

**Untersuchungen zu den
Pathomechanismen der Destruktion
von Faserknorpelgewebe am Beispiel
des Meniskus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Angelika K. Lemke

Kiel, Mai 2006

Referent:

Prof. Dr. Rolf Mentlein

Korreferent:

Prof. Dr. Rüdiger Schulz-Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung:

18.07.2006

Zum Druck genehmigt: Kiel,

19.07.2006

gez. Prof. Dr. J. Grothemeyer
(Der Dekan)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Struktur und Aufbau des Meniskus.....	1
1.2.1 Meniskusfunktionen.....	5
1.2.2 Ursachen für eine Schädigung des Meniskusgewebes.....	6
1.3 Zytokine und Knorpelgewebe.....	7
1.3.1 Interleukin-1 (IL-1).....	8
1.3.2 IL-1 Rezeptoren.....	8
1.4 IL-1 Signaltransduktion.....	9
1.4.1 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch IL-1.....	9
1.4.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	12
1.5 Matrixmetalloproteinasen.....	13
1.5.1 Funktion von Matrixmetalloproteinasen.....	13
1.5.2 Struktur von Matrixmetalloproteinasen.....	14
1.5.3 Aktivierung und Regulation von Matrixmetalloproteinasen.....	15
1.6 Aggrekanasen.....	16
1.6.1 Funktion von Aggrekanasen.....	17
1.6.2 Struktur von Aggrekanasen.....	17
1.6.3 Aktivierung und Regulation von Aggrekanasen.....	18
1.7 Wirkungsweise von matrix-abbauenden Proteasen bei Gelenkerkrankungen....	19
1.8 Beeinflussung der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Enzymen durch synthetische Inhibitoren	23
1.9 Ziele und Fragestellung.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	26
2.1.2 Antikörper.....	29
2.1.3 Materialien und Geräte.....	29
2.2 Zellkultur.....	31
2.2.1 Die Isolierung und Kultivierung von bovinen Meniskusexplantaten.....	31
2.2.2 Die Isolierung und Kultivierung von Explantaten aus humanem Meniskusgewebe.....	32

2.2.3	Die Isolierung und Kultivierung von bovinen Gelenkknorpel-explantaten.....	33
2.2.4	Die Isolierung und Kultivierung von bovinen Meniskuszellen.....	34
2.2.5	Die Kultivierung von bovinen Cornea-Fibroblasten.....	35
2.2.6	Die Kultivierung der Zelllinie TC28a2.....	35
2.2.7	Subkultivierung der Zellen.....	35
2.3	Versuchsdurchführungen.....	36
2.4	Die Bestimmung der Glykosaminoglykane (GAGs) in Kulturüberständen und im Gewebe.....	37
2.5	Die Bestimmung der Biosyntheseaktivität der Gewebeexplantate durch den Einbau von radioaktiv-markiertem [³⁵ S]-Sulfat und [³ H]-Prolin.....	38
2.6	Messung von Stickoxid (NO) in den Kulturüberständen.....	38
2.7	Die Bestimmung des DNA-Gehaltes in Gewebeexplantaten nach der CyQuant-Methode.....	39
2.8	Untersuchungen der physikalischen Eigenschaften des Meniskusgewebes.....	39
2.8.1	Aufbau und Funktion der Druckmaschine.....	39
2.8.2	Durchführung der Kompression zur Messung des Gegendruckes.....	40
2.9	Histologische Untersuchungen.....	40
2.9.1	Beschichten der Objektträger mit Chromalaungelatine.....	40
2.9.2	Fixieren und Einbetten von Gewebeexplantaten für histologische und immunhistochemische Untersuchungen.....	40
2.9.3	Färbung der Gewebeexplantate zur histologischen Darstellung mit Toluidinblau.....	41
2.9.4	Färbung der Gewebeexplantate zur histologischen Darstellung mit Mayer's Hämalaunlösung.....	41
2.9.5	Färbung der Gewebeexplantate mit Bisbenzimid.....	42
2.10	Der lichtmikroskopische Nachweis von Apoptose.....	42
2.11	Immunhistochemische Untersuchungen.....	43
2.11.1	Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II im Meniskusgewebe.....	43
2.11.2	Immunhistochemischer Nachweis von IL-1 Rezeptor Typ I im Meniskusgewebe.....	44
2.11.3	Immunhistochemischer Nachweis von m-Calpain im Meniskusgewebe.....	44
2.12	Nachweis von Proteoglykanen mittels Western Blot.....	45
2.12.1	Western Blot-Analyse.....	45
2.12.2	Isolierung von Proteoglykanen aus Kulturmedien.....	46
2.12.3	Isolierung von Proteoglykanen aus Gewebe.....	47
2.12.4	Durchführung der Gelelektrophorese.....	47
2.12.5	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran.....	48
2.13	Untersuchungen zur Genexpression von Matrixmolekülen und matrixabbauenden Proteasen auf mRNA Ebene.....	49

2.13.1	RNA Isolierung.....	49
2.13.1.1	RNA-Isolierung aus Meniskuszellen.....	49
2.13.1.2	RNA-Isolierung aus Meniskusgewebe.....	50
2.13.2	Bestimmung der RNA-Menge.....	50
2.13.3	RT-PCR (Reverse-Transkription PCR).....	51
2.13.3.1	Durchführung der RT-PCR.....	51
2.13.3.2	Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse der PCR-Amplifikate.....	53
2.13.4	Real time RT-PCR.....	54
2.13.4.1	Durchführung der SYBR® Green real time RT-PCR.....	54
2.13.5	Real time RT-PCR mit TaqMan® Sonden.....	56
2.13.5.1	Durchführung der real time RT-PCR mit TaqMan® Sonden.....	57
2.13.6	Auswertung und Darstellung der Daten der real time RT-PCR.....	59
2.14	Untersuchungen zur Genexpression von matrix-abbauenden Proteasen auf Proteinebene.....	60
2.14.1	Durchführung von zymographischen Analysen.....	60
2.15	Untersuchungen zur Signaltransduktion von IL-1.....	62
2.15.1	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA).....	62
2.15.2	Isolierung von Kernproteinen.....	62
2.15.3	Bestimmung der Kernproteinkonzentration.....	63
2.15.4	Radioaktive Markierung der Oligonukleotid-Sonde.....	64
2.15.5	Herstellung des Polyacrylamidgels für die elektrophoretische Auftrennung der Kernproteine.....	64
2.15.6	Durchführung des Gel-Shifts.....	65
2.16	Untersuchungen zur Bindungsaffinität.....	66
2.16.1	Iodierung von IL-1.....	66
2.16.2	Durchführung der Untersuchungen zur Bindungsaffinität mit ¹²⁵ I-IL-1..	66
2.17	Statistische Auswertung.....	67
3.	Ergebnisse.....	68
3.1	Lichtmikroskopische Darstellung von Gewebeexplantaten aus dem bovinen Meniskus.....	68
3.2	Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskuszellen.....	70
3.3	Untersuchung zur Expression der Matrixmoleküle auf mRNA Ebene.....	72
3.3.1	Expression von Matrixmolekülen im Meniskusgewebe.....	72
3.3.2	Expression von Matrixmolekülen in isolierten Meniskuszellen.....	72
3.4	Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf isolierte Meniskuszellen.....	73
3.4.1	Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen in Meniskuszellen auf mRNA Ebene.....	73
3.4.2	Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen auf Proteinebene.....	74

3.5	Untersuchungen zur IL-1 Signaltransduktion in Meniskuszellen.....	76
3.5.1	Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch IL-1.....	76
3.5.2	Untersuchungen zur Hemmung der IL-1-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch ein Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm).....	77
3.5.3	Untersuchungen zur Wirkung eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression von matrix-abbauenden Proteasen in isolierten Meniskuszellen auf mRNA Ebene.....	78
3.5.4	Untersuchungen zur Wirkung eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression in isolierten Meniskuszellen auf Proteinebene.....	79
3.6	Untersuchungen zum destruktiven Einfluss von IL-1 auf Meniskugewebe.....	81
3.6.1	Dosisabhängiger Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus Meniskus- und Gelenkknorpelimplantaten.....	81
3.6.2	Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen.....	82
3.7	Einfluss von IL-1 auf die biomechanischen Eigenschaften des Meniskugewebes.....	84
3.8	Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität.....	85
3.9	Einfluss von IL-1 auf die Stickoxid (NO)-Produktion in Meniskusexplantaten....	86
3.10	Nachweis von Apoptose im Meniskugewebe.....	87
3.11	Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen im Meniskugewebe auf mRNA Ebene.....	88
3.12	Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen im Meniskugewebe auf Proteinebene.....	89
3.13	Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf Proteoglykane im Meniskugewebe.....	90
3.13.1	Nachweis von Aggrekan im Meniskugewebe und Untersuchung zur Wirkung von IL-1.....	90
3.13.2	Nachweis der Proteoglykane Biglykan, Decorin und Versikan im Meniskugewebe und Untersuchungen zur Wirkung von IL-1.....	94
3.14	Untersuchungen zur Hemmung der Effekte von IL-1.....	95
3.14.1	Untersuchungen mit einem Matrixmetalloproteinase (MMP)-Inhibitor..	95
3.14.1.1	Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen	95
3.14.1.2	Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Biosyntheseaktivität	96
3.14.1.3	Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Zerstörung von Aggrekan im Meniskus.....	97
3.14.2	Untersuchungen mit einem Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm)	99
3.14.2.1	Einfluss von SODm auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen.....	99

3.14.2.2	Einfluss von SODm auf die Biosyntheseaktivität.....	100
3.14.2.3	Einfluss von SODm auf die NO-Produktion.....	101
3.14.2.4	Einfluss von SODm auf die Expression von matrix- abbauenden Proteasen im Meniskusgewebe auf Proteinebene.....	102
3.15	Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation des Meniskusgewebes.....	102
3.15.1	Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe.....	102
3.15.2	Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation.....	105
3.15.3	Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation.....	106
3.15.4	Einfluss von IL-1 auf die Produktion von Stickoxid (NO) in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation.....	107
3.15.5	Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation auf mRNA Ebene.....	108
3.15.6	Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation auf Proteinebene.....	110
3.16	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von IL-1.....	111
3.17	Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf humanes Meniskusgewebe.....	112
3.17.1	Nachweis des IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) in humanen Meniskusexplantaten.....	112
3.17.2	Einfluss von IL-1 auf die GAG-Freisetzung und die Biosyntheseaktivität in humanem Meniskusgewebe.....	113
3.17.3	Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf die Expression von matrix- abbauenden Enzymen im humanen Meniskusgewebe.....	114
4.	Diskussion.....	116
4.1	IL-1 als Modellsubstanz und in vitro-Modelle am Meniskus.....	116
4.2	Einfluss von IL-1 auf Meniskuszellen.....	117
4.2.1	Meniskuszellen unter in vitro-Kulturbedingungen.....	117
4.2.2	IL-1-induzierte Expression von matrix-abbauenden Proteasen in Meniskuszellen.....	118
4.2.3	Vergleich der Genexpression von isolierten Meniskuszellen und Gewebeexplantaten.....	119
4.2.4	IL-1-induzierte Aktivierung des Signalweges NF-κB in Meniskuszellen und Beeinflussung durch Antioxidantien.....	121
4.2.5	IL-1-induzierte Genexpression von Matrixmetalloproteinasen und NF-κB.....	121

4.3	Einfluss von IL-1 auf Meniskusgewebe.....	124
4.3.1	Nachweis von Kollagen Typ I und II im Meniskusgewebe anhand von immunhistochemischen Färbungen und Genexpression von Matrixmolekülen.....	124
4.3.2	Einfluss von IL-1 auf die GAG-Freisetzung.....	124
4.3.3	Einfluss von IL-1 auf die biomechanischen Eigenschaften.....	125
4.3.4	Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität und Apoptoserate.....	126
4.3.5	Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion.....	126
4.3.6	Vergleich der IL-1 Effekte am Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe..	127
4.3.7	Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Proteasen.....	128
4.4	Spaltung von Aggrecan durch die Wirkung von matrix-abbauenden Proteasen im Meniskusgewebe.....	129
4.4.1	Spaltung durch Matrixmetalloproteinasen.....	130
4.4.2	Spaltung durch Aggrecanasen.....	131
4.4.3	Spaltung durch Calpain und andere Faktoren.....	133
4.5	Untersuchungen zur Hemmung der Effekte von IL-1.....	134
4.5.1	Einfluss eines MMP-Inhibitors.....	134
4.5.2	Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm).....	135
4.6	Einfluss von IL-1 auf die Proteoglykane Decorin, Biglykan und Versikan.....	135
4.7	Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation.....	136
4.7.1	Einfluss von IL-1 auf die GAG-Freisetzung, Biosyntheseaktivität und NO-Produktion.....	137
4.7.2	Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Proteasen.....	138
4.8	Untersuchungen zur Bindungsaffinität von IL-1.....	139
4.9	Therapeutische Ansätze zur Beeinflussung von IL-1 Effekten.....	140
4.10	Ausblick.....	140
5.	Zusammenfassung.....	143
6.	Summary.....	145
7.	Literaturverzeichnis.....	147
	Danksagung.....	163
	Lebenslauf.....	164
	Publikationen/Poster/Vorträge.....	165
	Erklärung.....	166

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAM	„a disintegrin and metalloproteinase“
ADAMTS	„a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif“
AP-1	„Activator Protein-1“
APS	Amoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CF	„carrier free“
cpm	„counts per minute“
CS	Chondroitinsulfat
C _T	„threshold cycle“
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase
DAB	Diaminobenzidin
DE	Diaminoethyl
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DS	Dermatansulfat
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemiluminescence light“
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDTA	Ethylendiamintetraacetatessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	„extrazellular signal regulated kinase“
et al.	et alii (und andere)
EZM	Extrazellulärmatrix
FG	Feuchtgewicht
FKS	foetales Kälberserum
g	Zentrifugalbeschleunigung
G (G1, G2, G3)	globuläre Domäne
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
[³ H]	Prolin-Isotop mit der Massenzahl 3

h	Stunde(n)
HA	Hyaluronan
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hanks´ Buffering Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
¹²⁵ I	Jod-Isotop mit der Massenzahl 125
ICE	„IL-1β converting“ Enzym
IGD	Interlobuläre Domäne
IgG	Immunglobulin G
IKK	„inhibitory κB (IκB)“-Kinase Komplex
IL	Interleukin
IL-1 Ra	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
IL-1 RAcP	„receptor accessory protein“
IL-1 RI	Interleukin-1 Rezeptor Typ I
IL-1 RII	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
iNOS	„inducible NO-synthase“
IRAK	„IL-1 receptor associated kinase“
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Koll	Kollagen
KS	Keratansulfat
M	molar
M.	musculus
mA	Milliampere
MAPK	„mitogen activated protein kinase“
MDB	„Membrane Desalting Buffer“
MES	2-Morpholinosulfonsäure
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
MnTMPyP	Manganese(III)tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) Porphyrin Pentachlorid
MPa	Mega Pascal
mRNA	Boten („messenger“)-RNA
MT-MMP	membrangebundene („membrane-type“) Matrixmetalloproteinase
MyD88	„myeloid differentiation marker 88“
μCi	Mikrocurie
NEMO	„NF-κB essential modulator“
NF-κB	„Nuclear factor kappa B“
ng	nanogramm

NNGH	N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic acid
NO	„nitric oxide“, Stickoxid
NTC	„no-template-control“
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
OA	Osteoarthrose
OD	optische Dichte
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PBS	„phosphate-buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
pg	pikogramm
PG	Proteoglykane
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
[³⁵ S]	Schwefel-Isotop mit der Massenzahl 35
SDS	Sodium (Natrium)-Dodecyl-Sulfat
sec	Sekunde(n)
s.	siehe
SOD	Superoxiddismutase
SODm	Superoxiddismutase-Mimetikum
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	„transforming growth factor β activated kinase 1“
T _{anneal}	„Annealing“-Temperatur
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBST	„Tris-buffered saline tween“
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	„tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases“
T _m	Schmelztemperatur
TNF-α	„Tumor necrosis factor alpha“
Tollip	„Toll-interacting protein“
TRAF-6	„Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRU	„turbidity-reducing units“
U	„units“
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs	versus
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Schematische Darstellung zur Lage und Form der Menisken im Kniegelenk.....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der ultrastrukturellen Anordnung der Kollagenfasern im Meniskus.....	4
Abb. 3: Vereinfachtes Schema der IL-1 Signaltransduktion über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	11
Abb. 4: Schematische Darstellung zur Bindung von Aggrekan an Hyaluronan sowie zum Aufbau und den Spaltstellen mit den Bruchstückenden (Neoepitopen), die durch die Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen (MMPs, Aggrekanasen, Calpain) entstehen.....	20
Abb. 5: Schematische Darstellung zur Herstellung von Meniskusexplantaten.....	32
Abb. 6: Schematische Darstellung zur Herstellung von Gelenkknorpel-explantaten.....	33
Abb. 7: Strukturformeln des MMP-Inhibitors und des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm).....	37
Abb. 8: Darstellung der Apparatur sowie der Druckkammer zur Induktion einer Kompression.....	39
Abb. 9: Lichtmikroskopische Darstellung eines oberflächlichen Meniskusexplantates am Paraffinschnitt.....	69
Abb. 10: Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II in einem Meniskusexplantat aus dem oberflächlichen Gewebe.....	70
Abb. 11: Lichtmikroskopische Darstellung von isolierten Meniskuszellen in Kultur	70
Abb. 12: Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskuszellen nach der 1. Subkultivierung.....	71
Abb. 13 : Nachweis der mRNA Expression der extrazellulären Matrixmoleküle Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Aggrekan im Meniskusgewebe.....	72
Abb. 14: Nachweis der mRNA Expression von extrazellulären Matrixmolekülen in isolierten Meniskuszellen und Cornea-Fibroblasten.....	73
Abb. 15: Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen in isolierten Meniskuszellen auf mRNA Ebene.....	74
Abb. 16: Zymographische Analysen der Zelllysate und Kulturüberstände von Meniskuszellen zum Nachweis der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Enzymen auf Proteinebene.....	75
Abb. 17 : Nachweis der IL-1-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in isolierten Meniskuszellen.....	76
Abb. 18: Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	77
Abb.19: Einflüsse eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression von MMP-1 und -2 in isolierten Meniskuszellen.....	78

	Seite
Abb. 20: Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression von MMP-3, -9 und -13 in isolierten Meniskuszellen.....	79
Abb. 21: Zymographische Analysen der Kulturüberstände von Meniskuszellen zur Darstellung des Einflusses eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte proteolytische Aktivität von matrixabbauenden Proteasen.....	80
Abb. 22: Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen (GAG) aus Meniskus- und Gelenkknorpelexplantaten in Abhängigkeit von der Konzentration.....	82
Abb. 23: Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen (GAG-Freisetzung) aus den Explantaten des Meniskus- und Gelenkknorpelgewebes in den Überstand und auf den Glykosaminoglykan-Gehalt (GAG-Gehalt) innerhalb der Gewebeexplantate.....	83
Abb. 24: Einfluss von IL-1 auf die biomechanischen Eigenschaften des Meniskusgewebes. Meniskusexplantate.....	84
Abb. 25: Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseleistung von Explantaten des Meniskus- und Gelenkknorpelgewebes.....	85
Abb. 26: Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion von Explantaten des Meniskus- und Gelenkknorpelgewebes.....	86
Abb. 27: Nachweis von apoptotischen Zellen in Meniskusexplantaten.....	87
Abb. 28: Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von Matrixmetalloproteinasen im Meniskusgewebe.....	88
Abb. 29: Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrixabbauenden Enzymen im Meniskusgewebe auf mRNA Ebene.....	89
Abb. 30: Zymographische Analysen der Kulturüberstände von Meniskusexplantaten zur Darstellung der proteolytischen Aktivität von matrixabbauenden Proteasen.....	90
Abb. 31: Western Blot zum Nachweis von G1-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Meniskusgewebe und Kulturmedium.....	91
Abb. 32: Western Blot zum Nachweis von TFKEEE/TAGELE-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Kulturmedium von Meniskusexplantaten mit Anti-TFKEEE/Anti-TAGELE-detektierenden Antikörpern.....	92
Abb. 33: Western Blot zum Nachweis der Aggrekan-Fragmente <i>b</i> und <i>c</i> im Meniskusgewebe.....	93
Abb. 34: Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von m-Calpain im bovinen Meniskusgewebe.....	93
Abb. 35: Western Blot-Analysen zum Nachweis der Proteoglykane Biglycan, Decorin und Versikan im Meniskusgewebe.....	94
Abb. 36: Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe.....	95
Abb. 37: Einfluss eines MMP-Inhibitors auf den IL-1-verminderten GAG-Gehalt im Meniskusgewebe.....	96

	Seite
Abb. 38: Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Biosyntheseaktivität von Meniskusexplantate.....	97
Abb. 39: Western Blot zum Nachweis von G1-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Gewebe und Kulturmedium unter dem Einfluss eines MMP-Inhibitors	98
Abb. 40: Western Blot zum Nachweis von TFKEEE/TAGELE-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Kulturmedium von Meniskusexplantaten unter dem Einfluss eines MMP-Inhibitors.....	99
Abb. 41 : Einfluss des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Glykosaminoglykan(GAG)-Freisetzung aus Meniskusgewebe	100
Abb. 42: Einfluss des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die Biosyntheseaktivität.....	100
Abb. 43: Einfluss des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die NO-Produktion.....	101
Abb. 44: Caseinzymographie zum Nachweis von Casein-spaltenden Enzymen in den Kulturüberständen von Meniskusexplantaten unter dem Einfluss von IL-1 und einem Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm).....	102
Abb. 45 : Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskusexplantaten aus unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen.....	103
Abb. 46: Unterschiede in der Zellzahl und im DNA-Gehalt zwischen Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe.....	104
Abb. 47: Lichtmikroskopische Darstellung der Zellkerne in Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe.....	105
Abb. 48: Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate.....	106
Abb. 49: Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate.....	107
Abb. 50: Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate.....	108
Abb. 51: Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen auf mRNA Ebene in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate.....	109
Abb. 52: Zymographische Analysen der Kulturüberstände von Meniskusexplantaten zur Darstellung der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen auf Proteinebene in Abhängigkeit von dem anatomischen Ursprung der Explantate.....	110
Abb. 53: Untersuchungen zur Bindungsaffinität von ¹²⁵ I-IL-1 in Meniskusexplantaten in Abhängigkeit von dem anatomischen Ursprung der Explantate.....	112
Abb. 54: Immunhistochemischer Nachweis des IL-1 Rezeptor Typ I in humanem Meniskusgewebe.....	113
Abb. 55: Einfluss von IL-1 auf den Glykosaminoglykan(GAG)-Verlust und die Biosyntheseaktivität von humanen Meniskusexplantaten.....	114

	Seite
Abb. 56: Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen in humanen Meniskusexplantaten auf mRNA- und Proteinebene.....	115
Abb. 57: Vereinfachtes Schema zur Darstellung der möglichen IL-1-vermittelten Signaltransduktionwege in Meniskuszellen.....	123
Abb. 58 Schematische Darstellung von Meniskusexplantaten aus unterschiedlichen Lokalisationen sowie der Wirkung von IL-1.....	139

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Übersicht über einige Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die an der Degradation des Gelenkknorpels beteiligt sind.....	14
Tab. 2: Übersicht über einige Aggrecanasen, die an der Zerstörung von Proteoglykanen im Knorpelgewebe beteiligt sind.....	17
Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II im Meniskusgewebe...	43
Tab. 4: Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) in humanen Meniskusgewebe.....	44
Tab. 5: Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von m-Calpain in bovinem und humanem Meniskusgewebe.....	45
Tab. 6: Übersicht der RT-PCR Primer.....	52
Tab. 7: Übersicht über den Ablauf der RT-PCR.....	53
Tab. 8: Übersicht der real time RT-PCR Primer.....	55
Tab. 9: Übersicht der ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) der PCR-Produkte im Anschluss an die real time RT-PCR sowie die Angabe über die Anzahl der PCR-Schritte.....	55
Tab. 10: Übersicht über die Bedingungen und den Ablauf der SYBR [®] Green real time RT-PCR.....	56
Tab. 11: Übersicht der Reaktionsbedingungen zur Herstellung einzelsträngiger cDNA für die Durchführung einer real time RT-PCR mit TaqMan [®] Sonden.....	57
Tab. 12 : Übersicht der verwendeten TaqMan [®] Sonden zur Durchführung der real time RT-PCR.....	58
Tab. 13: Übersicht der Reaktionsbedingungen der real time RT-PCR mit TaqMan [®] Sonden.....	58
Tab. 14: Übersicht über den Glykosaminoglykan(GAG)-Gehalt in Explantaten aus dem Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe an Tag 0 und die kumulative GAG-Freisetzung unter dem Einfluss von IL-1 (10 ng/ml).....	83

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

In unserer heutigen Gesellschaft leiden infolge von Übergewicht und altersbedingten Verschleißerscheinungen immer mehr Menschen an Schmerzen und Beschwerden des Bewegungsapparates. Degenerative Gelenkerkrankungen gelten in diesem Zusammenhang als eine Volkskrankheit. Sie sind zwar nicht lebensbedrohlich, führen aber durch die eingeschränkte Funktion des Bewegungsapparates und die bei der Belastung auftretenden Beschwerden wesentlich zur Verminderung der Lebensqualität. Zusätzlich belasten die hohen Kosten, die durch die Behandlung von Gelenkerkrankungen sowie die damit verbundenen Arbeitsausfalltage oder die Arbeitsunfähigkeit entstehen, das Gesundheitswesen enorm.

Das Kniegelenk ist das größte und mit am meisten beanspruchte Gelenk des Menschen. Für die normale Funktion des Kniegelenkes spielen die Menisken eine wichtige Rolle. Durch eine mechanische Überbeanspruchung und extreme sportliche Belastungen können Meniskusverletzungen hervorgerufen werden, die schwerwiegende Spätschäden für das gesamte Gelenk nach sich ziehen. Neben den traumatisch bedingten Verletzungen können aber auch degenerative Veränderungen des Meniskusgewebes zu einer Schädigung des gesamten Kniegelenkes führen. In Deutschland werden jährlich 350.000 Meniskusverletzungen behandelt, womit diese Eingriffe zu den häufigen Operationen zählen. Die biochemischen und zellbiologischen Mechanismen, die die Zerstörung des Meniskusgewebes zur Folge haben können, sind bislang wenig bekannt. Es wird postuliert, dass neben direkten mechanischen Belastungen proinflammatorische Mediatoren in vorentzündlichen Prozessen (wie z.B. Zytokine) das Meniskusgewebe schädigen. Aus dieser Disposition heraus können sich schwerwiegende Spätschäden entwickeln, wie Verletzungen am Meniskus und daraus resultierende Begleitschädigungen des Gelenkknorpels mit einem Knorpelabbau bis hin zur Entstehung einer Osteoarthrose. Es ist daher wichtig, die Pathomechanismen, die der Destruktion des Meniskusgewebes zugrunde liegen, zu untersuchen, um diesen entgegenwirken zu können. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein in vitro-Modell etabliert, welches ermöglicht, die degenerativen Einflüsse von Mediatoren wie dem proinflammatorischen Zytokin Interleukin-1 auf das Meniskusgewebe zu studieren. Die Erkenntnisse aus den gewonnenen Daten sollen helfen, Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention bei dem Verdacht auf Meniskusschädigung aufzuzeigen.

1.2 Struktur und Aufbau des Meniskus

Die Menisken sind zwei halbmondförmige Strukturen (lat. meniscus = Halbmond), die als im Wesentlichen faserknorpelige Scheiben zwischen Ober- und Unterschenkel (Femur und Tibia) liegen (McDevitt und Webber, 1990) (**Abb. 1A**). Der laterale Außenmeniskus des Menschen ist nahezu kreisförmig, da Vorder- und Hinterhorn nahe beieinander liegen und eine ähnliche Breite aufweisen (**Abb. 1B**). Der Außenmeniskus bedeckt einen größeren Bereich der Tibiagelenkfläche als der mediale Innenmeniskus. Dagegen hat der

Innenmeniskus mehr die Form einer Mondsichel, da seine Hörner weiter auseinander liegen und unterschiedlich breit sind. Im Querschnitt erscheinen die Menisken keilförmig. Am Außenrand ist das Gewebe verdickt und an der Gelenkkapsel befestigt; zum Innenrand wird das Gewebe dünner und liegt frei im Gelenkspalt. Die der Tibia aufliegende Unterseite ist plan, während die den Femorkondylen zugewandte Seite konkav gekrümmt ist. Der Innenmeniskus ist am Rand vollständig mit der Gelenkkapsel verwachsen, während die periphere Anheftung des lateralen Meniskus durch die Sehne des M. popliteus unterbrochen ist. Der Innenmeniskus wird in seiner Beweglichkeit durch die Fixierung an der Gelenkkapsel und am medialen Kollateralband stärker eingeschränkt und ist daher im Vergleich zum Außenmeniskus deutlich verletzungsanfälliger. Ausgehend vom Vorder- und Hinterhorn sind die Menisken über kurze Bänder mit der Tibia jeweils an der Area intercondylaris anterior und posterior verankert. Der Innenmeniskus ist zusätzlich mit dem medialen Kollateralband (Lig. collaterale tibiale) verbunden, was die Beweglichkeit des Innenmeniskus weiterhin einschränkt, während der Außenmeniskus keine Verbindung mit dem lateralen Kollateralband aufweist.

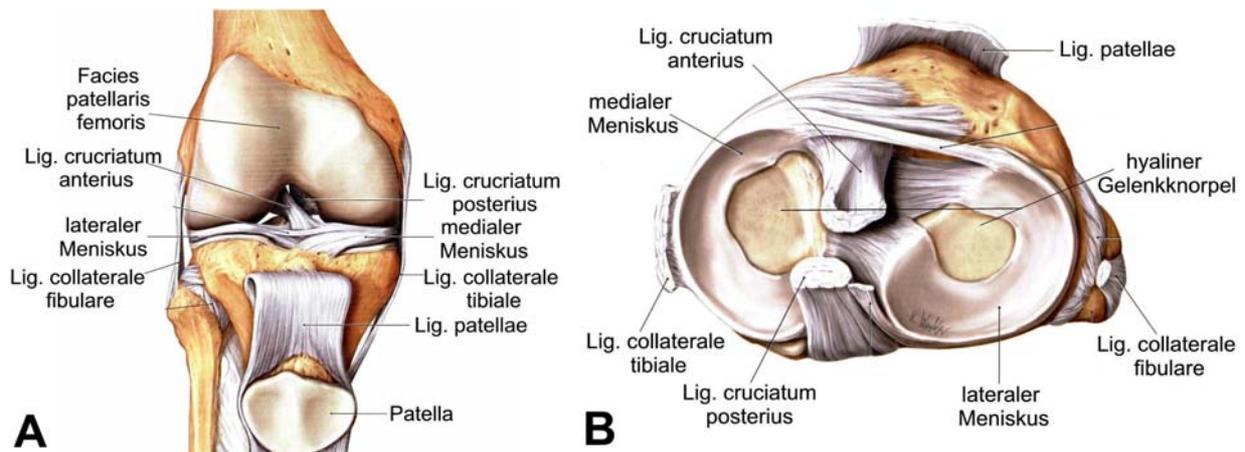


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Lage der Menisken im Kniegelenk (A) sowie des Tibiaplateaus mit den aufliegenden Menisken nach Entfernung des Femurs (B) (Schünke et al., 2005).

Der Meniskus besteht im zentralen inneren, im Querschnitt schmalen Bereich hauptsächlich aus einem faserknorpelartigen Gewebe (Sommer und Sommer, 1983). Mit zunehmender Dicke des Querschnitts nach außen nimmt der Anteil an großen kollagenfaserigen Bündeln zu (**Abb. 2**, Schicht 3), so dass das äußere Drittel größtenteils einem straffen kollagenfaserigen Bindegewebe ähnelt. Die beiden inneren im Querschnitt schmalen Drittel des Meniskus sind gefäßfrei und werden ausschließlich durch Diffusion über die Synovialflüssigkeit und mechanische Konvektion ernährt (Proctor et al., 1989). Bei Neugeborenen lassen sich innerhalb des gesamten Meniskusgewebes Blutgefäße finden (Clark und Ogden, 1983). Mit zunehmendem Alter nimmt, als mögliche Folge der Belastung, die Gefäßversorgung ab, so dass bei Erwachsenen nur noch der äußere Bereich des Gewebes in der Nähe der Gelenkkapsel durchblutet ist (Arnoczky und Warren, 1982; Petersen und Tillmann, 1995). Man bezeichnet diesen Bereich als „Rot-rote Zone“, während der avaskuläre Bereich des Meniskus „Weiß-weiße Zone“ und der Übergangsbereich mit einer teilweise vorhandenen Vaskularisierung „Rot-weiße Zone“ genannt wird. Nur im äußeren Drittel verlaufen Nerven

zusammen mit den Gefäßen frei in das Gewebe hinein, während die beiden inneren Drittel vollständig nervenfrei sind (Day et al., 1985; Gray, 1999).

Das Gewebe des Meniskus besteht aus einer geringen Anzahl von Zellen, die von einer extrazellulären Matrix (EZM) umgeben sind. Man findet im Meniskus im Hinblick auf die morphologische Erscheinung keine einheitliche Population von Meniskuszellen (Ghadially et al., 1983; Webber et al., 1985). Direkt an der Oberfläche, wo die Zelldichte am höchsten ist, sind die Zellen flach und spindelförmig, besitzen wenige Fortsätze und einen geringen Zytoplasmagehalt. In ihrem Erscheinungsbild ähneln sie den Fibroblasten des kollagenen Bindegewebes. Weiter tiefer im zentralen Bereich des Meniskusgewebes ist die Anzahl der Zellen geringer und die Zellform überwiegend rund und polygonal. Die Zellen liegen häufig alleine oder in einer Gruppe von zwei bis drei Zellen und ähneln morphologisch den Chondrozyten des Gelenkknorpels. Die Zellen innerhalb der Kollagenfaserbündel sowie im äußeren Drittel des Meniskusgewebes hingegen erscheinen überwiegend lang gestreckt.

Die von den Meniskuszellen gebildete Extrazellulärmatrix besteht aus Wasser (70-75% des Gesamtvolumens), Kollagen (60-70% des Trockengewichtes), einem kleinen Anteil an Proteoglykanen (1-3% des Trockengewichtes) sowie nicht-kollagenen Proteinen (8-13%) (Adams und Muir, 1981; Proctor et al., 1989; McDevitt und Webber, 1990). Unter den Kollagenen überwiegt Kollagen Typ I (> 90%) (Eyre und Wu, 1983; McDevitt und Webber, 1990), daneben finden sich geringere Mengen Kollagen Typ II, III, V und VI (Cheung, 1987; Wildey und McDevitt, 1998; Wildey et al., 2001). In den nicht-vaskularisierten faserknorpelartigen Anteilen des Gewebes ist Kollagen Typ II zusammen mit Kollagen Typ I koexprimiert und bildet ein gemeinsames Netzwerk (Kambic und McDevitt, 2005). Von innen nach außen findet man im Querschnitt zunehmend Kollagen Typ I und geringe Mengen von Kollagen Typ III und V (Cheung, 1987). Aufgrund des morphologischen Erscheinungsbildes und der Kollagenzusammensetzung wurden die Zellen des Meniskusgewebes von Webber et al. im Jahre 1985 als „Fibrochondrozyten“ bezeichnet. Es ist aber zu vermuten, dass die Zellen an der Oberfläche des Meniskus, in den faserknorpelartigen Anteilen oder in den Bündeln von Kollagen unterschiedliche Populationen darstellen und dass auch die Matrixzusammensetzung je nach Lokalisation im Meniskus unterschiedlich ist.

Innerhalb des Gewebes sind die Kollagenfasern in einer besonderen Weise angeordnet, was vermutlich mit der biomechanischen Beanspruchung des Meniskus im Zusammenhang steht (Proctor et al., 1989). An der zum Tibiaplateau und den Femorkondylen gelegenen Oberflächen des Meniskus findet man jeweils ein Netzwerk feiner Fibrillen, die zur Oberfläche parallel angeordnet, aber sonst in ihrer Ausrichtung zufällig verteilt erscheinen (Petersen und Tillmann, 1998; Kambic und McDevitt, 2005) (**Abb. 2**).

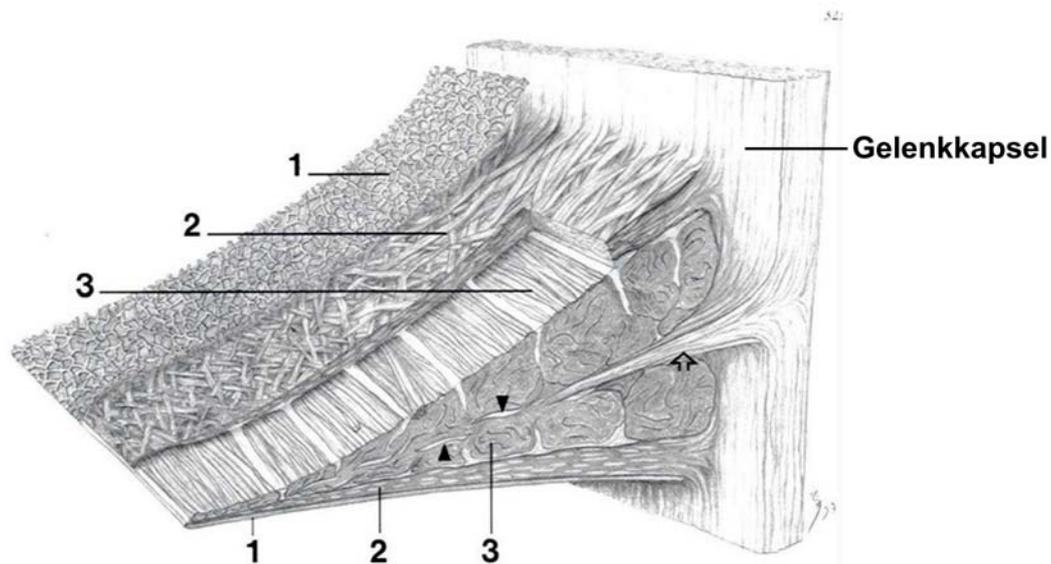


Abb. 2:

Schematische Darstellung der ultrastrukturellen Anordnung der Kollagenfasern im Meniskus. Innerhalb des Meniskusgewebes lassen sich in einem Querschnitt drei Schichten unterscheiden (Petersen und Tillmann, 1998).

1. Netzwerk feiner Fibrillen, die zur Oberfläche parallel angeordnet und in ihrer Ausrichtung zufällig verteilt sind.
2. Schicht von Kollagenfasern, die sich überkreuzen.
3. Kollagenfaserbündel, die überwiegend zirkulär verlaufen (hier quer geschnitten) und die von septenartig angeordneten Verbindungsfasern unterbrochen werden (Pfeilspitzen und Pfeile).

Unter diesem Netzwerk liegt eine Schicht von Kollagenfasern, die sich überkreuzen. Weiter im Inneren besteht der Meniskus hauptsächlich aus Kollagenfaserbündeln, welche als Ausdruck der hohen Zugspannungen, überwiegend zirkulär (der Form des Halbmondes folgend) angeordnet sind. Zwischen diesen Faserbündeln verlaufen radiäre Kollagenfasern, die den Meniskus an der Gelenkkapsel fixieren und solche, die die zirkulär verlaufenden Kollagenfasern septenartig bündeln. Die Dichte der radiären Fasern ist im Bereich großer mechanischer Belastungen sehr hoch (Adams und Hukins, 1992; Skaggs et al., 1994).

Zwischen den Kollagenfasern liegen die Proteoglykane. Diese besitzen eine oder mehrere negativ geladene Polysaccharidketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten (Glykosaminoglykan(GAG)-Seitenketten), die kovalent an ein Kernprotein gebunden sind (z.B. Aggrekan). Die Glykosaminoglykanketten sind stark sulfatiert und besitzen zahlreiche negative Ladungen, die sich gegenseitig abstoßen und Wasser sowie positive freie Ionen in das Gewebe hineinziehen. Die Bedeutung der Proteoglykane für die biomechanischen Eigenschaften des Meniskusgewebes ist bislang kaum untersucht. Von Studien an dem Gelenkknorpel lässt sich aber ableiten, dass durch die fixierten negativen Ladungen der GAG-Seitenketten ein hoher osmotischer Quellungsdruck entsteht, dem die Kollagenfibrillen Widerstand leisten. Bei einer Kompression des Gewebes wird das Wasser verdrängt und ein weiteres Zusammendrücken durch die gegenseitigen Abstoßungskräfte erschwert. Zudem baut sich während der Verdrängung des Wassers ein hydrostatischer Druck auf, da das Wasser durch die Reibungskräfte an der Matrix am Abfließen behindert wird. Durch die Belastung wird die Matrix zunehmend verdichtet, so dass der hydrostatische Druck weiter

ansteigt bis er in einem Gleichgewicht mit der einwirkenden Last steht. Abstoßungskräfte und hydrostatischer Druck wirken der Belastung des Gewebes entgegen und verhindern somit eine zu starke Kompression. Dieser Hypothese folgend federn die Proteoglykane im Zusammenspiel mit Kollagen- und Wasseranteilen der Matrix die bei der Belastung im Kniegelenk auftretenden Kräfte ab und sorgen für eine gleichmäßige Verteilung der wirkenden Kräfte.

Die wichtigsten Glykosaminoglykane (GAGs) der Proteoglykanmoleküle sind Chondroitin-4-Sulfat (CS-4), Chondroitin-6-Sulfat (CS-6), Keratansulfat (KS) und Dermatansulfat (DS). Im Meniskusgewebe kommen neben den großen Proteoglykanen mit vielen CS- und KS-tragenden Seitenketten (Aggrecan, Versican) (McNicol und Roughley, 1980; Roughley et al., 1981; Adams et al., 1983; Willey und McDevitt, 1998; Valiyaveetil et al., 2005), auch die kleinen Proteoglykane mit nur einer oder zwei GAG-tragenden Seitenketten (Decorin, Biglykan) (Roughley und White, 1992; Scott et al., 1997) vor, die über ihre leucin-reichen Wiederholungen mit Kollagenen interagieren können. Das größte und am häufigsten vorkommende Proteoglykan ist das Aggrecan, das aufgrund seiner vielen GAG-tragenden Seitenketten für die stoßdämpfenden Eigenschaften des Gewebes verantwortlich ist. Die beiden kleinen leucin-reichen Proteoglykane Decorin und Biglykan gehören zur Gruppe der Chondroitin-/Dermatan-Sulfat-Proteoglykane. Beide Proteoglykane dienen der Organisation und mechanischen Stabilisierung der extrazellulären Matrix. Im hyalinen Knorpelgewebe bindet Decorin an Kollagenfibrillen in der interterritorialen Matrix und ist an der Regulation der Faserdicke beteiligt (Vogel et al., 1984). Biglykan ist an der Oberfläche des Gelenkknorpelgewebes und in der perizellulären Matrix lokalisiert und schützt vermutlich die Zellen bei Belastungen (Miosge et al., 1994). Ähnliche Funktionen dieser Proteoglykane sind auch in der Matrix des Meniskusgewebes zu vermuten. Der Gehalt an Proteoglykanen ist in den beiden inneren Dritteln des Meniskusgewebes, wo die Druckbelastungen am höchsten sind, höher als im äußeren Bereich (Adams und Muir, 1981). In Abhängigkeit vom Alter, der Spezies und der Lokalisation kann innerhalb des Gewebes die Verteilung und Zusammensetzung der Proteoglykane jedoch variieren (Verbruggen et al., 1996).

Die funktionellen Eigenschaften des Meniskusgewebes werden durch die spezifische Zusammensetzung der Bestandteile der extrazellulären Matrix gegeben. Die Kollagenfasern sind für die Zug- und Reißfestigkeit des Gewebes verantwortlich, während die Proteoglykane dem Meniskusgewebe Druckelastizität und Formstabilität verleihen. Die Zerstörung einer der Komponenten der extrazellulären Matrix muss daher mit einem Verlust der Funktion des Gewebes einhergehen.

1.2.1 Meniskusfunktionen

Die Menisken sind im Kniegelenk für die normale biomechanische Gelenkfunktion unerlässlich (Fithian et al., 1990). So gleichen sie die physiologische Inkongruenz zwischen den stark gebogenen Femorkondylen und dem Tibiaplateau aus, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Krümmung keinen guten Kontakt zueinander haben. Damit wird die größtmögliche Unterstützungsfläche des Tibiaplateaus gesichert und eine punktförmige

Belastung sowie die damit verbundene Abnutzung des Gelenkknorpels am Kniegelenk verhindert (Walker und Erkman, 1975). Die Menisken sind bei einer mechanischen Belastung an der Stoßaufnahme beteiligt und tragen 50-70% der auf das Kniegelenk einwirkenden Kräfte (Ahmed und Burke, 1983). Weiterhin stabilisieren die Menisken das Gelenk und begünstigen die Gelenkschmierung (Fithian et al., 1990).

Die ursprüngliche Annahme, der Meniskus im Kniegelenk sei weitgehend funktionslos, ist also falsch. Eine Entfernung des Gewebes im Sinne der Schmerzreduktion bei einer Funktionsbeeinträchtigung des Gelenkes kann zu einer Degeneration des Gelenkknorpels führen. Dabei verkleinert sich die lastübertragende Fläche und die mechanische Belastung auf die Gelenkflächen nimmt zu. Viele tierexperimentelle Studien, bei denen der Meniskus entfernt wurde, konnten eine daraus resultierende Zerstörung des Gelenkknorpels bestätigen (Roos et al., 1998; Carlson et al., 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse für die Bedeutung des Meniskus bei der Gelenkfunktion wird heutzutage versucht, das Gewebe bei einer Schädigung nach Möglichkeit zu erhalten.

1.2.2 Ursachen für eine Schädigung des Meniskusgewebes

Eine Schädigung des Meniskusgewebes kann durch traumatische oder degenerative Prozesse hervorgerufen werden (DiCarlo, 1992; Rupp et al., 2002). Darüber hinaus kann eine genetische Prädisposition die Ursache dafür sein, dass das Gewebe z.B. bei einer Fehlbildung des Meniskus einer ständigen Überlastung ausgesetzt ist (z.B. Scheibenmeniskus) oder physiologischen Belastungen nicht standhalten kann.

Traumatische Verletzungen treten in der Regel bei einer Kombination einer Druckbelastung mit gleichzeitiger Drehbewegung des Kniegelenkes auf. Bei dieser Bewegung wirken sehr hohe Druck- und Scherkräfte auf das Meniskusgewebe. Es kommt zu Rissen innerhalb des Meniskus, wenn dieser den Bewegungen nicht folgen kann und zwischen den Femurkondylen und der Tibia eingeklemmt wird. Solche Verletzungen treten häufiger bei jüngeren Menschen auf und entstehen in den meisten Fällen bei der Ausübung von Sportaktivitäten bei einem schnellen Richtungswechsel, Gewalteinwirkungen (Fußball, Basketball) oder bei Stürzen (Skifahren). Unklar ist jedoch, ob bereits ein gesunder Meniskus in den beschriebenen Situationen versagt, oder ob das Gewebe vorgeschädigt sein muss.

Im Vergleich zu einer traumatischen Verletzung des Meniskusgewebes kommt es zu einer degenerativen Veränderung aufgrund von Verschleißerscheinungen im Laufe des Lebens. Man spricht in diesem Fall von einer Meniskusdegeneration. Eine dauerhafte Überlastung des Gewebes, z.B. bei einer Achsenfehlstellung (O-Bein- oder X-Bein-Stellung), häufiges Arbeiten in der Hocke oder vorentzündliche Prozesse innerhalb des Gelenkes könnten zu einer Veränderung der biochemischen Eigenschaften führen und eine erhöhte Verletzbarkeit des Gewebes bedingen. Degenerative Gelenkerkrankungen wie die OA sind gekennzeichnet durch einen Abbau des Gelenkknorpels, was mit der Zerstörung wichtiger Bestandteile der extrazellulären Matrix (Proteoglykane, Kollagen) einhergeht und zu einem Funktionsverlust des Knorpels führt. Dabei scheinen Zytokine eine wichtige Rolle bei der Degradation zu spielen.

1.3 Zytokine und Knorpelgewebe

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 können. Sie werden aufgrund ihrer Wirkung in proinflammatorische (z.B. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) und antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-4, IL-10, IL-13) eingeteilt (Martel-Pelletier, 1999; Fernandes et al., 2002). Die proinflammatorischen Zytokine werden als katabole Mediatoren angesehen, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Gelenkerkrankungen spielen, während antiinflammatorische Zytokine diesen entgegenwirken können. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Gelenkerkrankungen können erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-1, -2, -4, -6 sowie TNF- α nachgewiesen werden (Westacott et al., 1990; Schlaak et al., 1996).

Unter den proinflammatorischen Zytokinen wird IL-1 als ein dominierender Mediator der Knorpeldestruktion angesehen und spielt bei der Entstehung von rheumatischen Entzündungen und Gelenkerkrankungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis (RA) und der Osteoarthritis (OA) eine wichtige Rolle (Van de Loo et al., 1995). Unter normalen physiologischen Bedingungen findet man in der Gelenkflüssigkeit IL-1 in den Konzentrationen 6,6 pg/ml (IL-1 α) oder 10 pg/ml (IL-1 β) (Cameron et al., 1997). Bei Patienten mit RA konnten im Vergleich dazu 20- bis 30-fach höhere IL-1-Konzentrationen (> 100 pg/ml) nachgewiesen werden (Schlaak et al., 1996), während in der Synovialflüssigkeit von OA Patienten sich im Mittel Konzentrationen von 28 pg/ml finden (Westacott et al., 1990).

Zahlreiche Untersuchungen an Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel haben gezeigt, dass sich unter dem Einfluss von IL-1 die Proteoglykansynthese (Huch et al., 1997) und die Kollagenproduktion vermindert (Goldring et al., 1988). Weiterhin werden Zellen des Knorpelgewebes unter dem Einfluss von IL-1 angeregt, proteolytische Enzyme freizusetzen (z.B. Matrixmetalloproteinasen, Aggrecanasen), die Bestandteile der extrazellulären Matrix zerstören können (Little et al., 1999; siehe dazu Kapitel 1.5 und 1.6) und eine Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe induzieren.

Durch die Wirkung von IL-1 wird bei entzündlichen Prozessen die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS, NOS2) aktiviert, welche zur Bildung von Stickoxid (NO) beiträgt. Stickoxid (NO) ist ein freies Radikal, welches in geringen Konzentrationen als Signalmolekül für die Regulierung von verschiedenen physiologischen Prozessen bedeutsam ist und eine Vielzahl von Wirkungen vermitteln kann. Bei Gelenkknorpelerkrankungen wie RA und OA scheint NO als Mediator am Knorpelabbau wirksam zu sein (Lotz, 1999), da erhöhte Konzentrationen der induzierten NO-Synthase (iNOS) sowie von Stickoxid in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden konnten (Clancy et al., 1998; Karan et al., 2003). Die Chondrozyten des Gelenkknorpels gelten als die Hauptproduzenten von NO (Henrotin et al., 1993). Jedoch ist beschrieben worden, dass auch Zellen des Meniskusgewebes (Cao et al., 1998; Shin et al., 2003) unter dem Einfluss von IL-1 Stickoxid produzieren können, so dass diese zu einer erhöhten Konzentration von NO in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit einer Verletzung

des Meniskusgewebes beitragen (Haklar et al., 2002). Durch hohe Konzentrationen von Stickoxid kann die Kollagen- und Proteoglykansynthese von Gelenkknorpelzellen gehemmt (Häuselmann et al., 1994b; Taskiran et al., 1994) und die Expression von matrixabbauenden Enzymen gesteigert werden (Murrell et al., 1995; Sasaki et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation (Blanco und Lotz, 1995) sowie die Produktion des IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1 Ra) (Pelletier et al., 1996) vermindert ist und es zu einem Untergang der Zelle durch die Induktion der Apoptose kommt (Blanco et al., 1995; Hashimoto et al., 1999).

Während die meisten der oben aufgeführten Daten von Studien am Gelenkknorpel stammen, ist der Einfluss von IL-1 auf das Meniskusgewebe bislang kaum untersucht.

1.3.1 Interleukin 1 (IL-1)

Zur IL-1-Familie gehören die beiden Agonisten IL-1 alpha (IL1 α) und IL-1 beta (IL-1 β) und der IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1 Ra) (Dinarello, 1991; Dinarello, 1994). IL-1 α und IL-1 β sind auf Aminosäureebene nur zu 26% identisch, binden jedoch an die gleichen Oberflächenrezeptoren und sind in ihrer biologischen Wirkung sehr ähnlich. Bei entzündlichen Prozessen in Gelenken wird IL-1 von einer Vielzahl von Zellen (Makrophagen, Granulozyten, Chondrozyten, Synovialozyten) freigesetzt (Nashan und Luger, 1999). IL-1 α und IL-1 β werden in der Zelle als Vorläufermoleküle (pro IL-1) mit einem Molekulargewicht von 31-33 kDa synthetisiert. Pro IL-1 α ist biologisch aktiv und verbleibt zum größten Teil in der Zelle (Mosley et al., 1987). Bei einer Zerstörung der Zelle gelangt es nach einer Anlagerung von Myristat an die Zelloberfläche (Stevenson et al., 1993), wird nach außen transportiert und durch membranständige kalziumabhängige Proteasen (Calpain) oder durch extrazelluläre Proteasen in eine aktive IL-1-Form mit einem Molekulargewicht von 17 kDa gespalten. Im Vergleich dazu ist pro IL-1 β inaktiv und verbleibt im Zytosol (Singer et al., 1988). Durch ein spezifisches „IL-1 β converting“ Enzym (ICE, Cysteinprotease, Caspase-1) wird es in der Zelle in die aktive IL-1 β Form (17 kDa) gespalten und durch die Zellmembran nach außen abgegeben.

Der IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1 Ra) wird als ein 18-23 kDa Protein synthetisiert (Hannum et al., 1990). IL-1 Ra wird von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Fibroblasten und Chondrozyten gebildet (Dinarello, 1991; Dinarello, 1994). Der Rezeptorantagonist ist auf Aminosäureebene zu 19% mit IL-1 α und zu 26% mit IL-1 β identisch. Im Sinnes eines kompetitiven Inhibitors bindet er an die IL-1 Rezeptoren und ist dadurch in der Lage, die Effekte von IL-1 zu hemmen, da es durch die Bindung des Antagonisten zu keiner Signalauslösung kommt (Arend, 1991).

1.3.2 Interleukin-1 Rezeptoren

IL-1 bindet an einen IL-1 Rezeptor, der zur Immunglobulin-Superfamilie gehört und als IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI), IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1 RII) und als IL-1 Rezeptor-assoziiertes

Protein (IL-1 RAcP) vorkommt. IL-1 RI (80 kDa) wird von vielen Zellen exprimiert (T-Lymphozyten, Fibroblasten, Chondrozyten, Synovialozyten, Endothelzellen), während IL-1 RII (60-68 kDa) vorwiegend auf B-Lymphozyten, Monozyten und Neutrophilen lokalisiert ist (Sims et al., 1989; Groves et al., 1995; Nashan und Luger, 1999). Beide Rezeptoren besitzen drei extrazelluläre immunglobulinartige Domänen, die auf Aminosäureebene zu 28% homolog sind. Sie weisen eine ähnliche Transmembran-Domäne auf, mit welcher sie die Zellmembran durchspannen, und unterscheiden sich nur in ihrer zytoplasmatischen Domäne, die bei beiden Rezeptoren unterschiedlich lang ist. IL-1 RI erstreckt sich mit 213 AS in das Zytoplasma, während IL-1 RII nur 29 AS aufweist. Aufgrund der verkürzten zytoplasmatischen Domäne von IL-1 RII findet die Signaltransduktion nur durch eine Bindung von IL-1 an IL-1 RI statt (Sims et al., 1993). Bereits bei einer Besetzung von < 5% der IL-1 RI kann eine biologische Reaktion ausgelöst werden (Gallis et al., 1989). IL-1 RII übernimmt vermutlich eine regulatorische Funktion, da durch die Bindung von IL-1 an diesen Rezeptor, die Aktivität von IL-1 gehemmt wird („decoy target“) (Colotta et al., 1994). IL-1 α und IL-1 β können an beide Rezeptoren binden, jedoch besitzt IL-1 α eine höhere Affinität zu IL-1 RI und IL-1 β zu IL-1 RII (Scapigliati et al., 1989; Arend et al., 1994). Der IL-1Ra bindet bevorzugt an den signalweiterleitenden IL-1 RI und wirkt als kompetitiver Inhibitor der IL-1 Aktivität. Bei den meisten Zellen lässt sich der IL-1 RI in einer geringen Anzahl nachgewiesen, wobei die Rezeptordichte durch eine Stimulation mit IL-1 gesteigert wird, was eine Erklärung für die erhöhte Sensitivität dieser Zellen darstellt (Martel-Pelletier et al., 1992).

Durch die Bindung von IL-1 an den signalweiterleitenden IL-1 RI können innerhalb der intrazellulären Signaltransduktionskaskade nukleäre Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die eine Expression von verschiedenen Genen in den Zielzellen induzieren können. Neben der IL-1-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B („Nuclear Factor kappa B“) (Largo et al., 2003; Mendes et al., 2003; Martin et al., 2005) ist bei den Chondrozyten des Gelenkknorpels die Aktivierung der „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) beschrieben worden (Geng et al., 1996; Mengshol et al., 2000; Mengshol et al., 2001; Liacini et al., 2002). Zu der Familie der MAPK gehören die „extracellular signal-regulated“ Kinasen (ERK), die „c-Jun N-terminal“ Kinasen (JNK) und p38-MAPK, über die der Transkriptionsfaktor „activating protein-1“ (AP-1) aktiviert werden kann.

1.4 IL-1 Signaltransduktion

1.4.1 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch IL-1

Im Näheren wird hier die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch IL-1 beschrieben, da dieser in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde und an der Regulation der Proteinexpression von Genen beteiligt ist, die bei Entzündungsprozessen eine Zerstörung des extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels hervorrufen können (Berenbaum, 2004). Nach der Bindung von IL-1 an den Rezeptor IL-1 RI heterodimerisiert dieser mit dem IL-1 Rezeptor-assoziierten Protein („receptor accessory protein“, IL-1 RAcP) (Greenfeder et

al., 1995). Durch die Bildung dieses Komplexes wird eine intrazelluläre IL-1 Signaltransduktionskaskade aktiviert, bei der verschiedene Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen durch Proteinkinasen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen können.

Nach der Dimerisierung des Rezeptorkomplexes wird an die zytoplasmatische Rezeptor-Domäne das Adaptermolekül MyD88 („myeloid differentiation marker 88“) rekrutiert (Wesche et al., 1997) (**Abb. 3**). Dieses bindet an den Rezeptorkomplex und aktiviert über das Adaptermolekül Tollip („Toll-interacting protein“) die Serin/Threonin-spezifische Kinase IRAK („IL-1 receptor associated kinase“) (Huang et al., 1997). IRAK wird nach der Phosphorylierung aufgrund einer Konformationsänderung vom Rezeptorkomplex gelöst. Dies führt zu einer Rekrutierung des Adapterproteins TRAF-6 („tumor necrosis factor receptor-associated factor 6“) (Jefferies et al., 2001). Bei der Komplexbildung mit IRAK oligomerisiert TRAF-6 und aktiviert die MAP („mitogen activated protein“-)Kinase TAK1 („transforming growth factor β activated kinase 1“), dessen Translokation von der Zytoplasmamembran ins Zytosol durch IRAK induziert wird (Jiang et al., 2002). TAK1 aktiviert den Kinasekomplex IKK-Komplex („inhibitory κ B (I κ B) kinase complex“). Dieser Proteinkomplex stellt eine Serin-Kinase dar und besteht aus den beiden katalytisch aktiven Kinasen I κ B α (IKK1) und I κ B β (IKK2) und einer regulatorischen Untereinheit I κ B γ , die auch als NEMO („NF- κ B Essential Modulator“) bezeichnet wird und keine Kinaseaktivität aufweist (Yamaoka et al., 1998). Im inaktiven Zustand ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch eine nicht-kovalente Assoziation an inhibitorische Proteine der I κ B-Familie (I κ B α) im Zytoplasma lokalisiert (Karin und Ben-Neriah, 2000). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist ein Heterodimer mit den Untereinheiten p50/p65 und ist ein Mitglied der Rel-Familie der DNA-bindenden Proteine. In Säugetieren sind 5 Rel-Proteine beschrieben worden: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), c-Rel, RelA (p65) und RelB (Ghosh et al., 1998). Die Aktivierung des IKK-Komplexes durch verschiedene Stimuli (IL-1, TNF- α , reaktive Sauerstoffspezies (ROS), UV-Strahlen) führt zu einer Phosphorylierung und Zerstörung der inhibitorischen Proteine der I κ B-Familie und ermöglicht die Freisetzung des Transkriptionsfaktors (Karin und Ben-Neriah, 2000). Erst nach der Aktivierung kann der Transkriptionsfaktor durch eine Translokation der beiden Untereinheiten in den Zellkern an bestimmte Bindungsstellen die Genexpression verschiedener matrix-abbauender Proteasen initiieren (Baldwin, 1996).

Zu den wichtigsten matrix-abbauenden Proteasen, die bei der Zerstörung des Gelenkknorpels eine Rolle spielen können, gehören die Matrixmetalloproteinasen und die Aggrecanasen (siehe Näheres in Kapitel 1.5 und Kapitel 1.6). Bei Chondrozyten ist die durch IL-1-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Largo et al., 2003; Mendes et al., 2003; Schulze-Tanzil et al., 2004, Martin et al., 2005) unerlässlich für eine Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen (Mengshol et al., 2000; Elliott et al., 2002; Liacini et al., 2002; Vincenti und Brinckerhoff, 2002). Auch anhand von Untersuchungen an Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung von NF- κ B die IL-1-induzierte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 und MMP-3 (Bond et al., 1999; Bondeson et al., 2000) sowie von MMP-2 und MMP-9 reguliert werden kann (Xie et al., 2004).

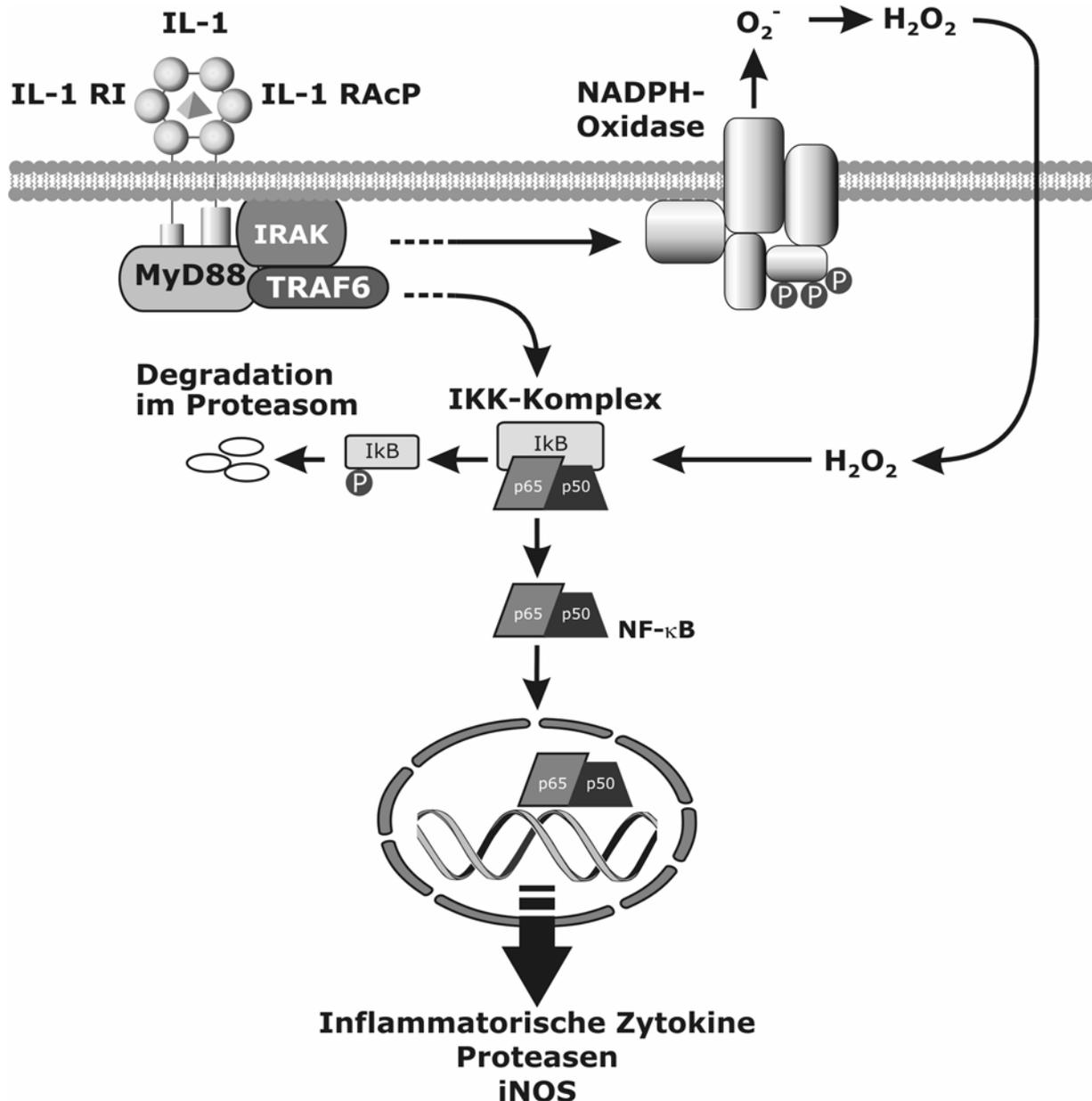


Abb. 3:
Vereinfachtes Schema der IL-1 Signaltransduktion über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB. Nach der Bindung von IL-1 an den Interleukin-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) und der Komplexbildung mit dem IL-1 Rezeptor-assoziierten Protein (IL-1 RAcP) wird eine intrazelluläre IL-1 Signaltransduktionskaskade aktiviert, die zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führt. Über das Adaptermolekül MyD88 und die Serin/Threonin-Kinase IRAK wird über verschiedene weitere Adaptermoleküle und MAP-Kinasen (nähere Beschreibung über den Ablauf siehe Text) der Kinasekomplex IKK-Komplex aktiviert, an welchen im inaktiven Zustand NF-κB gebunden ist. Die Aktivierung des IKK-Komplexes durch IL-1 führt zu einer Phosphorylierung und Zerstörung der inhibitorischen Einheit von IκB im Proteasom und ermöglicht die Freisetzung des Transkriptionsfaktors. Durch eine Translokation der beiden Untereinheiten von NF-κB in den Zellkern kann die Expression verschiedener Gene reguliert werden. Alternativ kann durch die Wirkung von IL-1 die NADPH-Oxidase aktiviert werden, welche Superoxidanionen (O_2^-) als reaktive Sauerstoffspezies freisetzt, über die Hydrogenperoxid (H_2O_2) entsteht, das ebenfalls eine Aktivierung von NF-κB vermitteln kann (modifiziert nach Brigelius-Flohé et al., 2004).

1.4.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Neben der oben beschriebenen Rezeptor-vermittelten Aktivierung von NF- κ B im Rahmen der IL-1 Signaltransduktion kann der Transkriptionsfaktor über die Wirkung von freien Sauerstoffradikalen aktiviert werden (Schreck et al., 1991; Mendes et al., 2003), wobei die Aktivierung zelltyp-abhängig ist. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind hochreaktive Derivate des Sauerstoffs und kommen als Nebenprodukte oder Mediatoren in der Signalkaskade verschiedener Stoffwechselfvorgänge vor. Zur Gruppe der ROS gehören Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale (HO^\cdot), Stickstoffmonoxid (NO) und Hydrogenperoxid (H_2O_2). ROS können in der Atmungskette von Mitochondrien im Rahmen der Energiegewinnung gebildet werden oder durch die Stimulation von Oxidasen entstehen. Ein Beispiel ist die NADPH-Oxidase, die in der Plasmamembran einer Vielzahl verschiedener Zellen (Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten) lokalisiert ist (Meier et al., 1991; Hiran et al., 1997). Durch die Wirkung von IL-1 kann bei Entzündungsreaktionen die NADPH-Oxidase aktiviert werden und eine Freisetzung von ROS bedingen (Lo et al., 1998).

