

**Barthold Deiters**

**Untersuchungen zum Hyaluronan Export  
aus Chondrozyten bei  
arthrotischen Vorgängen**

**2006**

Pharmazeutische und Medizinische Chemie

**Untersuchungen zum Hyaluronan Export aus Chondrozyten bei  
arthrotischen Veränderungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich  
Chemie und Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Barthold Deiters  
aus Warendorf

- 2006 -

Dekan:	Herr Professor Dr. B. Wunsch
Erster Gutachter:	Herr Professor Dr. M. Lehr
Zweiter Gutachter:	Herr Professor Dr. P. Prehm
Tage der mündlichen Prüfungen:	12, 15 und 21. Dezember 2006
Tag der Promotion:	21. Dezember 2006



## 1. Einleitung

1.1	Ätiologie der Arthrose	1
1.2	Therapie der Arthrose	3
1.3	Aufbau der Knorpelmatrix	5
1.4	Aufbau, Synthese und Abbau von Hyaluronan	7
1.5	Biologische Funktionen von Hyaluronan	10
1.6	Praktische Bedeutung von Hyaluronan	12
1.7	Proteoglykane	14
1.8	Kollagenabbau und Matrixmetalloproteasen	16
1.9	Induzierung einer Arthrose mit IL-1	18
1.10	IL-1 $\alpha$ und die cGMP-Signalkaskade	19
1.11	ABC Transporter	21
1.12	Arbeitshypothese und Zielsetzung	24

## 2. Material & Methoden 26

2.1	Material	26
2.1.1	Biologisches Material	26
2.1.2	Oligonucleotide	26
2.1.3	Nährmedien	27
2.1.4	Standardlösungen und Puffer	28
2.1.5	Marker	28
2.1.6	Chemikalien	29
2.1.7	Geräte	30
2.2	Allgemeine Methoden	31
2.2.1	Zell- und Organkultur	31
2.2.1.1	Isolierung boviner Chondrozyten aus Knorpel	31
2.2.1.2	Einbettung der Chondrozyten in Alginatebeads	32
2.2.1.3	Zellkultur	33
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2.1	Isolierung cytoplasmatischer RNA	34
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA	34
2.2.2.3	Umschreiben von RNA in DNA	35
2.2.2.4	Polymerasekettenreaktion	35
2.2.2.5	Agarose Gelelektrophorese	36

2.2.2.6 Gelextraktion	37
2.2.2.7 TOPO-TA Klonierung	38
2.2.2.8 DNA-Sequenzierung	39
2.2.3 Proteinchemische Methoden	39
2.2.3.1a Proteinbestimmung nach Lowry	39
2.2.3.1b Proteinbestimmung nach Bradford	40
2.2.3.2a Coomassie-Färbung	40
2.2.3.2b Silberfärbung	41
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.2.3.4 Gelatin-Zymographie	42
2.2.3.5 Casein-Zymographie	43
2.2.3.6 Hyaluronidase-Zymographie	43
2.2.3.7 TCA-Fällung	43
2.2.3.8 Western-Blot	44
2.2.4 Biochemische und analytische Methoden	45
2.2.4.1 ELISA-Hyaluronanmessung	45
2.2.4.2 Hyaluronan Synthase Assay	47
2.2.4.3 Histochemischer Nachweis des Hyaluronan im Knorpelgewebe	48
2.2.4.4a Bestimmung der Proteoglykankonzentration im Knorpel	48
2.2.4.4b Messung der Proteoglykankonzentration im Medium	50
2.2.4.5 Messung der Proteoglykan-Synthese	50
2.2.4.6 Histochemische Anfärbung der Proteoglykane im Knorpel	51
2.2.4.7 Kollagenfragmente	51
2.2.4.8 Messung des Hydroxyprolinegehalts	52
2.2.4.9 Messung der Kollagensynthese	54
2.2.4.10 Peroxidase-Infiltrationsassay	54
2.2.4.11 Nitrit Bestimmung	55
2.2.4.12 Messung der alkalischen Phosphatase	55
2.2.4.13 Tierversuch	56
2.2.4.14 Zytotoxizitätsassay	56
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1 Verlaufsplan der durchgeführten Versuche	58
3.2 Untersuchungen zur Hyaluronanausschleussung	60

