

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

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON
17 BETA-ESTRADIOL AUF
GELENKNORPELGEWEBE
UNTER PROINFLAMMATORISCHEN
BEDINGUNGEN IN VITRO**

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

vorgelegt von
HENDRIK NAUJOKAT
aus Hamburg

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Kurz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Seekamp
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2012
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 18.12.2012

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Aufbau des Gelenks und Funktion des Gelenkknorpels	1
1.3 Epidemiologie und Klinik der Osteoarthritis	3
1.4 Genese der Osteoarthritis	4
1.4.1 Einfluss von Interleukin-1	5
1.4.2 Funktion und Induktion von Matrixmetalloproteinasen.....	5
1.4.3 Funktion und Induktion von Aggrecanasen	6
1.4.4 Stickstoffmonoxid und die induzierbare NO-Synthase.....	7
1.5 Estradiol und Osteoarthritis	7
1.5.1 Estradiolsynthese	8
1.5.2 Estradiolabhängige Signaltransduktion	9
1.5.3 Hormonersatztherapie	12
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Reagenzien	14
2.2 Kulturbedingungen.....	15
2.3 Herstellung der bovinen Knorpelimplantate.....	16
2.4 Herkunft der humanen Knorpelimplantate.....	17
2.5 Vorversuche	19
2.5.1 Estradiol-Verdünnungsmethoden.....	19
2.5.2 Positivkontrolle Estradiolwirkung.....	20
2.5.3 Messung der Zellproliferation.....	21
2.5.4 Rezeptornachweis	21
2.6 Versuchsablauf der Hauptversuche	21
2.7 Messung der GAG-Konzentration in den Kulturüberständen.....	22
2.8 Messung der NO-Konzentration in den Kulturüberständen	23
2.9 Durchführung der realtime RT-PCR	23
2.9.1 Isolierung der RNA	24
2.9.2 Bestimmung der RNA-Menge	24

2.9.3	Reinigung der RNA.....	25
2.9.4	Vervielfältigung der RNA.....	25
2.9.5	Auswertung der realtime RT-PCR Ergebnisse.....	27
2.10	Histologische Untersuchungen des Knorpelgewebes.....	28
2.10.1	Färbung der histologischen Schnitte mit Toluidinblau	28
2.10.2	Färbung der histologischen Schnitte mit Hämatoxylin	28
2.10.3	Färbung der histologischen Schnitte nach der TUNEL-Methode.....	29
2.10.4	Immunhistochemische Färbung der Estradiolrezeptoren alpha und beta.....	29
2.10.5	Auswertung der histologischen Präparate.....	31
2.11	Statistische Auswertung.....	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Vergleich der Estradiol-Verdünnungsmethoden.....	32
3.1.1	Schlussfolgerung	33
3.2	Messungen zur Proliferation von MCF-7-Zellen unter Estradioleinfluss ..	34
3.3	Rezeptornachweis im Gelenkknorpel.....	35
3.4	Lichtmikroskopische Vitalitätsuntersuchung und Darstellung des Knorpelgewebes	36
3.5	Untersuchungen zum GAG-Verlust.....	40
3.5.1	Einfluss von Estradiol auf den GAG-Verlust.....	40
3.5.2	Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf den GAG-Verlust.....	41
3.6	Untersuchungen zur NO-Freisetzung.....	42
3.6.1	Einfluss von Estradiol auf die NO-Freisetzung	42
3.6.2	Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die NO-Konzentration.....	43
3.7	Untersuchungen zur Transkription des Enzyms iNOS.....	44
3.7.1	Einfluss von Estradiol auf die Transkription von iNOS.....	45
3.7.2	Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die Transkription von iNOS	46
3.8	Untersuchungen zur Transkription matrixdegradierender Enzyme	47
3.8.1	Einfluss von Estradiol auf die Transkription matrix- degradierender Enzyme.....	47
3.8.2	Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die Transkription matrixdegradierender Enzyme	49
3.9	Untersuchungen zur Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan	50
3.9.1	Einfluss von Estradiol auf die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan	51

3.9.2	Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan.....	53
3.10	Untersuchungen am humanen Gelenkknorpel	55
4.	Diskussion	57
4.1	Resümees der Vorversuche.....	57
4.2	Das verwendete in vitro Explantatmodell	59
4.3	Zeichen der Zellschädigung in den histologischen Untersuchungen	61
4.4	Einfluss von Estradiol auf den GAG-Verlust.....	62
4.5	Einfluss von Estradiol auf die NO-Freisetzung sowie die iNOS-Transkription	63
4.6	Einfluss von Estradiol auf die Transkription matrixdegradierender Enzyme.....	65
4.7	Einfluss von Estradiol auf die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan	67
4.8	Einfluss von Estradiol auf humanes Knorpelgewebe.....	68
4.9	Schlussfolgerung	70
4.10	Ausblick	72
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis.....	77
	Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
aqua dest.	destilliertes Wasser
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter = 10^{-2} Meter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	ethylen diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent essay
ER	Estradiolrezeptor
Estradiol	17 beta-Estradiol
et al.	et alii oder et aliae (und andere)
etc.	et cetera
EZM	Extrazellulärmatrix
FG	Feuchtgewicht
FKS	fetales Kelberserum
g	Gravitationskraft
GAG	Glykosaminoglykane
h	Stunde
HBSS	Hank's Buffering Salt Solution
IC ₅₀	Konzentration der halbmaximalen Inhibition eines Antagonisten
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1 beta
M	molar = Mol/Liter
MCF-7	Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie

min	Minute
ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
μ l	Mikroliter = 10^{-6} Liter
μ m	Mikrometer = 10^{-6} Meter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NF- κ B	nuclear factor- κ B
ng	Nanogramm = 10^{-9} Gramm
nm	Nanometer = 10^{-9} Meter
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PBE	phosphate-buffered saline with EDTA
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Picogramm = 10^{-12} Gramm
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
Tamoxifen	4-Hydroxytamoxifen
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UN	Vereinte Nationen
v.a.	vor allem
vs.	versus (gegenüber gestellt)
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	Seite
Abb. 1: Schematisierter Aufbau eines Gelenks.....	2
Abb. 2: Estradiolabhängige Signaltransduktion.....	10
Abb. 3: Herstellung von Knorpelimplantaten.....	17
Abb. 4: Makroskopische Darstellung eines humanen Femurresektats.....	18
Abb. 5: Versuchsablauf der Hauptversuche.....	22
Abb. 6: GAG-Verlust in Abhängigkeit verschiedener Verdünnungsmethoden.....	32
Abb. 7: NO-Freisetzung in Abhängigkeit verschiedener Verdünnungsmethoden.....	33
Abb. 8: DNA-Gehalt in MCF-7-Zellkulturen unter Estradioleinfluss.....	34
Abb. 9: Immunhistologischer Nachweis der Estradiolrezeptoren alpha und beta.....	35
Abb. 10: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpelimplantate (Toluidinblau).....	36
Abb. 11: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpelimplantate (Hämatoxylin).....	37
Abb. 12: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpelimplantate (TUNEL).....	38
Abb. 13: Lichtmikroskopische Darstellung des humanen Knorpelgewebes.....	39
Abb. 14: Einfluss von Estradiol auf den GAG-Verlust.....	40
Abb. 15: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf den GAG-Verlust.....	41
Abb. 16: Einfluss von Estradiol auf die NO-Konzentration.....	43
Abb. 17: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die NO-Konzentration.....	44
Abb. 18: Einfluss von Estradiol auf die iNOS-Transkription.....	45
Abb. 19: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die iNOS-Transkription.....	46
Abb. 20: Einfluss von Estradiol auf die MMP-3-Transkription.....	47
Abb. 21: Einfluss von Estradiol auf die ADAMTS-4-Transkription.....	48
Abb. 22: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die MMP-3-Transkription.....	49
Abb. 23: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die ADAMTS-4-Transkription.....	50
Abb. 24: Einfluss von Estradiol auf die Kollagen Typ II-Transkription.....	51
Abb. 25: Einfluss von Estradiol auf die Aggrecan-Transkription.....	52
Abb. 26: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die Kollagen Typ II-Transkription.....	53
Abb. 27: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die Aggrecan-Transkription.....	54
Abb. 28: GAG-Verlust des humanen Knorpelgewebes.....	55
Abb. 29: NO-Freisetzung des humanen Knorpelgewebes.....	56
Tab. 1: Übersicht über die im Knorpel nachgewiesenen Aggrecanasen.....	6
Tab. 2: Darstellung der angewandten Estradiol-Verdünnungsmethoden.....	20
Tab. 3: Übersicht über den realtime RT-PCR Zyklus.....	26
Tab. 4: Übersicht über die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer.....	26
Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Erstantikörper gegen die Estradiolrezeptoren.....	30

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Osteoarthrose, eine Gelenkerkrankung in dessen Mittelpunkt die fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels steht, erlebt aufgrund unserer alternden Gesellschaft eine steigende Inzidenz. Epidemiologische Untersuchungen zeigen die Besonderheit, dass postmenopausale Frauen besonders häufig unter Arthrose leiden (siehe 1.3), so dass man vermutet, die Knorpeldegeneration sei mit einem Mangel an Estradiol assoziiert. Experimente mit isolierten Knorpelzellen konnten den vermuteten protektiven Effekt des Estradiols überwiegend bestätigen (siehe 1.5), wohingegen Daten zu der Wirkung von Estradiol auf den Gewebeverband kaum vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wird daher an einem in vitro Modell untersucht, welchen Einfluss Estradiol auf Knorpelimplantate unter proinflammatorischen Bedingungen ausübt.

1.2 Aufbau des Gelenks und Funktion des Gelenkknorpels

Ein Gelenk ist die bewegliche Verbindung von zwei oder mehr Knochen. Auf der einen Seite soll es größtmögliche Beweglichkeit zulassen, auf der anderen Seite muss eine ausreichende Stabilität vorhanden sein. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, greift der knöchernen Gelenkkopf in die knöchernen Gelenkpfanne, wobei die artikulierenden Flächen jeweils mit hyalinem Knorpel überzogen und durch den Gelenkspalt voneinander getrennt sind. Begrenzt wird die Gelenkhöhle durch die bindegewebige Gelenkkapsel, deren innere Oberfläche von der Synovialmembran (Gelenkschleimhaut) ausgekleidet ist. Diese Synovialmembran sezerniert die Synovialflüssigkeit in das Innere des Gelenks und den Gelenkspalt. Außerhalb der Gelenkkapsel befindet sich der Weichteilmantel, bestehend aus Muskulatur, Sehnen und Bändern. Dieser ist für die Bewegungen zuständig und trägt zur Stabilisierung bei (siehe Abb. 1).

Gelenkknorpelgewebe hat die Funktion mechanische Druckbeanspruchung, die zwischen artikulierenden Knochen auftritt, als Stoßdämpfer abzufangen und gleichmäßig auf die Knochen zu übertragen (Garstang et al. 2006). Das Gewebe gewährleistet dadurch einen reibungslosen Ablauf der Gelenkbewegung und verhindert Gelenkschäden. Die Morphologie und Biochemie des Gelenkknorpels sind hierfür optimal an die biomechanischen Anforderungen adaptiert und unterliegen lebenslangen Anpassungsprozessen (Lin et al. 2006). Bei der Regulation der Umbauprozesse spielen Mediatoren (Moleküle der interzellulären Signalübermittlung) eine Rolle, die von Chondrozyten und Zellen der Synovialmembran synthetisiert werden (Lohmander 1988).

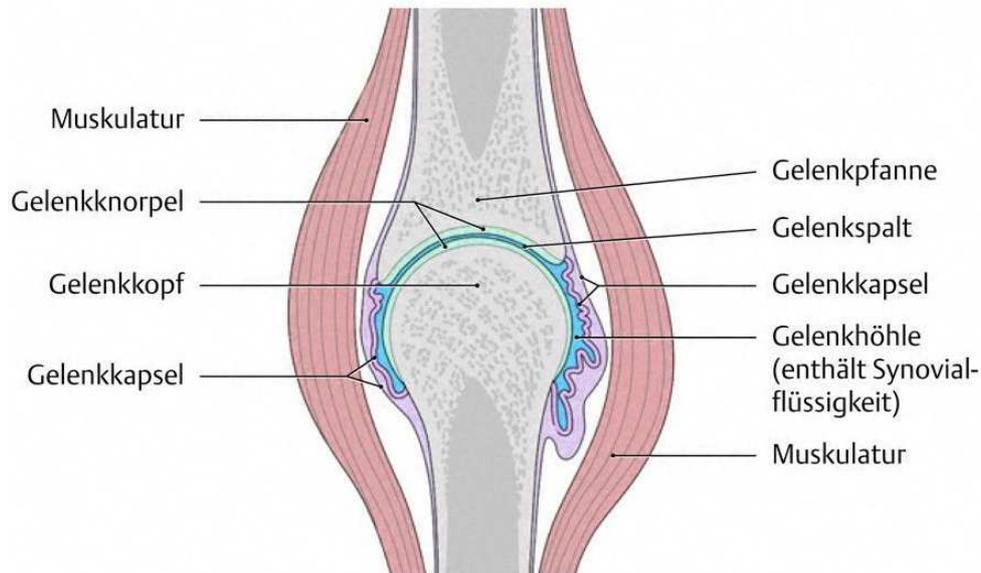


Abb. 1: Schematisierter Aufbau eines Gelenks (Schünke et al. 2006)

Die Abbildung zeigt den schematisierten Aufbau eines Gelenks. Der knöcherne Gelenkkopf greift in die knöcherne Gelenkpfanne, wobei die artikulierenden Flächen jeweils mit hyalinem Knorpel überzogen sind. Dazwischen befindet sich der Gelenkspalt, welcher wie die gesamte Gelenkhöhle mit Synovialflüssigkeit gefüllt ist. Außerhalb der Gelenkkapsel befindet sich der Weichteilmantel, bestehend aus Muskulatur, Sehnen und Bändern.

Beim Gelenkknorpel handelt es sich um hyalinen Knorpel, welcher weder durchblutet oder innerviert ist, noch Lymphgefäße enthält. Die Ernährung dieses bradytrophen Gewebes wird durch Diffusion und Konvektion aus der Synovialflüssigkeit gewährleistet. Das adulte Knorpelgewebe setzt sich zusammen aus 1-10 % Chondrozyten (knorpelspezifische Zellen), 15-30 % extrazellulärer Matrix und 65-80 % Wasser (Huber et al. 2000). Die Chondrozyten liegen in Gruppen zu zwei bis drei Zellen zusammen (Chondrone) und synthetisieren die extrazelluläre Matrix (EZM), welche vor allem aus Kollagenen und Proteoglykanen besteht. Bei den Kollagenen ist der Typ II vorherrschend (Auf der Heide et al. 2004). Die Proteoglykane sind aufgebaut aus einem Kernprotein (z.B. Aggrekan) und Glykosaminoglykanseitenketten (GAG), welche viele negative Ladungen tragen (Poole et al. 2002).

Für die Funktion des Gewebes ist von entscheidender Bedeutung, dass die Kollagenfibrillen eine arkadenartige Anordnung haben. Sie sind im subchondralen Knochen verankert und ziehen zunächst senkrecht in Richtung Knorpeloberfläche, um im weiteren Verlauf einen Bogen zu machen und wieder zum Knochen hinab zu ziehen. In diese Kollagenschlaufen sind die Proteoglykane eingelagert, die sich durch die negativen Ladungen gegenseitig abstoßen. Zusätzlich ziehen die negativen Ladungen Wasser und freie Ionen in das Gewebe hinein, wodurch ein Schwellungsdruck entsteht. Wird das Gewebe bei mechanischer Beanspruchung zusammengedrückt, entweichen Wasser und Ionen, während die EZM zunehmend verdichtet wird. Die Flüssigkeit kann durch die erhöhte Reibung an der

verdichteten EZM schwerer abfließen, was einen Anstieg des hydrostatischen Drucks zur Folge hat, außerdem erhöhen sich die Abstoßungskräfte der negativen Ladungen. Das Gewebe bietet dem mechanischen Druck einen zunehmenden Gegendruck, bis ein Equilibrium herrscht. Bei Entlastung expandiert das Gewebe zum Ursprungsvolumen, indem sich die negativen Ladungen abstoßen und Wasser samt Ionen wieder einströmt. Die Biomechanik des Gelenkknorpels ist somit von der Unversehrtheit der Kollagen-Arkaden sowie von einem optimalen Gehalt an GAG abhängig (Kurz et al. 2001; Lüllmann-Rauch 2009).

1.3 Epidemiologie und Klinik der Osteoarthritis

Die Osteoarthritis (Synonym Arthritis oder im Englischen osteoarthritis, im Folgenden als Arthritis bezeichnet) ist eine chronische Gelenkerkrankung mit fortschreitender Zerstörung des Gelenkknorpels. Die Angaben zu Prävalenz und Inzidenz variieren, je nachdem ob die Diagnose radiologisch oder durch klinische Untersuchungen gestellt wird. In der Gesundheitsberichterstattung der Bundesrepublik Deutschland wird angegeben, dass ab dem Alter von 50 bis 60 Jahren bei 10 bis 31 Prozent der Gesamtbevölkerung Deutschlands eine radiologisch gesicherte Arthritis des Hüft- und Kniegelenks vorliegt, die bei der Hälfte der Betroffenen symptomatisch wird. Sowohl Prävalenz als auch Inzidenz steigen mit höherem Alter an. Auffallend an den Statistiken ist, dass in der Alterskategorie unter 50 Jahren Männer eine höhere Inzidenz als Frauen haben, während ab einem Alter von 50 Jahren Frauen häufiger an der Arthritis erkranken (Felson et al. 1998; Richette et al. 2003). Die Behandlungskosten der Arthritis betragen in Deutschland laut einer Statistik des Robert-Koch-Instituts 7,2 Milliarden Euro pro Jahr (Robert-Koch-Institut 2006a). Noch weitaus höhere Kosten entstehen volkswirtschaftlich durch Rehabilitationsmaßnahmen, Arbeitsausfälle und Frühberentungen. Die Skeletterkrankungen nehmen bei den Ursachen für den vorzeitigen Rentenzugang mit ca. 20 Prozent den zweiten Rang hinter psychischen Erkrankungen ein (Robert-Koch-Institut 2006b). Durch den demographischen Wandel und die steigende Inzidenz im hohen Lebensalter, wird die Arthritis in Zukunft noch weiter an Bedeutung gewinnen. Um die Relevanz der Erkrankungen und Verletzungen des Halte- und Bewegungsapparats zu verdeutlichen, hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) zusammen mit den Vereinten Nationen (UN) im Jahre 2000 die „Bone and Joint Decade 2000-2010“ ausgerufen. „Es gibt einen gesellschaftlichen Anspruch auf Mobilität bis ins hohe Alter“, sagt Prof. Dr. Frank, Präsident der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie. Diese Aussage verdeutlicht, welche eine hohe Erwartungshaltung von unserer Gesellschaft an den eigenen Bewegungsapparat gestellt wird, und dass durch Arthritis bedingte Behinderungen und Einschränkungen des Alltags nicht mit diesem Selbstverständnis übereinstimmen.

Klinisch ist diese Krankheit gekennzeichnet durch schmerzhafte Bewegungseinschränkungen, die medikamentöse oder physikalische Behandlungen erforderlich machen. Diese Therapien sind jedoch keineswegs kurativ wirksam, so dass bei einem erheblichen Teil der Patienten die Schädigungen im Gelenk über Jahre fortschreiten, die Symptomatik sich verschlechtert und dadurch die Lebensqualität weiter abnimmt. Kurative Therapien sind heute noch nicht möglich. Endpunkt dieser Krankheit stellt häufig der operative Gelenkersatz mittels einer Endoprothese dar. Diese Therapieform ist jedoch mit möglichen bleibenden Funktionsdefiziten, Schmerzen, Operationskomplikationen und einem Krankenhausaufenthalt verbunden, so dass sie als Ultima ratio angesehen werden muss (Santaguida et al. 2008).

1.4 Genese der Osteoarthrose

Nuki beschreibt die Arthrose als das klinische oder pathologische Resultat einer Vielzahl von Funktionsstörungen, welche zu strukturellen oder funktionellen Störungen des Gelenks führen (Nuki 1999). Die Arthrose wird als eine chronisch degenerative Erkrankung angesehen, in dessen Zentrum die Schädigung des Gelenkknorpels steht. Zu den Risikofaktoren zählen systemische Einflüsse wie das Alter, die genetische Grundlage, Geschlecht und Hormonstatus, sowie lokale biomechanische Einflüsse wie Gelenkverletzungen, Adipositas, Gelenkfehlstellungen (z.B. Genu varum und Genu valgum) sowie die Bewegungsintensität (Garstang et al. 2006). Zu Beginn der Arthroseentwicklung finden sich histologisch Auffaserungen der Knorpelextrazellulärmatrix mit Freilegung von Kollagenfasern durch den Verlust von Proteoglykanen. Ursächlich dafür ist ein Ungleichgewicht zwischen Matrixumbauvorgängen (Aigner et al. 2002). Dies führt zu Erosionen und zur Verminderung der Knorpelschichtdicke, was radiologisch als Gelenkspaltverschmälerung sichtbar wird. Im Folgenden kommt es zur entzündlichen Veränderung der Synovialmembran (Synovialitis) mit Infiltration von Leukozyten und Sekretion von inflammatorischen Mediatoren in die Synovialflüssigkeit. Diese Mediatoren führen im Sinne eines Circulus vitiosus zu weiteren Knorpelschäden (Loeuille et al. 2005), bis hin zur so genannten Knochenglatze (freiliegender Knochen ohne Knorpelüberzug). Im Verlauf kommt es auch zum Umbau der knöchernen Gelenkanteile, wie einer subchondralen Osteosklerose, Geröllzysten und Osteophyten (Gunther et al. 1997). Die Gelenkfunktion wird sukzessive beeinträchtigt.

1.4.1 Einfluss von Interleukin-1

Zytokine sind lösliche regulatorische Proteine, die in entzündlichen und immunologischen Prozessen eine entscheidende Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielen. Es werden pro- und antiinflammatorisch wirkende Zytokine unterschieden. Es hat sich gezeigt, dass die proinflammatorischen, katabol wirkenden Zytokine (v.a. Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor alpha) in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthrose in erhöhten Konzentrationen vorliegen (van de Loo et al. 1995). Während die physiologische Konzentration von IL-1 in der Gelenkflüssigkeit 6,6-10 pg/ml beträgt (Cameron et al. 1997), ist bei verschiedenen Arthroseerkrankungen eine bis um den Faktor 20 – 30 erhöhte IL-1 Konzentration nachgewiesen worden (Schlaak et al. 1996). Bei entzündlichen Prozessen in Gelenken wird IL-1 von einer Vielzahl von Zellen (Makrophagen, Granulozyten, Chondrozyten, Synovialozyten) sezerniert. IL-1 ist am Fortschreiten der Knorpeldegradation beteiligt. So ist die Proteoglykan- und Kollagensynthese unter Einfluss von IL-1 vermindert (Huch et al. 1997) und die Produktion von Stickoxid stark gesteigert (Stadler et al. 1991). Des Weiteren werden Enzyme zum Abbau der extrazellulären Matrix verstärkt synthetisiert (Koshy et al. 2002).

1.4.2 Funktion und Induktion von Matrixmetalloproteinasen

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs), von denen über 20 Typen beim Menschen bekannt sind, gehören zur Familie der Endopeptidasen (Malemud 2006), welche Peptidbindungen innerhalb von Proteinen an bestimmten Aminosäuresequenzen spalten. Unter physiologischen Bedingungen sind sie an Abbau- und Umbauprozessen von Geweben beteiligt, so zum Beispiel bei der Embryonalentwicklung, Zellproliferation und Zellmigration, Osteogenese und Wundheilung nach Verletzungen (Nagase et al. 2006). Im Knorpel gelten die MMPs zusammen mit den Aggrecanasen als hauptverantwortliche Enzyme für den Umsatz der Kollagene und Proteoglykane der EZM (Mort et al. 2001). MMPs werden von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert, hierunter Makrophagen, Fibroblasten, Chondrozyten und Epithelzellen (Dreier et al. 2001). Die Regulation der MMP-Expression auf mRNA Ebene erfolgt z.B. durch inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α), Wachstumsfaktoren und Hormone (Benbow et al. 1997). Die MMPs werden als inaktive Vorstufe in den Extrazellularraum sezerniert, die Aktivierung erfolgt dann über komplexe, fein regulierte Kaskaden. Spezifische Inhibitoren (TIMPs, „tissue inhibitors of metalloproteins“) hemmen die Aktivität der MMPs im gesunden Gewebe (Baker et al. 2002), indem sie an das aktive Zentrum binden (Apte et al. 1995).

Bei pathologischen Prozessen kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren kommen, was zu einer erhöhten Aktivität der MMPs und zu einem vermehrten Abbau der EZM führt (Dean et al. 1989; Pelletier et al. 1990). Bei der Entwicklung der

Osteoarthrose scheinen vor allem MMP-1, -3 und -13 von Bedeutung zu sein (Bluteau et al. 2001). Im Tiermodell hat sich gezeigt, dass durch die Blockade der Expression von MMP-3 die Knorpelschäden im Verlauf der Arthrose geringer sind (Blom et al. 2007). In klinischen Studien hingegen konnten pharmakologische Inhibitoren der MMPs bisher nicht erfolgreich eingesetzt werden (Murphy et al. 2008).

1.4.3 Funktion und Induktion von Aggrekanasen

Die Aggrekanasen gehören wie die MMPs zu der Gruppe der Endopeptidasen. 1999 wurde das erste Enzym beschrieben, seitdem werden sie der Gruppe der ADAMTS („a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs“), die zurzeit aus 19 Mitgliedern besteht, zugeordnet (Abbaszade et al. 1999; Tortorella et al. 1999). Die Aggrekanasen werden wie die MMPs auch als inaktive Vorstufen synthetisiert, bei diesen jedoch erfolgt die Aktivierung wahrscheinlich noch intrazellulär durch Abspaltung der pro-Domäne (Malfait et al. 2008; Longpre et al. 2009). Während MMPs verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix umsetzen können, sind Aggrekanasen an der Spaltung von Proteoglykanen und dabei im Besonderen von Aggrekan beteiligt (Nagase et al. 2003). Eine Übersicht über die im Knorpel nachgewiesenen Aggrekanasen zeigt Tab. 1.

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

Tab. 1: Übersicht über die im Knorpel nachgewiesenen Aggrekanasen

Im Gelenkknorpel konnten bisher die Aggrekanasen ADAMTS -1, -4 und -5 nachgewiesen werden. Da Aggrekan den größten Anteil der Proteoglykane im Knorpelgewebe ausmacht, wird den Aggrekanasen ein maßgeblicher Anteil am Turnover im Knorpelgewebe zugeschrieben (Hardingham et al. 1995). Auch die MMPs spalten Aggrekan, jedoch an anderer Aminosäuresequenz als die Aggrekanasen (Porter et al. 2005), so dass spezifische Spaltprodukte entstehen. Durch Markierung der so genannten NITEGE-Fragmente (benannt nach der Schnittstelle G₁-NITEGE³⁷³) mit Antikörpern ist ein Nachweis Aggrekanase-spezifischer Spaltprodukte möglich. Sowohl im Knorpel als auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthrose wurden erhöhte Konzentrationen dieser spezifischen Fragmente gefunden (Lark et al. 1997). Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass den Aggrekanasen eine entscheidende Bedeutung bei der Degeneration von Gelenkknorpel

zukommt (Lohmander et al. 1993; Sandy 2006). Es gibt hier jedoch unterschiedliche Erkenntnisse über die degenerative Potenz der einzelnen Typen sowie ihrer Induktion und Regulation in Geweben verschiedener Spezies (Nagase et al. 2003; Huang et al. 2008).

1.4.4 Stickstoffmonoxid und die induzierbare NO-Synthase

Stickstoffmonoxid (NO) zählt zu den reaktiven Sauerstoffmolekülen. Es ist eine chemisch instabile und reaktionsfreudige Substanz mit einer Halbwertszeit im Sekundenbereich. NO erfüllt verschiedene physiologische Aufgaben in der Signaltransduktion, ist in pathologisch erhöhten Konzentrationen aber auch für oxidativen Stress mitverantwortlich, der das oxidative Gleichgewicht der Zelle stören kann. NO scheint als Mediator an der Knorpeldestruktion der Osteoarthritis beteiligt zu sein (Lotz 1999; Clancy et al. 2004; Henrotin et al. 2005) und ist hierbei auch in der Synovialflüssigkeit vermehrt nachweisbar (Karan et al. 2003). Erhöhte Konzentrationen von NO werden für die Hemmung der Kollagen- und Proteoglykansynthese (Hauselmann et al. 1994) sowie die Induktion von matrixdegradierenden Enzymen (MMPs und Aggrecanasen) mitverantwortlich gemacht (Sasaki et al. 1998; Stevens et al. 2008). Des Weiteren kommt es durch erhöhte NO-Konzentrationen bei Chondrozyten zu einem Rückgang der Zellproliferation und zur Induktion von Apoptose (Blanco et al. 1995). NO ist außerdem ein wichtiger Mediator der Signalkaskade von Zytokinen (Clancy et al. 2004). IL-1 bewirkt im Knorpelgewebe eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), wodurch vermehrt NO gebildet wird (Schmidt et al. 2010).

1.5 Estradiol und Osteoarthritis

Dass Estradiol eine Rolle bei der Osteoarthritis spielen könne, wurde das erste Mal vor einem knappen Jahrhundert von Cecil und Archer vermutet, indem sie die „Arthritis der Menopause“ als sich schnell entwickelnde Hand- und Kniegelenksarthritis zeitlich korrelierend zum Ende der Menstruation beschrieben (Cecil et al. 1925). Die heute zur Verfügung stehenden epidemiologischen Daten weisen ebenfalls auf eine Assoziation von klinischer Arthritismanifestation und dem Eintreten der Postmenopause hin (siehe 1.3). Die Postmenopause ist der Zeitraum nach der letzten Menstruation (Menopause), die bei Frauen zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr eintritt. Es kommt physiologischer Weise zu einer altersbedingten Reduktion der Ovarfunktion (Ovarialinsuffizienz) mit charakteristischem Absinken des Estradiolspiegels im Blut. Es wurde festgestellt, dass bei Frauen niedrigere Estradiolkonzentrationen im Blutplasma und in der Synovialflüssigkeit mit einem höheren Erkrankungsrisiko für Osteoarthritis einhergehen (Gokhale et al. 2004; Sowers et al. 2006; Richette et al. 2007b). Vor dem Hintergrund der zeitlichen Korrelation des Auftretens der

Osteoarthrose und der Postmenopause, welche mit einem Absinken der Estradiolkonzentration einhergeht, wurde eine Reihe von Untersuchungen zur Wirkung von Estradiol auf den Knorpel durchgeführt:

Es wurde herausgearbeitet, dass Estradiol dosisabhängig den Abbau von Kollagen Typ II bei Ratten mindert (Oestergaard et al. 2006) sowie die Synthese von Glykosaminoglykanen im Knorpel von Hasen steigert (Maneix et al. 2008). Auch die Aggregatsynthese von isolierten Chondrozyten gesunder Patientinnen wird durch Estradiol verstärkt (Kinney et al. 2005). Ebenso schützt Estradiol Knorpelzellen vor einer Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (Claassen et al. 2005).

In Tierexperimenten an verschiedenen Spezies wurde das postmenopausale Absinken des Estradiolspiegels durch Ovariectomie simuliert. Die in der Folge entstehenden Gelenkknorpelläsionen konnten in mehreren Studien durch Estradiolersatz reduziert werden (Sniekers et al. 2008; Tanko et al. 2008). Diesen vielen scheinbar protektiven Effekten des Estradiols stehen aber auch andere Untersuchungsergebnisse gegenüber. So wurden einerseits entzündungshemmende Effekte an Chondrozyten gezeigt (Richette et al. 2007a), andererseits aber auch entzündungsfördernde Effekte in Form vermehrter Synthese von IL-1-beta, IL-6 und IL-8 in Knorpelgewebe gefunden (Yun et al. 2008). Bei einer Versuchsreihe mit bovinen Knorpelimplantaten wurde ein Modell der Arthrose durch Zugabe von Essigsäure geschaffen und postuliert dass Estradiol eine allumfassende regulierende und kontrollierende Funktion auf Knorpelgewebe hat. Doch da Estradiol in dieser Arbeit sowohl protektiv als auch proarthrotisch wirkte, konnte keine Kausalität zwischen Estradiol und Osteoarthrose festgestellt werden (Sniekers et al. 2010).

Wichtig für das Verständnis all dieser Untersuchungsergebnisse ist, dass die Estradiolrezeptoren ER-alpha und ER-beta sowohl in humanem als auch in tierischem Knorpelgewebe nachgewiesen wurden (Claassen et al. 2001; Pfaffl et al. 2001). Es wurde kein Unterschied in der Expression der Rezeptoren zwischen gesundem und arthrotischem Knorpel festgestellt, so dass die Gewebe potentiell in der Lage sind, auf den Einfluss von Estradiol zu reagieren (Ushiyama et al. 1999). Zu der Frage, in welchem Maße die beiden Rezeptortypen beteiligt sind, gibt es widersprüchliche Aussagen. In Versuchen mit knock-out Mäusen vermitteln beide Rezeptortypen den Estradioleffekt gleichermaßen (Sniekers et al. 2009), während bei Experimenten mit an Arthrose erkrankten Ratten primär der ER-alpha für die Estradiolwirkung am Knorpelgewebe verantwortlich ist (Dulos et al. 2010).

1.5.1 Estradiolsynthese

Der Begriff Estradiol wird als eine Kurzform für 17 beta-Estradiol verwendet. Estradiol gehört zu den Östrogenen. Die Östrogene sind Steroidhormone, die wichtig für die Regulation der weiblichen und auch männlichen Geschlechtsorgane sind. Des Weiteren wurde in vielen anderen Organen und Geweben ein Einfluss von Estradiol nachgewiesen. Aus Cholesterin

werden Hormonvorstufen gebildet, aus denen mittels des Enzyms Aromatase Östrogene synthetisiert werden. Die biologisch wichtigen Östrogene sind das Estron und das Estradiol. Im weiblichen Organismus hängen der Ort der Synthese und die Höhe des Estradiolspiegels hauptsächlich vom Alter der Frau ab. Vor Eintritt der Menopause wird die Aromatase im Ovar gebildet, die Synthese findet zyklusabhängig statt. Postmenopausal geht die Synthese im Ovar zurück wodurch der Hormonspiegel im Blut sinkt. Vorwiegend Fettgewebe und Fibroblasten der Haut exprimieren noch die Aromatase, wobei der Estradiolspiegel deutlich niedriger ist (Nelson et al. 2001). Auch Chondrozyten sind in der Lage Estradiol zu synthetisieren (Takeuchi et al. 2007), wobei über die Bedeutung dieser Fähigkeit noch nichts bekannt ist.

1.5.2 Estradiolabhängige Signaltransduktion

Estradiol beeinflusst das jeweilige Zielgewebe über die Expression und Aktivität von Signalmolekülen, wobei deutlich voneinander getrennte Signalwege eingeschlagen werden können. Bei der genomischen Vermittlung wird die Transkriptionsrate von Proteinen beeinflusst; diese Signaltransduktion geschieht in einem Zeitraum von Stunden bis Tagen. Nicht-genomische Vermittlung bedeutet, dass über intrazelluläre Signaltransduktionswege zunächst DNA-unabhängige Reaktionsketten aktiviert werden. Diese Signalübertragung geschieht in Sekunden bis Minuten, wirkt sich langfristig jedoch ebenfalls auf die Transkriptionsrate von Proteinen aus. Gebunden sind all diese Reaktionen an den nukleären, den membrannahen oder den membrangebundenen Estradiolrezeptor. Eine schematische Darstellung der estradiolabhängigen Signaltransduktion erfolgt in Abb. 2.

