da zur physiologischen Aktivierung von MMP-2 v. a. das erhöhte Vorkommen von MMP-14 und MMP-15 im Zusammenspiel mit TIMP-2 führt {327,340-342}, ist anzunehmen, dass diese Faktoren in den untersuchten Kulturüberständen nicht enthalten sind. Desweiteren zeigen die Ergebnisse, dass die (in situ zymografisch) im Knorpel detektierte aktive Form der MMP-2 offensichtlich nicht aus der Knorpelmatrix in den Kulturüberstand sezerniert wird.

Auftretende Diskrepanzen zwischen den MMP-Aktivitäten bei den einzelnen Untersuchungsmethoden (Gesamt-MMP-Aktivitäts-Assay, *in situ*-Zymografie, Zymografie (im Gel)) können dabei methodisch bedingt sein: Im Gegensatz zur *in situ* Zymografie bzw. zum MMP-Gesamt-Aktivitäts-Assay werden bei der Zymografie (im Gel) auch TIMP-gebundene MMP erfasst, da durch die Anwesenheit von SDS die TIMP-MMP-Komplexe dissoziieren {326}.

### MMP-3 (Stromelysin-1)

Insgesamt erhöhte sich die MMP-3-Expression in allen Assays („real-time“ RT-PCR, ELISA und Zymografie der Kulturüberstände, Immunhistologie) sowohl durch Zytokinstimulation (MK und KK) als auch durch die KK mit SFB (Ausnahme: mRNA im Knorpel bei TNF- $\alpha$ -Stimulation ohne signifikanten Effekt).

Ähnliche Befunde wurden für die Regulation von MMP-3 durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowohl in bovinen Knorpel-explantaten {280} als auch in humanen SFB {173,331,343} berichtet.

Zusätzlich zum erhöhten Gehalt der MMP-3 (Proform) wurde die aktive Form in allen stimulierten KK (aber nicht in den MK) in der Casein-Zymografie nachgewiesen. Dieser Befund würde auf eine im Vergleich zur MK erhöhten proteolytischen Netto-Aktivität in den KK hindeuten, sofern die aktive MMP-3 nicht durch die Komplexierung mit TIMP inaktiviert wird (durch SDS-PAGE nicht differenziert). Gegen die Inaktivierung durch TIMP spricht, dass TIMP-1-Protein nicht durch TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  induziert wird (siehe 3.2.4.8.), TIMP-2 im Überstand nicht nachweisbar ist (s. 3.2.4.8.), TIMP-3 überwiegend an die Matrix gebunden vorkommt {344} und TIMP-4 nur mit geringer Affinität an MMP-3 bindet {345}. Bei den immunhistologischen Färbungen war im Falle der unstimulierten KK eine deutliche MMP-3-Färbung in der OF-nahen Zone des Knorpels erkennbar. Dieses Bild erinnert an histologische Färbungen von Knorpel-Pannus-Übergängen bzw. von arthrotisch verändertem Knorpel und deutet auf eine erhöhte proteolytische Aktivität der MMP-3 in diesen Regionen hin {137,287}.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Expression von MMP-3 durch Zytokinstimulation bzw. durch die KK mit SFB hat insofern pathogenetische Bedeutung, als dass MMP-3 *in vivo* über verschiedene Mechanismen als Mediator der Knorpelerosion agieren kann. MMP-3 kann aufgrund seiner breiten Substratspezifität eine Reihe von Bestandteilen der EZM des Knorpels, wie Aggrecan, Versican, PG-Link Protein, Kollagen III, IV, X, und Laminin abbauen {346,347}. Obwohl MMP-3 mit den Kollagenasen strukturverwandt ist (v. a. MMP-1 und MMP-13), kann sie kein natives Kollagen I und II spalten {348} und ist somit nicht direkt am initialen Abbau der Kollagenfibrillen beteiligt.



Wahrscheinlich fördert sie jedoch die initiale Knorpelschädigung, indem sie (neben den Aggrekanasen) Aggrekan abbaut und damit den Kollagenasen einen besseren Zugang zu den zuvor durch PG geschützten Kollagenfibrillen ermöglicht {96,343,349}. Daneben nimmt MMP-3 durch die Aktivierung von MMP-1, MMP-9 und MMP-13 indirekt eine Schlüsselrolle bei der Degradation des Kollagengerüsts ein {350-352}. Dafür spricht auch die vergleichsweise hohe MMP-3-Expression in der SM {353,354}, die quantitativ sogar das Expressionsniveau von MMP-1 und MMP-13 übersteigt {343}.

Weiterhin wurde in Studien eine Korrelation zwischen hohen MMP-3-Konzentrationen und klinischen Parametern der Gelenkentzündung gezeigt {333}. Die Bedeutung von MMP-3 für die Progression der Entzündung wird auch durch weitere Literaturdaten gestützt, die eine Aktivierung der Proformen von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. Pro-TNF- $\alpha$ ) durch MMP-3 belegen {178}.

### MMP-9 (Gelatinase B)

Im Knorpel der MK und der KK führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zu einer massiven Induktion der MMP-9-mRNA-Expression, die alleinige Stimulation mit TNF- $\alpha$  hatte hingegen nur einen geringen Effekt.

Auf der Proteinebene (Zymografie der Kulturüberstände) zeigte sich sowohl in den MK als auch in den KK eine teilweise signifikante Erhöhung der Pro-MMP-9 in TNF- $\alpha$ - und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -stimulierten Proben. IL-1 $\beta$  hatte hingegen nur einen geringen Einfluss. Dieser differentielle Effekt der TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermittelten Stimulierung der MMP-9-Proteinexpression im Knorpel ist literaturbekannt {280}. Durch die KK mit SFB wurde die MMP-9-Expression im Vergleich zur MK nicht erhöht (mRNA und Protein). Dieser Befund stimmt mit der generell niedrigen, durch die Stimulation nicht beeinflussten MMP-9-Genexpression der SFB überein. Obwohl einige Studien eine Induktion der MMP-9-mRNA-Expression in SFB beschreiben {339,355}, wurde an anderer Stelle auch von einer Resistenz von RA-SFB bezüglich einer IL-1 $\beta$ -vermittelten Induktion der MMP-9-mRNA-Expression berichtet {332}.

Eine Zunahme der MMP-9-Expression im Knorpel konnte nach Stimulation sowohl in den MK als auch in den KK immunhistologisch nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen der Zymografie übereinstimmt. Allerdings kam es in der Immunhistologie der KK mit RA-SFB nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  zu einer überraschend hohen MMP-9-Expression im Knorpel. Da in den Überständen eine parallele Erhöhung nicht nachweisbar war, ist die nachgewiesene MMP-9-Menge vermutlich knorpelgebunden und wird nicht freigesetzt {171,356}.

Die pathologische Relevanz von MMP-9 ist u. a. durch die erhöhte Konzentrationen im Serum und in der Synovialflüssigkeit bei entzündlichen Arthropathien gegeben {340}. MMP-9 ist in der Lage, die Kollagenfibrillen nach der primären Spaltung durch Kollagenasen effizient zu degradieren {357}. Daneben ist MMP-9 auch am Abbau des Aggrekans beteiligt und kann Pro-TNF- $\alpha$  aktivieren und hat somit eine indirekte pro-inflammatorische Wirkung {357}.

### MMP-13 (Kollagenase-3)

Die MMP-13-Genexpression wurde im Knorpel der MK und der KK durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  leicht und durch IL-1 $\beta$ - bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation massiv gesteigert. Im Gegensatz zum Knorpel beeinflusste die Stimulation die mRNA-Expression der kokultivierten SFB nicht, bzw. es erfolgte nur eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion. Dieser Befund weist Analogien zur Genexpression von Aggrecanase I und II, MMP-2 und MMP-9 in SFB auf und wird durch *in vivo*-Daten unterstützt, die die MMP-13-Produktion vorwiegend in Chondrozyten und weniger in SFB beschreiben {320}. Diese deutlichen, zelltypspezifischen Unterschiede in der Regulation von MMP-13 spiegeln die differentielle Bedeutung von Chondrozyten und SFB für die Matrixdegradation wider.

Die für den Knorpel beschriebenen Effekte bezüglich der MMP-13-mRNA-Expression werden durch Daten aus der Literatur gestützt. So konnte sowohl an humanen als auch an bovinen Knorpelimplantaten eine Induktion der MMP-13-Genexpression durch die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beobachtet werden, wobei IL-1 $\beta$  ein wesentlich potenterer Induktor war als TNF- $\alpha$  {280,358,359}. Zum Vorkommen und der Induzierbarkeit von MMP-13 in SFB liefert die Literatur unterschiedliche Aussagen. Einerseits konnten in OA-SFB konstitutiv nur eine sehr geringe MMP-13 mRNA-Expression nachgewiesen werden, die sich auch durch Stimulation mit IL-1 $\beta$  nicht steigern ließ {358}. Andererseits wurde in OA-SFB eine gesteigerte MMP-13 Proteinexpression nach Inkubation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  beobachtet {331}. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Daten könnte in der großen Heterogenität des Probenmaterials liegen, wie in einer Studie an RA-SFB gezeigt wurde, in der nur vier von zehn Patienten eine basale MMP-13-mRNA-Expression aufwiesen {360}. Möglicherweise ist der stimulierende Effekt auf die MMP-13-mRNA jedoch nach der 14-tägigen Dauerstimulation nicht mehr nachweisbar, da gezeigt werden konnte, dass das maximale Expressionsniveau der stimulierten RA-SFB nach 3 d wieder abfällt {360}.

Da die Kollagenase MMP-13 neben MMP-1 maßgeblich an der primären Spaltung der intakten Kollagenfibrillen beteiligt ist (z. B. hat MMP-13 eine fünf bis zehnfach höhere katalytische Aktivität bei der Spaltung von Kollagen II als MMP-1) und auch Aggrecan spalten kann, kommt ihr eine bedeutende Rolle im Prozess der Knorpelzerstörung zu {358}.

### **4.4.3. TIMP-1**

Für TIMP-1 konnte nur im Knorpel der MK eine deutliche Induktion der mRNA-Synthese durch Stimulation v. a. mit TNF- $\alpha$  und in geringerem Maße mit IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Eine solche TIMP-1-Induktion bestätigt Literaturbefunde zur TIMP-1 Induktion in humanen Chondrozyten nach 14-tägiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  {335}. Interessanterweise wurde die zytokinvermittelte TIMP-1-Induktion im Knorpel der KK mit SFB vollständig unterdrückt - dieser ausschließlich auf der KK mit SFB beruhende, reprimierende Effekt auf die TIMP-1-Genexpression wurde erstmals in dieser Arbeit beschrieben (siehe 3.2.4.8.). Die dadurch im Knorpel verursachte starke Imbalance zwischen der Induktion matrixdegradierender MMP (s. o.) und ihren Gewebsinhibitoren führt zu einem insgesamt stark katabolen Zustand, der wahrscheinlich ursächlich für die gewebstestruierenden Prozesse dieser Erkrankungen ist {110,225,361,362}.

Im Gegensatz zu den mRNA-Resultaten wurde jedoch in den Kulturüberständen der MK keine stimulationsbedingte Proteinerhöhung von TIMP-1 detektiert, was darauf beruhen kann, dass in den Kulturüberständen nur aus dem Knorpel diffundierte, jedoch nicht knorpelgebundene TIMP erfasst werden können. Die konstitutive TIMP-1 Freisetzung der MK konnte auch in den KK beobachtet werden, wobei die TIMP-1-Menge in den KK im Vergleich zur MK signifikant erhöht war. Diese Erhöhung ist literaturbekannt {331,363} und wahrscheinlich ausschließlich auf die TIMP-1-Sekretion der SFB zurückzuführen.

## 4.5. Matrix-Neosynthese

### 4.5.1. Aggrekan

Da es in den vorliegenden Untersuchungen zu einer erhöhten GAG-Freisetzung aus dem Knorpelgewebe kam, wurde auch die Aggrekan-Neosynthese der Zellen immunhistologisch analysiert (unter Verwendung eines für neugebildetes Aggrekan spezifischen AK), um den Einfluss der Zytokinstimulation bzw. der KK auf die Reparaturmechanismen des Knorpels zu ergründen. Bezüglich der Aggrekansynthese des Knorpels ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen den MK und den KK mit RA-SFB. In den unstimulierten Knorpelproben der MK und KK war neu synthetisiertes Aggrekan hauptsächlich mit den Chondrozyten assoziiert, die interterritoriale Matrix hingegen war deutlich schwächer gefärbt. Dieser Befund ist typisch für den in Homöostase befindlichen Knorpel {364}, und steht im Einklang mit anderen Arbeiten, die eine Bildung konstanter Mengen von Aggrekan in der Matrix bei der *in vitro*-Kultur von Knorpel belegen. Dabei entsprechen die *in vitro* gebildeten Mengen der *in vivo* beobachteten Neosynthese {259,365}.

In den stimulierten Proben (der MK und KK) war ein Verlust der Färbung für neugebildetes Aggrekan v. a. in der territorialen Zone um die Chondrozyten herum zu beobachten. Dabei führte TNF- $\alpha$  nur in den OF-nahen Chondrozyten, IL-1 $\beta$  hingegen auch in den Chondrozyten der tieferen Knorpelregionen zu einer verringerten Aggrekan-Neosynthese. Bei TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation betraf die verminderte Neosynthese die Chondrozyten des gesamten Knorpels. Die Verminderung der Aggrekan-Neosynthese gehört zu den charakteristischen Wirkungen pro-inflammatorischer/pro-destruktiver Zytokine {231,253,366,367}. Sie wird als initiales Ereignis einer degenerativen Knorpelveränderung angesehen, da damit auch eine Schädigung der Chondrozytenintegrität verbunden ist {368,369}. Die reduzierte Aggrekan-Neosynthese ist jedoch nicht durch eine nachlassende Zellvitalität erklärbar, da die Zellen im Knorpel kaum apoptotische/nekrotische Veränderungen aufweisen (z. B. Kernfragmentierung) und IL-1 im Allgemeinen in Chondrozyten keine Apoptose induziert {370}.

Überraschenderweise wurde die Chondrozyten-nahe Abnahme der Aggrekanfärbung von einer Verstärkung in der interterritorialen Knorpelzone begleitet, insbesondere in den IL-1 $\beta$  stimulierten Proben. Ein ähnlicher Befund wurde auch an bovinem Knorpel nach Stimulation mit Retinolsäure beobachtet (wirkt ähnlich katabol auf die Knorpelmatrix wie IL-1 $\beta$ ), was auf einer Verlagerung eines Teiles des neugebildeten Aggrekans von den Chondrozyten in die (inter)territoriale Zone des Knorpels beruhte {364}. Dieser Effekt beruht vermutlich auf dem auch physiologisch relevanten Umsatz des Aggrekans. So werden die Aggrekanmonomere in

intaktem Knorpelgewebe nach der Synthese in den Chondrozyten in die extrazelluläre Matrix abgegeben und bilden mithilfe des sog. Link-Proteins stabile Aggregate mit Hyaluronsäure {371}. Diese Aggregate sind vorerst mit dem Chondron assoziiert {372-374} und werden mit der Zeit durch proteolytische Aktivität von der Chondrozyten-OF gelöst und in die interterritoriale Matrix verlagert {375}. Durch katabole Faktoren (wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ ) kommt es zur vermehrten Proteasesekretion in den Chondrozyten, was diese Umlagerung beschleunigt.

Nach Doppelstimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  war kein neugebildetes Aggrekan mehr in der Knorpelmatrix nachweisbar. Dieser drastische Befund ist wahrscheinlich auf die aufgelockerte Matrixstruktur (als Folge des massiven PG-Verlustes) zurückzuführen, die einen Verlust neugebildeten Aggrekans bedingt. Der starke PG-Verlust konnte dabei zuvor durch die verminderte Safranin-O-Färbung der entsprechenden Knorpelproben bestätigt werden (siehe 3.2.1.1.).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Stimulation des Knorpels mit pro-inflammatorischen Zytokinen nicht nur zum Abbau des Aggrekans führt, sondern auch dessen Neosynthese unterdrückt bzw. den Verlust von neugebildetem Aggrekan erhöht. Deshalb kann man davon ausgehen, dass im vorliegenden KK-System eine massive Störung der Knorpelhomöostase vorliegt.

#### 4.5.2. Kollagen

Die Synthese von Kollagen II, dem mengenmäßig häufigsten Knorpelkollagen, wurde auf der mRNA-Ebene im kultivierten Knorpel untersucht.

Dabei wurde in der MK bei IL-1 $\beta$ -Stimulation zumindest eine numerische und bei Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  sogar eine signifikante Reduktion der Kollagen II mRNA-Expression beobachtet. In den KK mit SFB zeigte sich für alle Stimulierungen eine numerische und teilweise signifikante Reduktion gegenüber den unstimulierten Kontrollen. Bemerkenswerterweise war die Reduktion bei TNF- $\alpha$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten KK mit SFB sogar signifikant niedriger als in den entsprechenden MK. Dieser KK-Effekt ist von pathogenetischer Relevanz und deckt sich mit Literaturdaten, die im Knorpel *in vitro* und bei RA-Patienten *in vivo* eine verminderte Kollagen II-Produktion beschreiben {366,367,376,377}.