3.2.1	Nachweis von ABC Transportern	60
3.2.2	Induzierung der Hyaluronansynthese mit IL-1 $\alpha$	63
3.2.3	Inhibierung der Hyaluronansezernierung mit verschiedenen ABC Transporter - Inhibitoren	65
3.2.4	Untersuchung des Einflusses von ABC Transporter-Inhibitoren auf die Hyaluronansynthase	66
3.2.5	Untersuchung des Einflusses von MRP5 Inhibitoren auf die Hyaluronansezernierung	67
3.2.6	Auswirkungen der PDE5/MRP5 Inhibitoren auf die Hyaluronansynthase	71
3.2.7	Untersuchungen zur Toxizität der eingesetzten Stoffe	72
3.2.8	Histochemischer Hyaluronannachweis im Knorpel	73
3.2.9	Einfluss entzündungshemmender Stoffe auf die Hyaluronan- sekretion in Chondrozyten	75
3.3	Proteoglykane	77
3.3.1	Proteoglykane in bovinen Knorpelstücken	77
3.3.2	Einfluss der PDE5/MRP5 Inhibitoren auf die Proteoglykansynthese	81
3.3.3	Proteoglykane in Schnitten boviner Knorpelstücke	82
3.3.4	Proteoglykane im artikulärem Knorpel von Ratten nach Arthroseauslösung mit Iodacetat	84
3.4	Kollagene und Matrixmetalloproteasen	88
3.4.1	Messung der intakten Kollagenfibrillen im Knorpel	88
3.4.2	Kollagenabbauprodukte im Medium	91
3.4.3	Aktivität der Matrixmetalloproteasen	93
3.4.4	Messung der Diffusion von Proteinen im Knorpel nach IL-1 $\alpha$ Behandlung	96
3.4.5	Hyaluronan-Zymographie	97
3.5	Einflüsse des cGMP-Signalweges auf den Metabolismus von Hyaluronan, Proteoglykane und Kollagen	99
3.5.1	Versuche mit cGMP Analoga und anderen Modulatoren des cGMP-Signalweges	99
3.5.2	NO-Produktion im Knorpel	103
3.5.3	Messung der alkalischen Phosphatase	103

<b>4. Diskussion</b>	<b>105</b>
4.1 Methoden	105
4.2 Nachweis der ABC Transporter	106
4.3 Verminderte Hyaluronanausschleusung	106
4.4 Proteoglykangehalt im Knorpel	108
4.5 Einfluss einer reduzierten Hyaluronanausschleusung auf den Kollagenabbau	110
4.6 NO- und alkalische Phosphatase Produktion im Knorpel	113
4.7 Zusammenhänge zwischen IL-1 $\alpha$ Wirkung, PDE5 Hemmung, Hyaluronanausschleusung und dem cGMP Signalweg	113
4.8 Unser Entwurf zur Entstehung einer Arthrose	115
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>6. Ausblick</b>	<b>120</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	



# 1. Einleitung

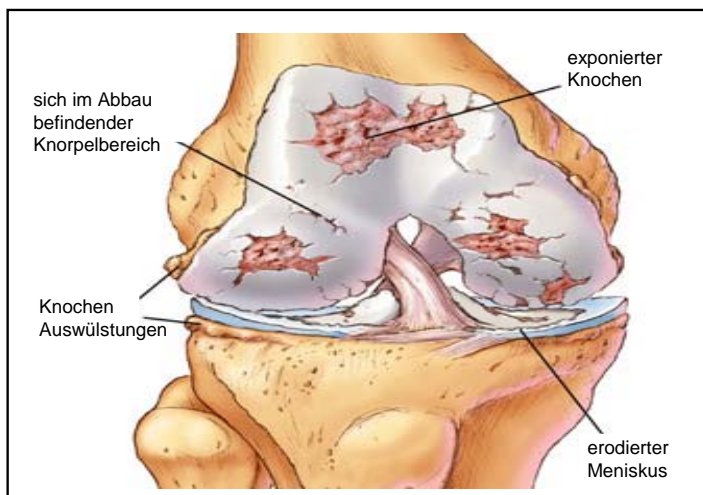
## 1.1 Ätiologie der Arthrose

Als Arthrose bezeichnet man eine degenerative Gelenkerkrankung, die mit einem irreversiblen Verlust/Verschleiß der Knorpelmatrix einhergeht. Die genauen Ursachen sowie die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Veränderungen in der Anfangsphase sind noch nicht vollständig bekannt. Doch während des Krankheitsverlaufs durchläuft der Knorpel mehrere Stadien. So versuchen die Chondrozyten durch veränderte Syntheseleistungen den Verlust der Matrix zu ersetzen, gleichzeitig erscheint die Matrix um die Chondrozyten herum geschwollen und amorph, was auf eine Wassereinlagerung schließen lässt [1]. Die verstärkte Wassereinlagerung führt zu einer Anschwellung und zur Aufweichung des Knorpels. Der Knorpel verliert die Proteoglykane und danach kommt es zu einem Abbau der Kollagenfibrillen, die dem Knorpel seine Zugfestigkeit geben.