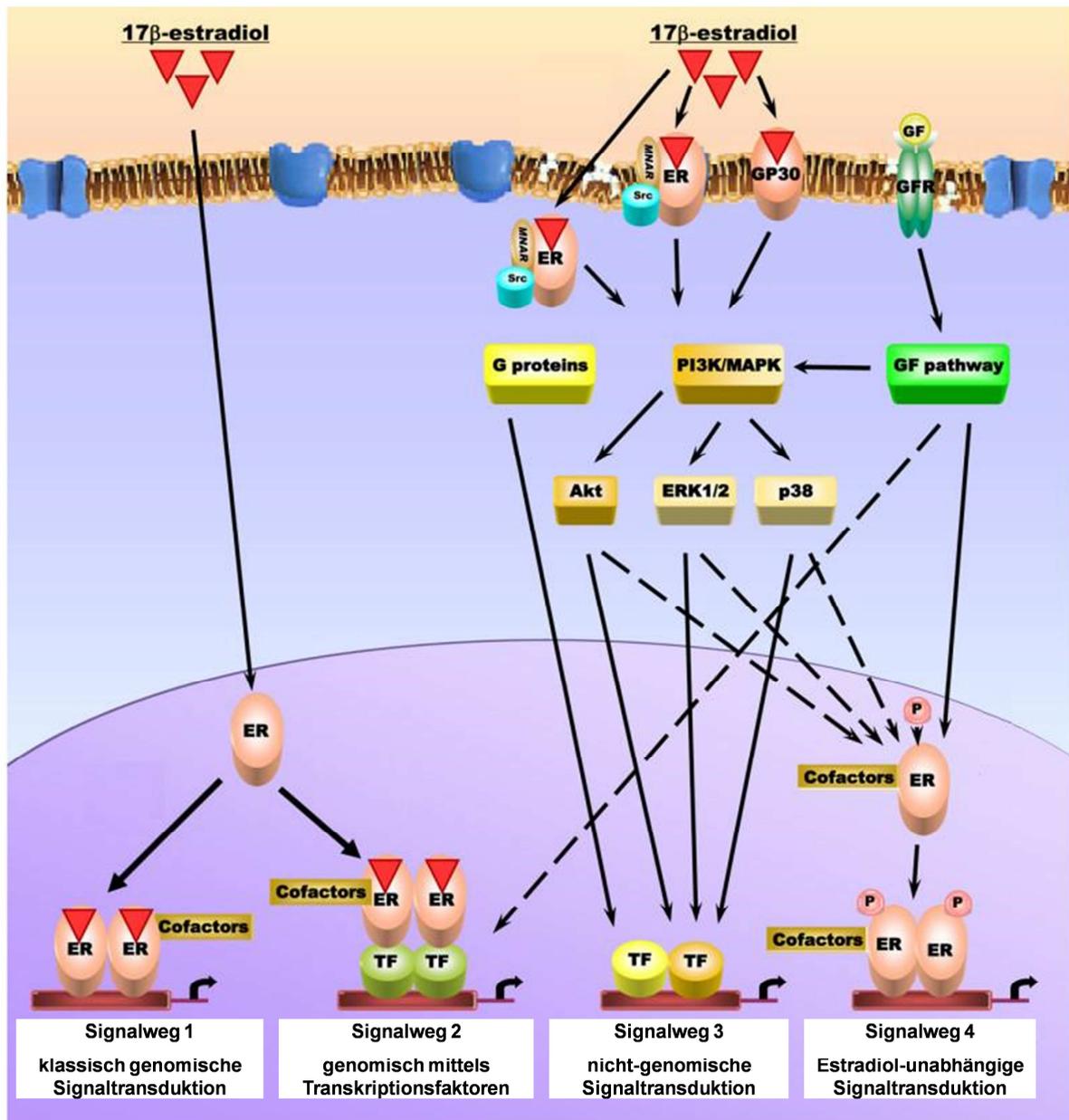


Abb. 2: Estradiolabhängige Signaltransduktion modifiziert nach (Roman-Blas et al. 2009) Beschreibung der Signalwege im folgenden Text. ER estradiol receptor = Estradiolrezeptor, ERK extracellular signal regulated kinase = durch außerzelluläre Signale regulierte Kinase, GF growth factor = Wachstumsfaktor, GFR growth factor receptor = Wachstumsfaktor-rezeptor, MNAR modulator of nongenomic action of estrogen receptors = Modulator der nicht-genomischen Aktivierung des Estradiolrezeptors, TF transcription factor = Transkriptionsfaktor

Signalweg 1 beschreibt die klassische genomische Signaltransduktion. Estradiol überwindet als Steroidhormon die Zellmembran und aktiviert den nukleären Estradiolrezeptor. Dieser agiert als Estradiol-aktivierter Transkriptionsfaktor und bindet spezifisch an das Estradiol-Responsive-Element an der Promotorregion von Zielgenen, deren Transkription dadurch beeinflusst wird. Weitere Co-Faktoren sind an der Regulation beteiligt.

Signalweg 2 beschreibt die genomische Signaltransduktion, jedoch nicht über das Estradiol-Responsive-Element. Der Estradiol-aktivierte nukleäre Rezeptor interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren und beeinflusst dadurch die Transkription von Zielgenen. Hierbei ist besonders der Transkriptionsfaktor NF- κ B zu nennen (Ghisletti et al. 2005). NF- κ B gilt als Transkriptionsfaktor, der die Wirkung von Zytokinen wie IL-1 vermittelt (Richette et al. 2007a). Auch hier sind weitere Co-Faktoren an der Regulation beteiligt.

Signalweg 3 beschreibt die nicht-genomische Wirkung von Estradiol. Estradiol wirkt auf einen membranhaften und/oder den membrangebundenen Estradiolrezeptor GP30, welcher im aktivierten Zustand weitere second messenger wie G-Proteine und Kinasen aktiviert (Watson et al. 2007). Beteiligt ist der Modulator der nicht-genomischen Aktivierung des Estradiolrezeptors (MNAR „modulator of nongenomic action of estrogen receptors“). Die dadurch stimulierten Signaltransduktionswege, auf die hier nicht genauer eingegangen werden soll, oder die noch nicht gänzlich aufgeklärt sind, vermitteln Effekte des Estradiols intrazellulär in Sekunden bis Minuten. Langfristig führen diese Effekte jedoch auch wieder zu einer Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, so dass sich die Transkription von Zielgenen verändert.

Signalweg 4 beschreibt die Estradiol-unabhängige Signaltransduktion des nukleären Estradiolrezeptors. So aktivieren z.B. Wachstumsfaktoren (GF „growth factor“) über den Wachstumsfaktorrezeptor (GFR „growth factor receptor“) intrazelluläre Signalkaskaden, welche den nukleären Estradiolrezeptor regulieren können. Die Regulation geschieht über Phosphorylierung und Co-Faktoren, jedoch ohne die Bindung von Estradiol. Die aktivierten Rezeptoren können dann über das Estradiol-Responsive-Element die Transkription beeinflussen.

Es gibt pharmakologische Wirkstoffe, die klinisch oder experimentell eingesetzt werden, um einzelne Komponenten der Signaltransduktion zu blockieren. Für die vorliegende Studie wurden zwei Inhibitoren der Estradiolrezeptoren eingesetzt. Tamoxifen wird als Anti-Östrogen seit den 70er Jahren klinisch eingesetzt. Es bindet an den Estradiolrezeptoren und verhindert kompetitiv die Estradiolbindung. Der Rezeptor kann zwar weiterhin dimerisieren, jedoch sind Co-Aktivatoren durch die Konformationsänderung nicht mehr in der Lage, an den Rezeptorkomplex zu binden (Ball et al. 2009). Fulvestrant findet seit einigen Jahren ebenso klinische Verwendung. Es bindet selektiv an den Estradiolrezeptor und verhindert dessen Dimerisierung sowie den anschließenden Transport in den Nukleus. Ebenso findet ein schnellerer Abbau der Rezeptoren statt, wenn Fulvestrant an diese gebunden ist (Martin et al. 2005).

1.5.3 Hormonersatztherapie

Das Prinzip der Hormonersatztherapie ist den postmenopausal oder durch Ovariectomie frühzeitig eingetretenen Estradiolmangel durch Substitution auszugleichen. Dadurch soll pathologischen Entwicklungen, wie z.B. der Osteoporose, entgegengewirkt werden. Aufgrund diverser Hinweise bezüglich der Assoziation von Estradiolmangel und Osteoarthritis (siehe 1.5) wurde in mehreren Studien untersucht, ob die Estradiolersatztherapie auch positive Einflüsse auf die Arthritis hat. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen uneinheitliche Ergebnisse (Hanna et al. 2004; Roman-Blas et al. 2009). In vivo Studien mit ovariectomierten Tieren zeigen, dass intraartikuläre Estradiol-Injektionen (Tsai et al. 1993) sowie Dosierungen oberhalb der physiologischen Konzentration (Ng et al. 1999) zu schädlichen Effekten am Knorpel führen. Protektive Auswirkungen hingegen wurden bei Tieren mit Langzeitsubstitution in niedriger Dosierung beobachtet (Richmond et al. 2000; Ham et al. 2002; Hoegh-Andersen et al. 2004). In diesem Zusammenhang führt eine frühzeitige Estradiolsubstitution zu einer Maximierung der positiven Effekte (Oestergaard et al. 2006). Klinische Beobachtungsstudien an postmenopausalen Frauen zeigen radiologisch einen protektiven Effekt (Nevitt et al. 1996; Spector et al. 1997; Hart et al. 1999; Wluka et al. 2001), wobei wiederum die Bedeutung der frühzeitigen und langfristigen Therapie hervorgehoben wird. In der Studie mit der größten Probandenzahl (Women's Health Initiative) benötigen die Patientinnen unter Estradiolsubstitution signifikant seltener Operationen zum Gelenkersatz der Hüfte und des Knies (Cirillo et al. 2006), wohingegen in einer aktuelleren Untersuchung zur Häufigkeit der endoprothetischen Therapie diese protektive Wirkung der Hormonersatztherapie in Frage gestellt wird (de Klerk et al. 2009).

Bis heute wird die Hormonersatztherapie als Arthroseprophylaxe oder Therapieoption noch nicht in der klinischen Routine eingesetzt. Den fraglichen protektiven Effekten stehen schwerwiegende Nebenwirkungen gegenüber. So werden unter Estradiolersatz ein erhöhtes Brustkrebsrisiko sowie vermehrt thromboembolische Ereignisse beobachtet (Tanko et al. 2005). Wenn in zukünftigen Studien der Nutzen der Therapie noch deutlicher wird oder pharmakologische Analoga ohne nennenswerte Nebenwirkungen entwickelt werden, kann die Hormonersatztherapie eine mögliche Prophylaxe oder Therapie der Osteoarthritis darstellen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die geschilderten epidemiologischen Daten sowie die Ergebnisse einiger Studien zur Hormonersatztherapie begründen die Hypothese, dass Estradiol einen protektiven Effekt auf die Initiierung und das Fortschreiten der Osteoarthritis hat. Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen, wie Estradiol diesen Effekt vermittelt, wurden bisher durch Untersuchungen an isolierten Chondrozyten in der Zellkultur oder durch in vivo Studien gewonnen. Am isolierten Gewebe fehlt es bislang an Erkenntnissen über die Wirkung und Mechanismen von Estradiol auf das Knorpelgewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein in vitro Modell angewendet, um Untersuchungen an Knorpelimplantaten durchzuführen. So soll die Wirkung von Estradiol auf bovines und humanes Knorpelgewebe, in dem entzündliche Reaktionen induziert werden, genauer untersucht werden. Des Weiteren soll erarbeitet werden, welche Rolle die Estradiolrezeptoren bei der Vermittlung der Effekte des Estradiols spielen.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Gibt es protektive Effekte des Estradiols auf die Interleukin-1-induzierte Knorpelgewebsdestruktion?

- Und wenn ja, wie zeigt sich dieser protektive Effekt?
 - Wird der GAG-Verlust beeinflusst?
 - Wird die NO-Freisetzung beeinflusst?
 - Wird die Transkription knorpeldegradierender Enzyme beeinflusst?
 - Wird die Transkription von Kollagen und Aggrecan beeinflusst?

- Werden die Effekte von Estradiol über die Estradiolrezeptoren vermittelt?

- Hat Estradiol einen Effekt auf osteoarthrotisch verändertes humanes Knorpelgewebe?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Anti-ER-alpha Antikörper	Abcam
Anti-ER-beta Antikörper	Abcam
Anti-Rabbit Immunglobulin (Zweitantikörper)	Dako Cytomation
Amphotericin	PAA
ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit	Chemicon
Aqua dest.	Biochrom AG
Aquatex	Merck
BSA	Sigma
Charcoat stripped Serum	Sigma
Chloroform	Merck
Chondroitin-6-Sulfat	Sigma
CyQuant-Kit	MoBi Tec
DAB-Kit	Dako Cytomation
DePeX®	Serva
Diluent	Invitrogen
Dinatriumtetraborat	Merck
DMEM	Sigma
DMMB	Polysciences
EDTA	Fluka
Estradiol	Sigma
Ethanol	Merck
FKS	Biochrom AG
Fulvestrant	Tocris
Glycin	Roth
Griess-Reagenz	Sigma
Hämatoxylin	Merck
HBSS	PAA
HCl	Merck
Hydroxytamoxifen	Sigma
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Merck
Methylbenzoat	Roth
Mayer's Hämaunlösung	Merck
NaCl	Roth

NaHPO ₄	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast (Paraffin)	Sherwood Medical
PBS	PAA
Penicillin G	PAA
Pyronin G	Merck
Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
Qiagen®One Step RT-PCR	Qiagen
Recombinanes humanes IL-1 α	R & D Systems
RQ1 Rnase-freie Dnase	Promega
RQ1 Dnase Stop Solution	Promega
Streptomycinsulfat	PAA
TaqMan®-Sonden	Applied Biosystems
Toluidinblau	Aldrich-Chemie
Trizol	Invitrogen
Vectastain® ABC Elite Kit	Vector Laboratories
Xylol	Roth

2.2 Kulturbedingungen

Kulturmedium für Explantate:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 μ g/ml	Amphotericin
10 μ l/ml	BSA 10%

Seedingmedium für MCF-7-Zellen:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 μ g/ml	Amphotericin
50 μ l/ml	FKS 5%

Kulturmedium für MCF-7-Zellen:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 µg/ml	Amphotericin
50µl/ml	Charcoal stripped Serum

HBSS-Lösung mit Antibiotika:

HBSS (Hanks Buffering Salt Solution)

10.000 U/ml	Penicillin G
10 mg/ml	Streptomycinsulfat
25 µg/ml	Amphotericin

Zelkulturplatten:

Tissue culture plate 6er-Wellplatte, Sarstedt

Tissue culture plate 24er-Wellplatte, Sarstedt

Tissue culture plate 96er-Wellplatte, Sarstedt

Inkubationsort:

Heraeus Zellkulturschrank Typ BB 6226 bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂

2.3 Herstellung der bovinen Knorpelimplantate

Als Ausgangsmaterial für die Knorpelimplantate diente der Gelenkknorpel aus Knien von ca. 2 Jahre alten weiblichen Rindern aus einem kommerziellen Schlachthof (Norddeutsche Fleischzentrale GmbH, Bad Bramstedt). Einen Tag nach der Schlachtung der Tiere wurden die Kniegelenke zur Verfügung gestellt und bis zur Präparation bei 6-8°C gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurden die Gelenkkapsel eröffnet, die Femurkondylen dargestellt und mit einem Skalpell Knorpelchips von den Kondylen gewonnen. Diese wurden in HBSS-Lösung mit Antibiotika überführt und anschließend die Dickenmessung mit der elektronischen Schieblehre (Digimatic CD 15 CPX) durchgeführt. Knorpelchips mit einer Dicke von 1 mm ± 0,2 mm wurden verwendet, die anderen verworfen. Mittels einer Biopsiestanze (Hebu Medical) wurden auf einer Teflonplatte die Knorpelimplantate mit einem Durchmesser von 3 mm ausgestanzt, in HBSS-Lösung mit Antibiotika überführt und gesammelt (siehe Abb. 3).

Die Implantate wurden in einer Petrischale randomisiert, um die Implantate unterschiedlicher Entnahmestellen gleichmäßig zu verteilen. Anschließend erfolgte die Aufteilung der Implantate auf Versuchsgruppen zu je drei Stück. Von diesen Gruppen wurde mit einer

Laborwaage (Sartorius Research R 160 P) das individuelle Feuchtgewicht (FG) ermittelt; anschließend erfolgte die Überführung der 3er Gruppen in eine 24er-Wellplatte mit je 1 ml Kulturmedium.

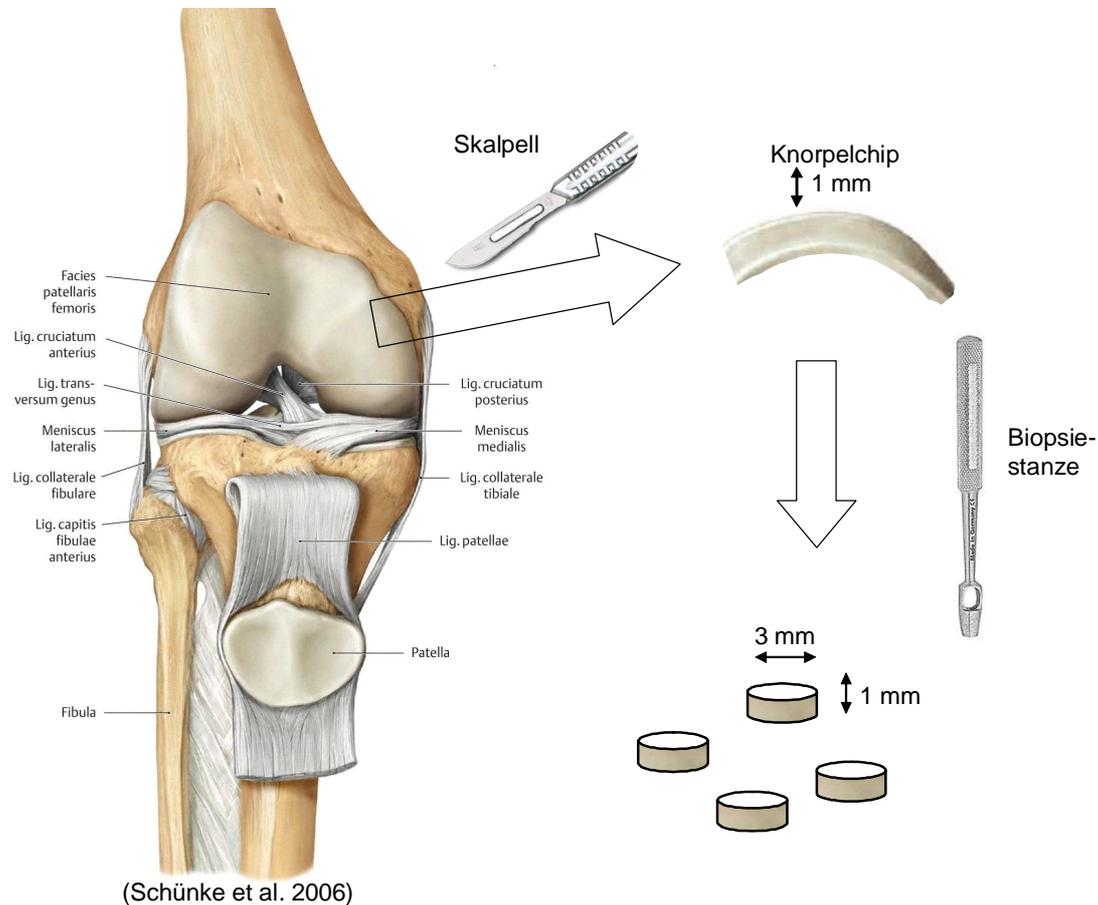


Abb. 3: Herstellung von Knorpelimplantaten

Nach der Darstellung der Femurkondylen erfolgte mit dem Skalpell die Präparation von Knorpelchips, aus welchen dann mittels einer Biopsiestanze die Knorpelimplantate (ca. 1 mm Dicke und 3 mm Durchmesser) gewonnen wurden. Die Grafik zeigt ein humanes Knie, die anatomischen Strukturen des bovinen Knies sind analog.

2.4 Herkunft der humanen Knorpelimplantate

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung humaner Knorpelimplantate dienten Operationsresektate aus der orthopädischen Lubinus Klinik Kiel. Neun Patientinnen, die wegen einer Kniegelenksarthrose mit einer Endoprothese chirurgisch versorgt werden sollten, wurden am Vortag zu der Gewebespende aufgeklärt und die Einwilligung wurde nach den Vorgaben der Ethikkommission schriftlich fixiert (Aktenzeichen D 426/09). Ebenso wurde der verantwortliche Operateur um dessen Zustimmung gebeten. Am Tag der Operation wurden die femoralen Knochen-Knorpel-Resektate, welche bei der Implantation der

Knieprothese anfallen und routinemäßig entsorgt werden, in das Anatomische Institut transportiert. Der Transport erfolgte in einem verschließbaren Schraubgefäß, gefüllt mit HBSS-Lösung mit Antibiotika bei Umgebungstemperatur. Die Transportdauer betrug ca. 10 Minuten. Im Labor wurden nach analoger Technik zur Herstellung der bovinen Knorpelimplantate (siehe 2.3) die humanen Implantate gewonnen. Besonders wichtig bei dieser Knorpelspende war das Randomisieren der Implantate, da die unterschiedlichen Areale der arthrotischen Resektate morphologisch sehr unterschiedlichen Knorpelüberzug besaßen. Eine exemplarische Darstellung eines verwendeten humanen Femurresektats zeigt die Abb. 4.

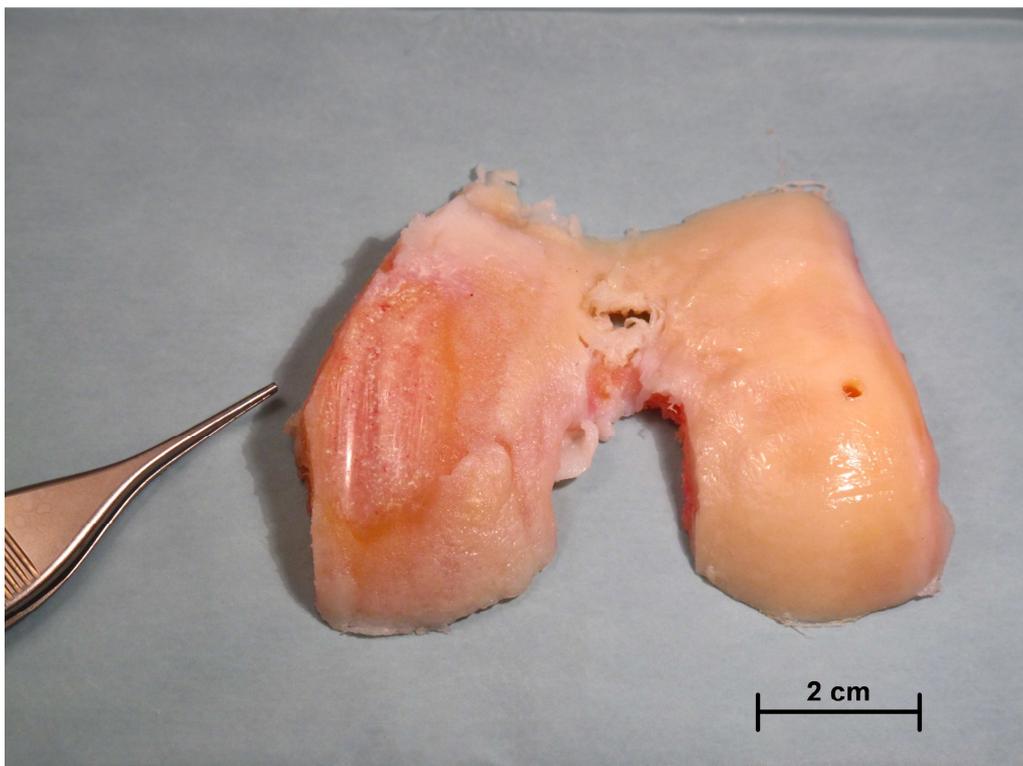


Abb. 4: Makroskopische Darstellung eines humanen Femurresektats

Ein humanes Femurresektat in der Ansicht von dorso-kaudal eines linken Knies, wie es zur Gewinnung der humanen Knorpelimplantate verwendet wurde. Die Pinzettenspitze zeigt auf den medialen Kondylus, wo ein ausgeprägter Knorpelschaden mit Knochenglatze sowie mechanisch entstandenen „Furchen“ im sklerosierten subchondralen Knochen vorliegt. Die Osteophyten wurden zuvor vom Chirurgen mittels eines Osteotoms reseziert und sind nicht mehr dargestellt. Um die Knochenglatze herum wirkt der Gelenkknorpel pathologisch rissig mit einer rauen und aufgetriebenen Oberfläche. Auf dem lateralen Kondylus hingegen ist der Knorpelüberzug makroskopisch noch intakt. Areale mit dieser Knorpelqualität wurden für die Herstellung der Implantate gewählt, wobei die Bereiche direkt an den Sägeschnitten ausgespart wurden. Die Löcher im lateralen Kondylus und interkondylär sind iatrogenen Ursprungs.

Je nach Form und Ausprägung der Arthrose erschien der Gelenkknorpel an einigen Stellen hyalin spiegelnd, an anderen aufgetrieben, trocken, faserig oder rissig, bis hin zur Knochenglatze. Ebenso wurde darauf geachtet, nicht den Knorpel direkt von der Sägekante zu nutzen, da durch die oszillierende Säge hohe Temperaturen am Sägeblatt entstehen, die die Vitalität des angrenzenden Gewebes gefährden können. Weil die Anzahl humaner Explantate geringer war, wurde von Einzelexplantaten das Feuchtgewicht bestimmt, und die Versuche mit je einem Explantat in einer 96er-Wellplatte in 200 µl Kulturmedium durchgeführt.

2.5 Vorversuche

Sinn der Vorversuche war es, methodische Grundfragen zu klären, bevor die eigentliche Fragestellung bearbeitet wird. Bei der vorliegenden Arbeit wurden Vorversuche zu den Themen der Estradiol-Verdünnungsmethoden, der Estradiolwirkung und des Rezeptornachweises durchgeführt.

2.5.1 Estradiol-Verdünnungsmethoden

Dieser Vorversuch diente dazu, zwei verschiedene Verdünnungsmethoden gegeneinander zu vergleichen, um eine Methode für die folgenden Experimente auszuwählen. Das Estradiol lag in Pulverform mit einem Reinheitsgrad >98% vor, das Molekulargewicht von Estradiol betrug 272,39 g/Mol. Zu Beginn wurde eine 0,1 M Stammlösung hergestellt, indem 27,24 mg Estradiol in 1 ml Ethanol gelöst wurden. Diese Stammlösung diente als Ausgangskonzentration für die Verdünnungsreihen. Um die für die Experimente benötigte Konzentration zu erlangen, wurde Estradiol in reinem Ethanol schrittweise verdünnt. Die Verdünnungsschritte beider Methoden zeigt Tab. 2. Die Versuche wurden mit einer Estradiolkonzentration 10^{-11} M nach identischem Versuchsablauf der Hauptversuche (siehe 2.6) durchgeführt. Zur Bewertung des Estradioleinflusses wurden anschließend der Glykosaminoglykan-Verlust sowie die NO-Freisetzung untersucht.

Methode I bietet den Vorteil, dass durch den letzten Verdünnungsschritt im Medium nur eine geringe Ethanolkonzentration von 0,01% im Kulturmedium auftritt. Jedoch ist nicht bekannt, ob bei diesem Verdünnungsschritt nicht eine gewisse Menge Estradiol bereits in dem letzten Schritt ausfällt, so dass die gewünschte Konzentration nicht erreicht wird. Bei Methode II werden weniger Verdünnungsschritte durchgeführt, jedoch finden alle in Ethanol statt, was den Effekt mit sich bringt, dass im Kulturmedium eine höhere Ethanolkonzentration von 1 % auftritt.

Methode I		Methode II	
Stammlösung:	= 10^{-1} M	Stammlösung:	= 10^{-1} M
10 μ l + 90 μ l Ethanol	= 10^{-2} M	10 μ l + 990 μ l Ethanol	= 10^{-3} M
10 μ l + 90 μ l Ethanol	= 10^{-3} M	10 μ l + 990 μ l Ethanol	= 10^{-5} M
10 μ l + 90 μ l Ethanol	= 10^{-4} M	10 μ l + 990 μ l Ethanol	= 10^{-7} M
10 μ l + 90 μ l Ethanol	= 10^{-5} M	10 μ l + 990 μ l Ethanol	= 10^{-9} M
10 μ l + 90 μ l Ethanol	= 10^{-6} M		
10 μ l + 90 μ l Ethanol	= 10^{-7} M	→ 10 μ l pro ml Medium	= 10^{-11} M
10 μ l + 990 μ l Medium	= 10^{-9} M		
→ 10 μ l pro ml Medium	= 10^{-11} M		

Tab. 2: Darstellung der angewandten Estradiol-Verdünnungsmethoden

Beginnend mit der 0,1 M Stammlösung, wird nach zwei unterschiedlichen Methoden eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem die zuvor erzielte Konzentration weiter verdünnt wird.

2.5.2 Positivkontrolle Estradiolwirkung

Zum Nachweis, dass das verwendete Estradiol biologisch wirksam ist und die gewählte Verdünnungsmethode auch die angestrebte Konzentration erzielt, wurden MCF-7-Zellen inkubiert und anschließend die Proliferation unter verschiedenen Estradiolkonzentrationen gemessen. Die MCF-7-Zellen sind eine seit 1973 bestehende Zellkulturlinie des humanen Mammakarzinoms und stammen von einem Rezeptor-positiven Adenokarzinom, so dass ihre Proliferation durch Estradiol stimuliert wird (Soule et al. 1973). Die MCF-7 Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH bezogen (DSMZ Nr. ACC115). Zur Inkubation wurden 50.000 Zellen in 2 ml Medium in einem 6er Well ausgesät. Die ersten 24 h erfolgte eine Inkubation mit Seeding Medium, anschließend eine sechstägige Inkubation mit dem hormonfreien Kulturmedium unter Zugabe von Estradiol der Konzentrationen 10^{-13} M, 10^{-11} M und 10^{-9} M. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 3 Tagen. Die Inkubation wurde nach 6 Tagen Estradioleinfluss durch Einfrieren der Zellkulturen bei -20°C beendet. Anschließend erfolgte die Proliferationsmessung anhand der DNA-Bestimmung nach der CyQuant-Methode.

2.5.3 Messung der Zellproliferation

Die Messung der Zellproliferation der MCF-7-Zellen beruht auf der Bestimmung des DNA-Gehalts mit der CyQuant-Methode, verwendet wird das CyQuant-Kit. Ein Farbstoff (CyQuant GR) sendet fluoreszierendes Licht aus, wenn sich der Farbstoff mit Nukleinsäuren verbindet. Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert linear mit der Menge der Nukleinsäuren und somit auch mit der Zellanzahl.

Die Messung erfolgte nach Herstellerangaben: Es wurden die eingefrorenen Zellkulturen aufgetaut und unter Zugabe von 250 µl Lysis-Puffer (im Kit enthalten) die Zellen lysiert. Um Verunreinigungen durch RNA auszuschließen, erfolgte die Zugabe von 5 µl RNase (im Kit enthalten). Nach 5 min Inkubation des CyQuant GR-Farbstoffs unter Lichtabschluss konnte der DNA-Gehalt bei einer Extinktion von 480 nm und einer Emission von 520 nm flourometrisch ermittelt werden. Um die absoluten DNA-Werte (µg DNA/ml Medium) berechnen zu können, wurde mit Hilfe von Bakteriophagen-DNA (im Kit enthalten) zuvor eine Standardkurve erstellt. Man kann von dem DNA-Wert auf die Zellanzahl schließen. Da alle Versuchsgruppen mit identischer Zellanzahl begonnen wurden, lässt sich aus der späteren Zellanzahl die Proliferation ableiten.

2.5.4 Rezeptornachweis

Zum Beweis der Anwesenheit der Estradiolrezeptoren vom Typ alpha und beta in dem verwendeten Knorpelgewebe wurden immunhistologische Färbungen an unbehandeltem Gelenkknorpel angefertigt. Dazu wurden primär polyklonale Kaninchenantikörper gegen ER-alpha und beta verwendet, woran ein an Biotin gekoppelter sekundärer Antikörper bindet. An Orten dieses Antikörper-Komplexes wurde mittels zweier Kits eine Farbstoffreaktion durchgeführt, welche die Estradiolrezeptoren nachweist (siehe 2.10.4)

2.6 Versuchsablauf der Hauptversuche

Die Abb. 5 zeigt den grundlegenden Ablauf der Experimente. Am Tag der Materiallieferung wurden nach der beschriebenen Methode die Explantate hergestellt und in Versuchsgruppen aufgeteilt. Die ersten 24 Stunden erfolgte die Vorinkubation in Kulturmedium mit Zusatz von Estradiol. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, jetzt mit Zusatz von Estradiol und Interleukin-1. IL-1 in der Konzentration 10 ng/ml dient der Schaffung der proinflammatorischen Bedingungen. Es folgte eine Kultivierung für 72 Stunden in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Zum Beenden der Experimente wurden die Explantate in Stickstoff eingefroren sowie je drei pro Behandlungsgruppe in Paraformaldehyd fixiert. Die Kulturüberstände wurden bei -20°C eingefroren.

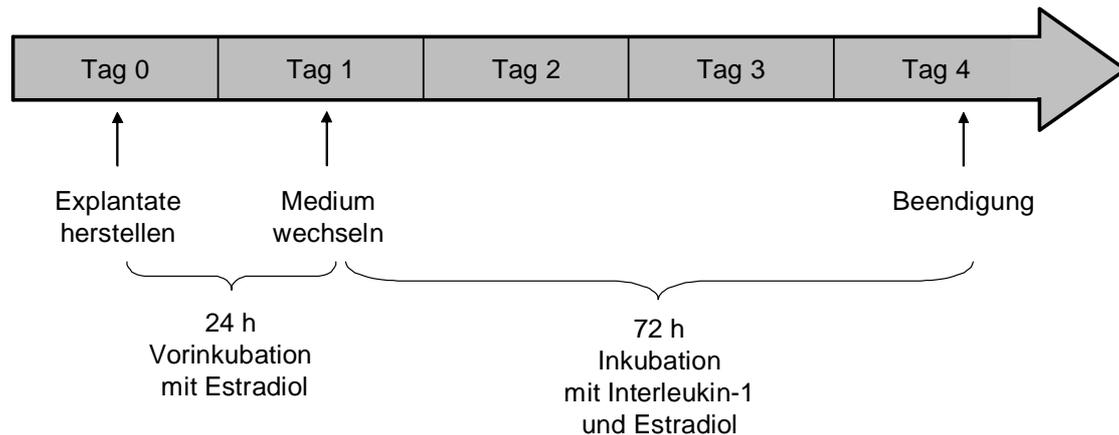


Abb. 5: Versuchsablauf der Hauptversuche

Am Tag 0 werden die Explantate hergestellt und auf die Versuchsgruppen aufgeteilt, es erfolgt eine Vorinkubation mit Estradiol für 24 Stunden. Am Tag 1 wird das Medium gewechselt und das Interleukin-1 zusätzlich appliziert. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation werden die Experimente beendet.