Da durch die Stimulation mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  neben der Kollagen II-mRNA-Expression auch die Aggrekansynthese supprimiert wird, sind damit die zwei wichtigsten Komponenten der EZM des Knorpels betroffen. Durch die Unterdrückung der Matrixsynthese und die gleichzeitige Induktion von matrixdegradierenden Proteasen wirken die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  daher in doppelter Hinsicht katabol auf die Knorpelhomöostase.

#### 4.6. Differentieller Beitrag der SFB und der Chondrozyten zum Matrixabbau

Das Devitalisieren des Knorpels ermöglichte es, die durch vitale Chondrozyten vermittelten funktionalen Effekte (Matrixsynthese, Sekretion von Proteasen oder löslichen Mediatoren) zu eliminieren und damit den differentiellen Beitrag der SFB zur Destruktion zu verdeutlichen. Dies ist eine anerkannte Methode, um in KK-Systemen den Matrixkontakt der SFB zu gewährleisten und gleichzeitig den Einfluss der Chondrozyten auszuschließen {331,378}.

Die Untersuchung des PG-Verlustes aus devitalisierten Knorpelproben erbrachte mehrere interessante Erkenntnisse: 1.) Die sehr geringe PG-Basisfreisetzung in der MK mit avitalem Knorpel beweist, dass die Kulturbedingungen alleine nur zu einem begrenzten PG-Abbau im Knorpel führen; 2.) Die in der MK durch TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  Stimulation induzierte PG-Depletion wird durch die Chondrozyten verursacht, da nur in vitalem, aber nicht in avitalem Knorpel, ein massiver PG-Verlust erfolgt; 3.) RA-SFB besitzen bereits unstimuliert eine beachtliche matrixdegradierende Kapazität, da sie in der Lage sind, einen massiven PG-Abbau in avitalem Knorpel zu induzieren; 4.) Der PG-Verlust in der unstimulierten KK mit vitalem Knorpel war jedoch viel geringer als in der KK mit avitalem Knorpel, d. h. die Chondrozyten verfügen offensichtlich über protektive Mechanismen, die der destruktiven Wirkung der RA-SFB entgegenwirken. Dabei könnte es sich um sezernierte Protease-Inhibitoren (z. B. TIMP,  $\alpha$ 2-Makroglobulin etc.), andere protektive Mediatoren (z. B. sTNF-R, IL-1-RA) oder aber auch um eine gesteigerte Neusynthese von Matrixbestandteilen handeln (hier v. a. Aggrecan); 5.) Die matrixdegradierende Kapazität der SFB wurde dadurch unterstrichen, dass die TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation in der KK mit avitalem Knorpel zu einem vollständigen PG-Verlust führt.

Diese Ergebnisse demonstrieren, wie wichtig stark die RA-SFB neben den Chondrozyten zur Matrixdestruktion beitragen und passen in Literaturkonzepte zu den Mechanismen bei der initialen Knorpelschädigung in der RA. So zeigt Knorpelgewebe, das sich in Homöostase befindet (unstimulierter vitaler Knorpel), eine hohe Resistenz gegenüber exogenen proteolytischen Enzymen und anderen Mediatoren. Pro-inflammatorische Zytokine, die sowohl von aktivierten SFB als auch von anderen Zellen der SM sezerniert werden, verursachen eine Störung dieses Gleichgewicht im Knorpel, indem sie einerseits eine verminderte Synthese von Matrixbestandteilen und andererseits eine vermehrte Sekretion proteolytischer Enzyme bewirken und damit die Matrixintegrität destabilisieren {38}. Auf der Grundlage dieses vorgeschädigten Knorpels können RA-SFB die Knorpelmatrix zusätzlich effektiv schädigen. Die Unterdrückung regenerativer Mechanismen und die gleichzeitige Induktion matrixdegradierender Proteasen ist vermutlich die Schlüsselrolle der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bei diesem Prozess.

Das Fehlen vitaler Chondrozyten reicht dabei offensichtlich aus, um eine SFB-vermittelte PG-Degradation zu erleichtern. Dieser Mechanismus könnte *in vivo* v. a. bei vorgeschädigtem Knorpel mit einer hohen Frequenz apoptotischer Chondrozyten von Wichtigkeit sein, da in einem derart fortgeschrittenen Stadium ein stimulierendes pro-inflammatorisches Milieu nicht mehr zwingend notwendig für eine weitere Knorpeldegradation zu sein scheint.

## 4.7. Pro-inflammatorische Zytokine IL-6 und IL-8

Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 stellen wichtige Faktoren der Entzündungs- und Destruktionsvorgänge in entzündlichen Gelenkerkrankungen dar. Sie wurden im Knorpel bzw. in den kokultivierten RA- und OA-SFB auf der mRNA-Ebene, sowie in den kokultivierten RA- und OA-SFB auf Proteinebene untersucht.

### 4.7.1. IL-6

Im Knorpel führte die Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , aber nicht von TNF- $\alpha$  allein, sowohl in den MK als auch in den KK mit SFB zu einer massiven Induktion der IL-6-mRNA-Expression. Dabei fiel die numerisch höhere Expression in den KK gegenüber den MK auf, was auf eine zusätzliche Induktion der IL-6-mRNA-Synthese durch die SFB hindeutet. Während eine verstärkte Induktion von IL-6 in Chondrozyten durch die KK mit SFB bisher noch nicht beschrieben wurde, ist die Erhöhung der IL-6-Expression in Chondrozyten durch Zytokine wie IL-1 $\beta$  bekannt {295}.

In den kokultivierten RA- und OA-SFB wurde die IL-6-mRNA-Expression v. a. durch IL-1 $\beta$ , in geringerem Maße aber auch durch TNF- $\alpha$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  erhöht. Dabei reagierten die RA-SFB tendenziell stärker auf die Stimulation als OA-SFB. Die Induktion von IL-6 in den SFB konnte auch auf Proteinebene reproduziert werden, wobei keine Unterschiede zwischen RA- und OA-SFB mehr auftraten und die Produktion von IL-6 nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  am höchsten war. Die durch TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzierte Expression von IL-6 in RA-SFB wurde bereits mehrfach beschrieben {185,296,329,379,380} und deutet auf eine maßgebliche Rolle von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  für die SFB-vermittelte Entzündungsreaktion im arthritischen Gelenk hin.

IL-6 ist bekanntermaßen auch in der RA an der Destruktion von Knorpel und Knochen beteiligt {381}. Es ist notwendig für die IL-1 $\beta$ -vermittelte Verminderung der PG-Synthese im humanen Knorpel {382}, da diese durch eine Neutralisierung von IL-6 verhindert wird. Daher könnte die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete erhöhte IL-6-Expression im Knorpel und den SFB indirekt an der immunhistologisch dargestellten verminderten Aggrecansynthese des Knorpels beteiligt sein. Neben dieser indirekten Wirkung kann IL-6 auch direkt die Produktion von Aggrecan und Kollagen II in Chondrozyten hemmen {383}. Außerdem kann IL-6 zur Matrixdestruktion beitragen, indem es die Sekretion des Plasminogenaktivators, der nach proteolytischer Spaltung zur MMP-Aktivierung führt, steigert {35}.

Die Bedeutung von IL-6 in der Pathogenese der RA wird auch dadurch verdeutlicht, dass die IL-6-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten sehr hoch ist, unter anti-TNF- $\alpha$ -Therapie jedoch stark abgesenkt wird {384}. Die hohe Konzentration an IL-6 induziert die Proliferation von SFB {385} und trägt somit maßgeblich zur Hyperplasie der SM bei, die ein Charakteristikum eines rheumatisch veränderten Gelenks ist. Die systemische Komponente der RA wird durch erhöhte IL-6-Serum-Spiegel reflektiert, die mit der Schwere radiologisch erfassbarer Knochenveränderungen korrelieren {386}. Folgerichtig lieferte IL-6 bei *in vitro*-Versuchen einen maßgeblichen Beitrag zur Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung hatte {387}. Besonders deutlich wird die Bedeutung von IL-6 für die Pathogenese von Gelenkentzündungen durch die effektive Prävention und Behandlung der Entzündung in

Arthritismodellen sowie die erfolgreiche klinische Behandlung der RA durch die Blockade von IL-6 {388,389}.

#### 4.7.2. IL-8

In Analogie zu IL-6 führte die Stimulation des Knorpels mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ , aber nicht mit TNF- $\alpha$  alleine, zu einer massiven Induktion der IL-8-mRNA-Expression. Eine solche Induktion von IL-8 mRNA wurde bereits in isolierten Chondrozyten und Knorpelxplantaten nach IL-1 $\beta$ -Stimulation beobachtet und als bedeutsam für die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen angesehen {390,391}. In den SFB der KK wurde die Menge an IL-8 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nach allen Stimulationen erhöht, wobei die Doppelstimulation in der Regel den stärksten Effekt hatte. Diese Befunde bestätigen Literaturdaten, die eine konstitutive Expression von IL-8 in SFB sowie eine starke Induktion durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachweisen {392-394}.

*In vivo* spielt IL-8 eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen Gelenkerkrankungen, da es eine starke chemotaktische und aktivierende Wirkung auf Neutrophile und T-Lymphozyten {395,396} und insbesondere auf SFB aufweist {397}. Seine prodestruktive Rolle wird dadurch deutlich, dass IL-8 in einem ähnlichen *in vitro*-KK-System wie in der vorliegenden Arbeit die Invasion von RA-SFB in die Knorpelmatrix stimulieren konnte {257}.

### 4.8. Morphologische Destruktion

#### 4.8.1. Lichtmikroskopie

Durch die lichtmikroskopische Analyse konnte in dieser Studie nach 14 d Kultur keine substantielle Erosion des Knorpels (geschädigte OF, Invasion von Zellen), weder durch unstimulierte noch durch stimulierte SFB, nachgewiesen werden. Die Gründe für die fehlende Erosion des Knorpels durch einwachsende SFB liegen vermutlich in der Beschaffenheit der Knorpelmatrix und in der relativ kurzen KK-Dauer. Nativer, gesunder Knorpel, wie der verwendete bovine Knorpel, zeichnet sich durch eine sehr hohe Dichte seiner Matrixbestandteile aus (z. B. 100 mg/ml PG {88}). Daher müssen die SFB erst einen Großteil der PG-haltigen Matrix abbauen, bevor diese aufgelockert wird und dadurch die Invasion der SFB ermöglicht. Dem steht jedoch die Fähigkeit der Chondrozyten entgegen, einen PG-Verlust durch Neusynthese zumindest teilweise zu kompensieren. Da die Kulturen bereits nach 14 d beendet wurden, ist eine substantielle Schädigung der Kollagenmatrix in diesen frühen Stadien wahrscheinlich durch die Anwesenheit der PG verhindert worden. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass Aggrecan die Kollagene vor der Proteolyse durch MMP schützt und die Kollagenfasern erst nach dem Abbau der PG proteolytisch angegriffen werden {96}. Tatsächlich konnte im vorliegenden Modell durch die Verlängerung der KK-Dauer auf 42 d gezeigt werden, dass mit TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierte RA-SFB in der Lage sind, die Matrix der Knorpel-OF zu erodieren.

Nach 14 d KK der RA-SFB mit avitalem Knorpel konnte unter TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$ -Stimulation

lichtmikroskopisch eine massive Matrixerosion dokumentiert werden. Somit scheint das erosive Potential der RA-SFB von vitalen Chondrozyten maßgeblich beeinflusst zu werden. Vermutlich ist der beobachtete Effekt hauptsächlich auf die ausbleibende Matrixsynthese der Chondrozyten bei Anwesenheit von MMP- und Aggrecanasen-sezernierenden SFB zurückzuführen. In vitalem Knorpel können dagegen die Chondrozyten der SFB-induzierten Matrixdegradation durch eine erhöhte Neosynthese gegensteuern. Zusätzlich wäre es möglich, dass die Chondrozyten matrixprotektive Mediatoren wie TGF- $\beta$  oder IGF-1 sezernieren und dadurch die matrix-erodierende Kapazität der SFB abschwächen {306}.

#### 4.8.2. Elektronenmikroskopie

Da bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen der MK und KK mit RA-SFB nach 14 d Kultur keine morphologische Matrixdestruktion in den Proben mit vitalem Knorpel nachgewiesen werden konnte, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dabei konnte eine initiale Schädigung der Knorpelmatrix sowohl durch die Stimulation mit Zytokinen als auch durch die kokultivierten RA-SFB nachgewiesen werden.

Durch die REM-Analyse gelang eine dreidimensionale Darstellung der Knorpelstrukturen und der SFB-Morphologie, da durch die Kryopräservierung der Proben die meisten Matrixstrukturen erhalten blieben. Bei intaktem Knorpel kaschierten die PG dabei die Kollagenfibrillen, während bei entsprechendem PG-Verlust die exponierten Kollagenfibrillen sehr gut darstellbar waren. Insofern erschien diese Methode besonders für die Visualisierung eines PG-Verlustes geeignet.

Bereits bei den unstimulierten MK konnte ein deutlicher Verlust der zellfreien *Lamina splendens* (LS) an der Knorpel-OF beobachtet werden, wobei die darunterliegenden Kollagenfibrillen des superfiziellen Knorpels sichtbar wurden. Diese sind bekanntermaßen nicht durch PG kaschiert, da die oberste Knorpelschicht relativ arm an PG ist und die PG-Konzentration erst mit zunehmender Tiefe ansteigt {66}. Der Verlust der LS wurde vermutlich durch die *in vitro*-Kulturbedingungen verursacht. Da die Proteine der LS (z. B. Lubricin) *in vivo* vorrangig durch Zellen der SM und nur teilweise durch superfizielle Chondrozyten sezerniert werden {63}, kommt es vermutlich durch das Fehlen der SM *in vitro* zur allmählichen Auflösung dieser Schicht. *In vivo* wird die Abwesenheit der LS als erster Schritt der Zerstörung der darunterliegenden Kollagenmatrix angesehen {398}, da durch ihr Fehlen einerseits das reibungsfreie Gleiten der Gelenkknorpelflächen vermindert, andererseits der Zutritt matrixdestruierender Proteasen und entzündlicher Mediatoren erleichtert wird {399}.

Bei den mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierten MK wurde eine markante PG-Depletion beobachtet. Die REM-Aufnahmen zeigen deutlich, dass die Kollagenfibrillen völlig exponiert sind und das Kollagenetzwerk teilweise kollabiert. Dies ergänzt die Befunde der konventionellen Histologie (Safranin-O-Färbung), in der ebenfalls ein massiver PG-Verlust dokumentiert wurde. Das morphologische Erscheinungsbild der PG-depletierten Knorpelregion weist dabei Ähnlichkeiten zu REM-Untersuchungen an bovinem Knorpel auf, bei dem die PG durch CaCl<sub>2</sub> Inkubation herausgelöst wurden {400}.

In der KK mit RA-SFB konnte durch REM gezeigt werden, dass die Zytokinstimulation zu



morphologischen Veränderungen der RA-SFB führte. Während in unstimulierten KK die RA-SFB einen flachen, fibroblastentypischen Phänotyp mit pflastersteinartiger Anordnung der SFB zeigten, resultierte die Stimulation mit TNF- $\alpha$  aber v. a. mit IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  in stark abgerundeten, aber dennoch adhären Zellen. Diese stark kondensierten SFB mit teils spindelförmigen Ausläufern hatten zahlreiche Mikrovilli auf der krausen Zell-OF. Es ist anzunehmen, dass diese Veränderung des Phänotyps in Zusammenhang mit der zytokininduzierten Aktivierung der Zellen steht. Es ist z. B. bekannt, dass sich die Zellmorphologie von Kaninchen- {401} oder humanen SFB {402} unter Stimulation mit IL-1 $\beta$  ähnlich stark verändert, was von einer erhöhten Kollagenase-Sekretion begleitet ist. Der Wandel der Zell-Morphologie wird vermutlich durch Veränderungen der zytoskelettalen Aktinfilamente verursacht, da diese maßgeblich die Zellform bestimmen {403}.

An einzelnen Stellen konnte in der unstimulierten KK mit RA-SFB bereits eine Destruktion der Knorpelmatrix in Form eines massiven PG-Verlustes dokumentiert werden, der in der unstimulierten MK nicht beobachtet wurde. Da die SFB-Schicht auf dem Knorpel jedoch in den meisten Proben konfluent und mehrere Zelllagen dick war, konnte die Matrixdestruktion in den KK nicht systematisch untersucht werden. Der o. a. initiale Befund lässt jedoch vermuten, dass bereits unstimulierte RA-SFB die Kapazität besitzen, die EZM der oberflächlichen Knorpelschichten zu degradieren.

Die Analyse der Grenzfläche zwischen Knorpel und RA-SFB erfolgte durch TEM-Analyse. Dabei konnte bereits in den MK nach Zytokinstimulation eine Degradation der Matrix in den OF-nahen Knorpelbereichen nachgewiesen werden (verminderte Kontrastierbarkeit der Kollagenfibrillen). Diese Beobachtung ist ein Hinweis auf die Effekte der zytokininduzierten Sekretion von Kollagen-spaltenden MMP in den Chondrozyten.