Beim Übergang zur Arthrose verändern die Chondrozyten ihren Metabolismus. Die Synthese der Matrixbausteine ist im gesunden Knorpel fein abgestimmt und jegliche Veränderung dieses Gleichgewichts beeinflusst rasch die funktionale Integrität der Knorpelmatrix. Chondrozyten in einem gesunden Knorpelgewebe sind in der Lage, durch Umbau der Matrix diese an die mechanische Beanspruchung anzupassen, vergleichbar mit der Funktion der Osteoblasten und Osteoklasten im Knochen. Im gesunden Knorpel werden Hyaluronan und das Proteoglykan Aggrecan in ähnlicher Geschwindigkeit synthetisiert und abgebaut mit einer Halbwertszeit von sechs bis sieben Stunden [2]. Der Kollagenumsatz ist damit verglichen deutlich langsamer [3]. Werden Regionen nur schwach belastet, überwiegen katabole Vorgänge, bei stärkerer Belastung wird mehr Matrix gebildet mit dickeren Kollagenfasern. Diese Adaption geht im arthrotischen Knorpel verloren. Eine höhere Hyaluronanproduktion und gleichzeitig verminderte Aggrecansynthese führen zur Aufweichung des Knorpels, der so genannten Chondromalazie [4]. Im Knorpel finden sich neben den gesunden Chondrozyten, welche Kollagen II produzieren, auch Knorpelzellen, die nach einer Dedifferenzierung Kollagene vom Typ I und III bilden, welche untypisch für den Knorpel sind. Andere Chondrozyten beginnen zu hypertrophieren, wie sie es sonst nur vor der Calcifizierung machen und bilden Kollagen X. Chondrozyten besitzen zwar die Fähigkeit zur Regenerierung der Knorpelmatrix, dies allerdings nur in begrenztem Umfang. Vor allem die Proteoglykane können leicht nachsynthetisiert werden, das zerstörte Kollagenetzwerk zu ersetzen ist dagegen sehr viel problematischer und findet nur spärlich statt [5]. Zytokine wie IL-1 oder der

Tumor Nekrose Faktor (TNF) stimulieren auch die Sekretion von Matrix abbauenden Enzymen wie den Matrixmetalloproteasen. Auf deren genaue Wirkung wird zu einem späteren Zeitpunkt noch eingegangen. Eine erhöhte Synthese dieser katabolen Enzyme trägt im arthrotischem Knorpel zum Matrixabbau bei.

Im Gegensatz zur rheumatischen Arthritis ist die Arthrose keine entzündliche Gelenkerkrankung. Allerdings findet man auch bei der Arthrose Entzündungsmediatoren wie IL-1 in der Synovialflüssigkeit. Weiterhin kann eine rheumatische Arthritis eine Arthrose auslösen. Da der Knorpel in den Gelenken nicht durch Blutgefäße innerviert ist, muss er über



**Abb. 1:** arthrotisches Kniegelenk

die Synovialflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt werden. Dies kann jedoch nur geschehen, wenn das Gelenk alternierend be- und entlastet wird. Der hyaline Knorpel wird sozusagen ordentlich durchgeknetet. Ist das Gelenk z.B. durch einen Gips für längere Zeit ruhig gestellt, oder wird es von sich aus nicht genug bewegt, kommt es zu einer Minderversorgung der Chondrozyten.

Auch zu hohe Belastungen mit zu kurzen Entlastungsphasen führen zu Versorgungsproblemen, in dessen Folge sich die Syntheseleistung der Chondrozyten verändert und ein Knorpelabbau beginnt (Abb. 1). Besonders anfällig sind Gelenke, die große Teile des Körpergewichts tragen müssen, wie Knie, Hüfte und Bandscheiben. In Deutschland sind ca. 80 % aller über 65-jährigen und 90% aller über 80-jährigen von dieser Krankheit betroffen. Frauen und übergewichtige Menschen haben ein erhöhtes Risiko, an Arthrose zu erkranken. Auch gibt es eine gewisse genetische Präposition, z.B. bei der Fingergelenkarthrose. Insbesondere harte körperliche Arbeit oder angeborene Gelenkfehlstellungen führen zur Ausbildung der Arthrose. Man kann in diesem Zusammenhang von der Volkskrankheit Nr.1 sprechen, die sehr hohe Kosten im Gesundheitssystem verursacht. In Deutschland werden die jährlichen Aufwendungen im Gesundheitssystem und entstehenden Kosten durch Produktionsausfall auf 12 Milliarden Euro taxiert. Die Kosten sind sehr viel höher als z.B. für Krebs, vor allem auch deswegen, weil die Arthrose keine tödliche Krankheit ist, sondern „nur“ starke Schmerzen und eine eingeschränkte Mobilität verursacht. Puhl veröffentlichte 1997 [6] epidemiologische Daten zur Arthrose, nachdem 27 % aller Frühberentungen 1991

und 42 % aller durchgeführten Rehabilitationsmaßnahmen auf degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates zurückzuführen sind. Durch die zunehmende Überalterung unserer Gesellschaft wird die sozialökonomische Bedeutung der Arthrose, die mit dem Alter eine überproportional zunehmende Prävalenz zeigt, in den kommenden Jahrzehnten weiter rasch an Bedeutung gewinnen.