2.7 Messung der GAG-Konzentration in den Kulturüberständen

Wie in 1.2 geschildert, sind Glykosaminoglykane ein wichtiger Bestandteil der EZM, so dass man von der Höhe des GAG-Verlustes Rückschlüsse auf die Stärke der Gewebsdestruktion ziehen kann. Der Glykosaminoglykan-Verlust aus dem Knorpelgewebe in den Kulturüberstand wurde mit Hilfe des Dimethylmethylblau (DMMB) Tests bestimmt (Farndale et al. 1986). Die Messung der GAG-Konzentration erfolgte nach Beendigung der Gewebeinkubation. Dafür wurden in eine Küvette 8 μl Kulturüberstand, 72 μl PBE-Stammlösung und 800 μl DMMB-Lösung gegeben. Die negativen Ladungen der Glykosaminoglykane im Medium und das DMMB bildeten einen Farbkomplex. Die mit dem Farbumschlag einhergehende Änderung der Extinktion wurde mit Hilfe eines Photometers (Ultraspex LKB, Biochrom) bei einer Wellenlänge von 525 nm gemessen. Durch eine zuvor mit Chondroitin-6-Sulfat erstellte Standardreihe konnte aus der Extinktionsmessung die GAG-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) berechnet werden. Die Ergebnisse der GAG-Konzentration in den Kulturüberständen wurden anschließend auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen dargestellt.

DMMB (Dimethylmethylblau):

Aqua dest.

0,04 M DMMB

0,2 M Ethanol

0,04 M NaCl

0,04 M Glycin

0,1 M HCl

PBE-Stammlösung:

Aqua dest.

0,1 M Na_2HPO_4 0,01 M Na_2EDTA **2.8 Messung der NO-Konzentration in den Kulturüberständen**

Wie in 1.4.4 geschildert, scheint NO ein Mediator von gewebedestruierenden Reaktionen zu sein, so dass von der NO-Konzentration Rückschlüsse auf das entzündliche Geschehen im Knorpelgewebe gezogen werden können. Mit Hilfe des Griess-Reagenzes wurde in den Kulturüberständen die NO-Produktion des Knorpelgewebes nach dreitägiger Inkubation gemessen. Bei dieser Methode wird Nitrit (NO_2), ein stabiles Endprodukt von NO, mit der Griess-Reaktion in einen Azofarbstoff umgesetzt, welcher photometrisch bestimmt werden kann. In eine 96er-Mikrotiterplatte wurden pro Well 100 μl Kulturüberstand und 100 μl Griess Reagenz pipetiert und für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Die Konzentration von NO_2 in den Kulturüberständen wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm in einem ELISA-Lesegerät (Spektralphotometer *EAR 340 ATTC, SLT*) ermittelt. Die Messwerte wurden anhand einer mit Natriumnitrit (NaNO_2) ermittelten Standardkurve in die absoluten NO-Werte (μmol) umgerechnet und bei der Darstellung der Ergebnisse auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen.

2.9 Durchführung der realtime RT-PCR

Für den quantitativen Nachweis der Genexpression matrixdegradierender Proteasen wurde eine realtime RT-PCR durchgeführt, welche auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) beruht. Die PCR stellt eine Methode dar, mit der spezifische Abschnitte der mRNA mit bekannter Nukleotidsequenz amplifiziert werden können. Sie wurde mit Hilfe des Qiagen QuantiTect® SYBR Green RT-PCR Kit durchgeführt. Die isolierte RNA wird durch eine Reverse Transkription (RT) zunächst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend erfolgt die Durchführung der PCR, in der die cDNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges dient. Die Quantifizierung dieser vervielfältigten DNA wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die unmittelbar während eines PCR-Zyklus erfasst werden („realtime“). Dabei bindet der Farbstoff SYBR® Green an die vervielfältigte doppelsträngige DNA, was aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffes nachgewiesen werden kann. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert daher mit der Zunahme der DNA von Zyklus zu Zyklus.

2.9.1 Isolierung der RNA

Für die Isolierung von RNA wurden die Knorpelimplantate nach der Inkubation bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Zur Gewinnung der RNA wurden die Proben in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser und Pistill zerkleinert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Trizol versetzt. Mit einem Dispergiergerät wurden die Proben anschließend so lange homogenisiert, bis keine Gewebestückchen mehr zu erkennen waren (30 sec bei 60.000 rpm). Die Lösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, um die restlichen Zelltrümmer zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand, welcher Proteine, DNA und RNA enthielt, abgenommen und in ein neues 1,5 ml 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 Minuten bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert ($12.000 \times g$, 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-Chloroform-Phase Proteine 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 bei Raumtemperatur für 10 min gefällt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei $12.000 \times g$ und 4°C war die RNA als Pellett am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Die RNA wurde in 1 ml 75% Ethanol gewaschen und 5 min bei $7.500 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2 Mal wiederholt, um mögliche Phenolrückstände zu eliminieren. Im Anschluss daran wurde das Ethanol verworfen und die RNA luftgetrocknet. Dann wurde die RNA in 50 μl RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 min bei $55-60^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Mengen wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.9.2 Bestimmung der RNA-Menge

Zur Quantifizierung der RNA-Menge wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von RNA) in einem Photometer gemessen. Dafür wurden in eine Quarzküvette 5 μl Probe und 995 μl Aqua bidest. gegeben. Um die Qualität der Probe zu überprüfen und eine mögliche Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, wurde die optische Dichte auch bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte dabei einen Wert $> 1,8$ ergeben.

2.9.3 Reinigung der RNA

Um DNA-Verunreinigungen zu vermeiden wurde bei der isolierten RNA zunächst ein DNase Verdau durchgeführt. Dafür wurden die zu untersuchenden Proben mit folgendem Reaktionsansatz (Promega) behandelt:

Reaktionsansatz für den DNase-Verdau:

x µl	RNA (x µl = 1-8 µl)
1 µl	RQ1 RNase-freie DNase 10 x Reaktionspuffer
1 µl	RQ1 RNase-freie DNase
Auffüllen bis 10 µl Endvolumen mit H ₂ O	

Zu jeder Probe wurden 1 µl DNase 10 x Reaktionspuffer sowie 1 µl DNase gegeben und 30 min bei 37°C in einem Thermocycler kultiviert. Zur Inaktivierung der DNase wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (20 mM EDTA, pH 8,0) zugesetzt und 10 min bei 65°C inkubiert.

2.9.4 Vervielfältigung der RNA

Im Anschluss an den DNase-Verdau wurden zur Bestimmung jedes einzelnen Zielgens 50ng der vorbereiteten RNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Reaktionsansatz für RT-PCR:

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

Das „Housekeeping-Gen“ 18s rRNA wurde bei der Messung als Referenzgen verwendet, um sicherzustellen, dass in jedem Reaktionsansatz intakte und gleiche Mengen an RNA vorhanden waren. Für jeden Primer wurde zusätzlich eine „no-template-control“ (NTC) angesetzt. Diese Kontrolle enthielt keine Proben RNA, sodass in diesem Ansatz keine Amplifikate gebildet werden und daher kein PCR-Produkt detektierbar sein sollte. Für die Durchführung der realtime RT-PCR wurden die Primer für folgende Zielgene verwendet: 18s rRNA, iNOS, MMP-3, ADAMTS-4, Kollagen Typ II und Aggrekan. Um die DNA um ein Vielfaches amplifizieren zu können, wurden Zyklen nach dem in Tab. 3 dargestellten Schema durchgeführt.

Schritt	Zeit	Temperatur
reverse Transkription	30 min	50 °C
initiale Aktivierung	15 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	94 °C
Annealing	30 sec	60 °C
Extension	30 sec	72 °C
Unterdrückung von Primerdimeren	15 sec	75-78 °C (je nach Primer, siehe Tab. 4)

Tab. 3: Übersicht über den realtime RT-PCR Zyklus

Zu Beginn der realtime RT-PCR wurde einmalig für 30 min bei 50°C die mRNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Im Anschluss daran folgte für 15 min bei 95°C eine initiale Aktivierung der PCR-Reaktion. Anschließend wurden die Proben für 15 sec auf 94°C erhitzt, um die Doppelstränge in zwei komplementäre Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Im folgenden Schritt (Annealing) wurde für die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge die Temperatur für 30 sec auf 60°C gesenkt. Als nächstes wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, um die Primer zu verlängern (Extension) und die Stränge zu komplementieren. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Schritt zur Unterdrückung von Signalen aus Primerdimeren bei einer Temperatur 3°C unter der genspezifischen, optimalen Schmelztemperatur, welche in Tab. 4 dargestellt sind. Innerhalb eines solchen Zyklus wurde die DNA verdoppelt, 40 Zyklen wurden insgesamt durchlaufen.

Name des Primers	Schmelztemperatur der Primerdimere
18 s rRNA	78 °C
iNOS	78 °C
MMP-3	78 °C
ADAMTS-4	80 °C
Kollagen Typ II	81 °C
Aggrekan	78 °C

Tab. 4: Übersicht über die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer

2.9.5 Auswertung der realtime RT-PCR Ergebnisse

Für die relative Quantifizierung wurde die Genexpression des Zielgens auf das „Housekeeping-Gen“ 18s rRNA bezogen. Nach einer PCR 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 CT-Wert („threshold cycle“) bezeichnet. Eine Probe mit einem höheren CT-Wert besaß eine niedrigere Konzentration des gesuchten Gens als eine Probe mit einem niedrigeren CT-Wert, da mehr Zyklen benötigt wurden, um den Schwellenwert zu erreichen. Das bedeutet, dass ein um eine Einheit geringerer CT-Wert einer Verdoppelung der eingesetzten cDNA entspricht.

Die Expressionsunterschiede wurden nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. In einem ersten Schritt wurde für jede Probe und Kontrolle die Differenz zwischen den gemessenen CT-Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet. Von diesem ΔCT -Wert der stimulierten Proben wurde der ΔCT -Wert der unbehandelten Kontrolle abgezogen.

$$\begin{aligned} (1) \quad \Delta\text{CT}_{(\text{Probe})} &= \text{CT}_{(\text{Probe}; \text{Zielgen})} - \text{CT}_{(\text{Probe}; \text{Referenzgen})} \\ (2) \quad \Delta\text{CT}_{(\text{Kontrolle})} &= \text{CT}_{(\text{Kontrolle}; \text{Zielgen})} - \text{CT}_{(\text{Kontrolle}; \text{Referenzgen})} \\ (3) \quad \Delta\Delta\text{CT} &= \Delta\text{CT}_{(\text{Probe})} - \Delta\text{CT}_{(\text{Kontrolle})} \end{aligned}$$

Für die Berechnung wurden folgende Daten der PCR verwendet:

CT =	„threshold cycle“; Anzahl der PCR-Zyklen
Probe =	stimulierte Probe
Kontrolle =	Kontrollgruppe ohne Estradiol
Zielgene =	ADAMTS-4, Aggrekan, iNOS, Kollagen Typ II und MMP-3
Referenzgen =	18s rRNA

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

$$(4) \quad \text{relative Zielgenmenge} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

2.10 Histologische Untersuchungen des Knorpelgewebes

Zur Charakterisierung des verwendeten Knorpelgewebes sowie Durchführung von histologischen Vitalitätsuntersuchungen wurden Knorpellexplantate nach Beendigung der Versuchsdurchführung in Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert. Im Anschluss wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Methylbenzoat behandelt und dann in Paraplast überführt. Die Einbettung erfolgte in einem Vakuumschrank. Nach dem Aushärten des Paraffins konnten mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2165) Schnitte der Dicke 7 µm zur histologischen Darstellung und weiteren Färbung angefertigt werden.

2.10.1 Färbung der histologischen Schnitte mit Toluidinblau

Toluidinblau-Färbelösung:

0,0714%	Toluidinblau
0,0714%	Pyronin G
0,143%	Dinatriumtetraborat (Borax Na ₂ B ₄ O ₇)

Zur lichtmikroskopischen Darstellung des Knorpelgewebes wurden die zuvor mit Paraformaldehyd fixierten Paraffinschnitte mit Toluidinblau gefärbt. Toluidinblau färbt die negativen Ladungen der Glykosaminoglykane an (siehe 1.2), so dass eine Beurteilung der Extrazellulärmatrix möglich wird. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst mit Xylol (3 x 5 min) aus dem Paraffin gelöst, je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) behandelt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Nach 5 min Inkubation in der Toluidinblau-Färbelösung wurden die Schnitte erneut mit Aqua dest. gespült und in 96% Ethanol differenziert. Nach einer Behandlung mit Propanol (3 x 3 min) und Entwässerung mit Xylol (3 x 5 min) wurden die Schnitte mit DePeX[®] versiegelt.

2.10.2 Färbung der histologischen Schnitte mit Hämatoxylin

Für die Darstellung der gesunden Zellkerne sowie des „Kernblebbings“ wurden die zuvor mit Paraformaldehyd fixierten Paraffinschnitte mit Mayer's Hämalaunlösung gefärbt. Kernblebbing entspricht Ausziehungen und Abschnürungen von Zellkernen und ist ein morphologisches Korrelat von Apoptose. Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit Xylol (3 x 5 min) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe je 5 min inkubiert und mit Aqua dest. gespült. Anschließend erfolgt die Inkubation mit Mayer's Hämalaunlösung für 7 min. Nach einem Spülen mit Aqua dest. und Differenzieren in 0,02 % HCl-Lösung wurden die Schnitte 10 min in lauwarmem Wasser zum Bläuen inkubiert. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 3 min) und einer Behandlung mit Xylol (3 x 5 min) wurden die Schnitte mit PePeX[®] eingedeckelt.

2.10.3 Färbung der histologischen Schnitte nach der TUNEL-Methode

Um in dem Knorpelgewebe die Anzahl der Zellen mit DNA-Abbau zu quantifizieren, wurden histologische Schnitte nach der TUNEL-Methode (TUNEL = TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) angefärbt. In untergehenden Zellen wird vermehrt fragmentierte DNA mit charakteristischen, freien 3'-OH Enden gefunden. Diese vermehrten Strangbrüche können durch die TUNEL-Färbung in einer enzymatischen Reaktion mit modifizierten Nukleotiden und einem Antikörper markiert und sichtbar gemacht werden. Die Färbung der Schnitte wurde mit dem ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit durchgeführt. Die mit Paraformaldehyd fixierten Präparate wurden zunächst mit Xylol (3 x 5 min) aus dem Paraffin gelöst, in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % 5 min, 96 % 3 min, 70 % 3 min) geschwenkt und anschließend 5 min in PBS gespült. Im Anschluss erfolgte ein Proteinverdau durch Behandlung mit Proteinase K (20 µg/ml) für 15 min und daraufhin Spülung mit Aqua dest. (2 x 5 min). Es folgte eine Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid für 5 min und eine erneute Spülung mit Aqua dest. (2 x 5 min). Im Anschluss wurden 75 µl des Equilibration Puffers auf das Präparat aufgetragen. Es folgte die Applikation des TdT-Enzyms (16,5 µl gelöst in 38,5 µl Reaktions Puffer, 11 µl je cm²) und anschließend die Spülung im Stop/Wash-Puffer für 10 min. Daraufhin wurde der Anti-digoxigenin Antikörper auf das Präparat aufgetragen, 30 min inkubiert und dann mit PBS gespült (4 x 2 min). Im Anschluss wurde Diaminobenzidin (0,05%, 15 µl pro cm²) appliziert und nach 6 min Inkubation mit Aqua dest. gespült (3 x 1 min). Es folgte die abschließende Färbung mit Methyl-Grün (0,5 %) für 10 min und eine erneute Spülung mit Aqua dest. (10 x eintauchen für 30 sec) und 100% N-Butanol (10x eintauchen für 30 sec). Zur endgültigen Fixation wurden die Präparate in Xylol entwässert (3 x 2 min) und mit DePeX[®] versiegelt.

Parallel zu den verwendeten Explantaten wurden eine Negativ- sowie eine Positivkontrolle für das ApopTag[®] Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit nach der identischen Methode angefertigt. Für die Negativkontrolle wurde unbehandelter Knorpel von jungen gesunden Kälbern genutzt, für die Positivkontrolle wurde dieser Knorpel einer Druckschädigung durch mechanische Kompression ausgesetzt, so dass eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nachweisbar ist (Kurz et al. 2004).

2.10.4 Immunhistochemische Färbung der Estradiolrezeptoren alpha und beta

Zum Nachweis der Anwesenheit der Estradiolrezeptoren vom Typ alpha und beta wurden immunhistologische Färbungen an unbehandeltem bovinen Knorpelgewebe durchgeführt. Das zuvor in Paraffin eingebettete Gewebe wurde zunächst mit Xylol (3 x 5 min) aus dem Paraffin gelöst, in einer absteigenden Alkoholreihe (100 % 5 min, 96 % 3 min, 70 % 3 min) geschwenkt und anschließend 5 min in PBS gespült. H₂O₂ wurde im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und wirkte für 30 Minuten ein. Nach dreimaligem Spülen mit

Tris-NaCl wurden die Präparate unter der Atmosphäre eines Citratpuffers zwei Mal je 5 Minuten bei 750 Watt in einer Mikrowelle (Severin MW 9613) behandelt um eine Demaskierung der Epitope zu erreichen. Nach einer 20 minütigen Phase des Auskühlens und dreimaligen Spülens mit Tris-NaCl wurde der erste Antikörper appliziert (siehe Tab. 5). Dieser wurde in Diluent gelöst und wirkte über Nacht bei Kühlschranktemperatur ein. Nach Abspülen ungebundener Antikörper mit Tris-NaCl (3 Mal) wurde der Zweitantikörper (Code No. E0432), Verdünnung 1:400 in Diluent, für 45 Minuten hinzugefügt. Dies ist ein aus Ziegenserum gewonnener polyklonaler Antikörper, welcher gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet und zusätzlich mit Biotin gekoppelt ist. Überschüssige Antikörper wurden mit Tris-NaCl (3 Mal) abgespült. Im nächsten Schritt wurde das Vectastain® ABC Elite Kit nach Herstellerangaben angewandt, wodurch sich an den Stellen der Antikörperbindung der Avidin-und-Biotingebundene-Peroxidase-Makromelukul-Complex bildet. Erneut wurde der Vorgang durch dreimaliges Spülen mit Tris-NaCl beendet. Der letzte farbgebende Arbeitsschritt beinhaltet die Anwendung des DAB-Kits (Code K3468) nach Herstellerangaben. Bei dieser auf Peroxidase-Aktivität basierenden immunhistochemischen Färbemethode entsteht durch die Diaminobenzidin-Chromogenlösung eine bräunliche Färbung. Mittels Aquatex erfolgte schließlich die Versiegelung des Präparats.

Nach identischer Methodik erfolgte die Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen. Für die Positivkontrolle des Rezeptors vom Typ alpha wurde boviner Uterus, für den Typ beta bovines Ovar verwendet. Diese Gewebe haben bekanntermaßen eine starke Expression des jeweiligen Estradiolrezeptors. Für die Negativkontrolle wurden boviner Knorpel sowie die beiden zuvor genannten Referenzgewebe nach oben beschriebenem Protokoll behandelt, jedoch ohne Anwendung der jeweiligen Erstantikörper.

Name des Antikörpers	Antigen	Herkunft	lot-Nummer
ab 75635	ER alpha	Kaninchen polyklonal	882069
ab 3576	ER beta	Kaninchen polyklonal	946598

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Erstantikörper gegen die Estradiolrezeptoren

2.10.5 Auswertung der histologischen Präparate

Die Beurteilung der histologischen Schnitte wurde lichtmikroskopisch mit dem Mikroskop Carl Zeiss Axioskop 20 durchgeführt. Für die Vitalitätsuntersuchung wurden von einem unabhängigen Untersucher bei 400-facher Vergrößerung mittels eines Zählgitters in 10 Gesichtsfeldern sowohl TUNEL-positive Zellen als auch Zellen mit Kernblebbing ausgezählt. Die Untersuchung erfolgte für jede Behandlungsgruppe lediglich in zentralen Arealen der Knorpelimplantate, welche keiner mechanischen Schädigung während der Herstellung der Implantate ausgesetzt waren. Sowohl TUNEL-positive Zellen als auch Zellen mit Kernblebbing sind morphologische Zeichen des Zelltodes, die durch DNA-Abbau und Apoptose bedingt sind.

Die Digitalisierung der histologischen Präparate erfolgte von 40-facher bis 400-facher Vergrößerung mittels eines Fotomikroskops (Mikroskop Nikon Eclipse E600, Kamera Nikon Digital Sight DS-Fi1) sowie der Software Nikon Imaging Software Elements, Basic Research 3.22.10.

2.11 Statistische Auswertung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwert und Standardfehler vom Mittelwert angegeben. Für die statistische Analyse wurde der Studentsche t-Test verwendet. Der Test wurde 2-seitig bei ungleicher Varianz durchgeführt. Getestet wurde jeweils die Versuchsgruppe mit Estradiol gegen die Versuchsgruppe ohne Estradiol. Bei den Versuchen mit den Estradiolrezeptoren wurde zusätzlich die Gruppe mit IL-1 und Estradiol ohne Rezeptorantagonist gegen die Gruppe mit IL-1 und Estradiol mit dem jeweiligen Rezeptorantagonisten unter proinflammatorischen Bedingungen getestet. Es wurde die Zuverlässigkeit einer Aussage als signifikant angenommen, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $\leq 0,05$ ermittelt wurde, als hochsignifikant bei $p \leq 0,005$.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich der Estradiol-Verdünnungsmethoden

Wie in 2.5.1 beschrieben, wurden 2 Estradiol-Verdünnungsmethoden gegeneinander verglichen. Der Einfluss der beiden Methoden auf die Knorpelimplantate wurde mit der Messung des GAG-Verlustes und der NO-Freisetzung nach insgesamt vier Tagen Inkubation verifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt.

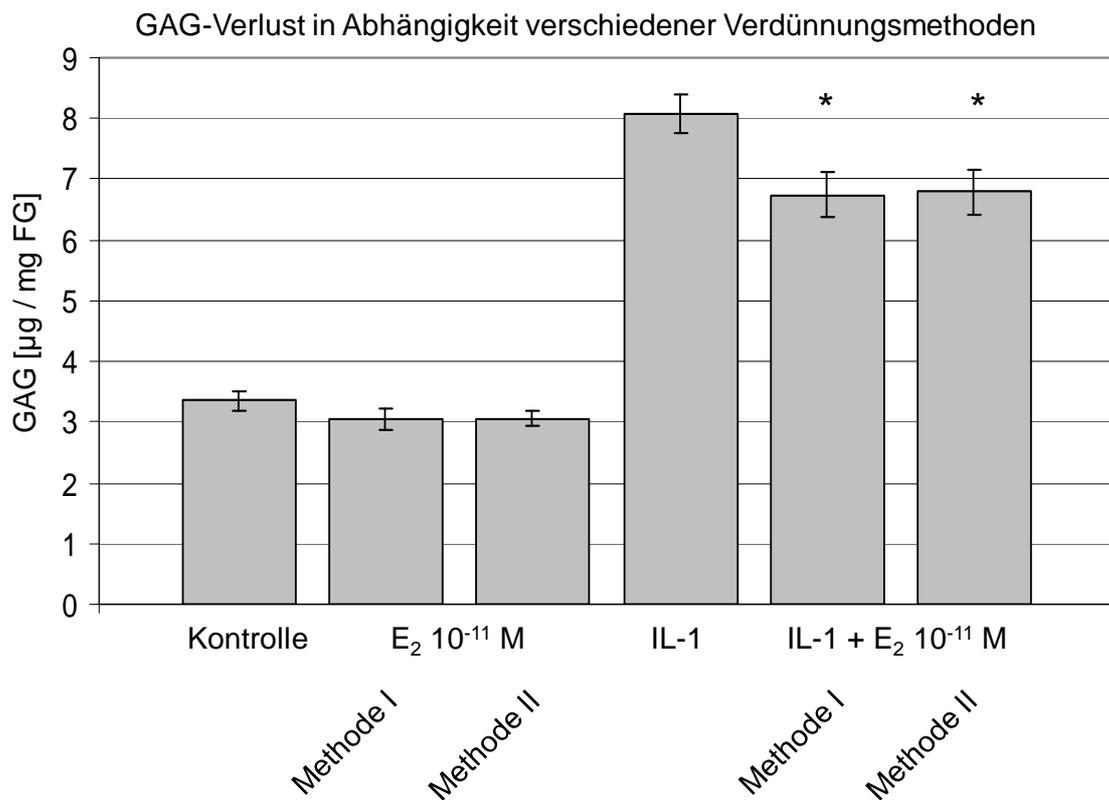


Abb. 6: GAG-Verlust in Abhängigkeit verschiedener Verdünnungsmethoden

Die Grafik zeigt den GAG-Verlust aus den Knorpelimplantaten in den Kulturüberstand. Zur Herstellung der Kulturmedien wurden zwei unterschiedliche Estradiol-Verdünnungsmethoden verwendet (Methode I und Methode II). Es wurde eine Estradiolkonzentration von 10^{-11} M verwendet. Die GAG-Messung erfolgte nach der DMMB-Methode. $n = 20$ aus 4 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Die GAG-Konzentration im Überstand der Kontrollgruppe beträgt $3,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpel. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die GAG-Freisetzung hochsignifikant auf $8 \mu\text{g}/\text{mg}$ FG an. Estradiol der Konzentration 10^{-11} M senkt diesen Wert signifikant um 16%. Bei dem Vergleich der beiden Estradiol-Verdünnungsmethoden zeigt sich, dass zwischen Methode I und Methode II kein Unterschied bezüglich des GAG-Verlustes vorliegt. Die GAG-Freisetzung ist unter Methode I sowie Methode II nahezu identisch ($\pm 0,6\%$).

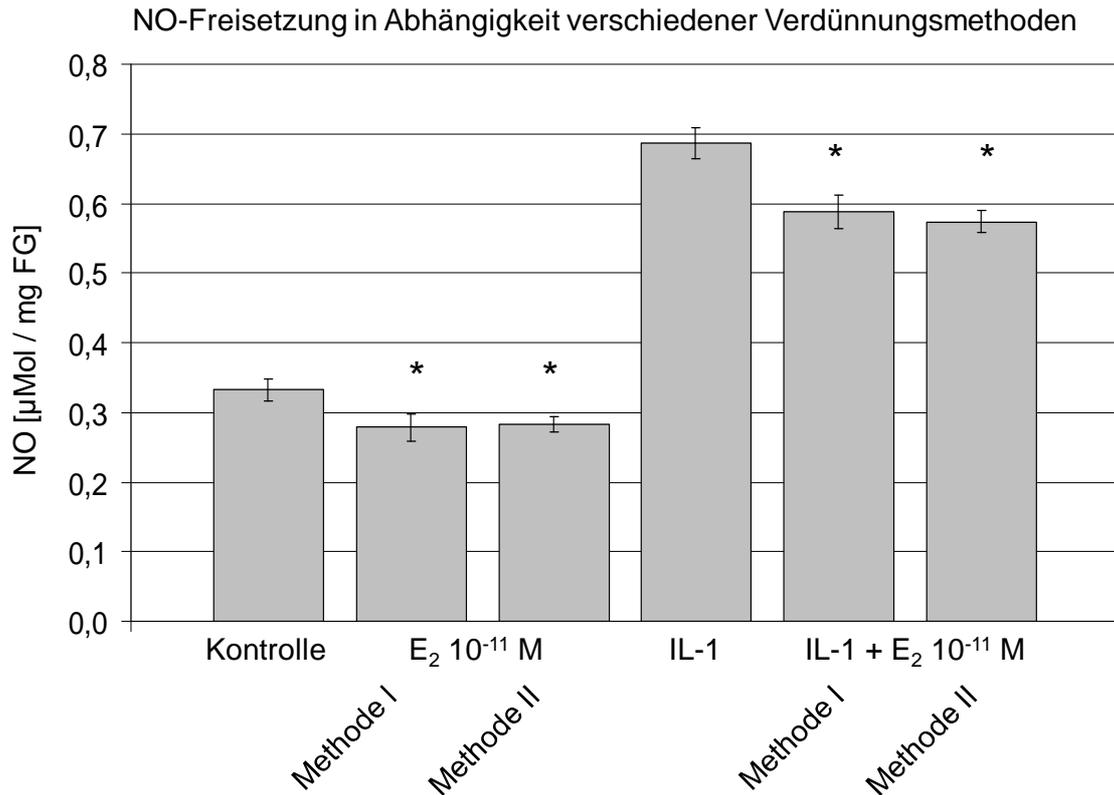


Abb. 7: NO-Freisetzung in Abhängigkeit verschiedener Verdünnungsmethoden

Die Grafik zeigt die NO-Freisetzung in den Kulturüberstand bezogen auf das Feuchtgewicht. Die Knorpel explantate wurden vier Tage inkubiert. Es wurden Gruppen ohne und mit IL-1 sowie ohne und mit Estradiol unterschieden. Die Estradiolkonzentration 10^{-11} M wurde mit 2 unterschiedlichen Verdünnungsmethoden hergestellt. Die Messung der NO-Konzentration im Überstand erfolgte mit dem Griess-Reagenz. $n = 20$ aus 4 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Die NO-Konzentration der Kontrollgruppe beträgt $0,33 \mu\text{Mol/mg}$ Knorpel. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt diese hochsignifikant auf $0,67 \mu\text{Mol/mg}$ FG an. Estradiol der Konzentration 10^{-11} M senkt die basale NO-Freisetzung signifikant um 15%, die IL-1 induzierte signifikant um 12%. Im Vergleich der beiden Verdünnungsmethoden erzielten beide Verdünnungsmethoden einen nahezu identischen Effekt ($\pm 2\%$).

3.1.1 Schlussfolgerung

Für die folgenden Versuche wird die Verdünnungsmethode II genutzt. Sie beinhaltet weniger Verdünnungsschritte, welche potentielle Fehlerquellen darstellen. Des Weiteren zeigen die Messungen des GAG-Verlustes und der NO-Freisetzung, dass die 1 %ige Ethanolkonzentration keinen Einfluss auf diese Messparameter hat.

3.2 Messungen zur Proliferation von MCF-7-Zellen unter Estradioleinfluss

Das Wachstum der rezeptorpositiven MCF-7-Zellen wird durch Estradiol stimuliert. Die Inkubation erfolgte für sechs Tage ohne sowie mit unterschiedlichen Estradiolkonzentrationen. Der DNA-Gehalt der Zellkulturen wurde anschließend mit der CyQuant-Methode ermittelt. Von dem DNA-Gehalt ($\mu\text{g DNA pro ml Medium}$) kann man Rückschlüsse auf die Zellanzahl pro ml Medium ziehen, so dass sich die Proliferation ableiten lässt. Aus den einzelnen Messwerten wurde der Mittelwert berechnet und mit dem Standardfehler in Abb. 8 graphisch aufgetragen.

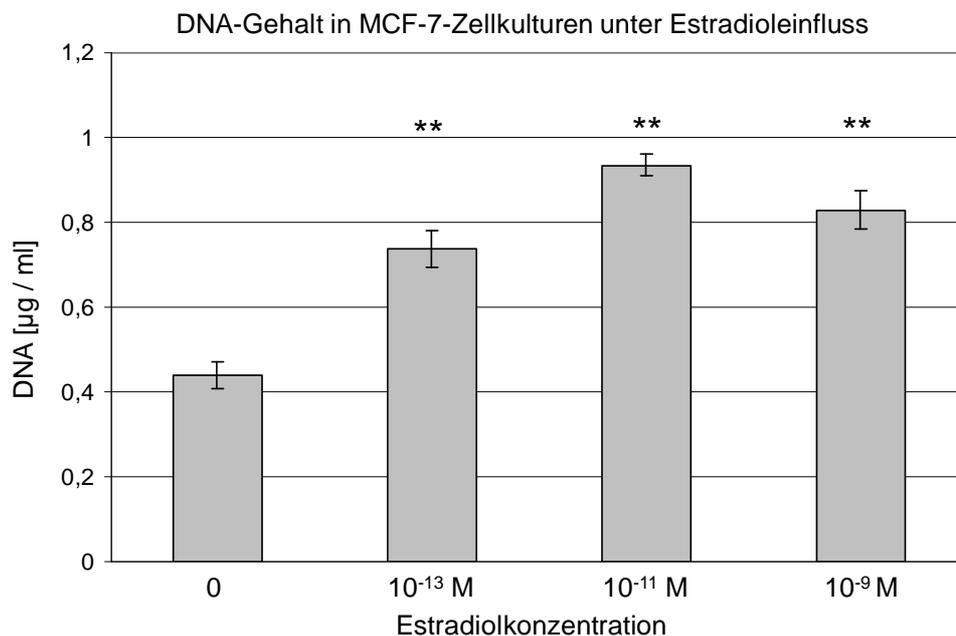


Abb. 8: DNA-Gehalt in MCF-7-Zellkulturen unter Estradioleinfluss

Die Grafik zeigt den DNA-Gehalt von Zellkulturen der rezeptorpositiven MCF-7-Zellen nach 6 Tagen Inkubation unter verschiedenen Estradiolkonzentrationen. Der DNA-Gehalt wurde mit der CyQuant-Methode bestimmt. $n = 6$, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, ** $p \leq 0,005$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Der DNA-Gehalt in den Versuchsgruppen unter Estradioleinfluss ist jeweils hochsignifikant gegenüber der Kontrollgruppe ohne Estradiol erhöht. Die stärkste Proliferation liegt bei der Estradiolkonzentration 10^{-11} M vor. Mit diesem Vorversuch liegt die Positivkontrolle für die Wirksamkeit des eingesetzten Estradiols sowie die ausgewählte Verdünnungsmethode vor.