Die verminderte Kontrastierbarkeit degradiert Kollagenfibrillen ist vermutlich auf den partiellen Verdau der Tripelhelix im Sinne einer Auffaserung zurückzuführen, da die Fibrillenstruktur grundsätzlich noch darstellbar war, während im Kulturüberstand keine Kollagenfragmente nachweisbar waren. Es wurde auch in anderen Untersuchungen ein Verlust der kontrastreichen Darstellung der Fibrillenstruktur beobachtet, z. B. bei einer KK humaner gingivaler Fibroblasten mit einer Kollagen-Matrix {404}. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch der aktive Verdau einer Kollagenmatrix mit bakterieller Kollagenase-A {405} und selbst in einem Tiermodell wurden ähnliche Befunde bei physiologischen Knorpelresorptions-Prozessen dokumentiert {406}.

Durch die Analyse des Knorpels aus der KK konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass bereits unstimulierte RA-SFB die Kollagenfibrillen der oberflächlichen Knorpelmatrix substantiell schädigen können. Durch die stimulierten RA-SFB wird die in den MK beobachtete zytokininduzierte Kollagendegradierung zusätzlich verstärkt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der REM und TEM Analyse also, dass: 1.) die Stimulation der Chondrozyten mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  einen gesteigerten Abbau der EZM induziert, indem PG freigesetzt und Kollagene degradiert werden; 2.) die kokultivierten RA-SFB diese Prozesse zusätzlich verstärken können; und 3.) bereits unstimulierte RA-SFB in der Lage sind, die Knorpelmatrix zu zerstören.

#### 4.9. Relativer Einfluss von TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ im *in vitro*-Destruktions-Modell

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der Untersuchungsergebnisse fällt auf, dass bei vielen analysierten Parametern sowohl die Einzelstimulationen als auch die Doppelstimulation einen deutlichen Effekt hatten.

Allerdings war IL-1 $\beta$  in den meisten Fällen ein stärkerer Induktor als TNF- $\alpha$ . Dieser Effekt wurde bei den Untersuchungen zum PG- und Kollagenabbau sowie beim Nachweis von COMP beobachtet und betraf somit drei wichtige EZM-Komponenten. Interessanterweise war im Knorpel auch die mRNA-Expression der für diese Abbauprozesse verantwortlichen Proteasen (Aggrecanase I und II, MMP-1, -2, -3, -9) und der analysierten pro-inflammatorischen Zytokine (IL-6 und IL-8) wesentlich stärker durch IL-1 $\beta$  induziert als durch TNF- $\alpha$ . Zusätzlich hemmte IL-1 $\beta$  wesentlich deutlicher als TNF- $\alpha$  die Synthese von EZM-Komponenten wie Aggrecan (Protein) und Kollagen II (mRNA). In den kokultivierten RA- bzw. OA-SFB waren lediglich die MMP-3, IL-6 und IL-8 Proteinexpression durch IL-1 $\beta$  stärker reguliert als durch TNF- $\alpha$ .

Die Wirkung von IL-1 $\beta$  wurde in einigen Fällen durch zusätzliche TNF- $\alpha$  Stimulation noch einmal deutlich gesteigert. So zeigten TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimulierte Proben einen gegenüber den Einzelstimulationen deutlich verstärkten Abbau der Knorpelmatrix (PG- und Kollagenabbau), der zusätzlich von einer dramatisch verminderten Matrix-Neosynthese (Aggrecan) begleitet war.

Bei einem Teil der hier untersuchten Parameter zeigten sich wiederum keine deutlichen Unterschiede zwischen den TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermittelten Effekten (Aggrecanase-Aktivität MK, Gesamt-MMP in den MK und KK, MMP-1-, -3-mRNA in SFB, MMP-1- Protein in RA-SFB, IL-6- und IL-8-mRNA in SFB).

Neben den z. T. differentiellen Effekten von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde für einige Parameter eine Unempfindlichkeit gegenüber einer Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  beobachtet. So war in den kokultivierten SFB die Aggrecanase I- und II-mRNA-Expression, die MMP-2 mRNA- und Proteinexpression sowie die MMP-9 bzw. -13-mRNA-Expression nicht durch Zytokin-Stimulation reguliert. Im Knorpel erwies sich nur die MMP-2 Proteinexpression bzw. die damit verbundene *in situ*-gelatinolytische Aktivität als unempfindlich gegenüber einer Zytokin-Stimulation.

Die experimentellen Daten demonstrieren daher die zentrale, aber differentielle Bedeutung der beiden Zytokine für die Prozesse der Knorpeldestruktion, wobei IL-1 $\beta$  gegenüber TNF- $\alpha$  eindeutig als stärkerer Induktor identifiziert werden konnte. Dieser Befund deckt sich mit Erkenntnissen aus der Literatur, die IL-1 $\beta$  hauptsächlich für die Gelenkdestruktion und TNF- $\alpha$  eher für die chronische Entzündung verantwortlich machen {138}. IL-1 $\beta$  scheint zudem eine äußerst wichtige Rolle bei der Initiierung der RA zu spielen und Erkenntnisse aus Tiermodellen belegen, dass die Gelenkzerstörung durch Behandlung mit IL-1-RA verhindert werden kann {191}. Die Bedeutung von IL-1 $\beta$  wird weiterhin dadurch untermauert, dass IL-

IL-1 $\alpha/\beta$  sowohl in frühen als auch in wesentlich späteren Phasen der RA auftritt, während TNF- $\alpha$  vorwiegend in den frühen Phasen der Krankheit detektiert wird [191].

Die Bedeutung von IL-1 $\beta$  für die Knorpeldestruktion konnte mit den Untersuchungen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Effekte der literaturbekannten Wirkung von TNF- $\alpha$  als Entzündungsmediator wurden mit dem Modell weit schlechter erfasst, da die eigentlichen Ziel/Effektorzellen einer Entzündungsreaktion (M $\phi$ , T- und B-Zellen) im verwendeten Assay nicht eingesetzt wurden. Dabei unterstrich jedoch die durch TNF- $\alpha$  verursachte Induktion der pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-6 und IL-8 im Knorpel und den SFB die entzündungsfördernden Effekte von TNF- $\alpha$ . Daneben kann TNF- $\alpha$  auch als ein wichtiger indirekter Mediator der Knorpeldegradation agieren, da aus der Literatur bekannt ist, dass TNF- $\alpha$  über die Induktion von IL-1 $\beta$  eine Gelenkdestruktion vermittelt [407]. Die wechselseitige Induktion der Synthese und nachfolgenden Aktivierung der gleichen Mediatoren zeigt die synergistische Wirkung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und demonstriert deren wichtige Rolle im Entzündungs- und Destruktionsprozess.

Überraschenderweise zeigt IL-1RA in der klinischen Anwendung bei der RA nur geringe Effekte [191], während die TNF- $\alpha$ -Blockade sowohl die Arthritis als auch die Gelenkdestruktion effektiv inhibieren kann [408,409]. Eine mögliche Erklärung dafür ist die geringe HWZ von IL-1-RA (Anakinra) im Körper des Patienten und die damit verbundene kurze Wirkperiode. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dennoch die überragende Bedeutung von IL-1 $\beta$  für die Prozesse der Knorpeldestruktion und bestärken therapeutische Ansätze zur Optimierung der IL-1 $\beta$ -Blockade/Neutralisierung.

#### **4.10. Unterschiede zwischen RA- und OA-SFB**

Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass nur in wenigen Einzelfällen deutliche Unterschiede zwischen den RA- und OA-SFB zu beobachten waren.

Die zur KK mit dem Knorpel verwendeten Zellen stellen eine hochreine SFB-Fraktion aus den SM der Patienten dar. *In vivo* wird die Aktivität der SFB jedoch maßgeblich durch den Zell-Zellkontakt mit anderen Zellen der SM (M $\phi$ , B- und T-Zellen) und über lösliche Mediatoren reguliert. Die Zusammensetzung der Zellen der SM und auch die Konzentration pro-inflammatorischer Mediatoren in der SM und der Synovialflüssigkeit variiert jedoch stark zwischen RA- und OA-Patienten. So ist der Anteil von aktivierten M $\phi$  und anderen Entzündungszellen (B- und T-Zellen) in der RA-SM wesentlich höher als in der OA; daher verhalten sich RA-SFB *in vivo* vermutlich wesentlich aggressiver als SFB von OA-SFB. Durch die *in vitro*-Bedingungen werden die RA- und OA-SFB mit den gleichen Zytokinkonzentrationen inkubiert und vermutlich in ihrem Verhalten teilweise synchronisiert.

#### 4.11. Beitrag der SFB zur Knorpeldestruktion

Bereits die unstimulierte KK mit SFB führte zu einer initialen Schädigung des Knorpels, die durch Zytokinstimulation noch deutlich verstärkt wurde.

So wurde der Beitrag von unstimulierten bzw. stimulierten SFB besonders bei den Untersuchungen zum PG- und Kollagenabbau bzw. der Detektion von COMP offensichtlich. Weiterhin demonstrierten histologische Untersuchungen der 42-tägigen KK mit vitalem Knorpel bzw. der 14-tägigen KK mit avitalem Knorpel, dass RA-SFB in der Lage sind, unter Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$  die Knorpelmatrix substantiell zu schädigen und invasiv zu erodieren. Das matrixdegradierende Potential der SFB konnte durch die morphologische Destruktion des Knorpels, aber auch durch den Nachweis der Synthese der dafür verantwortlichen Proteasen (Aggrecanasen und MMP) untermauert werden.

### 5. AUSBLICK

Das in dieser Arbeit beschriebene Knorpeldestruktions-Modell liefert umfangreiche Einblicke in die molekularen Prozesse, die durch Stimulation mit den Zytokinen  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  in SFB und Chondrozyten induziert werden. Das etablierte KK-Modell stellt ein wichtiges und wirkungsvolles Werkzeug für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen SFB, EZM und Chondrozyten dar. Es könnte die Basis zur Beantwortung von vielfältigen Detailfragen bezüglich der Vorgänge bei der Knorpeldestruktion bieten. Zur Aufklärung der molekularen Ursachen für die Destruktion könnte der Zusatz von Protease-Inhibitoren bzw. weiteren Zytokinen und deren Inhibitoren zum Kultur-Medium beitragen. Auch der Zusatz von verschiedenen Zelltypen während der KK (z. B. Makrophagen) bzw. der Einsatz von mit pathogenetisch relevanten Molekülen transfizierten SFB könnte dazu beitragen, den Destruktionsprozess der Knorpelmatrix in den betroffenen rheumatischen Gelenken besser zu verstehen. Weiterhin könnten die molekularen Wirkmechanismen von Medikamenten analysiert werden, die in der Therapie der RA eingesetzt werden (nicht-steroidale-Antirheumatika, Glucocorticoide, Basistherapeutika oder Biologicals). Dadurch könnte langfristig die Entwicklung neuer antirheumatischer Medikamente und die Untersuchung der Effekte dieser Medikamente auf die verschiedenen Zellen des Gelenkes ermöglicht werden.

---

**ANHANG****Ausführliche Liste der verwendeten Geräte****Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland**

Biopsiestanzen

**Clean Air Technology SA, Lausanne, Schweiz**

Laminarbox

**Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein**

Kritischpunkttrockner (BAL-TEL CPD030)

„Sputter coater“ (BAL-TEC SCD005)

**BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland**

BD-FACScan™

**BINDER, Tuttlingen, Deutschland**

Wärmeschrank

**Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland**

BIO-RAD Power Pack 300

Mini-Protean II Apparatur

Spektrophotometer Biorad 550

**Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland**

Dunkelhaube „DH-30/32“

**BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland**

FLUOStar OPTIMA Multimode Microplate Reader

**Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland**

Pipettierhilfe „accu-jet“

**B. Braun Biotech International, Melsungen**

Mikrodismembrator

**Eppendorf, Hamburg, Deutschland**

Mastercycler – „personal“ / „realplex2“

Multikanalpipette

Transferpipetten unterschiedlicher Größe

Thermomixer „comfort“

Zentrifugen – „5810 R“ / „5415 D“ / „5415 R“ / „minispin“

**Feinoptik Jena, Jena, Deutschland**

Neubauer-Zählkammer

**Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland**

Magnetrührer „MR 3001“

Taumeltisch „Polymax 1040“

Thermoschüttler „UNIMAX 1010“

**Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland**

HERAcell-Brutschrank für Zell- und Gewebekulturen

**LEICA-Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland**

Leica Ultracut E Ultramicrotome

**LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen**

Rasterelektronenmikroskop LEO 1450 VP

**Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland**

Wasserbad

**Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland**

pH-Meter „MP 220“

**Mikrom Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland**

Kryostat Mikrotom HM 500 M,

**Olympus GmbH, Hamburg**

Digitalkamera C5050

**Philips AG Hamburg, Deutschland**

Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop

**Sartorius AG, Göttingen, Deutschland**

Waagen – „KB BA 100“ / „BP 211D“ / „BL 600“

**Schubert & Weiss GmbH, München, Deutschland**

steriles Sektionsbesteck (Skalpell, chirurgische Pinzette, spitze Schere)

**Scientific Industries Inc., New York, USA**

Vortexer „Vortex Genie 2“

**Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland**

Elektrophoresekammer

**Zeiss AG, Jena, Deutschland**

Konfokales Laserscanningmikroskop LSM 510 Meta

Mikroskop „Axiovert 25“

AxioCam HRc Digitalkamera

Axiophot Mikroskop

AxioVision 3.1+4.0 Software

## **Ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel**

**Anamar Medicals, Göteborg, Schweden**

Bovine COMP-ELISA

**Bachem, Weil am Rhein, Deutschland**

MMP-Fluoreszenz-Substrat: Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub>

**BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland**

Human IL-6 ELISA OptEIA-Set

Human IL-8 ELISA OptEIA-Set

ITS TM Culture Supplement

15 ml/50 ml Röhren, BD Falcon™

Zellkulturflaschen, 12,5 cm<sup>2</sup> bis 175 cm<sup>2</sup>, BD Falcon™

6-, 48- und 96-Loch Flachboden-Platten, BD Falcon™

100 mm Zellkulturschalen, BD Falcon™

**Biomedica Corp., Foster City, USA**

Maus-anti-human Prolyl-4-hydroxylase-AK

**Biowhittaker, Walkersville, MN, USA**

Fötale Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert)

**Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA**

Anti-Biotin-AK (HRP-konjugiert)

**Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland**

Kaninchen-anti-Maus sekundärer AK (HRP-konjugiert)

Maus-anti-human CD 14 AK

Maus-IgG1-AK

Maus-IgG2a-AK

**Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland**

Maus-anti-human Thy-1-AK (Klon AS02)

**Dynal Biotech, Oslo, Norwegen**

Dynabeads® M-450 CD 14 (Klon RMO52),

Dynabeads-MPC®, Dynal Biotech

**Eppendorf, Hamburg, Deutschland**

HotMaster-*Taq*-DNA-Polymerase (5 U/μl)

96-Loch PCR-Platten

10 x Puffer HotMaster-*Taq*

Reaktionsgefäße 0,5 bis 2 ml

**Fluka Chemie, Buchs, Schweiz**

Ethidiumbromid

**Fresenius, Bad Homburg, Deutschland**

Ampuwa – Aqua inject.