Chondrozyten des Gelenkknorpels setzen bei Entzündungsreaktionen Superoxidanionen (O_2^-) frei, über die Hydrogenperoxid (H_2O_2) entsteht (Henrotin et al. 1993), das zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen kann (**Abb. 3**). ROS können intrazellulär die Expression kataboler Enzyme oder den apoptotischen Zelltod induzieren (Asada et al. 2001); sie hemmen die Proteoglykansynthese (Baker et al., 1988) und zerstören extrazellulär die Matrix (Tiku et al. 1999). In hohen Konzentrationen sind ROS daher an der Destruktion des Gelenkknorpels im Rahmen von entzündlichen Gelenkerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis beteiligt (Rowley et al. 1984). Um eine überschüssige Produktion von ROS zu vermeiden, haben die meisten Zellen endogene Schutzmechanismen entwickelt. Hierzu gehören antioxidative Enzyme (Antioxidantien) wie z.B. die Superoxiddismutase (SOD), die Superoxidanionen (O_2^-) zu H_2O_2 und O_2 umwandelt. Da das dabei entstandene H_2O_2 selbst oxidativen Stress verursachen kann, wird es durch Enzyme wie die Katalase und die Glutathionperoxidase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. In menschlichen Zellen können drei Formen der SOD unterschieden werden: die zytosolische Cu/Zn-SOD, die mitochondriale Mn-SOD und die extrazelluläre SOD (EC-SOD). In Knorpelzellen kommen im Wesentlichen die Katalase, Glutathionperoxidase, Cu/Zn-SOD und Mn-SOD vor (Grazioli et al., 1998). Während die oben genannten Erkenntnisse an Studien am Gelenkknorpel oder anderen Geweben und dessen Zellen gewonnen wurden, sind die Wirkung sowie die Signaltransduktionswege von IL-1 und von ROS am Meniskusgewebe und an Meniskuszellen weitgehend unbekannt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss einer antioxidativ wirksamen Substanz auf die IL-1-vermittelte Zellantwort von Meniskuszellen und -gewebe untersucht. Hierfür diente ein Mn(III)Porphyrin, welches Superoxidanionen und H_2O_2 eliminieren kann, in der Literatur aber als Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm) bezeichnet wird (Dwyer et al., 1998).

1.5 Die Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs, Matrixine) gehören zur Familie der Zink (Zn^{2+})- und Calcium (Ca^{2+})-abhängigen Endopeptidasen. Bisher sind in Vertebraten 24 MMPs beschrieben worden, wovon 23 im humanen Gewebe vorkommen (Nagase et al., 2006).

1.5.1 Funktion von Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen spielen bei physiologischen und 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 extrazellulären Matrix (Kollagen, Proteoglykane, Glykoproteine) beteiligt (Birkedal-Hansen et al., 1993). Sie erfüllen im Rahmen der Neubildung und Strukturhaltung bei der Embryonalentwicklung, Zellproliferation, Zellmigration, Osteogenese, Angiogenese und Wundheilung eine wichtige Funktion (Visse und Nagase, 2003). Die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen wird durch spezifische endogene Inhibitoren (TIMPs, „tissue inhibitors of metalloproteinases“) sowie unspezifisch durch α_2 -Makroglobulin reguliert (Baker et al., 2002). Bei pathologischen Prozessen ist das Gleichgewicht zwischen den MMPs und den natürlichen Inhibitoren gestört, so dass durch eine vermehrte Anreicherung oder Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen im Gewebe es zu einem verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix kommt (Dean et al., 1989). Unter pathologischen Bedingungen können MMPs daher an der Entstehung von Krankheiten und entzündlichen Prozessen beteiligt sein (RA, OA, Atherosklerose, Tumordinvasion, Metastasierung) (Brinckerhoff et al., 2000; Murphy et al., 2002; Elkington et al., 2005).

Matrixmetalloproteinasen 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 MMPs („membrane-type“ MMPs, MT-MMPs) (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) (Nagase et al., 2006). Beim Gelenkknorpel spielen die Kollagenasen MMP-1 und MMP-13 eine wichtige Rolle bei der Zerstörung des Kollagengerüsts, wobei MMP-13 eine 10 x stärkere Zerstörung von Kollagen Typ II induzieren kann (Mitchell et al., 1996) und die Expression in OA-verändertem Gelenkknorpel deutlich erhöht ist (Billinghurst et al., 1997). Bei entzündlichen Gelenkerkrankungen ist die Expression der Gelatinasen MMP-2 und -9 gesteigert (Mohtai et al., 1993; Duerr et al., 2004). Eine besondere Stellung nimmt MMP-3 ein, da es verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix umsetzen kann (Tetlow et al., 2001). Eine Übersicht über einige Matrixmetalloproteinasen, die im Gelenkknorpel nachgewiesen werden konnten und bei der Pathogenese von Gelenkerkrankungen eine wichtige Rolle spielen können sowie deren Substrate findet sich in **Tab. 1** (Murphy et al., 2002; Somerville et al., 2003).

Tab. 1: Übersicht über einige Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die an der Degradation des Gelenkknorpels beteiligt sind (Murphy et al., 2002; Somerville et al., 2003).

Name	MMP	Substrate	Aktivierung
Kollagenasen			
Kollagenase-1	MMP-1	Kollagen Typ I, II, III, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrekan, Versikan, Link-Protein, Casein	pro-MMP-2, -9
Kollagenase-2	MMP-8	Kollagen Typ I, II, III, V, VII, VIII, X, Gelatine, Aggrekan	pro-MMP-8
Kollagenase-3	MMP-13	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, IX, XI, Gelatine, Aggrekan, Casein	pro MMP-9, -13
Gelatinasen			
Gelatinase-A	MMP-2	Kollagen Typ I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV, Gelatine, Aggrekan, Link-Protein, Versikan, Decorin	pro-MMP-9, -13
Gelatinase-B	MMP-9	Kollagen Typ IV, V, VII, X, XIV, Gelatine, Aggrekan, Versikan, Link-Protein	pro-MMP-9, -13
Stomelysin			
Stomelysin-1	MMP-3	Kollagen Typ II, III, IV, IX, X, XI, Gelatine, Aggrekan, Casein, Decorin, Versikan	pro-MMP-1, -7, -8, -9, -13
membran-gebundene MMPs („membrane-type“-MMPs)			
MT1-MMP	MMP-14	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Aggrekan, Dermatansulfat-PG	pro-MMP-2, -13
MT2-MMP	MMP-15	Kollagen Typ I, II, III, Gelatine, Aggrekan	pro-MMP-2, -13
MT3-MMP	MMP-16	Kollagen I, III, Gelatine, Aggrekan, Casein	pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Gelatine	

Kollagenasen spalten fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III) in ihrer tripel-helikalen Domäne an spezifischen Stellen, so dass Fragmente von $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ der ursprünglichen Molekülgröße entstehen. Die Spaltung durch diese Enzyme macht die Kollagenmoleküle thermisch instabil, so dass sie sich entwinden und nicht-helikale Gelatineverbindungen entstehen, die von Gelatinasen weiter gespalten werden können. Stromelysine weisen eine breite Substratspezifität auf. Sie können verschiedene Kollagentypen, Proteoglykane und Glykoproteine hydrolysieren. Alle membranständigen Matrixmetalloproteinasen mit Ausnahme von MT4-MMP (English et al., 2000) spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von pro-MMP-2 (Imai et al., 1997b).

1.5.2 Struktur von Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen bestehen aus einem Signalpeptid, einer Pro-Domäne, einer katalytischen Domäne, einer „hinge“-Region und einer Hämopexin-ähnlichen Domäne. Am N-terminalen Ende befindet sich die Signalpeptid-Domäne (Prä-Domäne, 18-30 AS), die für den Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) und die extrazelluläre Sekretion

verantwortlich ist und nach der Synthese der Proteinase abgespalten wird (Murphy et al., 2002). Die Propeptid-Domäne (80 AS) besitzt eine „cysteine-switch“ Region. Durch die Bindung des Cysteins an ein Zinkatom werden MMPs aufgrund der Faltung des Propeptids über der katalytischen Domäne in einem inaktiven Zustand (pro-MMPs) gehalten. Das Cystein der Propeptid-Domäne besetzt im aktiven Zentrum die vierte Koordinationsstelle des Zinkatoms der katalytischen Domäne und verhindert, dass Wassermoleküle, die für die katalytische Aktivität wichtig sind, an das Zinkatom gebunden werden. Durch einen „cysteine-switch“ Mechanismus wird aufgrund einer Konformationsänderung oder einer proteolytischen Abspaltung des Propeptids die nicht-kovalente Bindung zwischen der Thiolgruppe des Cysteins und dem Zinkatom unterbrochen und das Enzym durch die Bindung eines Wassermoleküls aktiviert (Van Wart und Birkedal-Hansen, 1990; Springmann et al., 1995). Erst nach der Entfaltung der enzymatischen Aktivität sind MMPs in der Lage Substrate zu spalten. In der katalytischen Domäne (170 AS) besitzen die MMPs im aktiven Zentrum ein Zink-bindendes Motiv. Neben dem für die katalytische Aktivität verantwortlichen Zinkatom besitzen die Matrixmetalloproteinasen zur Stabilisierung und Expression der enzymatischen Aktivität ein weiteres Zink- und 2-3 Calciumionen. Die katalytische Domäne weist bei den Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) drei Wiederholungen eines Fibronectin Typ II Motivs (175 AS) auf, die für die Substratspezifität der Gelatine-spaltenden Enzyme verantwortlich sind. Die Hämapexin-ähnliche (Hpx)-Domäne (200-210 AS) am C-terminalen Ende ist für die katalytische Substratspezifität wichtig und kann die Bindung von TIMPs an die Domäne beeinflussen. Die Hämapexin-ähnliche Domäne und katalytische Domäne sind über eine Prolin-reiche „hinge“ Region, deren Funktion unbekannt ist, miteinander verbunden. Die membrangebundenen Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) sind an der Oberfläche von Zellmembranen gebunden und besitzen eine zytoplasmatische (20 AS) und eine Transmembran-Domäne. Sie dienen der Aktivierung von anderen Enzymen.

1.5.3 Aktivierung und Regulation von Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen werden von einer Vielzahl von Zellen (Makrophagen, Fibroblasten, Chondrozyten, Endothelzellen, Epithelzellen) (Okada et al., 1992; Dreier et al., 2001) als inaktive Proenzyme (pro-MMPs oder Zymogene) in den extrazellulären Raum synthetisiert (Nagase et al., 1997) und anschließend aktiviert. Eine Ausnahme bilden die MT-MMPs, sowie MMP-11, MMP-23 und MMP-28, die intrazellulär durch Proprotein-Convertasen (Furine) innerhalb des sekretorischen Weges aktiviert werden (Pei und Weiss, 1995). Die Expression der meisten MMPs ist unter normalen physiologischen Bedingungen gering. Die katalytische Aktivität der Matrixmetalloproteinasen kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden (Aktivierung von inaktiven Proenzymen, Transkription, Inhibition). Für eine Aktivierung der Proteinase muss die Verbindung des Cysteins an das Zinkatom gespalten werden. Die Zymogene der meisten MMPs können in vivo über proteolytische Spaltung durch endogene Proteinase (Serinproteinasen, Cysteinproteinasen, Matrixmetalloproteinasen) an der „bait“-Region aktiviert werden. Wird ein Teil des Propeptids durch eine intramolekulare Spaltung entfernt, so wird die restliche Propeptid-Domäne durch

eine Bindung von Wasser destabilisiert. Nach einer Abspaltung des verbleibenden Propeptidrestes durch teilaktive oder aktive MMPs kommt es dann zu einer vollständigen Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen. So ist bekannt, dass aktives MMP-3 die pro Form von MMP-1 und MMP-13 aktivieren kann (Murphy et al., 1987). In vitro können MMPs durch chemische Zusätze (Quecksilberverbindungen, Phorbol ester, Iodacetamid), denaturierende Substanzen (SDS, Harnstoff) und physikalische Reize (Hitze, UV-Strahlung, ROS, NO) aktiviert werden (Nagase, 1997). Die transkriptionale Regulation von MMPs erfolgt durch inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF-alpha), Wachstumsfaktoren, Hormone und Veränderung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Benbow und Brinckerhoff, 1997). Die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen kann unter normalen physiologischen Bedingungen durch TIMPs („tissue inhibitors of metalloproteinases“) gehemmt werden, indem diese nicht-kovalent in einer Stöchiometrie 1:1 an das aktive Zentrum der katalytischen Domäne binden (Apte et al., 1995). Zurzeit sind vier Formen der Inhibitoren bekannt (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4), die ein Molekulargewicht von 21-28 kDa aufweisen (Baker et al., 2002). Sie bestehen aus einer inhibitorischen N-terminalen Domäne, welche mit der Zn^{2+} -Bindungsstelle der aktiven MMPs in Wechselwirkung treten kann, und einer C-terminalen Domäne, welche an die Hämapexin-ähnliche Domäne der Proteasen bindet und deren Aktivierung vermittelt. TIMPs sind in der Lage, die Aktivität von nahezu allen Matrixmetalloproteinasen zu hemmen, können jedoch auch an anderen biologischen Funktionen beteiligt sein (Visse und Nagase, 2003). TIMP-3 unterscheidet sich in seiner inhibitorischen Fähigkeit von den anderen Inhibitoren, da es überwiegend die Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 hemmt (Kashiwagi et al., 2001, Hashimoto et al., 2001; Gendron et al., 2003) und eine Bindungsaffinität zu sulfatierten Glykosaminoglykanen aufweist (Yu et al., 2000).

Bei Gelenkerkrankungen wie der OA kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Synthese von MMPs und TIMPs, so dass daraus eine Zunahme der proteolytischen Aktivität der Matrixmetalloproteinasen resultieren kann (Dean et al., 1989). OA-veränderter Knorpel zeigt eine erhöhte Expression von TIMP-2 (Martel-Pelletier et al., 1994) und -3, während die Expression von TIMP-1 und TIMP-4 herunterreguliert ist (Kevorkian et al., 2004). Über die Bildung eines Komplexes von membrangebundenen MT-MMPs (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP), TIMP-2 und pro-MMP-2 kann die Matrixmetalloproteinase MMP-2 aktiviert werden (Visse und Nagase, 2003). In vitro Untersuchungen haben zeigen können, dass in rheumatoiden synovialen Fibroblasten die Produktion von TIMP-3 durch IL-1 gesteigert wird (Takizawa et al., 2000).

1.6 Die Aggrekanasen

Die Aggrekanasen gehören ebenfalls wie die Matrixmetalloproteinasen zu den Zink (Zn^{2+})-abhängigen Metalloendopeptidasen. Sie werden den ADAMTS („a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs“) zugeordnet, die zur Zeit aus 19 Mitglieder bestehen und eine Untergruppe der Adamalysine (ADAMs, „a disintegrin and metalloproteinases“) bilden (Porter et al., 2005).

1.6.1 Funktion von Aggrekanasen

Während Matrixmetalloproteinasen verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix umsetzen können, sind Aggrekanasen ausschließlich an der Spaltung von aggregierenden Proteoglykanen und dabei im Besonderen an Aggrekan beteiligt. Zu den Aggrekanasen gehören ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9 und -15 (Porter et al., 2005). Im Gelenkknorpel konnten die Aggrekanasen ADAMTS-1, -4 und -5 nachgewiesen werden (Flannery et al., 1999), die unter normalen physiologischen Bedingungen am Turnover des Aggrekans mit beteiligt sind, denen bei der Entstehung von Gelenkerkrankungen und der Destruktion des Gelenkknorpels aber eine besonders große pathologische Bedeutung zugeschrieben wird (Lohmander et al., 1993b; Kuno et al., 2000; Tortorella et al., 2001). In **Tab. 2** ist eine Übersicht der Aggrekanasen aufgeführt, die in der Lage sind, Aggrekan zu spalten und an der Zerstörung und zum Verlust von Knorpelgewebe beitragen können (Nagase und Kashiwagi, 2003; Porter et al., 2005).

Tab. 2: Übersicht über einige Aggrekanasen, die an der Zerstörung von Proteoglykanen im Knorpelgewebe beteiligt sind (Nagase und Kashiwagi, 2003; Porter et al., 2005).

Name	ADAMTS	Substrat
Aggrekanase-3	ADAMTS-1	Aggrekan, Versikan
Aggrekanase-1	ADAMTS-4	Aggrekan, Brevican, Versikan
Aggrekanase-2	ADAMTS-5	Aggrekan

1.6.2 Struktur von Aggrekanasen

Ähnlich wie die Matrixmetalloproteinasen sind auch die Aggrekanasen aus mehreren Domänen aufgebaut. Sie bestehen aus einem Signalpeptid, einer Propeptid-Domäne, einer katalytischen Domäne, eine Disintegrin-ähnlichen Domäne, einem Thrombospondin Typ I Motiv, einer cysteinreichen Domäne, einer Spacer-Domäne und einer weiteren Thrombospondin-Domäne mit einer variablen Anzahl von Thrombospondin-Wiederholungen. Am N-terminalen Ende liegt die Prodomäne (220-300 AS, mehr als 170 AS), die die Enzyme in ihrer inaktiven Form hält und zur Aktivierung beseitigt werden muss. Diese Pro-Domäne ist wichtig für die korrekte Faltung und Sekretion und besitzt eine Bindungsstelle für Furin, eine Proprotein-Convertase. In der katalytischen Domäne besitzen die Aggrekanasen im aktiven Zentrum, an dem die Spaltung des Substrats erfolgt, ein Zink-bindendes Motiv. Die Funktion der Disintegrin-ähnlichen Domäne (60-90 AS) ist unbekannt, während die zentrale Thrombospondin-Domäne vermutlich an der Substraterkennung beteiligt ist und eine Bindung an Bestandteile der EZM ermöglicht. ADAMTS-4 bindet über diese Thrombospondin-Domäne an die sulfatierten Glykosaminoglykane der CS-reichen Region von Aggrekan (Tortorella et al., 2000a). Am C-terminalen Ende liegt die Spacer-Domäne mit einer variablen Länge (127-221 AS) gefolgt von einer weiteren Thrombospondin-Domäne, mit einer unterschiedlichen Anzahl von Thrombospondin (TS)-Wiederholungen (Porter et al., 2005). Bei der Aggrekanase ADAMTS-4 findet man hier keine weiteren TS-Wiederholungen.

Verschiedene Isoformen von ADAMTS-1 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000), ADAMTS-4 (Gao et al., 2002; Gao et al., 2004; Kashiwagi et al., 2004) und ADAMTS-5 (Zeng et al., 2006), die durch eine autokatalytische Spaltung innerhalb der Spacer- und CS-reichen Domäne hervorgegangen sind, weisen andere Substratspezifitäten auf. Über die Thrombospondin-Domäne wird vermutlich die Bindung an die GAG-tragenden Seitenketten des Aggrekans und die Spaltung vermittelt (Tortorella et al., 2000b).

1.6.3 Aktivierung und Regulation von Aggrekanasen

Über die Regulation von Aggrekanasen ist bisher wenig bekannt. Aggrekanasen können als inaktive Proenzyme von Chondrozyten und Fibroblasten der Synovialmembran synthetisiert werden (Hughes et al., 1998; Ilic et al., 2000). In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Expression von Aggrekanasen als Antwort auf IL-1. So konnte in einigen Arbeiten am Gelenkknorpel durch IL-1 eine erhöhte Expression der Aggrekanasen nachgewiesen werden (Tortorella et al., 2001; Pattoli et al., 2005) während andere keine oder nur eine geringe Expression gefunden hatten (Flannery et al.; 1999; Pratta et al., 2003a). Dabei variieren auch die Angaben darüber, welche der beiden Aggrekanasen (ADAMTS-4 und/oder ADAMTS-5) auf mRNA-Ebene beeinflusst wird. Es ist daher anzunehmen, dass die durch IL-1 veränderte Aktivität von Aggrekanasen nur oder auch posttranslational reguliert wird (Nagase und Kashiwagi, 2003). Spezifische Proteasen können Aggrekanasen durch C-terminale Spaltung aktivieren (Porter et al., 2005). Patwari et al. (2005) hatten beschrieben, dass die IL-1-bedingte Spaltung von Aggrekan nicht von einer deutlichen Veränderung der ADAMTS-4 mRNA Expression begleitet ist. Daher hatten sie postuliert, dass die Spaltung durch bereits existierende Aggrekanasen vermittelt wird. Diese bereits vorhandenen Aggrekanasen können z.B. durch die Wirkung der membran-gebundenen Matrixmetalloproteinase MT4-MMP aktiviert werden (Gao et al., 2004). Durch die C-terminale Spaltung von ADAMTS-4 entstehen auf diesem Weg verschiedene kleinere Isoformen (Gao et al., 2002), welche aus der EZM freigesetzt werden und sich in ihren Substratspezifitäten unterscheiden (Gao et al., 2004; Kashiwagi et al., 2004). Nach einer Stimulation mit IL-1 können dementsprechend in Gelenkknorpelimplantaten sowie den dazugehörigen Kulturmedien MT4-MMP sowie die verschiedenen Isoformen des ADAMTS-4 nachgewiesen werden (Patwari et al., 2005). Ebenso ist bereits beschrieben worden, dass unter in vitro Bedingungen MMP-2, MMP-8 und MT2-MMP die C-terminale Spaltung von ADAMTS-1 vermitteln können (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000). Neben der Regulation durch MMPs kann die Aktivität der Aggrekanasen zudem aber auch durch den endogenen Inhibitor TIMP-3 mit K_i -Werten im subnanomolaren Bereich gehemmt werden (Hashimoto et al., 2001; Kashiwagi et al., 2001; Gendron et al., 2003).

Über das IL-1-abhängige Expressionsmuster von Aggrekanasen im Meniskusgewebe sowie dessen Regulation ist bislang nichts bekannt.

1.7 Wirkungsweise von matrix-abbauenden Proteasen bei Gelenkerkrankungen

Die Pathogenese der Osteoarthritis ist gekennzeichnet durch eine Zerstörung wichtiger Bestandteile der extrazellulären Matrix. Aggrecan ist eine der ersten Matrixkomponenten, die bei der Zerstörung des Gelenkknorpels einem messbaren Verlust durch proteolytische Enzyme unterliegt und eine Abnahme der Funktionseigenschaften innerhalb des Gewebes bedingt. Untersuchungen an Explantatkulturen haben gezeigt, dass durch IL-1 innerhalb der ersten Woche zunächst Aggrecan als Zeichen einer Degradation der extrazellulären Matrix und erst im weiteren Verlauf Kollagen zerstört wird (Kozaci et al., 1997; Pratta et al., 2003b). Im Meniskus stellt Aggrecan eines der wichtigsten großen Proteoglykane dar (McNicol und Roughley, 1980; Roughley et al., 1981; Adams et al., 1983; Wildev und McDevitt, 1998; Valiyaveetil et al., 2005). Es besteht aus einem zentralen Proteinkern („core protein“), an den viele sulfatierte Glykosaminoglykan(GAG)-Seitenketten kovalent gebunden sind (**Abb. 4**). Das „core protein“ hat ein Molekulargewicht von 250 kDa und besteht aus drei globulären Domänen (G1, G2, G3) (Hardingham und Fosang, 1992; Roughley und Lee, 1994). Am N-terminalen Ende befindet sich die G1-Domäne, die über ein Bindungsprotein („link protein“) nicht-kovalent an Hyaluronan (HA) gebunden ist. Über diese Bindung können große Aggrecanaggregate mit bis zu 100 Aggrecan-Molekülen/HA entstehen. Die G1-Domäne ist über eine interglobuläre Domäne (IGD) mit der G2-Domäne verbunden. Am C-terminalen Ende liegt die G3-Domäne. Zwischen G2 und G3 liegen Bindungsstellen für KS- und CS-tragende Glykosaminoglykane. Zellen des Knorpelgewebes werden unter dem Einfluss von IL-1 dazu angeregt, proteolytische Enzyme wie z.B. Matrixmetalloproteinasen und Aggrecanasen freizusetzen, die eine Zerstörung des Aggrecans im Bereich der IGD und zwischen den Domänen G2 und G3 induzieren können (Little et al., 1999; Tortorella et al., 2001).

Innerhalb der interglobulären Domäne (IGD) von Aggrecan wurden zwei wichtige Angriffsstellen für proteolytische Enzyme beschrieben. Durch eine Spaltung an diesen Stellen, bleibt die G1-Domäne an Hyaluronan gebunden, während die entstandenen Spaltfragmente des Aggrecans mit den GAG-tragenden Seitenketten aus dem Gewebe hinausdiffundieren können und einen Verlust der Funktionseigenschaften für das Gewebe zur Folge haben. Je nachdem, an welcher Stelle die Spaltung durch proteolytische Enzyme erfolgt, weisen die entstandenen Aggrecan-Bruchstückenden (Neopeptide) eine unterschiedliche Aminosäuresequenz auf. Durch die Verwendung von geeigneten Antikörpern, die gegen die entstandenen Neopeptide gerichtet sind, können solche Spaltprodukte im Gewebe und den Kulturüberständen nachgewiesen werden.

Bei Gelenkerkrankungen wie der OA und RA ist die Konzentration der matrix-abbauenden Proteasen im Gelenkknorpel und in der Synovialflüssigkeit deutlich erhöht, so dass vermutet wird, dass diese proteolytischen Enzyme an der Zerstörung des Knorpelgewebes beteiligt sind (Lohmander et al., 1993a; Lark et al., 1997). Analysen von Aggrecan-Fragmenten aus Gelenkknorpel-explantaten, die mit IL-1 stimuliert wurden, haben gezeigt, dass Aggrecan durch MMPs an der Aminosäureposition Asn³⁴¹-Phe³⁴² gespalten wird und die Bruchstücke

C-terminale Neopeptide mit der Endigung -VDIPES³⁴¹ (bovine Sequenz, -VDIPEN humane Sequenz) aufweisen. Die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13 und MT1-MMP können an dieser Spaltung beteiligt sein (Fosang et al., 1991; Flannery et al., 1992; Fosang et al., 1993; Fosang et al., 1994; Fosang et al., 1994; Fosang et al., 1996; Fosang et al., 1998; Imai et al., 1997b). Daneben ist beschrieben worden, dass ADAMTS-4 auch in der Lage ist, an der MMP-spezifischen Stelle zu spalten, jedoch erst wenn Aggrecan zuvor an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ gespalten wurde (Westling et al., 2002).

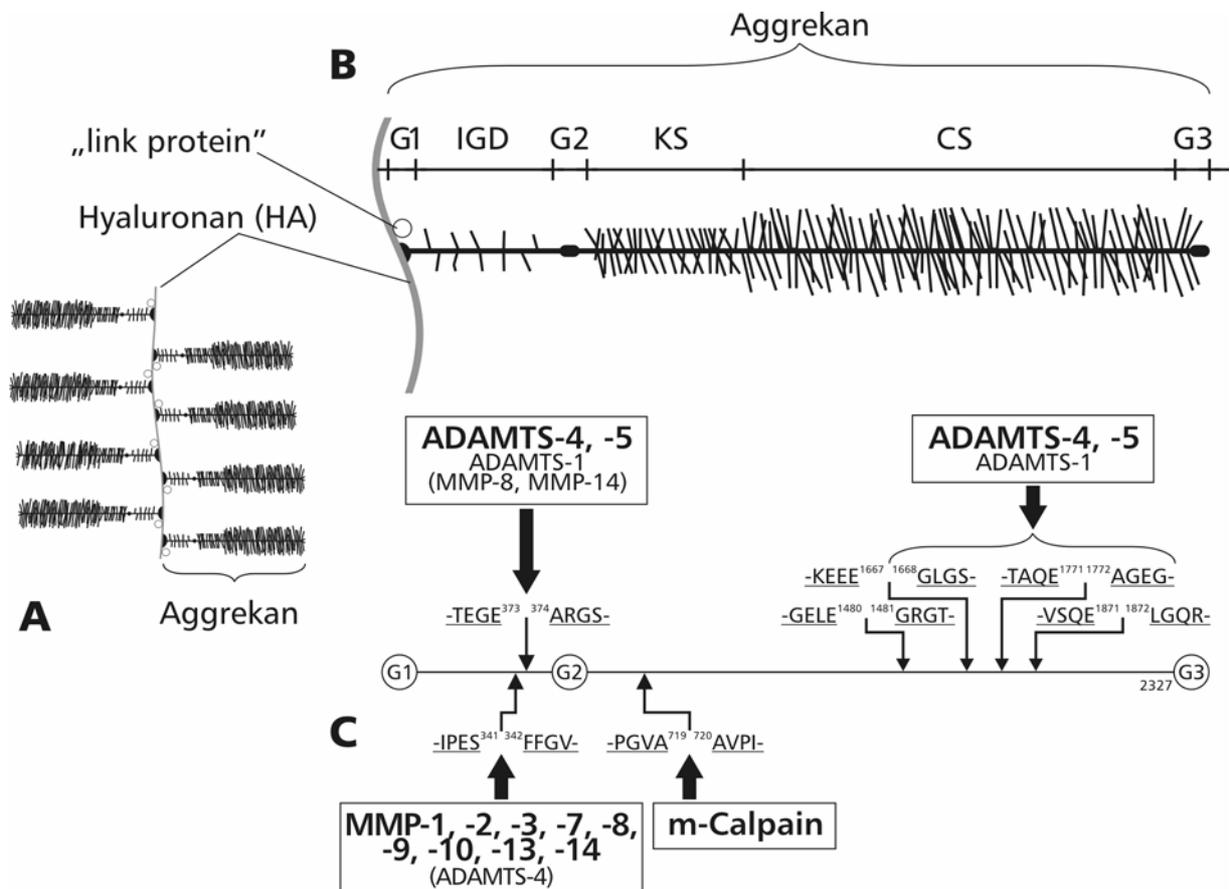


Abb. 4: Schematische Darstellung zur Bindung von Aggrecan an Hyaluronan über ein „link protein“ (A) sowie zum Aufbau (B) und den Spaltstellen mit den Bruchstückenden (Neopeptiden), die durch die Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen (MMPs, Aggrecanasen, Calpain) entstehen (C). Aggrecan besteht aus drei globulären Domänen (G1, G2, G3) (B). Am N-terminalen Ende ist das Aggrecan mit der G1-Domäne über ein Bindungsprotein („link protein“) an Hyaluronan (HA) gebunden, so dass große Aggrecanaggregate entstehen (A). Innerhalb der interglobulären Domäne (IGD) zwischen den Domänen G1 und G2 finden sich zwei wichtige Angriffsstellen für Matrixmetalloproteinasen (an der Stelle Asn³⁴¹-Phe³⁴²) und Aggrecanasen (an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ hauptsächlich durch die Aktivität von ADAMTS-4 und -5) (C). Am C-terminalen Ende liegt die G3-Domäne. Zwischen G2 und G3 liegen Bindungsstellen für Keratansulfat (KS)- und Chondroitinsulfat (CS)-tragende Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAGs). Durch die Wirkung von m-Calpain kann Aggrecan an der Stelle Ala⁷¹⁹ innerhalb der KS-reichen Region gespalten werden. Innerhalb der CS-reichen Region finden sich vier weitere Angriffsstellen für Aggrecanasen. Weitere Beschreibung siehe Text (modifiziert nach Adams und Hukins, 1992; Struglics et al., 2006).

Durch die Aktivität von Aggrekanasen wird Aggrekan an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ gespalten und die entstandenen Spaltprodukte weisen die Endigung -TEGE³⁷³ auf (Sandy et al., 1991; Arner et al., 1999). Die einzigen Matrixmetalloproteinasen, die in der Lage sind, Aggrekan an der Aggrekanase-spezifischen Stelle innerhalb der IGD zu spalten sind MMP-8 (Fosang et al., 1994) und MMP-14 (MT1-MMP) (Fosang et al., 1998; Büttner et al., 1998), wobei diese zunächst an der Stelle Asn³⁴¹-Phe³⁴² eine Spaltung induzieren. Eine effizientere Spaltung von Aggrekan durch Aggrekanasen erfolgt an vier weiteren Angriffsstellen zwischen der G2- und G3-Domäne innerhalb der CS-reichen Region: -GELE¹⁴⁸⁰⁻¹⁴⁸¹GRGT-, -KEEE¹⁶⁶⁷⁻¹⁶⁶⁸GLGS-, -TAQE¹⁷⁷¹⁻¹⁷⁷²AGEG- und -VSQE¹⁸⁷¹⁻¹⁸⁷²LGQR- (Ilic et al., 2000; Tortorella et al., 2000b) (**Abb. 4**).

Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von Aggrekan an diesen Stellen im Gelenkknorpel hauptsächlich durch die Aggrekanasen ADAMTS-4 und -5 (zu 90%) vermittelt wird (Tortorella et al., 1999, Tortorella et al., 2001; Westling et al., 2002). In vitro Untersuchungen an OA-verändertem Gelenkknorpel konnten zeigen, dass Aggrekan durch eine Hemmung dieser Aggrekanasen vor einer Zerstörung geschützt ist (Malfait et al., 2002). Die IL-1-induzierte Freisetzung von Glykosaminoglykanen in Gelenkknorpel-explantaten, als Zeichen einer Zerstörung des Gewebes, kann durch die Wirkung von TIMP-3, einem Aggrekanase-Inhibitor, signifikant gehemmt werden (Gendron et al., 2003). Auch ADAMTS-1 wird ein destruktives Potential durch die Spaltung von Aggrekan an den Stellen Glu³⁷³-Ala³⁷⁴, Glu¹⁷⁷¹-Ala¹⁷⁷² (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002) und Glu¹⁶⁶⁷-Gly¹⁶⁶⁸ (Kuno et al., 2000) zugeschrieben, jedoch benötigt es eine deutlich höhere Wirkkonzentration gegenüber ADAMTS-4 und -5 (Tortorella et al., 2001).

Zwischen der G2- und G3-Domäne des Aggrekans wurde innerhalb der KS-reichen Region an der Stelle Ala⁷¹⁹-Ala⁷²⁰ eine weitere Spaltstelle nachgewiesen, die durch die Wirkung einer neutralen Ca²⁺-abhängigen Cysteinprotease, eines Calpains induziert wurde (Oshita et al., 2004). Die dabei entstandenen Fragmente weisen die Endigung -PGVA⁷¹⁹ auf. Calpain ist ein Heterodimer (110 kDa), welches sich aus einer großen katalytischen (80 kDa) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit (30 kDa) zusammensetzt (Suzuki et al., 2004). Calpaine werden in ubiquitäre und gewebespezifische Calpaine unterteilt, welche in zytoplasmatischer oder membran-gebundener Form in den Zellen vorkommen können. Innerhalb der ubiquitär verbreiteten Calpaine unterscheidet man zwischen μ -Calpain (Calpain 1) und m-Calpain (Calpain 2), die unterschiedliche Ca²⁺-Konzentrationen (im mikro- oder millimolarer Bereich) zur Aktivierung benötigen. Bei Gelenkerkrankungen wie der OA und RA wurde m-Calpain in Chondrozyten des Gelenkknorpels und in Zellen der Synovialmembran und in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen (Yamamoto et al., 1992; Szomor et al., 1999). Daher wurde angenommen, dass neben den Matrixmetalloproteinasen und Aggrekanasen auch Calpaine eine wichtige Rolle bei der Zerstörung des Knorpelgewebes und dabei im Besonderen an der Spaltung von Aggrekan spielen.

Im Gelenkknorpel von OA Patienten lassen sich Aggrekan-Fragmente nachweisen, die hauptsächlich durch die Aktivität von proteolytischen Enzymen entstanden sind, die zur Familie der Matrixmetalloproteinasen gehören (Fosang et al., 1991; Fosang et al., 1996, Sandy und Verscharen, 2001), während in der Synovialflüssigkeit nur Spaltprodukte von

Aggrecan zu finden sind, die auf eine Aggrecanase-Aktivität hindeuten (Sandy et al., 1992; Lohmander et al., 1993b; Lark et al., 1997, Sandy und Verscharen, 2001). Daher wurde angenommen, dass die IL-1-induzierte Zerstörung des Aggrecans und die damit verbundene Freisetzung von GAG-tragenden Spaltprodukten aus dem Gewebe durch die Wirkungsweise von Aggrecanasen und nicht durch MMPs vermittelt wird (Pratta et al., 2003a; Arner et al., 1998; Tortorella et al., 2001, Westling et al., 2002). Es wurde beschrieben, dass Matrixmetalloproteinasen unabhängig von der Wirkung einer Aggrecanase-Aktivität (welche nur intaktes Aggrecan spaltet) überwiegend an bereits gespaltenen Aggrecanfragmenten wirken (Sandy, 2006) und somit nur zu 1-3% an der Freisetzung der GAG-tragenden Aggrecanfragmente beitragen (Little et al., 1999; Fosang et al., 2000). In kürzlich durchgeführten Untersuchungen der Synovialflüssigkeit und des Gelenkknorpels von OA Patienten konnte jedoch gezeigt werden, dass 20-25% der GAG-tragenden Aggrecan-Fragmente in der Synovialflüssigkeit die Endigung ³⁴²FFGV- tragen und somit durch die Wirkung von MMPs freigesetzt wurden, während 55-60% durch die Aktivität einer Aggrecanase entstanden sind, da sie die Endigung ³⁷⁴ARGS- aufwiesen (Struglics et al., 2006). Daher sind weitere Untersuchungen im Hinblick darauf, welche spezifischen Mitglieder der MMP- und Aggrecanase-Familie eine Zerstörung des Aggrecans bedingen können, notwendig.

Durch Matrixmetalloproteinasen kann die Fragmentierung der Proteoglykane beschleunigt werden. Da MMPs neben Aggrecan auch Kollagene spalten können, wird durch eine Zerstörung des Kollagennetzes das Grundgerüst der Matrix zusätzlich gelockert, so dass die Vergrößerung der Matrixporen im Gewebe ein Abdiffundieren von Matrixbestandteilen erleichtert. Der Verlust der Proteoglykane und die Schädigung des Kollagennetzwerkes können schließlich zur Folge haben, dass die Kollagene für Proteasen leichter zugänglich sind, so dass das Kollagen Grundgerüst noch weiter abgebaut werden kann.

Aggrecan und Kollagen Typ II stellen die wichtigsten Komponenten der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels dar. Daneben gibt es noch weitere Bestandteile, die eine wichtige Funktion im Gewebe erfüllen können. Von besonderem Interesse sind die kleinen leucinreichen Proteoglykane, zu denen Decorin und Biglykan gehören. Diese Moleküle haben die Fähigkeit mit Kollagenfibrillen in Wechselwirkung zu treten und tragen zur Stabilisierung bei (Vogel et al., 1984). Weiterhin wird vermutet, dass die Kollagenfibrillen durch die Bindung an die kleinen Proteoglykane vor einem proteolytischen Angriff geschützt sind (Monfort et al., 2006). Bei einer Zerstörung dieser Proteoglykane kann jedoch die Bindung verloren gehen, so dass es zu einem Verlust der Gewebeintegrität aufgrund der fehlenden Wechselwirkung kommen kann. Matrixmetalloproteinasen als auch Aggrecanasen können eine Spaltung dieser Proteoglykane induzieren (Imai et al., 1997a; Sandy et al., 2001; Kashiwagi et al., 2004; Montfort et al., 2006).

Während die oben aufgeführten Daten zur Funktion und dem Vorkommen von Matrixabbauenden Enzymen bei Gelenkerkrankungen in erste Linie von Untersuchungen an Gelenkknorpelgewebe oder Gelenkflüssigkeit stammen ist bislang wenig darüber bekannt, welche Matrixbestandteile im Meniskusgewebe vorkommen und wie diese (z.B. durch die

Aktivierung von Enzymen wie MMPs, Aggrecanasen oder Calpain) im Rahmen von Gelenkerkrankungen abgebaut werden.

1.8 Beeinflussung der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Enzymen durch synthetische Inhibitoren

Nach dem heutigen Stand sind MMPs unter normalen physiologischen Prozessen an Auf- und Umbauprozessen der EZM beteiligt, können jedoch unter pathologischen Bedingungen aufgrund einer vermehrten Anreicherung eine Zerstörung von wichtigen Bestandteilen der extrazellulären Matrix zur Folge haben. In den letzten Jahren wurden zur Behandlung von verschiedenen Erkrankungen, die mit einer übermäßigen Zerstörung von Bestandteilen der EZM einhergehen, synthetische MMP-Inhibitoren mit einem kleinen Molekulargewicht entwickelt, die kompetitiv das Zinkatom am aktiven Zentrum besetzen und dadurch MMPs in ihrer Wirkung hemmen können (Rothenberg et al., 1999). In einigen Untersuchungen an Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von MMP-/Aggrecanase-Inhibitoren die Zerstörung wichtiger Komponenten der extrazellulären Matrix unterdrückt wird, indem die enzymatischen Aktivitäten dieser Proteasen gehemmt wurden (Nixon et al., 1991; Bottomley et al., 1997).

Unter den Matrixmetalloproteinasen nimmt MMP-3 eine besondere Stellung ein, da es die Fähigkeit besitzt, verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix (Proteoglykane, Kollagen) zu zerstören und andere Matrixmetalloproteinasen (pro-MMP-1, -7, -8, -9 und -13) zu aktivieren (Nagase et al., 2006). Da sich erhöhte Konzentrationen von MMP-3 bei Gelenkerkrankungen sowohl im Knorpelgewebe (Tetlow et al., 2001; Martel-Pelletier et al., 1994) als auch in der Synovialflüssigkeit (Yoshihara et al., 2000) finden lassen, wird vermutet, dass diese Protease bei der Zerstörung eine wichtige Rolle spielt. MacPherson et al. (1997) haben einen synthetischen MMP-3-Inhibitor MMI270B (frühere Bezeichnung: CGS 27023A) entwickelt, der in einem Tiermodell die Zerstörung des Gelenkknorpelgewebes, welche durch eine intraartikuläre Injektion von MMP-3 induziert wurde, hemmen konnte. Dieser MMP-Inhibitor ist ein Breitband-Inhibitor mit einem hohen inhibitorischen Potential unter in vitro Bedingungen für die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -9 und -13 mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich (MacPherson et al., 1997). In einem weiteren OA-Tiermodell, bei dem die Menisken entfernt wurden, konnte gezeigt werden, dass durch die orale Aufnahme des MMP-Inhibitors die Abnahme des GAG-Gehaltes aufgehoben wurde (Doughty et al., 1997). Dagegen konnte bei in vitro Untersuchungen am Gelenkknorpelgewebe die IL-1-bedingte Freisetzung von Glykosaminoglykanen durch diesen MMP-Inhibitor nicht beeinflusst werden; jedoch wurde die perizelluläre Anfärbbarkeit der Proteoglykane vor einem IL-1-induzierten Verlust geschützt (Ganu et al., 1998).

1.9 Ziele und Fragestellung

Degenerative Gelenkerkrankungen wie die OA sind gekennzeichnet durch eine Zerstörung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und den Abbau des Gelenkknorpels. Bei diesen Prozessen spielen proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren wurde hauptsächlich die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 auf den Gelenkknorpel untersucht. Die entscheidenden katabolen Mechanismen bei der Wirkungsweise von IL-1 sind eine verringerte Synthese von extrazellulären Matrixbestandteilen und eine gesteigerte Spaltung der Matrixmoleküle der Extrazellulärmatrix durch proteolytische Enzyme. Die Pathomechanismen, die zu einer Degeneration des Meniskusgewebes führen, sind bislang jedoch nicht bekannt.

Um zu klären, welche biochemischen und zellbiologischen Prozesse eine degenerative Veränderung des Meniskus bedingen können, wurde die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 als eine Modellsubstanz einerseits auf isolierte Zellen des Meniskusgewebes betrachtet, da diese für die Aufrechterhaltung der Bestandteile der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Des Weiteren wurde ein in vitro-Modell etabliert, welches ermöglicht, unter standardisierten Bedingungen die Wirkung von IL-1 an Gewebekulturen zu untersuchen, da diese eine differenzierte Betrachtung der Zellen in ihrer natürlichen Gewebeumgebung sowie der EZM erlauben. Da bei einer degenerativen Schädigung des Gelenkknorpels die Zerstörung der Proteoglykane eines der ersten Ereignisse darstellt und diese maßgeblich an den Funktionseigenschaften des Gewebes beteiligt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen der Abbau der Proteoglykane des Meniskusgewebes untersucht. Neben den Studien zum Einfluss von IL-1 auf den Glykosaminoglykangehalt wurden die Biosyntheseaktivität und die Produktion von Stickoxid (NO) beim Meniskusgewebe im Vergleich zum Gelenkknorpel betrachtet. Da sich innerhalb des Meniskusgewebes im Hinblick auf die Form und Anordnung der Zellen sowie die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix Unterschiede erkennen lassen, sollte zudem untersucht werden, ob auch in der Wirkung von IL-1 lokale Unterschiede zu beobachten sind.

Erste vorläufige Untersuchungen am humanen Meniskusgewebe sollten dazu dienen, zu zeigen, ob das in der vorliegenden Arbeit etablierte System am bovinen Meniskusgewebe sich auf das humane System übertragen lässt.

Im Einzelnen stellten sich folgende Fragen:

- a. Welchen Einfluss hat IL-1 auf Meniskuszellen?
- Wie können Meniskuszellen isoliert werden und wie verhalten sie sich im Vergleich zu Zellen in dem Gewebeverband bezüglich der Expression von Matrixmolekülen?
 - Welche biochemischen Veränderungen werden durch IL-1 im Hinblick auf eine Expression von matrix-abbauenden Proteasen in Meniskuszellen hervorgerufen?
 - Kann in Meniskuszellen durch IL-1 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B vermittelt werden?
 - Welche Rolle spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors bei der Expression von matrix-abbauenden Proteasen in Meniskuszellen?
 - Kann die Aktivierung des Transkriptionsfaktors und die IL-1-induzierte Genexpression matrix-abbauender Enzyme durch antioxidative Substanzen, wie z.B. ein Superoxiddismutase (SOD)-Mimetikum, beeinflusst werden?
- b. Welchen Einfluss hat IL-1 auf Meniskugewebe?
- Welchen Einfluss hat IL-1 auf den Abbau der Proteoglykane, die Biosyntheseaktivität und die Produktion von Stickoxid (NO) des Meniskugewebes?
 - Welche matrix-abbauenden Proteasen werden im Meniskus durch IL-1 heraufreguliert?
 - Kann die Freisetzung von Glykosaminoglykanen und die Spaltung von Aggrekan durch die Zugabe eines Matrixmetalloproteinase-Inhibitors beeinflusst werden?
 - Kann die Freisetzung von Glykosaminoglykanen, die Produktion von NO sowie die Expression von matrix-abbauenden Proteasen durch die Zugabe eines Superoxiddismutase (SOD)-Mimetikums beeinflusst werden?
 - Lassen sich in der Wirkung von IL-1 lokale Unterschiede („oberflächlich“ vs. „tief“) innerhalb des zonal aufgebauten Meniskugewebes finden?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Aceton	Merck
Acrylamid	Serva
AEBSF	Sigma
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Aminohexansäure	Sigma
Ammoniumacetat	Merck
Amphotericin	PAA
Aprotinin	Sigma
APS	Roth
Aquatex®	Merck
Acrylamid	Serva
Acryl-/Bisacrylamid NuPAGE	Invitrogen
Benzamidin	Sigma
β-Casein	Fluka
β-Glycerol-Phosphat	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
BioRad Protein Assay	BioRad
Bisacrylamid	Serva
Bisbenzimid	Sigma
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Promega
BSA	Sigma
CaCl ₂	Merck
Chemilumineszenzreagenz ECL-Kit	Amersham Pharmacia
Chloramin-T	Merck
Chloroform	Merck
Chondroitinase ABC	Seikagaku, Falmouth, MA, USA
Chondroitin-C-Sulfat	Sigma
Citronensäure	Merck
Coomassie-Brilliant-Blue-R-250	Severa
CyQuant-Kit	MoBiTec
DAB-Kit	Roche
DE52 Zellulose	Whatman
DePeX®	Serva
Dextranblau	Sigma
DMEM	Sigma
DMMB	Polysciences
DMSO	Sigma

dNTP Mix	Fermentas
DTT	Fluka
DMEM/Ham's	PAA
EDTA	Fluka
Endo- β -galactosidase	Seikagaku, Falmouth, MA, USA
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
FKS	Biochrom AG
Gel Shift Assay System	Promega
Gelatine	Sigma
Glutamin	Roth
Glycerin	Fluka
Glycin	Roth
Griess-Reagenz	Sigma
Guanidin-HCl	Roth
H ₂ O ₂	Roth
Ham's F-12 Medium	Biochrom KG
Hämatoxylin	Merck
Harnstoff	Merck
HBSS	Biochrom AG
HCl	Merck
HEPES	Biochrom AG
Hyaluronidase	Sigma
Hyaluronidase <i>Streptomyces hyalurolyticus</i>	Seikagaku, Falmouth, MA, USA
¹²⁵ I-Iod	Amersham Pharmacia
Iodacetamid	Sigma
Isopropanol	Merck
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
Kalium-Chromsulfat-12-Hydrat	Merck
KCl	Merck
Keratanase II	Seikagaku, Falmouth, MA, USA
Kollagenase	Sigma
L-Cystein	Sarstedt
Magermilchpulver	BioRad
Manganese(III)tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) Porphyrin	Alexis Biochemicals, Grünberg
Pentachlorid (MnTMPyP)	
Mayer's Hämlaunlösung	Merck
MES	Sigma
Methanol	Merck
Methylbenzoat	Roth
MMP-3 Inhibitor II	Calbiochem
Na ₂ B ₄ O ₇ (Borax)	Sigma
Na ₂ EDTA	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na-Acetat	Merck

NaCl	Roth
NaNO ₂	Merck
NaOH	Merck
Natrium-Pyrophosphat	Sigma
Na-Pyruvat	Biochrom AG
Natrium-Vanadat	Sigma
NukleoSpin [®] RNA II Kit	Macherey-Nagel
Opti Phase Hi Safe 3 (Szintillationsflüssigkeit)	Perkin Elmer
[³² P]-ATP	Amersham Pharmacia
[³ H]-Prolin	Amersham Pharmacia
Papain	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast (Paraffin)	Sherwood Medical, St. Louis, USA
PBS	Biochrom AG
pd(N) ₆ Random Hexamer	Amersham Biosciences
Penicillin G	PAA
Pepsin	Sigma
Pepstatin	Sigma
PMSF	Roth
Prolin	Sigma
Propanol	Roth
Pyronin G	Merck
Qiagen QuantiTect [®] SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
Qiagen [®] One Step RT-PCR	Qiagen
5 x Reaction Buffer	Fermentas
recombinant human IL-1 α	R & D Systems
recombinant human IL-1 α CF	R & D Systems
Revert Aid [™] H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
RQ1 RNase-freie DNase	Promega
[³⁵ S]-Sulfat	Amersham Pharmacia
SDS	Serva
Sephadex [™] G-25 Superfine	Amersham Biosciences
Streptomycinsulfat	PAA
TaqMan [®] -Sonden	Applied Biosystems
TEMED	Sigma
Toluidinblau	Merck
Trichloressigsäure	Merck
Tris	Sigma
Tris-Acetat	Sigma
2 x Tris-Glycin-SDS Sammelpuffer	Novex
Tris-HCl	Merck
Triton-X-100	Roth
Trizol	Invitrogen
Trypanblau	Sigma
Trypsin	Sigma
Tween-20	Merck
Tyrosin	Sigma

Vitamin C	Sigma
Vitamin E	Sigma
Xylol	Roth
Aqua dest.	Biochrom AG

Die für die Durchführung der RT- und real time RT-PCR verwendeten Primerpaare (Angaben zu den Primer-Sequenzen siehe Kapitel 2.13.3.1, Tab. 6 und Kapitel 2.13.4.1, Tab. 8) wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

2.1.2 Antikörper

Produkt	Hersteller
AK Anti-human IL-1 RI (AF269)	R & D Systems
AK Anti-Kollagen Typ I (C-2456)	Sigma
AK Anti-Kollagen Typ II Holmdahl	DSHB, Iowa, USA
AK Anti-m-Calpain (MA3-942)	Dianova GmbH, Hamburg
AK Kaninchen Anti-Maus IgG (P0260)	Dako
AK Kaninchen Anti-Ziege IgG (P0449)	Dako
AK Ziege Anti-Kaninchen IgG (P0448)	Dako

Die Antikörper zur Darstellung der Proteoglykane sowie der Spaltfragmente von Aggrekan (siehe Kapitel 2.12.5) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. John D. Sandy (Tampa, Florida, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Materialien und Geräte

Produkt	Hersteller
24er-Wellplatte	Sarstedt
96er-Mikrotiterplatte	Sarstedt
25 cm ² Kulturflaschen	Sarstedt
75 cm ² Kulturflaschen	Sarstedt
Autoradiographie-Filme	Kodak
Autoradiographiekassette	Amersham Biosciences
Chemilumineszenz-Film (Hyperfilm TM ECL)	Amersham Pharmacia
Deckgläschen	Menzel-Gläser
Dialysegerät (Slide-a-Lyzer mini 10000 MWCO)	Pierce
Dispergiergerät (Polytron PT 3000)	Kinematica AG
Einmalfilter	Sarstedt
Elektrodenkammer	BioRad
Elektrophoresekammer	Biometra
ELISA-Reader (SLT)	Labinstruments GmbH
Eppendorf-Caps	Eppendorf
Gazefilter (Porengröße 20 µm)	Hydrobios, Kiel
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus
Gefriertrocknungsanlage (Lyovac GT 2)	Heraeus

Gelgießstand (Wide mini-Sub [®] Cell GT)	BioRad
Glasplatten	Amersham Pharmacia
Hyper Ladder IV	Bioline, Luckenwalde
Kühlschrank/Gefrierschrank (-20 °C)	Privileg
MicroSpin [™] G-25 Säule“	Amersham Pharmacia
Mikroskop Axioskop	Zeiss
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikrotom (RM 2165)	Leica, Bensheim
Mikrowelle	Severin
Molekulargewichtsstandard (#161-0372, #161-0305)	BioRad
Netzanschlussgerät (Power Pac 200)	BioRad
Neubauer Zählkammer	Assistent
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
Novex [™] Pre-Cast Gele	Novex
O ₂ /CO ₂ -regulierter Brutschrank	Heraeus
Objekträger HistoBond	Marienfeld
Photometer Ultraspec II	Biochrom, Cambridge
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastibrand Einmalküvetten	Brand
Poly-Prep-Chromatographiesäule	BioRad
RIA-Röhrchen	Sarstedt
Rüttler	Polzin Laborbedarf, Eppendorf
SDS-Polyacrylamid-Fertiggele (# 161-1113, 161-1114)	BioRad
Skalpell (Cutoff 10)	Aesculap AG
Skalpellklingen	Bayha
Spectrophotometer (U 2000)	Hitachi
Stanzen (3 mm)	Lamoral
Stanzen (10 mm)	Arthrex
sterile Werkbank	Herasafe
Szintillationszähler (Wallac1904)	Wallac, Turku, Finnland
Thermoblock (DB-120)	Kisker Biotech, Steinfurt
Tischzentrifuge	Heraeus
Thermocycler (Primus 96)	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV-Transilluminator	Herolab
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Waage (Genius)	Sartorius
Wasserbäder	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
	Memmert, Eydam
Whatman-Filterpapiere	Biometra (Whatman)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge Megafuge	Heraeus
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt
γ-Counter	Wallac, Freiburg

2.2 Zellkultur

2.2.1 Die Isolierung und Kultivierung von bovinen Meniskusexplantaten

Kulturmedium für Explantate:

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

HBSS-Lösung mit Antibiotika:

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

In der vorliegenden Arbeit wurde ein in vitro Modell etabliert, mit dessen Hilfe der Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf Meniskusgewebe einer definierten Form und Größe untersucht werden konnte. Für die Untersuchungen wurde hauptsächlich Meniskusgewebe von Rindern (< 2 Jahren) aus ökologischer Tierhaltung (Hofschlachtereier Muhs, Krumbek) und in einigen Versuchen aus organisatorischen Gründen von Schlachtrindern (Norddeutsche Fleischzentrale GmbH, Bad Bramstedt) verwendet. Einen Tag nach der Schlachtung der Tiere wurden die Kniegelenke zur Verfügung gestellt und waren bis zur Präparation bei 6-8°C gelagert. Sie wurden unter sterilen Bedingungen eröffnet. Nach einer Durchtrennung der Kreuzbänder waren die Menisken frei zugänglich. Diese konnten herauspräpariert werden, nachdem die periphere Anheftung an der Gelenkkapsel abgelöst und die Verbindungen am Vorder- und Hinterhorn durchtrennt waren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Menisken in die HBSS-Lösung (mit Antibiotika) überführt. Mit Hilfe einer Stanze wurden aus den medialen und lateralen Menisken einzelne Zylinder mit einem Durchmesser von 10 mm entnommen (siehe **Abb. 5**). Die Stanze wurde so an die Menisken angelegt, dass periphere Anteile des Meniskusgewebes, die eine Vaskularisierung aufwiesen, nicht miteinbezogen wurden. Mit Hilfe eines Skalpell wurde anschließend von der planen Unterseite des Meniskusgewebes, welche im Kniegelenk direkt dem Tibiaplateau aufliegt, jeweils eine ca. 1 mm dicke Meniskusscheibe von dem oberflächlichen Meniskusgewebe („oberflächlich“), sowie aus einem etwas tieferen Bereich des Gewebes („tief“) hergestellt. Aus diesen Meniskusscheiben (Durchmesser 10 mm, Dicke 1 mm) wurden 4-5 kleinere Meniskusexplantate mit einem Durchmesser von 3 mm herausgestanzt. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichtes wurden die aus den medialen und lateralen Menisken gewonnenen Explantate gleichmäßig auf die verschiedenen Versuchsgruppen aufgeteilt und in Kulturmedium überführt. Je nach Versuchsdurchführung wurden die Explantate 3 oder 6

Tage kultiviert, wobei nach 3 Tagen das Medium gewechselt wurde. Die Kulturbedingungen in jeder Versuchsgruppe wurden so gewählt, dass entweder jeweils 1 Explantat in einer 96er-Wellplatte in 250 µl Kulturmedium oder 3 Explantate in einer 24er-Wellplatte mit 1 ml serumfreiem Medium bei 37°C kultiviert wurden.

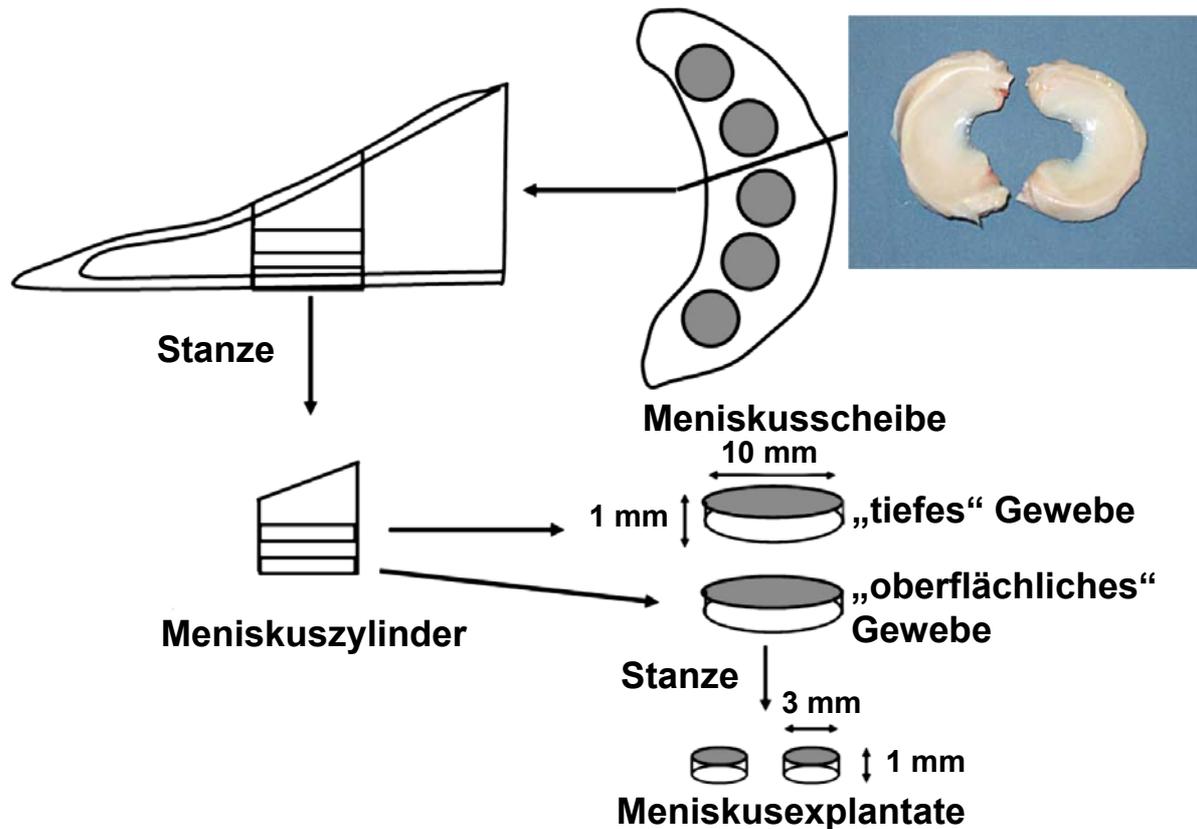


Abb. 5:
Schematische Darstellung zur Herstellung von Meniskusexplantaten.

2.2.2 Die Isolierung und Kultivierung von Explantaten aus humanem Meniskusgewebe

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete humane Meniskusgewebe stammte von Patienten aus der Endo-Klinik (Hamburg) und musste aufgrund pathologischer Kniegelenksveränderungen bei chirurgischen Eingriffen entnommen werden. Es handelte sich dabei um Meniskusgewebe von zwei Patienten. Das herauspräparierte Meniskusgewebe wurde bis zur weiteren Verarbeitung im Labor in einem sterilen Gefäß mit HBSS spezial Lösung aufbewahrt und kühl gelagert. Nachdem umgebendes Synovialgewebe und periphere Anteile des Meniskusgewebes mit einer erkennbaren Vaskularisation entfernt wurden, konnten die Meniskusexplantate (Durchmesser 3 mm, Dicke 1 mm) nach dem gleichen Prinzip wie bei den Explantaten aus dem bovinen Meniskusgewebe hergestellt werden (siehe 2.2.1). Die Stimulationsdauer der humanen Meniskusexplantate betrug insgesamt 6 Tage, wobei nach drei Tagen das Medium gewechselt wurde. In ersten Untersuchungen zur Genexpression von matrix-abbauenden

Enzymen auf mRNA Ebene (siehe 2.13) wurde humanes Meniskusgewebe von Körperspendern des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel verwendet. Für immunhistochemische Untersuchungen (siehe 2.11) wurden Querschnitte des Meniskusgewebes hergestellt und für eine Einbettung in Paraformaldehyd überführt.

2.2.3 Die Isolierung und Kultivierung von bovinen Gelenkknorpel-explantaten

Um die Wirkung von IL-1 auf verschiedene Knorpelgewebe (Faserknorpel im Meniskus und hyalinen Gelenkknorpel) untersuchen zu können, wurden neben der Gewinnung von Meniskus-explantaten für einige Untersuchungen zusätzlich Gelenkknorpel-explantate entnommen. Mit Hilfe einer Hohlfräse wurden Knochen-/Knorpelzylinder (9 mm Durchmesser) aus der Facies patellaris femoris herausgebohrt (siehe Abb. 6).

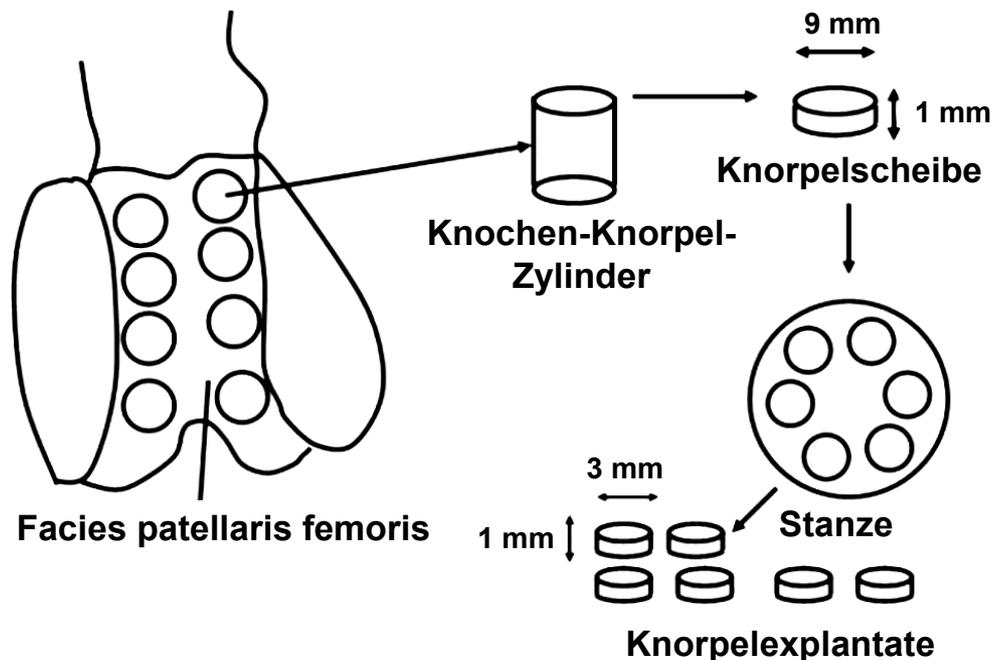


Abb. 6:
Schematische Darstellung zur Herstellung von Gelenkknorpel-explantaten.

Während des gesamten Bohrvorgangs wurde die Gelenkfläche mit einer HBSS-Lösung (mit Antibiotika) gespült, um eine Überhitzung des Gewebes beim Bohren zu vermeiden. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurde eine ebene Knorpelfläche der Knochen-/Knorpelzylinder geschaffen und anschließend eine ca. 1 mm dicke Knorpelscheibe vom Knochen heruntergehobelt. Aus diesen Scheiben konnten wiederum kleinere Knorpel-explantate mit einem Durchmesser von 3 mm herausgestanzt werden. Die Knorpel-explantate wurden daraufhin in Medium überführt und wie die Meniskus-explantate kultiviert (siehe 2.2.1).

2.2.4 Die Isolierung und Kultivierung von bovinen Meniskuszellen

Kulturmedium für Zellen:

	Ham`s F-12 Medium
10% (v/v)	foetales Kälberserum (FKS)
50 µg/ml	Vitamin C
50 µM	Vitamin E
10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 µg/ml	Amphotericin

Kollagenaselösung für den Enzymverdau:

	Ham`s F-12 Medium
9,18 KU/ml	Kollagenase

Neben der Untersuchung des Einflusses von IL-1 auf Meniskusgewebe wurde die Wirkung auf enzymatisch isolierte Meniskuszellen analysiert. Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Zellen wurden ausschließlich aus den Menisken von Rindern aus der Ökotierhaltung gewonnen. Die Menisken wurden aus dem Kniegelenk herauspräpariert und anliegendes Kapselgewebe entfernt. Um eine größere Ausbeute an Zellen zu erhalten wurden von beiden oberflächlichen Seiten des Meniskusgewebes (von der zur Tibia angrenzenden planen Seite, welche bereits für die Herstellung der Meniskusexplantate verwendet wurde, sowie von der zu den Femurkondylen gerichteten konkaven Seite) ca. 2 mm dicke Gewebestücke mit einem Skalpell herausgeschnitten und in eine HBSS-Lösung (mit Antibiotika) überführt. Die Gewebestücke wurden anschließend in ca. 2 x 2 mm kleine Stückchen zerkleinert und dreimal mit HBSS-Lösung gespült. Um die Zellen aus ihrer Extrazellulärmatrix herauszulösen, wurden die von der Ober- und Unterseite des medialen und lateralen Meniskus herausgeschnittenen Gewebestückchen in 10 ml Kollagenaselösung überführt und für 17 h unter Schütteln bei 37°C im Wasserbad verdaut. Die Zellsuspension wurde im Anschluss an den Verdau zentrifugiert (10 min bei 1000 x g). Da nach der Zentrifugation kein Pellet erkennbar war, wurde bis auf 1 ml der Überstand verworfen und der Rest der Zellsuspension in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe eines Gazefilters, (Porengröße 20 µm) durch den die Probe mit Hilfe einer Einmalspritze gedrückt wurde, sollten vorhandene Zellaggregate in der Zellsuspension getrennt werden. Die Zellen der Einzelzellsuspension wurden mit Hilfe des Trypanblau-Ausschluss-Tests auf ihre Vitalität hin untersucht. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension zu 20 µl Trypanblau gegeben und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Durch das Trypanblau wurden tote Zellen angefärbt, da ihre Zellmembran für den Farbstoff durchlässig war. Da die Ausbeute an isolierten Meniskuszellen sehr gering ausfiel, konnten keine Untersuchungen an Primärkulturen durchgeführt werden. Daher wurden die Zellen in eine Kulturflasche (75 cm²) mit 16 ml Kulturmedium überführt und für 1,5 Wochen bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Sobald die Meniskuszellen einen konfluenten Monolayer gebildet hatten, wurden diese einen Tag vor Versuchsbeginn subkultiviert (siehe 2.2.7) und in einer Dichte von 2 x 10⁶ Zellen in kleinen Kulturflaschen (25 cm²) mit serumhaltigem

Medium ausgesät. Am Tag der Versuchsdurchführung wurde das Medium abgezogen, und nach Spülung mit PBS durch serumfreies Stimulationsmedium ersetzt.