3.3 Rezeptornachweis im Gelenknorpel

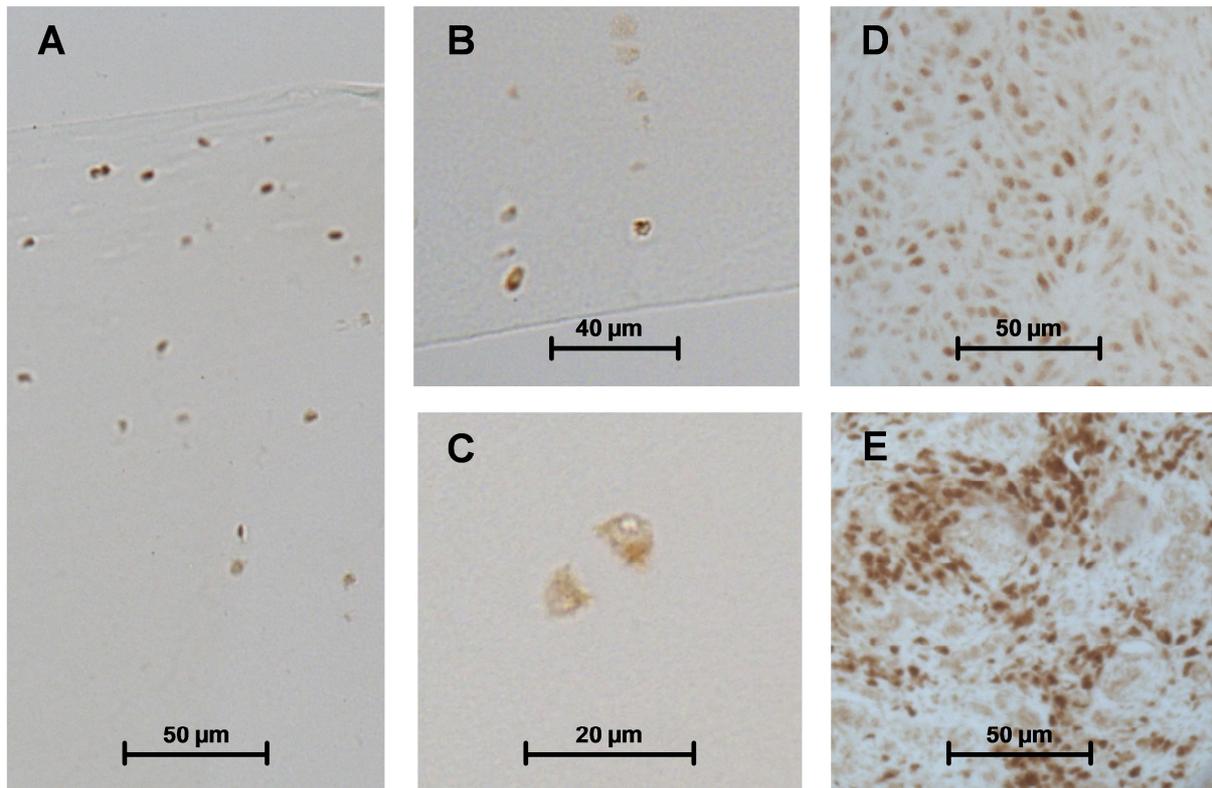


Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis der Estradiolrezeptoren alpha und beta

Die Abbildungen zeigen Ausschnitte aus den verwendeten Knorpelimplantaten, welche mittels polyklonalen Antikörpern gegen die Estradiolrezeptoren alpha und beta gefärbt wurden. Das verwendete Knorpelgewebe wurde zuvor nicht inkubiert. Es zeigt sich in allen Arealen des Knorpels eine positive Färbung im Bereich der Zellkerne. **A** zeigt einen Ausschnitt von der Knorpeloberfläche (ER alpha) **B** zeigt einen Ausschnitt aus einer tieferen Zone, wo die Chondrozyten in Reihen senkrecht zur Knorpeloberfläche angeordnet sind (ER alpha). **C** zeigt die Färbung von zwei Nuclei welche zu einem Chondron gehören (ER beta). **D** zeigt die Positivkontrolle mit bovinem Uterusgewebe, in welcher die Zellkerne der Muskelzellen angefärbt sind (ER alpha) **E** zeigt die Positivkontrolle mit bovinem Ovargewebe, in welcher die Granulosazellen positiv angefärbt sind (ER beta) Das Knorpelgewebe wurde mittels Mikrowelle vorbehandelt und die primären Antikörper in einer 1:1000 Konzentration eingesetzt. Die Negativkontrolle wurde jeweils ohne den Primärantikörper durchgeführt, hierbei zeigte sich keinerlei Anfärbung der Zellkerne.

Die immunhistologische Färbung des Knorpelgewebes mittels Antikörpern gegen die Estradiolrezeptoren alpha sowie beta ist positiv im Bereich der Zellkerne aller Chondrozyten (siehe Abb. 9). Sowohl die Zellen nahe der Knorpeloberfläche, als auch die Zellen in tieferen Arealen, wo die Chondrozyten in Reihen angeordnet sind, sind positiv angefärbt. Die Bereiche des Zytoplasmas, der Zellmembran sowie der extrazellulären Matrix weisen keinerlei Färbung auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass das verwendete Knorpelgewebe von weiblichen Rindern die nukleären Estradiolrezeptoren exprimiert und somit die grundsätzliche Fähigkeit besitzt, auf Stimulation mittels Estradiol zu reagieren.

3.4 Lichtmikroskopische Vitalitätsuntersuchung und Darstellung des Knorpelgewebes

In der lichtmikroskopischen Untersuchung der Toluidinblaufärbung (siehe Abb. 10) wird die extrazelluläre Matrix homogen violett angefärbt, während sich die Zellkerne blau darstellen. Die Chondrozyten der Knorpeloberfläche sind vielfach abgeflacht und liegen mit der Längsachse parallel zur Oberfläche ausgerichtet, wohingegen die Chondrozyten in tieferen Knorpelarealen rundlicher und in Reihen senkrecht zur Knorpeloberfläche angeordnet sind.

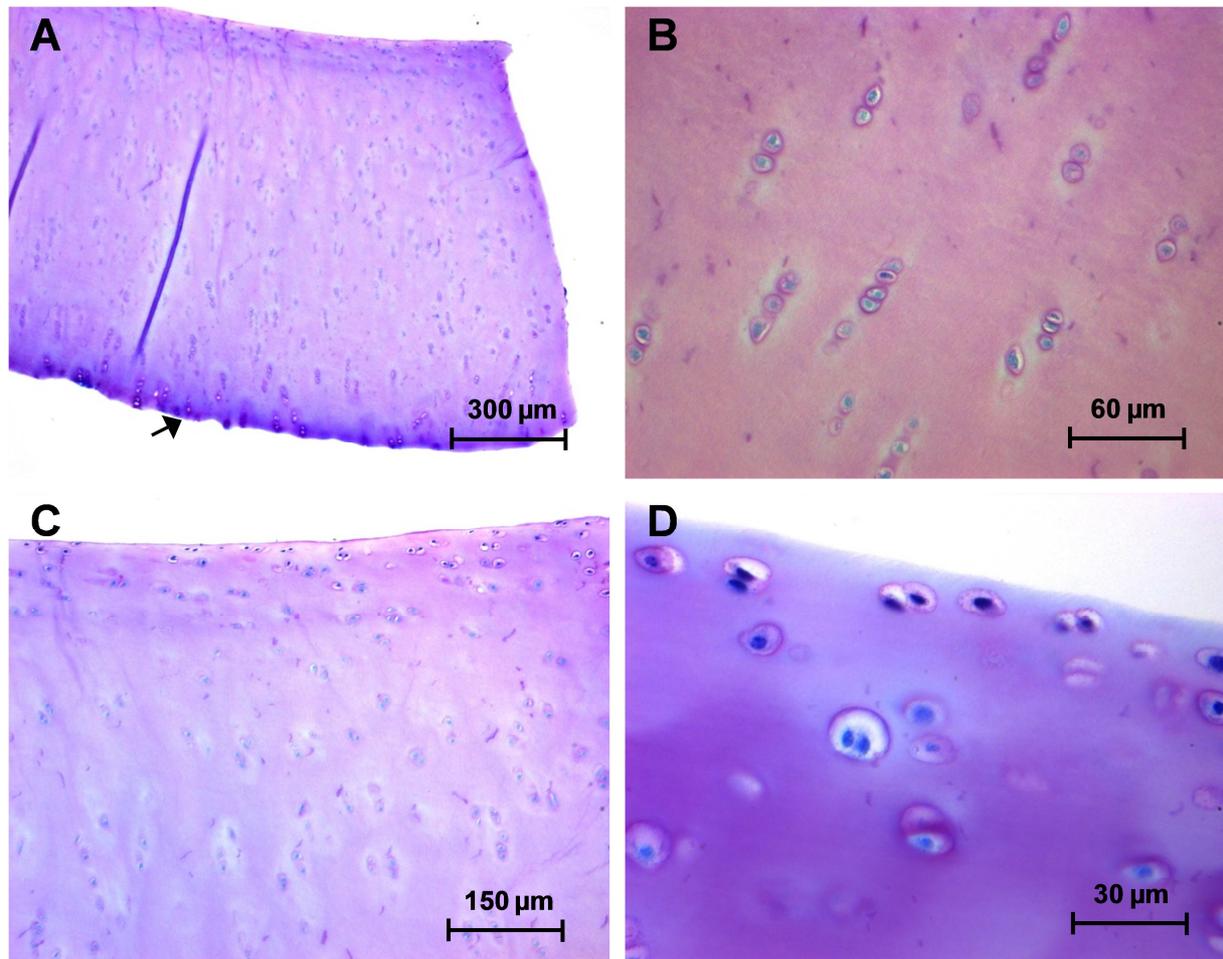


Abb. 10: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpelimplantate (Toluidinblau)

- A: Knorpelimplantat in der Übersicht. Die Implantatdicke beträgt ca. 1 mm. Die Glykosaminoglykane der EZM werden violett sowie die Zellkerne blau angefärbt. In der Darstellung befindet sich die Knorpeloberfläche oben, die knochennahe Schnittkante zeigt nach unten (Pfeilmarkierung). Die knorpeltypischen Zellen (Chondrozyten) liegen solitär oder in Gruppen zusammen (Chondrone) in die EZM eingebettet vor. Die Zelldichte ist im gesamten Knorpelimplantat homogen.
- B: Ausschnittsvergrößerung eines tieferen Areals des Knorpelimplantats. Die Chondrozyten liegen in Reihen angeordnet vor, welche senkrecht zur Knorpeloberfläche ausgerichtet sind. Die Form der Zellen ist rundlich.
- C+D: Ausschnittsvergrößerungen von der Knorpeloberfläche. Die Zellen sind teilweise abgeflacht und liegen mit der Längsachse parallel zur Oberfläche ausgerichtet.

Bei den histologischen Untersuchungen wurden bei 400facher Vergrößerung in 10 Gesichtsfeldern der Knorpelimplantate die Zellen mit den Zeichen des Kernblebbings sowie TUNEL-positive Zellen ausgezählt. Es zeigte sich, dass weder Interleukin-1 noch Estradiol einen Einfluss auf die lichtmikroskopischen Anzeichen für Zellschädigung haben. In allen Behandlungsgruppen beträgt in den zentralen Arealen die Häufigkeit von Zellen mit obengenannten Zeichen zwischen 0,5 und 1,5 Prozent. Lediglich an den Randbereichen, welche mechanischen Einflüssen während der Herstellung der Implantate ausgesetzt waren, findet man eine Häufung von Zellen mit dem morphologischen Korrelat des Zelltodes (siehe Abb. 11 und Abb. 12).

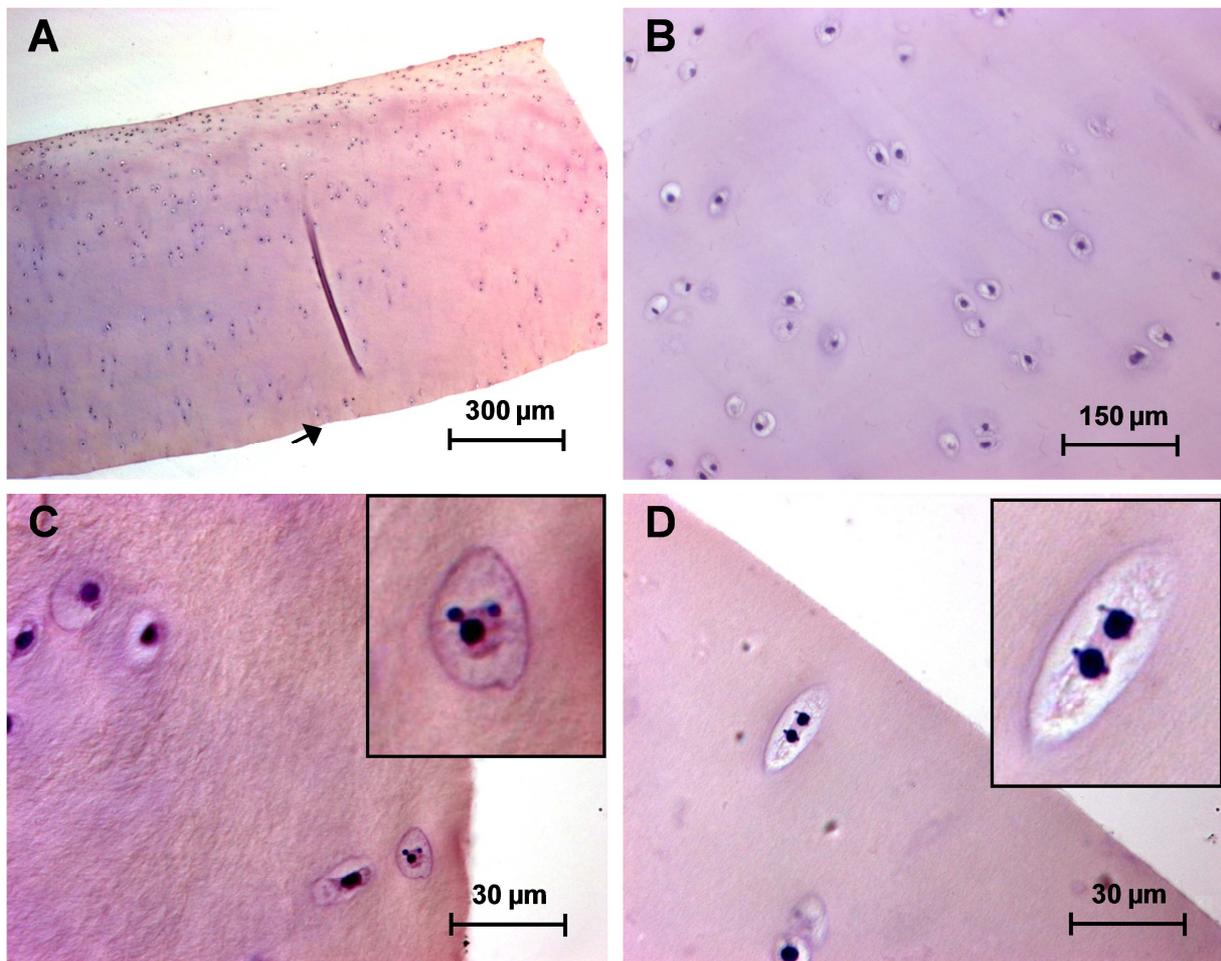


Abb. 11: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpelimplantate (Hämatoxylin)

- A: Knorpelimplantat in der Übersicht. Die Implantatdicke beträgt ca. 1 mm. Hämatoxylin färbt die Zellkerne der Chondrozyten blau an. Die knochen-nahe Schnittkante zeigt nach unten (Pfeilmarkierung).
- B: Ausschnittsvergrößerung aus einem zentralen Areal des Knorpelimplantats. Die Chondrozyten weisen keine morphologischen Anzeichen einer Zellschädigung auf.
- C+D: Ausschnittsvergrößerungen aus Randbereichen des Knorpelimplantats. An den Schnittkanten sind einzelne Zellen durch die mechanische Schädigung des Gewebes apoptotisch geworden, was sich morphologisch als Kernblebbing darstellt. Es entspricht Ausziehungen und Abschnürungen von Chromatinanteilen in Zellkernen. Die betroffenen Zellen wurden exemplarisch im Kasten vergrößert dargestellt.

In der lichtmikroskopischen Darstellung der Hämatoxylinfärbung (siehe Abb. 11) färben sich die Zellkerne der Chondrozyten intensiv blau an. Wie zuvor beschrieben haben weder Interleukin-1 noch Estradiol nennenswerten Einfluss auf die Anzahl der Zellen mit dem Zeichen des Kernblebbings. Während Chondrozyten in zentralen Arealen der Explantate keine morphologischen Anzeichen einer Zellschädigung aufweisen, liegen an den Schnittkanten einzelne mechanisch geschädigte Zellen vor. Morphologisches Zeichen des apoptotischen Vorgangs ist das Kernblebbing, welches Ausziehungen und Abschnürungen von Chromatinanteilen in Zellkernen entspricht.

Bei der TUNEL-Färbung werden durch eine enzymatische Reaktion DNA-Fragmente in untergehenden Zellen sichtbar gemacht. Vitale Zellkerne färben sich grün an, TUNEL positive Zellkerne hingegen zusätzlich braun. Die Untersuchung der mit dieser Methode gefärbten Knorpel-explantate zeigt weder einen nennenswerten Einfluss von Interleukin-1 noch von Estradiol auf die Anzahl TUNEL positiver Chondrozyten. In zentralen Arealen konnten diese Zellen nur vereinzelt gefunden werden. An der Schnittkante, einem Bereich mechanischer Schädigung, liegen vermehrt Zellen mit diesem Zeichen der Zellschädigung vor (siehe Abb. 12).

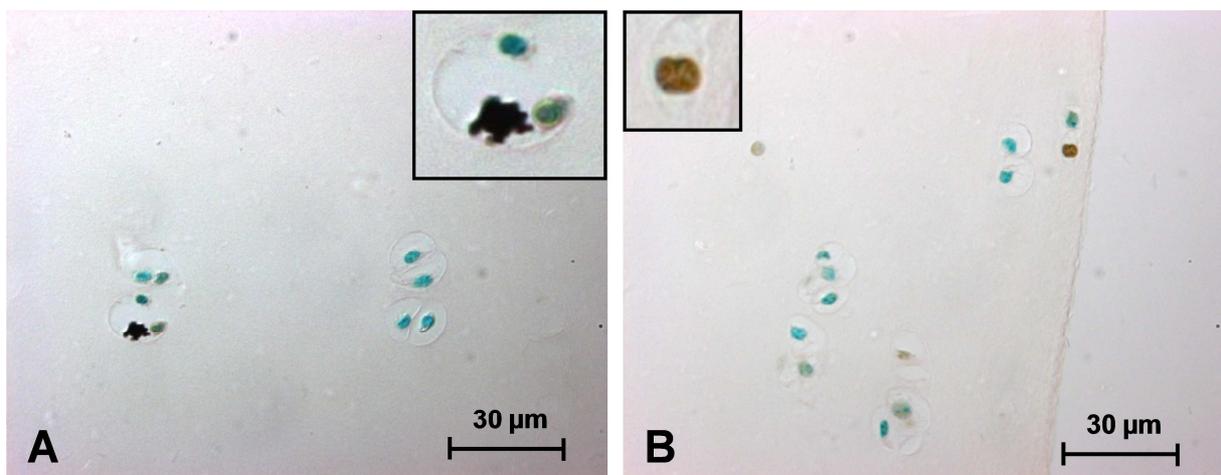


Abb. 12: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpel-explantate (TUNEL)

A+B: Bei der TUNEL-Färbung werden vitale Zellkerne grün angefärbt, apoptotische und geschädigte Zellkerne hingegen braun. Exemplarisch sind aus Arealen mechanischer Schädigung (Schnittkante) Zellen dargestellt, die dieses Zeichen der Zellschädigung aufweisen. In zentralen Arealen konnten diese Zellen nur vereinzelt gefunden werden.

In der lichtmikroskopischen Untersuchung des verwendeten humanen Knorpelgewebes zeigt sich eine große Ähnlichkeit zum verwendeten bovinen Knorpelgewebe (siehe Abb. 13). Die Zelldichte in den Knorpelimplantaten ist in beiden Spezies identisch, die Verteilung der Chondrozyten gleichmäßig. Die Chondrozyten liegen entweder solitär oder in Zweiergruppen zusammen. Die Matrix um die Zellen ist stark angefärbt (Knorpelhof), was auf eine hohe Konzentration von GAG hindeutet. An der Oberfläche erscheint die EZM etwas faserig und parallel zur Oberfläche ausgerichtet.

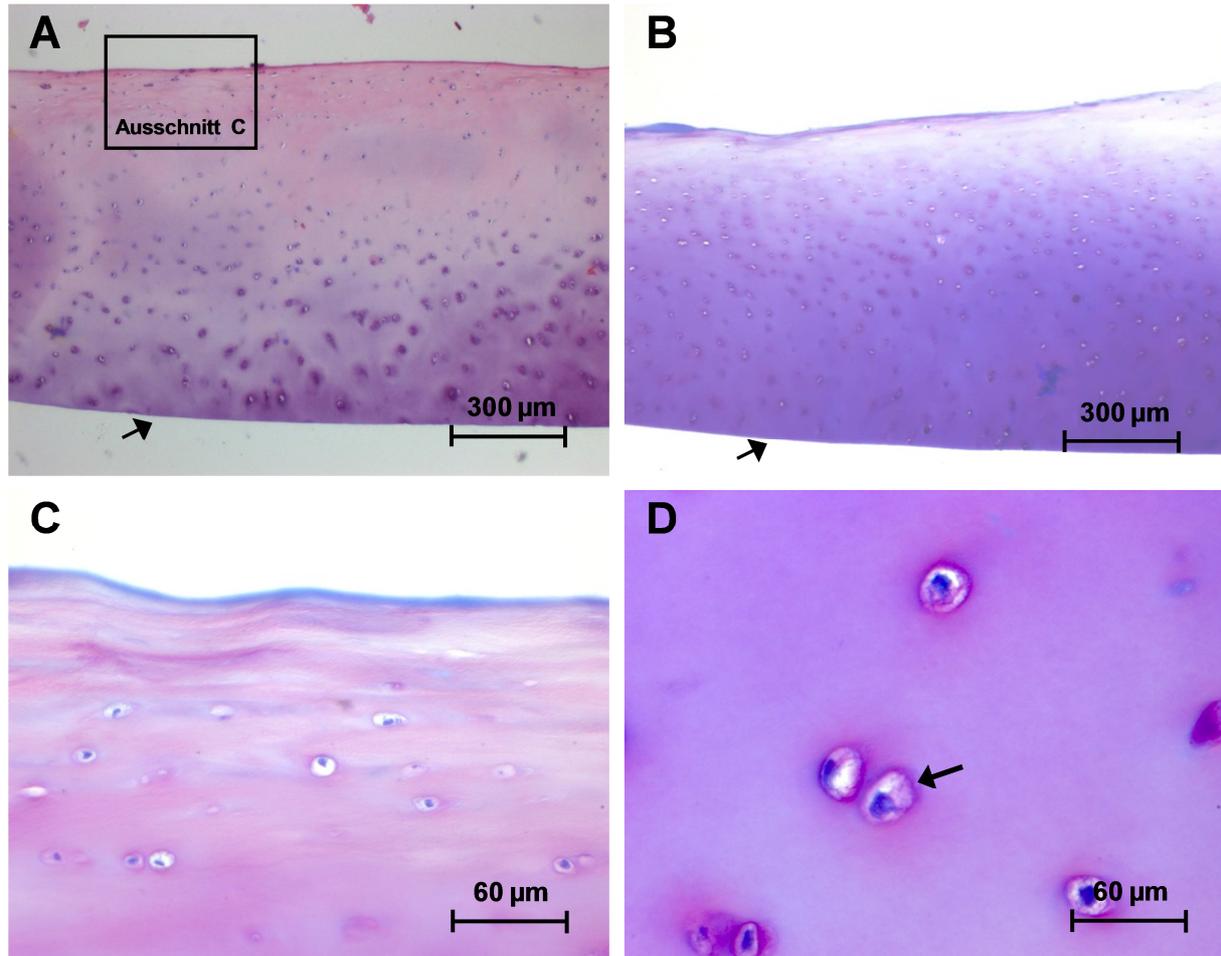


Abb. 13: Lichtmikroskopische Darstellung des humanen Knorpelgewebes

- A: Knorpelimplantat in der Übersicht in Hämatoxylinfärbung. Die Implantate des humanen Gewebes wurden mit identischer Technik hergestellt. Die Dicke beträgt ebenso ca. 1 mm. Die knochenartige Schnittkante zeigt nach unten (Pfeilmarkierung).
- B: Knorpelimplantat in der Übersicht. Die Toluidinblaufärbung macht Glykosaminoglykane violett sichtbar. Es zeigt sich eine intensiv angefärbte Schicht an der Knorpeloberfläche, im Bild oben abgebildet, welche als Artefakt einzustufen ist.
- C: Ausschnittsvergrößerung der Knorpeloberfläche aus A (Hämatoxylinfärbung). Die Zellen liegen solitär vor, haben eine abgeflachte Form und sind mit der Längsachse parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Die EZM erscheint etwas faserig und parallel zur Oberfläche.
- D: Ausschnittsvergrößerung eines zentralen Areals aus B (Toluidinblaufärbung). Vitale Chondrozyten liegen entweder solitär oder in Zweiergruppen zusammen. Die Matrix um die Zellen ist stark violett angefärbt (Knorpelhof), was auf eine hohe Konzentration von GAG hindeutet (Pfeilmarkierung).

3.5 Untersuchungen zum GAG-Verlust

Glykosaminoglykane sind ein wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix von Knorpelgewebe (siehe 1.2). Die Freisetzung von GAG aus dem Gewebeverband führt zu einer Schädigung des Knorpels sowie dessen Funktionstüchtigkeit. Bei der Arthrose wird dieser Prozess vermehrt beobachtet (siehe 1.4). Die Freisetzung von Proteoglykanen in das Kulturmedium wurde mit Hilfe des DMMB-Tests nach Beendigung der Inkubation bestimmt und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Aus den Ergebnissen der Einzelmessungen (μg GAG je mg Knorpelgewebe) wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Standardfehler graphisch dargestellt.

3.5.1 Einfluss von Estradiol auf den GAG-Verlust

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit verschiedenen Estradiolkonzentration inkubiert, beginnend bei 10^{-15} M bis zu der deutlich über dem physiologischen Wert liegenden Konzentration 10^{-7} M. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 10 ng/ml unterschieden. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage. Anschließend wurde die GAG-Messung mittels des DMMB-Tests im Kulturmedium durchgeführt. Aus diesen Daten konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols erstellt werden (siehe Abb. 14).

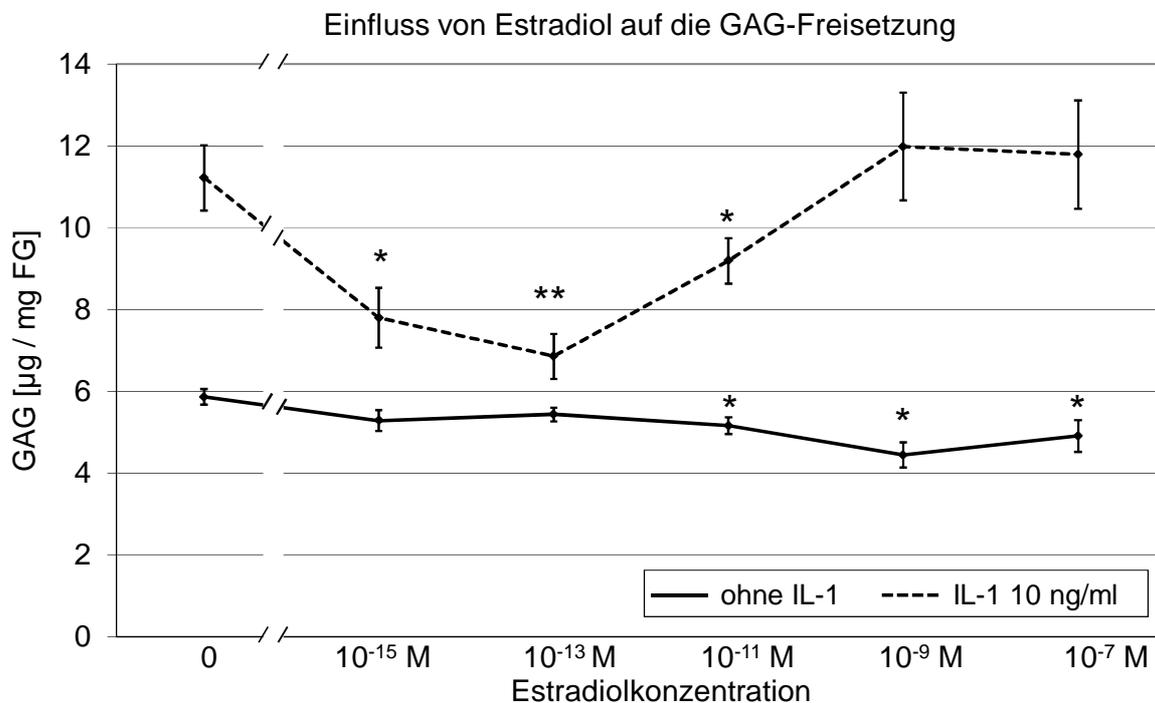


Abb. 14: Einfluss von Estradiol auf den GAG-Verlust

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die GAG-Freisetzung erstellt. Die GAG-Messung erfolgte nach der DMMB-Methode. $n = 20$ aus 4 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

In der Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt sich, dass Estradiol den IL-1 induzierten GAG-Verlust von 11,2 µg/mg FG signifikant mit den Konzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M und 10^{-11} M absenkt. Der stärkste und hochsignifikante Effekt liegt bei 10^{-13} M, hier wird der GAG-Verlust um 38% gesenkt. Die basale GAG-Freisetzung hingegen wird durch die hohen Estradiolkonzentrationen 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M signifikant gesenkt, die niedrigen Estradiolkonzentrationen zeigen keinen Einfluss.

3.5.2 Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf den GAG-Verlust

Die Knorpelimplantate wurden mit der Estradiolkonzentration 10^{-13} M inkubiert. Um den Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg zu hemmen, wurden 30 Minuten vor der Estradioleinwirkung die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen in der Konzentration 10^{-9} M appliziert. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 10 ng/ml unterschieden. Nach Beendigung der viertägigen Inkubation erfolgte die GAG-Messung mittels des DMMB-Tests (siehe Abb. 15).

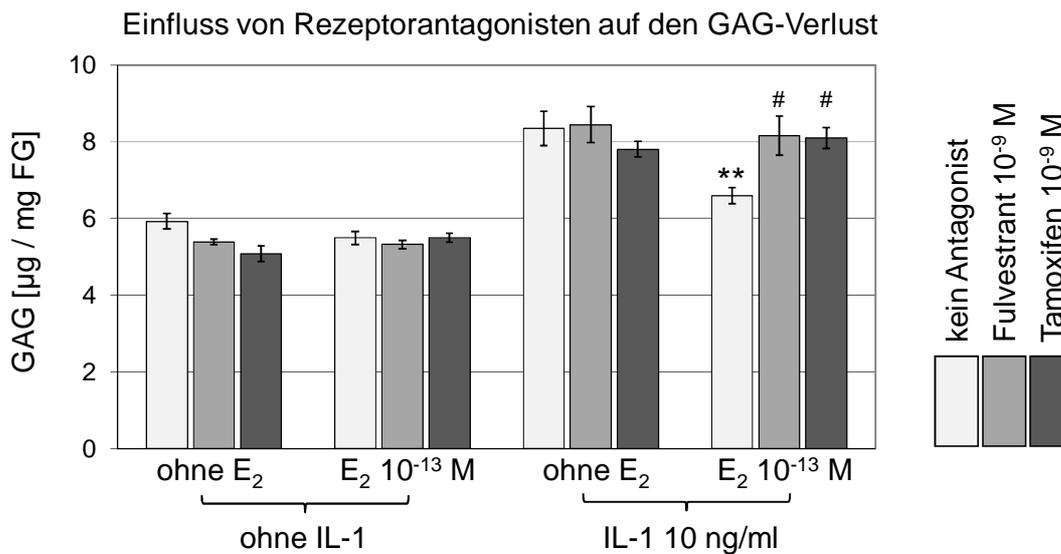


Abb. 15: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf den GAG-Verlust

Die Knorpelimplantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterschieden. Die GAG-Freisetzung wurde nach der DMMB-Methode bestimmt. $n = 15$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, ** $p \leq 0,005$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol, # $p \leq 0,05$ E₂ mit RA vs. E₂ ohne RA

In der Kontrollgruppe beträgt der mittlere GAG-Verlust 5,5 µg/mg FG. Interleukin erhöht den GAG-Verlust signifikant auf 8,2 µg/mg FG im Mittel. Im Vergleich zu der Versuchsanordnung 3.5.1 ist der durch Interleukin-1 induzierte Effekt auf die GAG-Freisetzung schwächer ausgeprägt. Estradiol senkt den IL-1 induzierten GAG-Verlust signifikant auf 6,6 µg/mg FG ab, was einer Senkung um 19,5 % entspricht, während dieser Effekt durch die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen aufgehoben wird. Auf den basalen GAG-Verlust hat das Estradiol keinen Einfluss, er beträgt unter Estradioleinfluss ebenfalls 5,5 µg/mg FG.

3.6 Untersuchungen zur NO-Freisetzung

Stickstoffmonoxid scheint als Entzündungsmediator an der Knorpelschädigung beteiligt zu sein. Bei Patienten, welche unter Arthrose leiden, ist NO in der Synovialflüssigkeit vermehrt nachweisbar (siehe 1.4.4). Nach Beendigung der viertägigen Inkubation wurde im Überstand die NO-Konzentration mittels des Griess-Reagenz gemessen und auf das Feuchtgewicht der Explantate bezogen. Aus den Ergebnissen der Einzelmessungen (µMol NO je mg Knorpelfeuchtgewicht) wurde der Mittelwert gebildet und mit dem Standardfehler in Abb. 16 und Abb. 17 graphisch dargestellt.

3.6.1 Einfluss von Estradiol auf die NO-Freisetzung

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von Estradiol wurden die Knorpelimplantate ohne sowie mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen (10^{-15} M bis 10^{-7} M in Schritten je zwei Zehnerpotenzen) inkubiert. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 10ng/ml unterschieden. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage bei 37 °C. Anschließend wurde die NO-Konzentration im Kulturmedium mit dem Griess-Reagenz bestimmt. Aus diesen Daten konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols erstellt werden.

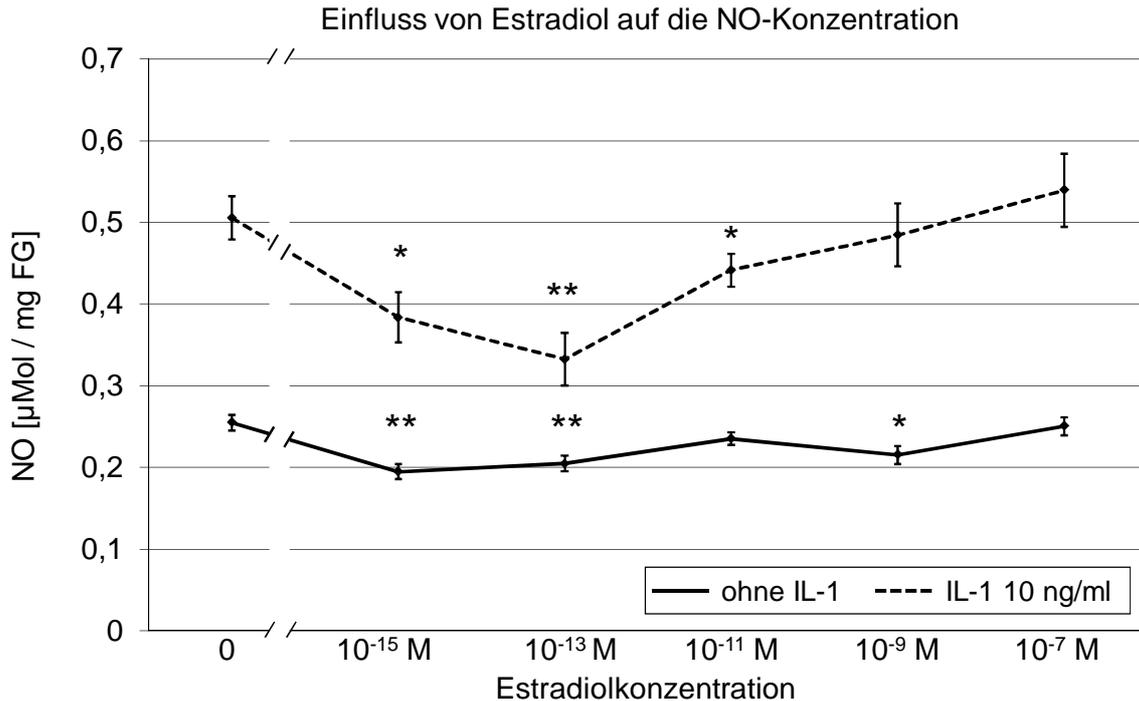


Abb. 16: Einfluss von Estradiol auf die NO-Konzentration

Die Knorpel explantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die NO-Konzentration erstellt. Die NO-Messung erfolgte mit dem Griess-Reagenz. $n = 20$ aus 4 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,005$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

In der Kontrollgruppe beträgt die NO-Konzentration im Kulturmedium $0,25 \mu\text{Mol/mg}$ Knorpelgewebe. Estradiol der Konzentration 10^{-15} M, 10^{-13} M und 10^{-9} M senken diese signifikant ab, bis auf die minimale Konzentration von $0,2 \mu\text{Mol/mg}$ FG. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die NO-Konzentration signifikant im Überstand um 98 % auf $0,5 \mu\text{Mol/mg}$ FG an. Estradiol der niedrigeren Konzentrationen (10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M) mindern diese signifikant, mit dem stärksten Effekt bei 10^{-13} M. Die hohen Estradiolkonzentrationen (10^{-9} M und 10^{-7} M) haben unter proinflammatorischen Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des NO im Kulturmedium.