**Gibco Invitrogen Corp., Karlsruhe, Deutschland**

Pferdeserum

DMEM/Nutmix F12 [DMEM/F12 (1:1)]

**Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland**

Sterile Einmalpipetten, Cellstar™

**Hollborn & Söhne GmbH & Co KG, Leipzig, Deutschland**

Eosin-Lösung

Hämatoxylin-Lösung

Lichtgrün-Lösung

Safranin-O-Lösung

**Invitek, Berlin, Deutschland**

Aggrekanase-Aktivitäts-ELISA

**Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland**

10 x BSA

DTT (0,1 M)

MgCl<sub>2</sub> (50 mM)

5 x First Strand Puffer (250 mM Tris/HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3)

10 x PCR Puffer (200 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, pH 8,4)

Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/μl)

*Taq*-DNA-Polymerase (5 U/μl)

UltraPURE Agarose

Molekulargewichtsmarker (wide range)

**Kamiya Biomedicals, Seattle, USA**

COMP-AK für Immunhistologie

**Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland**

Jung Tissue Freezing Medium

**Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland**

Deckgläschen 24 x 50 mm

Objektträger Superfrost

**Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland**

Natriumazetat,

Tween 20

Guanidinhydrochlorid

Natriumformiat

Ameisensäure

Aquatex

Kanadabalsam

Paraformaldehyd

NaOH

**Miles Inc., Elkhart, USA**

Tissue Tek Formen Cryomold<sup>®</sup> 1x1 cm,

**Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland**

Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)

DQ-Gelatine-Fluorescein

DQ-Kollagen I-Fluorescein

DQ-Kollagen IV-Fluorescein

**Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland**

F96 MAXISORB ImmunoPlate

Kryoröhrchen

**PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland**

DMEM



Geneticin

Gentamicin

HEPES

Penicillin/Streptomycin

**PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland**

rekombinantes humanes TNF- $\alpha$

rekombinantes humanes IL-1 $\beta$

**Qiagen, Hilden, Deutschland**

RNase-freie DNase I

RNeasy<sup>®</sup> Micro Kit

Proteinase K

**R&D Systems, Wiesbaden, Germany**

Human-MMP-3-ELISA DuoSet (DY513)

Maus-anti-human MMP-1-AK (Klon 36665, MAB901)

Ziege-anti-human MMP-1-AK, biotinyliert (BAF901)

Rekombinantes humanes MMP-1 (NS0, 901-MP-010)

**Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland**

dNTP (10 mM)

Kollagenase-P

Trypsin

DAPI

**Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland**

Aceton

Dimethylsulfoxid

Ethanol 96%

Isopentan

Xylol

Triton-X-100

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Gelatine

**Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA**

Ziege-anti-Kaninchen-sekundärer AK, HRP-konjugiert (sc-2004)

**Sigma-Aldrich AG, Taufkirchen, Deutschland**

Chondroitinase ABC

o-Phenylendiamin-dihydrochlorid (OPD)

N,N,N',N' – Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Ziege-anti-Maus-sekundärer AK, HRP-konjugiert (A3682)

Sigma Fast<sup>™</sup> 3,3'-Diaminobenzidin Tabletten

Trypanblau

Casein

**SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland**

1,9-Dimethylen Blau

**TECOmedical AG, Sissach, Schweiz**

C12C-ELISA

C2C-ELISA

C12C-AK für Immunhistologie

Alle weiteren nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

## **Ausführliche Liste der verwendeten Medien und Lösungen**

### **Fibroblasten-Medium (D10F+)**

DMEM mit 10% FKS, 25 mM HEPES, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 100 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Gentamicin

### **Kokulturmedium (KK-Medium)**

DMEM/F12 mit 5% FKS, ITS-Supplement 1:1000 verdünnt (Endkonz.: je 5 µg/ml Insulin und Transferrin, 5 ng/ml Selensäure), 100 µg/ml Gentamicin

### **Trypsin-Lösung (0,25%)**

Trypsin (2,5%); 1:10 in Versene verdünnt

### **Phosphate-buffered saline (PBS)**

137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,09 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,38 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4

### **ELISA-Bikarbonat-Puffer:**

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>

### **ELISA Zitratpuffer:**

21 g/l Zitronensäure; pH-Wert 4,8

### **DMB-Assay-Natriumazetat-Puffer:**

0,05 M NaAc; 0,05% Tween 20; pH 6,8

### **DMB-Assay-Guanidinhydrochlorid-Lösung:**

2,88 M Guanidinhydrochlorid gelöst in 0,05 M NaAc-Puffer

### **DMB-Reagenz:**

1,9-Dimethylen Blau (16 µg/ml); 0,03 M Natriumformiat; 0,2% Ameisensäure; pH 6,8

### **Zymografie-Trenngelpuffer**

1,5 M Tris/HCl; pH-Wert: 8,8

### **Zymografie-Sammelgelpuffer**

0,5 M Tris/HCl; pH-Wert: 6,8

**Zymografie-Elektrophoresepuffer**

25 mM Tris-HCl; pH 8,3; 0,1% SDS; 192 mM Glycin

**Zymografie-5x Probenpuffer**

1,5 M Tris-HCl; pH 6,8; 10% Glycerol; 2% SDS; 5% Bromphenolblau

**Zymografie-Inkubationpuffer**

100 mM Tris-HCl; 30 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,02% Natriumazid; pH 7,8

**Zymografie-Coomassie-Blau-Lösung**

10% Essigsäure; 50% Methanol; 0,25% Coomassie-Blue G250

**Zymografie-Entfärber**

25% Methanol; 7% Essigsäure

***In situ*-Zymografie Inkubationspuffer**

100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,05% Brij35; 1 μM ZnCl<sub>2</sub>; pH 7,5

**Gesamt-MMP-Assay-Reaktionspuffer**

100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 30 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,05% Brij; 0,01% Natriumazid; pH 7,6

**APMA-Stammlösung:**

100 mM Tris-HCl; 20 mM APMA; 5% DMSO; pH 8,8

**DAB Substrat**

(Färbetabletten in 1 ml dH<sub>2</sub>O)

**AEC Substrat:**

4 mg 3-Amino-9 Ethylcarbazol in 1 ml DMF

14 ml 0,1 M Azetatpuffer (210 ml 0,1 N Essigsäure+790 ml 0,1 M Na-Azetat) pH 5,2

0,15 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**FastBlue-BB Substrat**

3 mg Naphtol-AS-Mx-Phosphat in 200 μl DMF zu 10 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,4) mit 2,4 mg Levamisol und 10 mg Fast Blue BB Salz

**DNA-Auftragspuffer:** 50% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau in TBE

**TBE-Puffer:** 89 mM Tris-HCl; 89 mM Borsäure; 25 mM EDTA

Tabelle 1: Klinische Daten der Gewebespende

Patient	Alter* (Jahre)	Geschlecht	Dauer der Erkrankung (Jahre)	RF (Titer)	BSG 1h/2h (mm/h)	CRP (mg/l)	# der ARA Kriterien	Medikamentöse Behandlung
<b>Rheumatoide Arthritis (RA)</b>								
EB 50	46	w	1	58	16/30	5,5	4	NSAR,MTX
EB 73	68	m	8	71	90/96	48,1	6	MTX
EB 74	71	w	17	123	45/70	26,9	6	NSAR
EB 87	65	w	12	220	50/84	106,7	5	NSAR
EB 124	59	m	10	28	46/91	53,6	7	NSAR
<b>Osteoarthrose (OA)</b>								
EB 81	56	w	3	<10	14/24	4,3	0	-
EB 102	73	w	8	<10	20/36	3,8	0	NSAR
EB 119	69	m	3	0	67/77	9,1	0	NSAR
EB 185	74	w	5	14	17/33	3,8	0	NSAR
EB 187	74	w	5	<10	6/11	1,2	0	-
EB 190	56	m	5	<10	6/9	0,5	1	NSAR

\* zum Zeitpunkt der Operation; m: männlich; w: weiblich; RF: Rheumafaktor (positiv  $\geq 10$ ); BSG: Blutkörperchen-Senkungs-Geschwindigkeit; CRP: C-reaktives Protein (normal  $\leq 5$  mg/ml); ARA: American Rheumatism Association (heute: American College of Rheumatism); n. u.: nicht untersucht; NSAR: Nichtsteroidale Antirheumatika; MTX: Methotrexat

**Tabelle 2: Bedingungen und Primersequenzen für die „real-time“ RT-PCR der humanen Gene.** Alle Primer wurden von Dr. E. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie (FSU Jena) synthetisiert. Die Primersequenzen von MMP-3 und MMP-13 stammen aus {152}, die für TIMP-1 aus {410}

Gen	Primer upstream (5'→3')	Primer down-stream (3'→5')	Produkt in bp	Amplifikationsprotokoll (Zyklen: 40)		Schmelzkurvenprotokoll	
Aldolase	5'-TCATCCTCTTC CATGAGACACTCTA -3'	5'ATTCTGCTGGCAGA TACTGGCATAA -3'	314	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 58°C 4) 8 s bei 83°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 63°C
MMP-1	5'-GACCTGGAG GAAATCTTGC -3'	5'-GTTAGCTTA CTGTCACACGC -3'	322	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 58°C 4) 8 s bei 81°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 53°C
MMP-2	5'-CTTTGCTGGA GACAAATTCTGG -3'	5'-GTCCTTCTC TAGTTCTCCAGGC -3'	312	1) 10 s bei 95°C 3) 35 s bei 68°C	2) 10 s bei 58°C 4) 8 s bei 85°C	5) 5 s bei 95°C 7) 10 min bis 95°C	6) 10 s auf 63°C
MMP-3	5'-CTCACAGAC CTGACTCGGTT -3'	5'-CACGCCTGA AGGAAGAGATG -3'	293	1) 20 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 58°C 4) 8 s bei 76°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 63°C
MMP-9	5'-CGTGAACAT CTTCGACGCCATC -3'	5'-CAGCTTGTC CAGACGCCTCG -3'	262	1) 10 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 10 s bei 58°C 4) 8 s bei 85°C	5) 5 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 15 s auf 63°C
MMP-13	5'-CTATGGTCCA GGAGATGAAG -3'	5'-AGAGTCTTG CCTGTATCCTC -3'	390	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 62°C 4) 8 s bei 76°C	5) 5 s bei 95°C 7) 10 min bis 95°C	6) 15 s auf 63°C
TIMP-1	5'-CTTCTGGCA TCCTGTTGTTG -3'	5'-AGAAGGCCGT CTGTGGGT -3'	83	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 60°C 4) 8 s bei 77°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 58°C
IL-6	5'-ATGAACTCC TTCTCCACAAGCG -3'	5'-CTCCTTTCT CAGGGCTGAG -3'	199	1) 20 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 10 s bei 62°C 4) 8 s bei 81°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 58°C
IL-8	5'-GCCAAGAG AATATCCGAACT -3'	5'-AGGCACAGTG GAACAAGGACTTGT -3'	200	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 60°C 4) 8 s bei 73°C	5) 5 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 53°C
ADAMTS-4	5'-TCCTGCAAC ACTGAGGACTG -3'	5'-CGTGGCTCC AGCACATAGTA -3'	209	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 62°C 4) 8 s bei 83°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 67°C
ADAMTS-5	5'-GCTACTGCA CAGGGAAGAGG -3'	5'-TGCATATTTG GGAACCCATT -3'	161	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 58°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95	6) 10 s auf 63°C

1) Denaturierung

2) Primer Anlagerung

3) Amplifikation

4) zusätzl. Heizschritt zum Abschmelzen von Primerdimeren

5) Denaturierung

6) Kühlung

7) Erhitzen

**Tabelle 3: Bedingungen und Primersequenzen für die „real-time“ RT-PCR der bovinen Gene.** Alle Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert.

Gen	Primer upstream (5'→3')	Primer down stream (3'→5')	Produkt in bp	Amplifikationsprotokoll (Zyklen: 40)		Schmelzkurvenprotokoll	
Aldolase	5'-TCATCCTCTTC CATGAGACTCTA -3'	5'-ATTCTGCTGGC AGATACTGGCATAA -3'	314	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 58°C 4) 8 s bei 83°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 63°C
MMP-1	5'-CAAGAGCAG ATGTGGACCAA -3'	5'-CTGGTTGAAAA GCATGAGCA -3'	186	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
MMP-2	5'-CTGGTGTCCA GAAGTGGAT -3'	5'-TAGGCGCC CTTGAAGAAGTA -3'	220	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
MMP-3	5'-TGTGCTCA GCCTATCCACTG -3'	5'-AGCTTTCC TGTCACCTCCAA -3'	196	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
MMP-9	5'-AGAGAGCAC GGAGATGGGTA -3'	5'-TCAAAGGTGA AGGGGAAGTG -3'	194	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
MMP-13	5'-CATGAGTTT GGCCATTCCTT -3'	5'-GGCGTTTTGG GATGTTTAGA -3'	179	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
TIMP-1	5'-CTGCGGATAC TTCCACAGGT -3'	5'-ATGGATGAG CAGGGAAACAC -3'	198	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
IL-6	5'-ATGAACTC CCGCTTCACAAG -3'	5'-CCTTGCTGC TTTCACACTCA -3'	247	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
IL-8	5'-TGCTCTCTG CAGCTCTGTGT -3'	5'-CAGACCTCG TTTCATTGGT -3'	190	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 64°C 4) 8 s bei 76°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 69°C
ADAMTS-4	5'-GAAGCAATG CACTGGTCTGA -3'	5'-CTAGGAGA CAGTGCCCGAAG -3'	155	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
ADAMTS-5	5'-CTCCCATGAC GATTCCAAGT -3'	5'-TACCGTGACC ATCATCCAGA -3'	155	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C
Kollagen II	5'-CATCTGGTTTG GAGAAACCATC -3'	5'-GCCCAGTTCA GGTCTCTTAG -3'	600	1) 15 s bei 95°C 3) 20 s bei 68°C	2) 15 s bei 61°C 4) 8 s bei 78°C	5) 1 s bei 95°C 7) 20 min bis 95°C	6) 10 s auf 66°C

1) Denaturierung

2) Primer Anlagerung

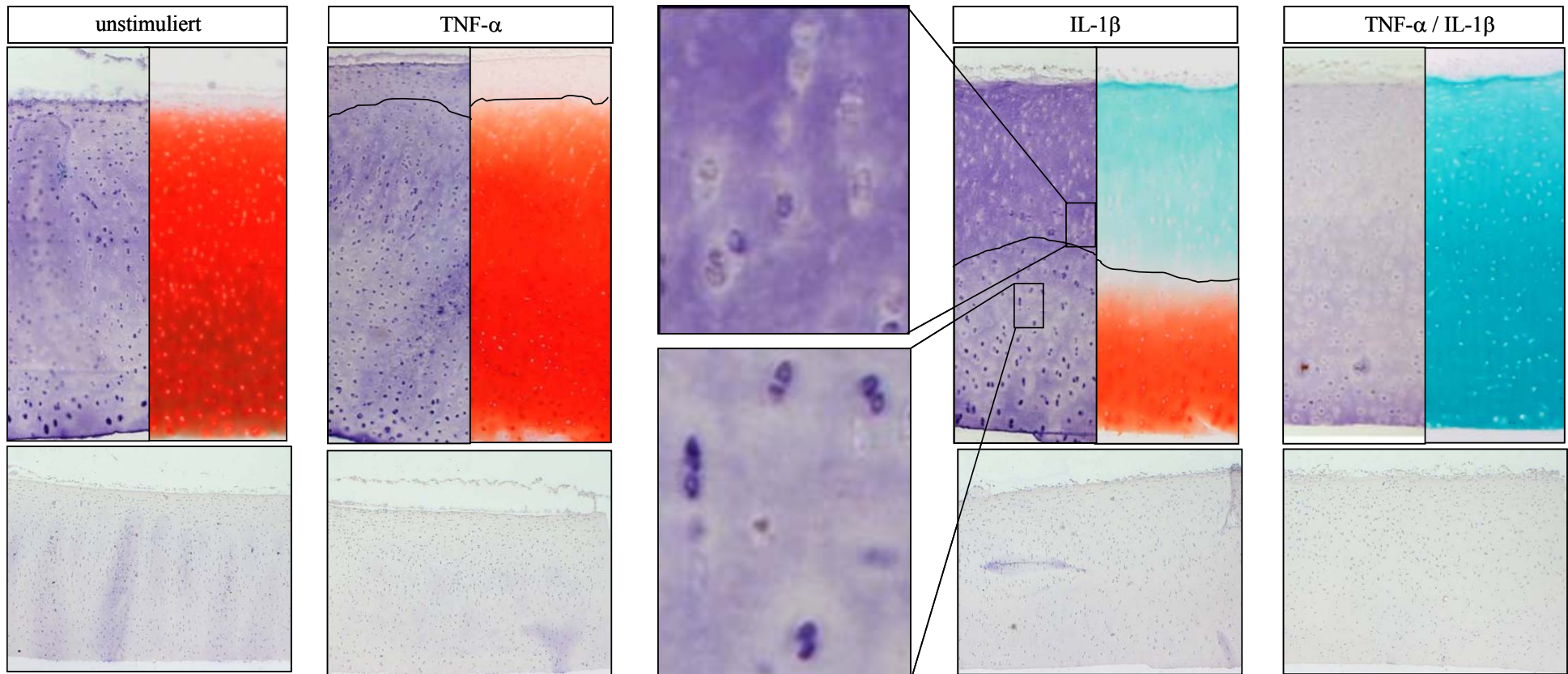
3) Amplifikation

4) zusätzl. Heizschritt zum Abschmelzen von Primerdimeren

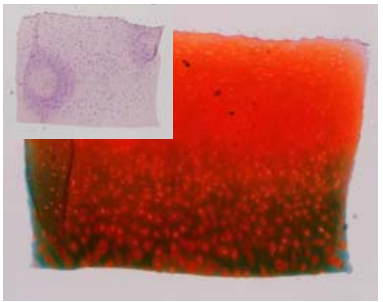
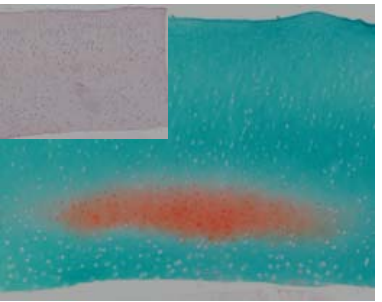
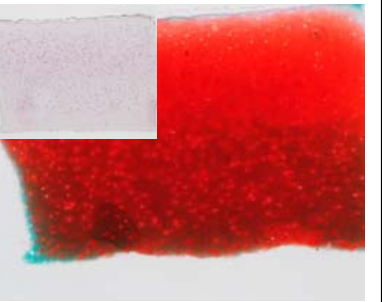
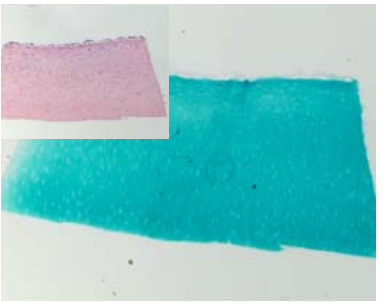
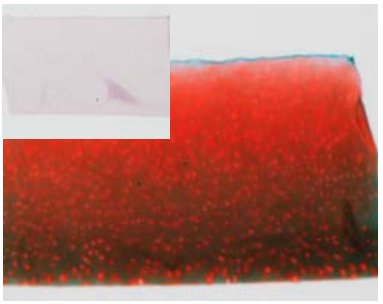
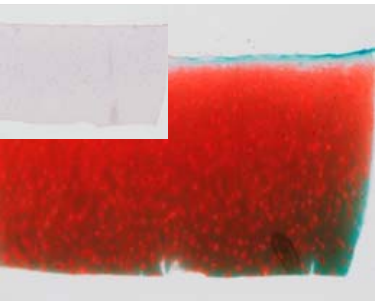
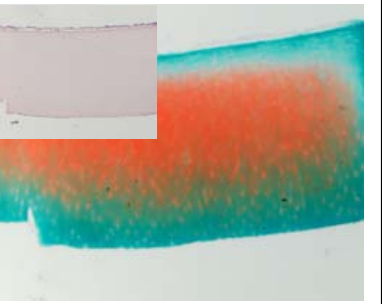
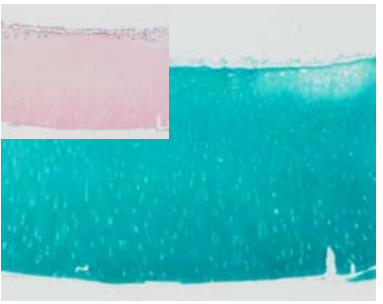
5) Denaturierung