2.2.5 Die Kultivierung von bovinen Cornea-Fibroblasten

Für die Charakterisierung des Zelltyps der aus dem bovinen Meniskusgewebe isolierten Zellen wurden zum Vergleich Fibroblasten herangezogen. Bovine Fibroblasten aus der Cornea wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Lüllmann-Rauch (Anatomisches Institut, Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Fibroblasten waren in DMSO (Dimethylsulfoxid) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellsuspension wurde sofort nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine Kulturflasche mit Ham's F-12 Medium (siehe 2.2.4) überführt. Das Medium wurde 2 x wöchentlich gewechselt und die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Für den Nachweis der Genexpression von typischen Matrixbestandteilen auf mRNA Ebene wurden die Fibroblasten subkultiviert und nach einer Aussaat von 2×10^6 Zellen in kleinen Flaschen drei Tage mit serumhaltigem Ham's F-12 Medium kultiviert.

2.2.6 Die Kultivierung der Zelllinie TC28a2

Kulturmedium für Zellen der Zelllinie TC28a2:

	DMEM/Ham's
10% (v/v)	FKS
3% (w/v)	Glutamin
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 µg/ml	Amphotericin

Für die Untersuchungen zur IL-1 Signaltransduktion in Meniskuszellen wurde zum Nachweis des Transkriptionsfaktors NF-κB im Meniskusgewebe als Kontrolle Zellen von immortalisierten (SV40 Virus T large antigen) Chondrozyten (Zelllinie TC28a2) verwendet. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Mary B. Goldring (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden 2 Tage vor der Stimulation in einer Dichte von 5×10^5 Zellen in kleine Kulturflaschen (25 cm²) ausgesät.

2.2.7 Subkultivierung der Zellen

EDTA/Trypsin-Lösung:

	PBS
0,5 M	EDTA
0,25% (w/v)	Trypsin

Für die Subkultivierung der isolierten Zellen wurde zunächst das Medium in der Kulturflasche abgezogen und die Zellen anschließend einmal mit PBS gespült. Auf den Monolayer wurden für 30 sec 10 ml einer EDTA/Trypsin-Lösung gegeben und bis auf einen kleinen Rest wieder abgezogen. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch kräftiges Klopfen vom Flaschenboden abgelöst und in 10 ml Ham's F-12 Kulturmedium aufgenommen. Nach einer Zentrifugation (10 min, 1000 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Medium pro Kulturflasche resuspendiert. Die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe von Trypanblau (siehe 2.2.4) bestimmt und die Meniskuszellen in einer Dichte 2×10^6 Zellen in kleinen Kulturflaschen (25 cm²) mit 7 ml Kulturmedium ausgesät.

2.3 Versuchsdurchführungen

Für die Untersuchungen wurde Interleukin-1 α („recombinant human IL-1 α “) als Modells substanz verwendet, welches im Folgenden nur als IL-1 bezeichnet wird. Bei der Untersuchung der Wirkung auf isolierte Meniskuszellen wurde in Anlehnung an andere Arbeiten IL-1 in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Um eine destruktive Wirkung an Gewebekulturen induzieren zu können wurde zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration eine Dosiswirkungsreihe durchgeführt. Für die weiteren Untersuchungen am Gewebe wurde IL-1 dann in einer Konzentration von 10 ng/ml angewendet. Um Rückschlüsse über die Wirkungsweise von IL-1 bei der Zerstörung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix zu erhalten, wurde ein MMP-Inhibitor (MMP-3 Inhibitor II; N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic Acid, NNGH) eingesetzt. Für weitere Untersuchungen zur Hemmung der Effekte von IL-1 bei isolierten Zellen und Gewebeexplantaten wurde ein zellpermeables Manganese(III)tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) Porphyrin Pentachlorid (MnTMPyP) als ein Molekül mit den Eigenschaften eines Superoxiddismutase-Mimetikums verwendet, welches im Folgenden als SODm bezeichnet wird.

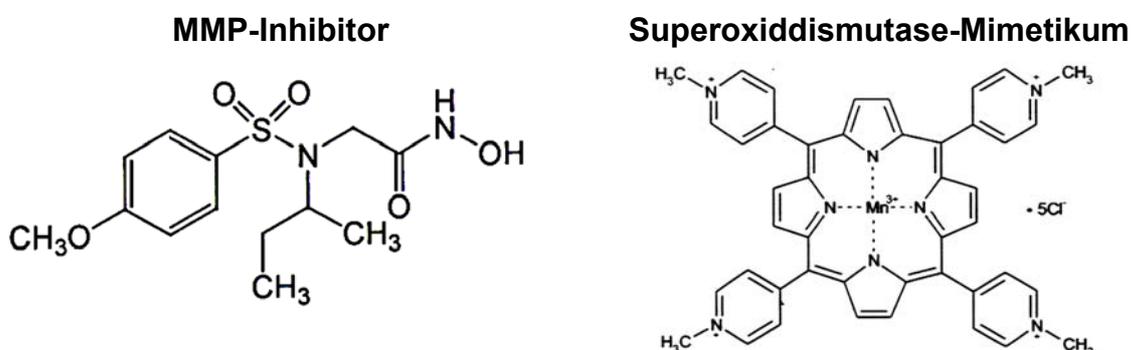


Abb. 7: Strukturformeln des MMP-Inhibitors (MMP-3 Inhibitor II; N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic acid, NNGH; links) und des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) (Manganese(III)tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) Porphyrin Pentachlorid (MnTMPyP, rechts).

2.4 Die Bestimmung der Glykosaminoglykane (GAGs) in Kulturüberständen und im Gewebe

DMMB (Dimethylmethylenblau):

0,04 M	DMMB
0,2 M	Ethanol
0,04 M	NaCl
0,04 M	Glycin
0,1 M	HCl
(pH 3)	

PBE-Stammlösung:

0,1 M	Na ₂ HPO ₄
0,01 M	Na ₂ EDTA
(pH 6,5)	

Papain-Lösung:

2,125 U/ml	Papain
0,01 M	L-Cystein
0,1 M	Na ₂ HPO ₄
0,01 M	Na EDTA
(pH 6,0)	

Eine Freisetzung von Glykosaminoglykanen (GAGs) aus den Explantaten in den Kulturüberstand als Zeichen einer Gewebsdestruktion wurde mit Hilfe eines Dimethylmethylenblau (DMMB)-Tests bestimmt. Für die Messung wurden bei einer Versuchsdauer von 6 Tagen die Kulturüberstände verwendet, die an Tag 3 und Tag 6 abgezogen wurden. In eine Küvette wurden zu 80 µl Standard bzw. Probe (Kulturüberstand) 800 µl DMMB-Lösung gegeben. Die Glykosaminoglykane im Überstand und das DMMB bildeten einen Farbkomplex, dessen Extinktion mit Hilfe eines Photometers (Ultrospec LKB, Biochrom) bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen werden konnte. Für die Messung des GAG-Gehaltes wurden die Explantate bei 65°C über Nacht in 1 ml Papain-Lösung verdaut. Nach dem Verdau konnte der Glykosaminoglykangehalt der Explantate photometrisch durch Bindung von DMMB gemessen werden. Dafür wurden 20 µl Standard bzw. Probe (verdautes Explantat) und 2000 µl DMMB eingesetzt.

Der absolute Gehalt an GAGs im Kulturüberstand und in den Explantaten konnte durch die Umrechnung der gemessenen Werte anhand einer zuvor mit Chondroitin-C-Sulfat angesetzten Standardreihe ermittelt werden. Die Ergebnisse der GAG-Freisetzung in den Kulturüberstand und des GAG-Gehaltes innerhalb der Explantate wurden auf das Feuchtgewicht der Explantate (GAG/mg FG) bezogen.

2.5 Die Bestimmung der Biosyntheseaktivität der Gewebeexplantate durch den Einbau von radioaktiv-markiertem [³⁵S]-Sulfat und [³H]-Prolin

radioaktiv markiertes Inkubationsmedium:

10 µCi/ml Kulturmedium für Explantate (siehe 2.2.1)
 [³⁵S]-Sulfat oder [³H]-Prolin

Spülpuffer:

0,5 mM PBS
 Prolin

Die Messung der Glykosaminoglykan- und der Proteinbiosynthese des Gewebes erfolgte je nach Versuchsdurchführung nach 3 oder nach 6 Tagen durch den Einbau von [³⁵S]-Sulfat und [³H]-Prolin. Jeweils ein Explantat wurde in einer 96er-Wellplatte mit 250 µl Inkubationsmedium 6-8 h bei 37°C inkubiert. Nach dem radioaktiven Einbau wurden die Explantate 3 x 20 min mit Spülpuffer gewaschen, um überschüssige bzw. aus dem Gewebe wieder freigesetzte radioaktive Anteile zu entfernen. Anschließend wurden die Explantate über Nacht bei 65°C in je 1 ml Papain-Lösung verdaut (siehe 2.4) und der Einbau von radioaktiv markierten Substanzen gemessen. Dazu wurden 200 µl der verdauten Proben mit jeweils 2 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und in einem Szintillationszähler mit dem jeweils passenden Messprogramm für [³⁵S] und [³H] gemessen. Die Dauer der Messung pro Probe betrug 1 min. Für die Darstellung der Glykosaminoglykan- und der Proteinbiosynthese wurden die gemessenen cpm-Werte („counts per minute“) auf das Feuchtgewicht der Gewebeexplantate bezogen.

2.6 Messung von Stickoxid (NO) in den Kulturüberständen

Mit Hilfe des Griess-Reagenz wurde in den Kulturüberständen die Stickoxid (NO)-Produktion der Zellen des Meniskusgewebes gemessen. Bei dieser Methode wurde Nitrit (NO₂), ein stabiles Endprodukt von NO, mit der Griess-Reagenz in einen Farbstoff umgesetzt, der photometrisch bestimmt werden konnte. In einer 96er-Mikrotiterplatte wurden zu 100 µl Kulturüberstand 100 µl der Griess Reaktion dazu pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationen von Nitrit in den Kulturüberständen wurden durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 540 nm in einem ELISA-Reader ermittelt. Die Messwerte wurden mit Hilfe einer mit Natriumnitrit (NaNO₂) ermittelten Standardkurve in die absoluten NO-Werte (µmol) umgerechnet und bei der Darstellung der Ergebnisse auf das Feuchtgewicht der Gewebeexplantate bezogen.

2.7 Die Bestimmung des DNA-Gehaltes in Gewebeexplantaten nach der CyQuant-Methode

Die Messung des DNA-Gehaltes der Gewebeexplantate aus den unterschiedlichen Bereichen des Meniskusgewebes („oberflächlich“, „tief“) erfolgte mit Hilfe der modifizierten CyQuant-Methode nach dem Verdau der Explantate in einer Papain-Lösung (siehe 2.4). Für die DNA-Bestimmung wurden zu 250 µl verdauter Gewebeprobe 250 µl 2x-Reagenz (im CyQuant-Kit enthalten) zugegeben und für 2-5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die Messung des DNA-Standards wurden 2 µl der Bakteriophagen λ-DNA (im CyQuant-Kit enthalten) mit 198 µl Papain-Lösung vermischt. Der DNA-Gehalt der Gewebeexplantate konnte bei einer Extinktion von 480 nm und einer Emission von 520 nm fluorometrisch ermittelt werden. Die absoluten DNA-Werte wurden mit Hilfe des ermittelten Standards berechnet.

2.8 Untersuchungen der physikalischen Eigenschaften des Meniskusgewebes

2.8.1 Aufbau und Funktion der Druckmaschine

Die Messung des Gegendruckes, den Meniskusimplantate bei einer Kompression aufbauen können, erfolgt mit Hilfe einer Druckapparatur, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alan J. Grodzinsky am Massachusetts Institute of Technology (MIT, Cambridge, USA) entwickelt wurde (**Abb. 8**).

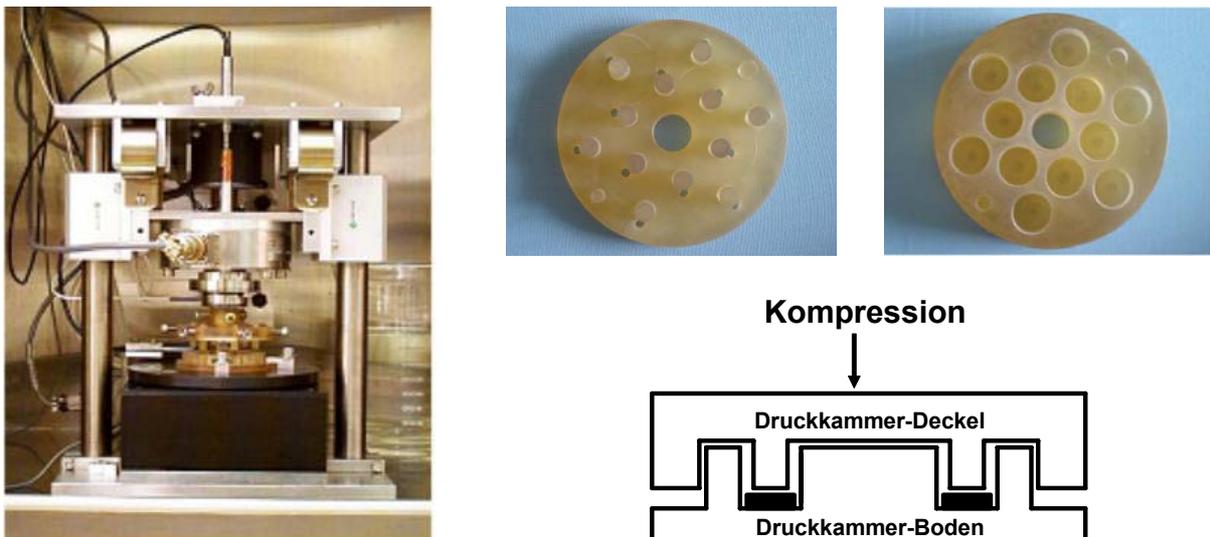


Abb. 8: Darstellung der Apparatur (links) zur Induktion einer Kompression, sowie der Druckkammer, bestehend aus einem Druckkammer-Deckel und -Boden (fotografisch: rechts oben, schematisch: rechts unten). Meniskusimplantate wurden in die Vertiefungen eines Druckkammer-Bodens gegeben. Über die stempelförmigen Strukturen im Druckkammer-Deckel wurde die Kompression auf die Explantate übertragen und der sich aufbauende Gegendruck des Gewebes gemessen.

Die Explantate wurden nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen in eine Druckkammer überführt, die sich aus einem Boden- und einem Deckelteil zusammensetzte. Durch die stempelförmigen Strukturen im Deckel konnte ein Druck auf die Explantate ausgeübt und der sich dabei aufbauende Gegendruck des Gewebes gemessen werden. Vor den Komprimierungsversuchen wurden Druckkammer und -maschine aufeinander geeicht.

2.8.2 Durchführung der Kompression zur Messung des Gegendruckes

In den einzelnen Vertiefungen des Druckkammer-Bodens wurden Meniskusexplantate einer einheitlichen Größe und 250 µl Medium hineingegeben. Um eine gleichmäßige Kompression zu gewährleisten, wurden nur drei oder vier Explantate gleichzeitig in die Druckkammer überführt. Die Explantate wurden einer einmaligen Kompression (Komprimierungsrate $0,1 \text{ s}^{-1}$) von 10% der Probenstärke ausgesetzt und der sich aufbauende maximale Gegendruck (MPa) erfasst. Anschließend kehrte der Druckstempel zur Ausgangsposition zurück.

2.9 Histologische Untersuchungen

2.9.1 Beschichten der Objektträger mit Chromalaungelatine

Chromalaungelatine:

4,5% (w/v)	Gelatine
300 mM	Kalium-Chromsulfat-12-Hydrat

Für die histologische Darstellung der Meniskus- und Gelenkknorpel-explantate sowie die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Objektträger mit Chromalaungelatine beschichtet. Die Objektträger wurden 2 min vollständig in warme Chromalaungelatine (40°C) getaucht und im Anschluss daran geschleudert, um überschüssige Gelatine zu beseitigen. Die beschichteten Objektträger wurden daraufhin im Trockenschrank bei 40°C getrocknet.

2.9.2 Fixieren und Einbetten von Gewebeexplantaten für histologische und immunhistochemische Untersuchungen

Paraformaldehyd:

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

Die Gewebeexplantate wurden direkt am Tag ihrer Herstellung oder nach Beendigung der Versuchsdurchführung in frisch angesetztem Paraformaldehyd (4%ig in PBS) für mehrere Stunden fixiert. Nach dem Abgießen des Paraformaldehyds wurden die Explantate eine

Stunde mit Leitungswasser gewässert. Daraufhin wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100% Ethanol), 3 x für je 2 h mit Methylbenzoat behandelt und dann 2 x für je 2 h in Paraplast überführt. Die Einbettung erfolgte in einem Vakuumschrank. Nach dem Erhärten des Paraffins konnten mit Hilfe eines Mikrotoms Schnitte (Dicke 7 µm) auf chromalaunbeschichteten Objektträgern (siehe **2.9.1**) angefertigt werden.

2.9.3 Färbung der Gewebeexplantate zur histologischen Darstellung mit Toluidinblau

Toluidinblau-Färbelösung:

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

Zur lichtmikroskopischen Darstellung der Gewebeexplantate wurde an paraformaldehydfixierten Paraffinschnitten eine Toluidinblau-Färbung durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden zunächst in Xylol (3 x 5 min) entparaffiniert, je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) inkubiert und mit Aqua dest. gespült. Nach 5 min Inkubation in der Toluidinblau-Färbelösung wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült und in 96%iges Ethanol getaucht. Nach einer Behandlung mit Propanol (3 x 3 min) und Xylol (3 x 5 min) wurden die Schnitte mit DePeX[®] eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte konnten lichtmikroskopisch betrachtet werden.

2.9.4 Färbung der Gewebeexplantate zur histologischen Darstellung mit Mayer's Hämalaunlösung

Für die Darstellung des „Kernblebbings“ als morphologisches Korrelat der Apoptose wurden die Schnitte der Meniskusexplantate mit Mayer's Hämalaunlösung angefärbt. Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert und mit Aqua dest. gespült (siehe **2.9.2**). Anschließend wurden die Schnitte 6 min in Mayer's Hämalaunlösung inkubiert. Nach einem Spülen mit Aqua dest. und Eintauchen in 96%iges Ethanol wurden die Schnitte 10 min in lauwarmem Leitungswasser stehen gelassen. Nach einem Durchlaufen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min) und einer Behandlung mit Xylol (3 x 5 min) wurden die Schnitte mit DePeX[®] eingedeckelt.

2.9.5 Färbung der Gewebeexplantate mit Bisbenzimid

Tris-NaCl-Spülpuffer:

50 mM	Tris
0,1 M	HCl
0,14 M	NaCl

(pH 7,5)

Neben den gebräuchlichen Färbemethoden wurde zur besseren Darstellung der Zellkerne innerhalb des Meniskusgewebes eine Bisbenzimid-Färbung durchgeführt. Bisbenzimid (2'-4[Hydroxyphenyl]-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bis-1H-benzimidazol) ist ein blau-fluoreszierender Farbstoff, der sich selektiv an DNA anlagert.

Die Schnitte der Meniskusimplantate wurden mit Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe inkubiert, 1 x mit Aqua dest. gespült und 3 min in einer mit Tris-NaCl angesetzten Bisbenzimid-Lösung inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend 3 x mit Tris-NaCl gespült, mit Aquatex[®] eingedeckelt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss Axioskop, Germany) die blau-gefärbten Zellkerne sichtbar gemacht.

2.10 Der lichtmikroskopische Nachweis von Apoptose

Apoptotische Zellen konnten lichtmikroskopisch an Serienschnitten von Meniskusimplantaten nachgewiesen und ausgezählt werden. An Paraffinschnitten paraformaldehydfixierter Explantate wurde zur Darstellung des für die Apoptose typischen „Blebbings“ der Zellkerne eine Färbung mit Mayer's Hämalaunlösung durchgeführt (siehe **2.9.4**). Bei einer 400-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskops wurden jeweils an 2 Schnitten eines Explantates in drei Gesichtsfeldern die Gesamtzellzahl und die Anzahl apoptotischer Zellen ermittelt. Die auszuzählenden Gesichtsfelder wurden dabei so gewählt, dass ein zentraler und zwei peripher gelegene Bereiche betrachtet wurden, wobei die Randbereiche der Explantate (~ 100 µm Dicke), die durch schnittbedingte Artefakte eine unnatürlich hohe Anzahl apoptotischer Zellen aufweisen konnten, nicht berücksichtigt wurden. Für die Darstellung der Anzahl apoptotischer Zellen wurde aus den ausgezählten Bereichen der Mittelwert für das jeweilige Explantat bestimmt.

2.11 Immunhistochemische Untersuchungen

2.11.1 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II im Meniskusgewebe

Tris-NaCl-Spülpuffer:

50 mM	Tris
0,1 M	HCl
0,14 M	NaCl
(pH 7,5)	

Pepsinlösung:

0,1 % (w/v)	Pepsin
0,5 M	Essigsäure

Für den Nachweis von Kollagen Typ I und Typ II wurden Schnitte von bovinen Meniskusimplantaten mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe in Aqua dest. überführt (siehe **2.9.2**). Die Schnitte wurden mit einer Pepsinlösung 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer angedaut, 3 x 5 min mit Tris-NaCl gespült und anschließend 30 min unter den gleichen Bedingungen mit Hyaluronidase (5 mg/ml in Tris-NaCl) behandelt. Nach dem Spülen mit Tris-NaCl (3 x 5 min) wurden die Schnitte 20 min in 0,6%igem (v/v) H₂O₂-Methanol inkubiert, um die zelleigene Peroxidase zu inaktivieren. Die Schnitte wurden 3 x 5 min mit Tris-NaCl gespült und 60 min bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (siehe **Tab. 3**) inkubiert. Die verwendeten Antikörper wurden jeweils mit Tris-NaCl verdünnt. Bei der Negativkontrolle wurde der Primärantikörper weggelassen. Nach dem Spülen mit Tris-NaCl (3 x 5 min) zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern wurden die Schnitte 30 min mit dem Sekundärantikörper (siehe **Tab. 3**) inkubiert, 3 x 5 min mit Tris-NaCl gespült und im Anschluss daran 30 min mit dem Tertiärantikörper (siehe **Tab. 3**) behandelt.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II im Meniskusgewebe.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärantikörper
Antigen	Anti-Kollagen Typ I (monoklonal)	Kaninchen Anti-Maus IgG (PAP-konjugiert)	Ziege Anti-Kaninchen IgG (PAP-konjugiert)
Verdünnung	1:500	1:200	1:100
Spezies	Maus	Kaninchen	Ziege
Antigen	Anti-Kollagen Typ II (monoklonal)	Kaninchen Anti-Maus IgG (PAP-konjugiert)	Ziege Anti-Kaninchen IgG (PAP-konjugiert)
Verdünnung	1:10	1:200	1:100
Spezies	Maus	Kaninchen	Ziege

Durch weiteres Spülen mit Tris-NaCl (3 x 5 min) wurde ungebundenes Material entfernt. Die Immunfärbung erfolgte für 10 min unter Lichtabschluss mit Diaminobenzidin (DAB), welches von den an die Antikörper gekoppelten Peroxidasen in einen braunen Farbstoffniederschlag umgewandelt wurde. Das überschüssige DAB wurde durch Spülen mit Aqua dest. (3 x 1 min) entfernt. Für eine Gegenfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte für 30 sec in eine Hämatoxylinlösung getaucht, einmal mit Aqua dest. abgespült und zum Abschluss mit Aquatex® eingedeckelt. Die gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.11.2 Immunhistochemischer Nachweis von IL-1 Rezeptor Typ I im Meniskusgewebe

Für den immunhistochemischen Nachweis des IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) im Meniskusgewebe wurden Paraffinschnitte von humanem Meniskusgewebe verwendet. Nach dem Entparaffinieren der Schnitte und dem Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe wurden diese 3 x 5 min mit Tris-NaCl gespült und für 20 min mit 0,6%igem (v/v) H₂O₂-Methanol behandelt. Die Schnitte wurden 3 x 5 min mit Tris-NaCl gespült und für 60 min bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (siehe **Tab. 4**) inkubiert. Die weitere Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit dem Sekundär- und Tertiärantikörper (siehe **Tab. 4**) erfolgte nach der in Kapitel **2.11.1** beschriebenen Methode.

Tab. 4: Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) in humanen Meniskusgewebe.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärantikörper
Antigen	Anti-human IL-1 RI (polyklonal)	Kaninchen Anti-Ziege IgG (PAP-konjugiert)	Ziege Anti-Kaninchen IgG (PAP-konjugiert)
Verdünnung	1:100	1:800	1:200
Spezies	Ziege	Kaninchen	Ziege

2.11.3 Immunhistochemischer Nachweis von m-Calpain im Meniskusgewebe

Für den Nachweis von m-Calpain wurden Paraffinschnitte von humanem und bovinem Meniskusgewebe verwendet. Die Schnitte wurden zunächst mit Hilfe von Xylol entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe in Aqua dest. überführt und anschließend 3 Tage im Trockenschrank gelagert. Damit sollte ein Abschwimmen der Schnitte bei der weiteren Behandlung verhindert werden. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült, 10 min mit 3%igem (v/v) H₂O₂ behandelt und anschließend wieder mit Aqua dest. gespült. Die Schnitte wurden in einem Dampfkochtopf in 0,01 M Citronensäure (pH 6) 2,5 min gekocht, um die durch Formalinfixierung veränderten Epitope zu demaskieren, und zum Abkühlen 20 min stehen gelassen. Die Schnitte wurden danach wieder mit Aqua dest. gespült, 3 min in Tris-NaCl eingetaucht und 60 min bei

Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (siehe **Tab. 5**) inkubiert. Die weitere Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit dem Sekundär- und Tertiärantikörper (siehe **Tab. 5**) erfolgte nach der in Kapitel **2.11.1** beschriebenen Methode.

Tab. 5: Antikörper zum immunhistochemischen Nachweis von m-Calpain in bovinem und humanem Meniskusgewebe.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Tertiärantikörper
Antigen	Anti-m-Calpain (monoklonal)	Kaninchen Anti-Maus IgG (PAP-konjugiert)	Ziege Anti-Kaninchen IgG (PAP-konjugiert)
Verdünnung	1:50	1:200	1:150
Spezies	Maus	Kaninchen	Ziege

2.12 Nachweis von Proteoglykanen mittels Western Blot

2.12.1 Western Blot-Analyse

Für den Nachweis der Proteoglykane Aggrekan, Decorin, Biglykan und Versikan als Bestandteile der extrazellulären Matrix des Meniskusgewebes wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Mit dieser Methode werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und nach einer Übertragung auf eine Membran (Nitrozellulosemembran) mit geeigneten Antikörpern dargestellt. Dabei wird der gebundene Primärantikörper durch einen an eine Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Mittels der Western Blot-Analysen sollte untersucht werden, ob durch IL-1 eine Degradation der Proteoglykane im Meniskus vermittelt wurde und ob sich durch die Wirkung von proteolytischen Enzymen Spaltfragmente im Kulturmedium und im Gewebe darstellen ließen, die Rückschlüsse auf die Aktivität bestimmter Proteasen erlauben könnten. Die hier verwendeten Antikörper zur Darstellung der Proteoglykane sowie der Spaltfragmente von Aggrekan wurden freundlicherweise von Prof. Dr. J. D. Sandy (Tampa, Florida, USA) zur Verfügung gestellt.

Proteaseinhibitoren:

5 mM	EDTA
0,1 mM	AEBSF
5 mM	Iodacetamid
1 µg/ml	Pepstatin

Für die Probenaufbereitung zur Durchführung des Western Blots wurden nach Beendigung der Stimulationsversuche die Kulturmedien mit Inhibitoren versetzt und die Meniskusexplantate eine Stunde darin inkubiert. Damit sollte verhindert werden, dass durch die Aktivität der in den Proben enthaltenen Proteasen die gesuchten Proteine abgebaut werden könnten. Im Anschluss daran wurden die Gewebeexplantate und die Kulturmedien eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

2.12.2 Isolierung von Proteoglykanen aus Kulturmedien

Ammoniumacetat-Lösung:

0,5 M Ammoniumacetat
20 mM EDTA
0,5 mM AEBSF
(pH 6,0)

Harnstoffpuffer:

7 M Harnstoff
50 mM Tris-Acetat
(pH 8,0)

Acetat-Lösung:

50 mM Na-Acetat
50 mM Tris-Acetat
10 mM EDTA
(pH 7,6)

Für die Gewinnung der Proteoglykane aus den Kulturmedien wurden die lyophilisierten Proben mit 2 TRU („turbidity-reducing units“) Hyaluronidase *Streptomyces hyalurolyticus* für 3 h bei 60°C in 0,4 ml Ammoniumacetat-Lösung verdaut. Im Anschluss daran wurden die Proben zur Beseitigung des Ammoniumacetats getrocknet und in 2 ml Harnstoffpuffer aufgenommen und auf eine Poly-Prep-Chromatographiesäule mit einem Volumen von 0,5 ml DE52 Zellulose (Diaminoethylzellulose) aufgetragen. Für die Herstellung der Chromatographiesäule wurde die DE52 Zellulose zum Aufquellen 3 x mit Aqua dest. gewaschen und bis zur Verwendung als eine 50%ige schlammige Lösung in Aqua dest. bei 4°C gelagert. Die Säule wurde vor der Auftragung der Proben mit 2 ml Harnstoffpuffer äquilibriert. Im Anschluss daran wurden die Proben aufgetragen und der Durchfluss mit nicht gebundenem Material aufgefangen. Die in der Säule enthaltenen Proteoglykane wurden eluiert, indem zunächst 2 ml des Harnstoffpuffers auf die Säule aufgetragen und nach Durchfluss aufgefangen wurden. Anschließend wurden 4 ml eines mit 0,2 M NaCl-Lösung versetzten Harnstoffpuffers auf die Säule gegeben und die aufgefangene Fraktion zur Einstellung des Salzgehaltes für 24 h bei 4°C gegen destilliertes Wasser dialysiert. Für die Deglykosylierung von Chondroitinsulfat- und Dermatan-sulfat-tragenden GAG-Ketten wurden die Rückstände getrocknet, in der Acetat-Lösung gelöst und nach der Zugabe von 25 mU Chondroitinase ABC (pro 100 µg GAG) bei 37°C für 1-2 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt und für die Deglykosylierung von Keratansulfat-tragenden GAG-Ketten 0,5 mU Endo-β-galactosidase (pro 100 µg GAG) und 0,5 mU Keratanase II zugefügt und für 2-4 h bei 37°C inkubiert und abschließend für die Western Blot-Analyse getrocknet.

2.12.3 Isolierung von Proteoglykanen aus Gewebe

Lysispuffer für Proteinaufbereitung des Meniskusgewebes:

4 M	Guanidin-HCl
10 mM	MES
50 mM	Na-Acetat
0,3 M	Aminohexansäure
15 mM	Benzamidin
5 mM	EDTA
0,1 mM	AEBSF
5 mM	Iodacetamid
1 µg/ml	Pepstatin
(pH 6,8)	

Für die Isolierung von Proteoglykanen aus dem Gewebe wurden die lyophilisierten Proben der Meniskusexplantate in Lysispuffer aufgenommen und 48 h bei 4°C unter Schütteln extrahiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und der Überstand 24 h bei 4°C gegen destilliertes Wasser dialysiert (siehe **2.12.2**). Die Rückstände wurden anschließend getrocknet, in 2 ml Harnstoffpuffer aufgenommen und über eine Poly-Prep-Chromatographiesäule mit DE52 Zellulose aufgereinigt und nach der in Kapitel **2.12.2** beschriebenen Methode deglykosyliert und für die Western Blot-Analyse getrocknet.

2.12.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Gelsammelpuffer:

50 mM	Dithiotreitol (DTT)
6 M	Harnstoff
10% (w/v)	2 x Tris-Glycin-SDS Sammelpuffer
(pH 6,8)	

Elektrodenpuffer:

50 mM	Tris
384 mM	Glycin
0,2% (w/v)	SDS
(pH 8,8)	

Transferpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol
(pH 8,4)	

Blockierungsreagenz:

200 mM	Tris
1,37 M	NaCl
0,1% (v/v)	Tween-20
1% (w/v)	Magermilchpulver
(pH 7,6)	

TBST-Puffer:

200 mM	Tris
1,37 M	NaCl
0,1 % (v/v)	Tween-20
(pH 7,6)	

Die Durchführung des Western Blots zum Nachweis der Proteoglykane und deren Spaltprodukte erfolgte nach den von Sandy (2001) beschriebenen Methoden. Von den Proben wurden 2 µg Protein in 20-40 µl eines frisch angesetzten Gelsammelpuffers gelöst und für 5-10 min bei 100°C auf einem Thermoblock gekocht und anschließend zentrifugiert, um die Flüssigkeiten zu sammeln. Die Proben (bis zu 40 µl) wurden auf vorgefertigte Novex™ Pre-Cast Gele aufgetragen und in einem Elektrodenpuffer bei 200 V für 45 min bei 4°C laufen gelassen. Um den Gellauf gut verfolgen zu können, wurde dem Laufpuffer ein Tropfen Bromphenolblau zugesetzt, welches im Gel eine blaue Lauffront erzeugte.

2.12.5 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend nach dem Semidryblot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (7,5 x 7 cm) transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde zuvor mit Aqua dest. gespült und 15-20 min in Transferpuffer äquilibriert, um den Übergang der Proteine vom Gel auf die Membran zu erleichtern. In eine Elektrodenkammer wurden auf mit Transferpuffer befeuchtete Whatman-Filterpapiere die Nitrozellulosemembran und darauf das Gel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt. Das Gel wiederum wurde mit feuchtem Whatman-Papier bedeckt. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für 1 Stunde bei 4°C. Die Membran wurde 10 min bei Raumtemperatur mit einem Blockierungsreagenz inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit einem Primärantikörper (Verdünnung 1:3000 in Blockierungsreagenz) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Folgende Primärantikörper wurden bei der Durchführung der Western Blot-Analysen zum Nachweis von Proteoglykanen und Abbau-Fragmenten verwendet: Anti-G1 (zum Nachweis von G1-tragenden Aggrekan-Fragmenten) (Sandy et al., 1995), Anti-TFKEEE/TAGELE (zum Nachweis der Neoepitope TFKEEE/TAGELE von Aggrekan) (Sandy et al., 1995; Sandy et al., 2000), Anti-SK-28 (zum Nachweis der Neoepitope VGPGVA von Aggrekan an der Aminosäurestelle 719) (Oshita et al., 2004), Anti-Decorin, Anti-Biglycan und Anti-Versikan.

Die Membran wurde danach 3 x 2 min mit dem TBST-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Detektion der auf der Membran gebundenen Antikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur ein Sekundärantikörper (HRP-konjugiert Ziege Anti-Kaninchen

IgG, Verdünnung 1:3000 in Blockierungsreagenz) auf die Membran gegeben. Danach wurde die Membran 3 x 10 min in TBST-Puffer gewaschen und 1 min mit der Chemilumineszenzreagenz ECL entsprechend den Angaben des Herstellers behandelt. Die Membran wurde anschließend in eine Klarsichtfolie gewickelt und in eine Entwicklungskassette gelegt. Auf die Membran wurde ein Chemilumineszenz-Film aufgelegt, bis eine optimale Signalintensität erreicht wurde. Anschließend wurde der Film entwickelt und ausgewertet.

2.13 Untersuchungen zur Genexpression von Matrixmolekülen und matrixabbauenden Proteasen auf mRNA Ebene

2.13.1 RNA Isolierung

2.13.1.1 RNA Isolierung aus Meniskuszellen

Die RNA Isolierung aus Meniskuszellen erfolgte mit einem NukleoSpin[®]RNA II Kit. Nach Beendigung der Stimulationsversuche wurden die Kulturmedien entfernt und die RNA nach den Angaben der Hersteller isoliert. Dafür wurde 3,5 µl β-Mercaptoethanol mit 350 µl RA1 Puffer versetzt und auf die am Boden angewachsenen Zellen gegeben, um die Proteine zu denaturieren und Disulfidbrücken aufzubrechen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen unmittelbar danach vom Flaschenboden abgekratzt, auf einen NukleoSpin[®]Filter übertragen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Filter wurde nach der Zentrifugation beseitigt und der Überstand mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt und auf eine NukleoSpin[®]RNA II Säule aufgetragen. Diese NukleoSpin[®] RNA II Säule wies eine Nitrocellulosemembran auf, an der die RNA gebunden wurde. Nach der Zentrifugation (30 sec, 8.000 x g) wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß eingesetzt. Auf die Säule wurde 350 µl MDB („Membrane Desalting Buffer“) aufgetragen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben durch die Zugabe von 95 µl DNase Reaction Mixture (10 µl DNase I + 90 µl DNase Reaction Buffer) bei Raumtemperatur 15 min inkubiert, um die DNA zu verdauen. Es folgten mehrere Zentrifugationsschritte, in denen störende Proteine durch die Aufreinigung der RNA über die NukleoSpin[®]RNA II Säule beseitigt wurden. In einem ersten Waschvorgang wurden 200 µl RA2 Puffer auf die NukleoSpin[®]RNA II Säule aufgetragen und 30 sec bei 8.000 x g zentrifugiert, um die DNase zu inaktivieren. Die NukleoSpin[®]RNA II Säule wurde in ein neues Auffanggefäß eingesetzt und nach der Zugabe von 600 µl RA3 Puffer in einem zweiten Waschschrift erneut 30 sec bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und für einen dritten Waschvorgang wurden weitere 250 µl RA3 Puffer auf die NukleoSpin[®]RNA II Säule gegeben und 2 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die NukleoSpin[®]RNA II Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zum Eluieren der RNA wurden 60 µl RNase-freien Wassers auf die Säule aufgetragen und 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Anschließend konnten die im Eppendorfgefäß aufgefangenen RNA-Mengen der einzelnen Proben bestimmt werden (siehe **2.13.2**) und wurden danach bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.13.1.2 RNA-Isolierung aus Meniskusgewebe

Für die Isolierung von RNA wurden ~ 100 mg Meniskusgewebe (ca. 15 Meniskusimplantate) nach Beendigung der Stimulationsversuche mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert und in flüssigen Stickstoff überführt. Bis zur Gewinnung der RNA-Menge konnten die Proben bei -70°C eingefroren werden.

Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill zermörsert. Das pulverisierte Meniskusgewebe wurde in ein Röhrchen überführt und mit 1 ml Trizol versetzt. Mit einem Dispergiergerät wurden die Proben anschließend so lange homogenisiert, bis keine Gewebestückchen mehr zu erkennen waren. Die Lösung wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert, um die restlichen Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, der Proteine, DNA und RNA enthielt, vorsichtig abgezogen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für die Isolierung der RNA wurden 200 µl Chloroform zugefügt. Die Lösung wurde 15 sec geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 2-3 min bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4°C). Es konnten innerhalb der Lösung zwei Phasen beobachtet werden. Die obere Phase, die die RNA enthielt, war farblos und wässrig, während die untere rötliche Phenol-Chloroformphase Proteinen und DNA beinhaltete. Die farblose wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne dass die Interphase berührt wurde, um eine Verunreinigung der RNA auszuschließen. Die RNA wurde mit 500 µl Isopropylalkohol gefällt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4°C war die RNA als ein kleines gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit der darin enthaltenen RNA in 1 ml 75%igem Ethanol gelöst und 5 min bei 7.500 x g bei 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2-3-mal wiederholt, um mögliche Phenolrückstände zu eliminieren. Im Anschluss daran wurde das Ethanol verworfen und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für 10 min bei 55-60°C inkubiert. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Mengen (siehe 2.13.2) wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.13.2 Bestimmung der RNA-Menge

Zur Quantifizierung der RNA-Menge wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) in einem Photometer gemessen. Dafür wurden in eine Quarzküvette zu 5 µl Probe 495 µl Aqua bidest dazugegeben. Um die Qualität der Probe zu überprüfen und eine mögliche Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte dabei einen Wert $\geq 1,8$ ergeben.

2.13.3 RT-PCR (Reverse-Transkription PCR)

Für den qualitativen Nachweis von wichtigen Matrixmolekülen im Meniskusgewebe, in Meniskuszellen und Cornea-Fibroblasten sowie die Genexpression matrix-abbauender Proteasen wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) stellt eine Methode dar, mit der spezifisch Abschnitte der mRNA mit bekannter Nukleotidsequenz vermehrt (amplifiziert) werden können. Die aus den Zellen (siehe 2.13.1.1) und dem Gewebe (siehe 2.13.1.2) isolierte RNA wird durch eine Reverse Transkription (RT) zunächst in eine komplementäre DNA („complementary“ DNA; cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Durchführung der PCR, in der die cDNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges dient. Mit Hilfe einer Gelelektrophorese können die amplifizierten Produkte aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

2.13.3.1 Durchführung der RT-PCR

Die Durchführung der RT-PCR zur qualitativen Bestimmung der mRNA-Expression wichtiger Matrixmoleküle (Aggrecan, Kollagen Typ I und Typ II) und matrix-degradierender Proteasen (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13) erfolgte mit Hilfe der Qiagen® One Step RT-PCR. Mit der aus dem Meniskusgewebe und den Meniskuszellen isolierten RNA wurde zunächst ein DNase Verdau nach den Angaben der Firma Promega durchgeführt, um DNA-Verunreinigungen zu beseitigen. Dafür wurden die zu untersuchenden Proben mit folgendem Reaktionsansatz behandelt:

Reaktionsansatz für den DNase-Verdau:

x µl	RNA (x µl = 1-8 µl)
1 µl	RQ1 RNase-freies DNase 10 x Reaktionspuffer
1 µl	RQ1 RNase-freie DNase
x µl	Nuklease-freies H ₂ O
10 µl	Endvolumen

Zu jeder Probe wurden 1 µl DNase 10 x Reaktionspuffer sowie 1 µl DNase dazugegeben und 30 min bei 37°C in einem Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA, pH 8,0) beigefügt und 10 min bei 65°C inkubiert. Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde für einen Reaktionsansatz zur Bestimmung eines einzelnen Zielgens 100-500 ng verdaute RNA eingesetzt und nach dem folgenden Schema pipettiert:

Reaktionsansatz für RT-PCR:

10 µl	5 x Qiagen One Step RT-PCR Buffer
2 µl	dNTP Mix
10 µl	5 x Q-Solution
x µl (100 pmol)	Primer (Sense)
x µl (100 pmol)	Primer (Antisense)
2 µl	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix
x µl	RNA (x µl = 100-500 ng verdaute RNA)
x µl	RNAse-freies H ₂ O
50 µl	Endvolumen

Das „Housekeeping“ Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) wurde als Referenzgen verwendet, um sicherzustellen, dass in jedem Reaktionsansatz intakte und gleiche Mengen an RNA vorhanden waren. Für die Durchführung der RT-PCR wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

Tab. 6: Übersicht der RT-PCR Primer.

RT-PCR Primer			
Name	Primer-Sequenz (5' → 3')	Produkt	T _{anneal}
GAPDH Sense	TCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCC	252 bp	67°C
GAPDH Antisense	AAATGAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAAGG		
Aggrekan Sense	TCCACTGACACCAAAGAGT	333 bp	54°C
Aggrekan Antisense	TCTGGATTTAGTGGTGAGTATT		
Koll Typ I Sense	GATGGAGACTTCTACAGGGCTGAC	712 bp	63°C
Koll Typ I Antisense	CGATGTCCAAAGGTGCAATATCAAGG		
Koll Typ II Sense	AAGAAACACATCTGGTTTGGAGAAACC	342 bp	62°C
Koll Typ II Antisense	ATGGGTGCAATGTCAATGATGGG		
MMP-1 Sense	GGACTGTCCGGAATGAGGATCT	91 bp	60°C
MMP-1 Antisense	TTGGAATGCTCAAGGCCCA		
MMP-2 Sense	GTACGGGAATGCTGACGGGAATA	93 bp	60°C
MMP-2 Antisense	CCATCGCTGCGGCCTGTGTCTGT		
MMP-3 Sense	CACTCAACCGAACGTGAAGCT	109 bp	60°C
MMP-3 Antisense	CGTACAGGAACTGAATGCCGT		
MMP-9 Sense	TCCCTTCCTTGTC AAGAGCAA	106 bp	60°C
MMP-9 Antisense	TACTTGGCGCCCAGAGAAGAA		
MMP-13 Sense	TCTTGTGCTGCCCATGAGT	101 bp	60°C
MMP-13 Antisense	GGCTTTTGCCAGTGTAGGTGTA		

In **Tab. 7** ist eine Übersicht über den Verlauf der RT-PCR für die Amplifikation der gewünschten mRNA Abschnitte dargestellt. Zu Beginn der RT-PCR wurde die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (siehe **Tab. 7**). Im Anschluss daran folgte eine initiale Aktivierung der PCR. Während der Denaturierung für 15 sec bei 95°C wurde die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen und in zwei komplementäre Einzelstränge getrennt. Anschließend wurde in einem nächsten PCR-Schritt (Annealing) die Temperatur herabgesetzt, um eine Anlagerung der Primer an die beiden Einzelstränge als Starter für die Polymerisation zu ermöglichen. Die Annealing-Temperatur (T_{anneal}) wurde abhängig vom Zielgen variabel eingestellt (siehe **Tab. 6**). Während der Extension wurden ausgehend von den Primern die zu den Einzelsträngen komplementären Sequenzen ergänzt. Insgesamt wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Durch die finale Extension bei 72°C für 10 min konnte die PCR-Ausbeute verbessert werden. Die amplifizierten Produkte wurden im Anschluss an die PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe **2.13.3.2**) aufgetrennt.

Tab. 7: Übersicht über den Ablauf der RT-PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	10 min	50°C
initiale Aktivierung	5 min	95°C
Denaturierung	15 sec	95°C
Annealing	30 sec	x°C (s. Tab. 6)
Extension	1 min	72°C
Anzahl der Zyklen: 40		
finale Extension	10 min	72°C

2.13.3.2 Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese zur Analyse der PCR-Amplifikate

1 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer):

40 mM	Tris
20 mM	Essigsäure
1 mM	EDTA
(pH 8)	

DNA-Ladungspuffer:

30% (v/v)	Glycerin
0,25% (w/v)	Bromphenolblau

Die Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte durch eine horizontale Gelelektrophorese mit 2%igem Agarosegel als Gelmatrix. Dazu wurde Agarose mit 1 x TAE-Puffer zum Lösen 2 x in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend auf 60°C abgekühlt. Das Gel wurde in einen Gelgießstand der Firma BioRad gegossen, mit einem 20-Slot-Kamm zur Ausbildung der Probenauftragstaschen versehen und zum Aushärten 30 min stehengelassen. Für den Ansatz des DNA-Ladungspuffers wurde Glycerin mit Bromphenolblau und Aqua dest. vermischt. Zu 10 µl Probe wurden 5 µl des DNA-Ladungspuffers dazugegeben und auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard für die Zuordnung der entstandenen Banden wurden 5 µl eines Markers in eine Geltasche pipettiert. Die Kammer wurde mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt und die Gelelektrophorese gestartet. Die Laufzeit zur elektrophoretischen Auftrennung betrug 40 min bei einer angelegten Spannung von 130 V und 180 mA. Nach Beendigung des Laufvorgangs wurde das Gel aus der Gelkammer herausgenommen und in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/ml) 20 min inkubiert. Die entstandenen Banden konnten unter UV-Licht (UV-Transilluminator) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.13.4 Real time RT-PCR

2.13.4.1 Durchführung der SYBR[®] Green real time RT-PCR

Eine relative Quantifizierung der durch IL-1-induzierten mRNA-Expression verschiedener matrix-abbauender Proteasen im bovinen Meniskusgewebe und in isolierten Meniskuszellen, erfolgte mit Hilfe einer real time RT-PCR (Echtzeit-RT-PCR), die mit einem Qiagen QuantiTect[®] SYBR Green RT-PCR Kit durchgeführt wurde. Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf der Bindung des Farbstoffes SYBR[®] Green an doppelsträngige DNA, was aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffes nachgewiesen werden konnte. Dabei nahm mit zunehmender Menge des PCR-Produktes die Fluoreszenz zu. Nach dem DNase-Verdau (siehe 2.13.3.1) wurden zur Bestimmung jedes einzelnen Zielgens pro Reaktionsansatz 50 ng verdaute RNA eingesetzt. Für die Durchführung der real time RT-PCR wurden folgende Reaktionskomponenten verwendet:

Reaktionsansatz für real time RT-PCR:

25 µl	2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
x µl (100 pmol)	Primer (Sense)
x µl (100 pmol)	Primer (Antisense)
0,5 µl	QuantiTect RT Mix
x µl	Template RNA (x µl = 50 ng verdaute RNA)
x µl	RNase-freies H ₂ O
50 µl	Endvolumen

Für die Durchführung der real time RT-PCR wurden zum Nachweis der mRNA Expression der Matrixmetalloproteinase (MMP-1, -2, -3, -9, -13) die Primer verwendet, die bereits bei der RT-PCR angegeben wurden (siehe **Tab. 6**). Für das „Housekeeping“ Gen GAPDH als Referenzgen und die Aggrekanase ADAMTS-5 wurden die in **Tab. 8** angegebenen Primer-Sequenzen verwendet.

Tab. 8: Übersicht der real time RT-PCR Primer (insofern nicht bereits oben beschrieben).

real time RT-PCR Primer		
Name	Primer-Sequenz (5' → 3')	Produkt
GAPDH Sense	ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG	101 bp
GAPDH Antisense	TGAGTGTCTGCTGTTGAAGTCG	
ADAMTS-5 Sense	CTCCCATGACGATTCCAA	85 bp
ADAMTS-5 Antisense	AATGCTGGTGAGGATGGAAG	

Für die relative Quantifizierung wurde die Expression der verschiedenen Zielgene auf das Referenzgen GAPDH bezogen. Für jeden Primer wurde zusätzlich eine „no-template-control“ (NTC) angesetzt. Der Reaktionsansatz dieser Kontrolle enthielt im Vergleich zu den Proben keine „Template“-RNA, sodass in diesem Ansatz keine Amplifikate gebildet werden durften und daher kein PCR-Produkt detektierbar sein sollte.

Die real time RT-PCR wurde abhängig von der ermittelten Schmelztemperatur (T_m) der einzelnen Zielgene in 3 oder 4 Schritten durchgeführt. Im Anschluss an die real time RT-PCR wurde die Temperatur kontinuierlich von 65°C auf 95°C erhöht und die Produkte aufgeschmolzen. Durch eine Schmelzkurvenanalyse konnte die Schmelztemperatur der einzelnen PCR-Produkte ermittelt werden. In **Tab. 9** sind eine Übersicht der ermittelten Schmelztemperaturen (T_m), sowie die Anzahl der PCR-Schritte für die einzelnen Zielgene angegeben.

Tab. 9: Übersicht der ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) der PCR-Produkte im Anschluss an die real time RT-PCR sowie die Angabe über die Anzahl der PCR-Schritte.

Zielgen	Schmelztemperatur: T_m (°C)	Anzahl der PCR-Schritte
GAPDH	78	4-Schritt-Cycling
MMP-1	-*	3-Schritt-Cycling
MMP-2	78	4-Schritt-Cycling
MMP-3	77	4-Schritt-Cycling
MMP-9	-*	3-Schritt-Cycling
MMP-13	70	4-Schritt-Cycling
ADAMTS-5	73	4-Schritt-Cycling
Aggrekan	78	4-Schritt-Cycling

* (es konnte keine Schmelztemperatur ermittelt werden)

Zu Beginn der real time RT-PCR wurde die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) für 30 min bei 50°C umgeschrieben (siehe **Tab. 10**). Im Anschluss daran folgte für 15 min bei 95°C ein PCR-Aktivierungsschritt.

Tab. 10: Übersicht über die Bedingungen und den Ablauf der SYBR® Green real time RT-PCR.

Schritt	3-Schritt-Cycling		4-Schritt-Cycling	
	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	30 min	50°C	30 min	50°C
initiale Aktivierung	15 min	95°C	15 min	95°C
Denaturierung	15 s	94°C	15 s	94°C
Annealing	30 s	60°C	30 s	60°C
Extension	30 s	72°C	30 s	72°C
Optionsschritt zur Datenaufnahme	-	-	30 s	x°C (s. Tab. 9)

Beim 3-Schritt-Cycling wurden die Proben in einem ersten PCR-Schritt (Denaturierung) für 15 sec auf 94°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA aufzuschmelzen und in zwei komplementäre Einzelstränge zu trennen. Im zweiten Schritt (Annealing) wurde für die Anlagerung der Primer an die beiden Einzelstränge als Starter für die Polymerisation die Temperatur für 30 sec auf 60°C herabgesetzt. In einem dritten Schritt (Extension) wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, um die Primer zu verlängern und die Stränge zu komplementieren. Innerhalb eines solchen Zyklus wurde die DNA verdoppelt. Um die DNA um ein Vielfaches amplifizieren zu können, wurden daher insgesamt 40 Zyklen durchgeführt. Bei der 4-Schritt real time RT-PCR wurde im Anschluss an die Extension in einem vierten Schritt zur Datenaufnahme die Temperatur für 30 sec auf eine für die einzelnen Zielgene spezifische Schmelztemperatur (siehe **Tab. 9**) erhöht.

2.13.5 Real time RT-PCR mit TaqMan® Sonden

Die relative Quantifizierung der durch IL-1-induzierten mRNA Expression verschiedener matrix-abbauender Proteasen (MMP-2, MMP-3, ADAMTS-4, ADAMTS-5) in humanem Meniskusgewebe erfolgte mit Hilfe einer real time RT-PCR unter Verwendung des TaqMan®-Systems der Firma Applied Biosystems. Die TaqMan® Sonde weist eine nicht-fluoreszierende Farbstoffmarkierung am 3'-Ende (Quencher, Farbstoff TAMRA, 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) und eine fluoreszierende Farbstoffmarkierung am 5'-Ende (Reporter, Farbstoff FAM, 6-Carboxy-Fluorescein) auf (Beschreibung aus dem Protokoll „Assays-on-Demand™ Gene Expression Products“, Applied Biosystems). Liegen Reporter- und Quencher-molekül nah beieinander, was bei einer intakten Sonde der Fall ist, so wird die Fluoreszenz des Reporters durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt. Während der PCR bindet die Sonde mit den Primern spezifisch an den Matrizen-Strang. Der DNA-Strang verlängert sich vom Vorwärtsprimer aus und läuft auf die Sonde zu. Die AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase besitzt eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, durch die das

Reportermolekül, welches den Zugang zum Matrizenstrang blockiert, von der Sonde durch Spaltung verdrängt wird. Dadurch werden Reporter- und Quencher-molekül räumlich voneinander getrennt und eine ansteigende Fluoreszenz des Reporters induziert. Eine Zunahme des Fluoreszenzsignals ist dabei direkt proportional zur Anreicherung der amplifizierten PCR-Produkte, da durch die DNA Polymerase nur Sonden gespalten werden, die spezifisch gebunden sind. Der Vorteil bei der Verwendung der TaqMan[®] Sonden liegt darin, dass es nur zu einem Fluoreszenzsignal kommen kann, wenn die Sonde sequenzspezifisch gebunden und die Zielsequenz amplifiziert wurde, sodass keine unspezifischen Nebenprodukte nachgewiesen werden.

2.13.5.1 Durchführung der real time RT-PCR mit TaqMan[®] Sonden

Für den Nachweis einer durch IL-1 gesteigerten mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -3 sowie der Aggrekanasen ADAMTS-4 und -5 mit Hilfe von TaqMan[®] Sonden wurde die aus humanem Meniskusgewebe isolierte RNA einem DNase-Verdau (siehe 2.13.3.1) unterzogen. Für die Herstellung der einzelsträngigen cDNA wurden zu dem Reaktionsansatz des DNase-Verdau (Endvolumen 11 µl) 200 ng pd(N)₆ Random Hexamer gegeben und 5 min in einem Thermocycler bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5 x Reaction Buffer (Revert Aid[™] H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase) und 2 µl dNTP Mix zugefügt und 5 min bei 25°C inkubiert.

Reaktionsansatz für Herstellung der cDNA:

11 µl	Reaktionsansatz für den DNase-Verdau (siehe 2.13.3.1)
x µl (200 ng)	pd(N) ₆ Random Hexamer
4 µl	5 x Reaction Buffer
2 µl	dNTP Mix
1 µl	Reverse Transkriptase
20 µl	Endvolumen

Nach der Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase wurde die RNA-Sequenz nach den in **Tab. 11** beschriebenen Reaktionsbedingungen in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Tab. 11: Übersicht der Reaktionsbedingungen zur Herstellung einzelsträngiger cDNA für die Durchführung einer real time RT-PCR mit TaqMan[®] Sonden.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
cDNA-Herstellung	10 min	25°C	1
	60 min	42°C	1
	10 min	70°C	1

Als ein interner Standard wurde GAPDH verwendet. Zur Darstellung der mRNA Expression von GAPDH und der Proteasen wurden folgende TaqMan[®] Sonden verwendet:

Tab. 12: Übersicht der verwendeten TaqMan[®] Sonden zur Durchführung der real time RT-PCR.

TaqMan[®] Sonden	
Name	Nummer
GAPDH	Hs999999905
MMP-2	Hs00234422_m1
MMP-3	Hs00233962_m1
ADAMTS-4	Hs00192708_m1
ADAMTS-5	Hs00199841_m1

Für die Durchführung der real time RT-PCR wurden pro Reaktion 50 ng cDNA eingesetzt und für jedes gesuchte Zielgen folgender Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz für real time RT-PCR mit TaqMan[®] Sonden:

1 µl	Target Mix (Sonde TaqMan [®])
10 µl	TaqMan [®] Universal PCR Master Mix
x µl	cDNA (x µl = 50 ng cDNA)
x µl	RNase-freies H ₂ O
20 µl	Endvolumen

Die Amplifikation der Produkte mit Hilfe von TaqMan[®] Sonden erfolgte in einer 2-Schritt-PCR (siehe **Tab. 13**). Zu Beginn wurden die Reaktionsansätze 2 min bei 50°C inkubiert. Im ersten Schritt wurde durch die Erhöhung der Temperatur auf 95°C für 10 min die AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase irreversibel aktiviert. Im zweiten Schritt wurden die Proben für 15 sec bei 95°C denaturiert und in einem kombinierten Annealing/Extensions-Schritt 1 min bei 60°C inkubiert. Insgesamt wurde dieser Schritt 40 Mal wiederholt.

Tab. 13: Übersicht der Reaktionsbedingungen der real time RT-PCR mit TaqMan[®] Sonden.

Schritt		Zeit	Temperatur	Zyklen-Anzahl
		2 min	50°C	
Schritt 1	Aktivierung der AmpliTaq Gold [®] DNA-Polymerase	10 min	95°C	
Schritt 2	Denaturierung	15 sec	95°C	40 Zyklen
	Annealing/Extension	1 min	60°C	

2.13.6 Auswertung und Darstellung der Daten der real time RT-PCR

Für die relative Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens auf das „Housekeeping“ Gen GAPDH bezogen. Nach einer PCR-Reaktion wurde ein Schwellenwert („threshold“) für die Fluoreszenz festgelegt. Die Anzahl der PCR-Zyklen, bei der dieser Schwellenwert in den einzelnen Reaktionsansätzen erreicht wurde, wird als C_T -Wert („threshold cycle“) bezeichnet. Eine Probe mit einem höheren C_T -Wert besaß eine niedrigere Konzentration der gesuchten Gene als eine Probe mit einem niedrigeren C_T -Wert, da mehr Zyklen benötigt wurden, um den Schwellenwert zu erreichen. Das bedeutet, dass ein um eine Einheit geringerer C_T -Wert der doppelten Menge an eingesetzter cDNA entspricht.

Die Expressionsunterschiede wurden nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. In einem ersten Schritt wurde für jede Probe und Kontrolle die Differenz zwischen den gemessenen C_T -Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet (1 + 2). Von diesem ΔC_T -Wert der IL-1-stimulierten Proben wurde der ΔC_T -Wert der unbehandelten Kontrolle abgezogen (3).

- (1) ΔC_T (Probe) = C_T (Probe; Zielgen) - C_T (Probe; Referenzgen)
- (2) ΔC_T (Kontrolle) = C_T (Kontrolle; Zielgen) - C_T (Kontrolle; Referenzgen)
- (3) $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (Probe) - ΔC_T (Kontrolle)

C_T :	„threshold cycle“; Anzahl der PCR-Zyklen
Probe:	IL-1-stimulierte Proben
Kontrolle:	Kontrollgruppe
Zielgen:	MMP-1, -2, -3, -9, -13, ADAMTS-5
Referenzgen:	GAPDH

Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA. Daher wurde bei der Berechnung der Expressionsunterschiede zwischen einer mit IL-1 stimulierten Probe und der unbehandelten Kontrolle relativ zum Referenzgen folgende Formel verwendet:

$$\text{relative Zielgenmenge} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.14 Untersuchungen zur Genexpression von matrix-abbauenden Proteasen auf Proteinebene

Für den Nachweis der proteolytischen Aktivität von Matrixmetalloproteinasen in Kulturüberständen und Zelllysaten wurden zymographische Analysen durchgeführt. Die Zymographie entsprach einer Elektrophorese mit einem Zusatz von Gelatine bzw. Casein als Substrat zu einem Gradienten-SDS-Polyacrylamidgel. Die in den Kulturüberständen oder Zelllysaten vorhandenen Proteasen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, um die Struktur und Aktivität der Enzyme zu erhalten. Bei der Verwendung von Gelatine als Substrat war es mittels Zymographie möglich, die proteolytische Aktivität der in den Proben enthaltenen Gelatinasen nachzuweisen. Das Substrat Casein diente wiederum zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Kollagenasen und des Stromelysins-1 (MMP-3). Da Kollagenasen eine gelatinolytische Aktivität besitzen, konnten diese auch in einem Gelatine-Zymogramm dargestellt werden. Die Proteasen konnten durch die Spaltung der verwendeten Substrate an bestimmten Positionen innerhalb des Gels, an denen sie sich nach der elektrophoretischen Trennung befanden, nachgewiesen werden. Diese Bereiche wurden nach einer Färbung des Gels mit Coomassie-Blau als helle Banden in einem blau gefärbten Gel sichtbar. Mit Hilfe dieser Methode konnten Proteasen in der pro- und der aktiven Form nachgewiesen werden, da das Substrat aufgrund eines unterschiedlichen Molekulargewichtes der Proteasen an verschiedenen Stellen im Gel umgesetzt wurde.

2.14.1 Durchführung von zymographischen Analysen

Lysispuffer für Proteinaufbereitung aus Meniskuszellen:

50 mM	Tris
100 mM	NaCl
5 mM	EDTA
1% (v/v)	Triton-X-100
2 mM	Natrium-Vanadat
2,5 mM	Natrium-Pyrophosphat
1 mM	β -Glycerol-Phosphat
1 mM	PMSF
(pH 7,5)	

2 x Probenpuffer:

20 mM	Tris-HCl
2 mM	EDTA
20% (w/v)	Glycerin
2% (w/v)	SDS
0,02% (w/v)	Bromphenolblau
(pH 8)	

Pufferlösung:

50 mM	Tris-HCl
5 mM	CaCl ₂
(pH 8)	

Coomassie-Blau-Färbelösung:

0,1% (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blue-R-250
25% (v/v)	Isopropanol
10% (v/v)	Essigsäure

1. Entfärbelösung:

50% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure

2. Entfärbelösung:

10% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure

Für den Nachweis der Matrixmetalloproteinasen in den Kulturüberständen der Explantate aus unterschiedlichen Bereichen des Meniskusgewebes, sowie der Kulturüberstände der Meniskuszellen und Zelllysate wurde zur Trenngellösung eines Gradientengels (4,5-15% (w/v) Acryl-/Bisacrylamid) als Substrat 0,1% (w/v) Gelatine bzw. 0,2% (w/v) β -Casein zugegeben. Das Sammelgel enthielt 4,5% (w/v) Acryl-/Bisacrylamid. Alternativ wurden SDS-Polyacrylamid-Fertiggele mit Gelatine und Casein als Substrat verwendet. Die Zellen wurden nach dem Abziehen des Kulturmediums mit kaltem PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgekratzt und in Lysispuffer aufgenommen. Das Abkratzen der Zellen erfolgte auf Eis, da eine Aktivierung von intrazellulären Proteasen bei der mechanischen Lyse verhindert werden sollte, die die gesuchten Proteine denaturieren könnten. Die Proben (Kulturüberstände, Zelllysate) (50 μ l) wurden mit dem gleichen Volumen eines 2 x Probenpuffers versetzt und jeweils 5 μ l der Probenlösung wurden in die Geltaschen hineinpipettiert. Zur Darstellung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine wurde entweder ein Molekulargewichtsstandard oder Proben von osteoarthrotisch veränderten (OA) Chondrozyten mit bekannten proteolytischen Aktivitäten (freundlicherweise von Dr. Rita Dreier zur Verfügung gestellt; Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Münster) als Kontrolle auf das Gel aufgetragen. Die Proben durchwanderten das Sammelgel in der Elektrophoresekammer zunächst bei 4°C mit einer Stromstärke von 100 V. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte anschließend bei einer Stromstärke von 110 V und einer Laufzeit von 110-120 min. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel 2 x 30 min in 2,5% (v/v) Triton-X-100 gewaschen, um das denaturierende SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) aus dem Gel zu entfernen und die katalytisch wirksame Tertiärstruktur der Proteasen wiederherzustellen. Das Gel wurde anschließend in Aqua dest. gespült und 16 h (über Nacht) bei 37°C in einer Pufferlösung unter leichter Bewegung auf einem Schüttler inkubiert, damit das Substrat durch die Proteasen umgesetzt werden konnte. Im Anschluss daran folgte die Färbung des Gels mit 0,1% Coomassie-Blau-Färbelösung für 20-30 min bei Raumtemperatur. Das Gel wurde zunächst mit der 1. Entfärbungslösung und anschließend

mit der 2. Entfärbelösung entfärbt, bis an den Stellen, wo das Substrat von den Proteasen umgesetzt wurde, weiße Banden deutlich gegen den blauen Hintergrund zu erkennen waren. Zur Konservierung wurden die Gele in 1%iger Glycerinlösung fixiert und luftdicht zwischen zwei Zellulosefolien eingeschweißt. Anschließend konnten die Zymogramme eingescannt und die Banden hinsichtlich der proteolytischen Aktivität der Matrixmetalloproteinasen analysiert werden.

2.15 Untersuchungen zur Signaltransduktion von IL-1

2.15.1 „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)

Innerhalb der Signaltransduktionskaskade des proinflammatorischen Zytokins IL-1 können Transkriptionsfaktoren über eine Abfolge von enzymatischen Schritten, mit Protein-Protein Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen durch Proteinkinasen aktiviert werden. Transkriptionsfaktoren besitzen die Fähigkeit an spezifische Bereiche der genomischen DNA, den sog. Promotorregionen, zu binden und sind dadurch in der Lage, die Expression von bestimmten Genen zu regulieren. In der vorliegenden Arbeit sollte die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B („Nuclear Faktor kappa B“) nach einer Stimulation der Meniskuszellen mit IL-1 anhand des „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide, die Bindungssequenzen für den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor tragen, mit isolierten Kernproteinen aus Meniskuszellen, welche mit IL-1 stimuliert wurden, inkubiert. Wurde der gesuchte Transkriptionsfaktor aktiviert, so wurden die Oligonukleotide gebunden und konnten nach einer elektrophoretischen Auftrennung detektiert werden.