3.6.2 Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die NO-Konzentration

Die Knorpel explantate wurden mit der Estradiolkonzentration 10^{-13} M für vier Tage inkubiert. Um den Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg zu hemmen, wurden 30 Minuten vor der Estradioleinwirkung die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen in der Konzentration 10^{-9} M appliziert. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit Interleukin 10 ng/ml unterschieden. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Messung der NO-Konzentration mit dem Griess-Reagenz.

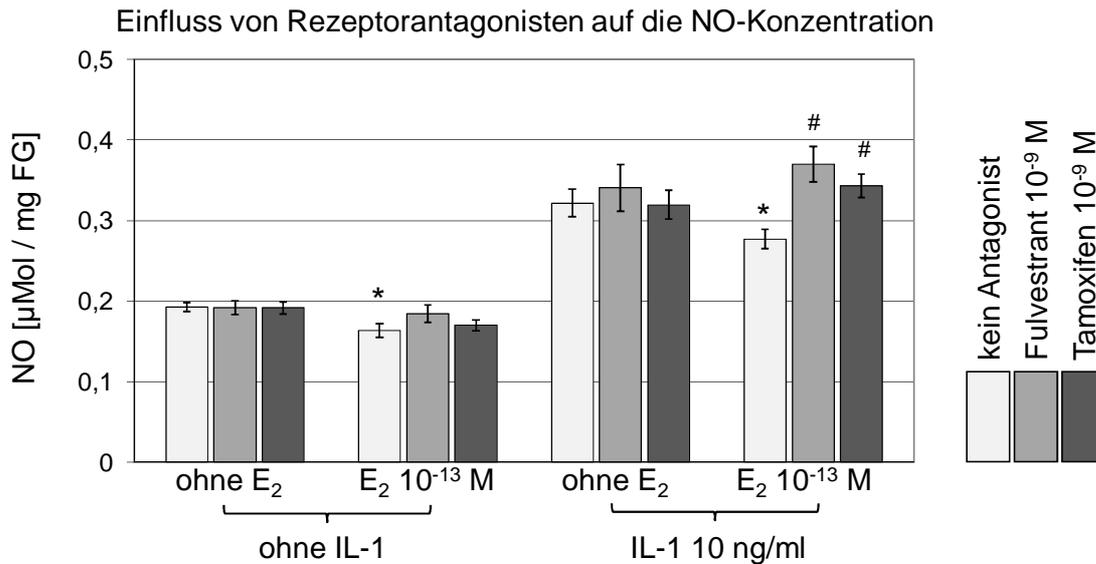


Abb. 17: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die NO-Konzentration

Die Knorpelimplantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterscheiden. Die NO-Konzentration wurde nach der Griess-Methode bestimmt. $n = 15$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol, # $p \leq 0,05$ E₂ mit RA vs. E₂ ohne RA

Bei diesen Versuchen beträgt die basale NO-Konzentration im Überstand der Kontrollgruppe 0,19 μ Mol/mg Knorpelgewebe. Unter Estradioleinfluss, ohne Applikation von Antagonisten, sinkt die Stickstoffmonoxid-Konzentration signifikant um 18% auf 0,16 μ Mol/mg FG. In Anwesenheit von Fulvestrant und Tamoxifen hat Estradiol keinen signifikanten Einfluss. Interleukin führt zu einer deutlichen und signifikanten Erhöhung der NO-Konzentration (0,32 μ Mol/mg FG). Estradiol wiederum senkt die IL-1 induzierte NO-Konzentration um 16% signifikant ab. Dieser Effekt wird sowohl durch Fulvestrant als auch Tamoxifen aufgehoben. Unter Einwirkung der Rezeptorantagonisten liegt eine leichte Steigerung der NO-Konzentration im Medium vor.

3.7 Untersuchungen zur Transkription des Enzyms iNOS

Die induzierbare NO-Synthase ist ein Enzym, welches unter anderem durch IL-1 aktiviert wird. Im Knorpelgewebe ist iNOS an der Synthese des Entzündungsmediators NO mitbeteiligt. Zur Messung der Quantität dieses Enzyms wurden die Implantate nach der viertägigen Inkubation in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Mörser und Pestill zerkleinert und zur weiteren mRNA Isolierung aufbereitet. Anschließend erfolgte die realtime RT-PCR (siehe 2.9). Die Ergebnisse aller Behandlungsgruppen wurden relativ zur Kontrollgruppe gesetzt. Aus den Einzelergebnissen wurde der Mittelwert berechnet und mit dem Standardfehler in Abb. 18 und Abb. 19 graphisch aufgetragen.

3.7.1 Einfluss von Estradiol auf die Transkription von iNOS

Die viertägige Inkubation der Knorpelimplantate erfolgte ohne sowie mit Estradiol. Aus den Ergebnissen der einzelnen Estradiolkonzentrationen wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die Transkription des Enzyms iNOS erstellt. Es wurde eine Gruppe ohne inflammatorische Bedingungen (ohne IL-1) sowie eine proinflammatorische Gruppe (mit IL-1 10 ng/ml) unterschieden.

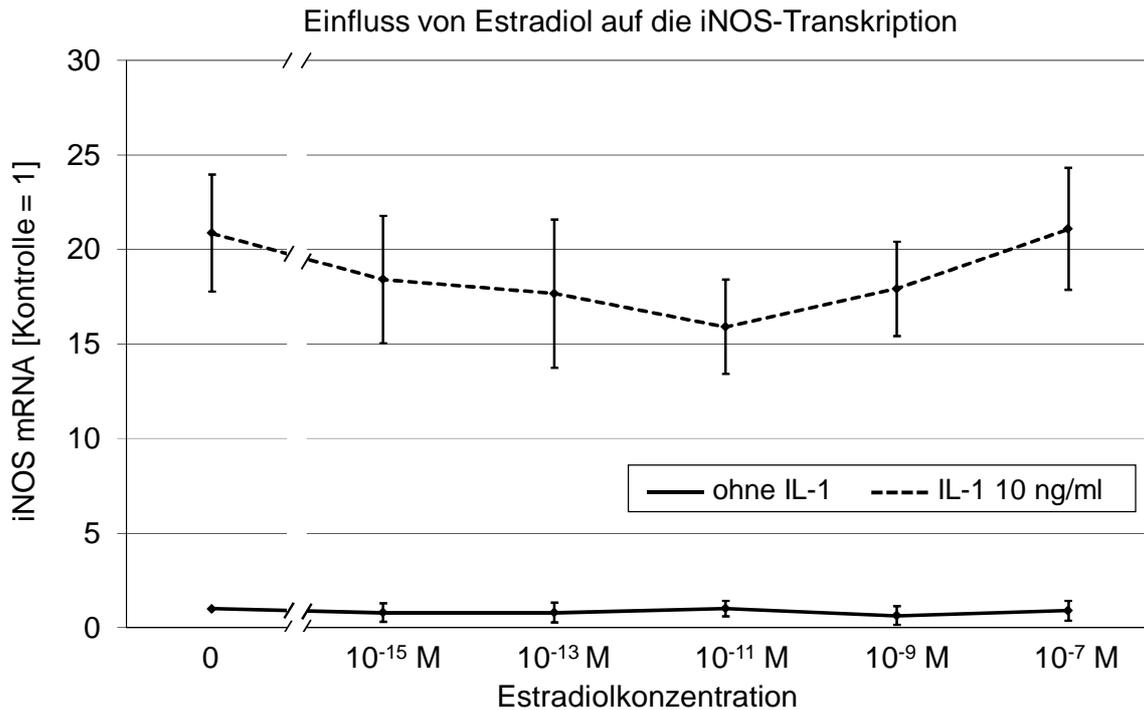


Abb. 18: Einfluss von Estradiol auf die iNOS-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die iNOS-Transkription erstellt. Unterschieden wurden Gruppen mit und ohne IL-1. Die Quantifizierung der Transkription erfolgte mit der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler

Während in den Behandlungsgruppen ohne IL-1 die Messwerte der Transkription eine geringe Streuung aufweisen (Standardfehler 0,1 – 0,15), sind die Standardfehler in der Behandlungsgruppe mit IL-1 deutlich größer (2,5 – 3,9). Die Transkription der induzierbaren NO-Synthase steigt unter proinflammatorischen Bedingungen signifikant um den Faktor 21 an. In den Behandlungsgruppen ohne IL-1 hat Estradiol keinen nennenswerten Einfluss auf die iNOS-Transkription. Die IL-1 induzierte Transkription wird durch die Estradiolkonzentrationen unterschiedlich stark gesenkt. Der schwächste Effekt liegt bei der hohen Konzentration 10^{-7} M vor, der Stärkste bei 10^{-11} M (minus 24 %).

3.7.2 Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die Transkription von iNOS

Die Knorpelimplantate wurden mit der Estradiolkonzentration 10^{-13} M inkubiert. Um den rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg zu hemmen, wurden 30 Minuten vor der Estradioleinwirkung die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen in der Konzentration 10^{-9} M appliziert. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 10 ng/ml unterschieden. Nach Beendigung der viertägigen Inkubation erfolgte die Quantifizierung der Transkription des Enzyms induzierbare NO-Synthase.

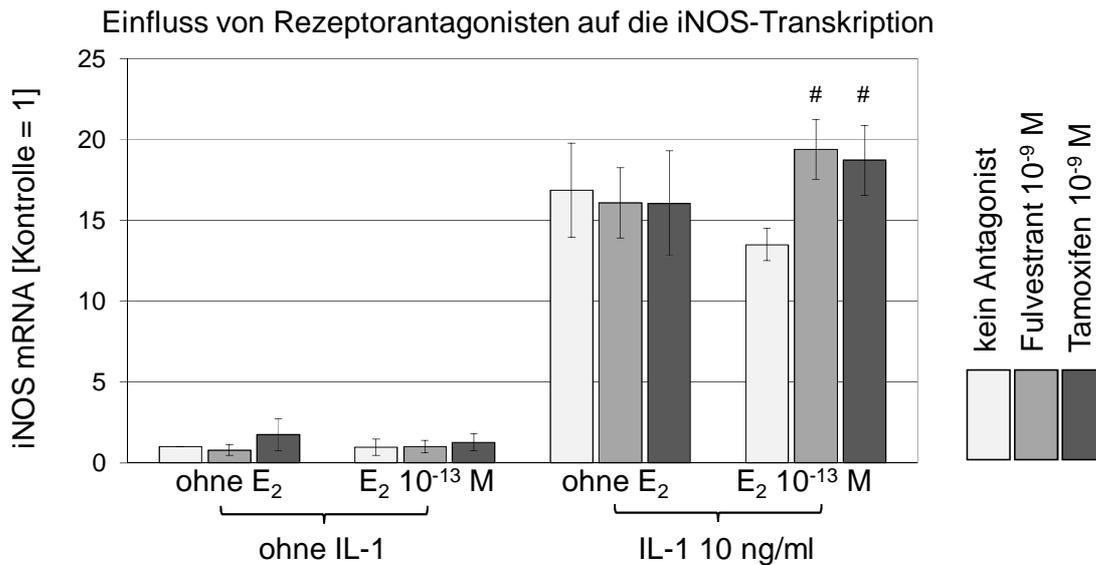


Abb. 19: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die iNOS-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterschieden. Die iNOS Transkription wurde mit der realtime RT-PCR bestimmt. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, # $p \leq 0,05$ E₂ mit RA vs. E₂ ohne RA

In den Behandlungsgruppen ohne Zugabe von IL-1 hat weder Estradiol noch Fulvestrant einen nennenswerten Einfluss auf die Transkription des Enzyms iNOS. Lediglich in der Behandlungsgruppe ohne Estradiol, mit Tamoxifen, beträgt die Transkriptionsrate 1,7 relativ zur Kontrollgruppe. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die Transkription signifikant um den Faktor 17 gegenüber der Kontrollgruppe an. Estradiol senkt die IL-1 induzierte Transkription um 19%, jedoch nicht signifikant. Die Rezeptorantagonisten Fulvestrant sowie Tamoxifen heben diese Wirkung des Estradiol auf. Im Vergleich zur Behandlungsgruppe ohne Estradiol und ohne Antagonisten, steigt unter Estradiol- und Antagonisteneinfluss die Transkriptionsrate von iNOS leicht an.

3.8 Untersuchungen zur Transkription matrixdegradierender Enzyme

Im Knorpelgewebe gelten Matrixmetalloproteinasen und Aggrecanasen als hauptverantwortliche Enzyme für den Umsatz der Kollagene und Proteoglykane der EZM. Bei pathologischen Prozessen, z.B. bei Patienten mit Osteoarthritis, kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen diesen Enzymen, ihren Inhibitoren sowie der Neusynthese kommen (siehe 1.4.2 und 1.4.3). Ein solches Ungleichgewicht führt zu einem vermehrten Abbau der EZM sowie einer Knorpelschädigung. Um die Wirkung des Estradiols auf matrixdegradierende Enzyme zu untersuchen wurde exemplarisch die Transkription der Enzyme MMP-3 sowie ADAMTS-4 mittels der realtime RT-PCR bestimmt.

3.8.1 Einfluss von Estradiol auf die Transkription matrixdegradierender Enzyme

Zur Untersuchung, welchen Einfluss verschiedene Konzentrationen von Estradiol auf die Transkription matrixdegradierender Enzyme haben, wurden die Knorpelimplantate ohne sowie mit 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M Estradiol inkubiert. Ebenso wurden Gruppen ohne und mit proinflammatorischen Bedingungen unterschieden. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Explantate für die Messung der Transkription (realtime RT-PCR) aufgearbeitet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Abb. 20 sowie Abb. 21.

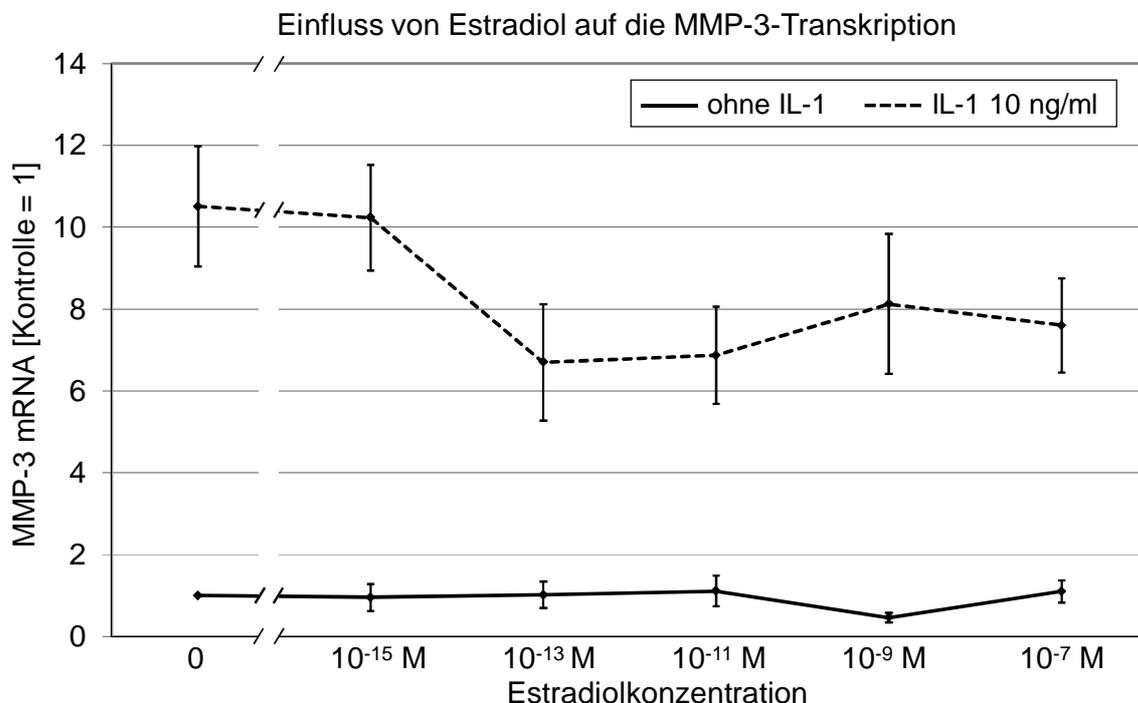


Abb. 20: Einfluss von Estradiol auf die MMP-3-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die Transkription des Enzyms MMP-3 erstellt. Die Messung erfolgte mit der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. n = 6 aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Ohne den proinflammatorischen Einfluss von Interleukin 10 ng/ml wird die Transkription von MMP-3 kaum durch Estradiol beeinflusst. Einzig Estradiol in der Konzentration 10^{-9} M senkt die Transkription signifikant ab. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die Transkription signifikant um den Faktor 10,5 an. Die niedrigste Estradiolkonzentration (10^{-15} M) verändert diese Transkriptionsrate nicht. In den Konzentrationen 10^{-13} M und 10^{-11} M senkt Estradiol die MMP-3-Transkription um 33% bzw. 32% im Vergleich zu der Behandlungsgruppe ohne Estradiol. Die Konzentrationen 10^{-9} M und 10^{-7} M haben ebenfalls einen senkenden Effekt auf die Estradiolkonzentrationen, jedoch ist der Effekt nicht so ausgeprägt.

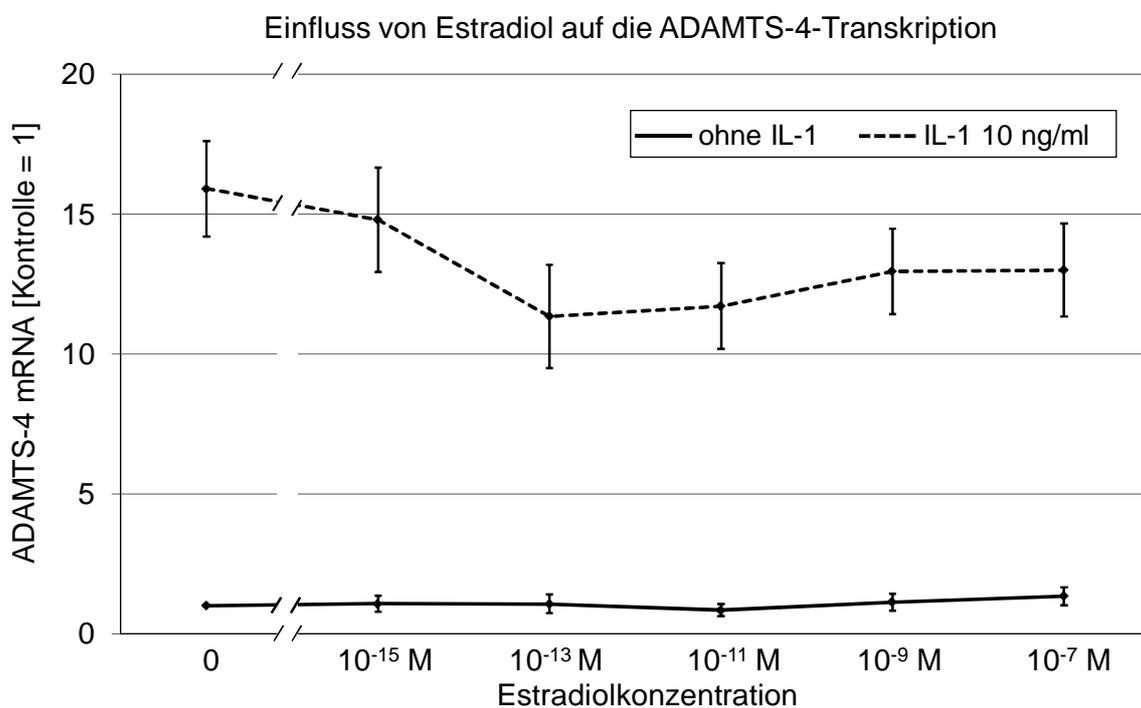


Abb. 21: Einfluss von Estradiol auf die ADAMTS-4-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die Transkription des Enzyms ADAMTS-4 erstellt. Die Messung erfolgte mit der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler

Die ADAMTS-4-Transkription wird in Abwesenheit von IL-1 nicht durch die eingesetzten Estradiolkonzentrationen beeinflusst. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die ADAMTS-4-Transkription signifikant um den Faktor 16 an. Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen senkt die IL-1 induzierte Transkription ab. Der stärkste Effekt des Estradiols liegt mit einer Senkung um 28% bei der Konzentration 10^{-13} M gegenüber der Behandlungsgruppe ohne Estradioleinwirkung vor. Ein signifikanter Einfluss des Estradiols liegt aufgrund der Datenstreuung nicht vor.

3.8.2 Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die Transkription matrixdegradierender Enzyme

In diesem Versuchsteil wurde der Rezeptor-vermittelte Signaltransduktionsweg durch die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen gehemmt. Estradiol wurde in der Konzentration 10^{-13} M eingesetzt, die Antagonisten wurden 30 Minuten zuvor in der Konzentration 10^{-9} M appliziert. Nach Abschluss der viertägigen Inkubation wurde die realtime RT-PCR durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgt in Abb. 22 und Abb. 23.

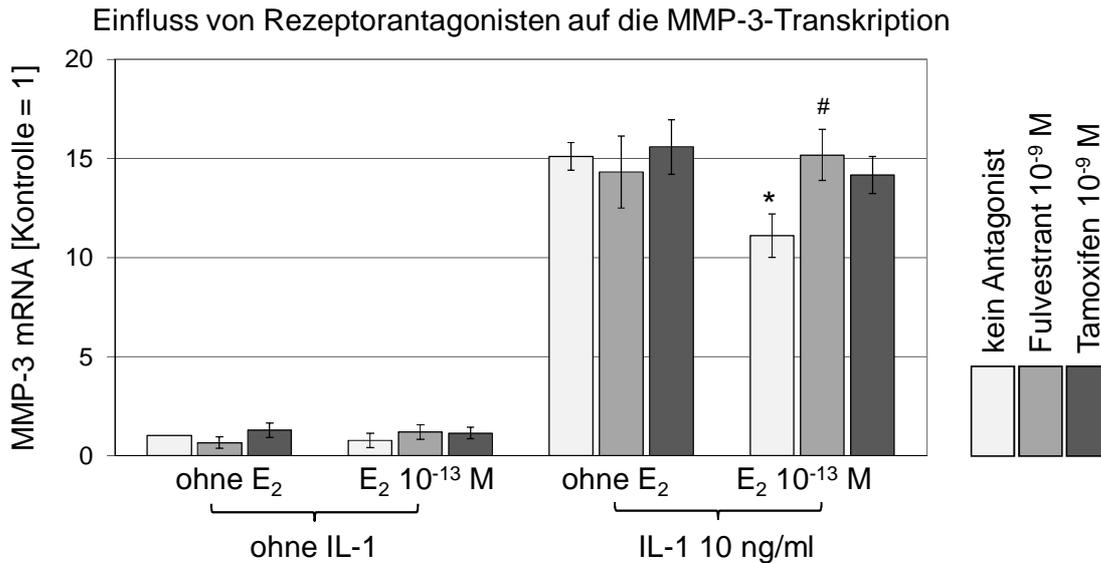


Abb. 22: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die MMP-3-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterschieden. Nach Beendigung der viertägigen Inkubation wurde die Transkription mit der realtime RT-PCR durchgeführt. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol, # $p \leq 0,05$ E₂ mit RA vs. E₂ ohne RA

In Abwesenheit von IL-1 ändert sich die MMP-3-Transkription weder durch die Anwesenheit von Estradiol noch durch die Rezeptorantagonisten wesentlich. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die MMP-3-Transkription signifikant um den Faktor 15 an. Während Fulvestrant die IL-1 induzierte Transkription leicht senkt, wird sie durch Tamoxifen leicht erhöht. Estradiol der Konzentration 10^{-13} M kann die IL-1 induzierte MMP-3-Transkription signifikant um 32% gegenüber der Behandlungsgruppe ohne Estradiol senken. Dieser Effekt wird durch Fulvestrant signifikant aufgehoben, durch Tamoxifen abgeschwächt.

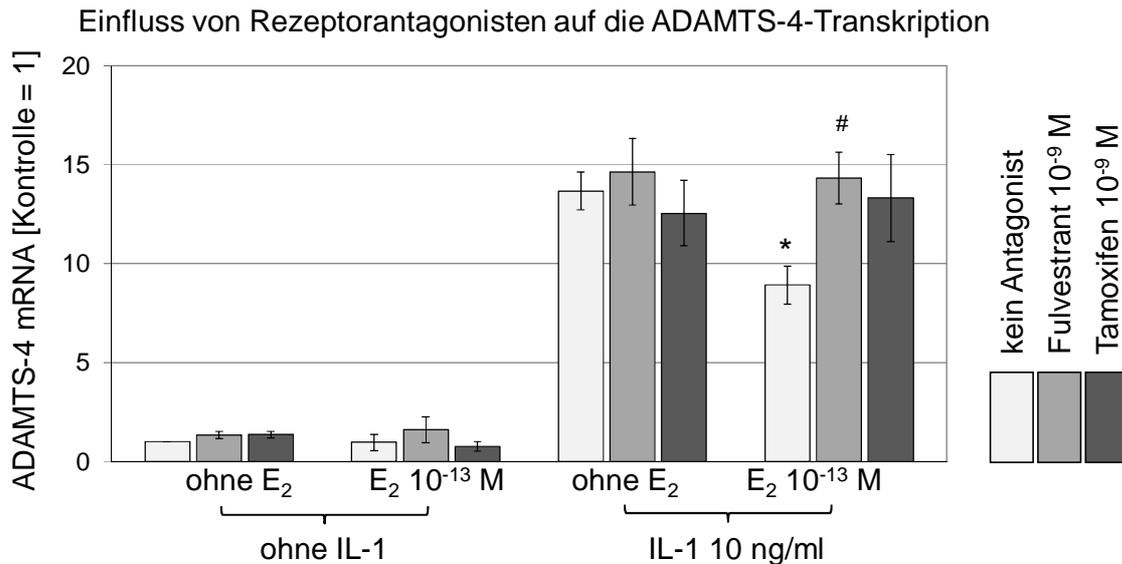


Abb. 23: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die ADAMTS-4-Transkription

Die Knorpel explantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterscheiden. Nach Beendigung der viertägigen Inkubation wurde die Transkription mit der realtime RT-PCR durchgeführt. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol, # $p \leq 0,05$ E₂ mit RA vs. E₂ ohne RA

In Abwesenheit von IL-1 ändert sich die ADAMTS-4-Transkription weder durch die Anwesenheit von Estradiol noch durch die Rezeptorantagonisten wesentlich. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die ADAMTS-4-Transkription signifikant um den Faktor 14 an. Während Fulvestrant die IL-1 induzierte Transkription leicht erhöht, wird sie durch Tamoxifen leicht gesenkt. Estradiol der Konzentration 10^{-13} M kann die IL-1 induzierte ADAMTS-4-Transkription signifikant um 34% gegenüber der Behandlungsgruppe ohne Estradiol senken. Dieser Effekt wird durch Fulvestrant signifikant aufgehoben und durch Tamoxifen abgeschwächt.

3.9 Untersuchungen zur Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan

Die Proteine Kollagen Typ II und Aggrekan sind die zwei wichtigsten Bestandteile der Extrazellulärmatrix des Knorpelgewebes (siehe 1.2). Kollagen Typ II organisiert sich in Kollagenfibrillen und fängt auftretende Zugkräfte auf. Aggrekan ist das Kernprotein von Proteoglykanen und ist somit an der Aufnahme und Verteilung von Druckkräften beteiligt. Für die Funktionsfähigkeit des gesunden Knorpelgewebes ist ein hoher Gehalt dieser beiden Bestandteile essentiell. Im Gegensatz dazu ist die Osteoarthrose gekennzeichnet durch einen Verlust sowohl von Kollagenen als auch von Proteoglykanen (siehe 1.4). Um die Wirkung des Estradiols auf die Synthese dieser beiden wichtigen Matrix-Bestandteile zu

untersuchen wurde die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan mittels der realtime RT-PCR bestimmt.

3.9.1 Einfluss von Estradiol auf die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von Estradiol wurden die Knorpelimplantate ohne sowie mit verschiedenen Estradiolkonzentration (10^{-15} M bis 10^{-7} M in Schritten je zwei Zehnerpotenzen) inkubiert. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 10 ng/ml unterschieden. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage bei 37 °C. Anschließend wurde die Transkription der Proteine Kollagen Typ II sowie Aggrekan mittels der realtime RT-PCR quantifiziert. Aus diesen Daten konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols erstellt werden (siehe Abb. 24 und Abb. 25).

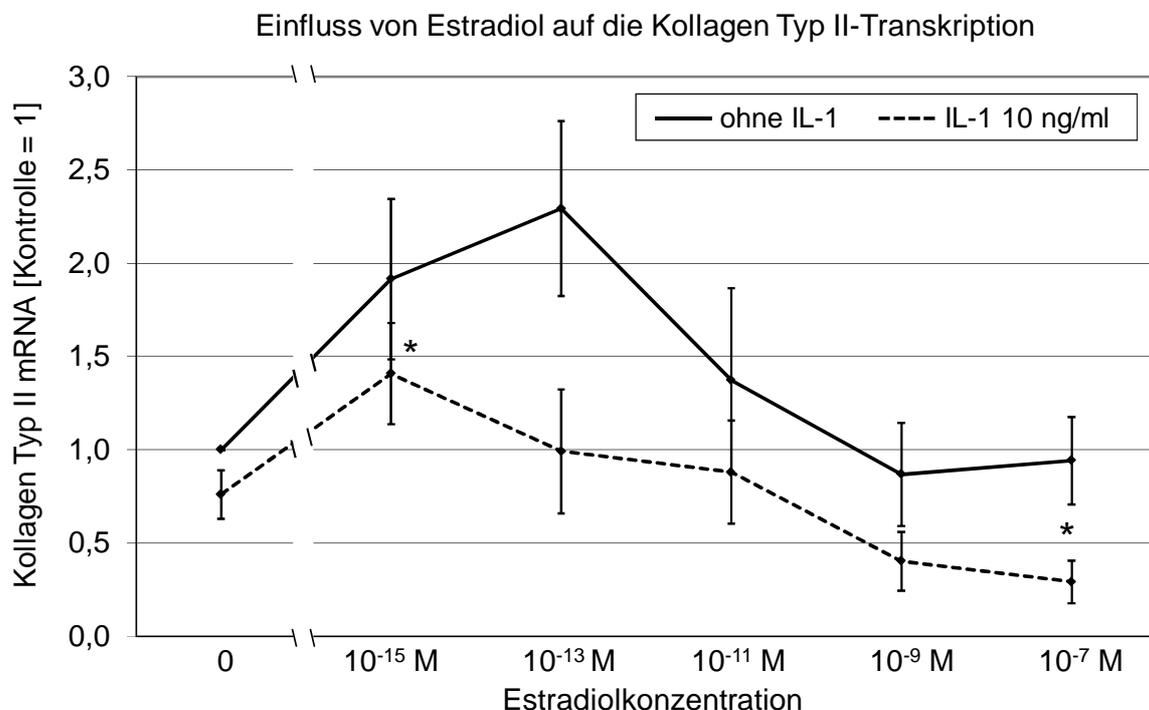


Abb. 24: Einfluss von Estradiol auf die Kollagen Typ II-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die Kollagen Typ II-Transkription erstellt. Unterschieden wurden Gruppen mit und ohne IL-1. Die Quantifizierung der Transkription erfolgte mit der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Estradiol in den Konzentrationen 10^{-15} M und 10^{-13} M steigert die Transkription von Kollagen Typ II signifikant um den Faktor 1,9 bzw. 2,3 im Vergleich zu der Behandlungsgruppe ohne Estradiol. Während die Konzentration 10^{-11} M nur eine geringere Steigerung der Transkription bewirkt, kommt es unter dem Einfluss der hohen Estradiolkonzentrationen (10^{-9} M und 10^{-7} M) sogar zu einer dezenten Abschwächung der Kollagen Typ II-Synthese. Interleukin führt insgesamt zu einer Verminderung der Kollagen-Transkription. Der Einfluss des Estradiols auf die Knorpelimplantate unter proinflammatorischen Bedingungen ist analog zu der Wirkung ohne IL-1 Zugabe: Niedrige Konzentrationen (10^{-15} M und 10^{-13} M) steigern die Kollagensynthese, hohe Estradiolkonzentrationen senken die Transkription.

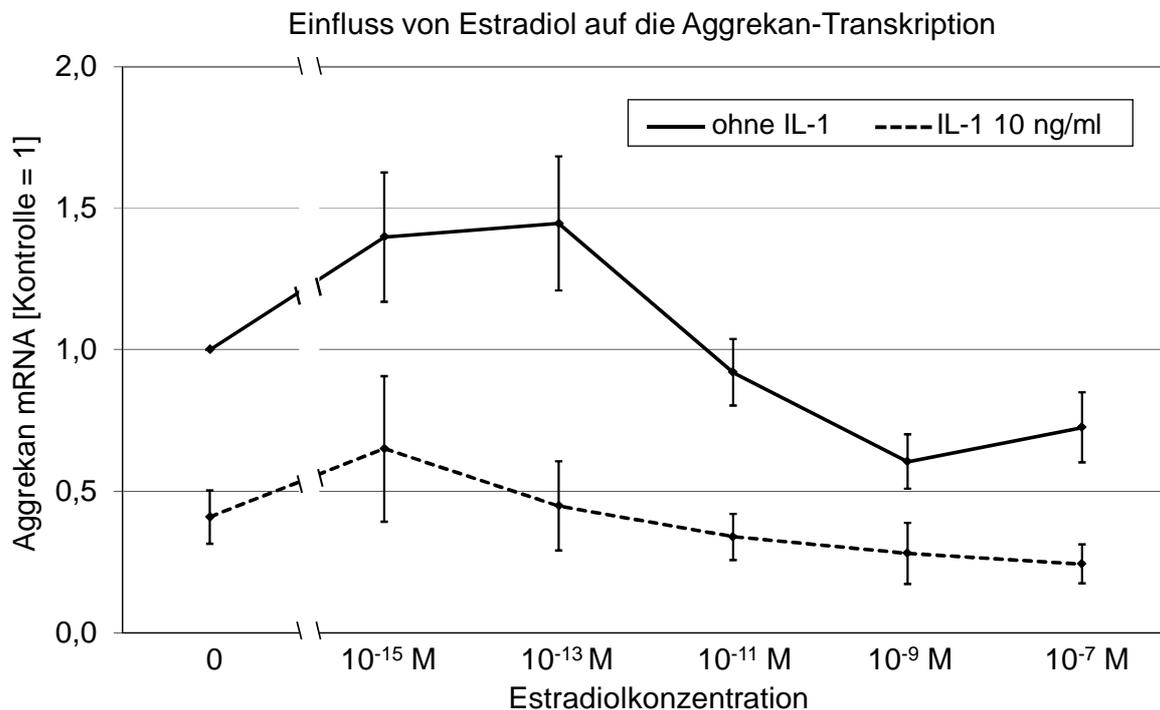


Abb. 25: Einfluss von Estradiol auf die Aggrekan-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden ohne sowie mit den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M, 10^{-11} M, 10^{-9} M und 10^{-7} M inkubiert. Es wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf die Aggrekan-Transkription erstellt. Unterschieden wurden Gruppen mit und ohne IL-1. Die Quantifizierung der Transkription erfolgte mit der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. n = 6 aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, *p \leq 0,05 mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Estradiol in den niedrigen Konzentrationen 10^{-15} M und 10^{-13} M steigert die Transkription von Aggrekan signifikant um den Faktor 1,4 bis 1,45 im Vergleich zu der Behandlungsgruppe ohne Estradiol. Unter dem Einfluss der hohen Estradiolkonzentrationen (10^{-9} M und 10^{-7} M) kommt es zu einer Verringerung der Aggrekansynthese. Interleukin führt insgesamt zu einer Minderung der Aggrekan-Transkription.