Die ersten Anzeichen sind Spannungsgefühl und Steifigkeit in den Gelenken. Dann treten - vor allem bei stoßartigen Belastungen - Schmerzen auf, die mit der Zeit stärker werden. Fließende Bewegungen wie Radfahren sind häufig noch schmerzfrei möglich. Bei feuchtem und kaltem Wetter können sich die Beschwerden verstärken. Nach längeren Ruhepausen kann es äußerst mühsam sein, "wieder in Schwung zu kommen". Ärzte sprechen vom so genannten Anlaufschmerz. In besonders schweren Fällen kann sich ein Dauerschmerz einstellen. Dann ermüdet körperliche Bewegung besonders schnell. Wenn die Gelenke öfter überwärmt und gerötet sind, liegt dies an abgeriebenem Knorpel- oder Knochenmaterial, welches Entzündungen hervorruft. Dies bezeichnet man als Detritussynovitis.

Eine Diagnose erfolgt per Röntgenuntersuchung. Bei starker Erodierung des Knorpels können diese Schäden gut sichtbar gemacht werden. Die Stärke der Schmerzen korreliert allerdings nur ungenügend mit dem Grad der Abnutzung des Knorpels. Nichtmedikamentöse Behandlungen zielen in erster Linie darauf ab, das betroffene Gelenk zu entlasten, dies bedeutet zum Beispiel eine Gewichtsreduktion. Diese Maßnahmen werden durch eine verbesserte Versorgung der Chondrozyten unterstützt, was durch Bewegung der Gelenke ohne Belastung erreicht werden kann. Geeignet dafür sind Aktivitäten wie Radfahren in kleinen Gängen oder Schwimmen.

## **1.2 Therapie der Arthrose**

Die Therapie der Arthrose stützt sich bis zum heutigen Zeitpunkt noch sehr stark auf die Klasse der nichtsteroidalen Antirheumatika. In den letzten Jahren haben sich für dieses Anwendungsgebiet auch die COX-2 Hemmstoffe etabliert, da diese weniger gastrointestinale Nebenwirkungen hervorrufen. Diese Medikamente sind in der Lage, Symptome wie den Schmerz und etwaige Schwellungen zu bekämpfen. Weiterhin werden mit ihnen eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Minimierung der Behinderung erreicht. Inwiefern so die ursächlichen Auslöser der Arthrose behandelt werden, ist strittig und zweifelhaft. Zu Recht werden Arzneistoffe wie Paracetamol, Morphin und Tramadol als „Symptom

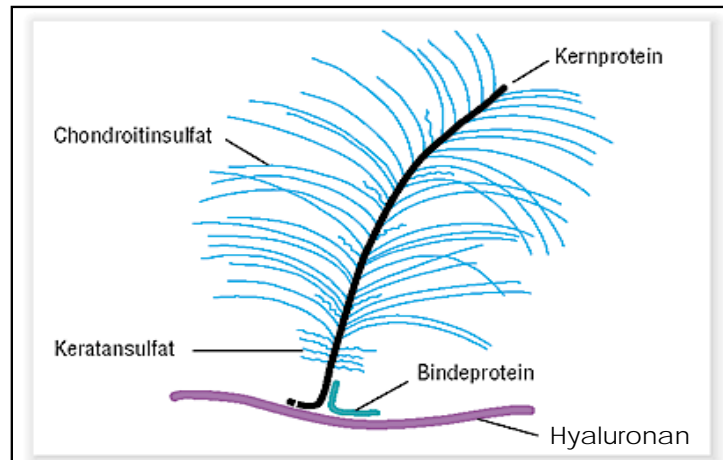
modifying OA (osteoarthrotic) Drugs“ eingestuft. Eine andere Möglichkeit ist die Injektion von Hyaluronan in das Kniegelenk. So kann vielen Patienten Linderung verschafft werden, da die erhöhte Hyaluronankonzentration in der Synovialflüssigkeit für eine erhöhte Viskosität und damit verbesserte Schmierfähigkeit sorgt. Diese Behandlung muss nach drei bis sechs Monaten allerdings wiederholt werden. Als letzte medikamentöse Möglichkeit können auch Glucocorticoide in hohen Dosen gegeben bzw. in das Gelenk gespritzt werden. Eher selten werden das topisch zu applizierende Capsaicin oder Präparate aus Weidenrindenextrakten (Assalix®) angewendet. Unter den nichtmedikamentösen Therapieformen gibt es zum Beispiel die Wärmetherapie mit warmen Wickeln, Fango- und Moorpackungen oder die Kältetherapie mit Kaltluft und Kaltwasserpackungen. Besonders hervorzuheben ist hier die Ergotherapie, die es Patienten oft ermöglicht, alltägliche Aktivitäten wieder selbstständig zu erledigen.