2.15.2 Isolierung von Kernproteinen

Kernprotein-Puffer A:

10 mM	HEPES
10 mM	KCl
0,2 mM	EDTA
1 mM	DTT*
0,5 mM	PMSF*
10 μ g/ml	Aprotinin*

(pH 7,9)

(* Hemmstoffe, kurz vor Gebrauch zugesetzt)

Kernprotein-Puffer B:

10 mM	HEPES
0,4 M	NaCl
0,2 mM	EDTA
1 mM	DTT*
0,5 mM	PMSF*
10 µg/ml	Aprotinin*

(pH 7,9)

(* Hemmstoffe, kurz vor Gebrauch zugesetzt)

Für den Nachweis der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB wurden isolierte Meniskuszellen einen Tag vor Stimulationsbeginn in einer Dichte von 2×10^6 pro Kulturflasche ($80.000 \text{ Zellen/cm}^2$) ausgesät und jeweils in 7 ml serumhaltigem Ham's F-12 Kulturmedium (siehe **2.2.4**) kultiviert. Vor der Durchführung des Versuches wurde das Medium abgezogen und nach einem Spülen mit PBS zur Eingewöhnung der Zellen zunächst für eine Stunde durch serumfreies Medium ersetzt. Im Anschluss daran wurde das Medium wieder abgezogen und das Stimulationsmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden unterschiedlich lang (0 min-240 min) mit IL-1 stimuliert. Als Negativkontrollen (0 min, 45 min, 150 min und 240 min) dienten die Meniskuszellen, die mit normalem Kulturmedium ohne IL-1 inkubiert wurden. Bei der Untersuchung der zeitabhängigen Aktivierung von NF-κB wurden alle Ansätze bis auf die Negativkontrollen doppelt durchgeführt. Um sicherzustellen, dass es sich bei der in der Autoradiographie dargestellten Bande um NF-κB handelte, wurde die Zelllinie TC28a2 (immortalisierte Chondrozyten; siehe **2.2.6**) 30 min mit einem aus der Literatur bekannten Stimulator des Transkriptionsfaktors, TNF-α (100 ng/ml), und mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Nach Ablauf der einzelnen Stimulationszeiten wurde das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit PBS gespült. Unmittelbar danach wurden 500 µl des kalten Puffers A auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zelllysate wurden mit einer Pipette aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, 10 sec gemischt und 1 Stunde bei 4°C stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 4°C auf einem Rüttler geschüttelt und danach 5 min ($1300 \times g$, 4°C) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet wurde mit 20-50 µl (je nach Pelletgröße) Puffer B resuspendiert. Die Zellsuspension wurde weitere 15 min bei 4°C auf einem Rüttler geschüttelt und anschließend 10 min bei 4°C und $14.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Kernproteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und nach der Bestimmung der Proteinmenge (siehe **2.15.3**) bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.15.3 Bestimmung der Kernproteinkonzentration

Die Bestimmung der Kernproteine erfolgte nach Bradford (1976) mit Hilfe eines Proteinkonzentrations-Testsystems „BioRad Protein Assay“. Dafür wurden 5 µl Proteinprobe mit 795 µl Aqua dest. vermischt. Nach der Zugabe von 200 µl BioRad Protein Assay Lösung wurde bei einer Extinktion von 595 nm Wellenlänge die Kernproteinmenge bestimmt.

2.15.4 Radioaktive Markierung der Oligonukleotid-Sonde

Für die radioaktive Markierung („labelling“) einer Oligonukleotid-Sonde mit Hilfe des „Gel Shift Assay Systems“ wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz:

14 µl	Aqua dest.
2 µl	T4-Kinase-Puffer
2 µl (10 ng)	Sonde („target nucleotide“)
1 µl	[³² P]-ATP (10 mCi/ml)
1 µl	Polynukleotid Kinase des Bakteriophagen T4 (10 U)

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert und zur Entfernung überschüssiger und nicht eingebauter Radioaktivität auf eine „MicroSpin™ G-25 Säule“ aufgetragen. Die Chromatographiesäule wurde zuvor durch eine Zentrifugation bei 735 x g bei Raumtemperatur aufgebaut. Vor dem Auftragen des Reaktionsansatzes auf die Säule wurde 1 µl abgenommen und zur späteren Messung der Radioaktivität in ein Szintillationsröhrchen überführt. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß eingesetzt, in dem die aufgereinigte Sonde aufgefangen werden sollte, und 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Von der aufgereinigten Oligonukleotid-Sonde wurde 1 µl abgenommen, in ein zweites Szintillationsröhrchen überführt und zusammen mit der vor der Aufreinigung entnommenen Probe nach der Zugabe von 2 ml Szintillationsflüssigkeit in einem β-Counter zur Bestimmung der Zerfallsrate pro Minute als Maß für die Markierungseffizienz verwendet. Die Einbaurrate der Sonde sollte ca. 30% betragen. Bei dem Einsatz der Sonde „NF-κB“ sollten 40.000 bzw. 80.000 cpm („counts per minute“) pro Probe eingesetzt werden.

2.15.5 Herstellung des Polyacrylamidgels für die elektrophoretische Auftrennung der Kernproteine

10 x TBE (Tris-Borsäure-EDTA)-Puffer:

0,9 M	Tris
0,9 M	Borsäure
0,5 M	EDTA
(pH 8)	

Polyacrylamidgel-Lösung (4%ig):

5 x	TBE-Puffer
2% (w/v)	Bisacrylamid
40% (w/v)	Acrylamid
80% (w/v)	Glycerin
0,01% (v/v)	TEMED
10% (w/v)	APS

Für die Durchführung des „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) wurde zur elektrophoretischen Auftrennung eine Elektrophoresekammer mit Wasserkühlung verwendet. Aus zwei Glasplatten wurde zunächst eine Gelkammer zusammengebaut. Die beiden Glasplatten wurden, durch ein Dichtungsgummi als Abstandshalter voneinander getrennt, aufeinander gesetzt, durch Klemmen fest zusammengedrückt und in einen Gelgießstand eingesetzt. Für die Herstellung der Gele (10 x 12 cm; 0,75 cm Dicke) wurde eine 4%ige-Polyacrylamid-Lösung verwendet. Zur Bildung von Taschen, in die die Proben später hineinpipettiert werden sollten, wurde an die Kante zwischen den beiden Glasplatten ein Kamm gesetzt. Das Gel wurde zum Polymerisieren 60 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend in die Elektrophoresekammer eingebaut. Die Taschen wurden einmal mit 0,5 x TBE-Puffer gespült, bevor die Kammer vollständig mit dem Puffer befüllt wurde. Vor dem Auftragen der Proben in die Taschen, wurde ein Vorlauf des Gels für 30 min bei 200 V durchgeführt.

2.15.6 Durchführung des Gel-Shifts

Marker:

250 mM	Tris-HCl
40% (v/v)	Glycerin
0,2% (w/v)	Bromphenolblau
(pH 7,5)	

Für die Durchführung des Gel-Shifts wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Reaktionsansatz:

2 µl	Gelshift „binding buffer“
5 µg	Probe (max. 7 µl Kernproteinvolumen)
1 µl	radioaktiv markierten Oligonukleotidsonde
x µl	H ₂ O
10 µl	Endvolumen

Nach einer Inkubation der Reaktionsansätze für 1 h bei 4°C wurden jeweils 10 µl Probenansatz in die einzelnen Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl Marker in eine Tasche hineinpipettiert. Der Marker sollte als Kontrolle den Stand der Elektrophorese anzeigen. Zum Reinlaufen der Proben in das Gel wurde für 3-5 min eine Spannung von 300 V bei Raumtemperatur angelegt. Anschließend wurde der Gellauf bei 140 V für 1,5 h bei 20°C durchgeführt, bis der Marker $\frac{3}{4}$ der Kammer durchlaufen hatte. Die Gelkammer wurde abgebaut und das Gel mit einem Whatman-Papier aufgenommen. Anschließend wurde das Gel in eine Klarsichtfolie gewickelt und in eine Autoradiographiekassette gelegt. Zur Darstellung der Gelshiftbanden wurde ein Autoradiographie-Film aufgelegt, der nach einer Exposition von 72 h bei -70°C entwickelt wurde. Die densitometrische Auswertung der eingescannten Banden erfolgte mit Hilfe des Programmes PCBAS (PCBAS20.Exe).

2.16 Untersuchungen zur Bindungsaffinität

2.16.1 Iodierung von IL-1

Säulenpuffer:

20 mM HEPES
0,14 M NaCl
(pH 7,4)

Kaliumphosphatpuffer:

1 M KH_2PO_4
1 M K_2HPO_4
(pH 7,2)

Für die Durchführung der Untersuchung zur Bindungsaffinität in Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe wurde IL-1 mit ^{125}I radioaktiv markiert. Die Iodierung von IL-1 erfolgte nach der Chloramin-T-Methode über eine Gelfiltrationssäule. Für die Herstellung der Säule wurde SephadexTM G-25 Superfine zum Aufquellen mit einem Säulenpuffer versetzt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und die abgesetzte Lösung wurde mit neuem Puffer resuspendiert und weitere 30 min stehen gelassen. Nachdem die Lösung eine zähe Konsistenz aufwies, wurde sie in die Säule aufgetragen. Die Säule wurde einen Tag vor der radioaktiven Markierung von IL-1 hergestellt und bis zur Verwendung verschlossen bei 4°C gelagert. Vor der IL-1-Iodierung wurde die Gelfiltrationssäule mit Säulenpuffer (mit 0,1% BSA versetzt) gespült. Für die Iodierung wurden in ein Eppendorfgefäß 10 µl Kaliumphosphatpuffer, 4 µl IL-1α CF („carrier free“), 2-4 µl ^{125}I -Iod und 10 µl Chloramin-T (1 mg/ml Kaliumphosphatpuffer) gegeben und für 30-40 sec geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde mit 100 µl Tyrosin gestoppt. Für eine Darstellung des Gemisches beim Durchlaufen durch die Säule wurden 100 µl Dextranblau dazugegeben. Das Reaktionsprodukt wurde auf die SephadexTM G-25-Säule aufgetragen, um überschüssige, nicht gebundene Radioaktivität zu entfernen. Sobald die radioaktiv markierte Probe die Säule durchlaufen hatte, wurden 10 Fraktionen von ca. 300 µl in Röhrchen gesammelt. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde anschließend mit Hilfe eines γ -Counters bestimmt. Die Fraktionen mit den höchsten Radioaktivitätswerten wurden vereinigt und unmittelbar danach für den Ansatz der Inkubationsmedien verwendet.

2.16.2 Durchführung der Untersuchungen zur Bindungsaffinität mit ^{125}I -IL-1

Für die Untersuchung der Bindungsaffinität in Meniskusexplantaten aus unterschiedlichen Bereichen des Meniskusgewebes, wurden Bindungsstudien mit ^{125}I -iod-markiertem IL-1 (^{125}I -IL-1) in Form eines Verdrängungsversuches mit unmarkiertem IL-1 durchgeführt. Jeweils 1 Meniskusexplantat wurde in einer 96er Wellplatte mit 200 µl Inkubationsmedium mit einer Konzentration von ^{125}I -IL-1 inkubiert, bei der durch die radioaktive Markierung 100.000 cpm eingebaut wurden (siehe 2.16.1). Zur Untersuchung einer Verdrängung wurden die

Explantate in Gegenwart eines 100-fachen Überschusses von unmarkiertem IL-1 kultiviert. Die Untersuchungen zur Bindungsaffinität erfolgten für 2, 6 und 18 h bei 4°C auf einem Schwenker, da bei niedrigen Temperaturen die Bindungsaffinität gegenüber einer Bindung bei 37°C deutlich vermindert ist. Nach den einzelnen Inkubationszeiten wurden die Explantate 4 x 5 min mit eiskaltem PBS-Puffer (mit 0,1% BSA) zur Beseitigung von überschüssiger, nicht gebundener Radioaktivität gespült. Die Explantate wurden anschließend in ein RIA-Röhrchen überführt. Die Menge an gebundenem ¹²⁵I-IL-1 wurde anschließend mit Hilfe eines γ -Counters für 1 min gemessen. Die Untersuchungen zur Bindungsaffinität wurden insgesamt in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Für die Darstellung der Ergebnisse zur Bindungsaffinität wurden nur die Werte nach einer Inkubationszeit von 6 h verwendet und die gemessene Radioaktivität auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

2.17 Statistische Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardfehler oder Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Für die statistische Auswertung wurde der sog. Student's t-Test verwendet. Der Test wurde 2-seitig bei ungleicher Varianz durchgeführt. Die Zuverlässigkeit einer Aussage wurde als signifikant angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopische Darstellung von Gewebeexplantaten aus dem bovinen Meniskus

Für die lichtmikroskopische Darstellung der Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe, welches direkt an das Tibiaplateau angrenzte, wurden Gewebeschnitte mit Toluidinblau angefärbt (siehe **2.9.3**). Zusätzlich wurden zum Nachweis von Kollagen Typ I und Kollagen Typ II in den Meniskusexplantaten immunhistochemische Färbungen durchgeführt (siehe **2.11.1**).

Lichtmikroskopisch konnten innerhalb der oberflächlichen Meniskusexplantate drei Schichten dargestellt werden (**Abb. 9A**). Die erste etwa 30 µm dicke Schicht entsprach der originären Meniskusoberfläche. In dieser Schicht war die Zelldichte relativ hoch und die Fasern der Matrix waren parallel zur Oberfläche ausgerichtet und negativ in der Kollagen Typ I- und II-Färbung (**Abb. 10A, Abb. 10B**). Direkt unter der Oberfläche aber innerhalb dieser Schicht lagen einzelne flache Zellen, mit wenig Zytoplasma, die mit der Längsachse parallel zur Oberfläche ausgerichtet waren (**Abb. 9B**). In ihrem Erscheinungsbild ähnelten sie fibroblastenartigen Zellen; daneben gab es aber auch rundlichere Zellen. Die darunter liegende zweite etwa 300 µm dicke Schicht in den Explantaten wies ebenfalls eine relativ hohe Zelldichte auf, ließ aber keine so deutliche Ausrichtung der Kollagenfasern erkennen (**Abb. 9A**). Die Zellen hatten die Struktur runder Knorpelzellen. Die Matrix um die Zellen („Knorpelhof“) war stark basophil angefärbt, was auf eine hohe Konzentration von polyanionischen Proteoglykanen hindeutete. In der Matrix waren Kollagen Typ I und II koexprimiert (**Abb. 10A, Abb. 10B**). Weiter innen im Gewebe, in der dritten und dicksten Schicht, konnte man zahlreiche große Kollagenfaserbündel erkennen, die kleine lichtmikroskopisch unauffällige Zellen beinhalteten. Die Bündel waren von einem Gewebe septenartig umgeben, welches histologisch dem der zweiten Schicht entsprach und somit als Faserknorpel zu benennen ist. Während die dritte Schicht etwa 2/3 der Dicke von oberflächlichen Explantaten ausmachte, waren die aus den tieferen Schichten des Meniskus gewonnenen Explantate ausschließlich aus dieser Art Gewebe aufgebaut (Näheres siehe auch Kapitel **3.15.1**).

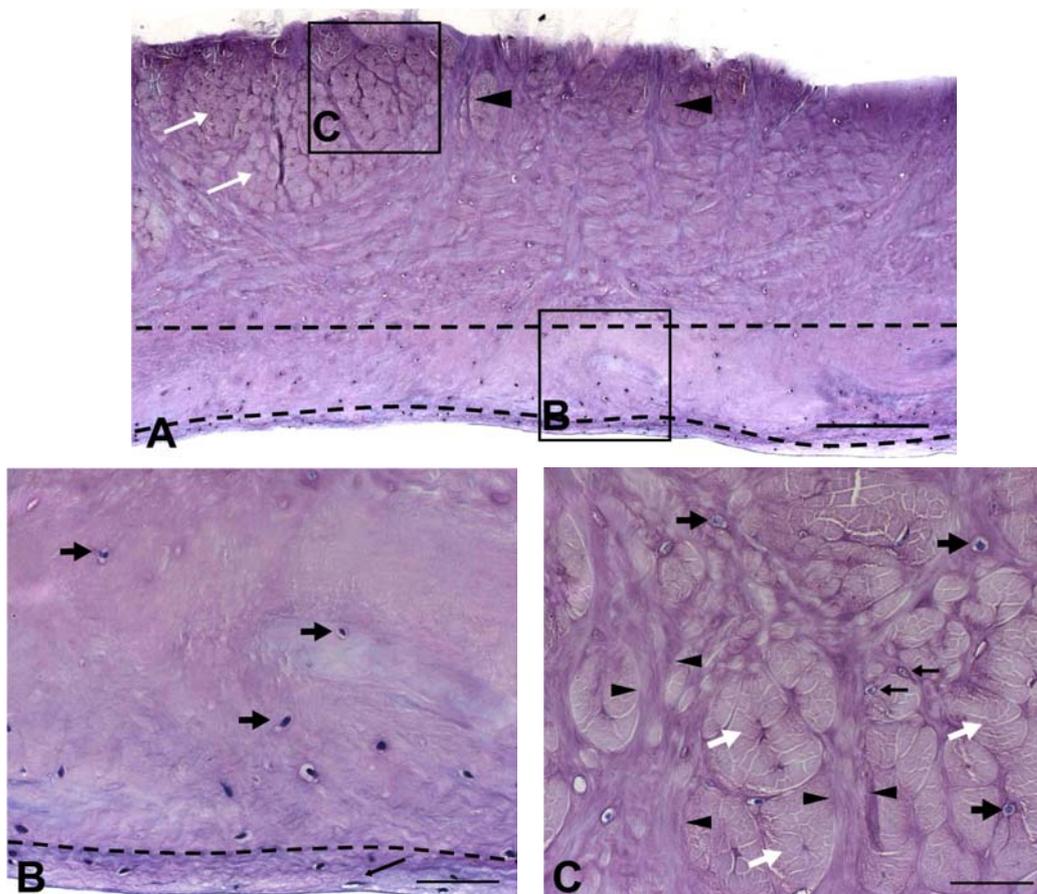


Abb. 9:
Lichtmikroskopische Darstellung eines oberflächlichen Meniskusexplantates am Paraffinschnitt (Toluidinblau-Färbung).

- (A) Meniskusexplantat in der Übersicht (Balken = 200 μm). An der Außenfläche des Explantates, welche ursprünglich an die Tibia grenzte (im Bild nach unten zeigend), sieht man eine etwa 30 μm dicke Gewebeschicht, in der die Matrixfasern parallel zur Oberfläche ausgerichtet sind (Näheres siehe Ausschnitt B) gefolgt von einer zweiten etwa 300 μm dicken Schicht, die faserknorpelartiges Gewebe beinhaltet (siehe Ausschnitt B). Dem gegenüber findet sich eine dritte Schicht (im Bild nach oben zeigend), die etwa 2/3 der Explantatdicke repräsentiert und große Bündel von Kollagenfasern beinhaltet (weiße Pfeile), die septenartig von einem faserknorpelartigen Gewebe umgeben sind (siehe Ausschnitt C). Schwarze Pfeilspitzen: besonders große Septen.
- (B) Ausschnittsvergrößerung aus A an der natürlichen Meniskusoberfläche (Balken = 50 μm). Die Zellen direkt an der Oberfläche sind zum Teil spindelförmig und parallel zur Außenfläche angeordnet (dünner schwarzer Pfeil). Sie liegen neben ovaleren Zellen in der etwa 30 μm dicken äußersten Schicht, in der auch die Kollagenfasern parallel zur Oberfläche verlaufen. Die Zellen in der zweiten Schicht weiter im Inneren des Gewebes haben eine runde knorpelzellartige Erscheinungsform mit kleinen Knorpelhöfen (hohe Dichte negativer Ladungen) (dicke schwarze Pfeile). Die Matrix um diese Zellen zeigt einen erhöhten Anteil an negativen Ladungen aber keine deutliche Ausrichtung der Kollagenfasern. Diese Schicht entspricht morphologisch einem Faserknorpel.
- (C) Die Ausschnittsvergrößerung aus A zeigt den Aufbau der dritten, weiter im Inneren des Meniskus liegenden Schicht (Balken = 50 μm). Sie besteht aus dicken Kollagenfaserbündeln (darin kleine unauffällige Zellen: dünne schwarze Pfeile), die quer angeschnitten (weiße Pfeile) von faserknorpelartigen Septen mit vielen negativen Ladungen in der Matrix (schwarze Pfeilspitze) umgeben sind. Die Zellen der Septen sind rund und haben einen Knorpelhof (schwarze Pfeile).

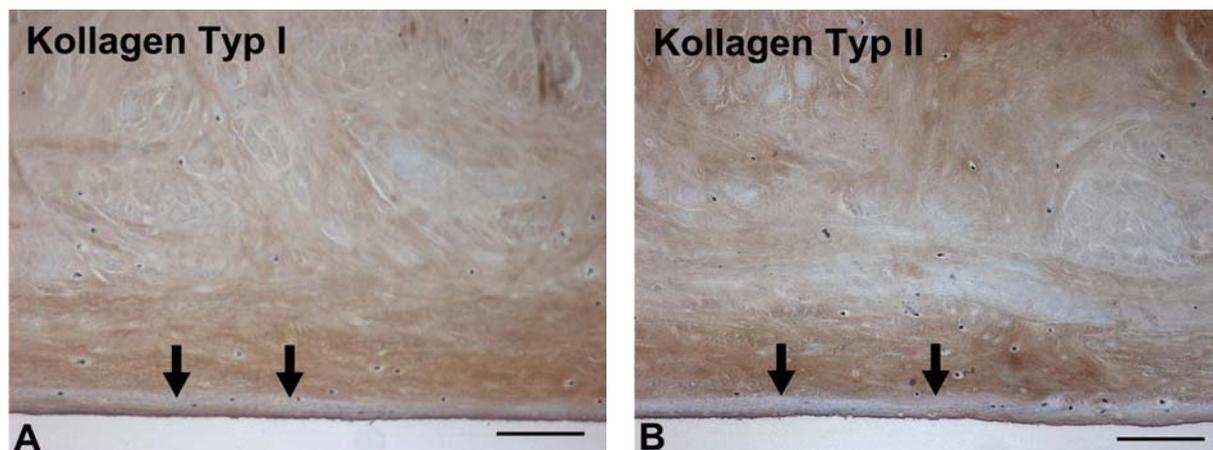


Abb. 10:
Immunhistochemische Darstellung von Kollagen Typ I (A) und Kollagen Typ II (B) in einem Meniskusexplantat aus dem oberflächlichen Gewebe. Während eine etwa 30 µm dicke Gewebeschicht direkt unter der Meniskusoberfläche keine positive Färbung für Kollagen Typ I und Kollagen Typ II zeigt (Pfeile), deutet die Färbung darauf hin, dass im darunter liegenden faserknorpelartigen Gewebe beide Kollagene koexprimiert sind (die Abbildungen entsprechen dem Ausschnitt B in **Abb. 9**); (Balken = 100 µm).

3.2 Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskuszellen

Zusätzlich zu den Explantatkulturen wurden aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe Zellen isoliert, um die direkte Wirkung von IL-1 auf die Zellen zu untersuchen. Nach einer enzymatischen Isolierung der Meniskuszellen aus der Extrazellulärmatrrix des Meniskusgewebes konnten bereits nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen in serumhaltigem Medium mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops vereinzelt runde und polymorphe Zellen beobachtet werden.

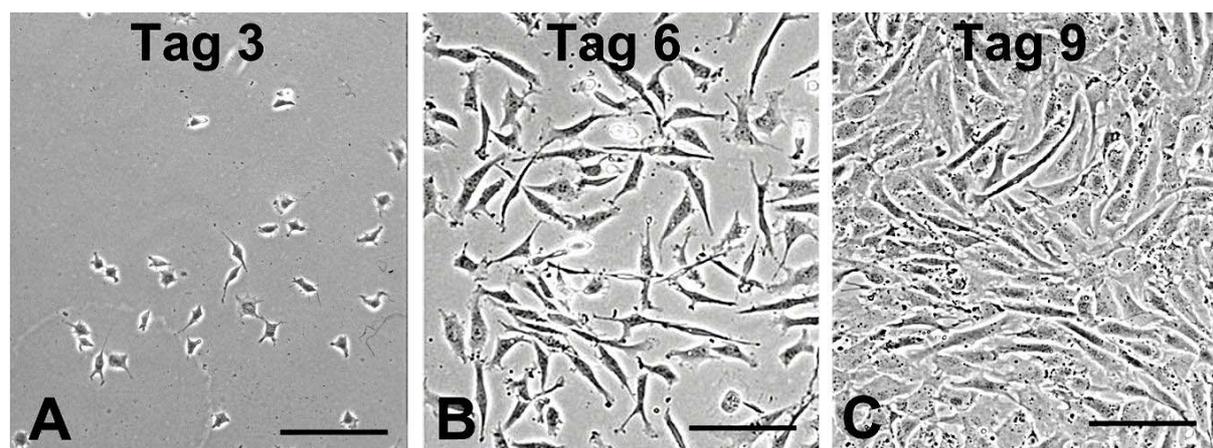


Abb. 11:
Lichtmikroskopische Darstellung von isolierten Meniskuszellen in Kultur. Meniskuszellen wurden enzymatisch isoliert und bis zur Versuchsdurchführung in serumhaltigem Medium kultiviert (Balken = 100 µm).

- (A) Meniskuszellen zeigen nach 3 Tagen in Kultur eine runde bis polymorphe Erscheinungsform.
- (B) Nach 6 Tagen in Kultur sind die Zellen überwiegend spindelförmig.
- (C) Nach 9 Tagen in Kultur sind die Zellen nahezu konfluent gewachsen.

Einige der Zellen wiesen eine spindelförmige Zellform mit Ausläufern auf (**Abb. 11A**). Die Zellen zeigten nach 6 Tagen in Kultur ein überwiegend fibroblastenartiges Aussehen (**Abb. 11B**). Nach 9 Tagen waren die Zellen polygonal bis spindelförmig und nahezu konfluent gewachsen (**Abb. 11C**). Die Zellen wurden insgesamt 10 Tage kultiviert, bevor nach einer Subkultivierung die Stimulationsversuche mit IL-1 durchgeführt wurden.

Für die Versuchsdurchführungen wurden die subkultivierten Zellen (siehe **2.2.7**) in einer Dichte von 80.000 Zellen /cm² in serumhaltigem Medium ausgesät. Die Zellen waren bereits nach 2-3 h adhären und bildeten einen Monolayer. Im Phasenkontrastmikroskop konnte man einen Tag nach der Subkultur und damit am Tag des Versuchsbeginns spindelförmige Meniskuszellen mit zahlreichen Ausläufern erkennen (**Abb. 12A**). Für die Versuche wurde das serumhaltige Kulturmedium durch ein serumfreies Stimulationsmedium (ohne/mit IL-1) ersetzt, was dazu führte, dass die Zellen im Vergleich zu dem bisher verwendeten serumhaltigen Medium neben einer überwiegend spindelförmigen auch eine polygonale Erscheinungsform ausbildeten (**Abb. 12B**). Eine Stimulation der Meniskuszellen mit IL-1 führte zu einer noch stärkeren Verschiebung der Zellform hin zu fast ausschließlich polygonalen Zellen (**Abb. 12C**).

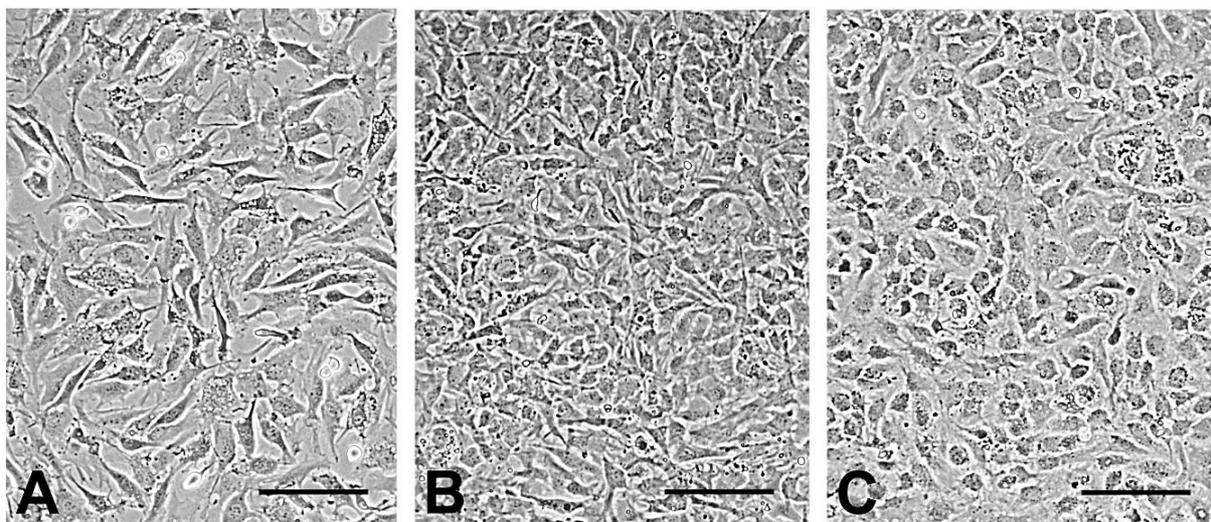


Abb. 12:

Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskuszellen nach der 1. Subkultivierung.

Meniskuszellen wurden einen Tag vor Versuchsbeginn in einer Dichte von 80.000 Zellen/cm² ausgesät und bis zum Stimulationsbeginn in serumhaltigem Medium kultiviert. Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen 3 Tage mit serumfreiem Stimulationsmedium, welches ohne/mit IL-1 (10 ng/ml) versetzt wurde, kultiviert (Balken = 100 µm).

- (A) Einen Tag nach Subkultivierung zeigen die Zellen in serumhaltigem Medium eine spindelförmige Erscheinungsform.
- (B) Nach drei Tagen in serumfreiem Medium (ohne IL-1) erscheinen die Zellen zum Teil spindelförmig, zum Teil polygonal und sind konfluent gewachsen.
- (C) Meniskuszellen, die drei Tage in serumfreiem Medium mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert wurden zeigen gegenüber Abb. B fast ausschließlich eine polygonale Form.

3.3 Untersuchung zur Expression der Matrixmoleküle auf mRNA Ebene

3.3.1 Expression von Matrixmolekülen im Meniskusgewebe

Mittels einer RT-PCR wurde im Meniskusgewebe am Tag der Explantatgewinnung (Tag 0) auf mRNA Ebene die Expression der Matrixmoleküle Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, sowie von Aggrekan bestimmt. Innerhalb der Meniskusexplantate konnte auf mRNA Ebene nur die Expression von Aggrekan, jedoch nicht von Kollagen Typ I und Typ II nachgewiesen werden (**Abb. 13**).

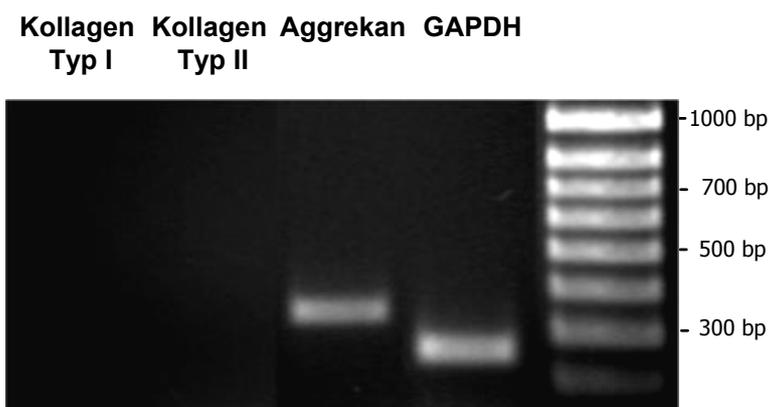
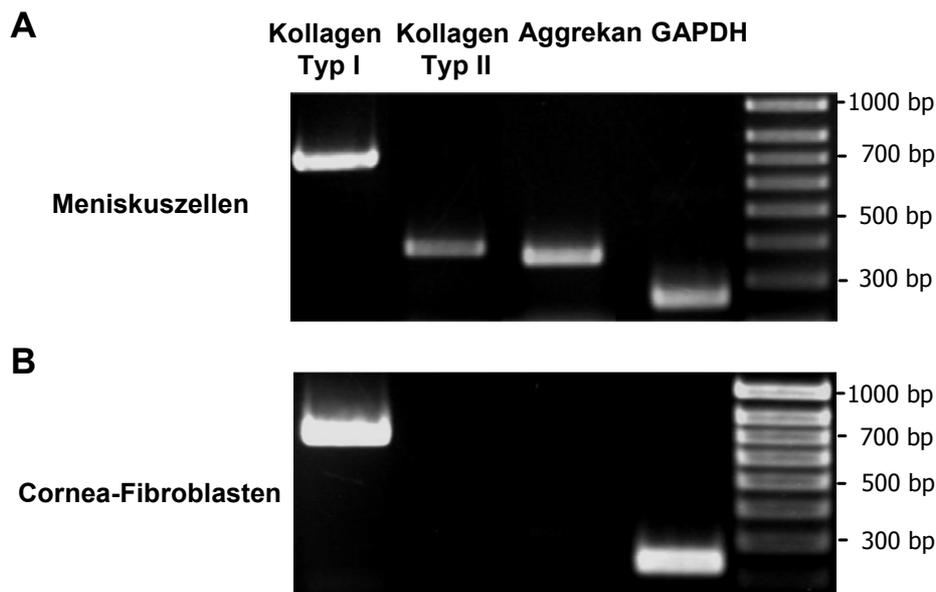


Abb. 13: Nachweis der mRNA Expression der extrazellulären Matrixmoleküle Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Aggrekan im Meniskusgewebe. Aus dem Meniskusgewebe wurde unmittelbar nach der Herstellung der Explantate eine RT-PCR durchgeführt. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente als Kontrolle.

3.3.2 Expression von Matrixmolekülen in isolierten Meniskuszellen

Zur Charakterisierung des Phänotyps der Meniskuszellen wurde die Expression von typischen Matrixmolekülen des Meniskusgewebes mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR bestimmt. In Meniskuszellen der 1. Subkultur konnte nach 3 Tagen in Kultur auf mRNA Ebene eine Expression von Kollagen Typ I und Aggrekan, sowie von Kollagen Typ II nachgewiesen werden. (**Abb. 14A**). Aufgrund der Expression dieser Matrixmoleküle, konnte man davon ausgehen, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kulturbedingungen zu keiner vollständigen Dedifferenzierung der Zellen geführt haben. Zum Vergleich der in den Meniskuszellen gefundenen Matrixbestandteile wurden bovine Cornea-Fibroblasten unter den gleichen Kultivierungsbedingungen gehalten und die Genexpression auf mRNA Ebene untersucht. In den Fibroblasten konnte auf mRNA Ebene nur eine Expression von Kollagen Typ I nachgewiesen werden (**Abb. 14B**).

**Abb. 14:**

Nachweis der mRNA Expression von extrazellulären Matrixmolekülen in isolierten Meniskuszellen und Cornea-Fibroblasten 3 Tage nach Subkultivierung. Nach der Isolierung der RNA aus den Zellen wurde mit Hilfe einer RT-PCR die Expression der Matrixmoleküle Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Aggrekan zur Charakterisierung der Zellen untersucht. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) diente als Kontrolle.

- (A) In Meniskuszellen ist auf mRNA Ebene Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Aggrekan nachweisbar.
 (B) In Cornea-Fibroblasten ist auf mRNA Ebene Kollagen Typ I nachzuweisen, Aggrekan und Kollagen Typ II sind negativ.

3.4 Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf isolierte Meniskuszellen

3.4.1 Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen in Meniskuszellen auf mRNA Ebene

Mit Hilfe einer real time RT-PCR wurde der Einfluss von IL-1 auf die Genexpression der Aggrekanase ADAMTS-5 sowie der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -9 und -13 in isolierten Meniskuszellen untersucht. Die Meniskuszellen wurden einen Tag (Tag 1) und drei Tage (Tag 3) ohne/mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert und der RNA-Gehalt nach der in Kapitel 2.13.1.1 beschriebenen Methode isoliert und ermittelt. Für die relative Quantifizierung der mRNA Menge der einzelnen Zielgene wurde die Genexpression auf das „Housekeeping Gen“ GAPDH bezogen und Expressionsunterschiede nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die unstimulierte Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Werte der einzelnen Zielgene im Vergleich dazu betrachtet.

In den isolierten Meniskuszellen führte IL-1 im Vergleich zur Kontrolle zu keiner deutlich gesteigerten Expression der Aggrekanase ADAMTS-5 sowie der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 und -2. Nach einem Tag wurde gegenüber der Kontrolle lediglich eine leichte Steigerung der mRNA Expression dieser matrix-abbauenden Proteasen gemessen, die aber nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar war (**Abb. 15**).

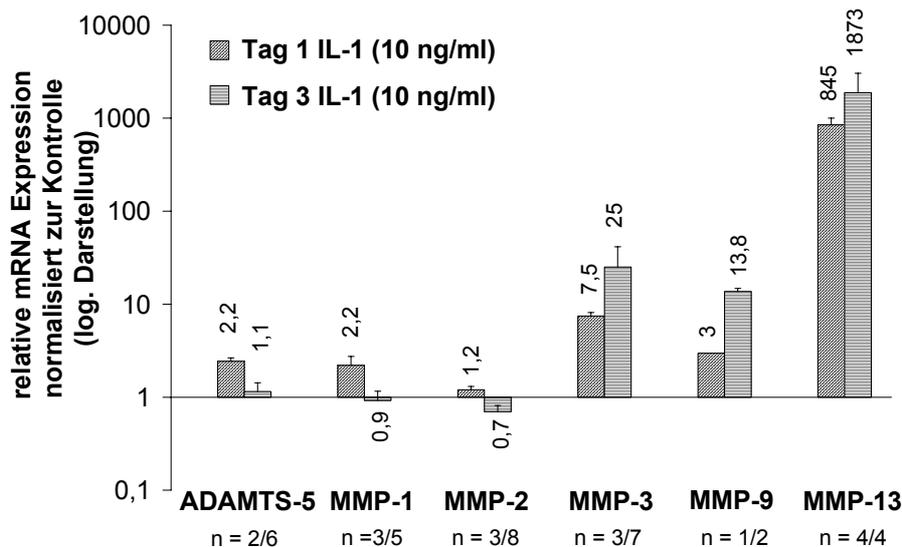


Abb. 15:
Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen in isolierten Meniskuszellen auf mRNA Ebene. Meniskuszellen wurden nach der 1. Subkultur in einer Dichte von 80.000 Zellen/cm² ausgesät und 1 Tag bzw. 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert. Nach der Isolierung der RNA wurde zum Nachweis einer IL-1-induzierten Genexpression eine real time RT-PCR durchgeführt. Die mRNA Expression einer Aggrecanase (ADAMTS-5) und verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2, -3, -9 und -13) ist relativ zur unstimulierten Kontrolle (welche gleich 1 gesetzt wurde) logarithmisch dargestellt. Mittelwerte + Standardabweichung

Demgegenüber wurde die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch IL-1 gesteigert. Diese Steigerung nahm mit Dauer der Kultivierung in allen drei Fällen noch zu. Die Expression von MMP-13 wurde mit den Faktoren 845-fach (Tag 1) und 1873-fach (Tag 3) am stärksten durch IL-1 beeinflusst. Für die anderen Enzyme betrug die Steigerung MMP-3: 7,5-fach (Tag 1) und 25-fach (Tag 3) sowie MMP-9: 3-fach (Tag 1) und 13,8-fach (Tag 3).

3.4.2 Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen auf Proteinebene

Durch zymographische Analysen, mit Gelatine und Casein als Substrat, konnte in den Meniskuszellen die proteolytische Aktivität der matrix-abbauenden Proteasen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für die Untersuchung der Zelllysate wurde konditioniertes Medium von osteoarthrotischen Chondrozyten (OA-Chondrozyten) mit bekannten proteolytischen Aktivitäten verwendet, und die dargestellten Banden mit Hilfe des Molekulargewichtes ermittelt.

In den Zelllysaten der unstimulierten als auch der mit IL-1-behandelten Meniskuszellen konnte bei 66 kDa die pro-Form von MMP-13 sowohl im Gelatine- als auch im Caseinzymogramm nachgewiesen werden (**Abb. 16A**), wobei diese Aktivität in den IL-1-stimulierten Zellen stärker war. Auch in den Kulturüberständen konnte pro-MMP-13 nachgewiesen werden und mit IL-1 war eine leichte Zunahme dieser proteolytischen Aktivität zu erkennen (**Abb. 16C, 16D**). Weitere Banden zwischen 66 und 97 kDa im

Gelatinezymogramm der Zelllysate ließen auf eine proteolytische Aktivität von MMP-9 (pro und aktiv) schließen (**Abb. 16A**), wobei im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen keine Unterschiede in der Bandenintensität in den IL-1-behandelten Proben ausgemacht werden konnten. In den konditionierten Kulturüberständen war allerdings keine proteolytische Aktivität von MMP-9 nachzuweisen.

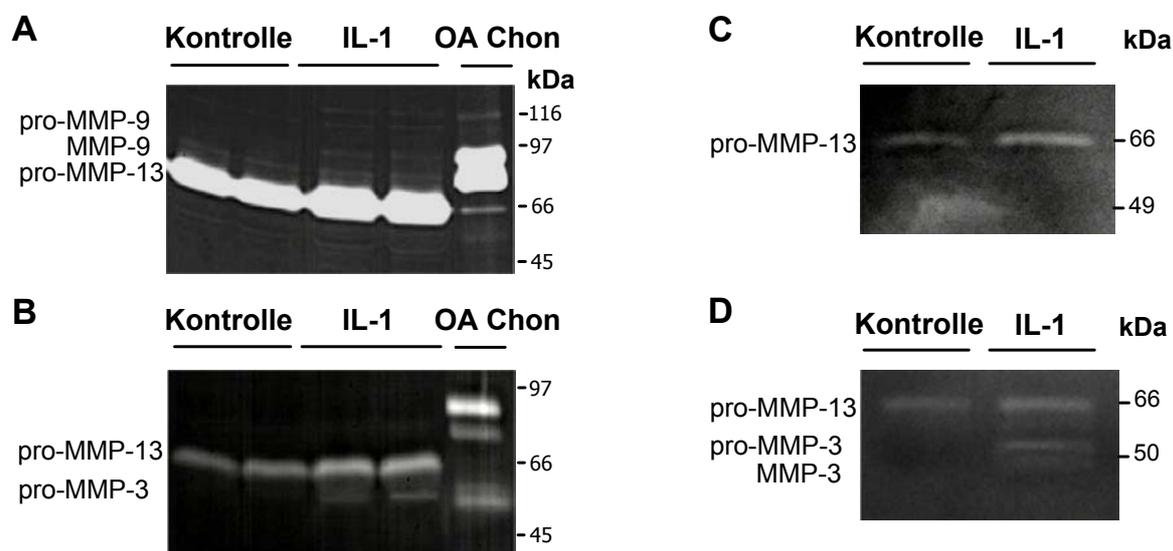


Abb. 16: Zymographische Analysen der Zelllysate (A, B) und Kulturüberstände von Meniskuszellen (C, D) zum Nachweis der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Enzymen auf Proteinebene. Meniskuszellen der 1. Subkultur wurden 3 Tage ohne (Kontrolle)/mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und die Zelllysate und Kulturüberstände zum Nachweis von matrix-abbauenden Proteasen in einem Gelatine- und Caseinzymogramm verwendet. Als Kontrolle zur Darstellung der proteolytischen Aktivität wurde konditioniertes Medium von osteoarthrotischen Chondrozyten (OA Chon) verwendet.

- (A) Gelatinezymogramm der Zelllysate zum Nachweis von MMP-13 (pro) und MMP-9 (pro/aktiv).
- (B) Caseinzymogramm der Zelllysate zum Nachweis von MMP-3 (pro) und MMP-13 (pro)
- (C) Gelatinezymogramm der Kulturüberstände von Meniskuszellen zum Nachweis von Kollagen MMP-13 (pro).
- (D) Caseinzymogramm der Kulturüberstände von Meniskuszellen zum Nachweis von MMP-13 (pro) und MMP-3 (pro/aktiv).

Im Vergleich zu MMP-13, dessen konstitutive Expression bereits in den Zelllysaten und Kulturüberständen der unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden konnte, wurde mittels eines Caseinzymogramms die proteolytische Aktivität von pro-MMP-3 (55 kDa) nur nach einer Stimulation der Zellen mit IL-1 induziert. In den Kulturüberständen der Meniskuszellen war neben der IL-1-induzierten Expression von pro-MMP-3 zusätzlich die aktive Form von MMP-3 (48 kDa) detektierbar. Im Vergleich zu der real time RT-PCR, die mit IL-1 eine deutliche Steigerung der Expression der MMPs zeigte, konnte mit Hilfe der zymographischen Analysen nur eine leichte Zunahme der proteolytischen Aktivität ausgemacht werden. Die Ursache für diese Diskrepanz ist bislang unklar, obwohl bei der real time RT-PCR von einer weit höheren Sensitivität ausgegangen werden muss; eventuell müssten unterschiedliche Probenmengen in der Zymographie getestet werden. Letztlich ist aber auch die Möglichkeit nicht völlig auszuschließen, dass sich die erhöhte mRNA-Menge nicht zwingend in einer entsprechenden Erhöhung der Proteinmenge der MMPs wieder finden muss. Die

Zymogramme bestätigen dennoch qualitativ die Expression der auf mRNA Ebene gefundenen MMPs und zeigen, dass diese überwiegend in der pro-Form nachweisbar sind.

3.5 Untersuchungen zur IL-1 Signaltransduktion in Meniskuszellen

3.5.1 Untersuchungen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch IL-1

Um zu überprüfen, ob die Stimulation der Meniskuszellen mit IL-1 eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bedingen könnte, wurde ein „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) durchgeführt (siehe 2.15.1), eine Methode, die zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen angewendet wird. Aus den Meniskuszellen wurden nach unterschiedlichen Stimulationszeiten mit IL-1 (0 min - 240 min) nukleäre Proteine isoliert und mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Spezifizierung der erhaltenen Bande, wurden Zellen der TC28a2 Zelllinie für 30 min mit einem klassischen gut beschriebenen NF- κ B Stimulus, dem „Tumor necrosis factor alpha“ (TNF- α), und IL-1 inkubiert. In den Zellen konnte sowohl mit TNF- α als auch mit IL-1 die Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden, so dass man die dargestellte Bande als Positivkontrolle für NF- κ B heranziehen konnte (Abb. 17A).

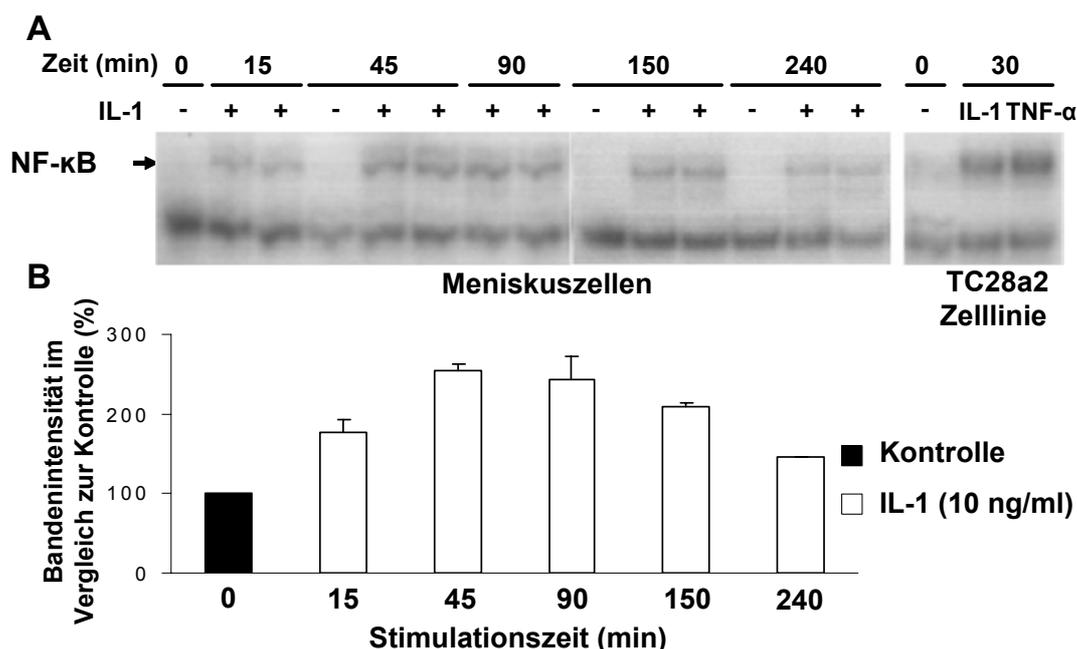


Abb. 17:

Nachweis der IL-1-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in isolierten Meniskuszellen. Meniskuszellen der 1. Subkultur wurden in einer Dichte von 80.000 Zellen/cm² ausgesät und unterschiedlich lang (0 min - 240 min) ohne (Kontrolle)/mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Nach der Gewinnung der Kernproteine aus den Meniskuszellen wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit Hilfe eines „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) ermittelt. Als Kontrolle zur Spezifizierung der erhaltenen Banden wurden Zellen der Zelllinie TC28a2 30 min mit IL-1 (10 ng/ml) und TNF- α (100 ng/ml) stimuliert.

(A) Darstellung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch IL-1 in Abhängigkeit von der Zeit.

(B) Darstellung der densitometrischen Auswertung der Bandenintensität Mittelwerte + Standardfehler (n = 2)

In den unstimulierten Zellen wurde zu keinem Zeitpunkt eine Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen. Bereits nach einer 15-minütigen Stimulation mit IL-1 konnte eine leichte Aktivierung des Transkriptionsfaktors beobachtet werden, die nach 45 min am stärksten war. Nach 90 min nahm die Bandenintensität leicht ab und wurde bei den längeren Stimulationszeiten zunehmend schwächer. In **Abb. 17B** ist eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität dargestellt.

3.5.2 Untersuchungen zur Hemmung der IL-1-induzierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch ein Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm)

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kann neben der rezeptorvermittelten Wirkung von IL-1 auch über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert werden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich durch die Zugabe eines Radikalfängers, des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm), die Aktivierung von NF- κ B beeinflusst werden könnte. Die isolierten Meniskuszellen wurden 150 min mit IL-1 und dem SODm in den Konzentrationen 2,5 μ M und 25 μ M stimuliert und die Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe des „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (siehe 2.15.1) ermittelt.

In der unstimulierten Kontrolle (0 min) war der Transkriptionsfaktor nicht nachweisbar, während die Stimulation der Zellen mit IL-1 zu der Aktivierung von NF- κ B führte (**Abb. 18A**).

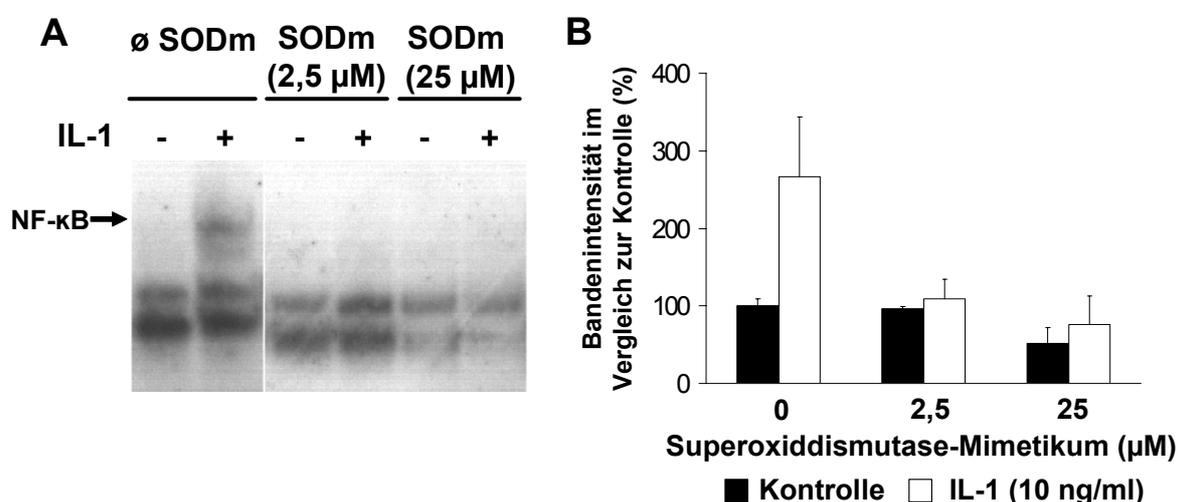


Abb. 18:

Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Meniskuszellen der 1. Subkultur wurden in einer Dichte von 80.000 Zellen/cm² ausgesät und 150 min ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) und SODm in verschiedenen Konzentrationen (2,5 μ M, 25 μ M) stimuliert. Nach der Gewinnung der Kernproteine aus den Meniskuszellen wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit Hilfe eines „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA) ermittelt. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Darstellung der IL-1-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors.

- (A) Darstellung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch IL-1 unter dem Einfluss von SODm.
 (B) Darstellung der densitometrischen Auswertung der Bandenintensität von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten (Mittelwerte + Standardfehler)

Durch die Zugabe des Superoxiddismutase-Mimetikums in den Konzentrationen 2,5 μM und 25 μM konnte die IL-1-vermittelte Aktivierung von NF- κB gehemmt werden. In **Abb. 18B** ist eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt.

3.5.3 Untersuchungen zur Wirkung eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression von matrix-abbauenden Proteasen in isolierten Meniskuszellen auf mRNA Ebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κB durch ein Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm) gehemmt wurde, sollte untersucht werden, ob die IL-1-induzierte Expression der matrix-abbauenden Proteasen in den Meniskuszellen dadurch beeinflusst wurde. In den Meniskuszellen wurde durch das Superoxiddismutase-Mimetikum alleine die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3 und -13 nicht beeinflusst (**Abb. 19, Abb. 20**). Lediglich MMP-9 wurde gegenüber der unbehandelten Kontrolle in Abhängigkeit von der SODm-Konzentration leicht gesteigert exprimiert (**Abb. 20**). In den Meniskuszellen wurde die Expression von MMP-1 und -2 auf mRNA Ebene durch IL-1 nicht beeinflusst und auch mit SODm konnten keine Unterschiede in der Expression gemessen werden (**Abb. 19**). Im Vergleich dazu wurde gegenüber der unstimulierten Kontrolle durch IL-1 eine gesteigerte Expression von MMP-3 und -9 induziert, welche in Abhängigkeit von der Konzentration des SODm weiterhin zunahm (**Abb. 20**). Eine erste vorläufige Untersuchung des Einflusses von SODm auf die IL-1-induzierte Expression von MMP-13 zeigte, dass durch das Superoxiddismutase-Mimetikum keine weitere Erhöhung der Expression gemessen werden konnte.

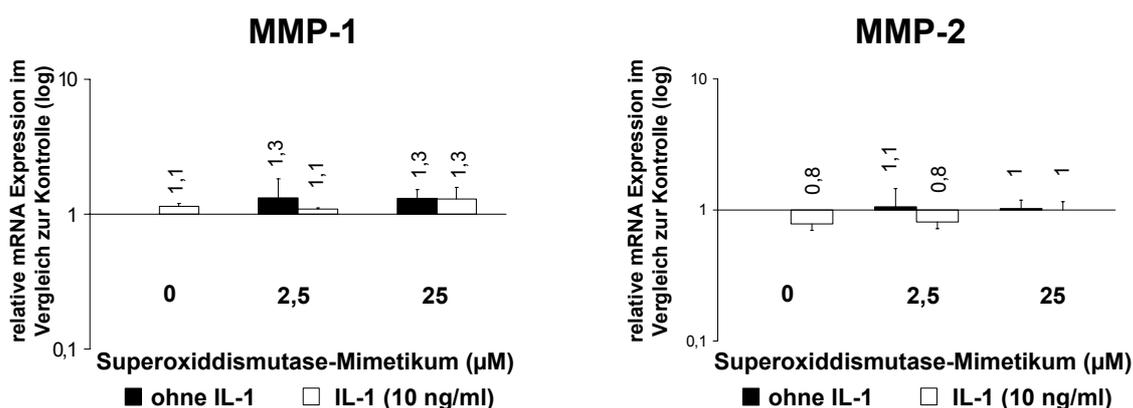


Abb. 19: Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression von MMP-1 und -2 in isolierten Meniskuszellen. Meniskuszellen wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) und SODm in verschiedenen Konzentrationen (2,5 μM , 25 μM) kultiviert und die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -und -2 mittels einer real time RT-PCR quantifiziert. Die mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen ist relativ zur unstimulierten Kontrolle (welche gleich 1 gesetzt wurde) logarithmisch dargestellt. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 2-4 unabhängige Experimente)

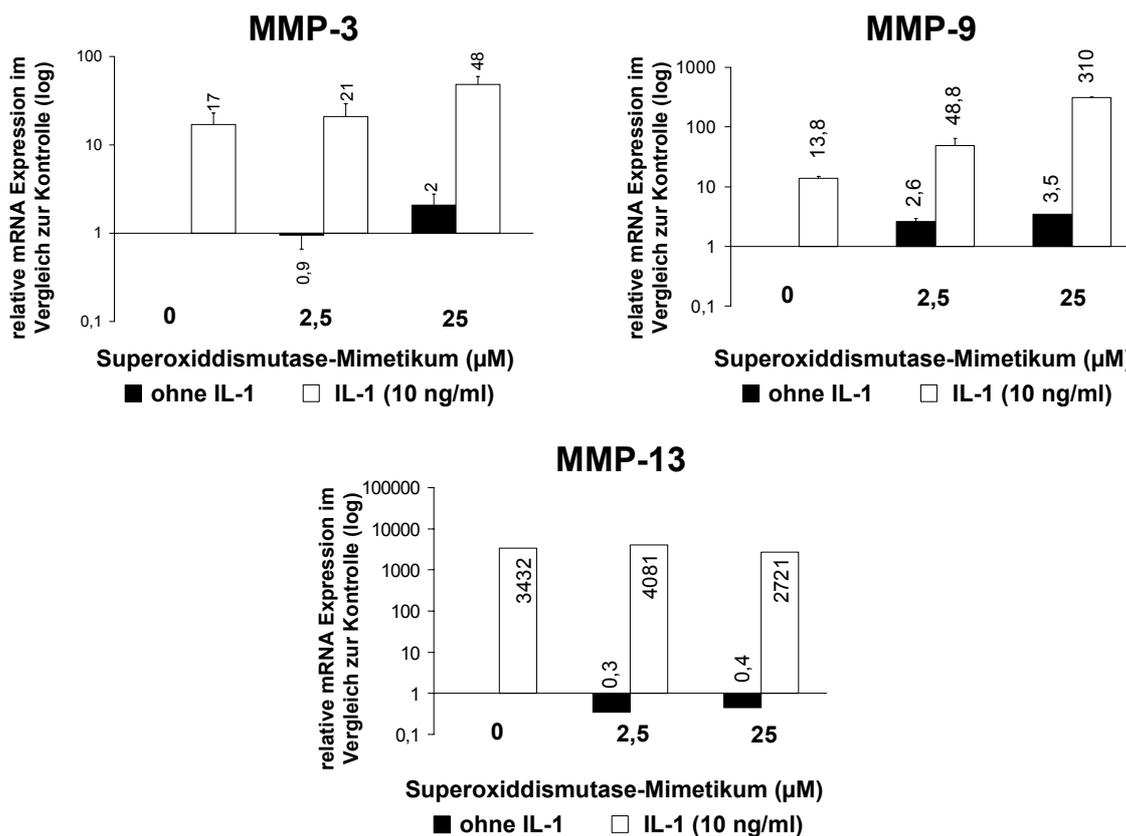


Abb. 20:

Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression von MMP-3, -9 und -13 in isolierten Meniskuszellen. Meniskuszellen wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) und SODm in verschiedenen Konzentrationen (2,5 μM, 25 μM) kultiviert und die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13 mittels einer real time RT-PCR quantifiziert. Die mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen ist relativ zur unstimulierten Kontrolle (welche gleich 1 gesetzt wurde) logarithmisch dargestellt. Mittelwerte + Standardabweichung (n = 2-4 unabhängige Experimente; MMP-13: n = 1)

3.5.4 Untersuchungen zur Wirkung eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Genexpression in isolierten Meniskuszellen auf Proteinebene

Mit Hilfe von Zymogrammen konnten in den Kulturüberständen der Meniskuszellen die proteolytische Aktivität der Matrixmetalloproteinasen MMP-3 (im Caseinzymogramm) und MMP-13 (sowohl im Casein- als auch im Gelatinezymogramm) auf Proteinebene bestätigt werden. Zymographische Analysen, in denen Gelatine als Substrat verwendet wurden, zeigten in den Kulturüberständen der Meniskuszellen bei 66 kDa die proteolytische Aktivität von pro-MMP-13, die durch IL-1 leicht verstärkt wurde (**Abb. 21A**). Bei der Verwendung einer niedrigen Konzentration des Superoxiddismutase-Mimetikums (2,5 μM) konnte keine Veränderung dieser proteolytischen Aktivität beobachtet werden. Jedoch war bei einer höheren Konzentration (25 μM) die pro-Form von MMP-13 nur noch schwach detektierbar und unterhalb dieser proteolytischen Aktivität eine weitere Bande sichtbar (57 kDa), bei der es sich vermutlich um eine intermediäre Form von MMP-13 handelt. Da MMP-13 neben einer gelatinolytischen Aktivität auch in der Lage ist Casein umzusetzen, konnte die proteolytische

Aktivität von MMP-13 auch anhand eines Caseinzymogramms nachgewiesen werden, wobei bereits in den Kulturüberständen der IL-1-stimulierten Zellen (\emptyset SODm) eine intermediäre Form von MMP-13 zu erkennen war (**Abb. 21B**). Die Verwendung des SODm in der niedrigen Konzentration (2,5 μ M) zeigte eine ähnliche Darstellung der IL-1-induzierten proteolytischen Aktivität. In der höheren Konzentration von SODm (25 μ M) war pro-MMP-13 (wie schon im Gelatinezymogramm) nur sehr schwach detektierbar; dafür war in der Kontrolle und noch stärker in der IL-1-behandelten Gruppe die Aktivität der intermediären Form von MMP-13 auszumachen.

Zusätzlich war im Caseinzymogramm in den Kulturüberständen der IL-1-stimulierten Zellen die proteolytische Aktivität von pro-MMP-3 (55 kDa) und ganz schwach die aktive Form (48 kDa) erkennbar. Die Verwendung des Superoxiddismutase-Mimetikums führte in der niedrigeren Konzentration zu einem Anstieg der IL-1-induzierten proteolytischen Aktivität von pro- und aktivem MMP-3. Weiterhin wurde in den Kulturüberständen der IL-1-behandelten Zellen mit der höchsten Konzentration von SODm (25 μ M) bei ca. 38 kDa eine weitere Bande sichtbar, deren proteolytische Aktivität jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden konnte.

Die Effekte von IL-1 und SODm in den Zymogrammen erscheinen geringer im Verhältnis zu dem Anstieg, den man auf mRNA Ebene findet. Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben ist die Ursache für diese Diskrepanz jedoch unklar.

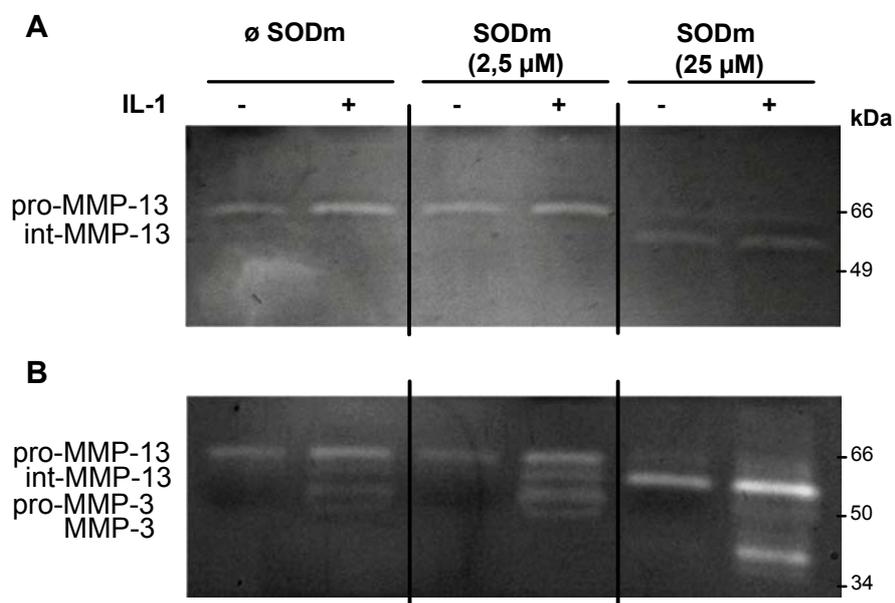


Abb. 21: Zymographische Analysen der Kulturüberstände von Meniskuszellen zur Darstellung des Einflusses eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte proteolytische Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen. Meniskuszellen wurden 3 Tage ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) und SODm in verschiedenen Konzentrationen (2,5 μ M, 25 μ M) stimuliert und die konditionierten Kulturüberstände zum Nachweis einer proteolytischen Aktivität verwendet.

(A) Gelatinezymogramm zum Nachweis von MMP-13 (pro und intermediär).

(B) Caseinzymogramm zum Nachweis von MMP-13 (pro und intermediär) und MMP-3 (pro und aktiv).

3.6 Untersuchungen zum destruktiven Einfluss von IL-1 auf Meniskusgewebe

3.6.1 Dosisabhängiger Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus Meniskus- und Gelenkknorpelimplantaten

Für die Ermittlung einer geeigneten Konzentration von Interleukin-1 (IL-1) für die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurde der Verlust von Glykosaminoglykanen (GAG), als Zeichen einer Gewebedestruktion, in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen (0-20 ng/ml) des Zytokins untersucht. Die dosisabhängige Wirkung von IL-1 wurde an Explantaten aus dem Meniskusgewebe und vergleichend an Gelenkknorpelimplantaten betrachtet. Die Meniskus- und Gelenkknorpelimplantate (Durchmesser 3 mm, Dicke 1 mm) wurden insgesamt 6 Tage ohne/mit IL-1 in den verschiedenen Konzentrationen kultiviert, wobei das Medium nach 3 Tagen gewechselt wurde. Der mittlere GAG-Verlust aus den Explantaten in das umgebende Medium wurde somit nach 3 und nach 6 Tagen mit Hilfe eines DMMB-Tests (siehe **2.4**), zur Messung unspezifischer negativer Ladungen, untersucht und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Im Durchschnitt hatten die Meniskusimplantate ein Feuchtgewicht von $7,8 \pm 0,2$ mg und die Gelenkknorpelimplantate wogen im Schnitt $7,5 \pm 0,1$ mg (Mittelwerte + SF).

Die Freisetzung an GAG aus den unstimulierten Meniskusimplantaten lag innerhalb der ersten 3 Tage bei $2,5 \pm 0,1$ μ g GAG/mg Feuchtgewicht, während in den nächsten 3 Tagen der GAG-Verlust im Verhältnis dazu niedriger ausfiel und bei $1,7 \pm 0,3$ μ g/mg lag. Für eine Darstellung der Ergebnisse wurde die kumulative GAG-Freisetzung aus den Explantaten nach insgesamt 6 Tagen verwendet. Bereits bei den Kontrollimplantaten, die ohne IL-1 behandelt wurden (0 ng/ml), konnte somit ein GAG-Verlust in das umgebende Medium gemessen werden ($4,2 \pm 0,4$ μ g GAG/mg Feuchtgewicht) (**Abb. 22**). Mit ansteigender Konzentration von IL-1 wurde auch die GAG-Freisetzung erhöht, wobei diese Effekte erst ab einer Konzentration von 5 ng IL-1/ml signifikant waren. Höhere Konzentrationen von IL-1 führten aber zu einem weiteren leichten Anstieg des GAG-Verlustes, so dass für nachfolgende Versuche die auch in der Literatur häufig beschriebene Konzentration von 10ng/ml verwendet wurde.

In den Gelenkknorpelimplantaten konnte man im Vergleich zum Meniskusgewebe in der Kontrolle einen höheren kumulativen GAG-Verlust messen ($7,5 \pm 0,3$ μ g GAG/mg Feuchtgewicht), der aber auch in den ersten drei Tagen höher war als in den zweiten drei Tagen der Kultur und bereits 2/3 der kumulativen GAG-Freisetzung ausmachte. In Abhängigkeit von der IL-1 Konzentration war die GAG-Freisetzung aus den Gelenkknorpelimplantaten bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml signifikant erhöht und erreichte bei 5 ng IL-1/ml den Wert der maximalen Freisetzung (**Abb. 22**).