Der Einfluss des Estradiols auf die Knorpelimplantate unter proinflammatorischen Bedingungen ist analog zu der Wirkung ohne IL-1 Zugabe: Die niedrige Konzentration 10^{-15} M steigert die Aggrekansynthese, während unter hohen Estradiolkonzentrationen die Transkription absinkt.

3.9.2 Einfluss von Fulvestrant und Tamoxifen auf die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan

Die Knorpelimplantate wurden mit der Estradiolkonzentration 10^{-13} M inkubiert. Um den Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionsweg zu hemmen, wurden 30 Minuten vor der Estradioleinwirkung die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen in der Konzentration 10^{-9} M appliziert. Ebenso wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 10 ng/ml unterschieden. Nach Beendigung der viertägigen Inkubation erfolgte die Messung der Transkription mittels der realtime RT-PCR. Die Mittelwerte wurden mit der Standardabweichung in Abb. 26 und Abb. 27 dargestellt.

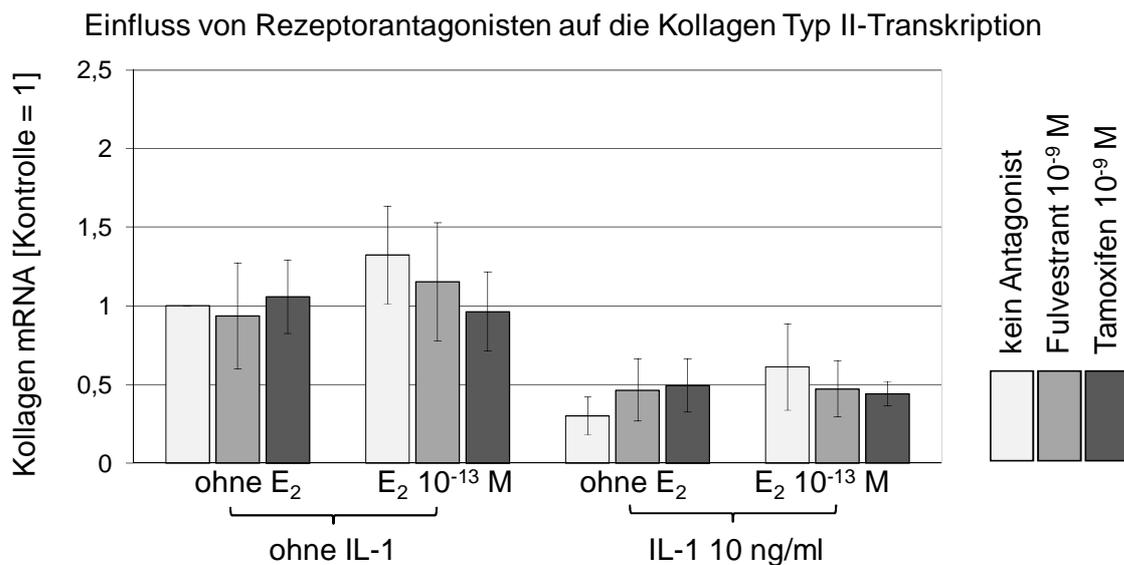


Abb. 26: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die Kollagen Typ II-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterschieden. Die Messung der Transkription erfolgte mittels der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler

Estradiol der Konzentration 10^{-13} M steigert die Transkription von Kollagen Typ II um 32% gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Effekt wird durch Fulvestrant abgeschwächt und durch Tamoxifen aufgehoben. Unter proinflammatorischen Bedingungen wird die Synthese von Kollagen Typ II deutlich verringert, die Transkription beträgt noch 30% der Transkription der Kontrollgruppe. Estradiol bewirkt eine Steigerung der Transkription unter proinflammatorischen Bedingungen, die Transkription wird nahezu verdoppelt. Durch die Applikation der Rezeptorantagonisten wird dieser Estradioleinfluss wiederum abgeschwächt.

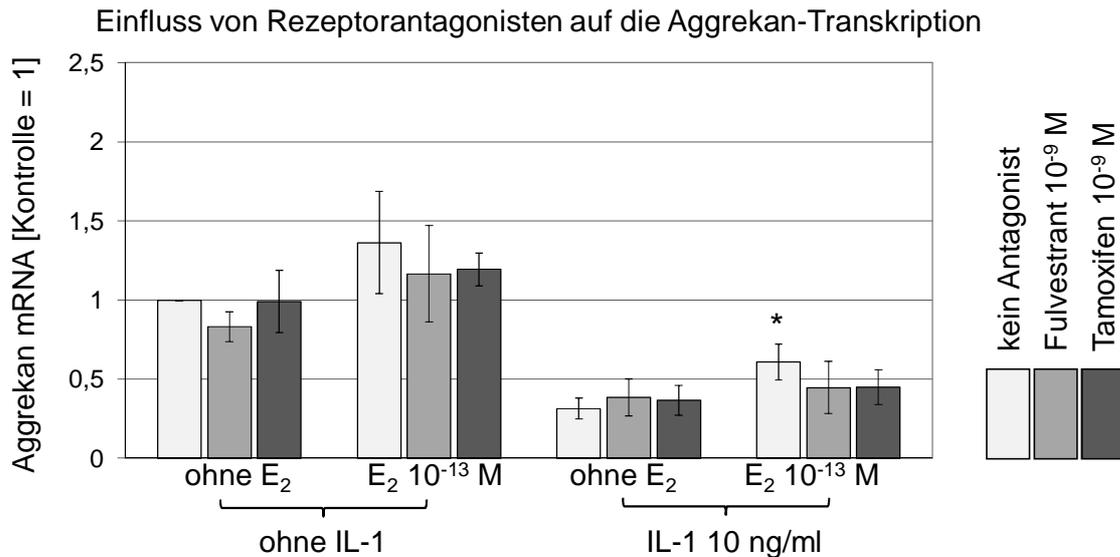


Abb. 27: Einfluss von Rezeptorantagonisten auf die Aggrekan-Transkription

Die Knorpelimplantate wurden mit einer Estradiolkonzentration von 10^{-13} M inkubiert und die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen wurden appliziert. Es wurden Gruppen ohne sowie mit IL-1 unterscheiden. Die Messung der Transkription erfolgte mittels der realtime RT-PCR. Ergebnisse relativ zur Kontrollgruppe. $n = 6$ aus 3 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert \pm Standardfehler, * $p \leq 0,05$ mit Estradiol vs. ohne Estradiol

Estradiol der Konzentration 10^{-13} M bewirkt eine Steigerung der Aggrekan-Transkription um 36% gegenüber der Kontrollgruppe ohne Estradiol. Wenn die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen appliziert wurden, wird dieser Effekt des Estradiols abgeschwächt, die Transkription ist jedoch weiterhin stärker als in der Kontrollgruppe. Unter proinflammatorischen Bedingungen wird die Synthese von Aggrekan schwächer, die Transkription beträgt noch 32% der Transkription der Kontrollgruppe ohne Interleukin. Unter Einfluss von Estradiol wird die durch IL-1 reduzierte Transkription nahezu wieder verdoppelt, was einer signifikanten Steigerung entspricht. Bei Applikation der Rezeptorantagonisten wird der Effekt des Estradiols sowohl durch Fulvestrant als auch durch Tamoxifen abgeschwächt.

3.10 Untersuchungen am humanen Gelenkknorpel

In dieser Versuchsreihe wurden humane Knorpelimplantate (siehe 2.4) nach identischer Technik wie die bovinen Knorpelimplantate hergestellt (siehe 2.3) und unter gleichen Bedingungen für vier Tage kultiviert. Hierbei wurde Estradiol in der Konzentration 10^{-13} M eingesetzt, Interleukin in der Konzentration 10 ng/ml. Anschließend wurden in den Kulturmedien die GAG-Messung nach der DMMB-Methode sowie die NO-Bestimmung mit dem Griess-Reagenz durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 und Abb. 29 dargestellt.

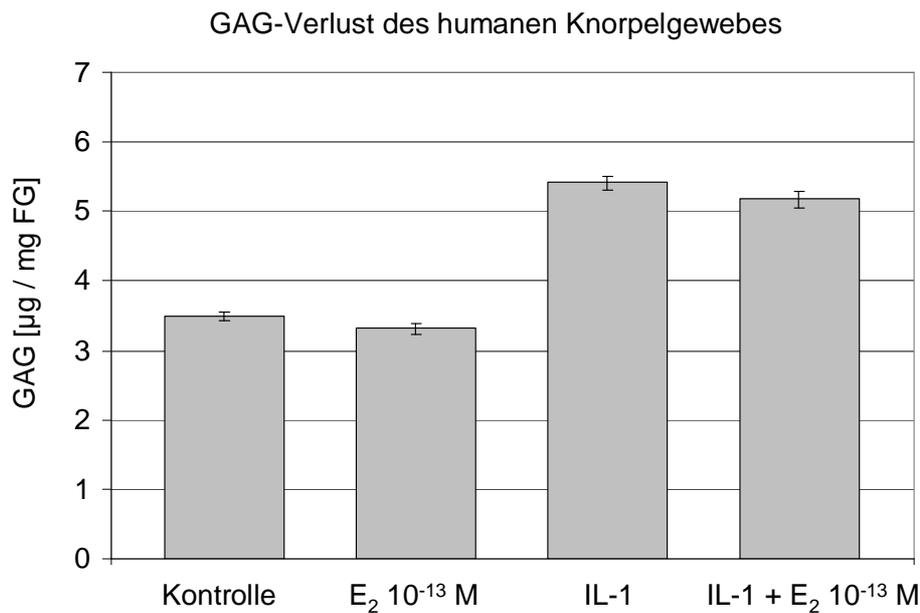


Abb. 28: GAG-Verlust des humanen Knorpelgewebes

Die Knorpelimplantate wurden vier Tage bei 37 °C ohne und mit Estradiol (10^{-13} M) sowie ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die GAG-Messung im Überstand nach der DMMB-Methode. n = 72 aus 9 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert ± Standardfehler

Der GAG-Verlust des humanen Knorpelgewebes beträgt in der Kontrollgruppe 3,5 µg/mg Knorpelfeuchtgewicht und ist damit etwas geringer als im bovinen Gewebe. Estradiol in der Konzentration 10^{-13} M beeinflusst die GAG-Freisetzung nur minimal (minus 4 Prozent). Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die GAG-Konzentration im Kulturmedium signifikant auf 5,4 µg/mg FG an, was einer Steigerung um 55% gegenüber der Kontrollgruppe entspricht. Estradiol bewirkt eine Senkung des IL-1 induzierten GAG-Verlustes um 5 %.

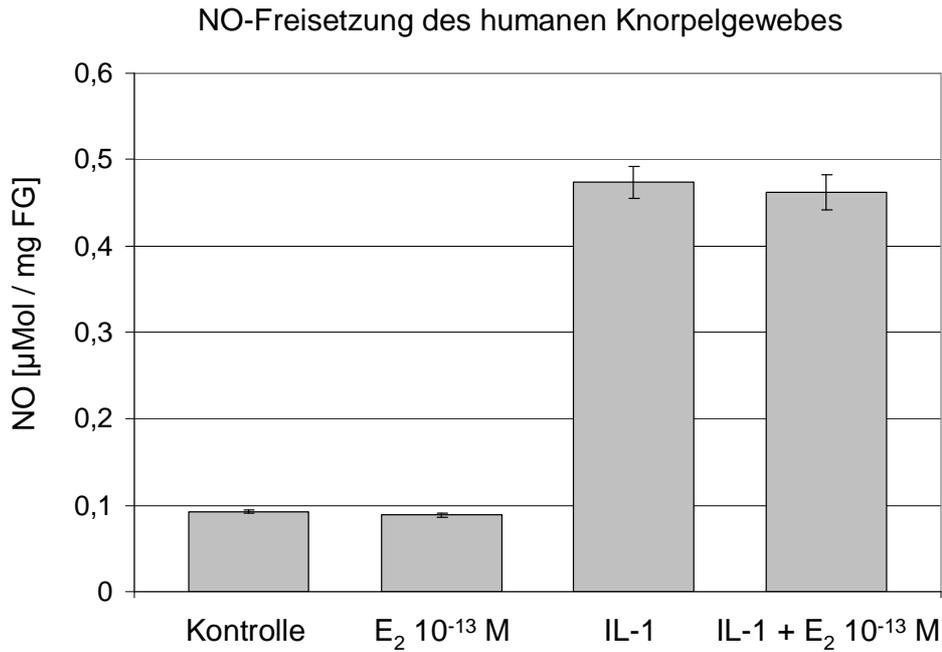


Abb. 29: NO-Freisetzung des humanen Knorpelgewebes

Die Knorpelimplantate wurden vier Tage bei 37 °C ohne und mit Estradiol (10⁻¹³ M) sowie ohne und mit IL-1 (10 ng/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die NO-Messung im Überstand nach der Griess-Methode. n = 72 aus 9 unabhängigen Versuchen, aufgetragen ist der Mittelwert ± Standardfehler

Die NO-Konzentration im Überstand der humanen Knorpelimplantate beträgt in der Kontrollgruppe 0,09 µMol/mg Knorpelgewebe. Sie ist damit niedriger als im Überstand der bovinen Knorpelimplantate. Estradiol in der Konzentration 10⁻¹³ M bewirkt eine Senkung der NO-Freisetzung um 4 %. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die NO Menge signifikant auf 0,47 µMol/mg FG an. Estradiol senkt die IL-1 induzierte NO-Konzentration um 2,5 %.

4. Diskussion

4.1 Resümees der Vorversuche

Es wurden Vorversuche durchgeführt, dessen Ziel es war methodische Grundfragen zu klären, bevor die eigentliche Fragestellung bearbeitet wurde. Bei der vorliegenden Arbeit wurden Vorversuche zu den Themen der Estradiol-Verdünnungsmethoden, der Estradiolwirkung sowie des Rezeptornachweises durchgeführt.

Ethanolkonzentrationen bei den Estradiol-Verdünnungsmethoden:

Der Vergleich der beiden Verdünnungsmethoden zeigt keinen Unterschied, bezogen auf den GAG-Verlust sowie die NO-Freisetzung. So wurde die Schlussfolgerung gezogen, für alle Folgeversuche die Methode II zu verwenden (siehe 3.1.1). Diese Methode beinhaltet weniger Verdünnungsschritte, welche eine potentielle Fehlerquelle für Abweichungen der Endkonzentration darstellen. Auf der anderen Seite geht diese Verdünnungsmethode mit einer 1%igen Ethanolkonzentration einher. Die Methode I bietet den Vorteil, dass durch den letzten Verdünnungsschritt im Medium nur eine geringe Ethanolkonzentration von 0,01% im Kulturmedium auftritt. Jedoch ist nicht bekannt, ob bei diesem Verdünnungsschritt nicht eine gewisse Menge Estradiol in dem letzten Schritt ausfällt, so dass die gewünschte Konzentration nicht erreicht wird. Die Messungen des GAG-Verlustes sowie der NO-Freisetzung lassen den Schluss zu, dass die erhöhte Ethanolkonzentration keinen schädigenden Einfluss auf die Knorpelimplantate hat. Dass Ethanol zytotoxische Effekte auf Zellen haben kann, wurde bereits an Astrozyten (Davies et al. 1991) sowie Leberzellen (Castaneda et al. 2000) nachgewiesen. Während die Knorpelentwicklung bei Embryos des asiatischen Reifisches durch Ethanol gestört wird (Hu et al. 2009), zeigen Untersuchungen am adulten Knorpel weniger Effekte. So sind Chondrosarkomzellen (ein bösartiger Tumor ausgehend von Knorpelzellen) bei Inkubation mit Ethanolkonzentrationen von bis zu 10% noch zu über 98% vital (Verdegaal et al. 2008). In einem Tierexperiment an Kaninchen wurden Knorpeltransplantate verwendet, welche zwischenzeitlich in einer 70%igen Ethanolkonzentration gelagert wurden. Auch diese Transplantate zeigten in den Nachuntersuchungen ausreichende Vitalität (Keskin et al. 2000). Es lässt sich also vermuten, dass Knorpelzellen und im Besonderen Knorpelgewebe nicht so vulnerabel auf Ethanol reagieren wie Zellen anderer Gewebsherkunft. Um dennoch mögliche Einflüsse des Ethanols zu egalisieren, wurde in die Behandlungsgruppen ohne Estradiol die identische Menge Ethanol appliziert.

Biologische Wirksamkeit der eingesetzten Estradiolkonzentrationen:

Zur Überprüfung der biologischen Wirksamkeit des Estradiols und der angewandten Verdünnungsmethode wurden humane Mammakarzinomzellen (MCF-7) kultiviert und verschiedenen Konzentrationen Estradiols ausgesetzt (siehe 2.5.2). Wie bereits bekannt, tragen diese Zellen Estradiolrezeptoren (Soule et al. 1973) und reagieren auf einen solchen hormonellen Stimulus mit einer gesteigerten Proliferation (Villalobos et al. 1987). Dieser Effekt konnte in allen drei Versuchsgruppen mit Estradiol reproduziert werden. Dabei zeigte die Konzentration von 10^{-11} M annähernd eine Verdoppelung der DNA-Menge bzw. der Zellproliferation.

Die Angaben zu der physiologischen Estradiolkonzentration in vivo schwanken je nach Phase des Regelzyklus, Lebensalter der Patientin, Ausgangsgewebe der Messung sowie nach Autor. Ebenso lassen sich Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies feststellen. Systematische Messungen im Blutplasma von Frauen wurden in den 80er Jahren durchgeführt. So beträgt die Estradiolkonzentration in der Follikelphase im Mittel $1,8 \cdot 10^{-10}$ M, in der Ovulationsphase $6 \cdot 10^{-10}$ M, in der Lutealphase $4 \cdot 10^{-10}$ M sowie postmenopausal $1,2 \cdot 10^{-10}$ M, die Konzentrationen im Vollblut entsprechen im Mittel 55% dieser Werte (Akerlund et al. 1981). Auch heute noch werden diese Messwerte von den laborchemischen Referenzwerten eingefasst. Die Untersuchungen an Blutplasma bovinen Ursprungs ergaben Werte, die um ca. 1 Zehnerpotenz geringer waren als die humanen Estradiolkonzentrationen. So liegt die mittlere bovine Konzentration in der Follikelphase bei $0,8 - 2,2 \cdot 10^{-11}$ M und während der Ovulation bei $1,6 - 4,2 \cdot 10^{-11}$ M (Schallenberger et al. 1985). Zu Beginn wurden Versuche zur Dosis-Wirkungs-Beziehung des Estradiols auf das Knorpelgewebe mit Konzentrationen um diesen physiologischen Schwankungsbereich herum durchgeführt. Dabei zeigte sich jedoch auch bei der niedrigsten Estradiolkonzentration noch ein Effekt, so dass der Konzentrationsbereich bis 10^{-15} M ausgeweitet wurde. Als Trend zeigte sich, dass die stärksten Effekte bei der Konzentration 10^{-13} M und 10^{-11} M vorlagen, d.h. Konzentrationen welche niedriger sind als die physiologische Plasmakonzentration. Knorpelgewebe ist den Bedingungen der Synovialflüssigkeit ausgesetzt, welche von der Synovialmembran sezerniert wird. Es ist bislang nicht ausreichend bekannt, welche Konzentration physiologisch auf den Gelenkknorpel einwirkt. In einer Untersuchung an Patientinnen mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose zeigte sich, dass die Estradiolkonzentration in der Synovialflüssigkeit 20 bis 48 % geringer ist als im Blutplasma (Rovensky et al. 2004). Für die Versuche unter Zugabe der Rezeptorantagonisten wurde die Estradiolkonzentration 10^{-13} M gewählt, da diese in den Dosis-Wirkungs-Versuchen tendenziell die stärksten Effekte bewirkte.

Anwesenheit der Estradiolrezeptoren:

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Estradiolrezeptoren alpha und beta mittels immunhistologischer Färbemethoden an den Zellkernen von Chondrozyten nachgewiesen. Für diese Versuche wurde das identische Knorpelgewebe von weiblichen Rindern verwendet, welches zuvor noch nicht inkubiert wurde. Die klassischen nukleären Estradiolrezeptoren alpha und beta wurden bereits an Chondrozyten von Ratten (Pelletier 2000), Affen (Richmond et al. 2000), Hasen (Dayani et al. 1988), Schweinen (Claassen et al. 2001), sowie Menschen (Ushiyama et al. 1999; Claassen et al. 2010) nachgewiesen. Es wurde herausgearbeitet, dass sowohl gesunder als auch arthrotischer Knorpel Estradiolrezeptoren exprimiert (Ushiyama et al. 1999). Das Alter der Individuen scheint in jungen Jahren keine signifikante Rolle zu spielen (Dayani et al. 1988), während in der Phase der Postmenopause die Rezeptordichte herabgesetzt ist (Oshima et al. 2007). Die Lage der Chondrozyten in den verschiedenen Arealen des Gelenkknorpels scheint, wie bei unseren Untersuchungen, keine Rolle bezüglich der Rezeptorexpression zu spielen (Yu et al. 2009). Ebenso wurde beobachtet, dass auch männliche Individuen Estradiolrezeptoren in nennenswertem Maße exprimieren (Yu et al. 2009), was als weiteres Indiz für die ubiquitäre regulatorische Wirkung des Estradiols zu bewerten ist. Während Untersuchungen der Vergangenheit unter Estradioleinfluss eine gesteigerte Expression der Rezeptoren und somit eine Verstärkung der eigenen Wirkung beobachteten, stellt eine aktuelle Untersuchung unter Estradioleinfluss eine Verringerung der Rezeptoren fest. So ist bei Zellkulturen mit humanen Chondrozyten die Expression der Estradiolrezeptoren alpha und beta sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene bei Inkubation mit 17-beta Estradiol verringert gegenüber den Behandlungsgruppen ohne Estradioleinfluss (Claassen et al. 2011). In zukünftigen Untersuchungen wäre es interessant auch an dem verwendeten bovinen Knorpelgewebe mittels quantitativen Methoden, so zum Beispiel mittels der realtime RT-PCR, die Expression der Rezeptoren zu messen. So wäre man in der Lage auch die Expression von Rezeptoren im Gewebeverbund nach Stimulation mit und ohne Estradiol sowie bei schädigender Stimulation zu quantifizieren.

4.2 Das verwendete in vitro Explantatmodell

Bei dem Versuchsmodell der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein in vitro Modell mit 24-stündiger Vorinkubations- und 72-stündiger Inkubationszeit von Knorpel-explantaten mit dem Zytokin Interleukin-1 und dem weiblichen Geschlechtshormon 17-beta Estradiol (siehe 2.6). Dieses Modell wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert und zeigte bereits in abgeschlossenen Versuchsreihen nachvollziehbare und reproduzierbare Ergebnisse (Kurz et al. 2005; Lemke 2006).

Das Zeitintervall der Inkubation:

In dem gewählten Zeitintervall von 24 Stunden Vorinkubation ausschließlich mit Estradiol und 72 Stunden Inkubation mit Interleukin und Estradiol konnten erfassbare Effekte auf die Transkription von Enzymen sowie die Biosynthese von Bestandteilen der EZM durch IL-1 und Estradiol in vitro induziert werden. Damit erscheint die Inkubationszeit prinzipiell geeignet, um Veränderungen am Knorpelgewebe zu simulieren und zu erfassen. Die vorangegangenen Arbeiten nutzten gesundes Knorpelgewebe von ca. 2 Jahre alten Rindern. In dieser Arbeit wurden viele Experimente ebenfalls mit diesem bovinen Gewebe durchgeführt. Weiterführend jedoch wurde von Patientinnen, welche sich aufgrund einer schweren Kniegelenksarthrose einer Prothesen-Operation unterzogen haben, humane Knorpelimplantate gewonnen und nach dem gleichen in vitro Modell inkubiert. Bei diesem Knorpelgewebe handelt es sich um seit Jahren geschädigten Gelenkknorpel, und man muss das lange Zeitintervall betrachten, in dem die proinflammatorischen Zytokine chronisch auf das Knorpelgewebe einwirkten. Bei der zukünftigen Etablierung eines Modells, das sich weiter den in vivo Bedingungen der Osteoarthritis im Menschen annähert, sollte eine längere Zeitspanne der Inkubation in Betracht gezogen werden.

Die gewählte Konzentration des Interleukin-1:

Interleukin-1 gehört zur Gruppe der Zytokine und scheint eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Osteoarthritis und Gelenkdestruktion zu spielen (siehe 1.4.1). In vielen experimentellen Modellen wird IL-1 in verschiedenen Konzentrationen zur Induktion von Entzündungsreaktionen am Knorpelgewebe eingesetzt (Allen et al. 2010; Chen et al. 2010). Bei Betrachtung von in vivo Konzentrationen des verwendeten Interleukin-1 findet man bei Messungen in der Synovialflüssigkeit von arthrotisch veränderten Gelenken deutlich geringere Konzentrationen (Schlaak et al. 1996) als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten 10 ng/ml. Zu bedenken ist jedoch der im vorhergehenden Absatz diskutierte Faktor der Einwirkzeit des Interleukins. Die gewählte Konzentration von 10 ng/ml IL-1 wurde in vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe (Kurz et al. 2005; Lemke 2006) bereits erfolgreich im identischen Explantatmodell eingesetzt und erwies sich für das Modell der initialen Veränderungen von entzündlichen Prozessen am Knorpelgewebe als geeignet.

Die verwendeten Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen:

Fulvestrant ist ein reiner Estradiolrezeptorantagonist, der seit ein paar Jahren unter dem Handelsnamen Faslodex® z.B. bei der antihormonellen Therapie des Mammakarzinoms bei Patientinnen nach der Menopause eingesetzt wird (Warm et al. 2011). Das Medikament hat eine steroidale Konformation (de Cupis et al. 1995) und wirkt über die intrazelluläre Blockade der klassischen genomischen Signaltransduktion sowie der genomischen Signaltransduktion

mittels anderer Transkriptionsfaktoren (siehe 1.5.2) als Estradiolantagonist. Diese Wirkung von Fulvestrant wird in vielen experimentellen Arbeiten genutzt, um der Frage nachzugehen, auf welchem Wege Estradiol seine Wirkung vermittelt. So hat eine Arbeitsgruppe in Regensburg die Entwicklung von Chondrozyten aus Stammzellen mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen beeinflusst und Fulvestrant als Antagonist in einer um 2 bis 4 Zehnerpotenzen höheren Konzentration eingesetzt (Jenei-Lanzl et al. 2010). Die intrazelluläre Wirkung des Estradiols wurde dadurch blockiert, der Effekt jedoch war weiterhin nachweisbar. So wurde der Schluss gezogen, dass Estradiol seine Wirkung auf die Chondrozytenentwicklung über die membranständigen Estradiolrezeptoren entfaltet. Laut Herstellerangaben beträgt die Konzentration der halbmaximalen Inhibition $IC_{50} = 0,29 \cdot 10^{-9}$ M. In der vorliegenden Arbeit wurde Fulvestrant in der Konzentration 10^{-9} M eingesetzt. Damit liegt eine um 4 Zehnerpotenzen höhere Konzentration gegenüber dem Estradiol vor. Um die volle Wirksamkeit des Rezeptorantagonisten zu erzielen, wurde Fulvestrant eine halbe Stunde vor dem Estradiol appliziert.

Hydroxytamoxifen wird als selektiver Estradiolrezeptormodulator bezeichnet. In vielen Geweben hat Tamoxifen eine antagonistische Wirkung auf die intrazellulären Estradiolrezeptoren, in manchen Geweben gibt es Unterschiede bezüglich der Rezeptortypen alpha und beta. Auf den Progesteronrezeptor wirkt es stimulierend (Riggs et al. 2003). Tamoxifen findet seit Jahren Verwendung in der Therapie und Prävention des Mammakarzinoms (Karn et al. 2010) sowie bei Unfruchtbarkeit (Beck et al. 2005), wobei der antagonistische Effekt zum Estradiol genutzt wird. Nicht so eindeutig ist der Einfluss von Tamoxifen auf Knorpelgewebe. In Experimenten mit Chondrozyten von weiblichen Ratten bewirkte Tamoxifen eine gleichsinnige Wirkung wie das Estradiol bezogen auf die NO-Synthese (Richette et al. 2007a). In der vorliegenden Arbeit wurde Tamoxifen unter der Hypothese des Estradiol-Antagonismus in der Konzentration 10^{-9} M eingesetzt. Damit liegt eine um 4 Potenzen höhere Konzentration gegenüber dem Estradiol vor. Um die volle Wirksamkeit des Rezeptorantagonisten zu erzielen, wurde Tamoxifen eine halbe Stunde vor dem Estradiol appliziert.

4.3 Zeichen der Zellschädigung in den histologischen Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurden von den Knorpelimplantaten histologische Präparate hergestellt. Die Toluidinblaufärbung dient der Beurteilung der Extrazellulärmatrix, die Färbung mit Hämatoxylin der Darstellung vitaler Zellkerne sowie des Kernblebbings und die TUNEL-Färbung der Detektion von DNA-Fragmenten in apoptotischen Zellen (siehe 2.10). Bei 400facher Vergrößerung wurden 10 Gesichtsfelder aus zentralen Arealen auf die morphologischen Korrelate der Apoptose, Kernblebbing und TUNEL-positive Zellen, untersucht. Es zeigte sich, dass weder IL-1 noch Estradiol einen Einfluss auf den

mikroskopisch sichtbaren Prozess der Apoptose haben. Lediglich an den Schnittkanten der Knorpelimplantate liegen geschädigte Zellen vor (siehe 3.4). Die Arbeitsgruppe um Johnson beschreibt, dass im arthrotischen Knorpel vermehrt Apoptose nachweisbar ist und vermutet, dass der Untergang von Chondrozyten eine Ursache für die Entwicklung einer Arthrose darstellt (Johnson et al. 2008). Während in der vorliegenden Arbeit Interleukin als proinflammatorisches Zytokin keine Apoptose induziert, beschreiben Forscher aus China, dass IL-1 in identischer Konzentrationen (10 ng/ml) an isolierten Kaninchenchondrozyten vermehrt Apoptose hervorruft (Ju et al. 2010). Es scheint, dass isolierte Zellen vulnerabler auf IL-1 reagieren als Zellen im physiologischen Gewebeverbund.

Zu bedenken ist jedoch auch die Hypothese, dass die Zelltodmorphologie im Gegensatz zu biochemischen Zelltodmarkern erst später eintritt. Hinweise auf einen solchen Zeitunterschied geben Untersuchungen an Knorpelimplantaten aus dem Jahre 2002 die zeigten, dass die typische Morphologie nicht zeitgleich mit den biochemischen Markern der Apoptose auftritt (Grogan et al. 2002). Es ist also möglich, dass sich mit Beendigung der Inkubation die mikroskopischen Merkmale noch nicht manifestiert haben. Gegen diese Hypothese wiederum spricht, dass an den Schnittkanten vermehrt apoptotische Zellen nachweisbar sind, die innerhalb der Inkubationszeit aufgetreten sind. Es scheint als sei mechanischer Stress ein stärkerer Auslöser für Apoptose bei Chondrozyten im Vergleich zu IL-1. Durch mechanischen Schaden hervorgerufene Apoptose, welche sich aktuell an den Schnittkanten zeigt, wurde vor einigen Jahren in unserer Arbeitsgruppe durch verletzende Kompression an Knorpelimplantaten induziert (Kurz et al. 2004) sowie auch durch weitere Experimente bestätigt (Takebe et al. 2010).

4.4 Einfluss von Estradiol auf den GAG-Verlust

Eine verstärkte Freisetzung von Proteoglykanen gilt als sicherer Hinweis für eine Degeneration der Extrazellulärmatrix von Gelenkknorpel (Caterson et al. 2000). Es ist seit längerem schon bekannt, dass Interleukin-1 die GAG-Freisetzung aus Knorpelimplantaten verstärkt (Ratcliffe et al. 1986; Kobayashi et al. 2005). Dieser katabole Effekt auf das Knorpelgewebe konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden und führte zu einer reproduzierbaren Erhöhung der Freisetzung der GAGs in den Überstand. So bewirkt IL-1 in der Konzentration 10 ng/ml nahezu eine Verdoppelung der GAG-Konzentration im Überstand verglichen mit der Kontrollgruppe. Bei der Co-Inkubation mit Estradiol in verschiedenen Konzentrationen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich der IL-1 induzierte GAG-Verlust signifikant reduzieren ließ. Den stärksten Effekt erzielte Estradiol in der Konzentration 10^{-13} M. Richette konnte zeigen, dass Estradiol einen dualen Effekt auf den IL-1 induzierten Proteoglykan-Abbau bei isolierten Chondrozyten aus Kaninchen-Knorpel hat (Richette et al. 2004). In geringeren Konzentrationen reduzierte Estradiol ebenfalls den Proteoglykan-

Abbau, in höheren Konzentrationen kam es zu einer Erhöhung des Abbaus und somit zu einem inversen Effekt. In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein ähnliches Wirkungsmuster des Estradiols beobachten, wobei eine größere Spanne der Estradiolkonzentration untersucht wurde. Mit der unphysiologisch hohen Konzentration von 10^{-7} M liegt eine minimale Steigerung des IL-1 induzierten GAG-Verlustes gegenüber der IL-1 Gruppe ohne Estradiol vor. Diese Steigerung ist jedoch keineswegs signifikant. Der in der vorliegenden Arbeit durch IL-1 verursachte GAG-Verlust lässt sich nicht auf eine vermehrte Synthese von Matrixbestandteilen zurückführen, welche anschließend ins Medium übergehen, da unter proinflammatorischen Bedingungen die Transkription von Aggrecan vermindert ist (siehe 3.9). Es lässt sich also vermuten, dass der GAG-Verlust vielmehr durch matrixdegradierende Enzyme verursacht wird (siehe 4.6). Um zu verifizieren, ob die Reduktion durch das Estradiol rezeptorvermittelt ist, wurden weitere Versuche mit den Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen durchgeführt. Diese wurden in höherer Konzentration sowie eine halbe Stunde vor dem Estradiol appliziert. Sowohl Fulvestrant als auch Tamoxifen heben die Reduktion der GAG-Freisetzung signifikant auf. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der Effekt des Estradiols klassisch rezeptorvermittelt ist.