Die finale Alternative ist ein Ersatz des betroffenen Gelenks durch eine Endoprothese. Diese haben mittlerweile hohe Qualitätsstandards erreicht und halten 20 bis 25 Jahre. Besonders häufig kommt dieses Verfahren bei Knie- und Hüftgelenken zum Einsatz. In Deutschland werden zurzeit jährlich ca. 200.000 Hüft- und 50.000 Kniegelenke durch eine Endoprothese ersetzt. Ein künstliches Gelenk weist aber noch immer gegenüber einem gesunden Gelenk einen 30fach höheren Reibungsquotienten auf.

In der ABDA-Datenbank findet man unter „Medikamente zur Behandlung der Arthrose“ 17 Arzneimittel aufgeführt. 16 von ihnen enthalten Hyaluronan zur Injektion und eines Glucosaminsulfat (Dona-S®). Daran lässt sich erkennen, dass man dieser Erkrankung hilflos gegenüber steht. Bei der oralen Gabe von Glucosamin ist nur schwer nachzuvollziehen, wie dies der Knorpelmatrix zugute kommen soll. Da es aber keine „wirksamen“ Medikamente gibt, erzielt dieses Medikament einen beachtlichen Umsatz. Allen Behandlungen gemein ist die rein symptomatische Behandlung. Es ist also klar, dass diese Behandlungen die Progression der Arthrose nicht aufhalten, sondern maximal verlangsamen können. Ein viel versprechender Ansatz könnte der IL-1 Antagonist Kineret® sein, der sich seit 2002 auf dem deutschen Markt befindet, aber bis dato nur zur Therapie der rheumatischen Arthritis zugelassen ist. Vielleicht wird hier bei positiven Studien eine Indikationserweiterung auch für Arthrose beantragt.

### 1.3 Aufbau der Knorpelmatrix

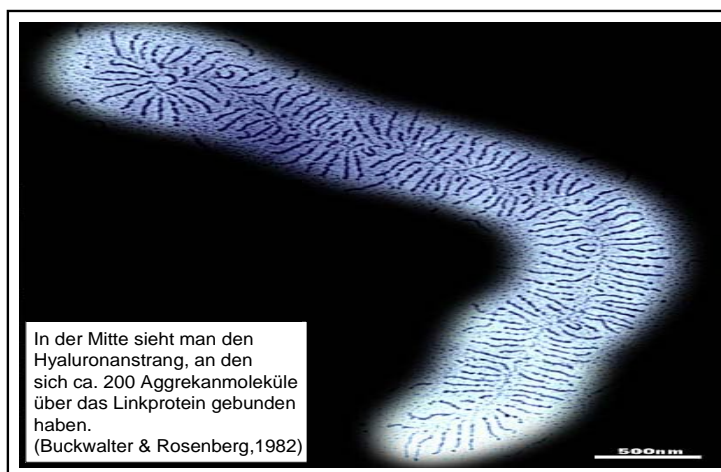
Der hyaline Knorpel ist aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und Knorpelmatrix zusammengesetzt. Die Knorpelmatrix an sich besteht aus zwei Hauptkomponenten, dem hoch molekularem Proteoglykan Aggrekan sowie neben Typ IX und XI insbesondere aus Kollagen Typ II [7]. Aggrekan ist ein Proteoglykan (Abb. 2), welches aus



**Abb. 2:** Aggrekan, gebunden an Hyaluronan

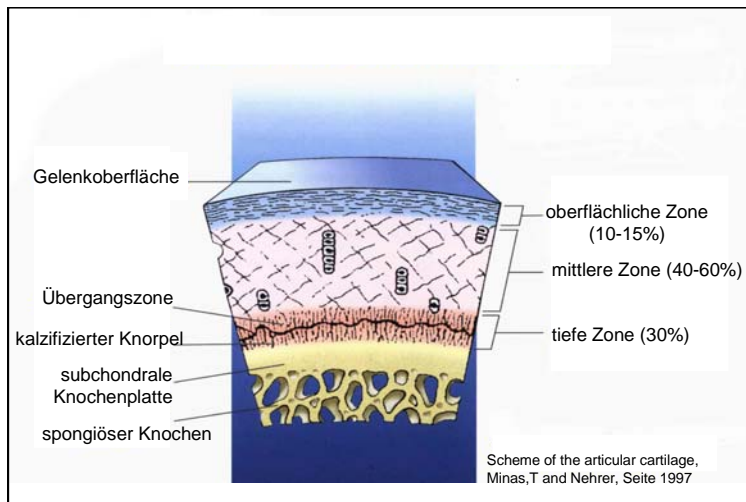
einem Kernprotein aufgebaut ist, an das lange Ketten aus Chondroitinsulfateinheiten und kürzere Ketten aus Keratansulfateinheiten gebunden sind [8]. Viele Aggrekane binden über

ein Linkprotein an ein „Rückgrat“ aus dem Glykosaminoglykan Hyaluronan, so dass man sich das entstehende Riesenmolekül wie eine Art Flaschenbürste vorstellen kann (Abb. 3). Das Hyaluronan hält durch diese Bindungen über das Linkprotein das Aggrekan im Knorpel. Es entstehen so riesige Moleküle von bis zu 100.000 Kilodalton [9]. Diese Aggregation