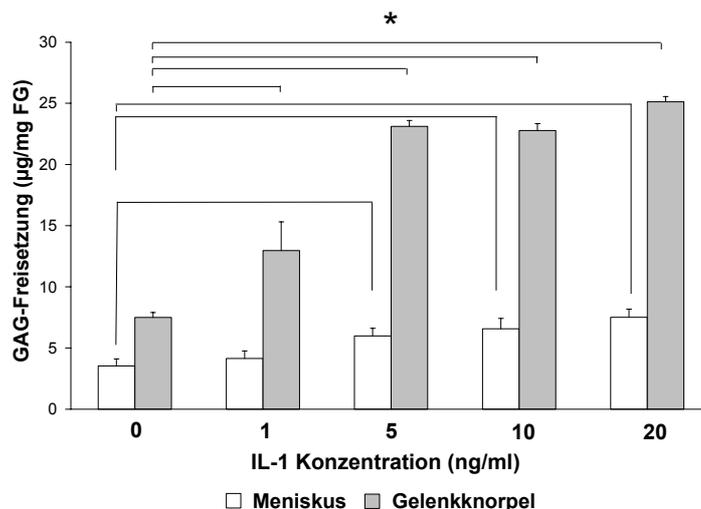


Abb. 22:

Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen (GAG) aus Meniskus- und Gelenkknorpel-explantaten in Abhängigkeit von der Konzentration.

Kumulative GAG-Freisetzung (nach 3 und 6 Tagen in Kultur) aus den Gewebeexplantaten in das umgebende Kulturmedium bezogen auf das Feuchtgewicht der Explantate.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 5-8, aus 3 unabhängigen Experimenten)

*p < 0,05 (für alle dargestellten Klammern)

3.6.2 Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen

Für die Durchführung der weiteren Versuche wurde basierend auf den oben beschriebenen Vorversuchen IL-1 in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Einige der Untersuchungen wurden zum Vergleich auch an Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel durchgeführt. Am Tag der Explantatgewinnung wurde zunächst der GAG-Gehalt der Explantate aus dem Meniskus und dem Gelenkknorpel ermittelt und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Nach einer Kultivierungszeit von insgesamt 6 Tagen ohne/mit IL-1 wurde zusätzlich die kumulative GAG-Freisetzung aus den Explantaten in das umgebende Medium, sowie der verbliebene GAG-Gehalt innerhalb des Gewebes (beides bezogen auf das Feuchtgewicht) dargestellt.

Die Meniskus-explantate wiesen am Tag der Gewinnung (Tag 0) einen mittleren GAG-Gehalt von $14,2 \mu\text{g/mg} \pm 0,9$. Im Vergleich dazu wurde in den Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel ein 4 x höherer GAG-Gehalt ($57,8 \mu\text{g/mg} \pm 4,9$) ermittelt (siehe **Tab. 14**).

Nach der Kultivierung von 6 Tagen wurde bei den Kontroll-explantaten aus dem Meniskusgewebe im Mittel eine kumulative GAG-Freisetzung von $4,5 \pm 0,2 \mu\text{g GAG/mg}$ Feuchtgewicht ermittelt (siehe **Tab. 14**). Diese entsprach im Vergleich zum ermittelten GAG-Gehalt in frisch isolierten Meniskus-explantaten bereits einem Verlust von 30,7% des ursprünglichen GAG-Gehaltes. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde in **Abb. 23** die unstimulierte Kontrolle der Meniskus-explantate gleich 100% gesetzt und die Wirkung von IL-1 im Verhältnis zu dieser betrachtet. Innerhalb der Meniskus-explantate wurde durch IL-1 eine signifikant gesteigerte GAG-Freisetzung aus dem Gewebe induziert, die im Vergleich zur Kontrolle um 80% erhöht war ($8,1 \pm 0,6 \mu\text{g/mg}$) (**Abb. 23**). Bei den Explantaten aus dem Gelenkknorpel wurde zwar im Vergleich zum Meniskus ein höherer Basisverlust an GAG

gemessen ($5,8 \pm 0,79 \mu\text{g GAG/mg}$), dieser betrug aber nur 10% des ursprünglichen 4-fach höheren GAG-Gehaltes der Gelenkknorpel-explantate. IL-1 induzierte auch im Gelenkknorpel eine signifikante Steigerung der GAG-Freisetzung, die gegenüber der korrespondierenden Kontrolle 2,8-fach erhöht war.

Tab. 14: Übersicht über den Glykosaminoglykan(GAG)-Gehalt in Explantaten aus dem Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe an Tag 0 und die kumulative GAG-Freisetzung unter dem Einfluss von IL-1 (10 ng/ml) (Daten aus 6 unabhängigen Experimenten).

	Meniskus	Gelenkknorpel
GAG-Gehalt (Tag 0)	14,2 $\mu\text{g/mg} \pm 0,9$	57,8 $\mu\text{g/mg} \pm 4,9$
GAG-Freisetzung (Tag 6)		
Kontrolle (Tag 6)	4,5 $\mu\text{g/mg} \pm 0,2$	5,8 $\mu\text{g/mg} \pm 0,8$
IL-1 (Tag 6)	8,1 $\mu\text{g/mg} \pm 0,6$	16,1 $\mu\text{g/mg} \pm 2,4$
Prozentuale GAG-Freisetzung bezogen auf den GAG-Gehalt Tag 0		
Kontrolle (Tag 6)	30,7%	10,0%
IL-1 (Tag 6)	57,0%	27,9%
IL-1-induzierte GAG-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (Tag 6) in %		
	180%	278%

Im Gewebevergleich war somit die IL-1-unabhängige GAG-Freisetzung bezogen auf den jeweiligen gewebespezifischen GAG-Gehalt im Meniskus etwa 3-fach höher als im Gelenkknorpel (30,7% vs 10%), dieser ließ sich durch IL-1 aber im Gelenkknorpel 1,5-fach mehr steigern (180% vs 278%, siehe **Tab. 14**).

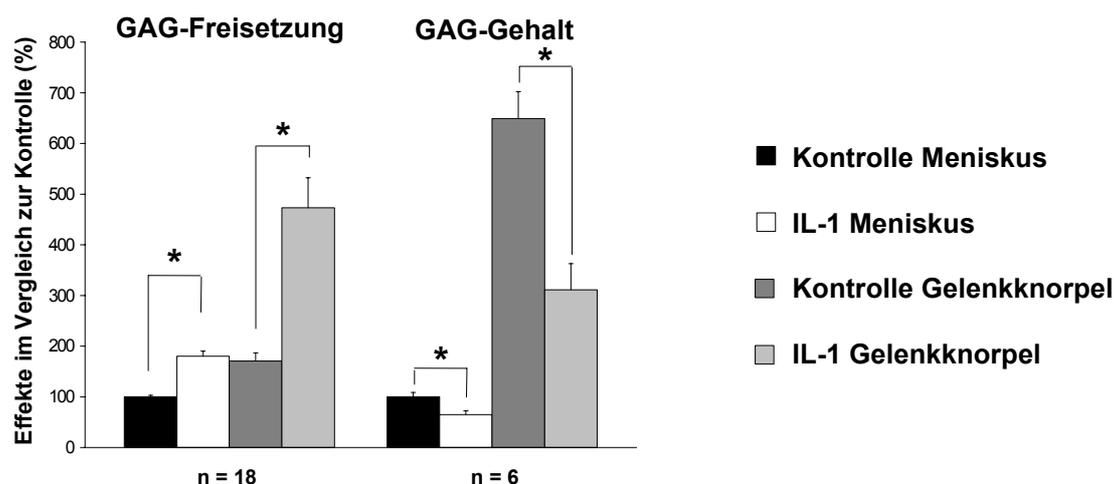


Abb. 23: Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen (GAG-Freisetzung) aus den Explantaten des Meniskus- und Gelenkknorpelgewebes in den Überstand und auf den Glykosaminoglykan-Gehalt (GAG-Gehalt) innerhalb der Gewebeexplantate. Kumulative GAG-Freisetzung aus den Explantaten (nach 3 und 6 Tagen in Kultur) und relativer GAG-Gehalt der Explantate nach einer Gesamtkultivierungszeit von 6 Tagen. Mittelwerte + Standardfehler (n = 18 aus 6 unabhängigen Experimenten, n = 6 aus 2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse der IL-1-induzierten GAG-Freisetzung aus dem Gewebe auch in einem Verlust innerhalb der Explantate wieder finden lassen, wurde zusätzlich der GAG-Gehalt der Gewebeexplantate nach der Kultivierung ohne/mit IL-1 gemessen. Der GAG-Gehalt der Explantate wurde wiederum auf das Feuchtgewicht bezogen und betrug bei Meniskusexplantaten nach 6 Tagen in Kultur $11,7 \pm 0,8 \mu\text{g GAG/mg}$ Feuchtgewicht. IL-1 reduzierte den GAG-Gehalt im Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle um 35%, so dass dieser bei $7,7 \pm 0,8 \mu\text{g/mg}$ lag. Beim Gelenkknorpel wurde nach 6 Tagen in Kultur ein mittlerer GAG-Gehalt von $55,7 \pm 7,5 \mu\text{g/mg}$ Feuchtgewicht gemessen, der durch IL-1 signifikant um 49% gesenkt wurde. Somit war die gewebespezifische IL-1-abhängige Reduktion des GAG-Gehalts im Gelenkknorpel 1,4-fach höher als im Meniskus.

3.7 Einfluss von IL-1 auf die biomechanischen Eigenschaften des Meniskugewebes

Mit Hilfe einer speziell konzipierten Kompressionsapparatur erfolgte die Messung der biomechanischen Eigenschaften des Gewebes. Die Meniskusexplantate wurden dabei einer einmaligen axialen Kompression (um 10% der Probenstärke) und einer Komprimierungsrate von $0,1 \text{ s}^{-1}$ (= 0,1 mm/s) ausgesetzt (siehe 2.8.2) und der sich aufbauende Gegendruck des Gewebes ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass das Gewebe durch den IL-1-bedingten Glykosaminoglykanverlust einen geringeren Gegendruck aufbauen konnte. In den nicht stimulierten Explantaten wurde im Mittel ein maximaler Gegendruck von 0,8 MPa gemessen, der in den IL-1-behandelten Explantaten signifikant um die Hälfte (0,4 MPa) erniedrigt war (Abb. 24).

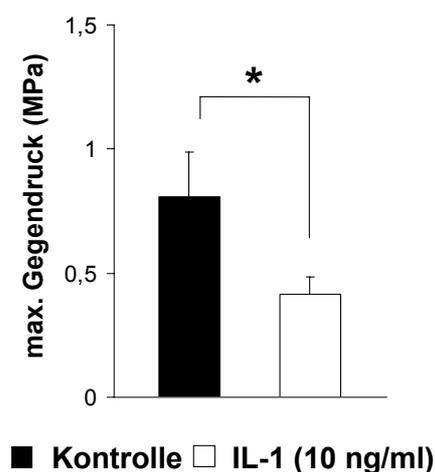


Abb. 24:
Einfluss von IL-1 auf die biomechanischen Eigenschaften des Meniskugewebes.
 Meniskusexplantate wurden nach einer 3-tägigen Kultivierungszeit ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) mit Hilfe einer Kompressionsapparatur (im Bild rechts) einer einmaligen Kompression von 10% der Probenstärke mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s ausgesetzt und der sich aufbauende Gegendruck (maximale Belastung) des Gewebes ermittelt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 20; aus 6 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

3.8 Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität

Mit Hilfe eines radioaktiven [^{35}S]-Sulfat- und [^3H]-Prolineinbaus (als unspezifisches Maß für die Proteoglykan- und Kollagensynthese) wurde nach einer 6-tägigen Stimulation mit IL-1 die biosynthetische Aktivität der Gewebeexplantate aus dem Meniskus und dem Gelenkknorpel bestimmt (siehe 2.5) und die gemessenen Werte auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Die Ergebnisse wurden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle betrachtet, deren Einbaurrate gleich 100% gesetzt war.

Die Kultivierung der Meniskus-Explantate mit IL-1 bewirkte eine Reduktion des Sulfat- und Prolineinbaus (**Abb. 25**). So war der Einbau von Sulfat nach einer Stimulation mit IL-1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 54% vermindert, während der Prolineinbau durch IL-1 gegenüber der Kontrolle nur um 26% gesenkt wurde.

Auch bei Gelenkknorpel-Explantaten wurde die Biosyntheseaktivität durch IL-1 signifikant reduziert. Der Einbau von Sulfat war gegenüber der korrespondierenden Kontrolle durch IL-1 um 84% vermindert, während der Prolineinbau um 76% gesenkt wurde.

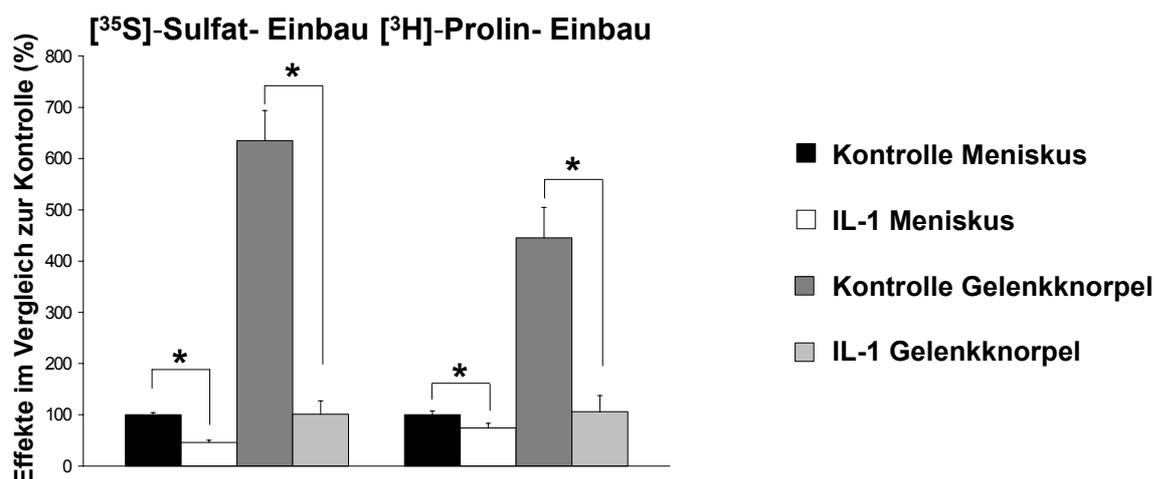


Abb. 25:

Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseleistung von Explantaten des Meniskus- und Gelenkknorpelgewebes. Die Explantate wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und durch den Einbau von radioaktivem [^{35}S]-Sulfat (als Maß für die Proteoglykansynthese) und [^3H]-Prolin (als Maß für die Proteinbiosynthese) die Biosyntheseaktivität ermittelt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die Kontrolle der Meniskus-Explantate gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen im Vergleich zu dieser betrachtet.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 6; aus 2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

In den stimulierten Meniskus-Explantaten konnte neben der IL-1-verminderten Proteoglykansyntheseaktivität (durch den reduzierten Einbau von Sulfat als Maß für die Sulfatierung) eine Reduktion der mRNA Expression von Aggrecan beobachtet werden.

3.9 Einfluss von IL-1 auf die Stickoxid (NO)-Produktion in Meniskusexplantaten

Mit Hilfe des Griess-Reagenz wurde in den Kulturüberständen der Meniskus- und Gelenkknorpel-explantate die Produktion von Nitrit, einem stabilen Endprodukt von Stickoxid (NO), als ein Syntheseprodukt der Zellen des Gewebes, untersucht (siehe 2.6). Die Gewebeexplantate wurden für einen Zeitraum von 6 Tagen mit IL-1 kultiviert, wobei innerhalb dieser Zeit das Medium einmal gewechselt wurde. So wurde zur Messung der NO-Produktion der Kulturüberstand der ersten drei Tage (Tag 3) und der darauf folgenden drei Tage (Tag 6) untersucht und die gemessenen NO Werte auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen dargestellt.

Nach einer Kultivierung von drei Tagen wurde in den Kontrollexplantaten des Meniskusgewebes eine Basis-NO-Produktion von $0,20 \pm 0,05$ $\mu\text{mol NO/mg Feuchtgewicht}$ gemessen (Abb. 26). Die Kultivierung mit IL-1 hatte zur Folge, dass die Produktion von NO gegenüber der unstimulierten Kontrolle signifikant um den Faktor 3,5 erhöht war. In den darauf folgenden drei Tagen konnte jedoch im Vergleich zu den ersten Tagen auch durch IL-1 keine gesteigerte NO-Produktion mehr gemessen werden. In den Gelenkknorpel-explantaten wurde in der Kontrolle innerhalb der ersten drei Tage (Tag 3) im Vergleich zum Meniskus eine leicht höhere NO-Produktion gemessen ($0,30 \pm 0,05$ $\mu\text{mol NO/mg Feuchtgewicht}$). Durch IL-1 wurde diese NO-Produktion gegenüber der korrespondierenden Kontrolle um den Faktor 4,8 erhöht. Auch bei den Gelenkknorpel-explantaten konnte während einer weiteren Stimulierung für 3 Tage mit IL-1 (Tag 6) ein Rückgang der NO-Produktion beobachtet werden. Jedoch führte IL-1 im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle weiterhin zu einer signifikanten Steigerung der NO-Produktion.

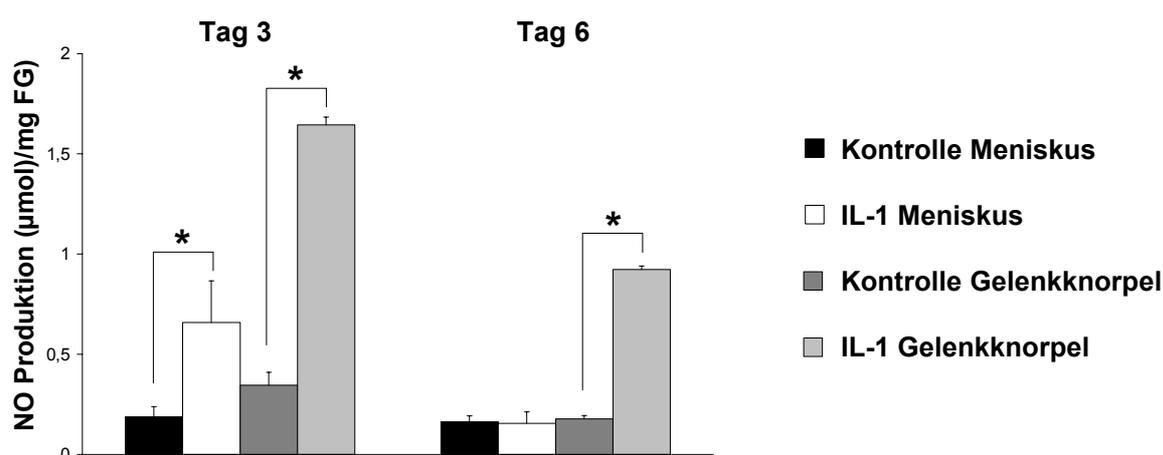


Abb. 26: Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion von Explantaten des Meniskus- und Gelenkknorpelgewebes. Gewebeexplantate wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und nach jeweils 3 und 6 Tagen die Produktion von Nitrit, einem stabilen Endprodukt von NO, in den Kulturüberständen mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt. Mittelwerte + Standardfehler (n = 6; aus 2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

3.10 Nachweis von Apoptose im Meniskusgewebe

Da IL-1 in dem Meniskusgewebe zu einer signifikanten Abnahme der Biosyntheseleistung führte, sollte geklärt werden, ob IL-1 einen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Hierzu erfolgte der Nachweis von apoptotischen Zellen in Meniskusexplantaten mit Hilfe der morphologischen Darstellung der Apoptose in Form des Kernblebbings (siehe **2.10**). Apoptotische Veränderungen wurden an Meniskusexplantaten ausgewertet, die direkt am Tag der Gewinnung (Tag 0) und nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen (ohne und mit IL-1) eingebettet und mit Mayer's Hämalaunlösung (siehe **2.9.4**) gefärbt wurden. An Tag 0 wurden in den Meniskusexplantaten nahezu keine apoptotischen Zellen (1%) gefunden (**Abb. 27**). Nach 3 Tagen in Kultur zeigten 2% der Zellen eine apoptotische Veränderung. Eine Stimulation mit IL-1 führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikant erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen im Meniskusgewebe (2,6%).

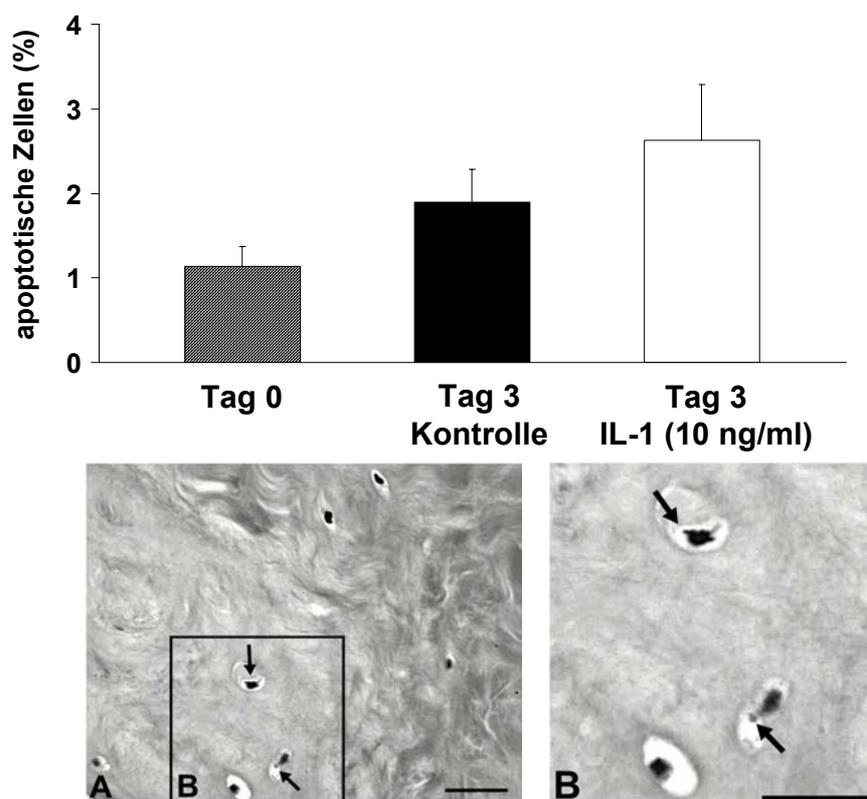


Abb. 27:

Nachweis von apoptotischen Zellen in Meniskusexplantaten. Auswertung der Auszählung von apoptotischen Zellen an Paraffinschnitten von Meniskusexplantaten am Tag der Herstellung (Tag 0) und nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen (ohne/mit IL-1) (obere Abbildung).

Mittelwerte + Standardfehler (n = 12; aus 4 unabhängigen Experimenten)

- (A) Darstellung von apoptotischen Zellen mit Hilfe des morphologisch sichtbaren „Blebbings“ in Meniskusexplantaten (Balken = 50 μm).
- (B) Ausschnittsvergrößerung aus A; Pfeil zeigt auf einabgeschnürtes Kernfragment (Balken = 25 μm).

3.11 Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen im Meniskusgewebe auf mRNA Ebene

Um zu untersuchen, welche proteolytischen Enzyme am IL-1-induzierten Matrixabbau und damit an der Freisetzung der Glykosaminoglykane aus dem Meniskusgewebe beteiligt sein könnten, wurde die Wirkung von IL-1 auf die mRNA Expression einiger Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2, -3, -9 und -13) sowie einer Aggrekanase (ADAMTS-5) untersucht.

Aus den Meniskusexplantaten wurde am Tag der Explantatgewinnung (Tag 0) und nach einer IL-1 Stimulation von drei Tagen die RNA isoliert. Die Ausbeute an Gesamt-RNA aus ca. 100 mg eingesetztem Meniskusgewebe (~15 Meniskusexplantate) betrug durchschnittlich 40 ng RNA/mg bei den unstimulierten und 25 ng RNA/mg bei den IL-1-stimulierten Explantaten.

Mit Hilfe einer RT-PCR wurde zunächst die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13 am Tag der Herstellung der Meniskusexplantate (Tag 0) und nach drei Tagen in Kultur (ohne/mit IL-1) dargestellt. Um sicherzustellen, dass die eingesetzte RNA funktionsfähig war, wurde als Referenzgen das „housekeeping gene“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) verwendet.

In der eher qualitativ zu bewertenden RT-PCR war unter allen Versuchsbedingungen (Tag 0 und Tag 3) eine Grundexpression von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 nachzuweisen (**Abb. 28**). Es deutete sich aber bereits hier eine Verstärkung der Expression von MMP-2 und MMP-3 an, die mit Hilfe der real time RT-PCR näher untersucht wurde (siehe unten). Eine mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-9 und MMP-13 konnte weder an Tag 0 noch an Tag 3 (ohne/mit IL-1) nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

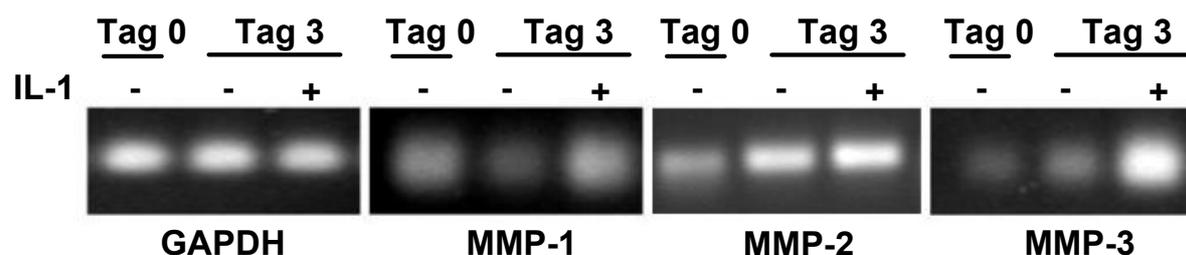


Abb. 28:

Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von Matrixmetalloproteinasen im Meniskusgewebe. Nachweis der Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2 und -3 in frisch isolierten Meniskusexplantaten (Tag 0) und nach einer 3-tägigen Kultivierung ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) mittels RT-PCR.

Mit Hilfe der real time RT-PCR wurden die relativen Mengen der IL-1-induzierten Expression der Matrixmetalloproteinasen sowie einer Aggrekanase (ADAMTS-5) untersucht. Für die relative Quantifizierung der mRNA Menge der einzelnen Zielgene wurde die Genexpression auf GAPDH bezogen und Expressionsunterschiede nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (siehe 2.13.6). Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Werte der einzelnen Zielgene im Vergleich dazu betrachtet. Die Ergebnisse der RT-PCR

konnten mit Hilfe der real time RT-PCR bestätigt werden: Nach einer 3-tägigen Stimulation mit IL-1 war die mRNA-Expression von MMP-1 gegenüber der Kontrolle 2-fach und von MMP-2 4,7-fach erhöht (**Abb. 29**). Die IL-1-induzierte Expression von MMP-3 war im Vergleich Kontrolle um den Faktor 30 erhöht. Auch mittels der real time RT-PCR konnten die Matrixmetalloproteinasen MMP-9 und MMP-13 weder in den Kontrollen noch in den IL-1-stimulierten Explantaten nachgewiesen werden. In einer ersten vorläufigen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Expression der Aggrekanase ADAMTS-5 auf mRNA Ebene durch IL-1 gegenüber der Kontrolle leicht vermindert war.

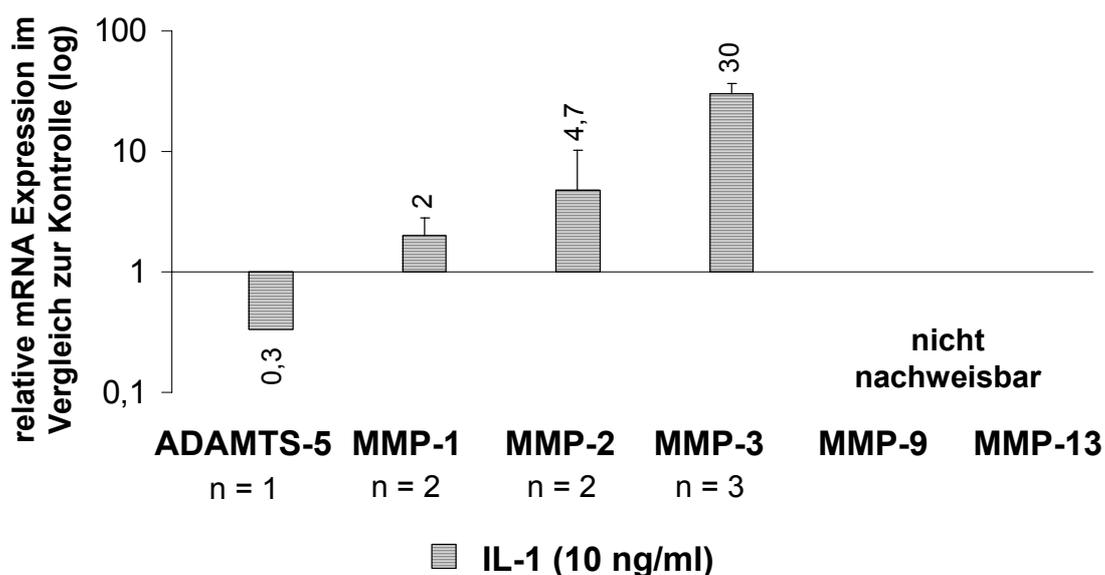


Abb. 29:

Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen im Meniskugewebe auf mRNA Ebene. Meniskusexplantate wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert und die RNA zur Bestimmung der Genexpression mittels real time RT-PCR isoliert. Die mRNA Expression der Aggrekanase ADAMTS-5 und der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, und -3 ist relativ zur unstimulierten Kontrolle (welche gleich 1 gesetzt wurde) logarithmisch dargestellt. Eine mRNA Expression von MMP-9 und -13 war im Meniskugewebe nicht nachweisbar. Mittelwerte + Standardabweichung

3.12 Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen im Meniskugewebe auf Proteinebene

Mit zymographischen Analysen wurde die proteolytische Aktivität von Matrixmetalloproteinasen auf Proteinebene nachgewiesen. Mit Hilfe einer Gelatine-Zymographie, bei der Gelatine als Substrat verwendet wurde, konnte in den Überständen der Explantate bei 66 kDa MMP-2 (liegt normalerweise bei 72 kDa, kann in einem nativen Gel auch darunter liegen) in der pro-Form nachgewiesen werden (**Abb. 30A**). Durch IL-1 wurde die gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 leicht verstärkt. Im Vergleich dazu konnte mittels eines Casein-Zymogramms in den Kulturüberständen der unstimulierten Explantate nahezu keine proteolytische Aktivität gefunden werden (**Abb. 30B**), während durch IL-1 die Expression von MMP-3 in der pro-Form (55 kDa) induziert wurde.

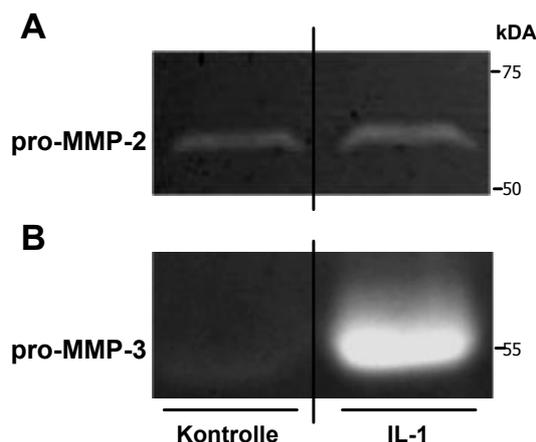


Abb. 30:

Zymographische Analysen der Kulturüberstände von Meniskusexplantaten zur Darstellung der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen. Meniskusexplantate wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und die konditionierten Kulturüberstände für die zymographische Untersuchung der proteolytischen Aktivität von MMP-2 und MMP-3 verwendet.

- (A) Gelatinezymogramm mit dem Nachweis von pro-MMP-2 in den Kulturüberständen der unbehandelten Meniskusexplantate. Nach einer Stimulation der Explantate mit IL-1 ist diese proteolytische Aktivität leicht verstärkt.
 (B) Caseinzytogramm mit dem Nachweis der IL-1-induzierten proteolytischen Aktivität von pro-MMP-3.

3.13 Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf Proteoglykane im Meniskusgewebe

Proteoglykane sind wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix des Meniskusgewebes und mit für die Funktionseigenschaften verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe von Western Blot-Analysen die großen Proteoglykanen Aggrekan und Versikan, sowie die kleinen leucin-reichen Proteoglykane Biglykan und Decorin nachgewiesen. Des Weiteren wurde aufgrund der erhöhten Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus dem Meniskusgewebe untersucht, ob sich im Gewebe und den Kulturmedien Abbau-Fragmente von Aggrekan darstellen lassen, die Rückschlüsse auf die Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen erlauben würden.

3.13.1 Nachweis von Aggrekan im Meniskusgewebe und Untersuchung zur Wirkung von IL-1

Mit Hilfe eines G1-Antikörpers, der die G1-Domäne des Aggrekan-Kernproteins erkennt, wurde mit Western Blot-Analysen die Wirkung von IL-1 auf die Struktur des Kernproteins im Meniskusgewebe untersucht. In frisch isoliertem Meniskusgewebe (Tag 0) konnte eine Vielzahl von G1-tragenden Aggrekan-Fragmenten nachgewiesen werden. Diese Fragmente wiesen jeweils unterschiedliche Längen auf, mit verschiedenen Endigungen ihrer Aminosäuresequenz, je nachdem an welcher Stelle sie, ausgehend vom C-terminalen Ende, durch die Wirkung von proteolytischen Enzymen gespalten worden sind. Die Identifikation der Fragmente erfolgte anhand der Nomenklatur der Banden nach den Angaben von Sandy

und Verscharen (1991). Die abgeleiteten Strukturen der G1-tragenden Aggrekan-Fragmente wurden in der **Abb. 31** schematisch dargestellt. Die Bande 1 (350 kDa), welche nur im Meniskusgewebe (G) aber nicht im Kulturmedium (M) dargestellt werden konnte, zeigte Aggrekan in seiner Gesamtlänge von 2327 Aminosäuren, mit den drei globulären Domänen (G1, G2, G3). Weiterhin wurden die Fragmente *a* (250 kDa), *b* (160 kDa) und *c* (120 kDa) detektiert, die C-terminal innerhalb der CS- oder KS-reichen Region gespalten wurden und keine G3-Domäne mehr aufweisen. Die Fragmente *d* (100 kDa), 6 (65 kDa; Doppelbande) und *e* (50 kDa) sind durch eine Spaltung innerhalb der Interglobulären Domäne (IGD) entstanden und besitzen nur noch die G1-Domäne. Alle im Western Blot detektierten G1-tragenden Fragmente konnten auch im Meniskusgewebe nach einer 3-tägigen Kultivierung unabhängig von einer Stimulation des Gewebes mit IL-1 nachgewiesen werden. Ein Teil der G1-tragenden Aggrekan-Fragmente war aufgrund einer Freisetzung aus dem Gewebe auch im Kulturmedium der Kontroll- und IL-1-behandelten Explantate detektierbar. Der Vergleich des Bandenmusters von Kontrollproben und IL-1-behandelten Proben ließ demnach keine qualitative Veränderung durch IL-1 in den G1-tragenden Aggrekan-Fragmenten erkennen.

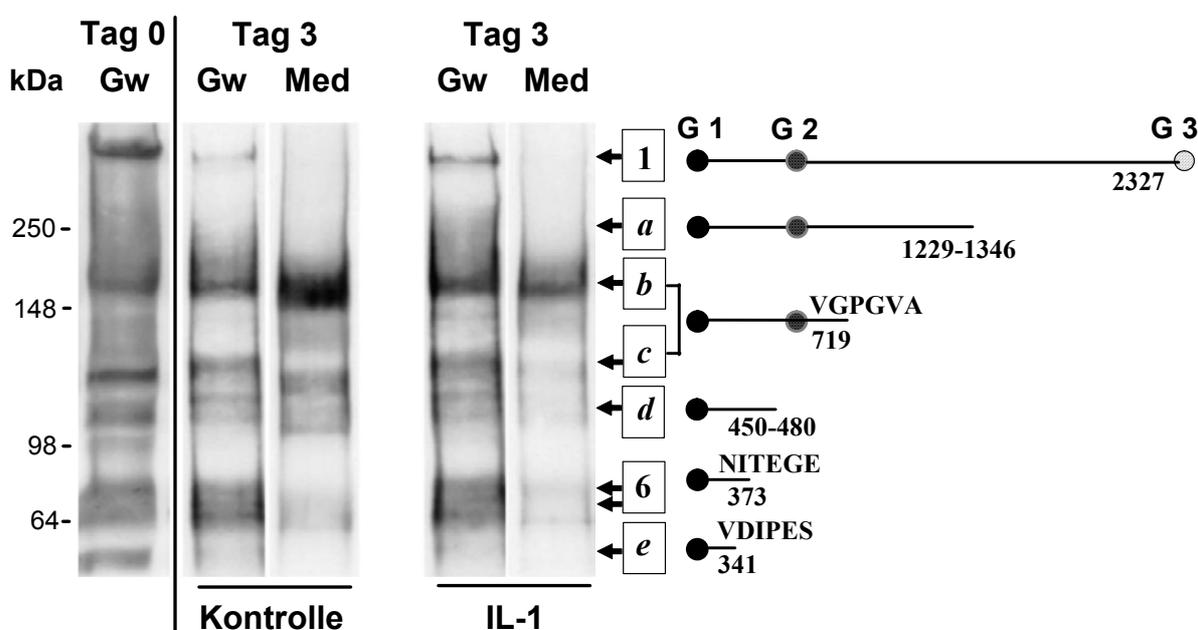


Abb. 31: **Western Blot zum Nachweis von G1-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Meniskusgewebe und Kulturmedium.** Darstellung von Aggrekan-Fragmenten im Gewebe (Gw) und im Medium (Med) nach einer 3-tägigen Kultivierung ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml), sowie in frisch isoliertem Gewebe (Tag 0) mit einem Anti-G1 Antikörper, der G1-tragende Aggrekan-Fragmente erkennt. Die daraus abgeleitete Struktur der G1-tragenden Fragmente (1, *a*, *b*, *c*, *d*, 6, *e*) von Aggrekan ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Nomenklatur der Aggrekan-Fragmente erfolgte nach Sandy und Verscharen (1991).

Mit Hilfe eines kombinierten Antikörpers Anti-TFKEEE/Anti-TAGELE, der Aggrekan-Fragmente an den Endigungen der Aminosäuresequenzen TFKEEE und TAGELE erkennt, konnten in den Kulturmedien der mit IL-1 inkubierten Proben die Fragmente 12 und 13 (260-270 kDa) nachgewiesen werden (**Abb. 32** zeigt exemplarisch einen entsprechenden Blot). Diese Fragmente sind N-terminal durch eine Spaltung innerhalb der IGD an der Stelle

-ARGSVI³⁷⁴ entstanden. Am C-terminalen Ende sind diese Fragmente in der CS-reichen Region zwischen der Domäne G2 und G3 an den Stellen -KEEE¹⁶⁶⁷ und -GELE¹⁴⁸⁰ gespalten worden. Das Aggrekan-Fragment *i* (70 kDa) ist vermutlich aus der Spaltung an der Stelle -GELE¹⁴⁸⁰⁻¹⁴⁸¹GTID- hervorgegangen. Im Vergleich zum Kulturmedium der IL-1-stimulierten Meniskusexplantate konnten diese Fragmente bei der Kontrolle nur sehr schwach oder nahezu gar nicht ausgemacht werden.

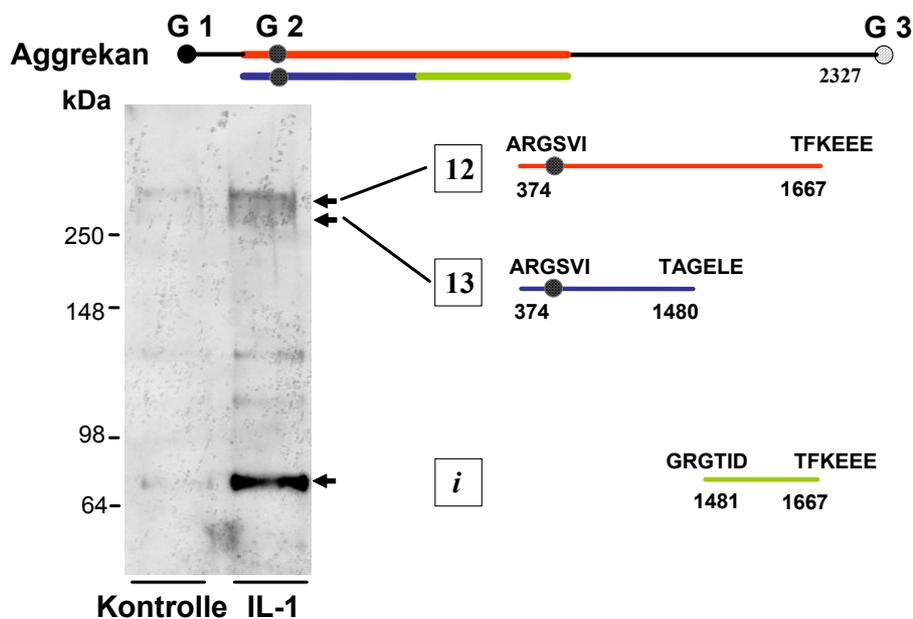
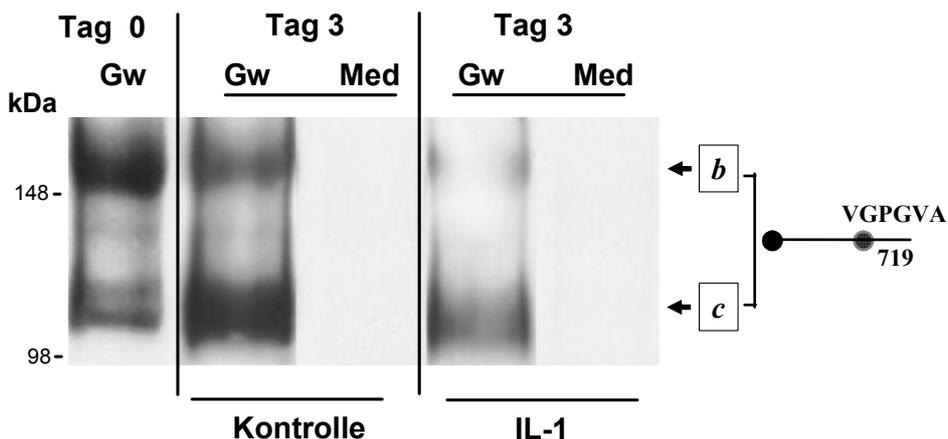


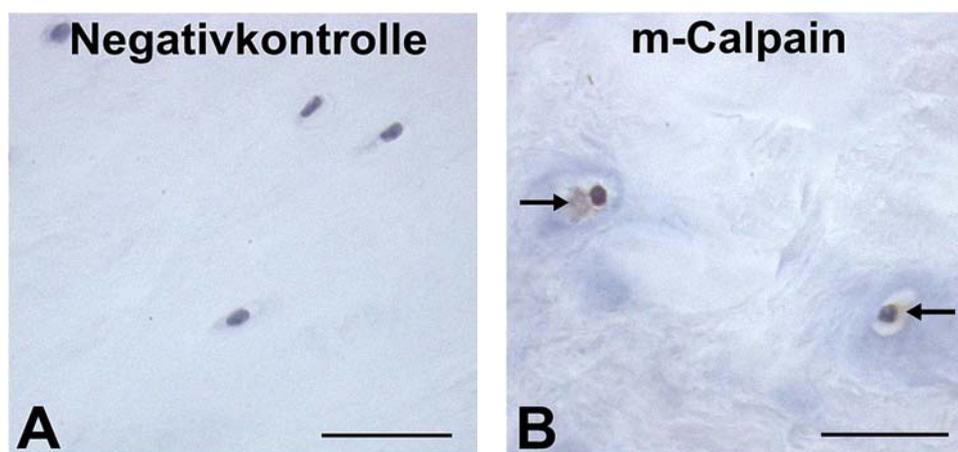
Abb. 32: Western Blot zum Nachweis von TFKEEE/TAGELE-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Kulturmedium von Meniskusexplantaten mit Anti-TFKEEE/Anti-TAGELE-detektierenden Antikörpern. Meniskusexplantate wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und die Kulturmedien mit Hilfe eines kombinierten Antikörpers Anti-TFKEEE/TAGELE, der Bruchstückenden von Aggrekan mit den Aminosäuresequenzen TFKEEE und TAGELE erkennt, untersucht. Die daraus abgeleitete Struktur der durch IL-1 verstärkt freigesetzten TFKEEE/TAGELE-tragenden Fragmente 12, 13 und *i* von Aggrekan ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Nomenklatur der Aggrekan-Fragmente erfolgte nach Sandy und Verscharen (1991).

Die Western Blot-Analysen mit dem monoklonalen Antikörper Anti-SK-28, der die Aggrekan-Fragmente *b* (160 kDa) und *c* (120 kDa) detektiert, zeigten deutliche Banden dieser Fragmente im frisch isolierten Meniskusgewebe (Tag 0) und nach einer 3-tägigen Kultivierung der Explantate. (**Abb. 33**). Die Fragmente *b* und *c* sind durch eine Spaltung zwischen der G2- und G3-Domäne innerhalb der KS-reichen Region des Aggrekans an der Stelle Ala⁷¹⁹ hervorgegangen. Oshita et al. (2004) haben postuliert, dass die Bande *b* eine modifizierte Form der Bande *c* darstellen könnte, was die unterschiedlichen elektrophoretischen Eigenschaften dieser beiden Banden (Bande *b* ist um 40 kDa größer) erklären würde. Mit dem Antikörper Anti-SK-28 konnten diese Fragmente nur im Meniskusgewebe und nicht im Kulturmedium nachgewiesen werden und schienen in den IL-1-behandelten Explantaten gegenüber der Kontrolle schwächer ausgeprägt zu sein.

**Abb. 33:**

Western Blot zum Nachweis der Aggrecan-Fragmente *b* und *c* im Meniskugewebe. Darstellung der Aggrecan-Fragmente *b* und *c* in frisch isoliertem Gewebe (Tag 0) sowie im Gewebe (Gw) aber nicht im Medium (Med) nach einer 3-tägigen Kultivierung ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) mit dem monoklonalen Antikörper Anti-SK-28. Die abgeleitete Struktur der Spaltfragmente *b* und *c* von Aggrecan ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte nach Sandy und Verscharen (1991).

In der Literatur wurde beschrieben, dass m-Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige Cystein-Protease, für die Abbaufragmente *b* und *c* von Aggrecan verantwortlich sein könnte (Oshita et al., 2004). Daher wurden zum Nachweis dieses Enzyms im Meniskugewebe mit dem Antikörper Anti-m-Calpain immunhistochemische Färbungen durchgeführt (siehe 2.11.3). In den Zellen des Meniskugewebes konnte m-Calpain nachgewiesen werden (**Abb. 34B**). Im Hinblick auf die Anfärbbarkeit wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und den IL-1-behandelten Explantaten gefunden.

**Abb. 34:**

Immunhistochemische Färbung zum Nachweis von m-Calpain im bovines Meniskugewebe. An frisch isolierten Meniskusexplantaten wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Anti m-Calpain durchgeführt.

(Balken = 25 μm).

(A) Negativkontrolle, ohne Verwendung des Primäntikörpers Anti m-Calpain.

(B) Nachweis von m-Calpain in den Meniskuszellen.

3.13.2 Nachweis der Proteoglykane Biglykan, Decorin und Versikan im Meniskusgewebe und Untersuchungen zur Wirkung von IL-1

Mit Hilfe der Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass neben Aggrecan weitere Proteoglykane im Meniskusgewebe exprimiert werden (**Abb. 35**). Die Proteoglykane Biglykan (48 kDa), Decorin (52 kDa) und Versikan (64 kDa) wurden im frisch isolierten Meniskusgewebe (Tag 0), sowie, in der gleichen Intensität, in den Kontrollexplantaten nach einer Kultivierung von drei Tagen ohne IL-1 detektiert. Nach einer Stimulation mit IL-1 wurden diese Proteoglykane im Gewebe mit einer tendenziell schwächeren Intensität dargestellt. Da jedoch keine Änderung der Bandenmuster und keine Fragmente im Kulturmedium nachgewiesen werden konnten war es nicht möglich, eindeutig zu klären, welchen Einfluss IL-1 auf diese Proteoglykane hatte. Im Vergleich zu Biglykan und Decorin, welche nur im Gewebe nachgewiesen werden konnten, wurden Versikan-reaktive Banden sowohl im Gewebe als auch in geringen Mengen im Medium detektiert.

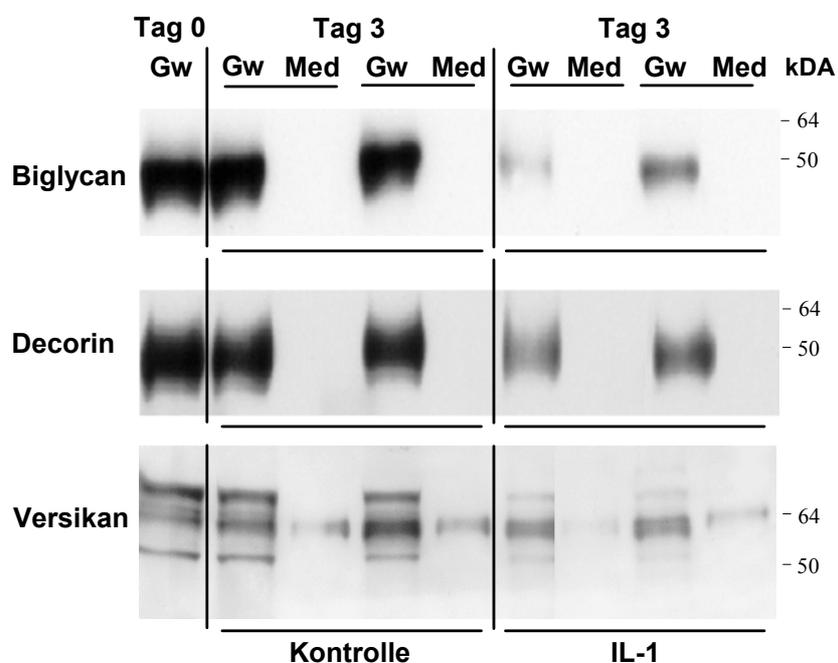


Abb. 35: Western Blot-Analysen zum Nachweis der Proteoglykane Biglykan, Decorin und Versikan im Meniskusgewebe. Darstellung der Proteoglykane Biglykan, Decorin und Versikan im Gewebe (Gw) und im Medium (Med) nach einer 3-tägigen Kultivierung ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) sowie in frisch isoliertem Gewebe (Tag 0).

3.14 Untersuchungen zur Hemmung der Effekte von IL-1

3.14.1 Untersuchungen mit einem Matrixmetalloproteinase (MMP)-Inhibitor

3.14.1.1 Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen

In den folgenden Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, ob Matrixmetalloproteinasen für die IL-1-induzierte Glykosaminoglykan-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe verantwortlich sein könnten. Daher wurde ein Matrixmetalloproteinasen (MMP)-Inhibitor mit einem breiten Wirkungsspektrum (N-Isobutyl-N-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamidsäure, NNGH) verwendet.

Der GAG-Gehalt der Kulturmedien und des Gewebes wurde mit dem DMMB-Test ermittelt und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen dargestellt.

In den Meniskusexplantaten konnte bei der Kontrolle nach 6 Tagen in Kultur eine kumulative GAG-Freisetzung von $4,9 \pm 0,4 \mu\text{g GAG/mg Feuchtgewicht}$ gemessen werden (**Abb. 36**).

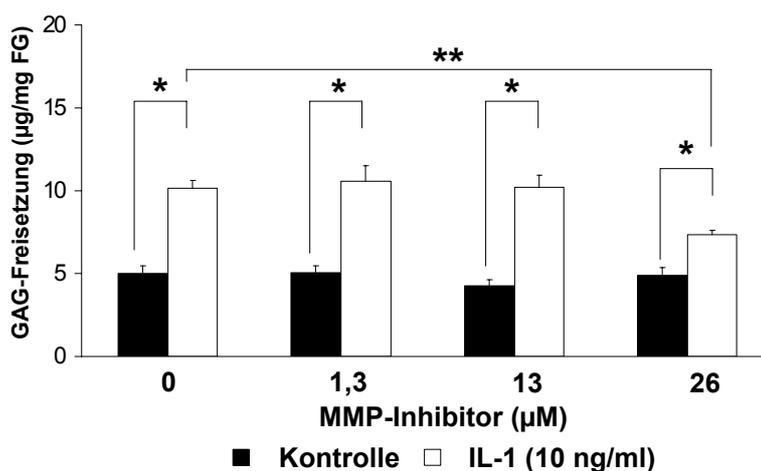


Abb. 36:

Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe und Darstellung der Strukturformel. Kumulative GAG-Freisetzung aus den Meniskusexplantaten (nach 3 und 6 Tagen) nach einer Inkubation ohne/mit IL-1 (10 ng/ml) in Abhängigkeit von der Konzentration eines MMP-Inhibitors.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 7-13, aus 2-4 unabhängigen Experimenten); *p < 0,001; **p < 0,0001

Eine Inkubation der Explantate mit IL-1 führte zu einer gesteigerten Freisetzung, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 109% erhöht war. Durch den MMP-Inhibitor wurde die GAG-Freisetzung in den Kontrollexplantaten nicht beeinflusst. Mit dem MMP-Inhibitor in den Konzentrationen 1,3 µM und 13 µM wurde die IL-1-induzierte Freisetzung von GAGs nicht beeinflusst. Jedoch konnte mit der höchsten eingesetzten Konzentration des MMP-Inhibitors (26 µM, bei der aber bereits auch von einer unspezifischen Hemmung anderer Enzyme, wie Aggrecanasen, ausgegangen werden muss) eine signifikante Hemmung der GAG-

Freisetzung gemessen werden, die gegenüber der unstimulierten Kontrolle ohne MMP-Inhibitor nur noch um 51% erhöht war.

Weiterhin wurde untersucht, ob die durch den MMP-Inhibitor beeinflusste IL-1-abhängige Freisetzung von Glykosaminoglykanen (GAG) aus dem Gewebe sich auch in einem veränderten GAG-Gehalt der Explantate wieder finden lassen konnte. Der GAG-Gehalt der Kontrollexplantate betrug nach 6 Tagen in Kultur $12,7 \pm 0,6 \mu\text{g GAG/mg Feuchtgewicht}$ (**Abb. 37**). Durch die Kultivierung mit IL-1 wurde in den Explantaten ein GAG-Gehalt gemessen, der gegenüber der unstimulierten Kontrolle signifikant um 44% vermindert war. Durch die Zugabe des MMP-Inhibitors wurde der GAG-Gehalt der Kontrollen nicht beeinflusst. Die IL-1-bedingte Abnahme des GAG-Gehaltes in den Meniskusexplantaten konnte aber dosis-abhängig mit ansteigender Konzentration des MMP-Inhibitors reduziert werden. Bei einer Konzentration von $26 \mu\text{M}$ war der IL-1-verminderte GAG-Gehalt des Gewebes im Vergleich zur korrespondierenden Kontrolle zwar immer noch signifikant um 20% reduziert, jedoch gegenüber dem GAG-Gehalt in den IL-1-behandelten Explantaten ohne MMP-Inhibitor bereits signifikant erhöht.

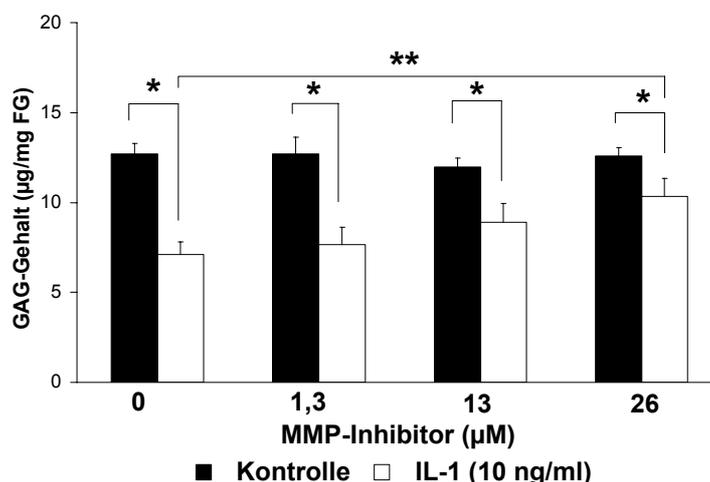


Abb. 37:
Einfluss eines MMP-Inhibitors auf den IL-1-verminderten GAG-Gehalt im Meniskusgewebe. Meniskusexplantate wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) und einem MMP-Inhibitor mit verschiedenen Konzentrationen (1,3 µM, 13 µM, 26 µM) inkubiert und anschließend der GAG-Gehalt des Gewebes bestimmt. Mittelwerte + Standardfehler (n = 7-13, aus 2-4 unabhängigen Experimenten)
 *p < 0,05; **p < 0,01

3.14.1.2 Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Biosyntheseaktivität

Die Messung der biosynthetischen Aktivität der Meniskusexplantate erfolgte mit Hilfe des radioaktiven [^{35}S]-Sulfat- und [^3H]-Prolineinbaus nach einer Kultivierung von 6 Tagen (siehe 2.5). Die gemessenen Werte wurden auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Die Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen wurden im Vergleich zu dieser betrachtet.

IL-1 führte zu einer Reduktion des Sulfat- und Prolin einbaus (**Abb. 38**). Der Einbau von Sulfat wurde durch IL-1 im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 53% vermindert, während der Prolin einbau in diesen Untersuchungen um 19% reduziert wurde. Die Zugabe des MMP-Inhibitors hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Sulfateinbau. Der Einbau von Prolin wurde jedoch durch die Zugabe des MMP-Inhibitors in den Konzentrationen 13 μM und 26 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant um 41% reduziert. Der Effekt von IL-1 schien dabei aber nicht durch den MMP-Inhibitor beeinflusst zu werden; die Effekte waren eher additiv, denn durch IL-1 wurde die MMP-Inhibitor-bedingte Reduktion des Prolin einbaus weiterhin leicht verstärkt. Diese Effekte waren aber nicht signifikant.

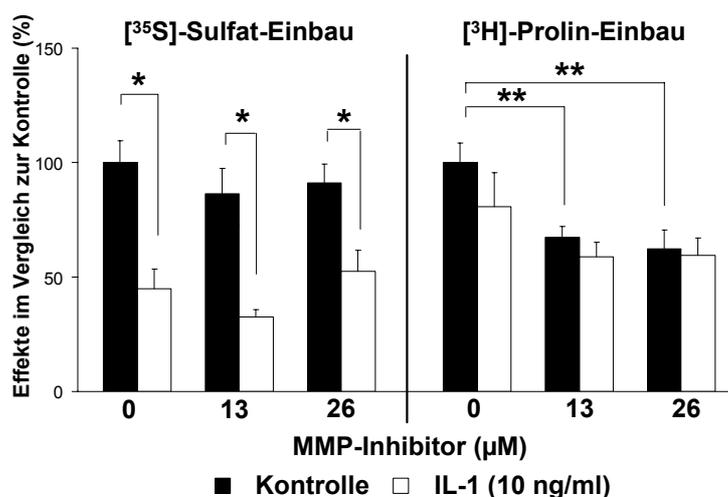


Abb. 38:

Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Biosyntheseaktivität von Meniskusexplantate.

Meniskusexplantate wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) und einem MMP-Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (1,3 μM , 13 μM , 26 μM) inkubiert und die Biosyntheseaktivität durch den Einbau von radioaktivem [^{35}S]-Sulfat- und [^3H]-Prolin, als Maß für die Proteoglykan- und Kollagensynthese, bestimmt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 6, aus 2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,01; **p < 0,01

3.14.1.3 Einfluss eines MMP-Inhibitors auf die Zerstörung von Aggrekan im Meniskus

Mit Hilfe des hier verwendeten MMP-Inhibitors konnte die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung aus dem Meniskusgewebe reduziert werden. Anhand von Western Blot-Analysen sollte daher überprüft werden, ob sich im Gewebe und den Kulturmedien Unterschiede hinsichtlich der Abbau-Fragmente von Aggrekan darstellen ließen. Mit dem Antikörper Anti-G1, der G1-tragende Aggrekan-Fragmente erkennt, konnten im Gewebe und im Medium die bereits in 3. dargestellten Fragmente 1, a, b, c, d, 6 und e nachgewiesen werden. Der MMP-Inhibitor führte weder alleine noch mit IL-1 zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der G1-tragenden Abbau-Fragmente (**Abb. 39**).

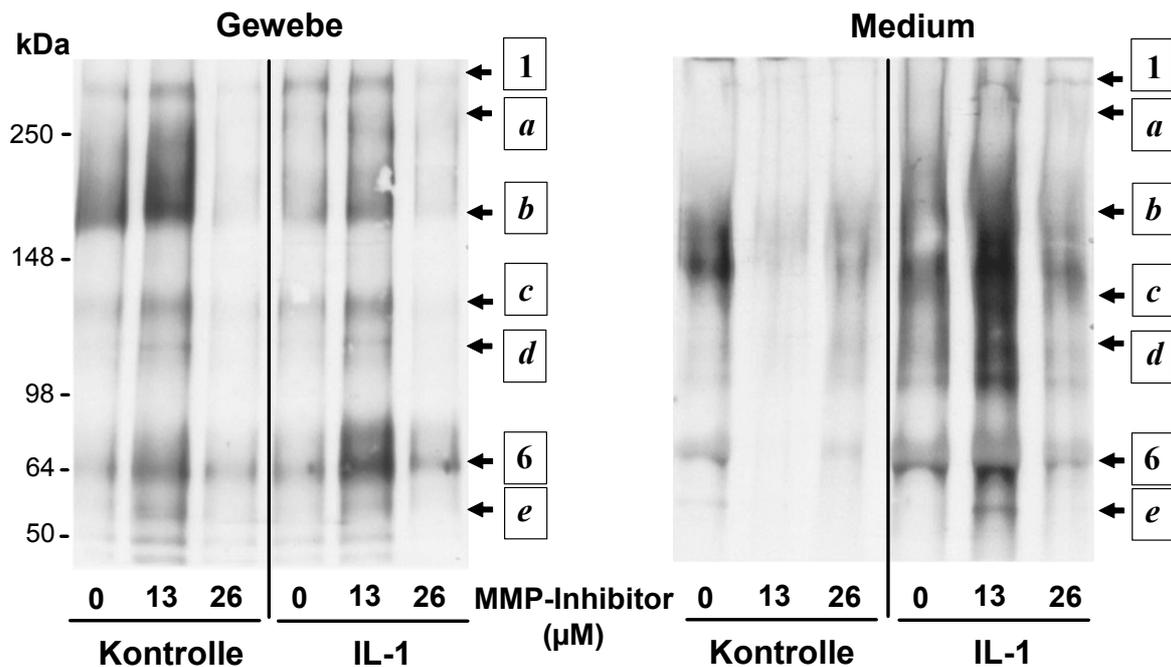


Abb. 39:

Western Blot zum Nachweis von G1-tragenden Aggrecan-Fragmenten im Gewebe und Kulturmedium unter dem Einfluss eines MMP-Inhibitors. Nachweis von G1-tragenden Aggrecan-Fragmenten im Gewebe und Medium nach einer 3-tägigen Kultivierung der Meniskusexplantate ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) und einem MMP-Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (1,3 µM, 13 µM, 26 µM) mit einem Antikörper Anti-G1, der G1-tragende Aggrecan-Fragmente erkennt.

In den Kulturmedien der IL-1-behandelten Explantate konnte mittels des kombinierten Antikörpers Anti-TFKEEE/Anti-TAGELE die Aggrecan-Fragmente *i*, 12 und 13 nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob diese Fragmente die IL-1-bedingte Freisetzung von GAGs erklären und durch die proteolytische Aktivität von Matrixmetalloproteinasen entstehen könnten, wurde überprüft, ob ihre Entstehung durch Verwendung des MMP-Inhibitors verhindert werden kann. Mit Hilfe des MMP-Inhibitors konnte in der höchsten eingesetzten Konzentration (26 µM) die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung reduziert werden (siehe 3.14.1.1). Anhand der Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Abbau-Fragmente 12 und 13 von Aggrecan in den Kulturüberständen der IL-1-behandelten Explantate tatsächlich mit dem MMP-Inhibitor in der höchsten Konzentration schwächer dargestellt wurden (**Abb. 40**). Dies lässt vermuten, dass die Fragmente zumindest zum Teil für die GAG-Freisetzung durch IL-1 mit verantwortlich sind. Da nur die hohe Konzentration des MMP-Inhibitors Wirkung zeigt bleibt offen, ob nicht nur oder auch Aggrecanasen an der Entstehung dieser Fragmente beteiligt sind.

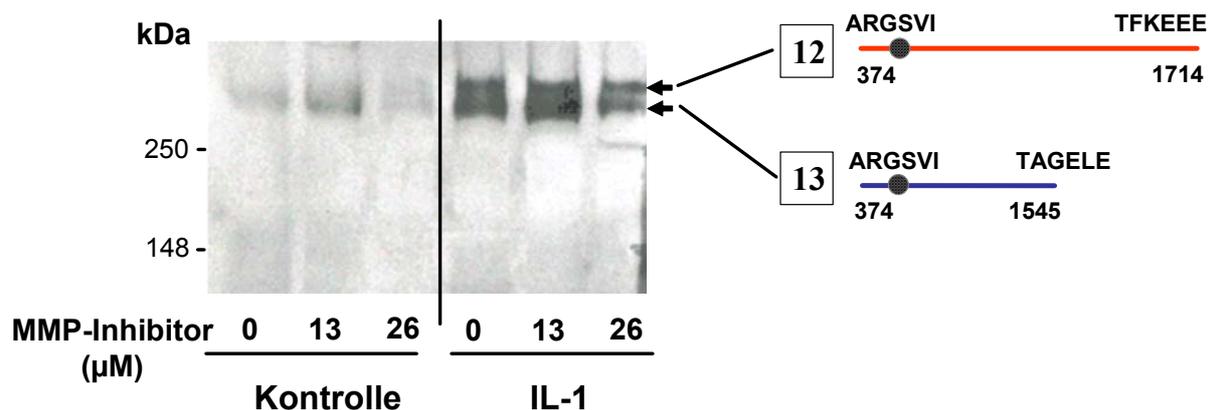


Abb. 40:

Western Blot zum Nachweis von TFKEEE/TAGELE-tragenden Aggrekan-Fragmenten im Kulturmedium von Meniskusexplantaten unter dem Einfluss eines MMP-Inhibitors.

Meniskusexplantate wurden 3 Tage ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) und einem MMP-Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (13 μM, 26 μM) inkubiert und die Kulturmedien mit Hilfe eines kombinierten Antikörpers Anti-TFKEEE/TAGELE, der Bruchstückenden von Aggrekan mit den Aminosäuresequenzen KEEE und GELE erkennt, untersucht. Die abgeleitete Struktur der Fragmente ist auf der rechten Seite dargestellt.

3.14.2 Untersuchungen mit einem Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm)

Für die Untersuchungen mit einem Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm) wurden Explantate nicht wie bisher aus dem Meniskusgewebe von Rindern aus ökologischer Tierhaltung sondern von Schlachtrindern aus Massentierhaltung gewonnen.

3.14.2.1 Einfluss von SODm auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen

Der GAG-Verlust aus dem Meniskusgewebe wurde mit einem DMMB-Test gemessen (siehe 2.4) und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Da bereits innerhalb der ersten drei Tage eine GAG-Freisetzung von $6,1 \pm 1$ μg GAG/mg Feuchtgewicht aus den Explantaten gemessen werden konnte (Abb. 41), und dieser Verlust höher war als bei den zuvor durchgeführten Untersuchungen am Meniskusgewebe von Rindern in ökologischer Tierhaltung nach einer Gesamtkultivierungszeit von 6 Tagen, wurden die Meniskusexplantate nur drei Tage mit IL-1 stimuliert. Durch IL-1 konnte eine GAG-Freisetzung aus dem Gewebe induziert werden, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant um 45% höher war. Die Zugabe von SODm alleine hatte keinen Einfluss auf die GAG-Freisetzung aus dem Gewebe. Mit niedrigen Konzentrationen von SODm wurde die IL-1-induzierte Freisetzung von GAG nicht beeinflusst, während höhere Konzentrationen diese hemmen konnten. So war unter dem Einfluss von 25 μM SODm die durch IL-1-vermittelte GAG-Freisetzung gegenüber der korrespondierenden Kontrolle nur noch um 10% und dies nicht-signifikant erhöht.