6) Kühlung

7) Erhitzen



**Vergrößerte Darstellung von Abbildung 19 18: Immunhistochemische Darstellung von intaktem neugebildeten Aggrekan und histologische PG-Färbung in Knorpelproben.** Dargestellt sind histologische Schnittpräparate von Knorpelproben nach 14 d KK mit RA-SFB. Im jeweils linken Bildausschnitt ist die immunhistologische Färbung für intaktes neugebildetes Aggrekan und im rechten Bildausschnitt der dazugehörige Serienschchnitt des gleichen Präparates mit Safranin-O/Lichtgrün Färbung abgebildet. Bei der mit IL-1 $\beta$  stimulierten Probe sind zusätzlich digitale Ausschnittsvergrößerungen dargestellt. Die Isotypkontrolle ist als verkleinerte Aufnahme unter den immunhistologischen Färbungen abgebildet. Originalvergrößerungen: 40 x für die immunhistologische Aggrekanfärbung, die Safranin-O-Färbung und die Hämatoxylin-Färbung der Isotypkontrollen; die digitale Ausschnittsvergrößerung entspricht einer 300 x Originalvergrößerung.

	Knorpel MK		Knorpel KK mit RA-SFB	
	unstimuliert	TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$	unstimuliert	TNF- $\alpha$ /IL-1 $\beta$
vitale Chondrozyten				
inaktivierte Chondrozyten				

**Vergrößerte Darstellung von Abbildung 19: Einfluss der An- bzw. Abwesenheit vitaler Chondrozyten auf den PG-Abbau.** Histologische Analyse des PG-Verlustes mittels Safranin-O-/Lichtgrün-Färbung der Knorpel MK und der KK mit RA-SFB mit vitalem sowie eingefrorenem Knorpel nach einer Gesamtkultivierungszeit von 14 d.



---

## Literaturverzeichnis

1. Distler O, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Gay RE, Gay S: **Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects.** *Med Klin (Munich)* 1999, **94**: 673-680.
2. Laufer S, Gay S, Brune K: *Rheumatische Erkrankungen und Entzündungen. Von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie. 2.Auflage.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.
3. Goebell H, Wagner I: **Entzündlich-rheumatische Krankheiten. In: Rheumatoide Arthritis.** Berlin: Walter de Gruyter & Co; 1992.
4. Rau R: *Basistherapie der rheumatoiden Arthritis. 1. Auflage.* Bremen: Uni-Medscience; 2000.
5. Goronzy JJ, Weyand CM: **Rheumatoid arthritis: epidemiology, pathology, pathogenesis.** In: *Primer on the rheumatic diseases.* Edited by Klippel JH, Weyand CM, Wortmann RL. Atlanta: Arthritis Foundation; 1997:155-161.
6. Bernhard J, Villiger PM: **Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie.** *Schweiz Med Forum* 2001, **8**: 179-183.
7. Pschyrembel: *Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, 258 edn.* Walter de Gruyter; 1998.
8. Smolen JS, Steiner G: **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**: 473-488.
9. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al.*: **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**: 315-324.
10. Harris ED, Jr.: **Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy.** *N Engl J Med* 1990, **322**: 1277-1289.
11. Mitterski B, Drynda S, Boschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J *et al.*: **Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis.** *BMC Genet* 2004, **5**: 2.
12. Franklin EC, Molman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG: **An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis.** *J Exp Med* 1957, **105**: 425-438.
13. Zvaifler NJ, Firestein GS: **Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**: 783-789.
14. Bang H, Mollenhauer J, Schulmeister A, Nager C, van Eden W, Wand-Wurtttenberger A *et al.*: **Isolation and characterization of a cartilage-specific membrane antigen (CH65): comparison with cytokeratins and heat-shock proteins.** *Immunology* 1994, **81**: 322-329.
15. Union A, Meheus L, Humbel RL, Conrad K, Steiner G, Moereels H *et al.*: **Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**: 1185-1195.
16. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR: **Macrophages in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res* 2000, **2**: 189-202.
17. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R: **Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 1990, **144**: 3347-3353.
18. Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC *et al.*: **Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in**

- patients with early rheumatoid arthritis.** *Nat Med* 1995, **1**: 448-452.
19. Lee YH, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG: **Functional polymorphisms in matrix metalloproteinase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 and rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol* 2003, **32**: 235-239.
  20. Han Z, Boyle DL, Shi Y, Green DR, Firestein GS: **Dominant-negative p53 mutations in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 1088-1092.
  21. Henderson B, Pettipher ER: **The synovial lining cell: biology and pathobiology.** *Semin Arthritis Rheum* 1985, **15**: 1-32.
  22. Firestein GS: **Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors?** *Arthritis Rheum* 1996, **39**: 1781-1790.
  23. Alsalameh S, Winter K, Al Ward R, Wendler J, Kalden JR, Kinne RW: **Distribution of TNF-alpha, TNF-R55 and TNF-R75 in the rheumatoid synovial membrane: TNF receptors are localized preferentially in the lining layer; TNF-alpha is distributed mainly in the vicinity of TNF receptors in the deeper layers.** *Scand J Immunol* 1999, **49**: 278-285.
  24. Stuhlmüller B, Kunisch E, Franz J, Martínez-Gamboa L, Hernández MM, Pruss A *et al.*: **Detection of oncofetal h19 RNA in rheumatoid arthritis synovial tissue.** *Am J Pathol* 2003, **163**: 901-911.
  25. Sweeney SE, Firestein GS: **Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**: 372-378.
  26. Franz JK, Kolb SA, Hummel KM, Lahrtz F, Neidhart M, Aicher WK *et al.*: **Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis.** *Eur J Immunol* 1998, **28**: 2661-2671.
  27. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP: **Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation.** *Am J Pathol* 1997, **151**: 317-322.
  28. Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ: **Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13).** *FEBS Lett* 1996, **380**: 17-20.
  29. Fosang AJ, Last K, Neame PJ, Murphy G, Knauper V, Tschesche H *et al.*: **Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan.** *Biochem J* 1994, **304 ( Pt 2)**: 347-351.
  30. Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F: **Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis.** *Rheumatol Int* 1993, **13**: 45-51.
  31. Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U *et al.*: **Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture--primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells.** *Arthritis Res* 2001, **3**: 72-76.
  32. Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F: **Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1995, **54**: 501-504.
  33. Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R, Lipsky PE: **Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells In vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model in vivo.** *J Clin Invest* 1998, **101**: 1261-1272.
  34. Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G: **Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1995, **22**: 1624-1630.
  35. Keyszer GM, Heer AH, Gay S: **Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis.** *Stem Cells* 1994, **12**: 75-86.

36. Firestein GS: **Rheumatoid synovitis and pannus**. In *Rheumatology*. Edited by Klippel JH, Dieppe PA. London: Mosby; 1998:1-24.
37. Fassbender HG: **Histomorphological basis of articular cartilage destruction in rheumatoid arthritis**. *Coll Relat Res* 1983, **3**: 141-155.
38. Gay S, Gay RE, Koopman WJ: **Molecular and cellular mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction?** *Ann Rheum Dis* 1993, **52 Suppl 1**: S39-S47.
39. Kunisch E, Pohlers D, Dunger S, Huber R, Kreusch A, Wiederanders B *et al.*: **What can experimental research offer to rheumatology today - the viewpoint of molecular biology? Contribution of molecular biology to pathogenesis research in rheumatology using the example of rheumatoid arthritis**. *Z Rheumatol* 2002, **61 Suppl 2**: III-III5.
40. Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE *et al.*: **Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice**. *Am J Pathol* 1996, **149**: 1607-1615.
41. Arend WP: **The pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis**. *Arthritis Rheum* 1997, **40**: 595-597.
42. Hirth A, Skapenko A, Kinne RW, Emmrich F, Schulze-Koops H, Sack U: **Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis**. *Arthritis Res* 2002, **4**: 117-125.
43. Ritchlin C: **Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis**. *Arthritis Res* 2000, **2**: 356-360.
44. Huber R, Kunisch E, Gluck B, Egerer R, Sickinger S, Kinne RW: **[Comparison of conventional and real-time RT-PCR for the quantitation of jun protooncogene mRNA and analysis of junB mRNA expression in synovial membranes and isolated synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients]**. *Z Rheumatol* 2003, **62**: 378-389.
45. Kinne RW, Boehm S, Iftner T, Aigner T, Vornehm S, Weseloh G *et al.*: **Synovial fibroblast-like cells strongly express jun-B and C-fos proto-oncogenes in rheumatoid- and osteoarthritis**. *Scand J Rheumatol Suppl* 1995, **101**: 121-125.
46. Sano H, Forough R, Maier JA, Case JP, Jackson A, Engleka K *et al.*: **Detection of high levels of heparin binding growth factor-1 (acidic fibroblast growth factor) in inflammatory arthritic joints**. *J Cell Biol* 1990, **110**: 1417-1426.
47. Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S: **Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts**. *Rheumatol Int* 1992, **12**: 53-59.
48. Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S: **Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction**. *Arthritis Res* 2000, **2**: 59-64.
49. Bombara MP, Webb DL, Conrad P, Marlor CW, Sarr T, Ranges GE *et al.*: **Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines**. *J Leukoc Biol* 1993, **54**: 399-406.
50. Fassbender HG, Simmling-Annefeld M: **The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis**. *J Pathol* 1983, **139**: 399-406.
51. Johansson B, Heim S, Mandahl N, Mertens F, Mitelman F: **Trisomy 7 in nonneoplastic cells**. *Genes Chromosomes Cancer* 1993, **6**: 199-205.

52. Kinne RW, Liehr T, Beensen V, Kunisch E, Zimmermann T, Holland H *et al.*: **Mosaic chromosomal aberrations in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other inflammatory joint diseases.** *Arthritis Res* 2001, **3**: 319-330.
53. Mertens F, Orndal C, Mandahl N, Heim S, Bauer HF, Rydholm A *et al.*: **Chromosome aberrations in tenosynovial giant cell tumors and nontumorous synovial tissue.** *Genes Chromosomes Cancer* 1993, **6**: 212-217.
54. Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL: **Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids.** *J Clin Invest* 1989, **83**: 1267-1276.
55. Ghadially FN: **Articular cartilage.** In *Fine structure of synovial joints. A text and atlas of the ultrastructure of normal and pathological articular tissues.* Edited by Ghadially FN. London: Butterworths; 1983.
56. Van Sickle DC, Kincaid SA: **Comparative Arthroscopy.** In *The Joints and Synovial Fluid.* Edited by Sokoloff L. New York: Academic Press; 1978:1-47.
57. Hamerman D: **The biology of osteoarthritis.** *N Engl J Med* 1989, **320**: 1322-1330.
58. Stockwell RA: **The Chondrocytes.** In *Articular Cartilage.* Edited by Freeman MAR. Tunbridge Wells; 1979:69-144.
59. Kuettner KE: **Biochemistry of articular cartilage in health and disease.** *Clin Biochem* 1992, **25**: 155-163.
60. Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB: **Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints.** *J Orthop Res* 1999, **17**: 110-120.
61. Warman ML: **Human genetic insights into skeletal development, growth, and homeostasis.** *Clin Orthop Relat Res* 2000, S40-S54.
62. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V *et al.*: **The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth.** *J Clin Invest* 2005, **115**: 622-631.
63. Jay GD, Torres JR, Rhee DK, Helminen HJ, Hytinen MM, Cha CJ *et al.*: **Association between friction and wear in diarthrodial joints lacking lubricin.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**: 3662-3669.
64. Jay GD, Torres JR, Warman ML, Laderer MC, Breuer KS: **The role of lubricin in the mechanical behavior of synovial fluid.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**: 6194-6199.
65. Mohr W: *Gelenkkrankheiten.* Georg Thieme Verlag; 1984.
66. Venn MF: **Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation.** *Ann Rheum Dis* 1979, **38**: 57-62.
67. Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ: **Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage.** *J Orthop Res* 1996, **14**: 681-689.
68. Akizuki S, Mow VC, Muller F, Pita JC, Howell DS, Manicourt DH: **Tensile properties of human knee joint cartilage: I. Influence of ionic conditions, weight bearing, and fibrillation on the tensile modulus.** *J Orthop Res* 1986, **4**: 379-392.

69. Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M: **The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans.** *Biochim Biophys Acta* 1973, **297**: 456-472.
70. Keene DR, Engvall E, Glanville RW: **Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network.** *J Cell Biol* 1988, **107**: 1995-2006.
71. Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Tang LH, Choi H, Rosenberg L: **Localization of proteoglycan monomer and link protein in the matrix of bovine articular cartilage: An immunohistochemical study.** *J Histochem Cytochem* 1980, **28**: 621-635.
72. Poole AR, Webber C, Pidoux I, Choi H, Rosenberg LC: **Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues.** *J Histochem Cytochem* 1986, **34**: 619-625.
73. Inoue H, Takeda T: **Three-dimensional observation of collagen framework of lumbar intervertebral discs.** *Acta Orthop Scand* 1975, **46**: 949-956.
74. Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Rosenberg L: **An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage.** *J Cell Biol* 1982, **93**: 921-937.
75. Poole AR: **Cartilage in Health and Disease.** In *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Edited by Koopman WJ. New York: Lippincott Williams; 2001:2260-2284.
76. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S: **Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair.** *Clin Orthop Relat Res* 2001, **S26-S33**.
77. Ostergaard K, Salter DM: **Immunohistochemistry in the study of normal and osteoarthritic articular cartilage.** *Prog Histochem Cytochem* 1998, **33**: 93-165.
78. Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegard D *et al.*: **Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.** *J Biol Chem* 1997, **272**: 14120-14126.
79. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegard D *et al.*: **Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX.** *J Biol Chem* 2001, **276**: 6083-6092.
80. Halasz K, Kassner A, Morgelin M, Heinegard D: **COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis.** *J Biol Chem* 2007, **282**: 31166-31173.
81. Bruckner P, Mendler M, Steinmann B, Huber S, Winterhalter KH: **The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils.** *J Biol Chem* 1988, **263**: 16911-16917.
82. Wu JJ, Woods PE, Eyre DR: **Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 23007-23014.
83. Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P: **Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI.** *J Cell Biol* 1989, **108**: 191-197.
84. Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, LaMantia C, Carroll H: **Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican.** *J Cell Biol* 1998, **141**: 1277-1286.

85. Hedbom E, Heinegard D: **Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens.** *J Biol Chem* 1993, **268**: 27307-27312.
86. Benninghoff A: **Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen und Funktionen. Zweiter Teil: Der Feinbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion.** *Z Zellforsch* 1925, 783-862.
87. Hunziker EB, Hermann W: **Ultrastructure of Cartilage.** In *Ultrastructure of Skeletal Tissues - Bones and Cartilage in Health and Disease*. Edited by Bonucci E, Motta PM. Norwell: Kluwer Academic Pub; 1990:79-110.
88. Hardingham TE, Fosang AJ: **Proteoglycans: many forms and many functions.** *FASEB J* 1992, **6**: 861-870.
89. Roughley PJ, Lee ER: **Cartilage proteoglycans: structure and potential functions.** *Microsc Res Tech* 1994, **28**: 385-397.
90. Poole AR: **Proteoglycans in health and disease: structures and functions.** *Biochem J* 1986, **236**: 1-14.
91. Hardingham TE, Fosang AJ, Dudhia J: **Aggrecan, the Chondroitin Sulfate/Keratan Sulfate Proteoglycan from Cartilage, Articular Cartilage and Osteoarthritis-Workshop Conference Hoechst Werk Kalle-Albert 2003.**
92. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D: **Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon.** *Biochem J* 1984, **223**: 587-597.
93. Miosge N, Flachsbarth K, Goetz W, Schultz W, Kresse H, Herken R: **Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage.** *Histochem J* 1994, **26**: 939-945.
94. Knudson CB, Knudson W: **Cartilage proteoglycans.** *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2001, **12**: 69-78.
95. Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS: **Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**: 101-113.
96. Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA *et al.*: **Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 45539-45545.
97. Fischer DC: *Isolierung, biochemische und immunochemische Charakterisierung der Proteoglycane des humanen Gelenkknorpels.* Rheinisch-Westfälische TH Aachen; 1992.
98. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D: **COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 22346-22350.
99. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E *et al.*: **Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 6132-6136.
100. DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M: **Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon.** *FEBS Lett* 1994, **354**: 237-240.
101. Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Chen FS, Leslie M, Perris R: **Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium.** *FEBS Lett* 1997, **412**: 249-252.

102. Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ: **Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation.** *Br J Rheumatol* 1997, **36**: 1151-1160.
103. Mansson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR *et al.*: **Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism.** *J Clin Invest* 1995, **95**: 1071-1077.
104. Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T: **Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis.** *Br J Rheumatol* 1992, **31**: 593-598.
105. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB, Dragomir AD, Luta G *et al.*: **Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 2356-2364.
106. Petersson IF, Boegard T, Svensson B, Heinegard D, Saxne T: **Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**: 46-50.
107. Petersson IF, Boegard T, Dahlstrom J, Svensson B, Heinegard D, Saxne T: **Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1998, **6**: 33-39.
108. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A *et al.*: **Matrix metalloproteinases: a review.** *Crit Rev Oral Biol Med* 1993, **4**: 197-250.
109. Visse R, Nagase H: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circ Res* 2003, **92**: 827-839.
110. Baker AH, Edwards DR, Murphy G: **Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.** *J Cell Sci* 2002, **115**: 3719-3727.
111. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr.: **Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage.** *J Clin Invest* 1989, **84**: 678-685.
112. McKee CM, Lowenstein CJ, Horton MR, Wu J, Bao C, Chin BY *et al.*: **Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism.** *J Biol Chem* 1997, **272**: 8013-8018.
113. Tremble PM, Damsky CH, Werb Z: **Fibronectin fragments, but not intact fibronectin, signalling through the fibronectin receptor induce metalloproteinase gene expression in fibroblasts.** *Matrix Suppl* 1992, **1**: 212-214.
114. Damsky CH, Werb Z: **Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information.** *Curr Opin Cell Biol* 1992, **4**: 772-781.
115. Yasuda T, Poole AR: **A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**: 138-148.
116. Bewsey KE, Wen C, Purple C, Homandberg GA: **Fibronectin fragments induce the expression of stromelysin-1 mRNA and protein in bovine chondrocytes in monolayer culture.** *Biochim Biophys Acta* 1996, **1317**: 55-64.
117. Jennings L, Wu L, King KB, Hammerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J: **The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes.** *Connect*

- Tissue Res* 2001, **42**: 71-86.
118. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I *et al.*: **Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium.** *Lab Invest* 1992, **66**: 680-690.
  119. 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* 2001, **114**: 3813-3822.
  120. Nagase H: **Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.** *Biol Chem* 1997, **378**: 151-160.
  121. Murphy G, Knauper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M *et al.*: **Matrix metalloproteinases in arthritic disease.** *Arthritis Res* 2002, **4 Suppl 3**: S39-S49.
  122. Pei D, Weiss SJ: **Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.** *Nature* 1995, **375**: 244-247.
  123. English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A *et al.*: **Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 14046-14055.
  124. Imai K, Ohta S, Matsumoto T, Fujimoto N, Sato H, Seiki M *et al.*: **Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage.** *Am J Pathol* 1997, **151**: 245-256.
  125. Benbow U, Brinckerhoff CE: **The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about?** *Matrix Biol* 1997, **15**: 519-526.
  126. Mitchell PG, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ *et al.*: **Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage.** *J Clin Invest* 1996, **97**: 761-768.
  127. Kojima T, Mwale F, Yasuda T, Girard C, Poole AR, Lavery S: **Early degradation of type IX and type II collagen with the onset of experimental inflammatory arthritis.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**: 120-127.
  128. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C *et al.*: **Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage.** *J Clin Invest* 1997, **99**: 1534-1545.
  129. Mohtai M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FM, Hutchinson NI *et al.*: **Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1.** *J Clin Invest* 1993, **92**: 179-185.
  130. Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Janusz MJ, Bohne R, Wang-Weigand S *et al.*: **Matrix metalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation.** *Matrix Biol* 2002, **21**: 271-288.
  131. Flannery CR, Lark MW, Sandy JD: **Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. Evidence for proteolysis at this site in vivo in human articular cartilage.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 1008-1014.
  132. Fosang AJ, Neame PJ, Hardingham TE, Murphy G, Hamilton JA: **Cleavage of cartilage proteoglycan between G1 and G2 domains by stromelysins.** *J Biol Chem* 1991, **266**: 15579-15582.
  133. Fosang AJ, Last K, Knauper V, Neame PJ, Murphy G, Hardingham TE *et al.*: **Fibroblast and**



- neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain.** *Biochem J* 1993, **295 ( Pt 1)**: 273-276.
134. Fosang AJ, Last K, Stanton H, Weeks DB, Campbell IK, Hardingham TE *et al.*: **Generation and novel distribution of matrix metalloproteinase-derived aggrecan fragments in porcine cartilage explants.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 33027-33037.
135. Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C *et al.*: **Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro.** *Biochem J* 1999, **344 Pt 1**: 61-68.
136. Sandy JD: **A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolytic.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**: 95-100.
137. Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE: **Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**: 585-594.
138. Rannou F, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F: **Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* 2006, **73**: 29-36.
139. Morel J, Berenbaum F: **Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* 2004, **71**: 503-510.
140. Garrington TP, Johnson GL: **Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *Curr Opin Cell Biol* 1999, **11**: 211-218.
141. Vincenti MP, Brinckerhoff CE: **Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors.** *Arthritis Res* 2002, **4**: 157-164.
142. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K: **The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway.** *Nature* 1999, **398**: 252-256.
143. Firestein GS, Manning AM: **Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 609-621.
144. Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE: **Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**: 801-811.
145. Miller C, Zhang M, He Y, Zhao J, Pelletier JP, Martel-Pelletier J *et al.*: **Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 gene by okadaic acid inhibition of phosphatase activity in human chondrocytes: co-stimulation of AP-1 and CRE nuclear binding proteins.** *J Cell Biochem* 1998, **69**: 392-413.
146. Barchowsky A, Frleta D, Vincenti MP: **Integration of the NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the collagenase-1 promoter: divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts.** *Cytokine* 2000, **12**: 1469-1479.
147. Tak PP, Firestein GS: **NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.** *J Clin Invest* 2001, **107**: 7-11.
148. Apte SS, Olsen BR, Murphy G: **The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases**

- (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family.** *J Biol Chem* 1995, **270**: 14313-14318.
149. Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K: **TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5).** *J Biol Chem* 2001, **276**: 12501-12504.
150. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y: **Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4).** *FEBS Lett* 2001, **494**: 192-195.
151. 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* 2003, **555**: 431-436.
152. Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J *et al.*: **Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1999, **58**: 691-697.
153. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR: **The ADAMTS metalloproteinases.** *Biochem J* 2005, **386**: 15-27.
154. Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I *et al.*: **Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4).** *J Biol Chem* 2000, **275**: 18566-18573.
155. Dickinson SC, Vankemmelbeke MN, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegard D, Hollander AP: **Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs.** *Matrix Biol* 2003, **22**: 267-278.
156. Hughes CE, Little CB, Buttner FH, Bartnik E, Caterson B: **Differential expression of aggrecanase and matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 30576-30582.
157. Ilic MZ, Vankemmelbeke MN, Holen I, Buttle DJ, Clem RH, Handley CJ: **Bovine joint capsule and fibroblasts derived from joint capsule express aggrecanase activity.** *Matrix Biol* 2000, **19**: 257-265.
158. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC *et al.*: **Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta.** *J Immunol* 2002, **168**: 1405-1412.
159. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B: **Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **260**: 318-322.
160. Lohmander LS, Neame PJ, Sandy JD: **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* 1993, **36**: 1214-1222.
161. Kuno K, Okada Y, Kawashima H, Nakamura H, Miyasaka M, Ohno H *et al.*: **ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan.** *FEBS Lett* 2000, **478**: 241-245.
162. Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E: **The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**: 539-552.
163. Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP: **Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**: 164-174.
164. Tortorella M, Pratta M, Liu RQ, Abbaszade I, Ross H, Burn T *et al.*: **The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage.** *J Biol Chem* 2000, **275**: 25791-25797.

165. Tortorella MD, Liu RQ, Burn T, Newton RC, Arner E: **Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4).** *Matrix Biol* 2002, **21**: 499-511.
166. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD: **Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 22201-22208.
167. Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R *et al.*: **Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins.** *Science* 1999, **284**: 1664-1666.
168. Westling J, Fosang AJ, Last K, Thompson VP, Tomkinson KN, Hebert T *et al.*: **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* 2002, **277**: 16059-16066.
169. Rodriguez-Manzaneque JC, Westling J, Thai SN, Luque A, Knauper V, Murphy G *et al.*: **ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293**: 501-508.
170. Langton KP, Barker MD, McKie N: **Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 16778-16781.
171. Nagase H, Woessner JF, Jr.: **Matrix metalloproteinases.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 21491-21494.
172. Martel-Pelletier J: **Pathophysiology of osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**: 371-373.
173. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: **The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.** *Biorheology* 2002, **39**: 237-246.
174. Smeets TJ, Dolhain RJE, Miltenburg AM, de Kuiper R, Breedveld FC, Tak PP: **Poor expression of T cell-derived cytokines and activation and proliferation markers in early rheumatoid synovial tissue.** *Clin Immunol Immunopathol* 1998, **88**: 84-90.
175. Williams RO, Mason LJ, Feldmann M, Maini RN: **Synergy between anti-CD4 and anti-tumor necrosis factor in the amelioration of established collagen-induced arthritis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**: 2762-2766.
176. Burger D, Dayer JM: **Interactions between T cell plasma membranes and monocytes.** In *T cells in arthritis*. Edited by Miossec P, van den Berg WB, Firestein GS. Basel: Birkhäuser Verlag; 1998:111-128.
177. Maini RN, Brennan FM, Williams R, Chu CQ, Cope AP, Gibbons D *et al.*: **TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy.** *Clin Exp Rheumatol* 1993, **11 Suppl 8**: S173-S175.
178. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH *et al.*: **Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases.** *Nature* 1994, **370**: 555-557.
179. Thoma B, Grell M, Pfizenmaier K, Scheurich P: **Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses.** *J Exp Med* 1990, **172**: 1019-1023.
180. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B *et al.*: **The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor.** *Cell* 1995, **83**: 793-802.
181. Grell M, Zimmermann G, Hulser D, Pfizenmaier K, Scheurich P: **TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways.** *J Immunol* 1994, **153**: 1963-1972.

182. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W: **Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55.** *J Exp Med* 1993, **177**: 1277-1286.
183. Brakebusch C, Nophar Y, Kemper O, Engelmann H, Wallach D: **Cytoplasmic truncation of the p55 tumour necrosis factor (TNF) receptor abolishes signalling, but not induced shedding of the receptor.** *EMBO J* 1992, **11**: 943-950.
184. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr., Goeddel DV: **The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**: 9292-9296.
185. Butler DM, Feldmann M, Di Padova F, Brennan FM: **p55 and p75 tumor necrosis factor receptors are expressed and mediate common functions in synovial fibroblasts and other fibroblasts.** *Eur Cytokine Netw* 1994, **5**: 441-448.
186. Neidel J, Schulze M, Lindschau J: **Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis.** *Inflamm Res* 1995, **44**: 217-221.
187. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M: **Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis.** *Lancet* 1989, **2**: 244-247.
188. Saklatvala J: **Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage.** *Nature* 1986, **322**: 547-549.
189. Brennan FM, Browne KA, Green PA, Jaspar JM, Maini RN, Feldmann M: **Reduction of serum matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 3 in rheumatoid arthritis patients following anti-tumour necrosis factor-alpha (cA2) therapy.** *Br J Rheumatol* 1997, **36**: 643-650.
190. Nashed D, Luger TA: **Interleukin 1. 1: Basic principles and pathophysiology.** *Hautarzt* 1999, **50**: 680-688.
191. Burger D, Dayer JM, Palmer G, Gabay C: **Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis?** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**: 879-896.
192. Singer II, Scott S, Hall GL, Limjuco G, Chin J, Schmidt JA: **Interleukin 1 beta is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and plasma membranes of stimulated human monocytes.** *J Exp Med* 1988, **167**: 389-407.
193. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL *et al.*: **Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor.** *Nature* 1990, **343**: 336-340.
194. Arend WP, Smith MF, Jr., Janson RW, Joslin FG: **IL-1 receptor antagonist and IL-1 beta production in human monocytes are regulated differently.** *J Immunol* 1991, **147**: 1530-1536.
195. Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG *et al.*: **Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**: 6155-6159.
196. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: **The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1.** *Immunol Today* 1994, **15**: 562-566.
197. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ *et al.*: **Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**: 8946-8950.
198. Groves RW, Giri J, Sims J, Dower SK, Kupper TS: **Inducible expression of type 2 IL-1 receptors by cultured human keratinocytes. Implications for IL-1-mediated processes in epidermis.** *J Immunol* 1995, **154**: 4065-4072.

199. Eastgate JA, Symons JA, Wood NC, Grinlinton FM, di Giovine FS, Duff GW: **Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis.** *Lancet* 1988, **2**: 706-709.
200. Miyasaka N, Sato K, Goto M, Sasano M, Natsuyama M, Inoue K *et al.*: **Augmented interleukin-1 production and HLA-DR expression in the synovium of rheumatoid arthritis patients. Possible involvement in joint destruction.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**: 480-486.
201. Borghaei RC, Rawlings PL, Jr., Mochan E: **Interleukin-4 suppression of interleukin-1-induced transcription of collagenase (MMP-1) and stromelysin 1 (MMP-3) in human synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 1398-1406.
202. DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K, Martel-Pelletier J: **Coordinate regulation of matrix metalloproteases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts.** *J Rheumatol Suppl* 1995, **43**: 123-128.
203. Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Firestein GS: **Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes.** *J Clin Invest* 1990, **86**: 1790-1798.
204. Dayer JM, de Rochemonteix B, Burrus B, Demczuk S, Dinarello CA: **Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells.** *J Clin Invest* 1986, **77**: 645-648.
205. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB: **Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**: 797-809.
206. Van Lent PL, van de Loo FA, Holthuysen AE, Van Den Bersselaar LA, Vermeer H, van den Berg WB: **Major role for interleukin 1 but not for tumor necrosis factor in early cartilage damage in immune complex arthritis in mice.** *J Rheumatol* 1995, **22**: 2250-2258.
207. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P *et al.*: **Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 2196-2204.
208. Champion GV, Lebsack ME, Lookabaugh J, Gordon G, Catalano M: **Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. The IL-1Ra Arthritis Study Group.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**: 1092-1101.
209. Muller-Ladner U, Roberts CR, Franklin BN, Gay RE, Robbins PD, Evans CH *et al.*: **Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective.** *J Immunol* 1997, **158**: 3492-3498.
210. Cameron M, Buchgraber A, Passler H, Vogt M, Thonar E, Fu F *et al.*: **The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations.** *Am J Sports Med* 1997, **25**: 751-754.
211. Hopkins SJ, Humphreys M, Jayson MI: **Cytokines in synovial fluid. I. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1.** *Clin Exp Immunol* 1988, **72**: 422-427.
212. Westacott CI, Whicher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA: **Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases.** *Ann Rheum Dis* 1990, **49**: 676-681.
213. Ospelt C, Neidhart M, Gay RE, Gay S: **Synovial activation in rheumatoid arthritis.** *Front Biosci* 2004, **9**: 2323-2334.

214. Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J *et al.*: **Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**: 290-298.
215. Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC: **Differential roles of hydrogen peroxide and superoxide in mediating IL-1-induced NF-kappa B activation and iNOS expression in bovine articular chondrocytes.** *J Cell Biochem* 2003, **88**: 783-793.
216. Martin G, Andriamanalijaona R, Mathy-Hartert M, Henrotin Y, Pujol JP: **Comparative effects of IL-1beta and hydrogen peroxide (H2O2) on catabolic and anabolic gene expression in juvenile bovine chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**: 915-924.
217. Georganas C, Liu H, Perlman H, Hoffmann A, Thimmapaya B, Pope RM: **Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun.** *J Immunol* 2000, **165**: 7199-7206.
218. Bond M, Baker AH, Newby AC: **Nuclear factor kappaB activity is essential for matrix metalloproteinase-1 and -3 upregulation in rabbit dermal fibroblasts.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **264**: 561-567.
219. Morel JC, Park CC, Kumar P, Koch AE: **Interleukin-18 induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast CXC chemokine production through NFkappaB activation.** *Lab Invest* 2001, **81**: 1371-1383.
220. Vincenti MP, Coon CI, Brinckerhoff CE: **Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 1987-1994.
221. Bai S, Liu H, Chen KH, Eksarko P, Perlman H, Moore TL *et al.*: **NF-kappaB-regulated expression of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**: 3844-3855.
222. Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS: **AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis.** *Autoimmunity* 1998, **28**: 197-208.
223. Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P *et al.*: **Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**: 2501-2512.
224. Morita Y, Kashihara N, Yamamura M, Okamoto H, Harada S, Kawashima M *et al.*: **Antisense oligonucleotides targeting c-fos mRNA inhibit rheumatoid synovial fibroblast proliferation.** *Ann Rheum Dis* 1998, **57**: 122-124.
225. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI: **Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression.** *J Biol Chem* 1990, **265**: 17238-17245.
226. Unemori EN, Hibbs MS, Amento EP: **Constitutive expression of a 92-kD gelatinase (type V collagenase) by rheumatoid synovial fibroblasts and its induction in normal human fibroblasts by inflammatory cytokines.** *J Clin Invest* 1991, **88**: 1656-1662.
227. Schnyder J, Payne T, Dinarello CA: **Human monocyte or recombinant interleukin 1's are specific for the secretion of a metalloproteinase from chondrocytes.** *J Immunol* 1987, **138**: 496-503.
228. Shinmei M, Masuda K, Kikuchi T, Shimomura Y: **Interleukin 1, tumor necrosis factor, and interleukin 6 as mediators of cartilage destruction.** *Semin Arthritis Rheum* 1989, **18**: 27-32.

- 
229. Lemaire R, Huet G, Zerimech F, Grard G, Fontaine C, Duquesnoy B *et al.*: **Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells.** *Br J Rheumatol* 1997, **36**: 735-743.
230. Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M *et al.*: **Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**: 772-780.
231. Huch K, Wilbrink B, Flechtenmacher J, Koepp HE, Aydelotte MB, Sampath TK *et al.*: **Effects of recombinant human osteogenic protein 1 on the production of proteoglycan, prostaglandin E2, and interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes cultured in the presence of interleukin-1beta.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**: 2157-2161.
232. Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM: **Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes.** *J Clin Invest* 1988, **82**: 2026-2037.
233. Le J, Vilcek J: **Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities.** *Lab Invest* 1987, **56**: 234-248.
234. Last-Barney K, Homon CA, Faanes RB, Merluzzi VJ: **Synergistic and overlapping activities of tumor necrosis factor-alpha and IL-1.** *J Immunol* 1988, **141**: 527-530.
235. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A *et al.*: **Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1.** *J Exp Med* 1986, **163**: 1433-1450.
236. Bachwich PR, Chensue SW, Larrick JW, Kunkel SL: **Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986, **136**: 94-101.
237. Tiku ML, Leisch JB, Robertson FM: **Chondrocytes produce oxygen radicals after treatment with ConA, gamma interferon or tumour necrosis factor.** *Proceedings of the 52nd annual meeting of the American Rheumatism Association Houston, Texas, 1988* 1988.
238. Maini RN, Elliott M, Brennan FM, Williams RO, Feldmann M: **TNF blockade in rheumatoid arthritis: implications for therapy and pathogenesis.** *APMIS* 1997, **105**: 257-263.
239. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL *et al.*: **Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein.** *N Engl J Med* 1997, **337**: 141-147.
240. Kuiper S, Joosten LA, Bendele AM, Edwards CK, III, Arntz OJ, Helsen MM *et al.*: **Different roles of tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 in murine streptococcal cell wall arthritis.** *Cytokine* 1998, **10**: 690-702.
241. Stoerk HC, Bielinski TC, Budzilovich T: **Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants.** *Am J Pathol* 1954, **30**: 616-621.
242. Trentham DE, Townes AS, Kang AH: **Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis.** *J Exp Med* 1977, **146**: 857-868.
243. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B: **Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice.** *Nature* 1980, **283**: 666-668.
244. Cremer MA, Ye XJ, Terato K, Griffiths MM, Watson WC, Kang AH: **Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities.** *Clin Exp Immunol* 1998, **112**: 375-382.

245. Carlsen S, Hansson AS, Olsson H, Heinegard D, Holmdahl R: **Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats.** *Clin Exp Immunol* 1998, **114**: 477-484.
246. Glant TT, Cs-Szabo G, Nagase H, Jacobs JJ, Mikecz K: **Progressive polyarthritis induced in BALB/c mice by aggrecan from normal and osteoarthritic human cartilage.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 1007-1018.
247. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D *et al.*: **Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis.** *EMBO J* 1991, **10**: 4025-4031.
248. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D: **Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity.** *Cell* 1996, **87**: 811-822.
249. Matsumoto I, Staub A, Benoist C, Mathis D: **Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme.** *Science* 1999, **286**: 1732-1735.
250. Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S: **Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 1873-1880.
251. Seemayer CA, Kuchen S, Kuenzler P, Rihoskova V, Rethage J, Aicher WK *et al.*: **Cartilage destruction mediated by synovial fibroblasts does not depend on proliferation in rheumatoid arthritis.** *Am J Pathol* 2003, **162**: 1549-1557.
252. Pap T, Aupperle KR, Gay S, Firestein GS, Gay RE: **Invasiveness of synovial fibroblasts is regulated by p53 in the SCID mouse in vivo model of cartilage invasion.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**: 676-681.
253. Martin JA, Wilkey AL, Brand RA: **Cartilage extracellular matrix metabolism differs in serum and synovial fluid.** *Methods Cell Sci* 2002, **24**: 139-143.
254. Tolboom TC, Pieterman E, van der Laan WH, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG *et al.*: **Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10.** *Ann Rheum Dis* 2002, **61**: 975-980.
255. Neidhart M, Gay RE, Gay S: **Anti-interleukin-1 and anti-CD44 interventions producing significant inhibition of cartilage destruction in an in vitro model of cartilage invasion by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**: 1719-1728.
256. Schultz O, Keyszer G, Zacher J, Sittinger M, Burmester GR: **Development of in vitro model systems for destructive joint diseases: novel strategies for establishing inflammatory pannus.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**: 1420-1428.
257. Wang AZ, Wang JC, Fisher GW, Diamond HS: **Interleukin-1beta-stimulated invasion of articular cartilage by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by antibodies to specific integrin receptors and by collagenase inhibitors.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**: 1298-1307.
258. Scott BB, Weisbrot LM, Greenwood JD, Bogoch ER, Paige CJ, Keystone EC: **Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**: 490-498.
259. Hascall VC, Handley CJ, McQuillan DJ, Hascall GK, Robinson HC, Lowther DA: **The effect of serum on biosynthesis of proteoglycans by bovine articular cartilage in culture.** *Arch Biochem Biophys* 1983, **224**: 206-223.
260. Ermis A, Muller B, Hopf T, Hopf C, Remberger K, Justen HP *et al.*: **Invasion of human cartilage by cultured multicellular spheroids of rheumatoid synovial cells--a novel in vitro model system for rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1998, **25**: 208-213.



- 
261. Halliday DA, Clemente G, Rathjen DA, Ferrante A: **Rapid degradation of articular cartilage proteoglycan by neutrophils: comparison with macrophages and synovial fibroblasts.** *Inflamm Res* 2000, **49**: 441-444.
262. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: **Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data.** *J Bone Joint Surg Am* 1971, **53**: 523-537.
263. Weinert S: *Etablierung eines in vitro Knorpeldestruktions-Assays - ein Modell für die Gelenkdestruktion bei der Rheumatoiden Arthritis.* Diplomarbeit, FSU-Jena . 2003.
264. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K *et al.*: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**: 1039-1049.
265. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW: **Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry.** *Ann Rheum Dis* 2004, **63**: 774-784.
266. Nickel R, Schummer A, Seiferle E, Frewein J, Wille K: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Bd. 1: Bewegungsapparat.* Singhofen: Parey Bei Mvs; 2003.
267. Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS: **Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**: 681-687.
268. Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA: **Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride.** *Anal Biochem* 1987, **161**: 103-108.
269. Fields G: **Using fluorogenic peptide substrates to assay matrix metalloproteinases.** In *Methods in Molecular Biology.* Clark I (eds): Humana Press; 2000:495-518.
270. Fasciglione GF, Marini S, D'Alessio S, Politi V, Coletta M: **pH- and temperature-dependence of functional modulation in metalloproteinases. A comparison between neutrophil collagenase and gelatinases A and B.** *Biophys J* 2000, **79**: 2138-2149.
271. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J *et al.*: **Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion.** *Circulation* 2001, **103**: 2181-2187.
272. Uggeri J, Gatti R, Orlandini G, Belletti S, Galli C, Scandroglio R *et al.*: **Analysis of living cells grown on titanium by real time CLSM.** *Congress of the European Orthopaedic Research Society, Bologna* 2006.
273. Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K: **Mechanisms of chondrocyte apoptosis.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**: 389-391.
274. Geng Y, Valbracht J, Lotz M: **Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes.** *J Clin Invest* 1996, **98**: 2425-2430.
275. Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Lotz M: **Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**: 1633-1643.
276. Neumann E, Judex M, Grifka J, Kullmann F, Masuda K, Schölmerich J *et al.*: **Veränderte Genexpression in synovialen Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis nach wenigen Zellkulturpassagen.** *Z Rheumatol* 60 [Suppl 1] 2001.

- 
277. Camplejohn KL, Allard SA: **Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies.** *Histochemistry* 1988, **89**: 185-188.
278. Pattoli MA, MacMaster JF, Gregor KR, Burke JR: **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* 2005, **315**: 382-388.
279. Sondergaard BC, Henriksen K, Wulf H, Oestergaard S, Schurigt U, Brauer R *et al.*: **Relative contribution of matrix metalloprotease and cysteine protease activities to cytokine-stimulated articular cartilage degradation.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**: 738-748.
280. Stevens AL, Wheeler CA, Tannenbaum SR, Grodzinsky AJ: **Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF-alpha but not IL-1beta treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007.
281. Patwari P, Kurz B, Sandy JD, Grodzinsky AJ: **Mannosamine inhibits aggrecanase-mediated changes in the physical properties and biochemical composition of articular cartilage.** *Arch Biochem Biophys* 2000, **374**: 79-85.
282. Patwari P, Gao G, Lee JH, Grodzinsky AJ, Sandy JD: **Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolytic activity in interleukin-1-treated bovine cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**: 269-277.
283. Sandy JD, Verscharen C: **Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo.** *Biochem J* 2001, **358**: 615-626.
284. Elsaid KA, Jay GD, Chichester CO: **Detection of collagen type II and proteoglycans in the synovial fluids of patients diagnosed with non-infectious knee joint synovitis indicates early damage to the articular cartilage matrix.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**: 673-680.
285. Poole CA: **The Structure and Function of Articular Cartilage Matrices.** In *Joint Cartilage Degradation. Basic and Clinical Aspects.* Edited by Woessner JF, Howell DS. New York: Marcel Dekker; 1993:1-33.
286. Häuselmann HJ, Flechtenmacher J, Michal L, Thonar EJ, Shinmei M, Kuettner KE *et al.*: **The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers.** *Arthritis Rheum* 1996, **39**: 478-488.
287. Walter H, Kawashima A, Nebelung W, Neumann W, Roessner A: **Immunohistochemical analysis of several proteolytic enzymes as parameters of cartilage degradation.** *Pathol Res Pract* 1998, **194**: 73-81.
288. Pratta MA, Scherle PA, Yang G, Liu RQ, Newton RC: **Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 119-133.
289. Singer II, Kawka DW, Bayne EK, Donatelli SA, Weidner JR, Williams HR *et al.*: **VDIPEN, a metalloproteinase-generated neopeptide, is induced and immunolocalized in articular cartilage during inflammatory arthritis.** *J Clin Invest* 1995, **95**: 2178-2186.
290. van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A, Lambrou D, Bayne E, Singer I *et al.*: **Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for stromelysin-1 in cartilage destruction.** *J Immunol* 1999, **163**: 5633-5639.
291. van Meurs JB, Van Lent PL, Holthuysen AE, Singer II, Bayne EK, van den Berg WB: **Kinetics of aggrecanase- and metalloproteinase-induced neopeptides in various stages of cartilage destruction in murine arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 1128-1139.

- 
292. Bayliss MT, Hutton S, Hayward J, Maciewicz RA: **Distribution of aggrecanase (ADAMts 4/5) cleavage products in normal and osteoarthritic human articular cartilage: the influence of age, topography and zone of tissue.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001, **9**: 553-560.
  293. Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, Rosenfeld SA, Ross OH: **Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 23443-23450.
  294. Arai M, Anderson D, Kurdi Y, Annis-Freeman B, Shields K, Collins-Racie LA *et al.*: **Effect of adenovirus-mediated overexpression of bovine ADAMTS-4 and human ADAMTS-5 in primary bovine articular chondrocyte pellet culture system.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**: 599-613.
  295. Fan Z, Bau B, Yang H, Soeder S, Aigner T: **Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**: 136-143.
  296. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE: **The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8**: R187.
  297. Flannery CR, Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, Chockalingam PS, Hebert T *et al.*: **Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites.** *J Biol Chem* 2002, **277**: 42775-42780.
  298. Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT *et al.*: **ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro.** *Nature* 2005, **434**: 648-652.
  299. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito BA, Blanchet T, Ma HL *et al.*: **Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**: 2547-2558.
  300. Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson FM, Campbell IK, Meeker CT *et al.*: **ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**: 1461-1472.
  301. Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, Ilic MZ, Handley CJ, Kelner GS *et al.*: **Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium.** *Eur J Biochem* 2001, **268**: 1259-1268.
  302. Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R *et al.*: **Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin.** *Matrix Biol* 2002, **21**: 461-470.
  303. Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D: **Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen.** *J Biol Chem* 1998, **273**: 20397-20403.
  304. Marti C, Neidhart M, Gerber T, Hauser N, Michel BA, Häuselmann HJ: **Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): the role of a non-collagen cartilage matrix protein as a marker of disease activity and joint destruction in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.** *Z Rheumatol* 1999, **58**: 79-87.
  305. Di Cesare PE, Carlson CS, Stolerian ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M: **Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage.** *J Orthop Res* 1996, **14**: 946-955.
  306. Goldring MB, Goldring SR: **Skeletal tissue response to cytokines.** *Clin Orthop Relat Res* 1990, 245-278.
  307. Nguyen Q, Liu J, Roughley PJ, Mort JS: **Link protein as a monitor in situ of endogenous proteolysis in adult human articular cartilage.** *Biochem J* 1991, **278 ( Pt 1)**: 143-147.

308. Roughley PJ, White RJ, Santer V: **Comparison of proteoglycans extracted from high and low weight-bearing human articular cartilage, with particular reference to sialic acid content.** *J Biol Chem* 1981, **256**: 12699-12704.
309. DiCesare PE, Morgelin M, Mann K, Paulsson M: **Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding.** *Eur J Biochem* 1994, **223**: 927-937.
310. Hummel KM, Neidhart M, Vilim V, Hauser N, Aicher WK, Gay RE *et al.*: **Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fibroblasts and synovial fluids.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**: 721-728.
311. Recklies AD, Baillargeon L, White C: **Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 997-1006.
312. Saxne T, Heinegard D: **Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood.** *Br J Rheumatol* 1992, **31**: 583-591.
313. Vilim V, Lenz ME, Vytasek R, Masuda K, Pavelka K, Kuettner KE *et al.*: **Characterization of monoclonal antibodies recognizing different fragments of cartilage oligomeric matrix protein in human body fluids.** *Arch Biochem Biophys* 1997, **341**: 8-16.
314. Morgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M: **Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure.** *J Biol Chem* 1992, **267**: 6137-6141.
315. Wagner S, Hofstetter W, Chiquet M, Mainil-Varlet P, Stauffer E, Ganz R *et al.*: **Early osteoarthritic changes of human femoral head cartilage subsequent to femoro-acetabular impingement.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**: 508-518.
316. Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M *et al.*: **Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**: 2087-2094.
317. Downs JT, Lane CL, Nestor NB, McLellan TJ, Kelly MA, Karam GA *et al.*: **Analysis of collagenase-cleavage of type II collagen using a neoepitope ELISA.** *J Immunol Methods* 2001, **247**: 25-34.
318. Poole AR, Ionescu M, Fitzcharles MA, Billingham RC: **The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases.** *J Immunol Methods* 2004, **294**: 145-153.
319. Fichter M, Korner U, Schomburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J: **Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes.** *J Orthop Res* 2006, **24**: 63-70.
320. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: **Matrix metalloproteinases: role in arthritis.** *Front Biosci* 2006, **11**: 529-543.
321. Okada Y: **Proteinase and matrix degradation.** In *Kelly's Textbook of Rheumatology*. Edited by Ruddy S, Harris ED, Jr., Sledge CB. Philadelphia: WB Saunders Company; 2001:55-72.
322. Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW: **Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**: 181-189.
323. Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K *et al.*: **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2000, **59**: 455-461.