**Abb. 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Aggrekans

findet allerdings erst direkt in der Matrix statt. Das Hyaluronan selbst ist wiederum an der Zellmembran über den Oberflächenrezeptor CD44 verankert [10;11]. Über diesen Rezeptor kann Hyaluronan durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen werden. Eine hohe CD44 Expression findet man in Geweben mit hoher Proliferation, wofür ein hoher Hyaluronanumsatz notwendig ist. Interessanterweise nimmt in humanem und bovinem Knorpel mit dem Alter der Gehalt an Hyaluronan zu [12;13], es ist allerdings noch nicht sicher geklärt, ob diese Änderung auf eine gesteigerte Synthese oder auf einen verminderten Abbau in der Matrix zurückzuführen ist.



**Abb. 4:** Aufbau des Gelenkknorpels

Die Matrix des Knorpelgewebes besteht neben Kollagen und Proteoglykanen vor allem aus Wasser. Kollagen macht 50 % des Trockengewichts und sogar 90 % des Proteingehalts aus. In den oberen Knorpelschichten verlaufen die Kollagenfasern parallel zur Knorpeloberfläche um dann in den tieferen Schichten sich umzubiegen und senkrecht in den

subchondralen Knochen einstrahlen. Die Kollagenfasern weisen nur eine geringe Elastizität auf. Ihre Zugfestigkeit ist allerdings groß. So können Sehnen, die fast ausschließlich aus Kollagenfasern bestehen, eine Zugkraft von 500-1000 Kilogramm pro Quadratcentimeter ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ ) aushalten.

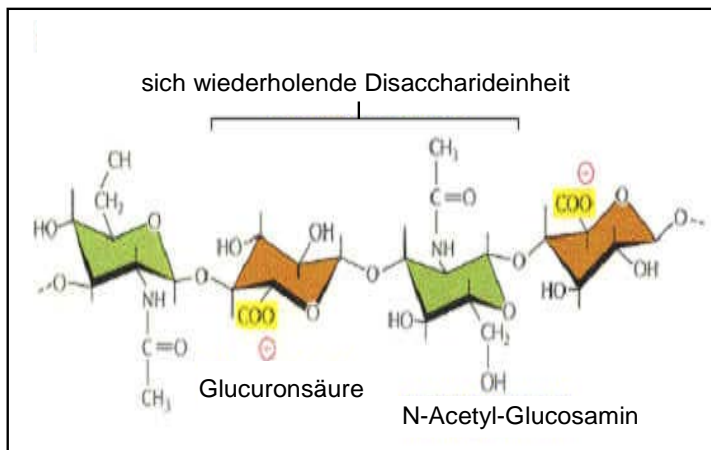
Das Proteoglykan Aggrecan besteht aus einem Proteinanteil mit angelagerten Glycosaminoglykanketten. Die Zucker des Aggrecans sind in hohem Maße sulfatiert. Dies führt zu einer enorm hohen negativen Ladungsdichte im Knorpel, die neben dem Wasseranteil auch die Elastizität bedingt, da nach einer Stauchung die negativen Ladungen wieder den größtmöglichen Abstand zueinander einnehmen. Durch ihre hohen Ladungsdichte verhindern die Proteoglykane auch die freie Diffusion von Molekülen durch den Knorpel [14;15].

Während in der Wachstumsphase die Chondrozyten noch in der Lage sind, sich zu teilen und Knorpelwunden zu heilen, haben adulte Knorpelzellen ihre mitotischen Fähigkeiten verloren und können Knorpeldefekte nicht mehr reparieren. Auch in der Ernährung des Knorpels besteht ein Unterschied zwischen Kindheit und Erwachsenenalter. In der Wachstumsphase wird der Knorpel sowohl über die Gelenkflüssigkeit (synovialer Trift) als auch über die subchondrealen Blutgefäße (subchondraler Trift) versorgt. Diese Versorgung wird aber durch die Kalzifizierung der Wachstumsfuge gekappt. Die Knorpelmatrix selbst ist avaskulär (Abb. 4)

## 1.4 Aufbau, Synthese und Abbau von Hyaluronan

Hyaluronan ist ein nicht-sulfatiertes Glycosaminoglykan, welches im Jahr 1934 erstmals von dem deutschen Chemiker Karl Meyer in den Glaskörpern von Rindern entdeckt wurde [16].