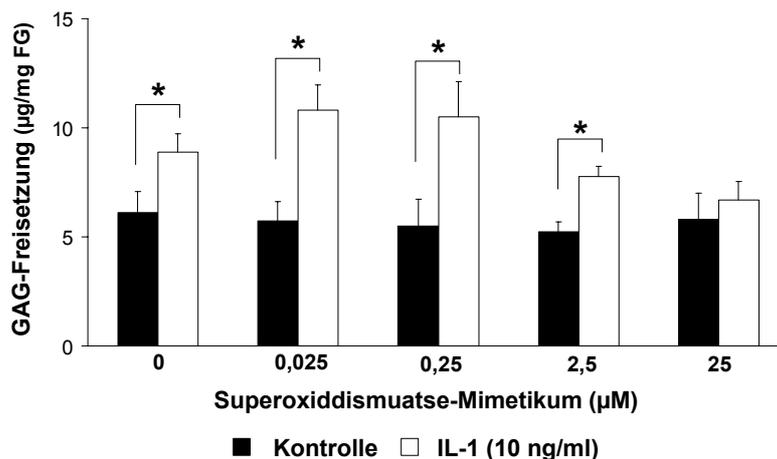


Abb. 41:
Einfluss des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die IL-1-induzierte Glykosaminoglykan(GAG)-Freisetzung aus Meniskusgewebe. Meniskusimplantate wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 und SODm in verschiedenen Konzentrationen (µM) stimuliert und die Freisetzung an GAG aus dem Gewebe bestimmt. Mittelwerte + Standardfehler (n = 7-9, aus 3 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

3.14.2.2 Einfluss von SODm auf die Biosyntheseaktivität

Mit Hilfe des Sulfateinbaus wurde die Proteoglykansynthese der Meniskusimplantate gemessen. Die Ergebnisse des Einbaus wurden auf das Feuchtgewicht der Implantate bezogen und im Vergleich zur Kontrolle (= 100%) betrachtet. Durch IL-1 wurde der Sulfateinbau signifikant um nahezu 72% gesenkt (**Abb. 42**).

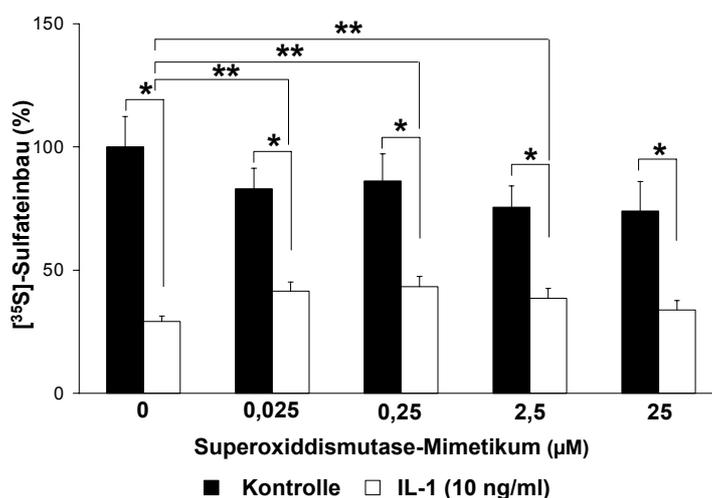


Abb. 42:
Einfluss des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die Biosyntheseaktivität. Meniskusimplantate wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) sowie mit verschiedenen Konzentrationen des SODm kultiviert und anschließend durch den Einbau von radioaktivem [³⁵S]-Sulfat (als Maß für die Proteoglykansynthese) die Biosyntheseaktivität ermittelt. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde die Kontrolle der Meniskusimplantate gleich 100% gesetzt und die Ergebnisse der anderen Versuchsgruppen im Vergleich zu dieser betrachtet. Mittelwerte + Standardfehler (n = 7-9, aus 3 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05, **p < 0,01

Der durch IL-1 verminderte Sulfateinbau konnte durch keine der verwendeten Konzentrationen von SODm signifikant beeinflusst werden. Mit ansteigender Konzentration von SODm wurde der Einbau von Sulfat in den Kontrollkulturen leicht jedoch auch nicht signifikant vermindert.

3.14.2.3 Einfluss von SODm auf die NO-Produktion

Mit Hilfe der Griess-Reaktion wurde in den Überständen die Produktion von NO aus den Meniskusexplantaten gemessen (siehe 2.6). In den in dieser Versuchsdurchführung verwendeten Meniskusexplantaten konnte im Vergleich zu den bisherigen Untersuchungen mit Meniskusgewebe von Rindern, die in ökologischer Tierhaltung gehalten wurden, innerhalb von drei Tagen bereits eine Basisproduktion von $2,3 \pm 0,5 \mu\text{mol NO/mg}$ Feuchtgewicht gemessen werden (Abb. 43). Mit ansteigender Konzentration von SODm konnte die Produktion von NO im Vergleich zur Kontrolle leicht gesenkt werden. Dieses Ergebnis war jedoch nur bei einer SODm Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ signifikant. Durch IL-1 wurde die Produktion von NO im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 130% gesteigert. Niedrige Konzentrationen von SODm hatten keinen Einfluss auf die IL-1-induzierte NO-Produktion. Bei der Verwendung von höheren Konzentrationen ($2,5 \mu\text{M}$ und $25 \mu\text{M}$) konnte die IL-1-bedingte NO-Produktion dagegen signifikant gehemmt werden, so dass diese gegenüber der IL-1- und SODm-freien Kontrolle nur noch um $\sim 50\%$ gesteigert war.

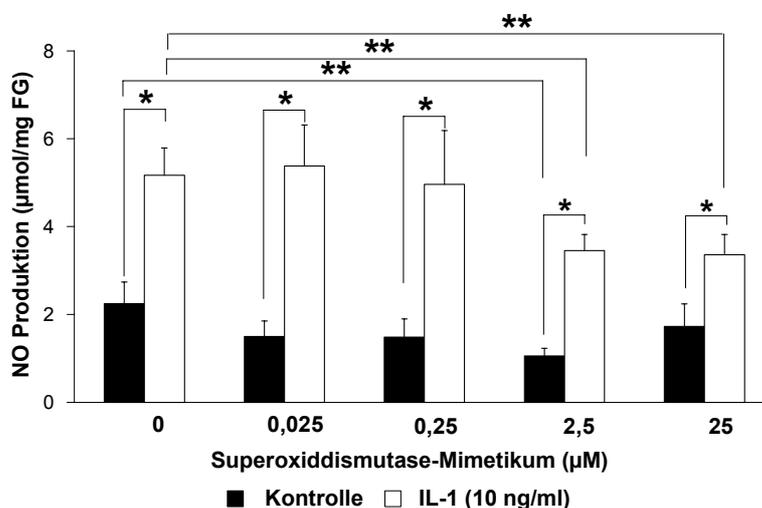


Abb. 43:
Einfluss des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) auf die NO-Produktion.
 Meniskusexplantate wurden 3 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) sowie SODm kultiviert und in den Kulturüberständen die NO-Produktion mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt.
 Mittelwerte + Standardfehler (n = 7-9, aus 3 unabhängigen Experimenten); * $p < 0,05$; ** $p < 0,05$

3.14.2.4 Einfluss von SODm auf die Expression von matrix-abbauenden Proteasen im Meniskusgewebe auf Proteinebene

Mit Hilfe einer Caseinzymographie konnte auf Proteinebene in den Kulturüberständen der Meniskusexplantate nach einer 3-tägigen Kultivierung mit IL-1 die proteolytische Aktivität von pro-MMP-3 nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Untersuchungen der Kulturüberstände von isolierten Meniskuszellen (siehe 3.5.4) konnte durch das SODm in den verschiedenen Konzentrationen weder alleine noch zusammen mit IL-1 eine eindeutige Veränderung der proteolytischen Aktivität beobachtet werden (Abb. 44).

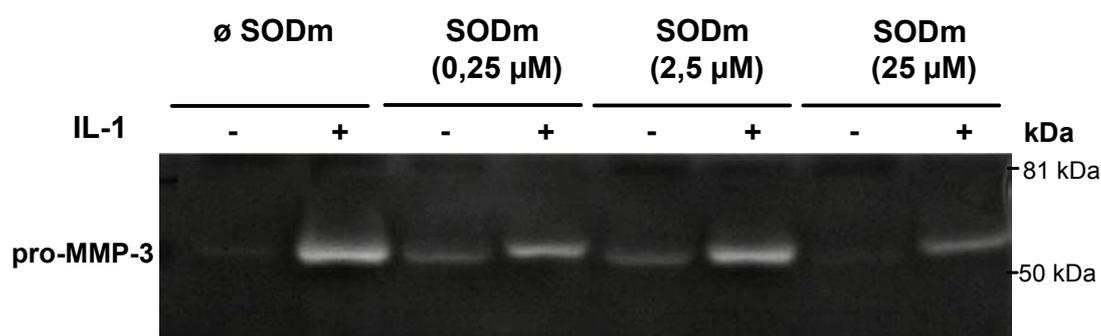


Abb. 44:

Caseinzymographie zum Nachweis von Casein-spaltenden Enzymen in den Kulturüberständen von Meniskusexplantaten unter dem Einfluss von IL-1 und einem Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm). Meniskusexplantate wurden 3 Tage ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) und SODm in verschiedenen Konzentrationen (0,25 µM, 2,5 µM, 25 µM) kultiviert und die konditionierten Kulturüberstände für zymographische Analysen zum Nachweis der proteolytischen Aktivität von pro-MMP-3 bei 55 kDa verwendet.

3.15 Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation des Meniskusgewebes

Für die weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss von IL-1 auf Meniskusgewebe aus unterschiedlichen Bereichen (oberflächliches Gewebe, das direkt dem Tibiaplateau auflag, und tiefes Gewebe aus dem Inneren des Meniskus) im Vergleich zueinander betrachtet.

3.15.1 Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe

Für eine lichtmikroskopische Darstellung der Unterschiede innerhalb des Meniskusgewebes wurden Schnitte von Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe, welches direkt dem Tibiaplateau auflag, und aus einem tieferen Bereich des Gewebes angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt (siehe 2.9.3).

Explantate, die aus dem oberflächlichen Meniskugewebe gewonnen wurden, zeigten ein dreigeteiltes Erscheinungsbild, welches bereits im Kapitel 3.1 näher beschrieben wurde und dessen Aufbau in **Abb. 45** noch einmal vergleichend dargestellt ist.

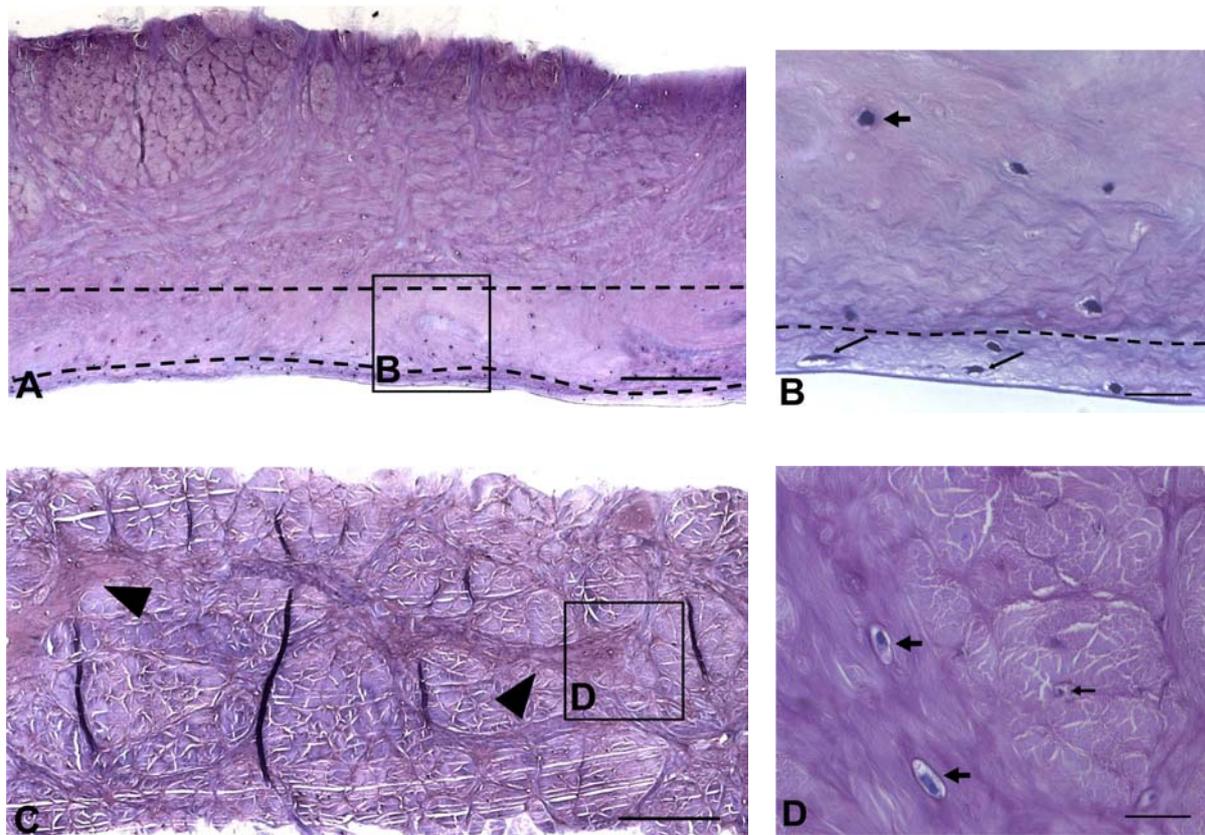


Abb. 45:
Lichtmikroskopische Darstellung von Meniskusexplantaten aus unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen. (Toluidinblau-Färbung, A, C: Balken = 200 µm, B, D: Balken = 25 µm).

- (A) Darstellung eines Meniskusexplantates aus dem oberflächlichen Gewebe. Die ursprüngliche Meniskusoberfläche zeigt im Bild nach unten und besteht aus einer dünnen äußeren und einer etwa 300 µm dicken faserknorpelartigen Schicht (siehe auch Ausschnittsvergrößerung in B). Der obere Bildanteil entspricht etwa 2/3 der Dicke des Explantates und repräsentiert als eine dritte Schicht den Innenaufbau des Meniskus, ist somit vergleichbar mit dem Aufbau der Explantate aus tieferen Schichten des Meniskus (siehe hierfür Beschreibung in C und D).
- (B) Ausschnittsvergrößerung aus (A). An der Oberfläche (im Bild nach unten zeigend) befindet sich eine etwa 30 µm dicke Schicht, die kaum negative Ladungen aufweist und deren Fasern parallel zur Oberfläche ausgerichtet sind. Die Zellen sind rundlich und zum Teil spindelförmig (dünne schwarze Pfeile). Die zweite weiter innen liegende Schicht entspricht einem Faserknorpel mit weniger deutlich ausgerichtetem Faserverlauf und knorpelartigen runden Zellen mit einem Knorpelhof (dicker schwarzer Pfeil).
- (C) Darstellung eines Meniskusexplantates aus dem tieferen Gewebe. Der Aufbau entspricht der dritten inneren Schicht der oberflächlichen Explantate (siehe A), nur dass hier das gesamte Explantat durch diese Schicht repräsentiert wird (zum näheren Aufbau siehe D).
- (D) Ausschnittsvergrößerung aus (C). Große quer geschnittene Bündel von Kollagenfasern mit dazwischen liegenden im Querschnitt kleinen unscheinbaren Zellen (dünner schwarzer Pfeil) werden septenartig (schwarze Pfeilköpfe in C) von einem Gewebe umgeben, welches mit vielen negativen Ladungen in der Matrix einem Faserknorpel entspricht und runde bis ovale Zellen mit Knorpelhof besitzt (schwarze dicke Pfeile).

Neben einer etwa 30 μm dicken Schicht, die die natürliche Oberfläche des Meniskus repräsentiert und einer etwa 300 μm dicken Schicht, die vom Aufbau einem Faserknorpel entspricht, beinhaltet der restliche Anteil der oberflächlichen Explantate ein Gewebe, welches aus großen Bündeln von Kollagenfasern aufgebaut war, die septenartig von einem faserknorpelartigen Gewebe umgeben sind. Diese dritte Kollagenfaserbündel-haltige Schicht der oberflächlichen Explantate entsprach der gesamten Struktur der Explantate aus tieferen Regionen des Meniskus.

Die vergleichende Betrachtung der Explantate aus oberflächlichen und tieferen anatomischen Lokalisationen des Meniskus ließen deutliche Unterschiede in der Anzahl der Zellen in diesen Bereichen des Meniskus vermuten. Deshalb wurde an Serienschnitten die Anzahl von Zellen in den verschiedenen Explantaten bestimmt. So konnte in einem Meniskusexplantat aus dem oberflächlichen Bereich am Tag der Isolierung (Tag 0) insgesamt eine mittlere Zellzahl von 137 Zellen/ mm^2 und aus dem tieferen Bereich eine Zellzahl von 56 Zellen/ mm^2 ermittelt werden, was etwa 41% der Zellzahl in oberflächlichen Explantaten entspricht (**Abb. 46**).

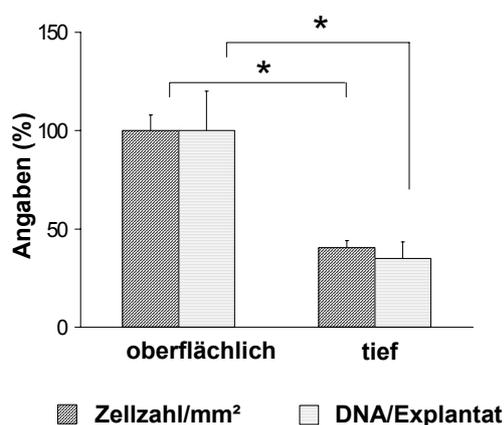


Abb. 46:

Unterschiede in der Zellzahl und im DNA-Gehalt zwischen Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe. Die Anzahl der Zellen in den Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Gewebe wurde durch Auszählen der Zellkerne an Paraffinschnitten ermittelt. Zusätzlich wurde der DNA-Gehalt in frisch isolierten Explantaten mit Hilfe der CyQuant-Methode bestimmt. Die Angaben wurden zum leichteren Vergleich in Prozent (%) dargestellt (Originalwerte siehe Text).

Mittelwerte + Standardfehler (n = 12-14, aus 4 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

Zur deutlicheren Darstellung der Zellen wurde neben der Färbung der Explantate mit Hämatoxylin, die für eine Erkennung von Kollagenfasern und ihrem Verlauf geeignet ist, eine Bisbenzimidfärbung durchgeführt (siehe **2.9.5**). Die Zellkerne konnten so mit Hilfe von fluoreszierendem Licht sichtbar gemacht werden (**Abb. 47**). Mit dieser Methode sollte ausgeschlossen werden, dass Zellen übersehen wurden. Eine Messung des DNA-Gehaltes mit Hilfe der CyQuant-Methode (siehe **2.7**) konnte die zonenabhängigen Unterschiede bestätigen. An Tag 0 wurde in den Explantaten aus dem oberflächlichen Gewebe ein mittlerer DNA-Gehalt von 59,7 ng DNA/Explantat ermittelt, während man in den Explantaten des tieferen Gewebes einen 2,4-mal niedrigeren DNA-Gehalt (25,3 ng DNA/Explantat) finden konnte, was dem Verhältnis der Zellzählung entspricht.

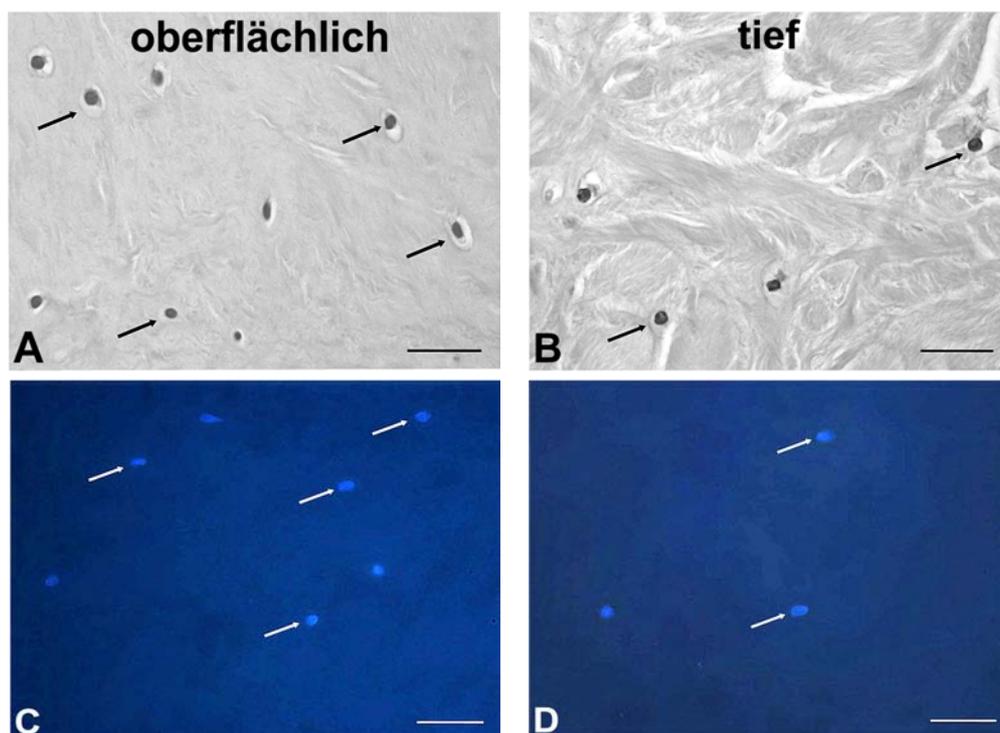


Abb. 47:
Lichtmikroskopische Darstellung der Zellkerne in Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen (A, C) und tiefen (B, D) Meniskusgewebe. In Hämatoxylin-gefärbten Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe waren mehr Zellen zu erkennen als in einem Explantat aus dem tieferen Gewebe (A, B). Zur besseren Darstellung der Zellkerne wurde in einigen Schnitten eine Bisbenzimidfärbung (C, D) durchgeführt (Balken = 25 μ m).

3.15.2 Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation

Aufgrund der Tatsache, dass der Meniskus in seinem Aufbau lokale Unterschiede zeigte, mit unterschiedlichen Zellformen, Anzahl der Zellen und Verlauf der Kollagenfasern an der Oberfläche und im Inneren des Meniskus, wurde untersucht, ob das Gewebe unterschiedlich auf IL-1 reagierte. Dafür wurden die Explantate aus den Bereichen „oberflächliches“ und „tieferes“ Meniskusgewebe verwendet (siehe 2.2.1) und mit IL-1 in einer Konzentration von 10 ng/ml über einen Zeitraum von 6 Tagen inkubiert. Die kumulative Freisetzung an Glykosaminoglykanen (GAG) aus den Explantaten in das umgebende Medium wurde mit Hilfe des DMMB-Tests gemessen (siehe 2.4) und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Die Explantate aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe hatten ein durchschnittliches Feuchtgewicht von $7,6 \pm 0,4$ mg und die Explantate aus dem tieferen Gewebe wogen $6,9 \pm 0,3$ mg. Der IL-1-unabhängige GAG-Verlust in den ersten drei Kultivierungstagen lag sowohl in den Explantaten aus dem oberflächlichen ($2,2 \pm 0,2$ μ g/mg) als auch aus dem tieferen Meniskusgewebe ($2,7 \pm 0,4$ μ g/mg) leicht höher als in den darauf folgenden Tagen (oberflächliches Gewebe: $1,4 \pm 0,1$ μ g/mg; tiefes Gewebe: $1,2 \pm 0,1$ μ g/mg). Insgesamt konnte somit in den Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe eine kumulative GAG-Freisetzung von $3,6 \pm 0,3$ μ g GAG/mg Feuchtgewicht ermittelt

werden. Bei den Meniskusexplantaten aus dem tieferen Gewebe wurde ein um 11% höherer Basisverlust an GAG gemessen als bei den Explantaten aus dem oberflächlichen Gewebe ($4 \pm 0,4 \mu\text{g GAG/ mg Feuchtgewicht}$). Im Hinblick auf den GAG-Gehalt des Gewebes wurde in den Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe nach 6 Tagen in Kultur ein GAG-Gehalt von $8,4 \pm 1,2 \mu\text{g GAG/mg Feuchtgewicht}$ gemessen, während Explantate aus dem tieferen Meniskusgewebe im Vergleich dazu einen 30% höheren GAG-Gehalt aufwiesen. In den Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe wurde durch IL-1 eine signifikant höhere Freisetzung an Glykosaminoglykanen in das umgebende Medium induziert, welche gegenüber der unbehandelten Kontrolle um 44% gesteigert war (**Abb. 48**). Im Vergleich dazu wurde in den Explantaten des tieferen Gewebes durch IL-1 jedoch kein zusätzlicher Verlust an Glykosaminoglykanen induziert.

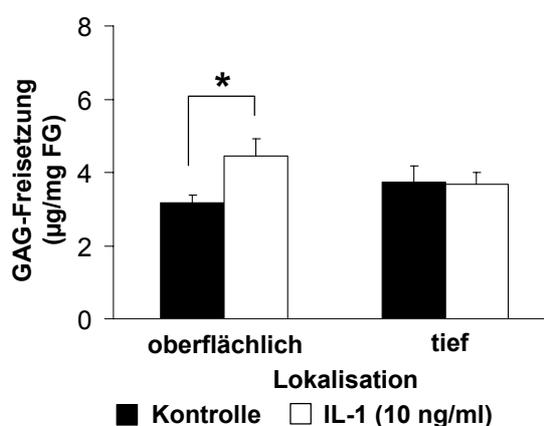


Abb. 48:

Einfluss von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und in den Kulturüberständen die kumulative GAG-Freisetzung (nach 3 und 6 Tagen) aus den Meniskusexplantaten bezogen auf das Feuchtgewicht der Explantate ermittelt.

Mittelwerte \pm Standardfehler (n = 18; aus 6 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

3.15.3 Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation

Mit Hilfe des Einbaus von radioaktivem [^{35}S]-Sulfat (als Maß für die Proteoglykansynthese) wurde die Biosyntheseaktivität in den Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen und dem tieferen Gewebe untersucht und miteinander verglichen. Die Einbauraten von Sulfat wurden jeweils auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

Durch IL-1 wurde der Einbau von Sulfat sowohl in den Explantaten aus dem oberflächlichen als auch aus dem tieferen Meniskusgewebe gesenkt (**Abb. 49**). In den Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe wurde der Einbau durch IL-1 signifikant um 55% reduziert. In den Kontrollexplantaten des tieferen Meniskusgewebes war der Sulfateinbau im Vergleich zu den Explantaten aus dem oberflächlichen Gewebe signifikant um 40% vermindert. Durch die IL-1 Stimulation der Explantate aus dem tiefen Meniskusgewebe konnte der Einbau von

Sulfat gegenüber der korrespondierenden Kontrolle um 44% gehemmt werden, was jedoch nicht signifikant war.

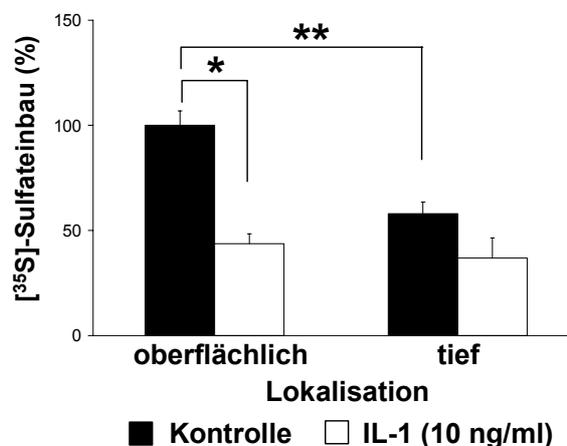


Abb. 49:

Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und anschließend durch den Einbau von radioaktivem [³⁵S]-Sulfat (als Maß für die Proteoglykansynthese) die Biosyntheseaktivität ermittelt (Kontrolle „oberflächlich“ = 100%).

Mittelwerte + Standardfehler (n = 6; aus 2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

3.15.4 Einfluss von IL-1 auf die Produktion von Stickoxid (NO) in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation

Neben der unterschiedlichen Wirkung von IL-1 auf die Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus den Explantaten des oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebes sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede in den Effekten von IL-1 im Hinblick auf die Produktion von Stickoxid (NO) finden lassen. Mit Hilfe des Griess-Reagenz wurde in den Kulturüberständen Nitrit, ein stabiles Endprodukt von NO, als ein Syntheseprodukt der Zellen des Meniskusgewebes nachgewiesen. Die Explantate aus den unterschiedlichen Bereichen des Meniskusgewebes wurden für einen Zeitraum von 6 Tagen mit IL-1 kultiviert. Innerhalb dieser Zeit wurde das Medium einmal nach 3 Tagen gewechselt, so dass die NO Synthese innerhalb der ersten drei Tage (Tag 3) und der darauf folgenden Tage (Tag 6) analysiert werden konnte. Da nur innerhalb der ersten drei Tage eine Wirkung von IL-1 im Hinblick auf die NO-Produktion in den Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe beobachtet werden konnte (siehe 3.9), wurden nur die gemessenen NO Werte der ersten drei Tage auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen und in der **Abb. 50** dargestellt. In den Überständen der Kontrollexplantate aus dem oberflächlichen Gewebe konnte nach 3 Tagen Kultur eine NO Produktion von $0,20 \pm 0,05$ μmol NO (μmol)/mg Feuchtgewicht gemessen werden. Die Kultivierung der Explantate mit IL-1 hatte zur Folge, dass die Produktion von NO gegenüber der unstimulierten Kontrolle signifikant um den Faktor 3,5 erhöht war.

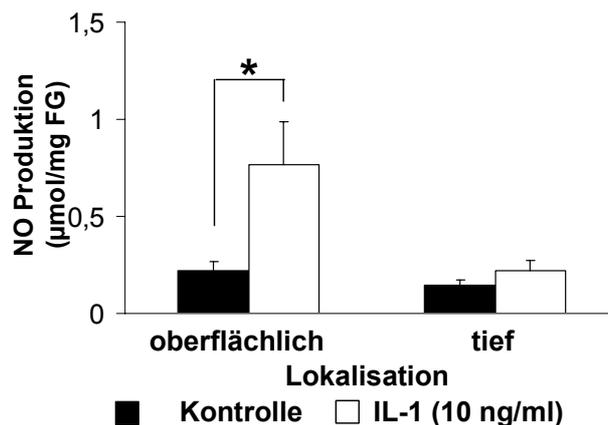


Abb. 50:

Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und in den Kulturüberständen die Produktion von NO ermittelt und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. In der Abbildung ist nur die NO-Produktion innerhalb der ersten 3 Tage berücksichtigt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 6; aus 2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

In den Kontrollexplantaten aus dem tieferen Meniskusgewebe wurde im Vergleich zu den Explantaten aus dem oberflächlichen Gewebe innerhalb der ersten 3 Tage eine geringere Produktion von NO als in den oberflächlichen Explantaten gemessen ($0,13 \pm 0,03$ µmol NO/mg). Mit IL-1 konnte zwar auch hier eine leicht gesteigerte Produktion von NO induziert werden, jedoch war diese nicht signifikant.

3.15.5 Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation des Meniskusgewebes auf mRNA Ebene

Weiterhin wurde untersucht, ob sich in Abhängigkeit von der Lokalisation des Meniskusgewebes Unterschiede in der IL-1-induzierten Expression der matrix-abbauenden Enzyme darstellen ließen die möglicherweise für die zuvor beschriebenen Unterschiede in der GAG-Freisetzung verantwortlich gemacht werden könnten. Mit Hilfe einer quantitativen real time RT-PCR wurde daher die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, und -3 auf mRNA Ebene ermittelt.

Durchschnittlich betrug die Ausbeute an Gesamt-RNA aus ca. 100 mg eingesetztem oberflächlichen Gewebe (~15 Meniskusexplantate) 40 ng/mg aus den unstimulierten und 25 ng/mg aus den stimulierten Explantaten. Im Vergleich dazu wurden aus dem tieferen Meniskusgewebe 35 ng/mg aus den unstimulierten und 21 ng/mg aus den IL-1-behandelten Explantaten isoliert. Als Referenzgen wurde das „Housekeeping Gene“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) verwendet und die gemessenen CT-Werte darauf bezogen. Die Verhältnisse der RNA-Ausbeuten entsprachen somit nur tendenziell aber nicht vollständig den Unterschieden des Zell- und DNA-Gehaltes die bereits oben für die Explantate unterschiedlicher Herkunft beschrieben wurden.

Mittels real time RT-PCR konnte gezeigt werden, dass durch IL-1 die Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-1 auf mRNA Ebene in den Explantaten aus dem oberflächlichen Gewebe im Vergleich zur Kontrolle 2-fach gesteigert war (**Abb. 51**).

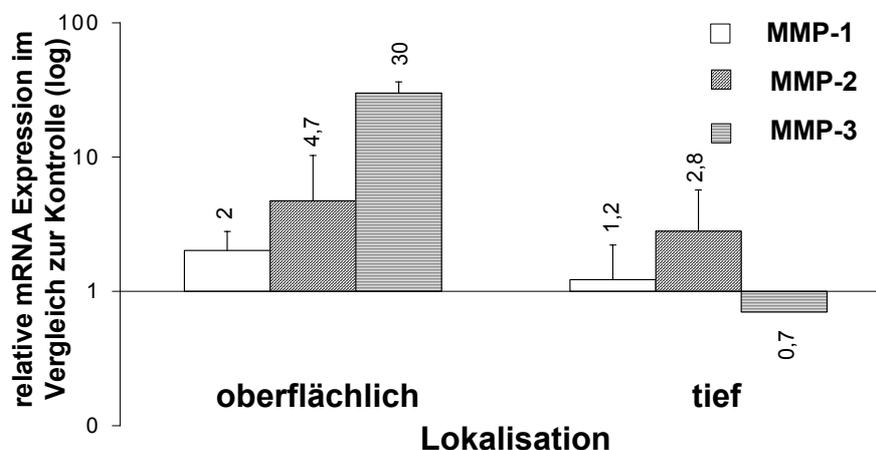


Abb. 51:

Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen auf mRNA Ebene in Abhängigkeit vom anatomischen Ursprung der Meniskusexplantate. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe wurden 3 Tage ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2 und -3 mittels einer real time RT-PCR ermittelt. Die mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen ist relativ zur unstimulierten Kontrolle (welche gleich 1 gesetzt wurde) logarithmisch dargestellt.

Mittelwerte + Standardfehler (n = 2-3 unabhängige Experimente; MMP-3 mRNA Expression in tiefem Meniskusgewebe ist n = 1, da nur in einem Experiment in der IL-1-Gruppe MMP-3 detektierbar war).

Demgegenüber konnte keine gesteigerte Expression von MMP-1 in den Explantaten aus dem tieferen Gewebe verifiziert werden. Durch IL-1 wurde die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-3 auf mRNA Ebene in den Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe gegenüber der unstimulierten Kontrolle 4,7- und 30-fach erhöht. Im Vergleich dazu war in den Explantaten aus dem tieferen Meniskusgewebe die Expression von MMP-2 durch IL-1 gegenüber der Kontrolle nur 2,8-fach gesteigert. Für MMP-3 konnte sogar nur in einem von zwei Experimenten in den IL-1-stimulierten Explantaten ein ΔC_T -Wert ermittelt werden. Daher war es nicht möglich, die Expression von MMP-3 mit entsprechender n-Zahl relativ zur Kontrolle darzustellen. Bei dem angegebenen Experiment war in den Explantaten aus dem tieferen Meniskusgewebe die IL-1-abhängige mRNA Expression von MMP-3 gegenüber der Kontrolle leicht vermindert.

3.15.6 Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Enzymen in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation des Meniskugewebes auf Proteinebene

Mit zymographischen Analysen der Kulturüberstände, mit deren Hilfe die proteolytische Aktivität von Matrixmetalloproteinasen auf Proteinebene dargestellt werden konnte, wurde bestätigt, dass die durch IL-1-induzierte Expression von MMP-2 und MMP-3 in den Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskugewebe viel stärker ausgefallen war als in den Explantaten aus dem tieferen Gewebe. Mit Hilfe eines Gelatinezymogramms konnte in den Überständen der Explantate aus dem oberflächlichen und aus dem tieferen Gewebe bei ~66 kDa die proteolytische Aktivität von MMP-2 in der pro-Form nachgewiesen werden (Abb. 52A).

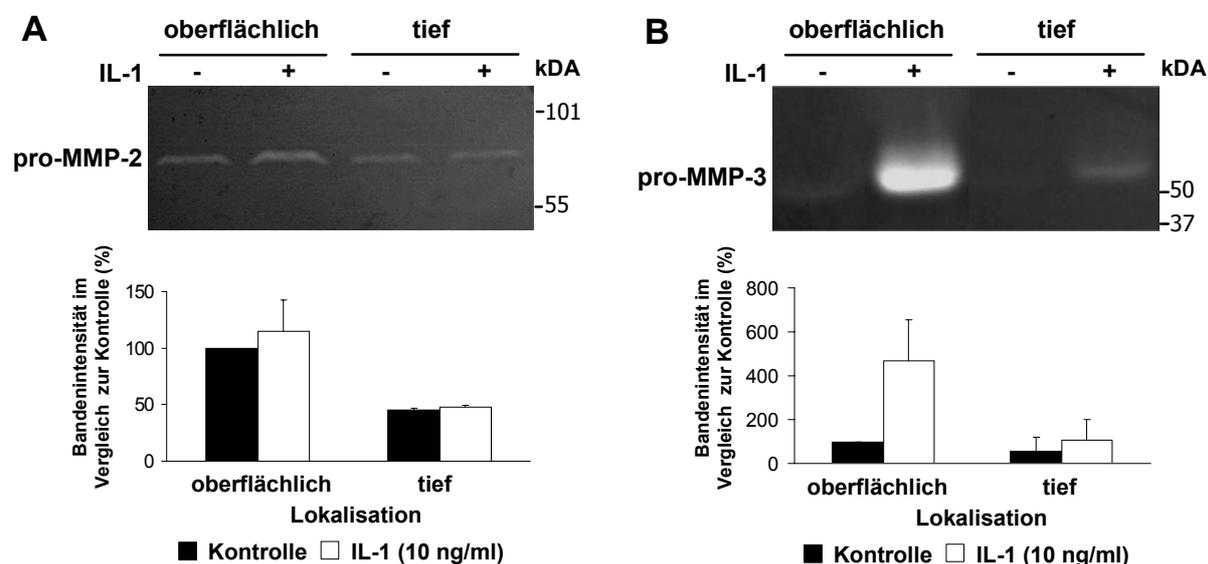


Abb. 52:

Zymographische Analysen der Kulturüberstände von Meniskusexplantaten zur Darstellung der proteolytischen Aktivität von matrix-abbauenden Proteasen auf Proteinebene in Abhängigkeit von dem anatomischen Ursprung der Explantate. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskugewebe wurden 3 Tage ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und die konditionierten Kulturüberstände für zymographische Analysen zum Nachweis der proteolytischen Aktivität verwendet. Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Beispiel von mehrfach durchgeführten unabhängigen Experimenten.

- (A) Gelatinezymogramm mit dem Nachweis von pro-MMP-2 (oben) und Darstellung der Bandenintensität von 2 unabhängig durchgeführten Experimenten (unten).
 (B) Caseinzymogramm mit dem Nachweis von pro-MMP-3 (oben) und Darstellung der Bandenintensität von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

Durch IL-1 war nur in den Überständen der oberflächlichen Explantate eine leicht verstärkte Aktivität von pro-MMP-2 erkennbar. Eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität konnte zeigen, dass die proteolytische Aktivität in den Explantaten aus dem tieferen Gewebe nahezu um die Hälfte gegenüber dem oberflächlichen Gewebe vermindert war, was sich durch den geringen Zellgehalt erklären lässt.

Mittels eines Casein-Zymogramms konnte in den Kulturmedien der unstimulierten Proben der oberflächlichen und tiefen Explantate nahezu keine proteolytische Aktivität gefunden

werden (**Abb. 52B**). Erst durch IL-1 und dabei in einem verstärkten Maße auch nur in den Kulturmedien der Explantate aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe konnte auf der Höhe von 55 kDa die proteolytische Aktivität von MMP-3 in der pro-Form nachgewiesen werden. In den Kulturüberständen der Explantate aus dem tieferen Gewebe war, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache Bande zu verifizieren (**Abb. 52B**). Eine densitometrische Auswertung der Bandenintensität der Casein-Zymogramme zeigt, dass die durch IL-1-induzierte Expression von pro-MMP-3 auf Proteinebene im oberflächlichen Gewebe gegenüber der Kontrolle im Mittel um den Faktor 4 gesteigert war. Im Vergleich dazu, war die proteolytische Aktivität von pro-MMP-3 im tieferen Gewebe im Verhältnis zu der dazugehörigen Kontrolle nur geringfügig erhöht.

3.16 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von IL-1

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem ^{125}I -IL-1 und in Anwesenheit eines 100-fachen Überschusses von unmarkiertem IL-1, für eine mögliche Verdrängung, sollte versucht werden, die Bindungseigenschaften in den Explantaten unterschiedlichen anatomischen Ursprungs näher zu untersuchen. Es sollte dabei überprüft werden, ob sich die verschiedenen Ergebnisse bei den Explantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe durch Unterschiede in der Bindungsaffinität von IL-1 aufgrund einer möglicherweise unterschiedlichen Verteilung von IL-1 Rezeptoren erklären lassen könnten. Die Untersuchungen wurden bei 4°C durchgeführt, da die Bindungskapazität der Rezeptoren bei niedrigen Temperaturen herabgesetzt ist. Bei der Darstellung der Ergebnisse wurden die gemessenen cpm-Werte auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

In den oberflächlichen und tiefen Meniskusexplantaten wurde eine Bindung von radioaktiv markiertem ^{125}I -IL-1 gemessen, die in den oberflächlichen Explantaten leicht erhöht war (**Abb. 53**). Da der Zusatz von nicht-markiertem IL-1 aber generell kaum eine Verdrängung der Bindung erzielte, ist zu vermuten, dass es sich in beiden Versuchsgruppen im Wesentlichen um eine unspezifische Bindung an die Extrazellulärmatrix des Meniskusgewebes handeln muss. Durch die zusätzliche Gabe von unmarkiertem IL-1 konnte in den Explantaten aus dem oberflächlichen Gewebe die Bindung von radioaktiv markiertem ^{125}I -IL-1 um 7% und in den Explantaten des tieferen Gewebes um 3% reduziert werden.

Da ein großer Teil des radioaktiv markierten ^{125}I -IL-1 unspezifisch an die Extrazellulärmatrix des Meniskusgewebes gebunden wurde, ist es nicht möglich gewesen eine verlässliche Angabe über eine signifikant unterschiedliche Verteilung von IL-1 Rezeptoren in den verschiedenen Bereichen des Meniskusgewebes zu machen, so dass, wenn überhaupt, nur von einem Trend zur stärkeren Expression von IL-1 Rezeptoren im oberflächlichen Meniskusgewebe gesprochen werden kann. Das Verhältnis (ca. 2,4-fach höhere Verdrängung im oberflächlichen Gewebe) spiegelt aber auch die Relation des Zellgehaltes in den verschiedenen Versuchsgruppen wider und könnte dadurch erklärbar sein.

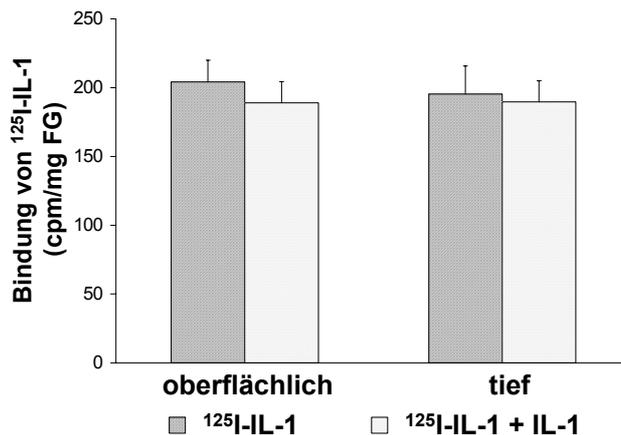


Abb. 53:

Untersuchungen zur Bindungsaffinität von $^{125}\text{I-IL-1}$ in Meniskusexplantaten in Abhängigkeit von dem anatomischen Ursprung der Explantate. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe wurden 6 h bei 4°C mit ^{125}I -markiertem IL-1 ($^{125}\text{I-IL-1}$) inkubiert. Zur Untersuchung einer Verdrängung wurden einige Explantate zusätzlich in Gegenwart eines 100-fachen Überschusses von unmarkiertem IL-1 ($^{125}\text{I-IL-1} + \text{IL-1}$) kultiviert. Die Menge an gebundenem $^{125}\text{I-IL-1}$ wurde mit Hilfe eines γ -Counters gemessen und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

Mittelwerte + Standardabweichung (n = 11-13; aus drei unabhängigen Experimenten)

3.17 Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 auf humanes Meniskusgewebe

Neben der Untersuchung des Einflusses von IL-1 auf den bovinen Meniskus wurde in ersten vorläufigen Versuchen überprüft, ob sich die destruktive Wirkung von IL-1 auch bei humanem Meniskusgewebe nachweisen lassen konnte. Dabei wurden die Untersuchungen im Hinblick auf eine Degradation an bereits teildegeneriertem Gewebe durchgeführt, welches bei Endoprothesenoperationen anfiel. Die Untersuchungen zur IL-1-induzierten Genexpression von matrix-abbauenden Proteasen konnten an Meniskusgewebe durchgeführt werden, welches kaum makroskopisch sichtbare degenerative Veränderungen aufwies.

3.17.1 Nachweis des IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1 RI) in humanen Meniskusexplantaten

Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung (siehe 2.11.2) konnte in humanem Meniskusgewebe der IL-1 Rezeptor Typ I dargestellt werden (**Abb. 54**). Eine positive Färbung konnte nur in einigen Zellen nachgewiesen werden, jedoch war es nicht möglich in Abhängigkeit von der Lokalität Unterschiede in der Anfärbbarkeit zu beobachten, die die lokalitätsspezifischen Effekte bei den Rinderexperimenten erklären könnten.

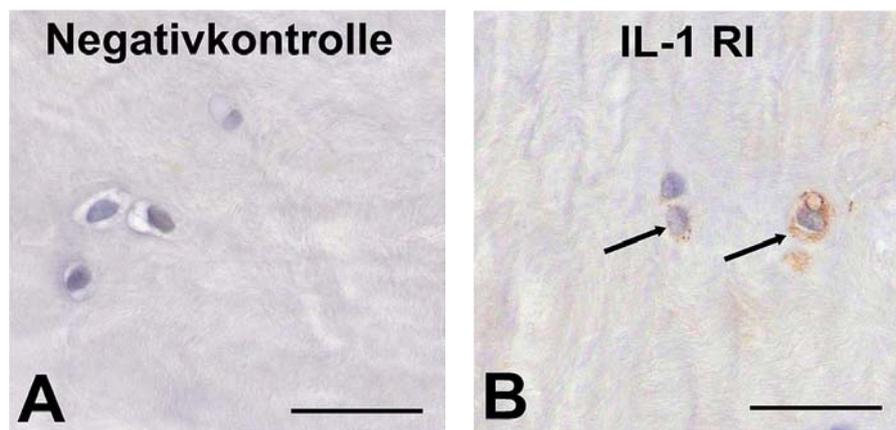


Abb. 54:
Immunhistochemischer Nachweis des IL-1 Rezeptor Typ I in humanem Meniskusgewebe. An frisch isoliertem Meniskusgewebe wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Anti-IL-1 RI durchgeführt.

(A) Negativkontrolle, bei der der Antikörper weggelassen wurde.

(B) Nachweis von IL-1 RI an Zellen im Meniskusgewebe.

3.17.2 Einfluss von IL-1 auf die GAG-Freisetzung und die Biosyntheseaktivität in humanem Meniskusgewebe

Bei der Untersuchung des Einflusses von IL-1 auf den Glykosaminoglykan(GAG)-Gehalt in den Kulturüberständen und den Explantaten sowie auf die Biosyntheseaktivität wurde humanes Meniskusgewebe verwendet, welches bei chirurgischen Eingriffen aufgrund einer vorhandenen Schädigung entfernt werden musste und somit bereits zum Teil degenerativ verändert war. Die Freisetzung an GAG aus dem humanen Meniskusgewebe wurde mit Hilfe eines DMMB-Tests durchgeführt (siehe 2.4) und die gemessenen Werte wurden auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Das mittlere Feuchtgewicht der humanen Meniskusimplantate betrug $10,5 \pm 0,7$ mg. Die Explantate wurden insgesamt 6 Tage kultiviert, wobei innerhalb dieser Zeit das Medium einmal gewechselt wurde. Die GAG-Freisetzung in der Kontrolle betrug innerhalb der ersten 3 Tage bereits $4,2 \pm 0,7$ μg GAG/mg Feuchtgewicht und war um den Faktor 2,5 höher als in den darauffolgenden Tagen. Für eine Darstellung der GAG-Freisetzung aus dem Gewebe wurde der kumulative Verlust innerhalb der gesamten Kultivierungszeit von 6 Tagen verwendet. Die Freisetzung an GAG aus dem Gewebe in das umgebende Medium lag in der unbehandelten Kontrolle bei $5,9 \pm 0,8$ μg GAG/mg Feuchtgewicht (**Abb. 55**).

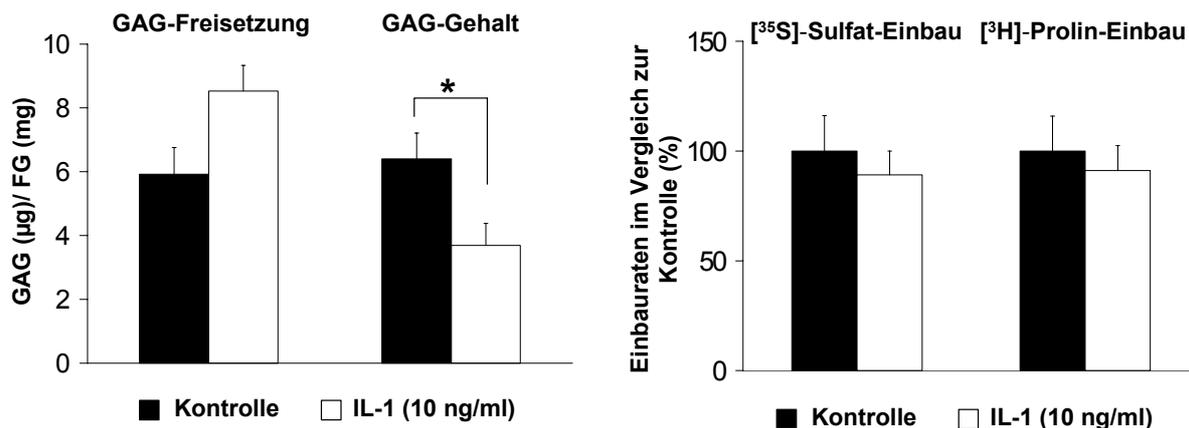


Abb. 55:

Einfluss von IL-1 auf den Glykosaminoglykan(GAG)-Verlust und die Biosyntheseaktivität von humanen Meniskusimplantaten. Explantate aus bereits teildegeneriertem Meniskusgewebe wurden 6 Tage ohne (Kontrolle) und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert. Die kumulative GAG-Freisetzung (nach 3 und 6 Tagen) und der GAG-Gehalt der Explantate wurden bestimmt (Abb. links) und die Biosyntheseaktivität durch den Einbau von radioaktivem [³⁵S]-Sulfat und [³H]-Prolin ermittelt (Abb. rechts). Die Ergebnisse wurden auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Mittelwerte + Standardfehler (GAG: n = 3-6; aus 1-2 unabhängigen Experimenten); *p < 0,05

Durch IL-1 konnte der in den Kontrollen beschriebene Verlust um 44% erhöht werden, wobei dieses Ergebnis den Versuchen am Rindergewebe entsprach, in diesem Fall aber knapp an der Signifikanzgrenze lag. Neben dieser GAG-Freisetzung aus den Explantaten konnte durch IL-1 gleichzeitig eine Verminderung des GAG-Gehaltes innerhalb des Gewebes gemessen werden. So wurde in den Kontrollexplantaten nach der 6-tägigen Kultivierung ein mittlerer GAG-Gehalt von $6,4 \pm 0,8 \mu\text{g GAG/mg Feuchtgewicht}$ gemessen, der durch IL-1 signifikant um 42% reduziert wurde.

Die Untersuchungen zur Biosyntheseaktivität zeigten, dass auch im humanen Meniskusgewebe IL-1 zu einer Reduktion der Biosyntheseaktivität führte, wobei diese Effekte nicht signifikant waren (**Abb. 55**). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde mit IL-1 ein 11% niedrigerer Sulfateinbau gemessen und der Einbau von Prolin war um 9% reduziert.

3.17.3 Einfluss von Interleukin-1 (IL-1) auf die Expression von matrixabbauenden Enzymen im humanen Meniskusgewebe

Für die weiteren Untersuchungen am humanen Meniskus wurde Meniskusgewebe von Körperspendern aus der Anatomie verwendet, welches im Vergleich zu dem zuvor verwendeten Gewebe nicht bereits makroskopisch sichtbar degenerativ verändert war. Mit Hilfe der quantitativen real time RT-PCR wurde die Wirkung von IL-1 auf die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-3, sowie der Aggrecanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 bei Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe untersucht. Die Ausbeute an Gesamt-RNA aus ca. 100 mg eingesetztem Gewebe betrug in dem bislang einzigen Experiment, das zu dieser Fragestellung durchgeführt worden wurde,

durchschnittlich 36 ng/mg aus den unstimulierten und 28 ng/mg aus den IL-1-stimulierten Explantaten.

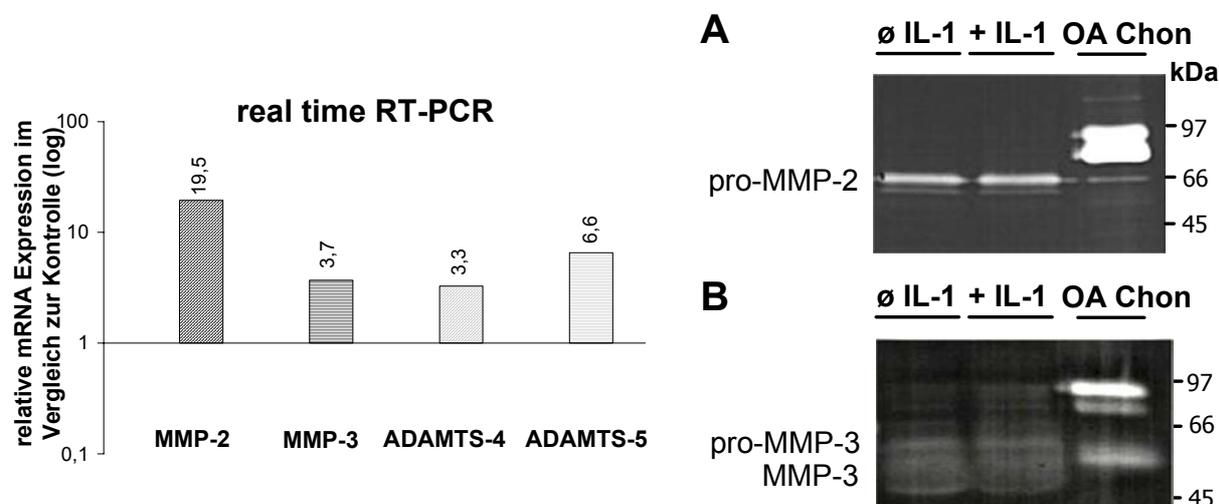


Abb. 56:

Einfluss von IL-1 auf die Genexpression von matrix-abbauenden Enzymen in humanen Meniskusexplantaten auf mRNA- (A) und Proteinebene (B,C). In einer ersten vorläufigen Untersuchung wurden humane Meniskusexplantate 3 Tage ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) kultiviert und mittels real time RT-PCR die Expression von MMP-2 und -3 sowie der Aggrekanasen ADAMTS-4 und -5 auf mRNA Ebene untersucht (linke Abb.) (logarithmische Darstellung, Kontrolle = 1)

Die konditionierten Kulturmedien wurden zum Nachweis einer proteolytischen Aktivität auf Proteinebene verwendet. Als Kontrolle zur Darstellung der proteolytischen Aktivität wurde konditioniertes Medium von osteoarthrotischen Chondrozyten (OA Chon) verwendet.

(A) Gelatine-Zymogramm mit dem Nachweis von MMP-2 (pro und aktiv).

(B) Casein-Zymogramm mit dem Nachweis von MMP-3 (pro und aktiv).

In humanen Meniskusexplantaten wurde durch IL-1 gegenüber der unstimulierten Kontrolle eine gesteigerte mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 (20-fach) und MMP-3 (3,7-fach) induziert. Weiterhin konnte eine durch IL-1 gesteigerte Expression der Aggrekanasen ADAMTS-4 (3,3-fach) und -5 (6,6-fach) nachgewiesen werden.

In den Kulturüberständen der humanen Meniskusexplantate wurde mit Hilfe von zymographischen Analysen die proteolytische Aktivität der beiden Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-3 auf Proteinebene gefunden. In dem Gelatinezymogramm war die proteolytische Aktivität von pro-MMP-2 (66 kDa) dargestellt (**Abb. 56A**). Eine Stimulation des humanen Meniskusgewebes mit IL-1 führte aber zu keiner Veränderung dieser proteolytischen Aktivität. Die schwachen Banden im Caseinzymogramm deuteten auf die proteolytische Aktivität von MMP-3 in der pro- (52 kDa) und aktiven (45 kDa) Form hin, wobei auch hier eine Stimulation mit IL-1 keine erkennbaren Unterschiede im Hinblick auf die Expression zuließ (**Abb. 56B**).

4. Diskussion

Die Menisken spielen im Kniegelenk für die normale biomechanische Gelenkfunktion eine wichtige Rolle. Die Entfernung des geschädigten Meniskus, aufgrund einer Verletzung oder Degeneration des Gewebes, kann schwerwiegende Folgen haben und nachfolgende Gelenkerkrankungen auslösen. Daher ist es wichtig, Methoden zur Behandlung und Prävention einer Schädigung des Meniskusgewebes zu entwickeln. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Vorgänge, die zu einer Degradation führen können, bekannt sind. Die traumatische Schädigung durch eine mechanische Überbeanspruchung und die degenerative Veränderung aufgrund von Verschleißerscheinungen sind zwei Faktoren, denen ein destruktives Potential zugesprochen wird. Da die Wirkmechanismen der degenerativen Destruktion durch proinflammatorische Mediatoren (z.B. Zytokine), die bei vorentzündlichen Prozessen im Gelenk freigesetzt werden, noch weitgehend unbekannt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit Studien durchgeführt, die dazu beitragen sollen, diese Vorgänge aufzuklären. Es wurde daher ein in vitro-Modell mit standardisierten Bedingungen etabliert, welches eine Entzündungssituation simulieren soll.

4.1 IL-1 als Modellschubstanz und in vitro Modelle am Meniskus

Bei entzündlichen Prozessen spielen unter in vivo Bedingungen proinflammatorische Zytokine eine wichtige Rolle. Da bei Patienten mit Gelenkerkrankungen Zytokine wie z.B. IL-1 oder TNF- α in erhöhten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden konnten und nachgewiesenermaßen an der Zerstörung des Gelenkknorpels beteiligt sind (Martel-Pelletier, 1999), wurde der Einfluss von IL-1 auf den Meniskus als eine Modellschubstanz zur Etablierung des Meniskus-Degenerationsmodells untersucht. Für die Studie wurde IL-1 α verwendet, da es eine höhere Bindungsaffinität an den signalweiterleitenden IL-1 Rezeptor (IL-1 RI) aufweist (Scapigliati et al., 1989; Arend et al., 1994). Außerdem konnte in Untersuchungen an bovinen Gewebekulturen aus dem Nasenknorpel gezeigt werden, dass durch IL-1 α gegenüber IL-1 β eine höhere Freisetzung an Glykosaminoglykanen induziert wird (Smith et al., 1989). Pattoli et al. (2005) beschreiben in ihren Untersuchungen sogar, dass bovine Gelenkknorpelimplantate zur Stimulation einer Knorpeldestruktion IL-1 α benötigen, da sie gegenüber IL-1 β unempfindlich sind. Einige wenige vergleichbare Meniskus-in vitro-Modelle wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen verwendet. Die Untersuchungen beschäftigten sich entweder mit der Zerstörung des Gewebes durch eine mechanische Überbeanspruchung (traumatische Schädigung), indem das Gewebe mechanisch auf Zug oder Druck belastet wird (Shin et al., 2003). In einigen Studien wurde aber auch die Wirkung von IL-1 auf Meniskuszellen (Cao et al., 1998; Bhargava et al., 1999) oder Gewebekulturen (Cao et al., 1998; Shin et al., 2003) untersucht.

Für die vorliegende Arbeit wurden aufgrund der einfachen Verfügbarkeit des Gewebes Menisken von Rindern verwendet. Diese sind im Vergleich zu humanen Menisken größer, enthalten aber im äußeren Bereich mehr faserartiges Gewebe (Skaggs et al., 1994).

Entscheidend ist, dass die Rindermenisken (Alter der Tiere etwa 2 Jahre) makroskopisch betrachtet nicht degenerativ verändert sind. Die Gewinnung der Meniskuszellen sowie der Explantate erfolgte aus einem Bereich, der einer stärkeren Belastung ausgesetzt ist und aufgrund einer fehlenden Blutversorgung ein geringes Heilungspotential aufweist, so dass angenommen wird, dass eine degenerative Schädigung hier ihren Ausgangspunkt hat.

4.2 Einfluss von IL-1 auf Meniskuszellen

4.2.1 Meniskuszellen unter in vitro-Kulturbedingungen

Die Zellen des Meniskus sind für die Aufrechterhaltung des Gewebes verantwortlich, können aber unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen Proteasen freisetzen, die eine Zerstörung der Grundbestandteile der extrazellulären Matrix (vor allem Proteoglykane und Kollagen) bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von IL-1 auf isolierte Zellen des Meniskusgewebes untersucht, da viele der zellbiologischen Untersuchungsmethoden nicht an dem extrazellulärmatrixreichen Meniskusgewebe durchgeführt werden können. Es gibt bereits einige Studien, die sich mit der Untersuchung von Meniskuszellen beschäftigt haben (Nakata et al., 2001; Pangborn und Athanasiou, 2005). Diese Studien erfolgten mit dem Ziel des sogenannten „Tissue engineering“, welches die Möglichkeit eines Ersatzes von beschädigtem Gewebe eröffnet. Die Meniskuszellen wurden dabei aus verschiedenen Spezies (Mensch, Kaninchen, Hund) auf unterschiedliche Art und Weise gewonnen und unter verschiedenen Kulturbedingungen gehalten (Webber et al., 1986; Tanaka et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen aufgrund der höheren Zelldichte ausschließlich aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe (welches direkt an das Tibiaplateau und die Femorkondylen angrenzte) und zudem von Rindern gewonnen. Da die Ausbeute an isolierten Zellen zu gering war, um mit einer Primärkultur arbeiten zu können, wurden für die Untersuchungen Meniskuszellen der 1. Subkultur verwendet. Die Monolayerkultur stellt gegenüber den Untersuchungen an Gewebeexplantaten einen Nachteil dar, da die Zellen auf einer flachen künstlichen Unterlage unter dem Verlust der umgebenden extrazellulären Matrix und ohne ihre normale räumliche Anordnung wachsen. Dieses führt vermutlich zu einer Dedifferenzierung, d.h. die Zellen zeigen zum Teil eine Änderung ihres morphologischen Erscheinungsbildes und verlieren ihre physiologischen Eigenschaften. Aus Untersuchungen mit Chondrozyten ist bekannt, dass diese in Kultur phänotypisch instabil sind und eine fibroblastenartige Zellform annehmen (Schnabel et al., 2002), was mit einer vermehrten mRNA Expression von Kollagen Typ I einhergeht, während die Expression von Kollagen Typ II, dem Kollagenhauptvertreter des Gelenkknorpels, sowie Aggrekan vermindert ist (Hering et al., 1994). Eine vergleichbare Veränderung könnte man auch für Meniskuszellen vermuten. Deshalb sollte durch eine kurze Kultivierungszeit der Meniskuszellen und Verwendung ausschließlich der 1. Subkultur gewährleistet werden, dass die phänotypischen Charaktereigenschaften der Zellen bewahrt bleiben.

Die Untersuchungen zur Genexpression der Matrixmoleküle zeigten, dass die Meniskuszellen unter den verwendeten in vitro Kulturbedingungen in der Lage waren Kollagen Typ I, Kollagen Typ II sowie Aggrekan auf mRNA Ebene zu exprimieren. Da im Vergleich zu Primärkulturen von humanen Meniskuszellen keine Veränderungen hinsichtlich der Expression dieser Matrixmoleküle gefunden wurden (Nakata et al., 2001), scheinen die hier verwendeten Meniskuszellen phänotypisch intakt zu sein. In den vergleichend untersuchten Cornea-Fibroblasten konnte nur die Expression von Kollagen Typ I nachgewiesen werden. Aus Untersuchungen an Chondrozyten in der Primärkultur ist bekannt, dass diese zunächst die charakteristischen Matrixmoleküle Kollagen Typ II und Aggrekan exprimieren (Willey und McDevitt et al., 1998; Nakata et al., 2001). Anhand dieser Ergebnisse könnte man schlussfolgern, dass Meniskuszellen eine Mischung von chondrozyten- und fibroblastenartigen Zellen darstellen oder auch Kollagen Typ I und II ko-exprimieren können. Jedoch wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt, die diese Annahmen eindeutig belegen könnten.

Die Meniskuszellen wurden zunächst in serumhaltigem Medium kultiviert, um optimale Bedingungen für eine schnelle Proliferation der Zellen zu gewährleisten. Für die Stimulationsversuche wurde jedoch serumfreies Medium verwendet, damit durch Bestandteile im Serum die Wirkung von IL-1 nicht beeinflusst werden konnte. Es zeigte sich, dass das verwendete Medium einen Einfluss auf die Zellmorphologie ausübte und die Zellen durch die Umstellung des Kulturmediums ihre Erscheinungsform veränderten. In serumhaltigem Medium besaßen die Zellen ein spindelförmiges Aussehen und ähnelten fibroblastenartigen Zellen. Dagegen erschienen sie in serumfreiem Medium zum Teil spindelförmig und zum Teil polygonal und die Inkubation der Zellen mit IL-1 bewirkte zusätzlich, dass die Zellen eine überwiegend polygonale Erscheinungsform annahmen. Ähnliche Beobachtungen einer Veränderung der Zellform durch die Verwendung eines serumfreien Mediums wurden bereits von Webber und Hough Jr. (1988) beschrieben. Die Ursache für die Veränderung der Zellform ist unklar.

4.2.2 IL-1-induzierte Expression von matrix-abbauenden Proteasen in Meniskuszellen

Zellen können einerseits an der Aufrechterhaltung des Gewebes beteiligt sein, andererseits eine Zerstörung der umgebenden Matrix durch die Expression und Aktivierung von verschiedenen Proteasen bedingen. In der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Gelenkerkrankungen lassen sich erhöhte Konzentration von Matrixmetalloproteinasen nachweisen (Lohmander et al., 1993a; Yoshihara et al., 2000; Struglics et al., 2006). Diese werden von den Chondrozyten des Gelenkknorpels, von Zellen der Synovialmembran (Okada et al., 1992) oder gegebenenfalls von Meniskuszellen freigesetzt. Zahlreiche in vitro Untersuchungen mit Chondrozyten des Gelenkknorpels (Lefebvre et al., 1991; Okada et al., 1992; Aida et al., 2005) sowie Synovialozyten (Tetlow et al., 1993; Ito et al., 1995) konnten belegen, dass durch IL-1 eine Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -3 und -9

induziert werden kann. Weiterhin können Chondrozyten nach einer Stimulation mit IL-1 MMP-13 exprimieren (Aida et al., 2005; Fan et al., 2005), während Synovialozyten dazu nicht in der Lage sind (Reboul et al., 1996).