- 
324. Sakakura Y, Hosokawa Y, Tsuruga E, Irie K, Yajima T: **In situ localization of gelatinolytic activity during development and resorption of Meckel's cartilage in mice.** *Eur J Oral Sci* 2007, **115**: 212-223.
325. Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M *et al.*: **Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro.** *FASEB J* 2004, **18**: 690-692.
326. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW: **Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors.** *Biotechniques* 2005, **38**: 73-83.
327. Brinckerhoff CE, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**: 207-214.
328. Nagase H, Visse R, Murphy G: **Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.** *Cardiovasc Res* 2006, **69**: 562-573.
329. Alsalameh S, Amin RJ, Kunisch E, Jasin HE, Kinne RW: **Preferential induction of prodestructive matrix metalloproteinase-1 and proinflammatory interleukin 6 and prostaglandin E2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via tumor necrosis factor receptor-55.** *J Rheumatol* 2003, **30**: 1680-1690.
330. Dayer JM, Beutler B, Cerami A: **Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts.** *J Exp Med* 1985, **162**: 2163-2168.
331. Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B: **Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**: 409-418.
332. Kim KS, Park EK, Ju SM, Jung HS, Bang JS, Kim C *et al.*: **Taurine chloramine differentially inhibits matrix metalloproteinase 1 and 13 synthesis in interleukin-1beta stimulated fibroblast-like synoviocytes.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**: R80.
333. Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B: **Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**: 2263-2274.
334. Inoue H, Takamori M, Nagata N, Nishikawa T, Oda H, Yamamoto S *et al.*: **An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** *Inflamm Res* 2001, **50**: 65-72.
335. Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Shiratsuchi H, Motohashi M, Matsumura H: **The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes.** *Life Sci* 2005, **77**: 3210-3221.
336. Duerr S, Stremme S, Soeder S, Bau B, Aigner T: **MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage.** *Clin Exp Rheumatol* 2004, **22**: 603-608.
337. Kunisch E, Klingler JH, Winter R, Roth A, Lungershausen W, Ukena B *et al.*: **IL-1beta and TNF-alpha downregulate the MMP-2 (gelatinase A) secretion in OA- and joint trauma synovial fibroblasts (SFB), but not in RA-SFB.**
338. Gervasi DC, Raz A, Dehem M, Yang M, Kurkinen M, Fridman R: **Carbohydrate-mediated regulation of matrix metalloproteinase-2 activation in normal human fibroblasts and fibrosarcoma cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **228**: 530-538.

- 
339. Smolian H, Aurer A, Sittinger M, Zacher J, Bernimoulin JP, Burmester GR *et al.*: **Secretion of gelatinases and activation of gelatinase A (MMP-2) by human rheumatoid synovial fibroblasts.** *Biol Chem* 2001, **382**: 1491-1499.
340. Goldbach-Mansky R, Lee JM, Hoxworth JM, Smith D, Duray P, Schumacher RH, Jr. *et al.*: **Active synovial matrix metalloproteinase-2 is associated with radiographic erosions in patients with early synovitis.** *Arthritis Res* 2000, **2**: 145-153.
341. Pei D: **Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP.** *J Biol Chem* 1999, **274**: 8925-8932.
342. Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C: **Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma.** *Cancer Res* 1996, **56**: 944-949.
343. Ainola MM, Mandelin JA, Liljestrom MP, Li TF, Hukkanen MV, Kontinen YT: **Pannus invasion and cartilage degradation in rheumatoid arthritis: involvement of MMP-3 and interleukin-1beta.** *Clin Exp Rheumatol* 2005, **23**: 644-650.
344. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, **1477**: 267-283.
345. Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ulrich S, Li H *et al.*: **Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4).** *J Biol Chem* 1997, **272**: 20479-20483.
346. Matrisian LM: **The matrix-degrading metalloproteinases.** *Bioessays* 1992, **14**: 455-463.
347. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ: **Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP).** *Biochem J* 1991, **277 ( Pt 1)**: 277-279.
348. Woessner JF, Nagase H: *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. Oxford: Oxford University Press; 2000.
349. Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM: **The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**: 388-397.
350. Knauper V, Wilhelm S, Seperack PK, De Clerck YA, Langley KE, Osthues A: **Direct activation of human neutrophil procollagenase by recombinant stromelysin.** *Biochem J* 1993, **295**: 581-586.
351. Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ: **Stromelysin is an activator of procollagenase: a study with natural and recombinant enzymes.** *Biochem J* 1987, **248**: 265-268.
352. van Meurs J, van Lent P, Stoop R, Holthuysen A, Singer I, Bayne E *et al.*: **Cleavage of aggrecan at the Asn341-Phe342 site coincides with the initiation of collagen damage in murine antigen-induced arthritis: a pivotal role for stromelysin 1 in matrix metalloproteinase activity.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 2074-2084.
353. Gravallesse EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH: **In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**: 1076-1084.
354. McCachren SS: **Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**: 1085-1093.
355. Tetlow LC, Lees M, Ogata Y, Nagase H, Woolley DE: **Differential expression of gelatinase B (MMP-9) and stromelysin-1 (MMP-3) by rheumatoid synovial cells in vitro and in vivo.** *Rheumatol Int* 1993, **13**: 53-59.

- 
356. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S: **Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.** *FASEB J* 1998, **12**: 1075-1095.
357. Mackay AR, Hartzler JL, Pelina MD, Thorgeirsson UP: **Studies on the ability of 65-kDa and 92-kDa tumor cell gelatinases to degrade type IV collagen.** *J Biol Chem* 1990, **265**: 21929-21934.
358. Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, Cloutier JM, Martel-Pelletier J: **The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis.** *J Clin Invest* 1996, **97**: 2011-2019.
359. Borden P, Solymar D, Sucharczuk A, Lindman B, Cannon P, Heller RA: **Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes.** *J Biol Chem* 1996, **271**: 23577-23581.
360. Westhoff CS, Freudiger D, Petrow P, Seyfert C, Zacher J, Kriegsmann J *et al.*: **Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**: 1517-1527.
361. Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG *et al.*: **Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**: 1748-1759.
362. Seitz M, Dayer JM: **Enhanced production of tissue inhibitor of metalloproteinases by peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients responding to methotrexate treatment.** *Rheumatology (Oxford)* 2000, **39**: 637-645.
363. Fearon U, Mullan R, Markham T, Connolly M, Sullivan S, Poole AR *et al.*: **Oncostatin M induces angiogenesis and cartilage degradation in rheumatoid arthritis synovial tissue and human cartilage cocultures.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**: 3152-3162.
364. Handley CJ, Winter GM, Ilic MZ, Ross JM, Anthony PC, Clem RH: **Distribution of newly synthesized aggrecan in explant cultures of bovine cartilage treated with retinoic acid.** *Matrix Biol* 2002, **21**: 579-592.
365. Hascall VC, Sandy JD, Handley CJ: **Regulation of proteoglycan metabolism in articular cartilage.** In *Biology of the Synovial Joint*. Edited by Caterson B, Archer C, Benjamin M, Ralphs J. Harwood Academic Publishers; 1999:100-120.
366. Seguin CA, Bernier SM: **TNF $\alpha$  suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways.** *J Cell Physiol* 2003, **197**: 356-369.
367. Goldring SR: **Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42 Suppl 2**: ii11-ii16.
368. Dodge GR, Poole AR: **Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1.** *J Clin Invest* 1989, **83**: 647-661.
369. Poole CA, Matsuoka A, Schofield JR: **Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage.** *Arthritis Rheum* 1991, **34**: 22-35.
370. Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M: **Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide.** *Am J Pathol* 1995, **146**: 75-85.
371. Hardingham TE: **The role of link-protein in the structure of cartilage proteoglycan aggregates.** *Biochem J* 1979, **177**: 237-247.

- 
372. Knudson W, Aguiar DJ, Hua Q, Knudson CB: **CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis.** *Exp Cell Res* 1996, **228**: 216-228.
373. Lee GM, Johnstone B, Jacobson K, Caterson B: **The dynamic structure of the pericellular matrix on living cells.** *J Cell Biol* 1993, **123**: 1899-1907.
374. Poole CA: **Articular cartilage chondrons: form, function and failure.** *J Anat* 1997, **191 ( Pt 1)**: 1-13.
375. Winter GM, Poole CA, Ilic MZ, Ross JM, Robinson HC, Handley CJ: **Identification of distinct metabolic pools of aggrecan and their relationship to type VI collagen in the chondrons of mature bovine articular cartilage explants.** *Connect Tissue Res* 1998, **37**: 277-293.
376. Fraser A, Fearon U, Billingham RC, Ionescu M, Reece R, Barwick T *et al.*: **Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**: 3085-3095.
377. Robbins JR, Thomas B, Tan L, Choy B, Arbiser JL, Berenbaum F *et al.*: **Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**: 2189-2201.
378. Vankemmelbeke MN, Ilic MZ, Handley CJ, Knight CG, Buttle DJ: **Coincubation of bovine synovial or capsular tissue with cartilage generates a soluble "Aggrecanase" activity.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **255**: 686-691.
379. Chen V, Croft D, Purkis P, Kramer IM: **Co-culture of synovial fibroblasts and differentiated U937 cells is sufficient for high interleukin-6 but not interleukin-1beta or tumour necrosis factor-alpha release.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**: 148-156.
380. Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M: **Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis.** *J Clin Invest* 1989, **83**: 585-592.
381. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA: **Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism.** *Bone* 2003, **32**: 1-7.
382. Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JL, den Otter W, Swaak AJ *et al.*: **Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**: 1695-1701.
383. Legendre F, Dudhia J, Pujol JP, Bogdanowicz P: **JAK/STAT but not ERK1/ERK2 pathway mediates interleukin (IL)-6/soluble IL-6R down-regulation of Type II collagen, aggrecan core, and link protein transcription in articular chondrocytes. Association with a down-regulation of SOX9 expression.** *J Biol Chem* 2003, **278**: 2903-2912.
384. Charles P, Elliott MJ, Davis D, Potter A, Kalden JR, Antoni C *et al.*: **Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis.** *J Immunol* 1999, **163**: 1521-1528.
385. Mihara M, Moriya Y, Kishimoto T, Ohsugi Y: **Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor.** *Br J Rheumatol* 1995, **34**: 321-325.
386. Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G: **Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 1992, **19**: 22-25.
387. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y *et al.*: **Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**: 11924-11928.



- 
388. Gabay C: **Interleukin-6 and chronic inflammation.** *Arthritis Res Ther* 2006, **8 Suppl 2**: S3.
389. Kavanaugh A: **Interleukin-6 inhibition and clinical efficacy in rheumatoid arthritis treatment--data from randomized clinical trials.** *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007, **65 Suppl 1**: S16-S20.
390. Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Namba A, Motohashi M, Matsumoto M *et al.*: **The effect of IL-1beta on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes.** *Life Sci* 2006, **79**: 764-771.
391. Recklies AD, Golds EE: **Induction of synthesis and release of interleukin-8 from human articular chondrocytes and cartilage explants.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**: 1510-1519.
392. Golds EE, Mason P, Nyirkos P: **Inflammatory cytokines induce synthesis and secretion of gro protein and a neutrophil chemotactic factor but not beta 2-microglobulin in human synovial cells and fibroblasts.** *Biochem J* 1989, **259**: 585-588.
393. Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM *et al.*: **Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8.** *J Immunol* 1991, **147**: 2187-2195.
394. Watson ML, Westwick J, Fincham NJ, Camp RD: **Elevation of PMN cytosolic free calcium and locomotion stimulated by novel peptides from IL-1-treated human synovial cell cultures.** *Biochem Biophys Res Commun* 1988, **155**: 1154-1160.
395. Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL: **Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils.** *J Clin Invest* 1989, **84**: 1045-1049.
396. Strieter RM, Chensue SW, Basha MA, Standiford TJ, Lynch JP, Baggiolini M *et al.*: **Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor-alpha, lipopolysaccharide, and interleukin-1 beta.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, **2**: 321-326.
397. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN: **Role of Cytokines in Rheumatoid Arthritis.** *Annu Rev Immunol* 1996, **14**: 397-440.
398. Nuernberger S, Klepal W, Vecseil V, Marlovits S: **Ultrastructural Insights into the World of Cartilage: Electron Microscopy of Articular Cartilage.** In *Osteo Trauma Care*. New York: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart; 2006:168-180.
399. Takada N, Wada I, Sugimura I, Sakuma E, Maruyama H, Matsui N: **A possible barrier function of the articular surface.** *Kaibogaku Zasshi* 1999, **74**: 631-637.
400. Glaser C, Putz R: **Functional anatomy of articular cartilage under compressive loading Quantitative aspects of global, local and zonal reactions of the collagenous network with respect to the surface integrity.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**: 83-99.
401. Aggeler J, Frisch SM, Werb Z: **Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts.** *J Cell Biol* 1984, **98**: 1662-1671.
402. Krane SM, Goldring SR, Goldring JM, Dayer JM: **Interaction among lymphocytes, monocytes, and other synovial cells in rheumatoid synovium.** In *Lymphokines*. New York: Academic Press; 1982:75-136.
403. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE: *Molekulare Zellbiologie, 5. Auflage.* Spektrum Akademischer Verlag; 2004.
404. Lee H, Overall CM, McCulloch CA, Sodek J: **A critical role for the membrane-type 1 matrix metalloproteinase in collagen phagocytosis.** *Mol Biol Cell* 2006, **17**: 4812-4826.
405. Ruberti JW, Hallab NJ: **Strain-controlled enzymatic cleavage of collagen in loaded matrix.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **336**: 483-489.

406. Davoli MA, Lamplugh L, Beauchemin A, Chan K, Mordier S, Mort JS *et al.*: **Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats aged 0-21 days: II. Two proteinases, gelatinase B and collagenase-3, are implicated in the lysis of collagen fibrils.** *Dev Dyn* 2001, **222**: 71-88.
407. Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Kronke G, Distler J *et al.*: **TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**: 11742-11747.
408. Klareskog L, van der HD, de Jager JP, Gough A, Kalden J, Malaise M *et al.*: **Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial.** *Lancet* 2004, **363**: 675-681.
409. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Furst D, Weisman MH *et al.*: **Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**: 1051-1065.
410. Sasaki K, Tagaki M, Mandelin J, Takei I, Santavirta S, Ida H: **Quantitative analysis of mRNA expression of TIMPs in the periprosthetic interface tissue of loose hips by realtime PCR system.** *J Biomed Mater Res* 2001, **58**: 605-612.

---

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. R. W. Kinne für die Bereitstellung des Themas, die hilfreiche Unterstützung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. S. Reißmann für die Betreuung dieser Arbeit an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät und PD Dr. M. Sittinger für seine Bereitschaft, als externer Gutachter dieser Arbeit zu fungieren.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Experimentelle Rheumatologie für ihre Hilfe sowie für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Dirk Pohlens für die hervorragende Unterstützung, die intensive Betreuung meiner Arbeit, die vielen wertvollen Anregungen sowie seine Hilfsbereitschaft in dienstlichen und auch privaten Angelegenheiten.

Bei Herrn Dr. Rene Huber möchte ich mich für seine Hilfe bei der Durchsicht der Arbeit bedanken.

Bianca Lanick danke ich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Zellkulturarbeiten.

Herrn Dr. W. Richter und Frau Kaiser vom Institut für Ultrastrukturforschung danke ich sehr herzlich für die Hilfe bei den REM-Untersuchungen.

Frau Cordula Müller gebührt mein Dank für die Anfertigung der TEM-Aufnahmen.

Prof. K. Jandt und Herrn Hempel vom Institut für Materialwissenschaft danke ich für die Unterstützung bei der LSM.

Der größte Dank gilt meiner Frau Conny, die mir immer den Rücken freigehalten hat und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Zuletzt möchte ich mich bei meinen beiden Kindern Paula und Djamila bedanken, die mir über so manch schwierige Phase hinweggeholfen haben.

---

## LEBENS LAUF

Name: Pretzel

Vorname: David

Geburtsdatum: 15.06.1976

Geburtsort: Berlin

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

### Schulbildung:

09/1983 – 06/1994 Besuch der Polytechnischen Oberschule Edwin Hoernle Berlin

09/1994 – 06/1996 Besuch des Bölschegymnasiums Berlin – Friedrichshagen

Abschluss 1996: Abitur

09/1996 – 09/1997 Ableistung des Zivildienstes beim Lazarus Hilfswerk Berlin

### Hochschulstudium:

10/1997 – 10/2002 Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Studienfach: Ernährungswissenschaften

09/1999 – 09/2000 Studienaufenthalt an der Universidad Jaume I, Castellon – Spanien

11/2002 – 11/2003 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Thema: *Synthese und Charakterisierung monomerer und dimerer metallkomplexierender Pseudopeptidliganden*

11/2003 – 03/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie und Biophysik der Friedrich-Schiller-Universität, Jena

seit 04/2004 Doktorand in der AG Experimentelle Rheumatologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Prof. Dr. R.W. Kinne

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne Inanspruchnahme unerlaubter fremder Hilfe angefertigt habe. Ich habe nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen zur Anfertigung dieser Arbeit eingesetzt und alle Materialien oder Dienstleistungen, die ich von Dritten erhalten habe, als solche gekennzeichnet.

Jena, den 6.2.2008

---

David Pretzel

---

## **Erklärung zur Dissertation**

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und daß ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung des Verfahrens zum Erwerb des o.g. Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena ist mir bekannt.

Jena, den 6.2.2008

---

David Pretzel