Es ist das einzige bekannte Glycosaminoglykan, welches sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten vorkommt.



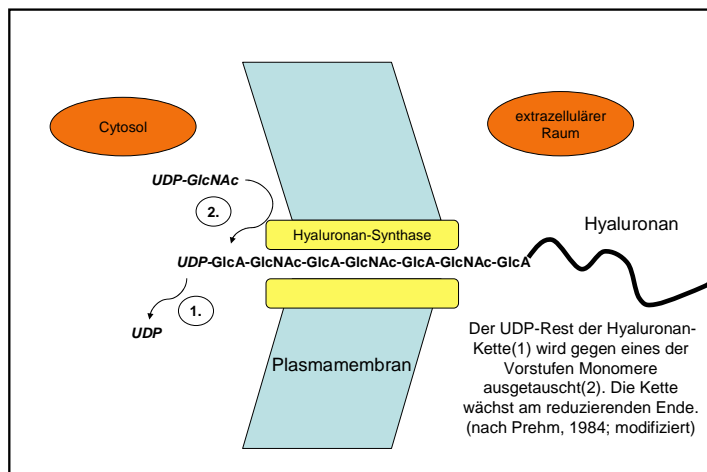
**Abb. 5:** Hyaluronanstruktur

Bei den Prokaryonten findet es sich allein bei den mucoiden Stämmen von Streptokokken der Gruppe A und C sowie bei pathogenen Pasteurella-Stämmen vom Serotyp A und B. Die Hyaluronanhülle der Bakterien schützt diese vor der Erkennung und anschließender Bekämpfung durch das Immunsystem.

Hyaluronan besteht aus unverzweigten 250 bis 25.000 Disaccharideinheiten, die  $\beta(1\rightarrow4)$ -glycosidisch miteinander verknüpft sind. Die Disaccharid-Grundeinheit besteht aus D-Glucuronsäure und N-Acetylglucosamin (Abb. 5), welche  $\beta(1\rightarrow3)$ -glycosidisch miteinander verknüpft sind. Durch die Aneinanderkettung von bis zu 25.000 dieser Einheiten können Molmassen von mehreren Millionen Dalton erreicht werden. Untersuchungen von Scott zeigten 1989, dass Hyaluronanketten durch intramolekulare Wechselwirkungen entlang der Kettenachse eine stabförmige, doppelhelikale Struktur ausbilden, welche das Polymer in wässrigen Lösungen als unregelmässiges Knäuel vorliegen lässt [17]. Diese Sekundärstruktur führt dazu, dass innerhalb des Moleküls hydrophobe Bereiche auftreten, die für die intermolekulare Aggregation unter Bildung eines Hyaluronan-Netzes verantwortlich sind. Dabei ist die Netzstruktur aber offen genug, um die Diffusion kleinerer Moleküle zu ermöglichen. Damit spielt Hyaluronan zusammen mit anderen Polysacchariden eine wichtige regulatorische Rolle bei der Verteilung und dem Transport von Plasmaproteinen im Gewebe. Bei physiologischem pH-Wert liegt Hyaluronan polyanionisch vor, so dass aufgrund der hohen negativen Ladungsdichte eine enorme Quellfähigkeit besteht. Dies führt zu einer mehr

als tausendfachen Volumenvergrößerung (ein Gramm Hyaluronan kann bis zu sechs Liter Wasser binden) mit Moleküldurchmessern von bis zu 500 nm [18;19].

Die Biosynthese von Hyaluronan findet nicht wie die der Proteoglykane im endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat, sondern an der Innenseite der Zellmembran statt (Abb. 6). Auch wird für die Synthese kein Protein als „Startmolekül“ benötigt, die Anwesenheit der beiden Nucleotidzucker UDP-Glucuronsäure und UDP-N-Acetylglucosamin



**Abb. 6:** Modell der Hyaluronanausschleusung

genügen zur Entstehung eines Kettenstarts. Markovitz und Hoffmann [20] konnten dies 1962 an Streptokokken-Membranen, Prehm 1984 an intakten eukaryontischen Zellen zeigen. Die naszierenden Hyaluronan-Ketten konnten durch eine Hyaluronidase Behandlung abgebaut werden.