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass auch Meniskuszellen Matrixmetalloproteinasen exprimieren und diese Expression durch IL-1 beeinflusst wird. So induzierte IL-1 eine gesteigerte mRNA Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13, während die Expression von MMP-1 und -2 nicht beeinflusst wurde. Auch in Chondrozyten findet sich keine IL-1-induzierte Expression von MMP-2 (Duerr et al., 2004; Fan et al., 2005), wobei die Expression möglicherweise von der Stimulationsdauer abhängig sein könnte, da bei einem längeren Inkubationszeitraum ein Anstieg der Expression von MMP-2 beschrieben wurde (Aida et al., 2005). Diese Befunde zeigen, dass sich nicht automatisch alle katalytischen Proteasen in Meniskuszellen durch IL-1 heraufregulieren lassen. Weiterhin wiesen die Meniskuszellen nach einer Stimulation mit IL-1 eine leicht erhöhte Expression von ADAMTS-5 auf. Eine IL-1-induzierte Heraufregulierung der Expression von ADAMTS-4 konnte dagegen bei Chondrozyten nachgewiesen werden (Fan et al., 2005). So kann man daraus schließen, dass Zellen aus den verschiedenen Gewebetypen im Kniegelenk neben den Matrixmetalloproteinasen auch dazu in der Lage sind als Antwort auf proinflammatorische Zytokine Aggrekanasen zu exprimieren.

Auf Proteinebene konnte in den Zelllysaten die proteolytische Aktivität von pro-MMP-3, pro-MMP-9 (aktiv) und pro-MMP-13 nachgewiesen werden. Mit IL-1 wurde die proteolytische Aktivität dieser Proteasen weiter verstärkt. Ein ähnlicher Befund fand sich auch in den Kulturüberständen der Meniskuszellen, wobei in den IL-1-behandelten Proben neben der pro-MMP-3 die aktive Form nachweisbar war.

4.2.3 Vergleich der Genexpression von isolierten Meniskuszellen und Gewebeexplantaten

Die Genexpression der isolierten Meniskuszellen war unterschiedlich zu der von Gewebeexplantaten (hierzu siehe auch Kapitel 4.3.7). So wurden in den Gewebeexplantaten die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-3 heraufreguliert, eine Expression von MMP-9 und MMP-13 war aber nicht nachweisbar. Auf Proteinebene konnte zudem in den Gewebekulturüberständen nur die proteolytische Aktivität dieser Matrixmetalloproteinasen in der pro-Form dargestellt werden. Eine unterschiedliche Expression von Matrixmetalloproteinasen in Gewebe und Zellen wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe am Beispiel des Gelenkknorpels beschrieben werden. Clegg und Carter (1999) hatten anhand von zymographischen Analysen bei isolierten Chondrozyten und synovialen Fibroblasten pro-MMP-2 gefunden und eine leichte Zunahme der proteolytischen Aktivität von pro-MMP-2 (aktiv) nach einer Stimulation mit IL-1 nachgewiesen. In den korrespondierenden Gewebekulturen wurde MMP-2 in der pro-Form gefunden und durch IL-1 ebenfalls eine Erhöhung dieser proteolytischen Aktivität hervorgerufen, wie es auch in der hier vorliegenden Arbeit am Meniskusgewebe gezeigt werden konnte. In Explantaten aus

der Synovialmembran war jedoch noch zusätzlich MMP-2 in der aktiven Form sowie MMP-9 nachweisbar (Clegg und Carter, 1999).

Bei der Suche nach Gründen für die Unterschiede zwischen Zellen und Gewebe muss zunächst festgehalten werden, dass die Meniskuszellen aus dem gleichen anatomischen Bereich stammten, aus dem auch die Gewebeexplantate hergestellt wurden. Eine mögliche Begründung der Unterschiede in der Expression der matrix-abbauenden Proteasen könnte darin liegen, dass die Zellen zuvor aus ihrer Umgebung herausgelöst wurden und so durch den Verlust der Matrix sich auf einem anderen Level der Aktivierung mit erhöhtem Turnover der Matrix befanden. Die Zellen waren damit beschäftigt, eine neue extrazelluläre Matrix zu synthetisieren. Dafür würde auch sprechen, dass die isolierten Meniskuszellen Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und Aggrekan mRNA produzierten, während in frisch isoliertem Meniskusgewebe nur die Expression von Aggrekan zu detektieren war. In einem intakten Gewebe erscheint der Gehalt an langlebigen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Kollagene, stabil, so dass daher auf mRNA Ebene keine Expression neuer Moleküle benötigt wird. Ähnliche Befunde konnten an Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel gefunden werden (Grover und Roughley, 1993). Die Zellen im Gewebeverband sind demnach auf eine geringere Turnoverrate eingestellt und reagieren daher anders auf IL-1 als die isolierten Zellen.

Weitere Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten der Stress, dem die Zellen bei der enzymatischen Isolierung in der Kollagenaselösung ausgesetzt waren sowie die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der Zellen und des Meniskusgewebes sein. Die Gewebeexplantate wurden in DMEM-Medium kultiviert, während für die Zellen Ham's F-12-Medium verwendet wurde. Dieses Medium war zunächst serumhaltig und wurde für die Stimulationsversuche durch ein serumfreies Medium ersetzt; die Gewebeproben wurden komplett serumfrei kultiviert. Dass die Zellmorphologie, Proteinsynthese und Proliferation von isolierten Zellen aus dem Meniskusgewebe in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und dem Medium variieren können ist bereits beschrieben worden (Webber und Hough, Jr., 1988; Webber et al., 1988; Webber, 1990; Nakata et al., 2001). So wäre es durchaus möglich, dass die isolierten Zellen sich schon aufgrund der Medienzusammensetzung vollkommen anders verhalten als die Zellen im intakten Gewebe.

Um jedoch trotz dieser Befunde eine Dedifferenzierung der Zellen als eine mögliche Begründung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Genexpression von Monolayer- und Gewebekultur auszuschließen, wäre es notwendig, weitere Untersuchungen an einem dreidimensionalen Kultursystem (z.B. Alginat) durchzuführen. Chondrozyten, die in Alginat kultiviert wurden, konnten ihren Phänotyp bewahren (Häuselmann et al., 1994a) und auch für humane Meniskuszellen konnte bereits beschrieben werden, dass diese unter dreidimensionalen Bedingungen fähig sind, ihren fibrochondrozytenartigen Phänotyp zu exprimieren (Collier und Gosh et al., 1995; Verdonk et al., 2005).

4.2.4 IL-1-induzierte Aktivierung des Signalweges NF- κ B in Meniskuszellen und Beeinflussung durch Antioxidantien

Proinflammatorische Zytokine können ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren an der Oberfläche ihrer Zielzellen vermitteln und mit Hilfe der Immunhistochemie wurde in dieser Arbeit die Expression von IL-1-Rezeptoren an humanem Meniskusgewebe nachgewiesen. Durch die Auslösung der Signaltransduktionskaskade von IL-1 können über Protein-Protein-Interaktionen, Konformationsänderungen und Phosphorylierungen durch Proteinkinasen verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die an die Promotorregion von verschiedenen Genen, wie z.B. proinflammatorischen Mediatoren und spezifischen Enzymen binden können und deren Transkription induzieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde im Speziellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht, da dieser bei Gelenkerkrankungen eine wichtige Rolle bei der Expression von verschiedenen inflammatorischen Genen spielt (Berenbaum, 2004). Anhand von Studien an Chondrozyten des Gelenkknorpels ist bekannt, dass eine Stimulation mit IL-1 zu einer Aktivierung dieses Transkriptionsfaktor führen kann (Largo et al., 2003; Mendes et al., 2003; Schulze-Tanzil et al., 2004, Martin et al., 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurde auch in Meniskuszellen durch IL-1 eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors vermittelt. Neben der IL-1-vermittelten Aktivierung von NF- κ B im Rahmen der Signaltransduktion kann der Transkriptionsfaktor bei Chondrozyten auch über die Wirkung von freien Sauerstoffradikalen aktiviert werden (Mendes et al., 2003). Da IL-1 wiederum die Bildung von Superoxidanionen über die Aktivierung der NADPH-Oxidase induziert (Lo et al., 1998), ist zu vermuten, dass die IL-1-abhängige Aktivierung von NF- κ B über Sauerstoffradikalbildung erfolgt. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit indirekt bestätigt werden, da durch die Zugabe eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) die IL-1-induzierte Aktivierung von NF- κ B gehemmt wurde. Somit könnten Antioxidantien möglicherweise präventiv oder therapeutisch bei Erkrankungen des Meniskus eine Rolle spielen, was im Weiteren zu prüfen ist.

4.2.5 IL-1-induzierte Genexpression von Matrixmetalloproteinasen und NF- κ B

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass bei Chondrozyten des Gelenkknorpels der Signalweg von NF- κ B unerlässlich für die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 (Mengshol et al., 2000; Elliott et al., 2002; Vincenti und Brinckerhoff, 2002), MMP-3 (Liacini et al., 2002) und MMP-13 (Mengshol et al., 2000; Liacini et al., 2002; Liacini et al., 2003; Vincenti und Brinckerhoff, 2002) ist. In Fibroblasten kann durch die Aktivierung von NF- κ B die IL-1-induzierte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 und MMP-3 (Bondeson et al., 1999; Bond et al., 1999) sowie von MMP-2 und MMP-9 reguliert werden (Xie et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-1 auch in Meniskuszellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt.

Ob die IL-1-induzierte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13 in Meniskuszellen über den Signaltransduktionsweg von NF- κ B vermittelt wird ist jedoch fraglich; die Hemmung der IL-1-bedingten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch

ein Superoxiddismutase-Mimetikum (SODm) führte nämlich nicht zu einer erwarteten Hemmung der Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13. Mit ansteigender Konzentration des SODm wurde die IL-1-induzierte mRNA Expression dieser Matrixmetalloproteinasen sogar weiterhin gesteigert. Auch auf Proteinebene konnte in den Kulturüberständen mit SODm eine Zunahme der proteolytischen Aktivität von MMP-3 (pro/aktiv) und MMP-13 (pro/intermediär) in den IL-1-behandelten Proben nachgewiesen werden. Bei der höchsten Konzentration des Superoxiddismutase-Mimetikums war im Caseinzymogramm neben MMP-13 in der intermediären Form, welche durch IL-1 zusätzlich verstärkt wurde, eine weitere Bande in den Kulturüberständen der IL-1-behandelten Zellen zu erkennen. Es könnte sich dabei um ein Fragment von MMP-13 handeln, welches noch die katalytische Domäne enthält. Matrixmetalloproteinasen werden durch die Abspaltung der Propeptid-Domäne aktiviert. Durch verschiedene Proteasen können diese weiter abgebaut werden, so dass Fragmente mit unterschiedlichen Größen daraus hervorgehen können. Solange die katalytische Domäne vorhanden und intakt ist, kann das Protein im Zymogramm sein Substrat abbauen und somit detektiert werden. Zymographische Analysen von Shen et al. (2003), in denen neben der proteolytischen Aktivität von MMP-3 in der pro- und aktiven Form weitere Banden mit einem deutlich niedrigeren Molekulargewicht zu erkennen waren und die daher postuliert hatten, dass es sich hierbei um MMP-Fragmente handeln könnte, bestätigen diese Annahme; weitere Untersuchungen müssen aber durchgeführt werden, um diese Hypothese zu belegen.

Anhand der hier ermittelten Befunde, dass durch das Superoxiddismutase-Mimetikum die Aktivierung von NF- κ B zwar gehemmt, die IL-1-induzierte Expression von MMP-3, -9 und -13 nicht vermindert sondern eher erhöht wurde, kann man vermuten, dass in Meniskuszellen die Expression der dargestellten Matrixmetalloproteinasen nicht über diesen Transkriptionsfaktor vermittelt wird; es sei denn, die IL-1-bedingte Proteasenaktivierung erfolgte über NF- κ B, durch das SODm wurde jedoch dieser Weg ausgeschaltet und dafür ein anderer, noch potenterer Aktivierungsweg induziert.

Es gibt Meniskus-unabhängige Arbeiten, die zeigen, dass Antioxidantien eine unterschiedliche Wirkung auf die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 haben können (Meyer et al., 1993; Schenk et al., 1994). So konnte von Meyer et al. (1993) gezeigt werden, dass die durch H_2O_2 -induzierte Aktivierung von NF- κ B bei Zelllinien durch Antioxidantien gehemmt werden konnte, die Aktivierung von AP-1 jedoch heraufreguliert wurde. Über die Superoxiddismutase (SOD) werden Superoxidanionen (O_2^-) zu H_2O_2 und O_2 umwandelt. Da das dabei entstandene H_2O_2 selbst oxidativen Stress verursachen kann, muss es durch Enzyme wie die Katalase und die Glutathionperoxidase weiter zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden. So wäre es durchaus möglich, dass durch die exogene Zugabe des Superoxiddismutase-Mimetikums vermehrt H_2O_2 gebildet wird und dieses zur Aktivierung eines Signaltransduktionsweges führt, der die erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen bedingt. Untersuchungen von Ranganathan et al. (2001) könnten die Hypothese belegen, da über die vermehrte Bildung von H_2O_2 durch Mn-SOD der Signaltransduktionsweg ERK1/2 aktiviert wird und dieser eine erhöhte Expression von

MMP-1 induziert. Die Veränderung der SOD-Aktivität könnte von den Zellen als ein Signalmechanismus zur Expression von Matrixmetalloproteinasen gedeutet werden. Da jedoch von dem hier verwendeten Superoxiddismutase-Mimetikum bekannt ist, das es neben dem Wegfangen von Superoxidanionen auch die Fähigkeit besitzt, davon abgeleitete Moleküle wie das H_2O_2 zu eliminieren (Dwyer et al., 1998) scheidet diese Möglichkeit als Begründung für die erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen aus.

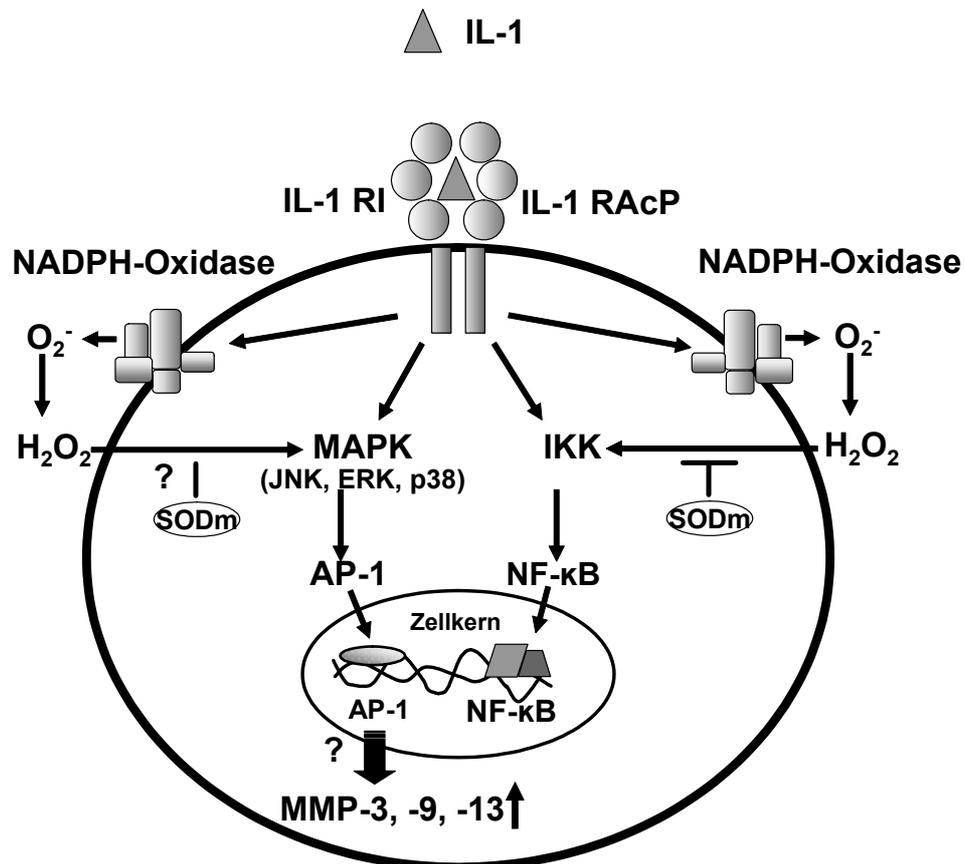


Abb.: 57

Vereinfachtes Schema zur Darstellung der möglichen IL-1-vermittelten Signaltransduktionswege in Meniskuszellen. Die IL-1-induzierte Aktivierung von NF- κ B kann durch die Zugabe eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) gehemmt werden. Da trotz der Hemmung von NF- κ B IL-1 eine erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13 induziert, scheint NF- κ B nicht für die IL-1-abhängige Induktion dieser MMPs verantwortlich zu sein. Andere Signaltransduktionswege, wie z.B. über AP-1, wären denkbar. Abkürzungen: IL-1 (Interleukin-1), IL-1 R I (Interleukin-1 Rezeptor Typ I), IL-1 RAcP (IL-1 Rezeptor-assoziiertes Protein), MAPK („mitogen activated protein“-Kinase), JNK („c-Jun N-terminal kinase“), ERK („extrazellular signal regulated kinase“), AP-1 („activator protein-1“), NF- κ B („Nuclear factor kappa B“).

Neben dem Signaltransduktionsweg von NF- κ B kann die IL-1-induzierte Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen auch über MAP-Kinasen (JNK („c-Jun N-terminal kinase“), ERK („extrazellular signal regulated kinase“), p38) durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 reguliert werden (**Abb. 57**) (Mengshol et al., 2000; Mengshol et al., 2001). Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte daher sein zu klären, welcher IL-1-abhängige Signaltransduktionsweg in den Meniskuszellen die Expression der hier gefundenen Matrixmetalloproteinasen induziert. Des Weiteren muss geklärt werden, ob IL-1

auch im Gewebe eine Aktivierung von NF- κ B induziert und somit die Befunde der Zellstudien auf das Gewebe übertragbar sind.

4.3 Einfluss von IL-1 auf Meniskusgewebe

4.3.1 Nachweis von Kollagen Typ I und II im Meniskusgewebe anhand von immunhistochemischen Färbungen und Genexpression von Matrixmolekülen

In immunhistochemischen Färbungen konnten innerhalb des Meniskusgewebes Kollagen Typ I und II nachgewiesen werden. Auf mRNA Ebene war in frisch isolierten Meniskusimplantaten jedoch nur Aggrecan detektierbar. Diese Befunde korrelieren mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die auf mRNA Ebene ebenfalls keine Expression der Matrixmoleküle Kollagen Typ I und Kollagen Typ II nachweisen konnten (Bland und Ashhurst, 1996; Wildey und McDevitt, 1998). Während der postnatalen Entwicklung lässt sich in Abhängigkeit des Alters im Meniskus eine veränderte Genexpression der Matrixmoleküle auf mRNA Ebene nachweisen (Bland und Ashhurst, 1996; Hellio Le Graverand et al., 1999). Bland und Ashhurst (1996) konnten zeigen, dass in den Menisken von Kaninchen bis zum 8. Lebensmonat Kollagen Typ I und II auf mRNA Ebene exprimiert werden, während bei älteren Tiere (2 Jahre) keine Expression dieser Kollagene mehr ermittelt werden konnte. Die hier verwendeten Menisken stammen von Rindern, die bis zu 2 Jahre alt waren. Daher ist anzunehmen, dass das Gewebe als ausgereift gilt, somit einen stabilen Kollagengehalt aufweist und keine weitere Expression benötigt wird. Proteoglykane werden im gesunden Gewebe ständig auf- und abgebaut und besitzen eine kurze metabolische Turnoverrate. Um einen stabilen Gehalt an Aggrecan zu erhalten ist daher eine ständige Expression notwendig. Im Vergleich dazu sind die im intakten Meniskusgewebe vorkommenden Kollagene relativ stabile Strukturen mit einer geringen und langsamen Umsatzrate. Daher benötigen sie möglicherweise, wenn sie einmal gebildet wurden, keine hohe Transkription und Translation zur Aufrechterhaltung der Matrixintegrität.

4.3.2 Einfluss von IL-1 auf die GAG-Freisetzung

Da die Turnoverrate der Proteoglykane im Meniskus höher ist als die für Kollagene und in Studien am Gelenkknorpel deutlich wurde, dass Proteoglykane an der durch IL-1-induzierten Matrixzerstörung wesentlich beteiligt sind (Kozaci et al., 1997; Pratta et al., 2003b), wurde in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt zunächst auf den Abbau von Proteoglykanen gelegt. Durch die hierbei verwendete Konzentration von IL-1 (10 ng/ml) sowie die serumfreien Kulturbedingungen sollte innerhalb kürzester Zeit eine messbare Zerstörung des Gewebes induziert werden. Bei entzündlichen Prozessen werden normalerweise geringere Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen freigesetzt (Westacott et al., 1990;

Schlaak et al., 1996), so dass sich eine degenerative Zerstörung des Knorpelgewebes über mehrere Jahre hinziehen kann.

Bereits in den unstimulierten Kontrollgruppen konnte eine Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe gemessen werden. Durch das Herauspräparieren der Explantate wird das Grundgerüst des Gewebes zum Teil zerstört, so dass die Glykosaminoglykane durch einen Verlust der Verankerung innerhalb des Gewebes in das Medium vermutlich leichter abdiffundieren können. Eine Stimulation des Meniskusgewebes mit IL-1 führte, als Zeichen einer Gewebedestruktion, zu einer erhöhten Freisetzung an Glykosaminoglykanen. Gleichzeitig konnte innerhalb des Gewebes eine Abnahme des GAG-Gehaltes beobachtet werden. Diese Ergebnisse einer IL-1-induzierten Freisetzung an GAGs aus dem Rindermeniskusgewebe stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen, die an Menisken von Schweinen (Shin et al., 2003) oder von Hasen durchgeführt wurden (Cao et al., 1998).

In ersten Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass auch in humanem Meniskusgewebe durch IL-1 eine Schädigung des Gewebes mit einer erhöhten Freisetzung von Proteoglykanen induziert werden kann. So kann man schlussfolgern, dass das hier verwendete in vitro-Modell prinzipiell auch auf das humane System übertragbar ist. Der IL-1-vermittelte GAG-Verlust aus dem humanen Gewebe fiel gegenüber den Untersuchungen am bovinen Meniskusgewebe etwas geringer aus. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass aufgrund einer permanenten Stimulation durch proinflammatorische Zytokine im Gelenk das Gewebe bereits vorstimuliert war. Aus Untersuchungen an humanen Chondrozyten ist bekannt, dass Zellen aus OA-verändertem Gelenkknorpelgewebe im Vergleich zu normalen Zellen weniger stark auf eine Stimulation durch IL-1 reagieren (Fan et al., 2005).

4.3.3 Einfluss von IL-1 auf die biomechanischen Eigenschaften

Anhand der Messung der biomechanischen Eigenschaften wurde deutlich, dass in Meniskusimplantaten, die mit IL-1 stimuliert wurden, gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei Kompression ein niedrigerer Gegendruck aufgebaut wird. Da (abgeleitet von Studien am Gelenkknorpel) die Fähigkeit des Gewebes, einen Gegendruck aufzubauen, vom Glykosaminoglykangehalt sowie der Integrität des Kollagennetzwerkes abhängig ist, kann die Abnahme des Gegendruckes als ein Ausdruck der Zerstörung der extrazellulären Matrix gedeutet werden (Patwari et al., 2000). Durch die erhöhte Freisetzung der Glykosaminoglykane nimmt die Fähigkeit des Gewebes, einen hydrostatischen Druck aufzubauen, ab. Das Gewebe wird weicher und verliert seine Funktionseigenschaft als Stoßdämpfer.

4.3.4 Einfluss von IL-1 auf die Biosyntheseaktivität und Apoptoserate

Der verminderte Einbau von radioaktivem [³⁵S]-Sulfat und [³H]-Prolin durch IL-1 spiegelte eine reduzierte Proteoglykan- und Kollagensynthese des Gewebes wider. Auch auf mRNA Ebene konnte gezeigt werden, dass die Expression von Aggrekan durch IL-1 vermindert wurde. Die Ergebnisse der reduzierten Proteoglykansyntheseaktivität korrelieren mit den Untersuchungen von Cao et al. (1988), die ebenfalls einen reduzierten Sulfateinbau nach einer IL-1-Stimulation an Hasenmenisken messen konnten. Jedoch gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass in den Gewebeexplantaten von Schweinemenisken durch IL-1 eine erhöhte Einbaurate von Sulfat erfolgt (Shin et al., 2003). Diese unterschiedlichen Wirkungen von IL-1 auf die Biosyntheseleistung könnten dadurch erklärt werden, dass die Meniskusexplantate bei der Untersuchung von Shin et al. (2003) nur 24 h mit IL-1 in einer Konzentration von 0,1 ng/ml inkubiert wurden. Obwohl es wie in den vorliegenden Untersuchungen auch zu einer erhöhten Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe kam, wird die erhöhte Proteoglykansynthese der Zellen von den Autoren als eine Art Reparaturmechanismus gedeutet. Ansonsten können auch Speziesunterschiede für die gegenläufigen Effekte verantwortlich sein.

Um festzustellen, ob die reduzierte Biosyntheseleistung des Gewebes durch eine Abnahme der Zellvitalität erklärt werden kann, wurde untersucht, ob die Zellen im Gewebe apoptotische Veränderungen aufweisen. Es zeigte sich, dass nur eine leichte, jedoch nicht signifikante Steigerung der Apoptoserate durch IL-1 induziert wird, so dass die Abnahme der Biosyntheseleistung des Gewebes vermutlich nicht mit einer Abnahme der Zellvitalität korreliert. Auch an Gelenkknorpelzellen konnte durch eine Inkubation mit IL-1 keine Apoptose induziert werden (Blanco et al., 1995).

4.3.5 Einfluss von IL-1 auf die NO-Produktion

Ein weiterer Befund der Wirkung von IL-1 war eine gesteigerte Produktion von Stickoxid (NO). Nur innerhalb der ersten drei Tage konnte durch IL-1 eine erhöhte Synthese von NO gemessen werden, während eine weitere Kultivierung keine gegenüber der Kontrolle erhöhte Nitritansammlung im Medium aufwies. Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass NO in erhöhten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Gelenkerkrankungen vorkommt (Farrell et al., 1992; Haklar et al., 2002; Karan et al., 2003) und dass sowohl die Chondrozyten des Gelenkknorpels (Stadler et al., 1991) als auch Fibroblasten der Synovialmembran (Stefanovic-Racic et al., 1994) an der Produktion beteiligt sind. Auch Zellen des Meniskusgewebes können als Antwort auf IL-1 Stickoxid produzieren (Cao et al., 1998, Hashimoto et al., 1999; LeGrand et al., 2001; Shin et al., 2003) und die vorliegenden Daten bestätigen diesen Befund am Rindermeniskus. Murrell et al. (1996) fanden dagegen, dass durch IL-1 weder bei isolierten Meniskuszellen noch in Meniskusexplantaten aus dem bovinen und humanen Gewebe eine Synthese von NO erfolgt. Möglicherweise könnten diese unterschiedlichen Ergebnisse dadurch erklärt werden,

dass bei den Untersuchungen von Murrell et al. (1996) Meniskusgewebe von jungen Kälbern verwendet wurde und die kurze Stimulationszeit von 24 h nicht ausreichte, um messbare Mengen von Stickoxid zu erhalten. Eine Abnahme der spontanen NO-Produktion nach einer Kultivierungszeit von 48 h konnte auch von Fink et al. (2001) in Explantaten aus Schweinemenisken, unabhängig von einer Stimulation mit IL-1, beobachtet werden.

Neben Menisken von Rindern aus ökologischer Tierhaltung wurden in den hier beschriebenen Untersuchungen auch Menisken von Schlachtrindern aus der herkömmlichen Tierhaltung (Norddeutsche Fleischzentrale GmbH, Bad Bramstedt) verwendet. Dabei fiel auf, dass sich im Hinblick auf die GAG-Freisetzung und NO-Produktion deutliche tierhaltungsspezifische Unterschiede zeigten. Bereits nach einer Kultivierungszeit von drei Tagen wurde bei den Tieren aus der herkömmlichen Haltung eine höhere Freisetzung an Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe sowie eine deutlich höhere Basisproduktion von NO gemessen. Die Ernährung der Tiere (gegebenenfalls medikamentöse Behandlung) sowie die Bewegungsfreiheit bei der Haltung könnten als eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse herangezogen werden.

4.3.6 Vergleich der IL-1 Effekte am Meniskus- und Gelenkknorpelgewebe

Untersuchungen an Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel zeigten, dass durch IL-1 im Vergleich zum Meniskusgewebe die Effekte stärker ausfallen. So wurde eine höhere GAG-Freisetzung durch IL-1 induziert, die Biosyntheseaktivität stärker gehemmt und von den Zellen des Gewebes mehr und länger Stickoxid als Antwort auf IL-1 gebildet. Bei Gewebeexplantaten vom Gelenkknorpel lässt sich neben einer stärkeren IL-1-induzierten Produktion von Stickoxid innerhalb der ersten drei Tage auch während der weiteren Kultivierung noch eine IL-1-induzierte Synthese nachweisen. Eine höhere Produktion von Stickoxid bei Gelenkknorpel-explantaten im Vergleich zum Meniskus als Antwort auf IL-1 wurde bereits auch von Hashimoto et al. (1999) beschrieben. Die Ursache für die Gewebe-abhängigen Unterschiede ist unklar. Da über Stickoxid (NO) eine Vielzahl von Wirkungen vermittelt werden kann, ist anzunehmen, dass einige der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte auf einer verstärkten Synthese von NO beruhen könnten, was in weiterführenden Untersuchungen zu klären wäre.

Der Meniskus weist gegenüber dem Gelenkknorpel eine geringere Zelldichte sowie einen niedrigeren Gehalt an Proteoglykanen auf (Adams und Muir, 1981), was auch in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Die höhere Zellzahl ist vermutlich ein Grund für die stärkere Ansprechbarkeit des Knorpels für IL-1 sein. Eine andere Erklärung wäre, dass die Zellen des Gelenkknorpelgewebes anders auf IL-1 reagieren als die Zellen des Meniskus, weil es sich um verschiedene Zellpopulationen handelt. Weitere Details zum Vergleich von Meniskus und Gelenkknorpelgewebe sind zudem in den anderen Kapiteln mit diskutiert.

4.3.7 Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Proteasen

Über die Wirkung von IL-1 können die Zellen des Meniskusgewebes dazu angeregt werden, bestimmte Enzyme freizusetzen, die die umgebende Matrix (vor allem Proteoglykane und Kollagen) zerstören: Die durch IL-1 erhöhte Freisetzung der Glykosaminoglykane könnte als eine Folge der Zerstörung der Bestandteile der Extrazellulärmatrix durch matrix-abbauende Proteasen angesehen werden. Erhöhte Konzentrationen von MMPs lassen sich bei Tiermodellen mit OA (Pelletier et al., 1993), in humanem OA Knorpel (Billinghurst et al., 1997) sowie in der Synovialflüssigkeit von OA Patienten (Lohmander et al., 1993a) nachweisen und es ist bislang unklar inwieweit das Meniskusgewebe an der Bildung dieser Enzyme beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnten auf mRNA Ebene in frisch isoliertem Gewebe von Rindern eine Grundexpression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2 und -3 nachgewiesen werden. Mit IL-1 wurde quantitativ eine Steigerung dieser Proteasen induziert, wobei MMP-3 am stärksten heraufreguliert wurde. Zu keinem Zeitpunkt der Versuchsdurchführungen wurde im Meniskusgewebe die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-9 und -13 gefunden. In normalen Menisken von Kaninchen konnten demgegenüber auf mRNA Ebene die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -3 und auch -13 nachgewiesen werden, deren Expression in einem experimentell induzierten OA-Modell, bei dem die Kreuzbänder durchtrennt wurden, zusätzlich erhöht war (Bluteau et al., 2001). Somit scheint die Expression von mRNA verschiedener MMPs speziesspezifisch zu sein.

Auf Proteinebene konnte in den Kulturüberständen der Meniskusimplantate nur die latente Form von MMP-2 und MMP-3 nachgewiesen werden, wobei diese proteolytische Aktivität mit IL-1 leicht beziehungsweise bei MMP-3 stark gesteigert war. Ähnliche Befunde einer leichten Zunahme von pro-MMP-2 nach einer Stimulation mit IL-1 konnten auch bei normalem Gelenkknorpelgewebe gemacht werden (Clegg und Carter, 1999). Im Meniskusgewebe von Patienten mit OA lassen sich die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 (pro und aktiv) und MMP-9 (pro) nachweisen (Chu et al., 2004; Hsieh et al., 2004). Eine Stimulation dieses degenerativ veränderten Meniskusgewebes mit IL-1 führt zu einer leichten Verstärkung von aktivem MMP-2 (Chu et al., 2004). Die kurze Kultivierungszeit von drei Tagen könnte möglicherweise dafür verantwortlich sein, dass in der vorliegenden Studie zunächst nur die pro-Formen dieser Matrixmetalloproteinasen in den Kulturüberständen gefunden werden. Arner et al. (1999) zeigten am Gelenkknorpel, dass in den Kulturüberständen durch IL-1 innerhalb der ersten Tage zunächst die proteolytische Aktivität von pro-MMP-3 und pro-MMP-9 nachweisbar war und erst während der weiteren Kultivierung (> 8 Tagen) auch die aktiven Formen detektierbar wurden. Das schließt aber nicht aus, dass aktive Enzyme bereits innerhalb des Gewebes vorhanden sein könnten (Arner et al., 1999); dieses wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Somit ist nicht endgültig geklärt ob MMP-2 und MMP-3 direkt an dem IL-1-bedingten Abbau der Meniskusmatrix beteiligt sind.

Überträgt man die *in vitro*-Befunde auf die *in vivo*-Situation, könnte den durch IL-induzierten pro-Formen von MMP-2 und MMP-3 mehr Bedeutung zukommen. Es wäre denkbar, dass die pro-Formen der Enzyme durch IL-1 induziert werden und dass *in vivo*-Aktivatoren der pro-Enzyme aus anderen Geweben des Gelenkes über die Synovia die pro-Formen aktivieren. So könnten diese Enzyme an der Destruktion von Geweben im Gelenk mit beteiligt sein. Dies kann aber nicht den IL-1-abhängigen GAG-Verlust in den *in vitro*-Studien erklären.

In einer ersten vorläufigen Untersuchung konnte bei humanen Explantaten auf mRNA Ebene mit IL-1 eine stärkere Expression von MMP-2 induziert werden als bei den bovinen Meniskusexplantaten, während die Expression von MMP-3 durch IL-1 nur leicht gesteigert war. Auf Proteinebene war in den Kulturüberständen wie bereits auch bei den Explantaten aus dem bovinen Meniskusgewebe pro-MMP-2 und pro-MMP-3 ermittelt werden, jedoch ließ sich keine Zunahme dieser proteolytische Aktivität nach einer Stimulation mit IL-1 erkennen. Ein weiterer Unterschied zu den Untersuchungen am bovinen Gewebe bestand darin, dass in den Überständen unabhängig von IL-1 MMP-3 in der aktiven Form nachgewiesen werden konnte.

4.4 Spaltung von Aggrekan durch die Wirkung von matrix-abbauenden Proteasen im Meniskusgewebe

Um zu klären, ob die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung durch die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen vermittelt wird, wurde neben der Detektion der mRNA der MMPs in Western Blot-Analysen die Struktur des Kernproteins von Aggrekan näher untersucht. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, kann das Proteoglykan Aggrekan durch die Wirkung von verschiedenen Proteasen innerhalb der IGD, sowie an weiteren Stellen zwischen der G2- und G3-Domäne gespalten werden und eine Freisetzung von Aggrekan-Fragmenten mit GAG-tragenden Seitenketten aus dem Gewebe bedingen (Fosang et al., 1991; Ilic et al., 2000; Tortorella et al., 2000b).

Im Meniskusgewebe als auch im Kulturmedium konnte eine Vielzahl von Aggrekan-Fragmenten nachgewiesen werden. Die dargestellten Aggrekan-Fragmente wurden nach der Nomenklatur von Sandy und Verscharen (2001) benannt. Diese hatten beschrieben, dass die Aggrekan-Fragmente 1, 6, 12 und 13 vermutlich durch eine Aggrekanase-Aktivität entstehen, während die Aggrekan-Fragmente *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, und *i* möglicherweise durch die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen oder anderen Proteasen freigesetzt werden (Sandy und Verscharen, 2001). Qualitativ konnte durch IL-1 kein verändertes Spaltmuster der G1-tragenden Aggrekan-Fragmente 1, *a*, *b*, *c*, *d*, 6 und *e* nachgewiesen werden. Diese Fragmente waren bereits in frisch isoliertem Gewebe nachweisbar und könnten einerseits artifiziell bei der Herstellung der Meniskusexplantate entstanden sein (die Menisken werden ca. 24 h nach Tötung der Tiere entnommen) oder andererseits im Rahmen des normalen „Turnovers“ von Aggrekan im Meniskusgewebe gebildet werden und somit schon im nicht

pathologisch veränderten Meniskusgewebe eine wichtige Rolle spielen. Im Gelenkknorpel liegt Aggrecan in gesundem Gewebe vornehmlich in voller Länge vor, so dass hier gewebespezifische Unterschiede erkennbar sind. Aggrecan ist eine dynamische Komponente der Extrazellulärmatrix, die im gesunden Gelenkknorpelgewebe ständig auf- und abgebaut wird, so dass die Struktur variabel ist (Roughley und Lee, 1994).

In Untersuchungen am Gelenkknorpel konnten in Gewebeexplantaten nach Stimulation mit IL-1 ähnliche Fragmente von Aggrecan nachgewiesen werden (Patwari et al., 2000; Sandy und Verscharen, 2001; Patwari et al., 2005) wie hier im Meniskus bereits in unbehandeltem Gewebe. Diese in frischem Gewebe hohe Fragmentierung von Aggrecan lässt eine hohe passive Diffusion aus der Matrix vermuten. Diese Hypothese wird durch die Messungen zur GAG-Freisetzung aus dem Gewebe gestützt: Im Meniskusgewebe wurde nach einer Kultivierungszeit von 6 Tagen ein Basisverlust von 30,7% des ursprünglichen GAG-Gehaltes gemessen (was durch die stärkere Fragmentierung erklärbar sein könnte), während im Gelenkknorpel nur 10% des ursprünglichen Gehaltes aus dem Gewebe freigesetzt wurden. Diese Ergebnisse könnten aber auch darin begründet sein, dass Aggrecan im Meniskus möglicherweise weniger stark verankert ist als im Gelenkknorpel und daher leichter und schneller aus dem Gewebe hinaus diffundieren kann, ohne dass ein pathologischer Mechanismus im Gewebe vorliegt; dieses müsste im Weiteren untersucht werden. Durch IL-1 wurde aber im Gelenkknorpel eine im Verhältnis zum Gesamtgehalt höhere GAG-Freisetzung aus dem Gewebe induziert als im Meniskus, die durch die vermehrte Spaltung und damit verbundene Zerstörung des Aggrecans bedingt sein könnte.

Der Meniskus weist gegenüber dem Gelenkknorpel eine geringere Zelldichte sowie einen niedrigeren Gehalt an Proteoglykanen auf (Adams und Muir, 1981). Möglicherweise werden im Gelenkknorpelgewebe mehr Zellen dazu angeregt, proteolytische Enzyme freizusetzen, die die Spaltung des Aggrecans bedingen, so dass es daher zu einer erhöhten Freisetzung von Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe kommt. Andererseits könnten im Gelenkknorpel andere Proteasen als im Meniskus heraufreguliert werden, die eine effektivere Zerstörung des Aggrecans erzeugen. So konnte von Patwari et al. (2000) eine Zunahme der Aggrecanase-generierten Fragmente, die durch eine Spaltung an der Stelle Ala³⁷³ entstanden sind, beschrieben werden, während in der hier vorliegenden Arbeit keine Unterschiede ausgemacht werden konnten.

4.4.1 Spaltung durch Matrixmetalloproteinasen

Durch die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13 und MT1-MMP kann Aggrecan an der Aminosäureposition Asn³⁴¹-Phe³⁴² gespalten werden, so dass Fragmente mit der Endigung -VDIPES entstehen (Fosang et al., 1991; Flannery et al., 1992; Fosang et al., 1993; Fosang et al., 1994; Fosang et al., 1994; Fosang et al., 1996; Fosang et al., 1998; Imai et al., 1997b). In der hier vorliegenden Arbeit lassen sich im Meniskusgewebe Fragmente von Aggrecan nachweisen, die durch die Spaltung an dieser MMP-spezifischen

Stelle hervorgegangen sind (Fragment e). Da diese Fragmente aber bereits in frisch isoliertem Gewebe unabhängig von der Wirkung von IL-1 gefunden wurden ist anzunehmen, dass Aggrekan an dieser Stelle vermutlich im Rahmen des normalen Turnovers gespalten worden ist und somit keine zusätzliche zerstörerische Wirkung durch IL-1 vorliegt.

4.4.2 Spaltung durch Aggrekanasen

Dass auch Aggrekanasen an der IL-1-abhängigen Spaltung von Aggrekan mit beteiligt sein können, lässt sich anhand einiger Daten der Western Blot-Analysen schlussfolgern: Mit dem kombinierten Antikörper Anti-TFKEEE/TAGELE, konnten im Kulturmedium nach einer Stimulation mit IL-1 die Aggrekan-Fragmente 12, 13 und *i* nachgewiesen werden. Die beiden Fragmente 12 und 13 sind am C-terminalen Ende durch eine proteolytische Spaltung im Bereich der GAG-tragenden Seitenketten zwischen der G2- und G3-Domäne an der Aminosäureposition Glu¹⁴⁸⁰ und Glu¹⁶⁶⁷ entstanden. Diese Stellen sind in der Literatur als Spaltstellen von Aggrekanasen beschrieben worden (Ilic et al., 2000; Tortorella et al., 2000b). Am N-terminalen Ende erfolgte die proteolytische Spaltung der Fragmente innerhalb der IGD an der Stelle Glu³⁷⁴. Da die Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ ebenfalls als eine Aggrekanase-Angriffsstelle bekannt ist (Sandy et al., 1991), sind die hier dargestellten Aggrekan-Fragmente 12 und 13 vermutlich durch eine Aggrekanase-Aktivität vermittelt worden.

Die Aggrekanasen ADAMTS-4 und -5 werden für die Spaltung innerhalb der IGD an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ sowie, mit einer stärkeren Intensität, an vier weiteren Stellen innerhalb der CS-reichen Region zwischen der G2- und G3-Domäne verantwortlich gemacht (Tortorella et al., 2000b; Tortorella et al., 2002; Westling et al., 2002). Eine erste vorläufige Untersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit, in der der Einfluss von IL-1 auf die Expression von ADAMTS-5 auf mRNA Ebene in den Rindermeniskusexplantaten untersucht wurde, konnte keine Hinweise über eine Beteiligung dieser Aggrekanase liefern, da die ADAMTS-5 mRNA durch IL-1 nicht vermehrt worden war. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Expression von Aggrekanasen im Meniskusgewebe beschäftigt haben. In pathologisch verändertem Meniskusgewebe kann auf mRNA Ebene ADAMTS-4 (Ito et al., 2000) nachgewiesen werden. Diese Aggrekanase wurde aber in der vorliegenden Studie nur am humanen Meniskusgewebe in einem einzigen Versuch untersucht, der aber den Befund von Ito et al. (2000) stützt. Bluteau et al. (2001) haben in normalem Meniskusgewebe von Kaninchen neben ADAMTS-4 auch ADAMTS-5 gefunden, so dass beide Aggrekanasen wie auch beim Gelenkknorpel eine Rolle bei der Zerstörung des Gewebes spielen könnten.

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben über die Wirkung von IL-1 auf die Expression von Aggrekanasen, meist aus Untersuchungen am Gelenkknorpel. So beschreiben Flannery et al. (1999), dass eine Stimulation von Gewebeexplantaten aus dem humanen Gelenkknorpel zu einer erhöhten Aggrekanase-Aktivität führte, auf mRNA Ebene jedoch kein Effekt auf die Expression der Aggrekanasen ADAMTS-1, -4 und -5 beobachtet werden konnte. Für ADAMTS-5 wurde bereits in einigen Untersuchungen gezeigt, dass IL-1

nur einen geringen oder keinen Einfluss auf die mRNA Expression hat (Tortorella et al., 2001), während andere wiederum eine gesteigerte Expression nachweisen können (Little et al., 2002; Pattoli et al., 2005). IL-1 erhöht zum Beispiel in bovinen Gelenkknorpelimplantaten (Tortorella et al., 2001) und Chondrozyten (Arai et al., 2004) die Expression von ADAMTS-4. Aufgrund dieser unterschiedlichen Befunde ist anzunehmen, dass sich die durch IL-1-veränderte Aktivität von Aggrekanasen nicht oder nicht nur auf mRNA Ebene erklären lässt, sondern auch durch weitere Mechanismen reguliert wird. Patwari et al. (2005) hatten beschrieben, dass die IL-1-bedingte Spaltung von Aggrekan an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ aufgrund einer Aggrekanase-Aktivität nicht von einer deutlichen Veränderung der Expression von ADAMTS-4 begleitet ist. Daher hatten sie postuliert, dass die Spaltung durch bereits existierende Aggrekanasen vermittelt werden muss. Dieser Pool von nicht aktiven Aggrekanasen könnte dann z.B. durch die Wirkung von membran-gebundenen Matrixmetalloproteinasen aktiviert werden, so dass IL-1 nicht die Menge der Aggrekanasen sondern deren Aktivierung reguliert. Es ist bekannt, dass ADAMTS-4 Aggrekan zunächst bevorzugt an den Stellen Glu¹⁶⁶⁷-Gly¹⁶⁶⁸ und Glu¹⁴⁸⁰-Glu¹⁴⁸¹ spaltet und erst danach innerhalb der IGD an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ (Tortorella et al., 2000b). Ein Grund dafür ist, dass es verschiedene Isoformen von ADAMTS-4 gibt, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten an die Glykosaminoglykane und Enzymaktivitäten aufweisen. Die zunächst durch Proprotein-Convertasen vermittelte intrazelluläre Abspaltung der Propeptid-Domäne von ADAMTS-4 in seiner Gesamtlänge bildet die Form p68, die in Assoziation mit MT4-MMP an der Zelloberfläche präsentiert wird, und nach einer weiteren C-terminalen Verkürzung die beiden Formen p53 und p40 hervorbringt. ADAMTS-4 in der Form p68 vermittelt die Spaltung von Aggrekan an der Stelle Glu¹⁴⁸⁰-Gly¹⁴⁸¹ und besitzt an der Stelle Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ eine geringere Aggrekanase-Aktivität (Gao et al., 2002; Kashiwagi et al., 2004). Ähnliche Befunde der Substratspezifität in Abhängigkeit von der Form wurden bereits auch für ADAMTS-1 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000) und ADAMTS-5 (Zeng et al., 2006) beschrieben.

Im normalen Gelenkknorpel können die Aggrekanasen ADAMTS-1, -4 und -5 nachgewiesen werden (Flannery et al., 1999; Bayliss et al., 2001), so dass vermutet wird, dass diese an der Spaltung von Aggrekan beteiligt sind. Patienten mit Gelenkerkrankungen weisen erhöhte Konzentrationen von ADAMTS-5 in der Synovialflüssigkeit auf (Vankemmelbeke et al., 2001). Da ADAMTS-5-Knock-out Mäuse bei einer experimentell induzierten inflammatorischen Arthritis vor einem Aggrekan-Verlust sowie einem Abbau des Gelenkknorpels geschützt sind (Stanton et al., 2005), während bei ADAMTS-4-Mutanten Aggrekan weiterhin gespalten werden kann (Glasson et al., 2004), wird vermutet, dass diese Aggrekanase zumindest bei Mäusen, an der Zerstörung des Aggrekans beteiligt ist. Auch die Aggrekanase ADAMTS-1 kann eine Spaltung von Aggrekan bedingen (Kuno et al., 2000; Rodriguez-Manzaneque et al., 2002). ADAMTS-1 spaltet Aggrekan innerhalb der CS-reichen Region an der Stelle KEEE¹⁶⁶⁷-GLGSV¹⁶⁶⁸ sowie an der Stelle TISQE¹⁸⁷¹-LGQRP¹⁸⁷² (bovine Sequenzen) (Kuno et al., 2000; Rodriguez-Manzaneque et al., 2002). ADAMTS-1-Knock-out Mäuse sind jedoch nicht vor einer experimentell-induzierten Arthrose geschützt (Little et al., 2005), so dass fraglich ist, ob diese Aggrekanase hauptsächlich an der Entstehung der Arthrose beteiligt ist (Tortorella et al., 2001).

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise dafür, dass IL-1 die Aktivität einer oder mehrerer Aggrekanasen induziert; der letztendliche Beweis für die Bedeutung von Aggrekanasen beim IL-1-bedingten Matrixabbau des Meniskus und wie diese dann reguliert werden steht jedoch noch aus.

4.4.3 Spaltung durch Calpain und andere Faktoren

Neben den Matrixmetalloproteinasen und Aggrekanasen wurde beschrieben, dass auch andere Proteasen in der Lage sind, Aggrekan zu spalten. Untersuchungen von Oshita et al. (2004) mit dem Antikörper SK-28 haben gezeigt, dass im bovinen Gelenkknorpel Aggrekan durch m-Calpain an der Stelle Ala⁷¹⁹-Ala⁷²⁰ gespalten wird. In der vorliegenden Arbeit waren im Meniskusgewebe die Aggrekanfragmente *b* und *c*, die C-terminal die Endigung Ala⁷¹⁹ aufweisen und somit möglicherweise durch die proteolytische Wirkung von m-Calpain induziert wurden, nachweisbar. Diese Fragmente waren aber unabhängig von IL-1 bereits in den Kontrollexplantaten vorhanden.

Immunhistochemisch war m-Calpain in den Meniskusexplantaten unabhängig von der IL-1-Inkubation anfärbbar und somit exprimiert. Da sowohl für die Aggrekan-Spaltprodukte als auch für den m-Calpain-Nachweis keine IL-1-bedingten Unterschiede auszumachen waren, scheint die m-Calpain-vermittelte Spaltung von Aggrekan im Meniskusgewebe Teil des normalen Turnovers zu sein.

Welche weiteren Proteasen an der Spaltung von Aggrekan im Meniskusgewebe beteiligt sein könnten oder für die durch IL-1 erhöhte GAG-Freisetzung verantwortlich sind, wurde in der vorliegenden Arbeit noch nicht näher untersucht. Unabhängig von einer MMP- und Aggrekanase-vermittelten Spaltung des Aggrekans können andere Mechanismen wie z.B. die Zerstörung des Linkproteins oder Hyaluronan zu einer Freisetzung von G1-tragenden Aggrekanfragmenten führen (Sugimoto et al., 2004). Durch die Aktivität einer Hyaluronidase kann die Verbindung von Aggrekan an Hyaluronan gespalten werden und Aggrekan mit seinen GAG-tragenden Seitenketten aus dem Gewebe hinausdiffundieren. Dadurch wird das Grundgerüst des Gewebes möglicherweise gelockert und die Bindungsfähigkeit des Hyaluronans aufgehoben, so dass das daran gebundene Aggrekan schneller freigesetzt werden kann und eine erhöhte Freisetzung von Glykosaminoglykanen erklären könnte. Da in vielen der Western Blots keine IL-1-bedingten Unterschiede im Bandenmuster erkennbar waren, könnte auch ein solcher Mechanismus für den verstärkten GAG-Verlust verantwortlich sein. Dieses muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

4.5 Untersuchungen zur Hemmung der Effekte von IL-1

4.5.1 Einfluss eines MMP-Inhibitors

In der vorliegenden Arbeit wurde der synthetische MMP-Inhibitor MMI270B verwendet, der als ein Breitband-Inhibitor mit einem hohen inhibitorischen Potential für die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -9 und -13 beschrieben worden ist (MacPherson et al., 1997). Im Bezug auf die Fragestellung, ob die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung durch die Verwendung des MMP-Inhibitors beeinflusst werden kann zeigte sich, dass bei der höchsten Konzentration des Inhibitors der GAG-Verlust aus dem Gewebe signifikant gesenkt wurde. In Untersuchungen von Ganu et al. (1998) konnte bei Gewebekulturen aus dem Gelenkknorpel von jungen Kälbern die IL-1-bedingte Freisetzung durch diesen MMP-Inhibitor nicht beeinflusst werden, jedoch wurde die perizelluläre Anfärbbarkeit der Proteoglykane vor einem Verlust geschützt. Die unterschiedlichen Befunde zur Wirkung des MMP-Inhibitors lassen sich dadurch erklären, dass Ganu et al. (1998) niedrigere Konzentration des MMP-Inhibitors (3 μ M, 10 μ M) eingesetzt hatten und Gelenkknorpelimplantate von jungen Kälbern verwendet wurden.

Da in der vorliegenden Arbeit die Proteoglykansyntheseaktivität durch den MMP-Inhibitor nicht beeinflusst wurde, kann die Hemmung der IL-1-bedingten Abnahme des GAG-Gehaltes in den Meniskusexplantaten durch den Inhibitor nicht durch eine verbesserte Neusynthese von Proteoglykanen erklärt werden. Die Zugabe des MMP-Inhibitors hatte eine generelle Reduktion der Proteinbiosyntheseaktivität zur Folge. Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Gabe des Inhibitors möglicherweise Prozesse beeinflusst werden, die für den langfristigen Erhalt des Gewebes wichtig sind.

Anhand der Western Blot-Analysen konnte mit dem MMP-Inhibitor keine Änderung der G1-tragenden Spaltfragmente nachgewiesen werden, lediglich die Abbau-Fragmente 12 und 13 in den Kulturüberständen waren bei der höchsten Konzentration schwächer dargestellt. Da bei dieser Konzentration die IL-1-vermittelte GAG-Freisetzung signifikant reduziert werden konnte, lässt das vermuten, dass diese Fragmente zumindest zum Teil für die IL-1-bedingte GAG-Freisetzung verantwortlich sind.

Synthetische MMP-Inhibitoren können vor allem bei höheren Konzentrationen auch die Aktivität von Aggrekanasen hemmen (Arner et al., 1999). Da nur die höchste Konzentration des MMP-Inhibitors in den vorliegenden Versuchen Wirkung zeigte bleibt demnach offen, ob nicht auch oder sogar nur Aggrekanasen über die Bildung der Fragmente 12 und 13 an der GAG-Freisetzung beteiligt sind und durch den Inhibitor gehemmt wurden.

4.5.2 Einfluss eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm)

Mit Hilfe eines Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) konnte gezeigt werden, dass SODm in der höchsten Konzentration (25 μM) die IL-1-induzierte GAG-Freisetzung und NO-Produktion zum Teil aufhebt, die Biosyntheseaktivität sowie die Expression von pro-MMP-3 auf Proteinebene jedoch nicht beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass einige der IL-1-abhängigen Effekte im Meniskusgewebe (wie die MMP-3-Induktion und die Abnahme der Biosyntheseleistung) nicht durch NO vermittelt werden. Fukuda et al. (1994) fanden, dass bei Gelenkknorpelimplantaten durch eine Superoxiddismutase die IL-1-vermittelte GAG-Freisetzung vollständig gehemmt wird. Aber auch hier konnte keine Wirkung der Superoxiddismutase auf die Proteoglykansynthese gemessen werden, so dass daher postuliert wurde, dass andere Mechanismen für diese Effekte verantwortlich sein müssen. Die Untersuchungen von Oh et al. (1998) haben gezeigt, dass die IL-1-vermittelte Hemmung der Proteoglykansynthese bei bovinen Chondrozyten das Ergebnis von Peroxynitrit (ONOO^-) ist, welches aus der Verbindung von Superoxidanionen (O_2^-) mit NO_2^- hervorgeht. Da durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Superoxiddismutase-Mimetikum Peroxynitrit weggefangen werden kann (Ferrer-Sueta et al., 1999) und auch die IL-1-induzierte NO-Produktion vermindert wird, kann somit geschlossen werden, dass die Reduktion der Proteoglykansyntheseaktivität durch IL-1 im Meniskusgewebe nicht durch NO oder Superoxidanionen vermittelt wird.

Bei Meniskuszellen wurde mit Hilfe des Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) die IL-1-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κB gehemmt und gleichzeitig die IL-1-induzierte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13 gesteigert. Bei den Gewebeexplantaten konnte auf Proteinebene in den Kulturüberständen keine Veränderung der IL-1-induzierten proteolytischen Aktivität von pro-MMP-3 nachgewiesen werden. So zeigt sich hier ein unterschiedlicher Effekt des SODm bei Zellen und Gewebekulturen, dessen Ursache unklar ist. Zudem stellt diese Diskrepanz auch die Übertragbarkeit der Befunde aus Zellversuchen auf die Gewebesituation zumindest zum Teil in Frage.

Für den Fall, dass IL-1 auch im Meniskusgewebe den Transkriptionsfaktor NF- κB aktiviert (hier nicht untersucht), könnten einige der Effekte möglicherweise dadurch indirekt erklärt werden.

4.6 Einfluss von IL-1 auf die Proteoglykane Decorin, Biglykan und Versikan

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnten im Meniskusgewebe neben Aggrekan die Proteoglykane Decorin, Biglykan und Versikan nachgewiesen werden. Die kleinen leucinreichen Proteoglykane Decorin und Biglykan können eine wichtige Funktion im Gewebe erfüllen, indem sie mit Kollagenfibrillen in Wechselwirkung treten, so dass diese dadurch möglicherweise vor einem proteolytischen Angriff geschützt sind (Monfort et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden nach einer Inkubation der Meniskusimplantate mit IL-1 die

Proteoglykane zum Teil mit einer tendenziell schwächeren Intensität dargestellt. Da jedoch keine Abbau-Fragmente im Kulturmedium nachgewiesen werden konnten, war es nicht möglich eindeutig zu klären, welchen Einfluss IL-1 auf diese Proteoglykane hatte. Eine Erklärung könnte sein, dass die leichte Abnahme der Bandenintensität in den IL-1-behandelten Explantaten auf einen Verlust dieser Proteoglykane aufgrund einer Spaltung durch matrix-abbauende Proteasen hindeutet. Im Gewebe sowie im Kulturmedium wurden jedoch keine nachweisbaren Mengen von Abbau-Fragmenten gefunden, was zum einen dadurch erklärt werden könnte, dass diese sofort weiter gespalten werden und die hier verwendeten Methoden nicht sensitiv genug sind, um auch diese Fragmente zu erfassen. Zum anderen könnten diese Fragmente sofort nach der Entstehung von den Zellen über Endozytose internalisiert worden sein. Eine Internalisierung von Aggrekan-Abbaufragmenten mit der Endigung -TEGE³⁷³ ist bei der Untersuchung von Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel gezeigt worden (Fosang et al., 2000), so dass durchaus möglich wäre, dass auch Fragmente anderer Proteoglykane durch Endozytose aufgenommen werden können. Andererseits könnte diese leichte Abnahme der Intensität ein zufälliger Befund sein, so dass durch IL-1 keine Zerstörung der Proteoglykane Decorin und Biglykan im Meniskusgewebe induziert wird.

Aufgrund der Wechselwirkungen dieser Proteoglykane mit den Kollagenfibrillen bieten sie nicht nur diesen einen Schutz vor einem proteolytischen Angriff sondern verhindern dadurch selber einen Zugang von Proteasen. Untersuchungen an Gewebeexplantaten aus dem Gelenkknorpel belegen diese Annahme, da die leucin-reichen Wiederholungen der kleinen Proteoglykane bei einer Stimulation mit IL-1 einem proteolytischen Angriff widerstehen können (Sztrolovics et al., 1999).

Es ist bekannt, dass Decorin und Biglykan durch Matrixmetalloproteinasen als auch Aggrekanasen gespalten werden können (Imai et al., 1997a; Sandy et al., 2001; Kashiwagi et al., 2004; Montfort et al., 2006;) und auch bei Versikan konnte eine Spaltung durch die Aggrekanasen ADAMTS-1 und -4 beschrieben werden (Sandy et al., 2001; Westling et al., 2004). Daher stellt sich die Frage, welche Proteasen an der Zerstörung des Aggrekans und dem IL-1-bedingten GAG-Verlust beteiligt sind, ohne jedoch Decorin, Biglykan und Versikan im Meniskusgewebe zu spalten.

4.7 Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation

Innerhalb des Meniskusgewebes lassen sich in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation Unterschiede in der Zellzahl, Zellmorphologie, der Zusammensetzung der biochemischen Komponenten der extrazellulären Matrix sowie der Ausrichtung der Kollagenfasern finden. Die meisten Untersuchungen am Meniskusgewebe wurden entweder unabhängig von der Lokalisation durchgeführt (Imler et al., 2004) oder beschränken sich überwiegend auf den Vergleich des peripher gelegenen vaskularisierten mit dem zentralen nicht-vaskularisierten Gewebe (Spindler et al., 1994; Nakano et al., 1997; Kobayashi et al.,

2004). In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der morphologischen Unterschiede die Wirkung von IL-1 in Abhängigkeit von der anatomischen Lokalisation des Meniskusgewebes untersucht.

Auch innerhalb des Gelenkknorpels lässt sich eine regionale und zonale Änderung der Zusammensetzung der Bestandteile der Extrazellulärmatrix sowie der Anzahl und Ausrichtung der Zellen wiederfinden. Der Gelenkknorpel kann in vier Zonen eingeteilt werden: eine dünne oberflächliche Zone (Tangentialzone, Superfizialschicht) mit parallel zur Gelenkoberfläche angeordneten Kollagenfasern und spindelförmigen Chondrozyten, eine dickere mittlere Zone (Transitionalzone, Übergangszone) mit größeren Chondrozyten und Kollagenfasern ohne erkennbare Ausrichtung, eine tiefe Zone (Radiärzone), in der die Chondrozyten säulenartig angeordnet und die Kollagenfasern parallel zur Oberfläche ausgerichtet sind und eine Zone des mineralisierten Knorpels, in der der Knorpel an den subchondralen Knochen verankert ist (Poole et al., 2001).

4.7.1 Einfluss von IL-1 auf die GAG-Freisetzung, Biosyntheseaktivität und NO-Produktion

Aus zahlreichen Untersuchungen an Chondrozyten des Gelenkknorpels ist bekannt, dass in Abhängigkeit von der Lokalisation unterschiedliche Effekte von IL-1 vermittelt werden können. Chondrozyten aus dem superfizialen Knorpelgewebe produzieren als Antwort auf IL-1 mehr Stickoxid (NO) als Zellen aus den tieferen Schichten (Fukuda et al., 1995; Hayashi et al., 1997; Häuselmann et al., 1998) und werden in ihrer Proteoglykansynthese stärker gehemmt (Häuselmann et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch innerhalb des Meniskusgewebes in Abhängigkeit von der Lokalisation unterschiedliche Effekte durch IL-1 induziert werden. Nur in Meniskusimplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe hatte IL-1 eine signifikant erhöhte Freisetzung an Glykosaminoglykanen zur Folge, während in den Implantaten aus dem tieferen Gewebe der Gehalt an Glykosaminoglykanen nicht beeinflusst wurde. Weiterhin konnte nur in den oberflächlichen Implantaten durch IL-1 eine signifikant erhöhte Produktion von NO nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Befunden von Fink et al. (2001), die ebenfalls zeigen konnten, dass Meniskusimplantate aus dem oberflächlichen Gewebe als Antwort auf IL-1 höhere Mengen an NO produzieren als Implantate aus dem tieferen Gewebe. Die Biosyntheseaktivität konnte jedoch sowohl bei den Implantaten aus dem oberflächlichen als auch tiefen Gewebe durch IL-1 reduziert werden. Da bei Gelenkknorpelzellen bekannt ist, dass durch Stickoxid die Biosyntheseaktivität gehemmt werden kann (Häuselmann et al., 1994b; Taskiran et al., 1994) und die NO-Produktion bei den Meniskusimplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe durch IL-1 deutlich gegenüber den Implantaten aus dem tieferen Gewebe erhöht ist, erscheint es als unwahrscheinlich anzunehmen, dass auch beim Meniskus diese Effekte durch NO beeinflusst werden.

4.7.2 Einfluss von IL-1 auf die Expression von matrix-abbauenden Proteasen

Auch im Hinblick auf die IL-1-induzierte Expression der Matrixmetalloproteinasen im Meniskusgewebe konnten lokale Unterschiede gefunden werden. In Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe wurde durch IL-1 die Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2 und -3 auf mRNA stärker heraufreguliert als in Explantaten aus dem tieferen Gewebe. Auf Proteinebene konnte im Zymogramm eine stärkere proteolytische Aktivität von pro-MMP-2 und pro-MMP-3 in den Kulturüberständen der oberflächlichen Meniskusexplantate nachgewiesen werden.

Die Zellzahl ist in dem oberflächlichen Gewebe etwa doppelt so hoch wie in dem tieferen Gewebe; dennoch lassen sich die gemessenen Unterschiede nicht durch die Zellzahldifferenzen erklären. Dieses trifft für die Bandenintensität von pro-MMP-2 und noch mehr für die deutlich gesteigerte Zunahme der proteolytischen Aktivität von pro-MMP-3 als Antwort auf IL-1 in den oberflächlichen Meniskusexplantaten zu. Die real time RT-PCR bestimmt Veränderungen von mRNA-Levels und die Zellzahl spielt bei der Messung keine Rolle; da auch mit dieser Methode gezeigt werden konnte, dass die Zellen in Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe durch IL-1 eine stärkeren Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-3 aufweisen, scheint bewiesen zu sein, dass die lokalen Unterschiede der Expression nicht (oder zumindest nicht nur) durch die Anzahl der Zellen herrührt.

In der Literatur findet man wenige Angaben zu einer zonenspezifischen Expression von Matrixmetalloproteinasen im Gelenkknorpel. Diese beziehen sich ausschließlich auf Untersuchungen von degeneriertem Knorpelgewebe und zeigen, dass in den oberflächlichen Schichten eine stärkere immunhistochemische Färbung verschiedener Matrixmetalloproteinasen zu erkennen ist (Walter et al., 1998; Tetlow et al., 2001). Es wird postuliert, dass matrix-abbauende Proteasen innerhalb des Gewebes unterschiedlich verteilt und daher in verschiedenen Bereichen wirksam sind (Patwari et al., 2005).

Da zu vermuten ist, dass die Zellen an der Oberfläche des Meniskus, in den faserknorpelartigen Anteilen oder in den Bündeln von Kollagen unterschiedliche Populationen darstellen, wäre es möglich, dass sie sich auch in ihrem Verhalten gegenüber proinflammatorischen Zytokinen unterscheiden. Es kann aber auch spekuliert werden, dass die IL-1-induzierten lokal unterschiedlichen Effekte durch die direkt an der Oberfläche des Gewebes gelegenen Zellen vermittelt werden, da diese eine eigene Population darstellen und nur in den oberflächlichen Explantaten vorkommen (**Abb. 58**). Die Fähigkeiten dieser Zellen sind noch kaum untersucht, was nun in weiterführenden Studien erfolgen sollte.