4.5 Einfluss von Estradiol auf die NO-Freisetzung sowie die iNOS-Transkription

Neben vielen physiologischen Funktionen in der Signaltransduktion scheint NO in pathologisch erhöhten Konzentrationen im Gelenkknorpel als Mediator an der Knorpeldestruktion beteiligt zu sein. So wurden bei Patienten mit Osteoarthrose erhöhte Konzentrationen von NO in der Synovialflüssigkeit gefunden (Karan et al. 2003) und aus diversen Experimenten ist bekannt, dass Interleukin eine vermehrte NO-Bildung, unter anderem durch die Induktion der induzierbaren NO-Synthase, bewirkt (Jacques et al. 2006; Richette et al. 2007a; Schmidt et al. 2010). NO hemmt die Synthese von Kollagen Typ II und Proteoglykanen (Hauselmann et al. 1994; Taskiran et al. 1994; Cao et al. 1997) und steigert die Expression von MMPs (Sasaki et al. 1998). Auch soll die Apoptoserate von Chondrozyten durch NO gesteigert werden (Blanco et al. 1995; Hashimoto et al. 1998). Die meisten Ergebnisse stammen jedoch aus Untersuchungen an isolierten Chondrozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde die NO-Freisetzung aus dem Knorpelgewebe untersucht. So konnte im Explantatmodell festgestellt werden, dass IL-1 nahezu eine Verdoppelung der NO-Konzentration im Überstand verglichen mit der Kontrollgruppe induziert (siehe 3.6). Dieses Ergebnis deckt sich mit den bisherigen bekannten Erkenntnissen zum Einfluss des Zytokins. Bei Co-Inkubation mit Estradiol erfolgte eine signifikante Senkung der IL-1 induzierten NO-Konzentration bei den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M, 10^{-13} M sowie 10^{-11} M, wobei der stärkste Effekt bei 10^{-13} M vorlag. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den vorliegenden Daten zu dem Effekt des Estradiols an isolierten Chondrozyten, wobei meist höhere

Konzentrationen des Estradiols untersucht wurden (Richette et al. 2007a). Bei den Experimenten zum Einfluss der Rezeptorantagonisten ist sowohl die basale als auch die IL-1 induzierte NO-Freisetzung niedriger als bei den Experimenten zu der Dosis-Wirkungs-Beziehung, der Trend ist jedoch gleichsinnig und auch der Einfluss von Estradiol in der Konzentration 10^{-13} M ist analog. Sowohl Fulvestrant als auch Tamoxifen egalisieren die estradiolvermittelte Senkung der NO-Freisetzung signifikant. Verglichen mit den Gruppen ohne Estradiol ist die NO-Konzentration im Überstand sogar etwas höher in den Gruppen mit den Rezeptorantagonisten und Estradiol. Es lässt sich der Schluss ziehen, dass der Effekt des Estradiols auf die NO-Konzentration klassisch rezeptorvermittelt ist.

NO wird unter anderem durch das Enzym induzierbare NO-Synthase produziert. Um zu untersuchen, ob die NO-Konzentration mit der Synthese der iNOS korreliert, wurde die Transkription dieses Enzyms mittels der realtime RT-PCR bestimmt (siehe 3.7). Es ist bekannt, dass Interleukin die Transkription von iNOS in Knorpelzellen induziert (Schmidt et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit steigert IL-1 die iNOS-Transkription um den Faktor 21 verglichen mit der Kontrollgruppe. Estradiol senkt die IL-1 induzierte iNOS-Transkription in unterschiedlichen Konzentrationen, den stärksten Effekt erzielt die Konzentration 10^{-11} M, jedoch liegt keine Signifikanz vor. Die Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen heben den Effekt des Estradiols auf die iNOS-Transkription auf, so dass sich erneut eine Beteiligung der klassischen Estradiolrezeptoren schlussfolgern lässt. Bei der Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der NO-Konzentration und der iNOS-Transkription zeigte sich nur eine schwache Korrelation.

Es lässt sich aus diesen Ergebnissen postulieren, dass zum einen noch weitere Enzyme an der NO-Freisetzung beteiligt sein müssen und dass zum anderen die Transkription nicht identisch ist mit der Syntheseleistung dieses Enzyms. Die Regulation eines Enzyms kann erfolgen auf Ebene der Transkription und nachfolgender Translation, sowie auf Ebene der Aktivierung bzw. Hemmung eines bereits vorliegenden Enzym-pools (Schmidt et al. 2010). Es scheint also, dass Estradiol die Senkung der NO-Konzentration über andere Wege als die Senkung der iNOS-Transkription vermittelt. In zukünftigen Versuchen sollte detaillierter herausgearbeitet werden, wie Estradiol einen Effekt auf die NO-Freisetzung vermittelt. In der Literatur jedoch verdichten sich die Hinweise, dass Interleukin über die iNOS die NO-Synthese steigert und dass die erhöhte NO-Konzentration an der Vermittlung kataboler Effekte beteiligt ist. So wurde in Tierexperimenten mit gentechnisch veränderten Mäusen, welche einen Defekt in der NO-Synthase aufwiesen (van de Loo et al. 1998), nach intraartikulärer Interleukin-Injektion ein verminderter Proteoglykan-Verlust nachgewiesen als in Tieren ohne Gendefekt. In anderen Tiermodellen wurden selektive NO-Synthase-Inhibitoren eingesetzt. Unter Einfluss dieser wurden ebenfalls knorpelschützende Effekte beobachtet (Presle et al. 1999; Pelletier et al. 2000; Ohtsuka et al. 2002). Auf Basis dieser

Ergebnisse wurde eine mögliche Kausalität zwischen Interleukin, NO-Freisetzung und Knorpeldegradation postuliert. Aufgrund der vorliegenden Ähnlichkeit des Einflusses von Estradiol auf die NO-Freisetzung sowie den GAG-Verlust in den Überstand kann man ebenfalls einen konkreten Zusammenhang zwischen der NO-Konzentration und der GAG-Freisetzung vermuten. Von Bedeutung ist in diesem Kontext die Entdeckung der Arbeitsgruppe um Clancy (Clancy et al. 2004), dass NO durch eine permanente Aktivierung des Nuclear factor κ B die Signaltransduktion proinflammatorischer Zytokine verstärkt. Wie in 1.5.2 beschrieben, interagiert Estradiol ebenso mit dem NK- κ B. So lässt sich die Hypothese aufstellen, dass NF- κ B als gemeinsamer Schnittpunkt zwischen den Effekten des Interleukins, des Mediators NO sowie des Estradiols fungiert. In Zukunft sollten weitere Experimente zur Klärung der Interaktionen durchgeführt werden, um Angriffspunkte für pharmakologische Therapien zu definieren.

4.6 Einfluss von Estradiol auf die Transkription matrixdegradierender Enzyme

Matrixmetalloproteinasen und Aggrecanasen kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Degeneration von Gelenkknorpel zu, welche mit einem Abbau von Kollagenen und Proteoglykanen in der EZM einhergeht (siehe 1.4.2 und 1.4.3). In der Literatur ist hinreichend bekannt, dass IL-1 die Transkription von MMPs und ADAMTSs in Zellkulturen isolierter Chondrozyten unterschiedlicher Spezies induziert (Lefebvre et al. 1991; Flannery et al. 1999 a; Aida et al. 2005; Busschers et al. 2010). In aktuelleren Arbeiten wurde dieser Effekt auch für Knorpelgewebe beschrieben (Chan et al. 2006) und wird in der vorliegenden Arbeit an bovinen Knorpel explantaten untersucht. Es gibt teilweise konträre Untersuchungsergebnisse, in welchem Umfang die unterschiedlichen Typen von MMPs und Aggrecanasen an der Degeneration der Matrix im Gelenkknorpel beteiligt sind. Es ist mehrfach beschrieben worden, sowohl an humanem als auch bovinem Gelenkknorpel, dass eine vermehrte Expression von ADAMTS-4 u.a. durch IL-1 induziert werden kann, während die Expression von ADAMTS-5 dabei weitgehend unverändert bleibt (Tortorella et al. 2001; Bau et al. 2002; Pratta et al. 2003). Eine Arbeitsgruppe aus Melbourne hingegen konnte durch IL-1 eine Induktion von ADAMTS-5 ohne eine Veränderung der Expression von ADAMTS-4 in Gelenkknorpel von Mäusen nachweisen (Stanton et al. 2005). Bluteau hat ein Profil der MMP-Transkription von Kaninchenknorpel erstellt, nachdem eine Knorpelschädigung mittels chirurgischer Kreuzbanddurchtrennung initiiert wurde (Bluteau et al. 2001). Ergebnis war, dass MMP-1 im Anfangsstadium wichtig zu sein scheint, während MMP-3 und -13 im fortgeschrittenen Stadium stärker exprimiert werden. Andere Autoren schreiben MMP-3 eine dominante Rolle in der Knorpeldegradation zu (Sugiyama 2007). Weiterführende Erkenntnisse liefert die Arbeit von Flannery. Dabei wurde humaner Knorpel mit Retinsäure inkubiert und es zeigte sich ein Anstieg der Aggrecanase-typischen Metabolite im Überstand,

ohne dass ein Anstieg der mRNA-Level der untersuchten Aggrekanasen eintrat (Flannery et al. 1999 b). Das Fazit dieser Arbeit lautete, dass entweder weitere Aggrekanasen existieren, die bislang nicht identifiziert wurden, oder eine Aktivitätssteigerung bereits vorhandener Enzyme durch Modifikation vorlag. Betont sei, dass Translation nicht gleichzusetzen ist mit der Aktivität von Enzymen. Für die Zukunft ist es wichtig, detaillierter der Frage nachzugehen, welche Enzyme maßgeblich für die Matrixdegradation verantwortlich sind und wie deren Synthese und Aktivität reguliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Transkription der wichtigen Enzyme MMP-3 und ADAMTS-4 nach Beendigung der Inkubation mittels der realtime RT-PCR quantifiziert (siehe 3.8). Unter Einfluss von IL-1 steigt die Transkription von MMP-3 um den Faktor 10,5 gegenüber der Kontrollgruppe an. Während Estradiol der niedrigen Konzentration 10^{-15} M keinen Einfluss auf die proinflammatorische Transkriptionsrate zeigt, bewirken die anderen Konzentrationen senkende Effekte um 23% bis zu 33%. Dieser Effekt wird durch Fulvestrant signifikant aufgehoben, durch Tamoxifen lediglich abgeschwächt. Es scheint also, dass Estradiol einen protektiven Einfluss auf die Bestandteile der EZM des Knorpelgewebes hat und diesen über die Estradiolrezeptoren vermittelt. Die ADAMTS-4-Transkription steigt unter proinflammatorischen Bedingungen signifikant um den Faktor 16 an. Estradiol unterschiedlicher Konzentrationen senkt die IL-1 induzierte Transkription ab, eine Signifikanz liegt aufgrund der großen Streuung für keine Konzentration vor. Der stärkste Effekt des Estradiols liegt mit einer Senkung um 28% bei der Konzentration 10^{-13} M gegenüber der Behandlungsgruppe ohne Estradiol vor. Bei der Versuchsreihe zu den Rezeptorantagonisten wird die IL-1 induzierte Transkription durch Estradiol der Konzentration 10^{-13} M um 34% signifikant gegenüber der Behandlungsgruppe ohne Estradiol gesenkt. Dieser Effekt wird durch Fulvestrant signifikant aufgehoben und durch Tamoxifen abgeschwächt. Es zeigt sich erneut ein für die Matrixbestandteile protektiver Effekt des Estradiols. Die Wirkung des Estradiols scheint über den nukleären Estradiolrezeptor vermittelt zu sein.

Nachdem deutlicher wurde, welche eine große Bedeutung die matrixdegradierenden Enzyme für die Knorpelschädigung haben, wurde mit diversen Substanzen versucht die Expression dieser Enzyme *in vitro* zu inhibieren. So gab es erfolgversprechende Experimente mit Cortison (Busschers et al. 2010), Hyaluronsäure (Hashizume et al. 2010) und Chondroitin-Sulfat (Imada et al. 2010). Zu dem Effekt von Estradiol ist bislang wenig bekannt. Eine Arbeitsgruppe aus Korea hat von 25 postmenopausalen Patientinnen, welche sich wegen Osteoarthritis einer Gelenkprothesen-Operation unterzogen, Zellkulturen mit deren Chondrozyten hergestellt und für 14 Tage inkubiert (Lee et al. 2003). Estradiol und Interleukin wurden in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen appliziert. Anschließend wurde die Menge verschiedener MMPs sowie deren Inhibitoren (TIMPs) gemessen. Die Ergebnisse zum Einfluss des Estradiols sind nicht einheitlich, so gibt es

Unterschiede bezüglich wirksamer Konzentrationen des Estradiols und Unterschiede bezogen auf die Typen der MMPs. Zu ähnlichen Ergebnissen ist die Arbeitsgruppe um Claassen gekommen, wobei jedoch höhere Estradiolkonzentrationen eingesetzt wurden (Claassen et al. 2010). Des Weiteren wurde ein Unterschied bezüglich Chondrozyten männlichen und weiblichen Ursprungs dargelegt. Die Schlussfolgerung dieser Arbeiten ist, dass Estradiol generell das Missverhältnis der MMPs sowie deren Inhibitoren in Chondrozyten verbessern mag und dadurch einen protektiven Effekt vermitteln könnte. Publikationen mit expliziten Aussagen zu diesem Thema sind bislang nicht vorhanden. Ähnlich verhält es sich in der vorliegenden Arbeit. Es liegen kaum eindeutig signifikante Effekte für einzelne Estradiolkonzentrationen vor, so dass sich schlussendlich nur eine Tendenz für die protektive Wirkung des Estradiols auf die Degradation von Knorpelgewebe ableiten lässt. In zukünftigen Untersuchungen sollten weitere Erkenntnisse über die Aktivität und Regulation dieser Enzyme gewonnen werden, da sie als potentiell erfolgversprechende Ziele für eine pharmakologische Behandlung der Osteoarthritis angesehen werden können (Wittwer et al. 2007; Gilbert et al. 2008).

4.7 Einfluss von Estradiol auf die Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan

Kollagen Typ II und Aggrekan sind die beiden wichtigsten Bestandteile der EZM des intakten Knorpelgewebes. Während die Biomechanik des Knorpelgewebes von der Unversehrtheit der Kollagenarkaden sowie von einem optimalen Gehalt an Aggrekan abhängig ist (siehe 1.2), ist arthrotischer Knorpel gekennzeichnet durch ein Ungleichgewicht zwischen Abbau- und Aufbauvorgängen von Bestandteilen der EZM, mit der Folge einer sukzessiven Degeneration des Knorpelgewebes (Aigner et al. 2002). Nachdem in den vorherigen Untersuchungen die matrixdegradierenden Enzyme sowie die GAG-Freisetzung quantifiziert wurden, wird nun die Synthese von Kollagen Typ II und Aggrekan unter proinflammatorischen Bedingungen mittels realtime RT-PCR untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Estradiol in den niedrigen Konzentrationen (10^{-15} M und 10^{-13} M) die Synthese von Kollagen Typ II und Aggrekan signifikant steigern kann. Interleukin sowie Estradiol der höheren Konzentrationen (10^{-9} M und 10^{-7} M) führen zu einer Minderung der Transkription dieser Proteine. Unter proinflammatorischen Bedingungen hat Estradiol insgesamt einen geringeren induzierenden Effekt. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits an isolierten Chondrozyten gemachte Entdeckung, dass unter proinflammatorischen Bedingungen die Neusynthese der wichtigen EZM-Bestandteile vermindert ist (Huch et al. 1997; Richardson et al. 2000; Gouze et al. 2001; Ley et al. 2011). Eine Arbeitsgruppe aus Pittsburgh hat Erkenntnisse gewonnen, dass NO als Mediator für die IL-1 induzierte katabole Stoffwechsellage (siehe 4.5) bei der Synthese von EZM-Bestandteilen eine Rolle spielt (Taskiran et al. 1994). Welche Bedeutung

Estradiol auf die Homöostase der Bestandteile der EZM hat, ist bisher weitgehend unbekannt. Vor einigen Jahren wurde ein dualer Effekt tituiert (Richette et al. 2004). So soll Estradiol in niedrigen Konzentrationen protektiv wirken, indem es die Proteoglykansynthese steigert, in höheren Konzentrationen jedoch nicht. Auf die Aggrekan-Transkription hatte Estradiol in dieser Untersuchung keinen Einfluss. Die in der vorliegenden Arbeit durch Estradiol induzierte Steigerung der Transkription von Kollagen Typ II und Aggrekan kann darauf hinweisen, dass ein protektiver Effekt auf die EZM vorliegt und somit arthrotischen Entwicklungen entgegengewirkt wird. Auf der anderen Seite muss berücksichtigt werden, dass die Unterschiede der Transkription von minimal Faktor 0,4 bis maximal Faktor 2,2 relativ zur Kontrollgruppe reichen. Das macht bei dem verwendeten Verfahren der realtime RT-PCR, welches immer eine gewisse Ungenauigkeit besitzt, lediglich einen detektierbaren Zyklus mehr oder einen Zyklus weniger aus (siehe 2.9.5). Obwohl mit 18sRNA ein bewährtes housekeeping-Gen gewählt wurde (Schmittgen et al. 2000), bleibt fraglich, ob dieser mathematische Effekt tatsächlich einem Effekt im Gewebe entspricht. Eine asiatische Arbeitsgruppe stellt heraus, dass in ihren Studien Estradiol keinen positiven Einfluss auf die Synthese der EZM hat (Ab-Rahim et al. 2008). Zu bedenken ist jedoch, dass es sich dabei um isolierte Zellen handelte, die nicht mehr in ihre natürliche Matrix eingebettet waren, und dass nur eine einzige Estradiolkonzentration eingesetzt wurde (10^{-8} M), welche in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Effekt vermittelte. Zu der Frage, über welchen Signalweg Estradiol seine Wirkung vermittelt, lässt sich nur schwer eine Aussage treffen, da die Wirkung des Estradiols so gering ist, dass ein Einfluss der Rezeptorantagonisten bei den vorliegenden Ergebnissen nicht verifizierbar ist.

4.8 Einfluss von Estradiol auf humanes Knorpelgewebe

Um von dem Estradioleinfluss am bovinen Explantatmodell etwas näher an die realen Bedingungen eines Patienten zu gelangen, wurden humane Knorpelimplantate von Patientinnen mit arthrotischer Erkrankung nach identischem Versuchsablauf inkubiert. Anschließend erfolgten im Kulturmedium die GAG-Messung sowie die NO-Bestimmung. Dabei ist der basale GAG-Verlust des humanen Gewebes etwas geringer als am bovinen Gewebe. Unter proinflammatorischen Bedingungen steigt die GAG-Freisetzung signifikant um 55% an. Estradiol der Konzentration 10^{-13} M hat keinen nennenswerten Einfluss auf die GAG-Konzentration im Überstand. Die NO-Freisetzung in der Kontrollgruppe ist ebenfalls wie die GAG-Freisetzung geringer als am bovinen Gewebe. Interleukin der Konzentration 10 ng/ml bewirkt einen starken Anstieg der NO-Konzentration im Medium, die nahezu an die bovine NO-Konzentration im Überstand heranreicht. Estradiol hat weder unter nichtinflammatorischen noch unter proinflammatorischen Bedingungen einen nennenswerten Einfluss auf die NO-Freisetzung. Im Gegensatz zu dem bovinen Ausgangsgewebe handelt

es sich nicht um gesundes Gewebe von jungen Individuen, sondern um Knorpelgewebe von Patientinnen mit einem Altersdurchschnitt von 67,8 Jahren, die seit vielen Jahren unter arthrotischen Gelenkveränderungen am Knie litten und sich nun einem Gelenkersatzverfahren unterzogen. Wie in 4.2 beschrieben, sind die Bedingungen des verwendeten in vitro Explantatmodells wie z.B. Inkubationszeit und Konzentrationen der verwendeten Reagenzien geeignet, um reproduzierbare Effekte zu erzielen. Die Steigerung sowohl der GAG-Freisetzung als auch der NO-Konzentration unter proinflammatorischen Bedingungen zeigt, dass das humane Gewebe grundsätzlich in der Lage ist, auf Stimuli zu reagieren. Dass Estradiol bei diesen Experimenten keinen Einfluss hat, kann auf den Zeitfaktor zurückgeführt werden. Obwohl möglichst Explantate aus unversehrten Knorpelarealen gewonnen wurden (siehe 2.4), stand auch dieser Knorpel jahrelang unter dem Einfluss der in der Synovialflüssigkeit herrschenden pathologischen Bedingungen. So ist zu vermuten, dass eine viertägige Inkubation mit Estradiol nicht ausreichend lang ist, um den proinflammatorischen Reaktionen entgegen zu wirken.

Ebenso zu überdenken ist die eingesetzte Estradiolkonzentration von 10^{-13} M. Diese scheint bei den bovinen Versuchsreihen die stärksten Effekte zu bewirken, jedoch ist es möglich, dass für humanes Knorpelgewebe andere Konzentrationen wirkungsvoller sind. Bei der zukünftigen Etablierung eines Modells, das sich weiter den in vivo vorherrschenden Bedingungen der Osteoarthritis im Menschen annähert, sollten deshalb eine längere Zeitspanne der Inkubation sowie weitere Estradiolkonzentrationen in Betracht gezogen werden. Dass der Zeitraum der Estradioleinwirkung eine Rolle zu spielen scheint, wird auch bei der Evaluation mehrerer Hormonersatztherapien hervorgehoben (siehe 1.5.3). So lautet ein Fazit dieser Therapien, dass die besten Therapieergebnisse stets bei frühzeitiger und langfristiger Therapie erzielt werden. Offen bleibt also weiterhin die Frage, ob Estradiol eventuell einen protektiven Effekt nur präventiv am gesunden Knorpel bewirken kann und ein protektiver Einfluss auf bereits arthrotisch veränderten Knorpel nicht möglich ist.

Rückblickend bleibt kritisch anzumerken, dass von den Patientinnen zu wenige Daten erhoben wurden. So wäre es sinnvoll, neben dem Alter weitere Daten zur Körpergröße, Körpergewicht, vorhergegangenen Verletzungen, Gelenkfehlstellungen, gynäkologischen Erkrankungen, Alter bei Eintritt der Menopause sowie eventuell durchgeführter Hormontherapien in einem Fragebogen zu erfassen und diese bei der Patientenauswahl und Auswertung zu berücksichtigen.

4.9 Schlussfolgerung

Zielsetzung der Arbeit war es, einen aufgrund von epidemiologischen Daten (siehe 1.3), klinischen Beobachtungen (siehe 1.5.3) sowie bereits durchgeführten Experimenten (siehe 1.5) vermuteten protektiven Effekt von Estradiol auf das Knorpelgewebe detaillierter zu untersuchen. Des Weiteren sollte erarbeitet werden, über welche Signalwege und Enzyme die Effekte des Estradiols vermittelt werden. Um eine Grundlage für zukünftige Therapien zu schaffen, ist es von großer Bedeutung, Pathomechanismen, Signaltransduktionswege sowie mögliche Interventionen zu identifizieren. Da die histologischen Analysen keine signifikanten Veränderungen zeigten, wurden ausschließlich die Messungen zur GAG-Freisetzung, NO-Konzentration und Genexpression zur Beantwortung der in 1.6 postulierten Fragestellungen herangezogen:

- Gibt es protektive Effekte des Estradiols auf die Interleukin-1-induzierte Knorpelgewebsdestruktion? Und wenn ja, wie zeigt sich dieser protektive Effekt?

In der Zusammenschau aller Ergebnisse scheint Estradiol einen protektiven Einfluss auf die Interleukin-1-induzierte Knorpelgewebsdestruktion zu haben. Nach Inkubation mit IL-1 und Estradiol ist der GAG-Verlust aus dem Knorpelgewebe geringer als nach alleiniger Inkubation mit IL-1. Auch in den Behandlungsgruppen ohne IL-1 senkt Estradiol die GAG-Freisetzung, wobei höhere Konzentrationen wirksam sind. Der GAG-Verlust dient an dieser Stelle als ein Marker für den Grad der Schädigung der EZM. Ein Mechanismus, wie die Degradation vermittelt wird, ist der Metabolismus matrixdegradierender Enzyme. Hierbei zeigt sich bei der Expressionsmessung von MMP-3 und ADAMTS-4, dass Estradiol die Transkription matrixdegradierender Enzyme unter proinflammatorischen Bedingungen senkt, wobei tendenziell 10^{-13} M die wirksamste Konzentration darstellt. Eine Signifikanz liegt jedoch nur in den Experimenten zu den Rezeptorantagonisten vor. Die Synthese der wichtigen Matrixbestandteile Kollagen Typ II und Aggrekan wurde durch Estradiol sowohl unter nichtinflammatorischen als auch unter proinflammatorischen Bedingungen gesteigert. Dies scheint wiederum protektiv für die Homöostase der EZM zu sein. NO, vermutlich ein Mediator pathologischer Prozesse am Knorpelgewebe, wurde mit dem Griess-Reagenz im Überstand gemessen. Die basale NO-Konzentration im Überstand wird durch niedrige Estradiolkonzentrationen gesenkt, ebenso verringert sich die durch IL-1 induzierte NO-Freisetzung unter den Estradiolkonzentrationen 10^{-15} M bis 10^{-11} M. Die unphysiologisch hohe Estradiolkonzentration 10^{-7} M bewirkt jedoch eine leichte Steigerung der NO-Konzentration. Die Transkription der induzierbaren NO-Synthase, ein Enzym welches an der NO-Produktion beteiligt ist, wird durch IL-1 gesteigert. Estradiol der Konzentrationen 10^{-15} M bis 10^{-9} M senkt die iNOS-Transkription jeweils um bis zu 24 %, wobei eine Signifikanz nicht vorliegt. Es liegt nur eine schwache Korrelation der NO-Konzentration sowie der iNOS

Expression vor, so dass weiterhin Fragen nach Synthese- und Regulationsmechanismen des scheinbar komplexen NO-Stoffwechsels offen bleiben. Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die bereits an isolierten Chondrozyten gewonnenen Erkenntnisse zum protektiven Einfluss von Estradiol auf Knorpelgewebe bzw. Knorpelzellen. Unbeantwortet bleibt die Frage einer optimalen Konzentration. Während in anderen Arbeiten mit höheren Konzentrationen Effekte erzielt wurden, scheinen in diesem Explantatmodell eher niedrige Konzentrationen wirksam zu sein. Tendenziell bewirkt Estradiol der Konzentration 10^{-13} M den stärksten Effekt.

- Werden die Effekte von Estradiol über die Estradiolrezeptoren vermittelt?

Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Co-Inkubation mit dem Rezeptorantagonisten Fulvestrant sowie dem Rezeptormodulator Tamoxifen durchgeführt. Dabei zeigte Fulvestrant eindeutigere Effekte als Tamoxifen, so dass für zukünftige Arbeiten ausschließlich dieser RA verwendet werden sollte. Die Estradioleffekte auf den GAG-Verlust, die NO-Konzentration sowie die iNOS-Transkription werden signifikant durch Fulvestrant inhibiert und scheinen somit über die nukleären Estradiolrezeptoren vermittelt zu sein, welcher zuvor mittels immunhistologischer Methoden nachgewiesen wurde. Bei den Untersuchungen zu der Transkription von MMP-3 und ADAMTS-4 schwächt Fulvestrant die Estradiolwirkung ab, jedoch ist dieser Effekt nicht signifikant. So lässt sich vermuten, dass die membranständigen Rezeptoren sowie andere Regulationsmechanismen beteiligt sein müssen. Unmöglich scheint es, eine Schlussfolgerung aus den Untersuchungen zu der Synthese von Matrixbestandteilen zu ziehen. Hierbei ist der Effekt des Estradiols nur schwach ausgeprägt, so dass es nicht möglich ist, eine Aussage über den Einfluss der Estradiolrezeptoren zu formulieren.

- Hat Estradiol einen Effekt auf osteoarthrotisch verändertes humanes Knorpelgewebe?

Auf das osteoarthrotisch veränderte humane Knorpelgewebe hat Estradiol in dem verwendeten Explantatmodell in der gewählten Konzentration keinen Einfluss. In zukünftigen Experimenten mit humanem Gewebe sollten die Inkubationsbedingungen optimiert sowie weitere Estradiolkonzentrationen eingesetzt werden. Des Weiteren wäre es unter Betracht der jahrelangen Knorpelschädigung sinnvoll, die Inkubationszeit zu verlängern um differenziertere Aussagen über den Einfluss von Estradiol auf osteoarthrotisch veränderten humanen Knorpel treffen zu können.

4.10 Ausblick

Bei der Osteoarthritis gibt es neben den Einschränkungen des alltäglichen Lebens und dem Leidensdruck für den betroffenen Patienten eine große gesellschaftliche Bedeutung. Aufgrund demographischer Entwicklungen sowie steigender Inzidenz der Adipositas wird die Arthritis in Zukunft immer weiter an Bedeutung gewinnen (siehe 1.3). Die aktuell schon enorme Belastung der Sozialsysteme wird zukünftig weiter zunehmen. Bis heute steht uns keine kausale Intervention zur Verfügung, so dass sich Therapieansätze nur auf eine symptomatische Besserung oder den operativen Gelenkersatz beschränken. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Estradiol als potentiell protektive Substanz auf Gelenkknorpelgewebe untersucht.

Das dabei verwendete Explantatmodell nähert sich den realen Bedingungen besser an als die meist mit isolierten Chondrozyten durchgeführten Experimente. Für die weiterführenden Versuchsreihen mit humanem Knorpelgewebe scheinen die Kulturbedingungen jedoch noch nicht ausgereift zu sein. Hier sollten in Zukunft Weiterentwicklungen stattfinden, um mögliche Speziesunterschiede zu beseitigen. Eine Hürde für Experimente mit humanen Knorpelimplantaten stellt die Gewinnung des Knorpelgewebes dar. In der vorliegenden Arbeit wurden Resektate von operativen Gelenkersatzverfahren verwendet, welche dementsprechend jahrelange Degenerationen erfahren haben. Um Pathomechanismen der Knorpeldegradation sowie den Einfluss von Estradiol detaillierter zu untersuchen, ist gesunder Gelenkknorpel besser geeignet. Solange jedoch humanes Knorpelgewebe nicht zur Verfügung steht, muss auf Gewebe anderen Ursprungs zurückgegriffen werden. Dabei wäre es sinnvoll, die *in vitro* Bedingungen weiter den realen Bedingungen anzunähern, sinnvoll wäre es z.B. die Inkubationszeit zu verlängern.

Um der Antwort näher zu kommen, über welche Estradiolrezeptoren die Effekte vermittelt werden, hat die Arbeitsgruppe um Jenei-Lanzl mit BSA-Estradiol gearbeitet. Das Hormon wurde hierbei über eine chemische Bindung an Albumin gekoppelt, so dass ein membranimpermeables Konstrukt entsteht. Mit dieser Methode ist es möglich, ähnlich wie bei Co-Inkubation mit Fulvestrant, ausschließlich den Effekt des membranständigen Estradiolrezeptors zu untersuchen (Jenei-Lanzl et al. 2010). Eine aktuelle Arbeit von Dulos differenzierte die unterschiedliche Wirkung der Estradiolrezeptoren alpha und beta mit Hilfe von synthetischen, selektiven Rezeptoragonisten und -antagonisten (Dulos et al. 2010). Diese Methoden sind zwar geeignet für wissenschaftliche Fragestellungen, aufgrund der sehr komplexen Signaltransduktion von Estradiol scheint es jedoch sinnvoller und realitätsnäher, mit Estradiol als Ligand zu arbeiten. Ob in Zukunft eventuell Estradiol oder spezifische Rezeptoragonisten zur Therapie zugelassen werden, muss weiter erarbeitet werden.

Insgesamt müssen noch weitergehende Fragen zu Konzentrationen, Interaktionen, weiteren beteiligten Enzymen, andere Mechanismen der Enzymregulation sowie der Optimierung der Kulturbedingungen beantwortet werden, um einer möglichen pharmakologischen Therapie näher zu kommen. In der Zusammenschau aller Ergebnisse scheint Estradiol jedoch Potential zu besitzen, in Zukunft therapeutisch gegen die Erkrankung Osteoarthrose eingesetzt zu werden.

5. Zusammenfassung

Einleitung:

Die klinische Fragestellung der vorgestellten Dissertation ergibt sich aus epidemiologischen Untersuchungen zur Inzidenz der Osteoarthritis, einer Gelenkerkrankung in dessen Mittelpunkt die fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels steht, ohne dass bis dato eine kausale Therapieoption besteht. Dabei zeigt sich die Besonderheit, dass in der männlichen Population die Inzidenz mit steigendem Alter nahezu linear ansteigt, während in der weiblichen Population die Zahl der Neuerkrankungen in dem Lebensalter überdurchschnittlich ansteigt, welches dem durchschnittlichen Alter der Menopause entspricht. Schlussfolgernd wurde postuliert, dass die Knorpeldegeneration mit einem Mangel an Estradiol assoziiert sei. Experimente mit isolierten Knorpelzellen konnten den vermuteten protektiven Effekt des Estradiols überwiegend bestätigen. Untersuchungen zu der Wirkung von Estradiol auf den Gewebeverband wurden bisher kaum durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird daher an einem in vitro Modell untersucht, welchen Einfluss Estradiol auf Knorpelimplantate unter proinflammatorischen Bedingungen ausübt.

Methoden:

Die verwendeten Knorpelimplantate (3mm Durchmesser, 1 mm Dicke) wurden aus Rinderknien eines kommerziellen Schlachthofes gewonnen, das Gewebe für einen zusätzlichen humanen Versuchsteil wurde von Patientinnen zur Verfügung gestellt, welche sich einem operativen Gelenkersatzverfahren unterzogen haben. Bei der viertägigen Inkubation wurde 10 ng/ml Interleukin-1 für die Induktion der proinflammatorischen Bedingungen appliziert. Neben Kontrollgruppen ohne Estradiol wurden Behandlungsgruppen mit Estradiolkonzentrationen von 10^{-15} M bis 10^{-7} M unterschieden; in weiteren Experimenten erfolgte eine Co-Inkubation mit den Estradiol-Rezeptorantagonisten Fulvestrant und Tamoxifen. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte die Messung der Glykosaminoglykan-Freisetzung als Maß für die Knorpelschädigung nach der DMMB-Methode. Die Konzentration des pathologischen Mediators Stickoxid (NO) wurde nach der Griess-Methode quantifiziert. Die Transkriptionsmessung von Enzymen, welche Bedeutung in der Homöostase des Knorpelgewebes haben, erfolgte nach der realtime RT-PCR-Methode. Ebenso wurde eine histologische Vitalitätsuntersuchung an Knorpelimplantaten durchgeführt, welche nach der Toluidinblau-, Hämatoxylin- sowie TUNEL-Methode gefärbt wurden. Mit polyklonalen Antikörpern erfolgte der immunhistochemische Nachweis der Estradiolrezeptoren alpha und beta in dem verwendeten Knorpelgewebe.

Ergebnisse:

Die Estradiolrezeptoren alpha und beta liegen nukleär bei den Chondrozyten des Knorpelgewebes vor. In der Zusammenschau aller Ergebnisse scheint Estradiol einen protektiven Einfluss auf Knorpelgewebe unter proinflammatorischen Bedingungen zu haben. Nicht nur der IL-1 induzierte GAG-Verlust wird durch Estradiol gesenkt, sondern auch die basale GAG-Freisetzung, wobei höhere Konzentrationen des Estradiols wirksam sind. Ein Mechanismus, wie die GAG-Freisetzung beeinflusst wird, ist der Metabolismus matrixdegradierender Enzyme. Hierbei zeigt die Expressionsmessung von MMP-3 und Aggrecanase-1, dass Estradiol die Transkription matrixdegradierender Enzyme unter proinflammatorischen Bedingungen senkt. Dabei stellt sich die Konzentration 10^{-13} M als die tendenziell wirksamste Konzentration dar. Die Synthese der wichtigen Matrixbestandteile Kollagen Typ II und Aggrecan wird durch Estradiol sowohl unter nichtinflammatorischen als auch unter proinflammatorischen Bedingungen gesteigert.