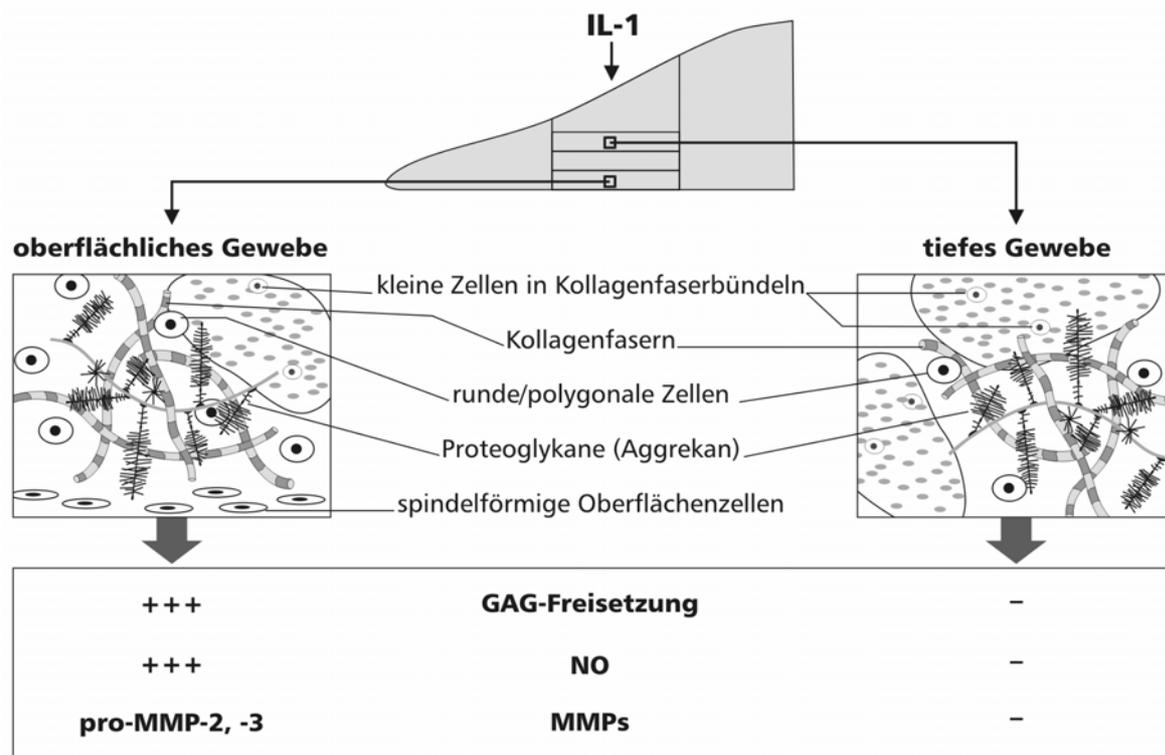


Abb. 58:

Schematische Darstellung von Meniskusexplantaten aus unterschiedlichen Lokalisationen sowie der Wirkung von IL-1. Meniskusexplantate aus dem oberflächlichen Gewebe weisen direkt an der originären Organoberfläche spindelförmige Zellen auf, die parallel zur Oberfläche ausgerichtet sind (siehe Kapitel 3.15.1). Weiter im Inneren findet man neben runden/polygonalen Zellen Kollagenfasern ohne eine erkennbare Verlaufsrichtung sowie Proteoglykane (Aggrekan). In den tiefer liegenden Kollagenfaserbündeln liegen zudem kleine Zellen, die vermutlich einer weiteren Zellpopulation angehören. In Meniskusexplantaten aus dem tieferen Gewebe findet man in geringerer Zelldichte lediglich die runden/polygonalen Zellen sowie die kleinen Zellen in den Kollagenfaserbündeln. Es ist zu vermuten, dass die Wirkung von IL-1 (GAG-Freisetzung, NO-Produktion, MMP-Expression von pro-MMP-2 und -3), die sich nur in den Meniskusexplantaten aus dem oberflächlichen Gewebe finden lässt, sich durch die lokal unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung erklären lässt.

4.8 Untersuchungen zur Bindungsaffinität von IL-1

Um zu überprüfen, ob sich die verschiedenen Ergebnisse bei den Explantaten aus dem oberflächlichen und tiefen Meniskusgewebe durch Unterschiede in der Bindungsaffinität von IL-1 aufgrund einer möglicherweise unterschiedlichen Verteilung von IL-1 Rezeptoren erklärt, wurden Bindungsaffinitätsstudien durchgeführt. Untersuchungen zur Bindungsaffinität bei Chondrozyten des Gelenkknorpels haben gezeigt, dass Zellen aus dem oberflächlichen Gewebe eine höhere Anzahl von IL-1 Rezeptoren aufweisen (Häuselmann et al., 1996). Die hier vorliegenden Untersuchungen zur Bindungsaffinität an Gewebekulturen in Abhängigkeit von der Lokalisation haben gezeigt, dass der größte Anteil (über 90%) des radioaktiv markierten ^{125}I -IL-1 unspezifisch in den Explantaten gebunden wird und erlauben daher leider keine klaren Rückschlüsse über eine unterschiedliche Anzahl der Rezeptoren bei den Zellen. Durch die Zugabe von unmarkiertem IL-1 konnte weder oberflächlich noch im tiefen Gewebe die radioaktive Bindung signifikant verdrängt werden. Es lag dennoch eine leichte

Tendenz zur Verdrängung vor, die in den oberflächlichen Meniskusexplantaten doppelt so hoch war, wie in den tiefen. Diese Verdrängung könnte durch die spezifische IL-1-Bindung an den Rezeptoren hervorgerufen worden sein, der lokale Unterschied ließe sich aber durch die Unterschiede in der Zellzahl erklären. So bleibt ungeklärt, ob eine zonale Verteilung von IL-1-Rezeptoren für die lokalen Unterschiede in der IL-1-Antwort verantwortlich ist.

4.9 Therapeutische Ansätze zur Beeinflussung von IL-1 Effekten

Anhand der vorliegenden in vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch IL-1 eine destruktive Wirkung auf den Meniskus ausgeübt wird. Bei Gelenkerkrankungen sind erhöhte Konzentrationen von IL-1 nachweisbar, so dass es notwendig ist, verschiedene therapeutische Methoden zu entwickeln, die einerseits eine Reduktion der Synthese von IL-1 bewirken oder andererseits den Effekten von IL-1 entgegenwirken. So kann die biologische Wirkung von IL-1 z.B. durch den Rezeptorantagonisten IL-1 Ra reguliert werden. IL-1Ra bindet an den IL-1-Rezeptor, verdrängt dadurch kompetitiv freies IL-1 und vermittelt somit eine antiinflammatorische Wirkung. In Untersuchungen an Explantatkulturen von bovinen Knorpel-explantaten konnte bereits gezeigt werden, dass die IL-1-bedingte Zerstörung von Proteoglykanen durch den IL-1 Rezeptor-Antagonisten gehemmt wird (Smith et al., 1991) und auch an Tiermodellen war ein positiver Effekt nachweisbar (Lewthwaite et al., 1994). Durch die Einnahme eines rekombinanten humanen IL-1 Rezeptorantagonisten (Anakinra) konnte bei der therapeutischen Behandlung von Gelenkerkrankungen wie der RA ebenfalls die Wirkung von IL-1 erfolgreich beeinflusst werden (Bresnihan, 2001). Durch die Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika wird darüber hinaus über eine Hemmung der Cyclooxygenase-, und damit der Prostaglandinsynthese, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 gesenkt (Yamazaki et al., 1997). Die vorliegende Untersuchung legt somit nahe, dass vergleichbare therapeutische Maßnahmen sich auch positiv auf den Erhalt des Meniskusgewebes auswirken; entsprechende Studien stehen jedoch noch aus.

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden in vitro Untersuchung zeigen, dass isolierte Zellen des Meniskusgewebes durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 dazu angeregt werden, Matrixmetalloproteinasen freizusetzen, die eine Zerstörung wichtiger Komponenten der extrazellulären Matrix bedingen können. Dabei wurde durch IL-1 der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, welcher jedoch nicht an der Regulation der Matrixmetalloproteinasen beteiligt zu sein scheint. Ein weiterer durch IL-1 regulierter Transkriptionsfaktor ist AP-1, der über die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 aktiviert werden kann. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte daher sein, zu überprüfen, ob dieser Signaltransduktionsweg die Expression der Matrixmetalloproteinasen erklären könnte. Wichtig wäre auch zu klären, ob die Aktivierung von NF- κ B ebenfalls im Gewebe erfolgt (z.B. durch immunhistochemische

Untersuchungen) und dort gegebenenfalls an der Induktion matrix-abbauender Proteasen beteiligt ist. Da das SODm den IL-1-bedingten Abbau des Meniskusgewebes zum Teil hemmen konnte, muss das Potential von antioxidativen Substanzen als möglicher therapeutischer Faktor in weiterführenden Studien geprüft werden.

Die Untersuchungen an Gewebekulturen unter standardisierten Bedingungen sollten dazu dienen, die Zellen des Meniskusgewebes in ihrer natürlichen Umgebung und die Wirkung von IL-1 auf Bestandteile der EZM zu betrachten. So konnte gezeigt werden, dass IL-1, aufgrund einer erhöhten Freisetzung von Glykosaminoglykanen, eine Zerstörung des Meniskusgewebes induziert. Es ließ sich aber nicht eindeutig klären, welche matrix-abbauenden Proteasen die IL-1-bedingte Freisetzung an Glykosaminoglykanen aus dem Gewebe zur Folge hatten. Es konnte zwar durch IL-1 eine erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-3 auf mRNA induziert werden; da jedoch in den Kulturüberständen nur eine Zunahme von pro-MMP-2 und vor allem pro-MMP-3, also den nicht aktiven Vorstufen, zu erkennen war, scheinen diese Proteasen nicht für die Freisetzung verantwortlich zu sein. Andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass andere MMPs als die, die hier in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, an der Zerstörung der Bestandteile der extrazellulären Matrix beteiligt sein könnten. Dabei könnte jedoch ausgeschlossen werden, dass die membrangebundenen MT-MMPs (MT1-MMP, MT2-MMP und MT3-MMP) eine Rolle spielen, da diese in der Lage sind pro-MMP-2 (und pro-MMP-13) zu aktivieren - eine solche Aktivierung war aber nicht nachweisbar.

Die Aggrekan-Fragmente 12 und 13 geben Aufschluss darüber, dass möglicherweise Aggrekanasen eine wichtige Rolle bei der Zerstörung des Meniskusgewebes spielen könnten. Ob jedoch diese Fragmente die IL-1-bedingte Freisetzung aus dem Gewebe bedingen, sollte durch eine gezielte Hemmung der Aggrekanasen (z.B. mit TIMP-3) in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Auch der direkte Nachweis der Aggrekanasen müsste erfolgen (z.B. immunhistochemisch/Western Blot). Darüber hinaus müssten weitere Studien zum Abbau der Proteoglykane durchgeführt werden, um noch mehr Informationen über die Spaltmuster zu erhalten und vor allem um zu klären, welche Fragmente den erhöhten GAG-Verlust des Gewebes bedingen.

Die Untersuchungen in Abhängigkeit von der Lokalisation haben ergeben, dass in Explantaten aus dem oberflächlichen Meniskusgewebe durch IL-1 stärkere Effekte oder nur Effekte induziert wurden, im Gegensatz zu Explantaten aus dem tieferen Gewebe. Optimierte Untersuchungen zur Bindungsaffinität der Zellen aus unterschiedlichen Bereichen des Meniskusgewebes (z.B. mit Autoradiographie) oder in situ-Hybridisierungs-Studien könnten möglicherweise Aufschluss über die Verteilung und Anzahl der Rezeptoren liefern, die diese Unterschiede erklären könnten.

Weitere wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix im Meniskusgewebe sind neben den Proteoglykanen die Kollagene, da diese für die Zug- und Druckfestigkeit des Gewebes entscheidend sind. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Wirkung von IL-1 auf Proteoglykane und dabei im Besonderen auf das Aggrekan untersucht. Der Einfluss von IL-1 auf die Kollagenfasern und eine Spaltung und Freisetzung von Kollagen-Fragmenten des Meniskusgewebes sollte daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Da jedoch aus in vitro-Untersuchungen am Gelenkknorpel bekannt ist, dass die Zerstörung der Proteoglykane einer Kollagendegradation vorausgeht, sollten diese Untersuchungen über einen längeren Zeitraum als hier in der vorliegenden Arbeit durchgeführt werden.

Schließlich sollen weitere Untersuchungen dazu dienen, zu überprüfen, ob Zellen des Meniskusgewebes selber dazu in der Lage sind, Zytokine freizusetzen, so dass diese wiederum das Gewebe selber und andere Bestandteile des Gelenkes über die Synovialflüssigkeit beeinflussen können.

5. Zusammenfassung

Pathologische Veränderungen des Meniskusgewebes können zu degenerativen Kniegelenkerkrankungen (wie z.B. Osteoarthritis) führen. Welche biochemischen und zellbiologischen Prozesse eine degenerative Veränderung des Meniskus bedingen ist bislang aber weitgehend unbekannt. Da bei der Destruktion des Gelenkknorpels proinflammatorische Zytokine bekanntermaßen eine wichtige Rolle spielen, wurde ein in vitro-Modell etabliert, mit dem die Wirkung von Interleukin-1 (IL-1) als Modellschubstanz auf isolierte Zellen und Gewebe des Meniskus untersucht werden kann.

Die isolierten Meniskuszellen wurden zunächst charakterisiert, indem die Expression typischer Matrixbestandteile wie Kollagen Typ I und II sowie Aggrecan nachgewiesen wurde (RT-PCR). Unter dem Einfluss von IL-1 (10 ng/ml) erhöhten die Zellen die mRNA-Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-3, -9 und -13, während die Expression von MMP-1, -2 und ADAMTS-5 nicht beeinflusst wurde (real time RT-PCR). Zellysate als auch Kulturüberstände enthielten pro-MMP-3 (mit IL-1 auch MMP-3) und pro-MMP-13 (Zymogramme). IL-1 aktivierte den Transkriptionsfaktor NF- κ B, was durch die Zugabe eines synthetischen zellgängigen Superoxiddismutase-Mimetikums (SODm) verhindert wurde (EMSA), so dass die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der Aktivierung postuliert werden kann. Die IL-1-abhängige MMP-Expression wird in den Meniskuszellen aber vermutlich nicht über NF- κ B und ROS vermittelt, da durch die Zugabe des SODm die Expression dieser MMPs noch weiter gesteigert wurde.

Für die Untersuchungen an Gewebekulturen wurden aus dem oberflächlichen Gewebe, welches direkt an das Tibiaplateau angrenzt, Meniskusimplantatscheiben standardisiert hergestellt (1 mm Dicke, 3 mm Durchmesser). IL-1 induzierte dosisabhängig und signifikant in den Explantaten einen GAG-Verlust (DMMB-Test) und verminderte die axiale Steifigkeit des Gewebes (biomechanische Messung), was auf eine Zerstörung der Matrix hindeutet. Zudem erhöhte IL-1 die Produktion von Stickoxid (NO; Griess-Reagenz) und reduzierte den Einbau radioaktiven Sulfats und Prolins (als Zeichen der Biosyntheseaktivität des Gewebes) ohne parallel die Vitalität der Zellen zu beeinflussen (morphologische Quantifizierung apoptotischer Zellen). SODm hemmte die IL-1-bedingte NO-Produktion und den GAG-Verlust ab einer Konzentration von 25 μ M, so dass Antioxidantien möglicherweise präventiv oder therapeutisch bei Erkrankungen des Meniskus einsetzbar sind. Auf mRNA Ebene erhöhte IL-1 im Gewebe die Expression von MMP-2 und -3, während MMP-9 und MMP-13 auch in den Kontrollen nicht detektierbar waren (dies stellt einen Unterschied zu den isolierten Zellen dar, dessen Ursache unklar ist; siehe oben). In den Gewebekulturüberständen induzierte IL-1 auch die pro-Formen von MMP-2 und -3 (Zymogramme), aber keine aktiven Enzyme.

Dennoch konnte ein Breitband-MMP-Inhibitor dosisabhängig und signifikant den IL-1-bedingten GAG-Verlust verhindern; dies erfolgte aber in einer Konzentration, in der vermutlich auch Aggrecanasen gehemmt werden (26 μ M). Die mögliche Beteiligung von

Aggrecanasen beim GAG-Abbau wurde durch Western Blot-Analysen von Aggrecanfragmenten bestätigt, da im Kulturmedium IL-1-bedingt Aggrecanase-typische Fragmente von Aggrecan mit den Endigungen ³⁷⁴ARGS- und -GELE¹⁴⁸⁰ entstanden. Auffallend war bei diesen Untersuchungen, dass bereits frisch isoliertes Meniskusgewebe eine intensive Fragmentierung des Aggrecankernproteins aufweist. Zu den Fragmenten gehörten auch solche, deren Spaltung durch m-Calpain hervorgerufen werden kann. Die Expression von m-Calpain wurde IL-1-unabhängig in den Menisken detektiert (Immunhistochemie), so dass man vermuten kann, dass m-Calpain an dem normalen Aggrecan-Turnover im Meniskus beteiligt ist. In Gelenkknorpelgewebe ist vor allem Aggrecan in der Gesamtlänge vorhanden, welches dann erst unter IL-1-Einfluss vielfältig fragmentiert wird. Meniskusgewebe zeigt somit eine generell und eventuell auch funktionell andere Turnoverrate für Aggrecan als der Gelenkknorpel. Die neben dem Aggrecan untersuchten Proteoglykane Decorin, Biglykan und Versikan wurden unter dem Einfluss von IL-1 im Meniskus nicht abgebaut.

Die Studien am Meniskusgewebe wurden vergleichend mit Explantaten aus oberflächlichen (siehe oben) und tiefer liegenden Regionen des Meniskus durchgeführt. Es zeigte sich, dass das tiefer liegende Meniskusgewebe eine nur halb so hohe Dichte an Zellen aufweist und zudem wenig oder gar nicht auf IL-1 reagiert (Ausbleiben von NO-Produktion, GAG-Verlust, Expression von MMP-2 und -3 mRNA und pro-Formen). Bindungsstudien mit radioaktivem IL-1 sollten klären, ob eine lokal unterschiedliche Expression von IL-1-Rezeptoren hierfür verantwortlich sein könnte; diese scheiterten aber vermutlich daran, dass weit über 90% des IL-1 unspezifisch im Gewebe gebunden wurde und so die relativ kleinen Werte der spezifischen Verdrängung am Rezeptor nicht erfasst werden konnten und die Ursachen für die lokalen Unterschiede in der IL-1-Antwort zunächst ungeklärt bleiben.

Erste vorläufige Untersuchungen am humanen Meniskusgewebe zeigten, dass das hier etablierte in vitro-System am bovinen Meniskusgewebe auf das humane System übertragbar ist, da IL-1 auch hier eine erhöhte GAG-Freisetzung und eine Hemmung der Biosyntheseaktivität vermittelte. IL-1 erhöhte zudem die Expression von MMP-2 und -3 und der Aggrecanasen ADAMTS-4 und -5.

Weiterführende Studien sollten nun die Bedeutung von Aggrecanasen sowie den protektiven Effekt von Antioxidantien bei dem IL-1-abhängigen Abbau des Meniskusgewebes thematisieren.

6. Summary

Pathological changes of the meniscus can lead to degenerative joint diseases like OA. However, the biochemical and cellular biological mechanisms which might contribute to degenerative changes of the meniscus are not fully understood. Since proinflammatory cytokines are known to be involved in the destruction of articular cartilage, the objective of this study was to establish an *in vitro* model where the effect of interleukin-1 (IL-1) on isolated bovine meniscal cells and tissue can be investigated.

Isolated meniscal cells in monolayer culture were characterized by the expression of typical constituents of the extracellular matrix, such as collagen type I and II and aggrecan (RT-PCR). Meniscal cells responded to IL-1 stimulation (10 ng/ml) with increased mRNA expression of the matrix-degrading enzymes MMP-3, -9 and -13, while other enzymes like MMP-1, -2 and ADAMTS-5 were not altered (real time RT-PCR). Cells and supernatants demonstrated pro-MMP-3 (with IL-1 also MMP-3) and pro-MMP-13 protein expression (zymography). IL-1 activated the transcription factor NF- κ B in meniscal cells (EMSA). Treatment of the cells with a cell-permeable superoxide dismutase mimetic (SODm) prevented the IL-1-dependent activation of NF- κ B. Therefore it seems that reactive oxygen species (ROS) are involved in the activation. However, since SODm was not able to decrease the IL-1-dependent induction of MMP-3, -9 and -13 at the same time it might be suggested that the IL-dependent upregulation of these enzymes is not being mediated by NF- κ B and ROS.

Tissue culture explants (1 mm thickness x 3 mm diameter) were isolated from the surface of the meniscus. In these explants IL-1 induced dose-dependently a significant increase in GAG loss (DMMB assay) accompanied by a reduction of the axial stiffness of the tissue (investigation of the biomechanical properties using a computer-controlled loading device), which indicates a degradation of the matrix. Furthermore the nitrite production (NO) in supernatants was increased in IL-1-treated explants (Griess assay) and the incorporation of radioactive sulphate and proline (for indication of biosynthetic activity) was reduced. However, the viability of the cells was not affected significantly (morphological quantification of apoptotic cells). SODm inhibited the IL-1-induced NO production and GAG loss dose-dependently (and significantly at a concentration of 25 μ M). So therefore the antioxidative status of the tissue could be a target for preventive or therapeutical interventions in meniscal disease management. MMP-2 and MMP-3 mRNA gene expression was upregulated by IL-1, whereas expression of MMP-9 and MMP-13 was not detected in any experimental group (which represents a difference to the isolated cells). This is supported by zymographies showing only pro-MMP-2 and -3 protein in explant supernatants.

Inhibition of MMP activity with a broad-spectrum MMP inhibitor reduced dose-dependently and significantly the IL-1-induced decrease in GAG content of meniscal explants, but only at concentrations in which aggrecanases might possibly also be inhibited (26 μ M). Data from the analysis of aggrecan fragments (Western blots) suggest that the loss of aggrecan was at

least in part due to aggrecanase activity, since the supernatants contained IL-1-mediated aggrecanase-generated products of aggrecan with neoepitopes ³⁷⁴ARGS- and -GELE¹⁴⁸⁰. The IL-1-independent presence of multiple species of aggrecan fragments in freshly isolated meniscal explants was unexpected, since in articular cartilage aggrecan can be detected mostly in full length. Thus, meniscal tissue shows a generally and functionally different turnover of aggrecan than articular cartilage. In the meniscal tissue there were also aggrecan neoepitopes generated by cleavage known from m-calpain. Since m-calpain was immunohistochemically present in meniscal explants independent from IL-1-treatment, it is suggested that calpain-mediated aggrecanolysis is part of the physiological aggrecan turnover in the bovine meniscus. The proteoglycans decorin, biglycan and versican were also detectable by western blotting but not effected by IL-1.

In another part of the study meniscal explants were isolated from deeper regions of the meniscus and the IL-1 response was compared to surface explants. Meniscal tissue from the surface had a 2-fold higher cell content than tissue from deeper locations, and seemed to be more responsive to IL-1 than tissue from deeper zones, which showed absence of IL-1-dependent NO production, GAG-loss and expression of MMP-2 and -3 mRNA and pro-forms. Binding experiments with ¹²⁵I-labelled IL-1 should clarify, if local differences in the expression of IL-1 receptors were responsible for the different effects of IL-1. However since over 90% of IL-1 was bound un-specifically to the tissue these studies failed, and the reason for the local differences in the IL-1 response remains unknown.

Preliminary studies on human meniscal tissue showed IL-1-induced GAG loss and reduction of the biosynthetic activity. IL-1 also increased the expression of MMP-2 and -3 and additionally the aggrecanases ADAMTS-4 and -5. Therefore the established in vitro model on bovine meniscal tissue seems to reflect features found in the human system.

The importance of aggrecanases and the protective effect of antioxidants in IL-1-induced degradation of aggrecan should now be investigated in further studies.

7. Literaturverzeichnis

- Adams M E, Muir H.** The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem J* 1981; (197): 385-389.
- Adams M E, Billingham M E, Muir H.** The glycosaminoglycans in menisci in experimental and natural osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1983; (26): 69-76.
- Adams M E, Hukins D W L.** The extracellular matrix of the meniscus. In: „Knee meniscus: Basic and clinical foundations“, Mow V C, Arnoczky S P, Jackson D W (Eds.), Raven Press, Ltd. 1992, (1st edition): 15-28.
- Ahmed A M, Burke D L.** In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints--Part I: Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng* 1983; (105): 216-225.
- 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.
- Apte S S, Olsen B R, 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.
- Arai M, Anderson D, Kurdi Y, Annis-Freeman B, Shields K, Collins-Racie L A, Corcoran C, DiBlasio-Smith E, Pittman D D, Dorner A J, Morris E, LaVallie E R.** 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.
- Arend W P.** Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991; (88): 1445-1451.
- Arend W P, Malyak M, Smith M F, Jr., Whisenand T D, Slack J L, Sims J E, Giri J G, Dower S K.** Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. *J Immunol* 1994; (153): 4766-4774.
- Arner E C, Hughes C E, Decicco C P, Caterson B, Tortorella M D.** Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; (6): 214-228.
- Arner E C, Pratta M A, Decicco C P, Xue C B, Newton R C, Trzaskos J M, Magolda R L, Tortorella M D.** Aggrecanase. A target for the design of inhibitors of cartilage degradation. *Ann N Y Acad Sci* 1999; (878): 92-107.
- Arnoczky S P, Warren R F.** Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 1982; (10): 90-95.
- Asada S, Fukuda K, Nishisaka F, Matsukawa M, Hamanisi C.** Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res* 2001; (50): 19-23.
- Baker M S, Feigan J, Lowther D A.** Chondrocyte antioxidant defences: the roles of catalase and glutathione peroxidase in protection against H₂O₂ dependent inhibition of proteoglycan biosynthesis. *J Rheumatol* 1988; (15): 670-677.
- Baker A H, Edwards D R, Murphy G.** Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; (115): 3719-3727.
- Baldwin A S, Jr.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; (14): 649-683.

- Bayliss M T, Hutton S, Hayward J, Maciewicz R A.** 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.
- Benbow U, Brinckerhoff C E.** The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* 1997; (15): 519-526.
- Berenbaum F.** Signaling transduction: target in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; (16): 616-622.
- Bhargava M M, Attia E T, Murrell G A, Dolan M M, Warren R F, Hannafin J A.** The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med* 1999; (27): 636-643.
- Billingham R C, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole A R.** Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; (99): 1534-1545.
- Birkedal-Hansen H, Moore W G, Bodden M K, Windsor L J, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler J A.** Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; (4): 197-250.
- Blanco F J, Lotz M.** IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE2. *Exp Cell Res* 1995; (218): 319-325.
- Blanco F J, Ochs R L, Schwarz H, Lotz M.** Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; (146): 75-85.
- Bland Y S, Ashhurst D E.** Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. *Histochem J* 1996; (28): 265-274.
- Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F.** Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2001; (1526): 147-158.
- Bond M, Baker A H, Newby A C.** 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.
- Bondeson J, Brennan F, Foxwell B, Feldmann M.** Effective adenoviral transfer of IkappaBalpha into human fibroblasts and chondrosarcoma cells reveals that the induction of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines is nuclear factor-kappaB dependent. *J Rheumatol* 2000; (27): 2078-2089.
- Bottomley K M, Borkakoti N, Bradshaw D, Brown P A, Broadhurst M J, Budd J M, Elliott L, Eyers P, Hallam T J, Handa B K, Hill C H, James M, Lahm H W, Lawton G, Merritt J E, Nixon J S, Rothlisberger U, Whittle A, Johnson W H.** Inhibition of bovine nasal cartilage degradation by selective matrix metalloproteinase inhibitors. *Biochem J* 1997; (323 (Pt 2)): 483-488.
- Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; (72): 248-254.
- Brigelius-Flohé R, Banning A, Kny M, Bol G F.** Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch Biochem Biophys* 2004; (423): 66-73.
- Brinckerhoff C E, Rutter J L, Benbow U.** Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000; (6): 4823-4830.
- Bresnihan B.** The safety and efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2001; (30): 17-20.

- Büttner F H, Hughes C E, Margerie D, Lichte A, Tschesche H, Catterson B, Bartnik E.** Membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cleaves the recombinant aggrecan substrate rAgg1mut at the 'aggrecanase' and the MMP sites. Characterization of MT1-MMP catabolic activities on the interglobular domain of aggrecan. *Biochem J* 1998; (333 (Pt 1)): 159-165.
- Cameron M, Buchgraber A, Passler H, Vogt M, Thonar E, Fu F, Evans C H.** 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.
- Cao M, Stefanovic-Racic M, Georgescu H I, Miller L A, Evans C H.** Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine. *J Orthop Res* 1998; (16): 104-111.
- Carlson C S, Guilak F, Vail T P, Gardin J F, Kraus V B.** Synovial fluid biomarker levels predict articular cartilage damage following complete medial meniscectomy in the canine knee. *J Orthop Res* 2002; (20): 92-100.
- Cheung H S.** Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 1987; (16): 343-356.
- Chu S C, Yang S F, Lue K H, Hsieh Y S, Wu C L, Lu K H.** Regulation of gelatinases expression by cytokines, endotoxin, and pharmacological agents in the human osteoarthritic knee. *Connect Tissue Res* 2004; (45): 142-150.
- Clancy R M, Amin A R, Abramson S B.** The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998; (41): 1141-1151.
- Clark C R, Ogden J A.** Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg Am* 1983; (65): 538-547.
- Clegg P D, Carter S D.** Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases. *Equine Vet J* 1999; (31): 324-330.
- Collier S, Ghosh P.** Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* 1995; (3): 127-138.
- Colotta F, Dower S K, Sims J E, Mantovani A.** The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 1994; (15): 562-566.
- Day B, Mackenzie W G, Shim S S, Leung G.** The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1985; (1): 58-62.
- Dean D D, Martel-Pelletier J, Pelletier J P, Howell D S, Woessner J F, Jr.** Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; (84): 678-685.
- DiCarlo E F.** Pathology of the meniscus. In: „Knee meniscus: Basic and clinical foundations”, Mow V C, Arnoczky S P, Jackson D W (Eds.), Raven Press, Ltd. 1992, (1st edition): 117-130.
- Dinarello C A.** Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; (77): 1627-1652.
- Dinarello C A.** The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994; (5): 517-531.
- Doughty J R, O'Byrne E, Spirito S, Blancuzzi V, Singh H N, Goldberg R L.** The effect of CGS 27023A on the level of 3B3 (-) epitope in a rabbit meniscectomy model. *Inflamm Res* 1997; (46 Suppl 2): 139-140.
- 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.
- 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.

- Dwyer B E, Lu S Y, Laitinen J T, Nishimura R N.** Protective properties of tin- and manganese-centered porphyrins against hydrogen peroxide-mediated injury in rat astroglial cells. *J Neurochem* 1998; (71): 2497-2504.
- Elkington P T, O'Kane C M, Friedland J S.** The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol* 2005; (142): 12-20.
- Elliott S F, Coon C I, Hays E, Stadheim T A, Vincenti M P.** Bcl-3 is an interleukin-1-responsive gene in chondrocytes and synovial fibroblasts that activates transcription of the matrix metalloproteinase 1 gene. *Arthritis Rheum* 2002; (46): 3230-3239.
- English W R, Puente X S, Freije J M, Knauper V, Amour A, Merryweather A, Lopez-Otin C, Murphy G.** 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.
- Eyre D R, Wu J J.** Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett* 1983; (158): 265-270.
- 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.
- Farrell A J, Blake D R, Palmer R M, Moncada S.** Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; (51): 1219-1222.
- Fernandes J C, Martel-Pelletier J, Pelletier J P.** The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; (39): 237-246.
- Ferrer-Sueta G, Batinic-Haberle I, Spasojevic I, Fridovich I, Radi R.** Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem Res Toxicol* 1999; (12): 442-449.
- Fink C, Fermor B, Weinberg J B, Pisetsky D S, Misukonis M A, Guilak F.** The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; (9): 481-487.
- Fithian D C, Kelly M A, Mow V C.** Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res* 1990;19-31.
- Flannery C R, Lark M W, Sandy J D.** 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.
- Flannery C R, Little C B, Hughes C E, Caterson B.** Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; (260): 318-322.
- Fosang A J, Neame P J, Hardingham T E, Murphy G, Hamilton J A.** Cleavage of cartilage proteoglycan between G1 and G2 domains by stromelysins. *J Biol Chem* 1991; (266): 15579-15582.
- Fosang A J, Neame P J, Last K, Hardingham T E, Murphy G, Hamilton J A.** The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J Biol Chem* 1992; (267): 19470-19474.
- Fosang A J, Last K, Knauper V, Neame P J, Murphy G, Hardingham T E, Tschesche H, Hamilton J A.** Fibroblast and neutrophil collagenases cleave at two sites in the cartilage aggrecan interglobular domain. *Biochem J* 1993; (295 (Pt 1)): 273-276.
- Fosang A J, Last K, Neame P J, Murphy G, Knauper V, Tschesche H, Hughes C E, Caterson B, Hardingham T E.** 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.

- Fosang A J, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame P J.** Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 1996; (380): 17-20.
- Fosang A J, Last K, Fujii Y, Seiki M, Okada Y.** Membrane-type 1 MMP (MMP-14) cleaves at three sites in the aggrecan interglobular domain. *FEBS Lett* 1998; (430): 186-190.
- Fosang A J, Last K, Stanton H, Weeks D B, Campbell I K, Hardingham T E, Hembry R M.** Generation and novel distribution of matrix metalloproteinase-derived aggrecan fragments in porcine cartilage explants. *J Biol Chem* 2000; (275): 33027-33037.
- Fukuda K, Dan H, Saitoh M, Takayama M, Tanaka S.** Superoxide dismutase inhibits interleukin-1-induced degradation of human cartilage. *Agents Actions* 1994; (42): 71-73.
- Fukuda K, Kumano F, Takayama M, Saito M, Otani K, Tanaka S.** Zonal differences in nitric oxide synthesis by bovine chondrocytes exposed to interleukin-1. *Inflamm Res* 1995; (44): 434-437.
- Gallis B, Prickett K S, Jackson J, Slack J, Schooley K, Sims J E, Dower S K.** IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *J Immunol* 1989; (143): 3235-3240.
- Ganu V, Goldberg R, Peppard J, Rediske J, Melton R, Hu S I, Wang W, Duvander C, Heinegard D.** Inhibition of interleukin-1 α -induced cartilage oligomeric matrix protein degradation in bovine articular cartilage by matrix metalloproteinase inhibitors: potential role for matrix metalloproteinases in the generation of cartilage oligomeric matrix protein fragments in arthritic synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1998; (41): 2143-2151.
- Gao G, Westling J, Thompson V P, Howell T D, Gottschall P E, Sandy J D.** Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J Biol Chem* 2002; (277): 11034-11041.
- Gao G, Plaas A, Thompson V P, Jin S, Zuo F, Sandy J D.** ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* 2004; (279): 10042-10051.
- 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.
- 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.
- Ghadially F N, Lalonde J M, Wedge J H.** Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 1983; (136 (Pt 4)): 773-791.
- Ghosh S, May M J, Kopp E B.** NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; (16): 225-260.
- Glasson S S, Askew R, Sheppard B, Carito B A, Blanchet T, Ma H L, Flannery C R, Kanki K, Wang E, Peluso D, Yang Z, Majumdar M K, Morris E A.** Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2004; (50): 2547-2558.
- Goldring M B, Birkhead J, Sandell L J, Kimura T, Krane S M.** 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.
- Gray J C.** Neural and vascular anatomy of the menisci of the human knee. *J Orthop Sports Phys Ther* 1999; (29): 23-30.
- Grazioli V, Schiavo R, Casari E, Marzatico F, Baena R, Gaetani P.** Antioxidant enzymatic activities and lipid peroxidation in cultured human chondrocytes from vertebral plate cartilage. *FEBS Lett* 1998; (431): 149-153.

- Greenfeder S A, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite R A, Ju G.** Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 1995; (270): 13757-13765.
- Grover J, Roughley P J.** Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA splicing variation with aggrecan. *Biochem J* 1993; (291 (Pt 2)): 361-367.
- Groves R W, Giri J, Sims J, Dower S K, Kupper T S.** 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.
- Haklar U, Yuksel M, Velioglu A, Turkmen M, Haklar G, Yalcin A S.** Oxygen radicals and nitric oxide levels in chondral or meniscal lesions or both. *Clin Orthop Relat Res* 2002;135-142.
- Hannum C H, Wilcox C J, Arend W P, Joslin F G, Dripps D J, Heimdahl P L, Armes L G, Sommer A, Eisenberg S P, Thompson R C.** Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990; (343): 336-340.
- Hardingham T E, Fosang A J.** Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB* 1992; (6): 861-870.
- Hashimoto S, Takahashi K, Ochs R L, Coutts R D, Amiel D, Lotz M.** Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999; (42): 2123-2131.
- 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.
- Häuselmann H J, Fernandes R J, Mok S S, Schmid T M, Block J A, Aydelotte M B, Kuettner K E, Thonar E J.** Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994a; (107 (Pt 1)): 17-27.
- Häuselmann H J, Oppliger L, Michel B A, Stefanovic-Racic M, Evans C H.** Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett* 1994b; (352): 361-364.
- Häuselmann H J, Flechtenmacher J, Michal L, Thonar E J, Shinmei M, Kuettner K E, Aydelotte M B.** 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.
- Häuselmann H J, Stefanovic-Racic M, Michel B A, Evans C H.** Differences in nitric oxide production by superficial and deep human articular chondrocytes: implications for proteoglycan turnover in inflammatory joint diseases. *J Immunol* 1998; (160): 1444-1448.
- Hayashi T, Abe E, Yamate T, Taguchi Y, Jasin H E.** Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; (40): 261-269.
- Henrotin Y, Deby-Dupont G, Deby C, De Bruyn M, Lamy M, Franchimont P.** Production of active oxygen species by isolated human chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1993; (32): 562-567.
- Hellio Le Graverand M P, Reno C, Hart D A.** Gene expression in menisci from the knees of skeletally immature and mature female rabbits. *J Orthop Res* 1999; (17): 738-744.
- Hering T M, Kollar J, Huynh T D, Varelas J B, Sandell L J.** Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys* 1994; (314): 90-98.
- Hiran T S, Moulton P J, Hancock J T.** Detection of superoxide and NADPH oxidase in porcine articular chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 1997; (23): 736-743.
- Hsieh Y S, Yang S F, Chu S C, Chen P N, Chou M C, Hsu M C, Lu K H.** Expression changes of gelatinases in human osteoarthritic knees and arthroscopic debridement. *Arthroscopy* 2004; (20): 482-488.

- Huang J, Gao X, Li S, Cao Z.** Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci* 1997; (94): 12829-12832.
- Huch K, Wilbrink B, Flechtenmacher J, Koepf H E, Aydelotte M B, Sampath T K, Kuettner K E, Mollenhauer J, Thonar E J.** 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-1 β . *Arthritis Rheum* 1997; (40): 2157-2161.
- Hughes C E, Little C B, Buttner F H, 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.
- Ilic M Z, Vankemmelbeke M N, Holen I, Buttler D J, Clem R H, Handley C J.** Bovine joint capsule and fibroblasts derived from joint capsule express aggrecanase activity. *Matrix Biol* 2000; (19): 257-265.
- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher M D, Okada Y.** Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor- β 1 release. *Biochem J* 1997a; (322 (Pt 3)): 809-814.
- Imai K, Ohta S, Matsumoto T, Fujimoto N, Sato H, Seiki M, Okada Y.** Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 1997b; (151): 245-256.
- Imler S M, Doshi A N, Levenston M E.** Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; (12): 736-744.
- Ito A, Nose T, Takahashi S, Mori Y.** Cyclooxygenase inhibitors augment the production of pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) in rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett* 1995; (360): 75-79.
- Ito T, Ishiguro N, Ito H, Shibata H, Oguchi T, Iwata H.** mRNA expression for aggrecanase and ADAMS in degenerated menisci of the knee (abstract). *Trans Orthop Res Soc* 2000; 0796.
- Jefferies C, Bowie A, Brady G, Cooke E L, Li X, O'Neill L A.** Transactivation by the p65 subunit of NF- κ B in response to interleukin-1 (IL-1) involves MyD88, IL-1 receptor-associated kinase 1, TRAF-6, and Rac1. *Mol Cell Biol* 2001; (21): 4544-4552.
- Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X.** Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol* 2002; (22): 7158-7167.
- Kambic H E, McDevitt C A.** Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus. *J Orthop Res* 2005; (23): 142-149.
- Karan A, Karan M A, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, Canbaz M, Oncel A.** Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2003; (22): 397-399.
- Karin M, Ben Neriah Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; (18): 621-663.
- 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.
- Kashiwagi M, Enghild J J, Gendron C, Hughes C, Caterson B, Itoh Y, Nagase H.** Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem* 2004; (279): 10109-10119.
- Kevoorkian L, Young D A, Darrah C, Donell S T, Shepstone L, Porter S, Brockbank S M, Edwards D R, Parker A E, Clark I M.** Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; (50): 131-141.

- Kobayashi K, Fujimoto E, Deie M, Sumen Y, Ikuta Y, Ochi M.** Regional differences in the healing potential of the meniscus-an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium. *Knee* 2004; (11): 271-278.
- Kozaci L D, Buttle D J, Hollander A P.** Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum* 1997; (40): 164-174.
- Kuno K, Okada Y, Kawashima H, Nakamura H, Miyasaka M, Ohno H, Matsushima K.** ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett* 2000; (478): 241-245.
- Largo R, Alvarez-Soria M A, Diez-Ortego I, Calvo E, Sanchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont G.** Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; (11): 290-298.
- Lark M W, Bayne E K, Flanagan J, Harper C F, Hoerrner L A, Hutchinson N I, Singer I I, Donatelli S A, Weidner J R, Williams H R, Mumford R A, Lohmander L S.** Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* 1997; (100): 93-106.
- Lefebvre V, Peeters-Joris C, Vaes G.** Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochim Biophys Acta* 1991; (1094): 8-18.
- LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky D S, Weinberg J B, Vail T P, Guilak F.** Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum* 2001; (44): 2078-2083.
- Lewthwaite J, Blake S M, Hardingham T E, Warden P J, Henderson B.** The effect of recombinant human interleukin 1 receptor antagonist on the induction phase of antigen induced arthritis in the rabbit. *J Rheumatol* 1994; (21): 467-472.
- Liacini A, Sylvester J, Li W Q, Zafarullah M.** Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-kappa B) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biol* 2002; (21): 251-262.
- Liacini A, Sylvester J, Li W Q, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M.** Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003; (288): 208-217.
- Little C B, Flannery C R, Hughes C E, Mort J S, Roughley P J, Dent C, Caterson B.** Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* 1999; (344 Pt 1): 61-68.
- Little C B, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson F M, Campbell I K, Meeker C T, Bateman J F, Pritchard M A, Fosang A J.** ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum* 2005; (52): 1461-1472.
- Lo Y Y, Conquer J A, Grinstein S, Cruz T F.** Interleukin-1 beta induction of c-fos and collagenase expression in articular chondrocytes: involvement of reactive oxygen species. *J Cell Biochem* 1998; (69): 19-29.
- Lohmander L S, Hoerrner L A, Lark M W.** Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993a; (36): 181-189.
- Lohmander L S, Neame P J, Sandy J D.** The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993b; (36): 1214-1222.

- Lotz M.** The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 1999; (25): 269-282.
- MacPherson L J, Bayburt E K, Capparelli M P, Carroll B J, Goldstein R, Justice M R, Zhu L, Hu S, Melton R A, Fryer L, Goldberg R L, Doughty J R, Spirito S, Blancuzzi V, Wilson D, O'Byrne E M, Ganu V, Parker D T.** Discovery of CGS 27023A, a non-peptidic, potent, and orally active stromelysin inhibitor that blocks cartilage degradation in rabbits. *J Med Chem* 1997; (40): 2525-2532.
- Malfait A M, Liu R Q, Ijiri K, Komiya S, Tortorella M D.** Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002; (277): 22201-22208.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure M P, Chin J A, Fournier S, Sarfati M, Pelletier J P.** The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992; (35): 530-540.
- Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier J M, Pelletier J P.** Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 1994; (70): 807-815.
- Martel-Pelletier J.** Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; (7): 371-373.
- Martin G, Andriamanalijaona R, Mathy-Hartert M, Henrotin Y, Pujol J P.** 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.
- McDevitt C A, Webber R J.** The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 8-18.
- McNicol D, Roughley P J.** Extraction and characterization of proteoglycan from human meniscus. *Biochem J* 1980; (185): 705-713.
- Meier B, Cross A R, Hancock J T, Kaup F J, Jones O T.** Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* 1991; (275 (Pt 1)): 241-245.
- Mendes A F, Caramona M M, Carvalho A P, Lopes M C.** 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.
- Mengshol J A, Vincenti M P, Coon C I, Barchowsky A, Brinckerhoff C E.** 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.
- Mengshol J A, Vincenti M P, Brinckerhoff C E.** IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res* 2001; (29): 4361-4372.
- Meyer M, Schreck R, Baeuerle P A.** H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J* 1993; (12): 2005-2015.
- 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.
- Mitchell P G, Magna H A, Reeves L M, Lopresti-Morrow L L, Yocum S A, Rosner P J, Geoghegan K F, Hambor J E.** Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1996; (97): 761-768.

- Mohtai M, Smith R L, Schurman D J, Tsuji Y, Torti F M, Hutchinson N I, Stetler-Stevenson W G, Goldberg G I.** 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.
- Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier J P, Martel-Pelletier J.** Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Res Ther* 2006; (8): R26 (Epub ahead of print).
- Mosley B, Dower S K, Gillis S, Cosman D.** Determination of the minimum polypeptide lengths of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; (84): 4572-4576.
- Murphy G, Cockett M I, Stephens P E, Smith B J, Docherty A J.** Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J* 1987; (248): 265-268.
- Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I.** Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res* 2002; (4 Suppl 3): 39-49.
- Murrell G A, Jang D, Williams R J.** Nitric oxide activates metalloprotease enzymes in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; (206): 15-21.
- Murrell G A, Doland M M, Jang D, Szabo C, Warren R F, Hannafin J A.** Nitric oxide: an important articular free radical. *J Bone Joint Surg Am* 1996; (78): 265-274.
- Nagase H.** Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997; (378): 151-160.
- Nagase H, Kashiwagi M.** Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; (5): 94-103.
- Nagase H, Visse R, Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; (69): 562-573.
- Nakano T, Dodd C M, Scott P G.** Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *J Orthop Res* 1997; (15): 213-220.
- Nakata K, Shino K, Hamada M, Mae T, Miyama T, Shinjo H, Horibe S, Tada K, Ochi T, Yoshikawa H.** Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 2001;208-218.
- Nashan D, Luger T A.** [Interleukin 1. 1: Basic principles and pathophysiology]. *Hautarzt* 1999; (50): 680-688.
- Nixon J S, Bottomley K M, Broadhurst M J, Brown P A, Johnson W H, Lawton G, Marley J, Sedgwick A D, Wilkinson S E.** Potent collagenase inhibitors prevent interleukin-1-induced cartilage degradation in vitro. *Int J Tissue React* 1991; (13): 237-241.
- Oh M, Fukuda K, Asada S, Yasuda Y, Tanaka S.** Concurrent generation of nitric oxide and superoxide inhibits proteoglycan synthesis in bovine articular chondrocytes: involvement of peroxynitrite. *J Rheumatol* 1998; (25): 2169-2174.
- Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, Bayliss M T, Iwata K, Nagase H.** Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest* 1992; (66): 680-690.
- Oshita H, Sandy J D, Suzuki K, Akaike A, Bai Y, Sasaki T, Shimizu K.** Mature bovine articular cartilage contains abundant aggrecan that is C-terminally truncated at Ala719-Ala720, a site which is readily cleaved by m-calpain. *Biochem J* 2004; (382): 253-259.
- Pangborn C A, Athanasiou K A.** Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *J Orthop Res* 2005; (23): 1184-1190.

- Pattoli M A, MacMaster J F, Gregor K R, Burke J R.** Collagen and aggrecan degradation is blocked in interleukin-1-treated cartilage explants by an inhibitor of I κ B kinase through suppression of metalloproteinase expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; (315): 382-388.
- Patwari P, Kurz B, Sandy J D, Grodzinsky A J.** Mannosamine inhibits aggrecanase-mediated changes in the physical properties and biochemical composition of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 2000; (374): 79-85.
- Patwari P, Gao G, Lee J H, Grodzinsky A J, Sandy J D.** Analysis of ADAMTS4 and MT4-MMP indicates that both are involved in aggrecanolytic in interleukin-1-treated bovine cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; (13): 269-277.
- Pei D, Weiss S J.** Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; (375): 244-247.
- Pelletier J P, Faure M P, DiBattista J A, Wilhelm S, Visco D, Martel-Pelletier J.** Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-1, and oncogene proteins in experimental osteoarthritis. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1993; (142): 95-105.
- Pelletier J P, Mineau F, Ranger P, Tardif G, Martel-Pelletier J.** The increased synthesis of inducible nitric oxide inhibits IL-1 α synthesis by human articular chondrocytes: possible role in osteoarthritic cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; (4): 77-84.
- Petersen W, Tillmann B.** Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand* 1995; (66): 308-312.
- Petersen W, Tillmann B.** Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl)* 1998; (197): 317-324.
- Poole A R, 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.
- Porter S, Clark I M, Kevorkian L, Edwards D R.** The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 2005; (386): 15-27.
- Pratta M A, Scherle P A, Yang G, Liu R Q, Newton R C.** Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum* 2003a; (48): 119-133.
- Pratta M A, Yao W, Decicco C, Tortorella M D, Liu R Q, Copeland R A, Magolda R, Newton R C, Trzaskos J M, Arner E C.** Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem* 2003b; (278): 45539-45545.
- Proctor C S, Schmidt M B, Whipple R R, Kelly M A, Mow V C.** Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res* 1989; (7): 771-782.
- Ranganathan A C, Nelson K K, Rodriguez A M, Kim K H, Tower G B, Rutter J L, Brinckerhoff C E, Huang T T, Epstein C J, Jeffrey J J, Melendez J A.** Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2001; (276): 14264-14270.
- Reboul P, Pelletier J P, Tardif G, Cloutier J M, 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.
- Rodriguez-Manzaneque J C, Milchanowski A B, Dufour E K, Leduc R, Iruela-Arispe M L.** Characterization of METH-1/ADAMTS1 processing reveals two distinct active forms. *J Biol Chem* 2000; (275): 33471-33479.
- Rodriguez-Manzaneque J C, Westling J, Thai S N, Luque A, Knauper V, Murphy G, Sandy J D, Iruela-Arispe M L.** ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; (293): 501-508.

- Roos H, Lauren M, Adalberth T, Roos E M, Jonsson K, Lohmander L S.** Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls. *Arthritis Rheum* 1998; (41): 687-693.
- Rothenberg M L, Nelson A R, Hande K R.** New drugs on the horizon: matrix metalloproteinase inhibitors. *Stem Cells* 1999; (17): 237-240.
- Roughley P J, McNicol D, Santer V, Buckwalter J.** The presence of a cartilage-like proteoglycan in the adult human meniscus. *Biochem J* 1981; (197): 77-83.
- Roughley P J, Lee E R.** Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994; (28): 385-397.
- Roughley P J, White R J.** The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus. *J Orthop Res* 1992; (10): 631-637.
- Rowley D, Gutteridge J M, Blake D, Farr M, Halliwell B.** Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci (Lond)* 1984; (66): 691-695.
- Rupp S, Seil R, Kohn D.** [Meniscus lesions]. *Orthopade* 2002; (31): 812-828.
- Sandy J D, Neame P J, Boynton R E, Flannery C R.** Catabolism of aggrecan in cartilage explants. Identification of a major cleavage site within the interglobular domain. *J Biol Chem* 1991; (266): 8683-8685.
- Sandy J D, Flannery C R, Neame P J, Lohmander L S.** The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence for the involvement in osteoarthritis of a novel proteinase which cleaves the Glu 373-Ala 374 bond of the interglobular domain. *J Clin Invest* 1992; (89): 1512-1516.
- Sandy J D, Plaas A H, Koob T J.** Pathways of aggrecan processing in joint tissues. Implications for disease mechanism and monitoring. *Acta Orthop Scand Suppl* 1995; (266): 26-32.
- Sandy J D, Thompson V, Doege K, Verscharen C.** The intermediates of aggrecanase-dependent cleavage of aggrecan in rat chondrosarcoma cells treated with interleukin-1. *Biochem J* 2000; (351): 161-166.
- Sandy J D.** Characterization of proteoglycan core and catabolic fragments present in tissues and fluids. *Methods Mol Biol* 2001; (171): 335-345.
- Sandy J D, 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.
- Sandy J D, Westling J, Kenagy R D, Iruela-Arispe M L, Verscharen C, Rodriguez-Mazaneque J C, Zimmermann D R, Lemire J M, Fischer J W, Wight T N, Clowes A W.** Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem* 2001; (276): 13372-13378.
- Sandy J D.** A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolysis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; (14): 95-100.
- Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, Takigawa M.** Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem (Tokyo)* 1998; (123): 431-439.
- Scapigliati G, Ghiara P, Bartalini M, Tagliabue A, Boraschi D.** Differential binding of IL-1 alpha and IL-1 beta to receptors on B and T cells. *FEBS Lett* 1989; (243): 394-398.

- Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K.** Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; (91): 1672-1676.
- Schlaak J F, Pfers I, Meyer Zum Buschenfelde K H, Marker-Hermann E.** Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 1996; (14): 155-162.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J.** Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; (10): 62-70.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle P A.** Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; (10): 2247-2258.
- Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Sendzik J, John T, Shakibaei M.** Effects of curcumin (diferuloylmethane) on nuclear factor kappaB signaling in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2004; (1030): 578-586.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U.** Prometheus: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005.
- Scott P G, Nakano T, Dodd C M.** Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys Acta* 1997; (1336): 254-262.
- Shen B, Melrose J, Ghosh P, Taylor T K F.** Induction of matrix metalloproteinase-2 and -3 activity in ovine nucleus pulposus cells grown in three-dimensional agarose gel culture by interleukin-1 β : a potential pathway of disc degeneration. *Eur Spine J* 2001; (12): 66-75.
- Shin S J, Fermor B, Weinberg J B, Pisetsky D S, Guilak F.** Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide. *J Appl Physiol* 2003; (95): 308-313.
- Sims J E, Acres R B, Grubin C E, McMahan C J, Wignall J M, March C J, Dower S K.** Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; (86): 8946-8950.
- Sims J E, Gayle M A, Slack J L, Alderson M R, Bird T A, Giri J G, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K.** Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; (90): 6155-6159.
- Singer I I, Scott S, Hall G L, Limjuco G, Chin J, Schmidt J A.** 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.
- Skaggs D L, Warden W H, Mow V C.** Radial tie fibers influence the tensile properties of the bovine medial meniscus. *J Orthop Res* 1994; (12): 176-185.
- Smith R J, Rohloff N A, Sam L M, Justen J M, Deibel M R, Cornette J C.** Recombinant human interleukin-1 alpha and recombinant human interleukin-1 beta stimulate cartilage matrix degradation and inhibit glycosaminoglycan synthesis. *Inflammation* 1989; (13): 367-382.
- Smith R J, Chin J E, Sam L M, Justen J M.** Biologic effects of an interleukin-1-receptor antagonist protein on interleukin-1-stimulated cartilage erosion and chondrocyte responsiveness. *Arthritis Rheum* 1991; (34): 78-83.
- Somer L, Somer T.** Is the meniscus of the knee joint a fibrocartilage? *Acta Anat (Basel)* 1983; (116): 234-244.
- Somerville R P, Oblander S A, Apte S S.** Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; (4): 216.
- Spindler K P, Miller R R, Andrish J T, McDevitt C A.** Comparison of collagen synthesis in the peripheral and central region of the canine meniscus. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(303): 256-263.

- Springman E B, Nagase H, Birkedal-Hansen H, Van Wart H E.** Zinc content and function in human fibroblast collagenase. *Biochemistry* 1995; (34): 15713-15720.
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar T R, Curran R D, McIntyre L A, Georgescu H I, Simmons R L, Evans C H.** Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1991; (147): 3915-3920.
- Stanton H, Rogerson F M, East C J, Golub S B, Lawlor K E, Meeker C T, Little C B, Last K, Farmer P J, Campbell I K, Fourie A M, Fosang A J.** ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005; (434): 648-652.
- Stefanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu H I, Evans C H.** Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. *J Rheumatol* 1994; (21): 1892-1898.
- Stevenson F T, Bursten S L, Fanton C, Locksley R M, Lovett D H.** The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; (90): 7245-7249.
- Struglics A, Larsson S, Pratta M A, Kumar S, Lark M W, Lohmander L S.** Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; (14): 101-113.
- Sugimoto K, Iizawa T, Harada H, Yamada K, Katsumata M, Takahashi M.** Cartilage degradation independent of MMP/aggrecanases. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; (12): 1006-1014.
- Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, Sorimachi H.** Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 2004; (53 Suppl 1): S12-S18.
- Szomor Z, Shimizu K, Yamamoto S, Yasuda T, Ishikawa H, Nakamura T.** Externalization of calpain (calcium-dependent neutral cysteine proteinase) in human arthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol* 1999; (17): 569-574.
- Sztrolovics R, White R J, Poole A R, Mort J S, Roughley P J.** Resistance of small leucine-rich repeat proteoglycans to proteolytic degradation during interleukin-1-stimulated cartilage catabolism. *Biochem J* 1999; (339 (Pt 3)): 571-577.
- Takizawa M, Ohuchi E, Yamanaka H, Nakamura H, Ikeda E, Ghosh P, Okada Y.** Production of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2000; (43): 812-820.
- Tanaka T, Fujii K, Kumagai Y.** Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1999; (7): 75-80.
- Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C.** Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; (200): 142-148.
- Tetlow L C, Lees M, Ogata Y, Nagase H, Woolley D E.** 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.
- Tetlow L C, Adlam D J, Woolley D E.** Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 2001; (44): 585-594.
- Tiku M L, Gupta S, Deshmukh D R.** Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 1999; (30): 395-405.
- Tortorella M D, Burn T C, Pratta M A, Abbaszade I, Hollis J M, Liu R, Rosenfeld S A, Copeland R A, Decicco C P, Wynn R, Rockwell A, Yang F, Duke J L, Solomon K, George H, Bruckner R, Nagase H, Itoh Y, Ellis D M, Ross H, Wiswall B H, Murphy K, Hillman M C, Jr., Hollis G F, Newton R C, Magolda R L, Trzaskos J M, Arner E C.** Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999; (284): 1664-1666.

- Tortorella M, Pratta M, Liu R Q, Abbaszade I, Ross H, Burn T, Arner E.** The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J Biol Chem* 2000a; (275): 25791-25797.
- Tortorella M D, Pratta M, Liu R Q, Austin J, Ross O H, Abbaszade I, Burn T, Arner E.** Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000b; (275): 18566-18573.
- Tortorella M D, Malfait A M, Deccico C, Arner E.** The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; (9): 539-552.
- Tortorella M D, Liu R Q, Burn T, Newton R C, Arner E.** Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4). *Matrix Biol* 2002; (21): 499-511.
- Valiyaveetil M, Mort J S, McDevitt C A.** The concentration, gene expression, and spatial distribution of aggrecan in canine articular cartilage, meniscus, and anterior and posterior cruciate ligaments: a new molecular distinction between hyaline cartilage and fibrocartilage in the knee joint. *Connect Tissue Res* 2005; (46): 83-91.
- Van de Loo A A, Arntz O J, Bakker A C, van Lent P L, Jacobs M J, van den Berg W B.** Role of interleukin 1 in antigen-induced exacerbations of murine arthritis. *Am J Pathol* 1995; (146): 239-249.
- Vankemmelbeke M N, Holen I, Wilson A G, Ilic M Z, Handley C J, Kelner G S, Clark M, Liu C, Maki R A, Burnett D, Buttle D J.** Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* 2001; (268): 1259-1268.
- Van Wart H E, Birkedal-Hansen H.** The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; (87): 5578-5582.
- Verbruggen G, Verdonk R, Veys E M, Van Daele P, De Smet P, Van den A K, Claus B, Baeten D.** Human meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1996; (4): 57-63.
- Vincenti M P, Brinckerhoff C E.** 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.
- Visse R, Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; (92): 827-839.
- Verdonk P C, Forsyth R G, Wang J, Almqvist K F, Verdonk R, Veys E M, Verbruggen G.** Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; (13): 548-560.
- Vogel K G, 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.
- Walker P, Erkman M.** The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop* 1975; (109): 184-192.
- 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.
- Webber R J, Harris M G, Hough A J, Jr.** Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res* 1985; (3): 36-42.
- Webber R J, Zitaglio T, Hough A J, Jr.** In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex. *Arthritis Rheum* 1986; (29): 1010-1016.

- Webber R J, Hough A J, Jr.** Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes II. Sulfated proteoglycan synthesis. *Biochimie* 1988; (70): 193-204.
- Webber R J, Zitaglio T, Hough A J, Jr.** Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative response. *J Orthop Res* 1988; (6): 13-23.
- Webber R J.** In vitro culture of meniscal tissue. *Clin Orthop Relat Res* 1990;114-120.
- Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin M U.** The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem* 1997; (272): 7727-7731.
- Westacott C I, Whicher J T, Barnes I C, Thompson D, Swan A J, Dieppe P A.** Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1990; (49): 676-681.
- Westling J, Fosang A J, Last K, Thompson V P, Tomkinson K N, Hebert T, McDonagh T, Collins-Racie L A, LaVallie E R, Morris E A, Sandy J D.** ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain. *J Biol Chem* 2002; (277): 16059-16066.
- Westling J, Gottschall P E, Thompson V P, Cockburn A, Perides G, Zimmermann D R, Sandy J D.** ADAMTS4 (aggrecanase-1) cleaves human brain versican V2 at Glu405-Gln406 to generate glial hyaluronate binding protein. *Biochem J* 2004; (377): 787-795.
- Willey G M, Billetz A C, Matyas J R, Adams M E, McDevitt C A.** Absolute concentrations of mRNA for type I and type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay. *J Orthop Res* 2001; (19): 650-658.
- Willey G M, McDevitt C A.** Matrix protein mRNA levels in canine meniscus cells in vitro. *Arch Biochem Biophys* 1998; (353): 10-15.
- Xie Z, Singh M, Singh K.** Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2004; (279): 39513-39519.
- Yamamoto S, Shimizu K, Shimizu K, Suzuki K, Nakagawa Y, Yamamuro T.** Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum* 1992; (35): 1309-1317.
- Yamaoka S, Courtois G, Bessia C, Whiteside S T, Weil R, Agou F, Kirk H E, Kay R J, Israel A.** Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell* 1998; (93): 1231-1240.
- Yamazaki R, Kawai S, Matsuzaki T, Kaneda N, Hashimoto S, Yokokura T, Okamoto R, Koshino T, Mizushima Y.** Aceclofenac blocks prostaglandin E2 production following its intracellular conversion into cyclooxygenase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 1997; (329): 181-187.
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; (59): 455-461.
- Yu W H, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner J F, Jr.** TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000; (275): 31226-31232.
- Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie L A, LaVallie E R, Morris E A, Flannery C R.** Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. *Biochim Biophys Acta* 2006; (1760): 517-524.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich für die Übernahme des Referates meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sowie die vielen hilfreichen Vorschläge bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Mentlein recht herzlich bedanken.

Danken möchte ich weiterhin dem Direktorium des Anatomischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Nutzung der Räumlichkeiten und der Geräte. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Schünke für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe, in der ich mich stets gut aufgehoben gefühlt habe, die Untersuchungen meiner Arbeit durchzuführen.

Zu großem Dank bin ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. rer. nat. Kurz verpflichtet. Ich möchte ihm danken für die intensive Betreuung meiner Arbeit, seine Hilfsbereitschaft, die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise, seinen Optimismus und seine unendliche Geduld. Seine Unterstützung hat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke!

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Schünke für das motivierende Arbeitsklima und die Zusammenarbeit. Ein großer Dank gebührt Rita und Frank, ohne deren Hilfe vieles nicht möglich gewesen wäre. Auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Mentlein, Martina und Miriam, möchte ich meinen Dank aussprechen. Weiterhin danke ich Herrn Frandsen und Herrn Schwiedeps für ihre Unterstützung bei technischen Problemen, Frau Walluk für die Fotoarbeiten und ganz besonders Herrn Franke bei der Erstellung der schematischen Darstellungen. Christian Domm möchte ich danken für seine Hilfe bei der Durchsicht der Arbeit. Allen anderen Mitarbeitern sowie Doktoranden des Anatomischen Institutes, die hier namentlich nicht erwähnt sind, danke ich für die vielen kleinen Hilfestellungen, die ich im Laufe meiner Arbeit erhalten habe sowie die freundschaftliche Atmosphäre. Herzlichen Dank auch an Frau Offermann für die Gespräche, die immer eine nette Abwechslung neben der Arbeit waren. Herrn Prof. Dr. med. Sandy (Shriners Hospital Research Center, Tampa, Florida, USA) möchte ich danken für die Hilfe bei der Durchführung der Western Blots sowie die Bereitstellung der Antikörper. Auch Frau Dr. rer. nat. Dreier (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Münster) danke ich vielmals für ihre Hilfe bei der Durchführung der zymographischen Analysen und ihre vielen hilfreichen Ratschläge. Weiterhin danke ich der Hofschlachtereier Muhs für die jahrelange Versorgung mit den Kniegelenken.

Meinem Freund Heiko danke ich, dass er während der Zeit der Anfertigung der Arbeit sehr viel Verständnis gezeigt und mir jede mögliche liebevolle Unterstützung gewährt hat und einfach immer für mich da war. Meiner Familie danke ich, dass sie mich in allen Lebenslagen unterstützt, mich immer bestärkt und mir mein Studium ermöglicht haben. Danke Mama und Papa für die vielen Pakete und aufmunternden Telefonate. Auch bei Ruda und Harm möchte ich mich für so vieles bedanken.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Lemke
Vorname: Angelika Konsuela
Geburtsdatum: 05.12.1976
Geburtsort: Bromberg (Polen)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULE

08/1983 - 07/1987 Grundschule, Lahr/Schwarzwald
08/1987 - 06/1996 Max-Planck-Gymnasium, Lahr/Schwarzwald
06/1996 Abitur

STUDIUM

10/1996 Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für den Studiengang Biologie (Diplom)
10/1998 Vordiplom
06/2001 Diplomprüfung in den Fächern Zoologie (Hauptfach), Biologische Meereskunde und Biochemie (Nebenfächer)
07/2001 - 08/2002 Diplomarbeit mit dem Thema: „Untersuchungen zur mechanisch-induzierten Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels“

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

10/2000 - 02/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut der Haustierkunde der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
Betreuung des Praktikums: „Anatomisch-morphologische Übungen für Fortgeschrittene“.
10/2001 - 01/2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
Betreuung des Praktikums: „Biologie für Mediziner“.

BERUFSTÄTIGKEIT

seit 09/2002 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin (Promotionsstelle) am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

PUBLIKATIONEN

1. Pufe T, **Lemke AK**, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R (2004) Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am J Pathol* 164 (1): 185-192.
2. Kurz B, **Lemke AK**, Kehn M, Domm C, Patwari P, Frank EH, Grodzinsky AJ, Schünke M (2004) Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. *Arthritis Rheum* 50 (1): 123-130.
3. Pufe T, Kurz B, Petersen W, Varoga D, Mentlein R, Kulow R, **Lemke AK**, Tillmann B (2005) The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system. *Ann Anat* 187 (5-6): 461-472.
4. Kurz B, **Lemke AK**, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schünke M (2005) Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* 187 (5-6): 473-485.

POSTER

Arbeitstagung der Anatomische Gesellschaft, Würzburg

Lemke AK, Klüsener C, Schünke M, Sellckau R, Kurz B (2003)

Einfluss von Interleukin-1 auf den Proteoglykangehalt, die mechanischen Eigenschaften und die Expression von Matrixmetalloproteinasen des Meniskusgewebes.

Orthopaedic Research Society (ORS), San Francisco (USA)

Kurz B, **Lemke AK**, Klüsener C, Sandy JD, Sellckau R, Grodzinsky AJ, Schünke M (2004)

Influence of IL-1 on glycosaminoglycan content, biomechanical properties, biosynthetic activity and expression of matrix-degrading enzymes in bovine meniscus tissue.

International Cartilage Repair Society (ICRS), Gent (Belgien)

Lemke AK, Sandy JD, Klüsener C, Fay J, Sellckau R, Grodzinsky AJ, Schünke M, Kurz B (2004)

Influence of interleukin-1 (IL-1) on meniscus destruction.

Orthopaedic Research Society (ORS), Chicago (USA)

Lemke AK; Dreier R; Walther C, Fay J, Mentlein R, Schünke M, Kurz B (2006) IL-1 induces gene expression of matrix-degrading enzymes in bovine meniscal cells and activates nuclear factor kappa B (NF- κ B): influence of an antioxidant (SOD)

Orthopaedic Research Society (ORS), Chicago (USA)

Lemke AK, Lee J, Sandy JD, Grodzinsky AJ, Mentlein R, Fay J, Schünke M, Kurz B (2006) IL-1-induced matrix degradation and gene expression in the meniscus depends on the anatomical location

VORTRÄGE

Forschungsschwerpunkt Muskel- und Skelettsystem, Kiel

Lemke AK, Klüsener C, Sandy J D, Sellckau R, Grodzinsky AJ, Schünke M, Kurz B (2004) Die Destruktion des Meniskus durch Zytokine

Deutscher Orthopädenkongress, Berlin

Lemke AK, Fay J, Klüsener C, Schünke M, Sandy JD, Sellckau R, Kurz B (2004) Untersuchungen zur Destruktion der Extrazellulärmatrix des Meniskus durch Interleukin-1

“Biology of the meniscus” discussion group, Washington, D.C. (USA)

Kurz B, **Lemke AK**, Klüsener C, Fay J, Sandy JD, Sellckau R, Schünke M (2005) Effects of IL-1 on tissue from superficial and deeper zones of bovine meniscus in comparison to bovine articular cartilage

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Die Dissertation wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Der Zulassung von Zuhörerinnen und Zuhörern bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den

.....
(Angelika Lemke)