Die NO-Konzentration im Überstand wird durch niedrige Estradiolkonzentrationen gesenkt, ebenso die Transkription der induzierbaren NO-Synthase. Es liegt jedoch nur eine schwache Korrelation der iNOS-Transkription und der NO-Konzentration vor. Bei Co-Inkubation mit den Rezeptorantagonisten werden die Effekte des Estradiols auf den GAG-Verlust, die NO-Konzentration sowie die iNOS-Transkription signifikant durch Fulvestrant inhibiert, so dass diese über die klassischen nukleären Estradiolrezeptoren vermittelt werden. Bei den Untersuchungen zu der Transkription von MMP-3 und ADAMTS-4 ist der Einfluss der Rezeptorantagonisten nicht signifikant.

Bei der histologischen Untersuchung zu der Vitalität der Chondrozyten haben weder IL-1 noch Estradiol einen Einfluss. Auf das osteoarthrotisch veränderte humane Knorpelgewebe hat Estradiol in dem verwendeten Explantatmodell in der gewählten Konzentration keinen Einfluss.

Diskussion:

Das verwendete Explantatmodell ist grundsätzlich geeignet am bovinen als auch am humanen Knorpelgewebe Reaktionen auf Interleukin und Estradiol zu reproduzieren. Die erarbeiteten Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Erkenntnissen zu der Estradiolwirkung auf isolierte Knorpelzellen. Eine einheitlich wirksame Estradiolkonzentration, die auf alle untersuchten Aspekte der Osteoarthrose wirksam ist, kann auch nach diesen Experimenten nicht genannt werden, tendenziell ruft jedoch 10^{-13} M die stärksten Effekte hervor. Diese Konzentration ist verglichen mit publizierten Estradiolkonzentrationen ähnlicher Experimente niedrig, wobei die Spannweite genannter Estradiolkonzentrationen weitreichend ist. Bis heute fehlen Erkenntnisse darüber, welche Estradiolkonzentration in vivo wirklich auf das Knorpelgewebe einwirkt. Weiterhin offen

bleiben Fragen bezüglich der Rolle von NO und dessen Synthese. Die geringe Korrelation der NO-Konzentration und der iNOS-Transkription lässt noch weitere beteiligte Enzyme sowie Regulationsmechanismen vermuten. In Zukunft gilt es weitere Erkenntnisse bezüglich des komplexen NO-Stoffwechsels zu gewinnen. Ebenso herrscht noch Unsicherheit darüber, welche matrixdegradierenden Enzyme in welcher Phase der Knorpeldegradation maßgeblich beteiligt sind. Die untersuchten Enzyme MMP-3 und ADAMTS-4 erklären nicht hinreichend die GAG-Freisetzung.

Schlussfolgerung:

In der Zusammenschau aller Ergebnisse scheint das Explantatmodell geeignet, um einen protektiven Einfluss von Estradiol auf die Interleukin-1-induzierte Knorpelgewebsdestruktion zu demonstrieren, wobei bei verschiedenen Parametern unterschiedliche Konzentrationen des Estradiols wirkungsvoll sind. Die Estradioleffekte auf den GAG-Verlust, die NO-Konzentration sowie die iNOS-Transkription scheinen dabei über die nukleären Estradiolrezeptoren vermittelt zu sein, während an der Transkription von MMP-3 und ADAMTS-4 die membranständigen Rezeptoren sowie weitere Regulationsmechanismen beteiligt sein müssen. Für osteoarthrotisch verändertes humanes Knorpelgewebe hat Estradiol in dem verwendeten Explantatmodell in der gewählten Konzentration keinen Einfluss.

6. Literaturverzeichnis

Ab-Rahim S., Selvaratnam L. and Kamarul T. (2008): The effect of TGF-beta1 and beta-estradiol on glycosaminoglycan and type II collagen distribution in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol Int* (32): 841-7.

Abbaszade I., Liu R. Q., Yang F., Rosenfeld S. A., Ross O. H., Link J. R., Ellis D. M., Tortorella M. D., Pratta M. A., Hollis J. M., Wynn R., Duke J. L., George H. J., Hillman M. C., Jr., Murphy K., Wiswall B. H., Copeland R. A., Decicco C. P., Bruckner R., Nagase H., Itoh Y., Newton R. C., Magolda R. L., Trzaskos J. M., Burn T. C. and et al. (1999): Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* (274): 23443-50.

Aida Y., Maeno M., Suzuki N., Shiratsuchi H., Motohashi M. and Matsumura H. (2005): The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci* (77): 3210-21.

Aigner T. and McKenna L. (2002): Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* (59): 5-18.

Akerlund M., Batra S. and Helm G. (1981): Comparison of plasma and myometrial tissue concentrations of estradiol-17 beta and progesterone in nonpregnant women. *Contraception* (23): 447-55.

Allen K. D., Adams S. B., Jr., Mata B. A., Shamji M. F., Gouze E., Jing L., Nettles D. L., Latt L. D. and Setton L. A. (2010): Gait and behavior in an IL1beta-mediated model of rat knee arthritis and effects of an IL1 antagonist. *J Orthop Res* (5): 694-703.

Apte S. S., Olsen B. R. and Murphy G. (1995): The gene structure of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and its inhibitory activities define the distinct TIMP gene family. *J Biol Chem* (270): 14313-8.

Auf der Heide A. C. and Athanasiou K. A. (2004): Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. *Ann Biomed Eng* (32): 1161-74.

Baker A. H., Edwards D. R. and Murphy G. (2002): Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* (115): 3719-27.

Ball L. J., Levy N., Zhao X., Griffin C., Tagliaferri M., Cohen I., Ricke W. A., Speed T. P., Firestone G. L. and Leitman D. C. (2009): Cell type- and estrogen receptor-subtype specific regulation of selective estrogen receptor modulator regulatory elements. *Mol Cell Endocrinol* (299): 204-11.

Bau B., Gebhard P. M., Haag J., Knorr T., Bartnik E. and Aigner T. (2002): Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* (46): 2648-57.

Beck J. I., Boothroyd C., Proctor M., Farquhar C. and Hughes E. (2005): Oral anti-oestrogens and medical adjuncts for subfertility associated with anovulation. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD002249.

Benbow U. and Brinckerhoff C. E. (1997): The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* (15): 519-26.

Blanco F. J., Ochs R. L., Schwarz H. and Lotz M. (1995): Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* (146): 75-85.

Blom A. B., van Lent P. L., Libregts S., Holthuysen A. E., van der Kraan P. M., van Rooijen N. and van den Berg W. B. (2007) Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3. *Arthritis Rheum* (56): 147-57.

Bluteau G., Conrozier T., Mathieu P., Vignon E., Herbage D. and Mallein-Gerin F. (2001): Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* (1526): 147-58.

Busschers E., Holt J. P. and Richardson D. W. (2010): Effects of glucocorticoids and interleukin-1 beta on expression and activity of aggrecanases in equine chondrocytes. *Am J Vet Res* (71): 176-85.

Cameron M., Buchgraber A., Passler H., Vogt M., Thonar E., Fu F. and Evans C. H. (1997): The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations. *Am J Sports Med* (25): 751-4.

Cao M., Westerhausen-Larson A., Niyibizi C., Kavalkovich K., Georgescu H. I., Rizzo C. F., Hebda P. A., Stefanovic-Racic M. and Evans C. H. (1997): Nitric oxide inhibits the synthesis of type-II collagen without altering Col2A1 mRNA abundance: prolyl hydroxylase as a possible target. *Biochem J* (324): 305-10.

Castaneda F. and Kinne R. K. (2000): Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* (126): 503-10.

Caterson B., Flannery C. R., Hughes C. E. and Little C. B. (2000): Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* (19): 333-44.

Cecil R. L. and Archer B. H. (1925): Arthritis of the menopause. *J Am Med Assoc* (84): 75-9.

Chan P. S., Caron J. P. and Orth M. W. (2006): Short-term gene expression changes in cartilage explants stimulated with interleukin beta plus glucosamine and chondroitin sulfate. *J Rheumatol* (33): 1329-40.

Chen W. P., Tang J. L., Bao J. P., Hu P. F., Shi Z. L. and Wu L. D. (2010): Anti-arthritic effects of chlorogenic acid in interleukin-1beta-induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. *Int Immunopharmacol* (1): 23-8.

Cirillo D. J., Wallace R. B., Wu L. and Yood R. A. (2006): Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. *Arthritis Rheum* (54): 3194-204.

Claassen H., Hassenpflug J., Schunke M., Sierralta W., Thole H. and Kurz B. (2001): Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in articular chondrocytes from cows, pigs and humans: in situ and in vitro results. *Ann Anat* (183): 223-7.

Claassen H., Schicht M., Brandt J., Reuse K., Schadlich R., Goldring M. B., Guddat S. S., Thate A. and Paulsen F. (2011): C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes as well as human primary articular chondrocytes express sex hormone and insulin receptors--Useful cells in study of cartilage metabolism. *Ann Anat* (193): 23-9.

Claassen H., Schunke M. and Kurz B. (2005): Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res* (319): 439-45.

Claassen H., Steffen R., Hassenpflug J., Varoga D., Wruck C. J., Brandenburg L. O. and Pufe T. (2010): 17beta-estradiol reduces expression of MMP-1, -3, and -13 in human primary articular chondrocytes from female patients cultured in a three dimensional alginate system. *Cell Tissue Res* (342): 283-93.

Clancy R. M., Gomez P. F. and Abramson S. B. (2004): Nitric oxide sustains nuclear factor kappaB activation in cytokine-stimulated chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* (12): 552-8.

Davies D. L. and Cox W. E. (1991): Delayed growth and maturation of astrocytic cultures following exposure to ethanol: electron microscopic observations. *Brain Res* (547): 53-61.

Dayani N., Corvol M. T., Robel P., Eychenne B., Monchamont B., Tsagris L. and Rappaport R. (1988): Estrogen receptors in cultured rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J Steroid Biochem* (31): 351-6.

de Cupis A., Noonan D., Pirani P., Ferrera A., Clerico L. and Favoni R. E. (1995): Comparison between novel steroid-like and conventional nonsteroidal antioestrogens in inhibiting oestradiol- and IGF-I-induced proliferation of human breast cancer-derived cells. *Br J Pharmacol* (116): 2391-400.

de Klerk B. M., Schiphof D., Groeneveld F. P., Koes B. W., van Osch G. J., van Meurs J. B. and Bierma-Zeinstra S. M. (2009): Limited evidence for a protective effect of unopposed oestrogen therapy for osteoarthritis of the hip: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* (48): 104-12.

Dean D. D., Martel-Pelletier J., Pelletier J. P., Howell D. S. and Woessner J. F., Jr. (1989): Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* (84): 678-85.

Dreier R., Wallace S., Fuchs S., Bruckner P. and Grassel S. (2001): Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). *J Cell Sci* (114): 3813-22.

Dulos J., Vijn P., van Doorn C., Hofstra C. L., Veening-Griffioen D., de Graaf J., Dijcks F. A. and Boots A. M. (2010): Suppression of the inflammatory response in experimental arthritis is mediated via estrogen receptor alpha but not estrogen receptor beta. *Arthritis Res Ther* (12): R101.

Farndale R. W., Buttle D. J. and Barrett A. J. (1986): Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* (883): 173-7.

Felson D. T. and Zhang Y. (1998): An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* (41): 1343-55.

Flannery C. R., Little C. B., Caterson B. and Hughes C. E. (1999 a): Effects of culture conditions and exposure to catabolic stimulators (IL-1 and retinoic acid) on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and disintegrin metalloproteinases (ADAMs) by articular cartilage chondrocytes. *Matrix Biol* (18): 225-37.

Flannery C. R., Little C. B., Hughes C. E. and Caterson B. (1999 b): Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* (260): 318-22.

Garstang S. V. and Stitik T. P. (2006): Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *Am J Phys Med Rehabil* (85): 2-11.

Ghisletti S., Meda C., Maggi A. and Vegeto E. (2005): 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol* (25): 2957-68.

Gilbert A. M., Bursavich M. G., Lombardi S., Georgiadis K. E., Reifenberg E., Flannery C. R. and Morris E. A. (2008): N-((8-hydroxy-5-substituted-quinolin-7-yl)(phenyl)methyl)-2-phenyloxy/amino-aceta mide inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2). *Bioorg Med Chem Lett* (18): 6454-7.

Gokhale J. A., Frenkel S. R. and Dicesare P. E. (2004); Estrogen and osteoarthritis. *Am J Orthop* (Belle Mead NJ) (33): 71-80.

Gouze J. N., Bordji K., Gulberti S., Terlain B., Netter P., Magdalou J., Fournel-Gigleux S. and Ouzzine M. (2001): Interleukin-1beta down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glucosamine on interleukin-1beta-mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum* (44): 351-60.

Grogan S. P., Aklin B., Frenz M., Brunner T., Schaffner T. and Mainil-Varlet P. (2002): In vitro model for the study of necrosis and apoptosis in native cartilage. *J Pathol* (198): 5-13.

Gunther K. P., Scharf H. P., Puhl W., Willauschus W., Sauerland S., Gluckert K. and Sun Y. (1997): Reproducibility in the roentgenological assessment of coxarthrosis. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* (135): 3-8.

Ham K. D., Loeser R. F., Lindgren B. R. and Carlson C. S. (2002): Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* (46): 1956-64.

Hanna F. S., Wluka A. E., Bell R. J., Davis S. R. and Cicuttini F. M. (2004): Osteoarthritis and the postmenopausal woman: Epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. *Semin Arthritis Rheum* (34): 631-6.

Hardingham T. E. and Fosang A. J. (1995): The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl* (43): 86-90.

- Hart D. J., Doyle D. V. and Spector T. D.** (1999): Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* (42): 17-24.
- Hashimoto S., Takahashi K., Amiel D., Coutts R. D. and Lotz M.** (1998): Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (41): 1266-74.
- Hashizume M. and Mihara M.** (2010): High molecular weight hyaluronic acid inhibits IL-6-induced MMP production from human chondrocytes by up-regulating the ERK inhibitor, MKP-1. *Biochem Biophys Res Commun* (403): 184-9.
- Hauselmann H. J., Oppliger L., Michel B. A., Stefanovic-Racic M. and Evans C. H.** (1994): Nitric oxide and proteoglycan biosynthesis by human articular chondrocytes in alginate culture. *FEBS Lett* (352): 361-4.
- Henrotin Y., Kurz B. and Aigner T.** (2005): Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* (13): 643-54.
- Hoegh-Andersen P., Tanko L. B., Andersen T. L., Lundberg C. V., Mo J. A., Heegaard A. M., Delaisse J. M. and Christgau S.** (2004): Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* (6): R169-80.
- Hu Y., Willett K. L., Khan I. A., Scheffler B. E. and Dasmahapatra A. K.** (2009): Ethanol disrupts chondrification of the neurocranial cartilages in medaka embryos without affecting aldehyde dehydrogenase 1A2 (Aldh1A2) promoter methylation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (150): 495-502.
- Huang K. and Wu L. D.** (2008): Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med Res* (36): 1149-60.
- Huber M., Trattng S. and Lintner F.** (2000): Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* (35): 573-80.
- Huch K., Wilbrink B., Flechtenmacher J., Koepp H. E., Aydelotte M. B., Sampath T. K., Kuettner K. E., Mollenhauer J. and Thonar E. J.** (1997): Effects of recombinant human osteogenic protein 1 on the production of proteoglycan, prostaglandin E2, and interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes cultured in the presence of interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* (40): 2157-61.
- Imada K., Oka H., Kawasaki D., Miura N., Sato T. and Ito A.** (2010): Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biol Pharm Bull* (33): 410-4.

- Jacques C., Gosset M., Berenbaum F. and Gabay C.** (2006): The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* (74): 371-403.
- Jenei-Lanzl Z., Straub R. H., Dienstknecht T., Huber M., Hager M., Grassel S., Kujat R., Angele M. K., Nerlich M. and Angele P.** (2010): Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum* (62): 1088-96.
- Johnson E. O., Charchandi A., Babis G. C. and Soucacos P. N.** (2008): Apoptosis in osteoarthritis: morphology, mechanisms, and potential means for therapeutic intervention. *J Surg Orthop Adv* (17): 147-52.
- Ju X. D., Deng M., Ao Y. F., Yu C. L., Wang J. Q., Yu J. K., Cui G. Q. and Hu Y. L.** (2010): The protective effect of tetramethylpyrazine on cartilage explants and chondrocytes. *J Ethnopharmacol* (132): 414-20.
- Karan A., Karan M. A., Vural P., Erten N., Tascioglu C., Aksoy C., Canbaz M. and Oncel A.** (2003): Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* (22): 397-9.
- Karn A., Jha A. K., Shrestha S., Acharya B., Poudel S. and Bhandari R. B.** (2010): Tamoxifen for breast cancer. *JNMA J Nepal Med Assoc* (49): 62-7.
- Keskin I. G., Oz F., Oz B., Oktem F. and Gustafson M.** (2000): Tracheal reconstruction using alcohol-stored homologous cartilage and autologous cartilage in the rabbit model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* (56): 161-7.
- Kinney R. C., Schwartz Z., Week K., Lotz M. K. and Boyan B. D.** (2005): Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17beta-estradiol. *Osteoarthritis Cartilage* (13): 330-7.
- Kobayashi M., Squires G. R., Mousa A., Tanzer M., Zukor D. J., Antoniou J., Feige U. and Poole A. R.** (2005): Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* (52): 128-35.
- Koshy P. J., Lundy C. J., Rowan A. D., Porter S., Edwards D. R., Hogan A., Clark I. M. and Cawston T. E.** (2002): The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* (46): 961-7.

- Kurz B., Jin M., Patwari P., Cheng D. M., Lark M. W. and Grodzinsky A. J.** (2001): Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J Orthop Res* (19): 1140-6.
- Kurz B., Lemke A., Kehn M., Domm C., Patwari P., Frank E. H., Grodzinsky A. J. and Schunke M.** (2004): Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression. *Arthritis Rheum* (50): 123-30.
- Kurz B., Lemke A. K., Fay J., Pufe T., Grodzinsky A. J. and Schunke M.** (2005): Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* (187): 473-85.
- Lark M. W., Bayne E. K., Flanagan J., Harper C. F., Hoerrner L. A., Hutchinson N. I., Singer, II, Donatelli S. A., Weidner J. R., Williams H. R., Mumford R. A. and Lohmander L. S.** (1997): Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* (100): 93-106.
- Lee Y. J., Lee E. B., Kwon Y. E., Lee J. J., Cho W. S., Kim H. A. and Song Y. W.** (2003): Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatol Int* (23): 282-8.
- Lefebvre V., Peeters-Joris C. and Vaes G.** (1991): Production of gelatin-degrading matrix metalloproteinases ('type IV collagenases') and inhibitors by articular chondrocytes during their dedifferentiation by serial subcultures and under stimulation by interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Biochim Biophys Acta* (1094): 8-18.
- Lemke A.** (2006): Untersuchungen zu den Pathomechanismen der Destruktion von Faserknorpelgewebe am Beispiel des Meniskus. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Dissertation, Kiel.
- Ley C., Svala E., Nilton A., Lindahl A., Eloranta M. L., Ekman S. and Skioldebrand E.** (2011): Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1beta, and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. *Connect Tissue Res* (52): 290-300.
- Lin Z., Willers C., Xu J. and Zheng M. H.** (2006): The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng* (12): 1971-84.

Loeuille D., Chary-Valckenaere I., Champigneulle J., Rat A. C., Toussaint F., Pinzano-Watrin A., Goebel J. C., Mainard D., Blum A., Pourel J., Netter P. and Gillet P. (2005): Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum* (52): 3492-501.

Lohmander L. S., Neame P. J. and Sandy J. D. (1993): The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (36): 1214-22.

Lohmander S. (1988): Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin Rheumatol* (2): 37-62.

Longpre J. M., McCulloch D. R., Koo B. H., Alexander J. P., Apte S. S. and Leduc R. (2009): Characterization of proADAMTS5 processing by proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* (41): 1116-26.

Lotz M. (1999): The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* (25): 269-82.

Lüllmann-Rauch R. (2009): Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Malemud C. J. (2006): Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* (11): 1696-701.

Malfait A. M., Arner E. C., Song R. H., Alston J. T., Markosyan S., Staten N., Yang Z., Griggs D. W. and Tortorella M. D. (2008): Proprotein convertase activation of aggrecanases in cartilage in situ. *Arch Biochem Biophys* (478): 43-51.

Maneix L., Beauchef G., Servent A., Wegrowski Y., Maquart F. X., Boujrad N., Flouriot G., Pujol J. P., Boumediene K., Galera P. and Moslemi S. (2008): 17Beta-oestradiol up-regulates the expression of a functional UDP-glucose dehydrogenase in articular chondrocytes: comparison with effects of cytokines and growth factors. *Rheumatology (Oxford)* (47): 281-8.

Martin L. A., Pancholi S., Chan C. M., Farmer I., Kimberley C., Dowsett M. and Johnston S. R. (2005): The anti-oestrogen ICI 182,780, but not tamoxifen, inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells refractory to long-term oestrogen deprivation through down-regulation of oestrogen receptor and IGF signalling. *Endocr Relat Cancer* (12): 1017-36.

- Mort J. S. and Billington C. J.** (2001): Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Res* (3): 337-41.
- Murphy G. and Nagase H.** (2008): Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pract Rheumatol* (4): 128-35.
- Nagase H. and Kashiwagi M.** (2003): Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* (5): 94-103.
- Nagase H., Visse R. and Murphy G.** (2006): Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* (69): 562-73.
- Nelson L. R. and Bulun S. E.** (2001): Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* (45): 116-24.
- Nevitt M. C., Cummings S. R., Lane N. E., Hochberg M. C., Scott J. C., Pressman A. R., Genant H. K. and Cauley J. A.** (1996): Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arch Intern Med* (156): 2073-80.
- Ng M. C., Harper R. P., Le C. T. and Wong B. S.** (1999): Effects of estrogen on the condylar cartilage of the rat mandible in organ culture. *J Oral Maxillofac Surg* (57): 818-23.
- Nuki G.** (1999): Osteoarthritis: a problem of joint failure. *Z Rheumatol* (58): 142-7.
- Oestergaard S., Sondergaard B. C., Hoegh-Andersen P., Henriksen K., Qvist P., Christiansen C., Tanko L. B. and Karsdal M. A.** (2006): Effects of ovariectomy and estrogen therapy on type II collagen degradation and structural integrity of articular cartilage in rats: implications of the time of initiation. *Arthritis Rheum* (54): 2441-51.
- Ohtsuka M., Konno F., Honda H., Oikawa T., Ishikawa M., Iwase N., Isomae K., Ishii F., Hemmi H. and Sato S.** (2002): PPA250 [3-(2,4-difluorophenyl)-6-[2-[4-(1H-imidazol-1-ylmethyl) phenoxy]ethoxy]-2-phenylpyridine], a novel orally effective inhibitor of the dimerization of inducible nitric-oxide synthase, exhibits an anti-inflammatory effect in animal models of chronic arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* (303): 52-7.
- Oshima Y., Matsuda K., Yoshida A., Watanabe N., Kawata M. and Kubo T.** (2007): Localization of estrogen receptors alpha and beta in the articular surface of the rat femur. *Acta Histochem Cytochem* (40): 27-34.
- Pelletier G.** (2000); Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* (15): 1261-70.

Pelletier J. P., Jovanovic D. V., Lascau-Coman V., Fernandes J. C., Manning P. T., Connor J. R., Currie M. G. and Martel-Pelletier J. (2000): Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. *Arthritis Rheum* (43): 1290-9.

Pelletier J. P., Mineau F., Faure M. P. and Martel-Pelletier J. (1990): Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteases in the early lesions of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (33): 1466-76.

Pfaffl M. W., Lange I. G., Daxenberger A. and Meyer H. H. (2001): Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR. *Apmis* (109): 345-55.

Poole A. R., Kobayashi M., Yasuda T., Lavery S., Mwale F., Kojima T., Sakai T., Wahl C., El-Maadawy S., Webb G., Tchetina E. and Wu W. (2002): Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* (61 Suppl 2): 78-81.

Porter S., Clark I. M., Kevorkian L. and Edwards D. R. (2005): The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* (386): 15-27.

Pratta M. A., Scherle P. A., Yang G., Liu R. Q. and Newton R. C. (2003): Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum* (48): 119-33.

Presle N., Cipolletta C., Jouzeau J. Y., Abid A., Netter P. and Terlain B. (1999): Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin-1beta in rats. *Arthritis Rheum* (42): 2094-102.

Ratcliffe A., Tyler J. A. and Hardingham T. E. (1986): Articular cartilage cultured with interleukin 1. Increased release of link protein, hyaluronate-binding region and other proteoglycan fragments. *Biochem J* (238): 571-80.

Richardson D. W. and Dodge G. R. (2000): Effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* (61): 624-30.

Richette P., Corvol M. and Bardin T. (2003): Estrogens, cartilage, and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* (70): 257-62.

- Richette P., Dumontier M. F., Francois M., Tsagris L., Korwin-Zmijowska C., Rannou F. and Corvol M. T.** (2004): Dual effects of 17beta-oestradiol on interleukin 1beta-induced proteoglycan degradation in chondrocytes. *Ann Rheum Dis* (63): 191-9.
- Richette P., Dumontier M. F., Tahiri K., Widerak M., Torre A., Benallaoua M., Rannou F., Corvol M. T. and Savouret J. F.** (2007a): Oestrogens inhibit interleukin 1beta-mediated nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes through nuclear factor-kappa B impairment. *Ann Rheum Dis* (66): 345-50.
- Richette P., Laborde K., Boutron C., Bardin T., Corvol M. T. and Savouret J. F.** (2007b): Correlation between serum and synovial fluid estrogen concentrations: comment on the article by Sowers et al. *Arthritis Rheum* (56): 698; author reply 698-99.
- Richmond R. S., Carlson C. S., Register T. C., Shanker G. and Loeser R. F.** (2000): Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* (43): 2081-90.
- Riggs B. L. and Hartmann L. C.** (2003): Selective estrogen-receptor modulators - mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* (348): 618-29.
- Robert-Koch-Institut** (2006a): Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, S. 37-39, Robert Koch Institut, Berlin.
- Robert-Koch-Institut** (2006b): Gesundheit in Deutschland. Themenheft 30: Gesundheitsbedingte Frühberentung, S. 1-24, Robert Koch Institut, Berlin.
- Roman-Blas J. A., Castaneda S., Largo R. and Herrero-Beaumont G.** (2009): Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther* (11): 241.
- Rovensky J., Radikova Z., Imrich R., Greguska O., Vigas M. and Macho L.** (2004): Gonadal and adrenal steroid hormones in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Endocr Regul* (38): 143-9.
- Sandy J. D.** (2006): A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanysis. *Osteoarthritis Cartilage* (14): 95-100.
- Santaguida P. L., Hawker G. A., Hudak P. L., Glazier R., Mahomed N. N., Kreder H. J., Coyte P. C. and Wright J. G.** (2008): Patient characteristics affecting the prognosis of total hip and knee joint arthroplasty: a systematic review. *Can J Surg* (51): 428-36.

- Sasaki K., Hattori T., Fujisawa T., Takahashi K., Inoue H. and Takigawa M.** (1998): Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem* (123): 431-9.
- Schallenberger E., Schondorfer A. M. and Walters D. L.** (1985): Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle. *Acta Endocrinol (Copenh)* (108): 312-21.
- Schlaak J. F., Pfers I., Meyer Zum Buschenfelde K. H. and Marker-Hermann E.** (1996): Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* (14): 155-62.
- Schmidt N., Pautz A., Art J., Rauschkolb P., Jung M., Erkel G., Goldring M. B. and Kleinert H.** (2010): Transcriptional and post-transcriptional regulation of iNOS expression in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol* (79): 722-32.
- Schmittgen T. D. and Zakrajsek B. A.** (2000): Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* (46): 69-81.
- Schünke M., Schulte E. and Schumacher U.** (2006): Prometheus: Lernatlas der Anatomie - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Sniekers Y. H., van Osch G. J., Ederveen A. G., Inzunza J., Gustafsson J. A., van Leeuwen J. P. and Weinans H.** (2009): Development of osteoarthritic features in estrogen receptor knockout mice. *Osteoarthritis Cartilage* (17): 1356-61.
- Sniekers Y. H., van Osch G. J., Jahr H., Weinans H. and van Leeuwen J. P.** (2010): Estrogen modulates iodoacetate-induced gene expression in bovine cartilage explants. *J Orthop Res* (28): 607-15.
- Sniekers Y. H., Weinans H., Bierma-Zeinstra S. M., van Leeuwen J. P. and van Osch G. J.** (2008): Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. *Osteoarthritis Cartilage* (16): 533-41.
- Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S. and Brennan M.** (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* (51): 1409-16.
- Sowers M. R., McConnell D., Jannausch M., Buyuktur A. G., Hochberg M. and Jamadar D. A.** (2006): Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (54): 2481-7.

Spector T. D., Nandra D., Hart D. J. and Doyle D. V. (1997): Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women? The Chingford Study. *Ann Rheum Dis* (56): 432-4.

Stadler J., Stefanovic-Racic M., Billiar T. R., Curran R. D., McIntyre L. A., Georgescu H. I., Simmons R. L. and Evans C. H. (1991): Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* (147): 3915-20.

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. and Fosang A. J. (2005): ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* (434): 648-52.

Stevens A. L., Wheeler C. A., Tannenbaum S. R. and Grodzinsky A. J. (2008): Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF-alpha but not IL-1beta treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* (16): 489-97.

Sugiyama E. (2007): Role of matrix metalloproteinase-3 in joint destruction in rheumatoid arthritis. *Clin Calcium* (17): 528-34.

Takebe K., Nishiyama T., Hayashi S., Hashimoto S., Fujishiro T., Kanzaki N., Kawakita K., Iwasa K., Kuroda R. and Kurosaka M. (2010): Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress. *Int J Mol Med* (27) 329-35.

Takeuchi S., Mukai N., Tateishi T. and Miyakawa S. (2007): Production of sex steroid hormones from DHEA in articular chondrocyte of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (293): 410-5.

Tanko L. B., Karsdal M. A. and Christiansen C. (2005): The clinical potential of estrogen for the prevention of osteoarthritis: what is known and what needs to be done? *Womens Health* (1): 125-32.

Tanko L. B., Sondergaard B. C., Oestergaard S., Karsdal M. A. and Christiansen C. (2008): An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage. *Climacteric* (11): 4-16.

Taskiran D., Stefanovic-Racic M., Georgescu H. and Evans C. (1994): Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* (200): 142-8.

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. and Arner E. C. (1999): Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* (284): 1664-6.

Tortorella M. D., Malfait A. M., Deccico C. and Arner E. (2001): The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* (9): 539-52.

Tsai C. L. and Liu T. K. (1993): Estradiol-induced knee osteoarthrosis in ovariectomized rabbits. *Clin Orthop Relat Res* (291): 295-302.

Ushiyama T., Ueyama H., Inoue K., Ohkubo I. and Hukuda S. (1999): Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* (7): 560-6.

van de Loo F. A., Arntz O. J., van Enkevort F. H., van Lent P. L. and van den Berg W. B. (1998): Reduced cartilage proteoglycan loss during zymosan-induced gonarthrosis in NOS2-deficient mice and in anti-interleukin-1-treated wild-type mice with unabated joint inflammation. *Arthritis Rheum* (41): 634-46.

van de Loo F. A., Joosten L. A., van Lent P. L., Arntz O. J. and van den Berg W. B. (1995): Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* (38): 164-72.

Verdegaal S. H., Corver W. E., Hogendoorn P. C. and Taminiau A. H. (2008): The cytotoxic effect of phenol and ethanol on the chondrosarcoma-derived cell line OUMS-27: an in vitro experiment. *J Bone Joint Surg Br* (90): 1528-32.

Villalobos M., Olea N., Gorgojo L., Lopez-Gonzalez J. D., Ruiz de Almodovar J. M. and Pedraza V. (1987): Proliferation kinetics of MCF-7 cell cultures. I. Relative influence of estrogens and antiestrogens on the growth of the cell population. *Rev Esp Fisiol* (43): 209-14.

Warm M., Kates R., Overkamp F., Thomas A. and Harbeck N. (2011): Benefits of early and prolonged fulvestrant treatment in 848 postmenopausal advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (125): 127-36.

Watson C. S., Alyea R. A., Jeng Y. J. and Kochukov M. Y. (2007): Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol* (274): 1-7.

Wittwer A. J., Hills R. L., Keith R. H., Munie G. E., Arner E. C., Anglin C. P., Malfait A. M. and Tortorella M. D. (2007): Substrate-dependent inhibition kinetics of an active site-directed inhibitor of ADAMTS-4 (Aggrecanase 1). *Biochemistry* (46): 6393-401.

Wluka A. E., Davis S. R., Bailey M., Stuckey S. L. and Cicuttini F. M. (2001): Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users. *Ann Rheum Dis* (60): 332-6.

Yu S. B., Wang M. Q., Li Y. Q., Lv X., Jiang Y., Dong G. Y. and Ma Z. F. (2009): The effects of age and sex on the expression of oestrogen and its receptors in rat mandibular condylar cartilages. *Arch Oral Biol* (54): 479-85.

Yun K. I., Chae C. H. and Lee C. W. (2008): Effect of estrogen on the expression of cytokines of the temporomandibular joint cartilage cells of the mouse. *J Oral Maxillofac Surg* (66): 882-7.

Danksagung

Es ist mir eine angenehme Pflicht, all denen zu danken, die in irgendeiner Weise Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit haben. Die größte Dankbarkeit für die allzeit bedingungslose Unterstützung und für das meinen Entscheidungen entgegengebrachte Verständnis und Vertrauen gilt meinen Eltern sowie meiner liebevollen Lebenspartnerin.

Danken möchte ich Professor Schünke für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe. Ebenso danke ich Professor Kurz für die Überlassung dieses Themas sowie die erstklassige Betreuung. Die Bereitschaft zu kritischen Diskussionen und die Hilfestellung bei aufkommenden Fragen sowie seine motivierenden Worte haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Obwohl sein Lehrauftrag an der Universität der Gold Coast in Australien seit Juni 2010 eine große räumliche Distanz sowie eine erhebliche Zeitverschiebung bedeutete, hatte ich stets das Gefühl, gut aufgehoben zu sein. Durch die Verwendung verschiedener Kommunikationsmittel und großen persönlichen Einsatz war die Fortführung der Dissertation jederzeit möglich.

Meine Untersuchungen wären ohne die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Schünke/Prof. Kurz nicht möglich gewesen. An dieser Stelle richte ich meinen Dank an Frau Rita Kirsch, Herrn Frank Lichte und Herrn Kristian Ewald, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Anatomischen Instituts, die hier nicht namentlich erwähnt sind, danke ich für die Hilfe und Unterstützung, die ich im Laufe meiner Arbeit erfahren habe. Es war mir stets eine Freude in der freundschaftlichen Atmosphäre im Institut zu arbeiten.

Nicht unerwähnt bleiben sollen die Lektoren Detlef, Ellen, Hans und Kristian, welche mit großer Aufmerksamkeit das Manuskript kontrolliert und korrigiert haben.

Zu großem Dank bin ich dem Lubinus Klinikum sowie deren Patientinnen verpflichtet. Ohne die Chirurgen der Abteilung für Endoprothetik unter der Leitung von Herrn Dr. Lubinus sowie das OP-Personal wäre der Versuchsteil „human“ nicht möglich gewesen. Meine große Dankbarkeit und mein Respekt gebühren den Patientinnen, die zur Spende eingewilligt haben. Ich hoffe, sie alle haben eine schnelle Genesung erfahren.