Prehm [21;22] konnte an differenzierten Teratokarzinomzellen

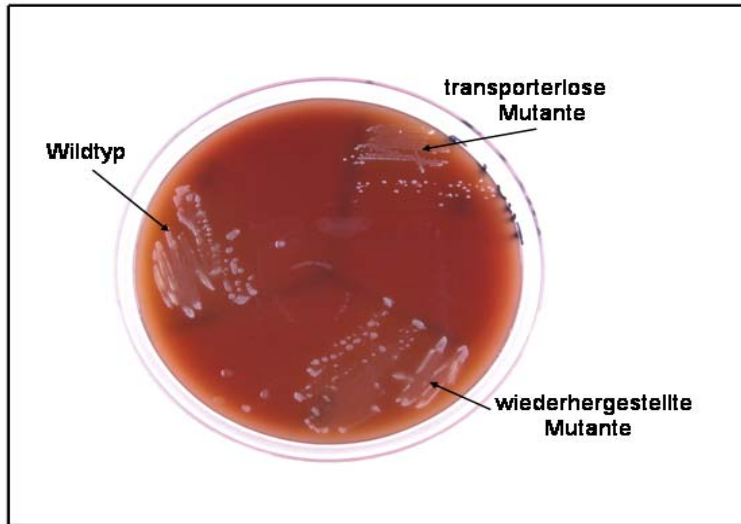
zeigen, dass die Hyaluronan-Ketten durch alternatierenden Transfer der Vorstufenzucker UDP-GlcA und UDP-GlcNAc auf UDP-Hyaluronan synthetisiert werden. Dabei wächst die Kette am reduzierenden Ende, wobei der UDP-Rest des Hyaluronans gegen eines der Monomere ausgetauscht wird. Versuche mit einem von Prehm [23] entwickelten Syntheseinhibitor bestätigten den postulierten Mechanismus.

Die Hyaluronansynthase kann in Digitonin solubilisiert werden [24] und in der aktiven Form als ein 42 kDa Protein aufgereinigt werden. Drei Gene des Has Operons kodieren Enzyme, die in der Hyaluronansynthese eine Rolle spielen: Das Gen Has A ist notwendig für die enzymatische Aktivität, Has B exprimiert die UDP-Glucose-Dehydrogenase, welche aus UDP-Glucose UDP-Glucuronsäure synthetisiert. Das Has C Gen kodiert für eine UDP-Glucose Phosphorylase, die aber nicht zwangsläufig benötigt wird [25]. Gleichzeitig gibt es auch drei Hyaluronansynthasen, Has1, -2 und -3. Während Has1 und -2 hochmolekulare Hyaluronanketten bis zu 2000 kDa synthetisieren, produziert Has3 Ketten unter 300 kDa Gesamtgröße [26]. Die unterschiedlichen Molekulargewichte der Hyaluronanketten führen zu verschiedenen Reaktionen der Zellen. Da die katalytisch aktiven Regionen auf der Cytoplasmaseite zu finden sind [27], ist es unklar, wie das Hyaluronan von der Synthase transportiert werden soll. So wurde in Bezug auf die Aktivität der Hyaluronansynthase



Escherichia coli mit dem Synthese Gen transfiziert, eine Hyaluronanproduktion von intakten Zellen konnte allerdings nicht gezeigt werden [28].

Entgegen der bisherigen Meinung, dass das an der Hyaluronansynthese entstandene



**Abb. 7:** Hyaluronan-Produktion von Transporter Mutante

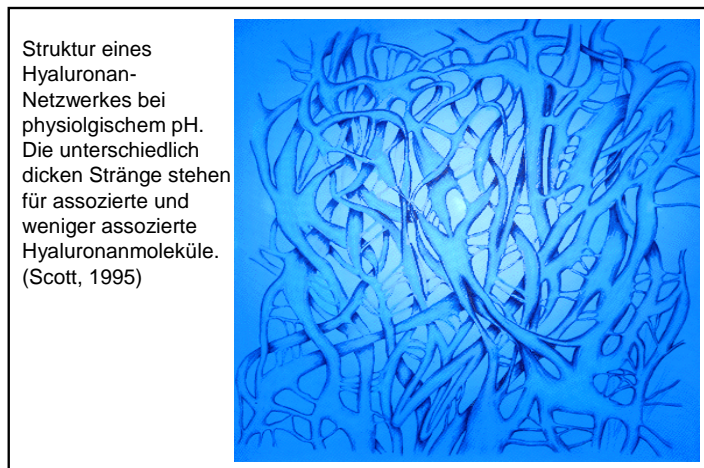
Hyaluronan durch die Synthese selbst in das extrazelluläre Kompartiment transportiert wird, konnten Arbeiten von Ouskova und Prehm 2004 aufzeigen, dass an dem Export auch ein Transporter beteiligt sein muss [29]. Hierbei wurden bei mucuiden Streptokokken, die Hyaluronan in der Protoplastenmembran bilden, Insertionsmutanten geschaffen, die kein

Hyaluronan mehr bilden konnten. Bei anschließender Sequenzierung der Nucleotidsequenz, in der die Insertion lag, stellte sich bei einigen Mutanten heraus, dass der Genabschnitt für ein Protein mit einer ATP-binding cassette (ABC) kodierte. Wurde die Mutante mit DNA, welche das ABC-Transportersystem kodierte, komplementiert, entstand wiederum der mucoide Phänotyp (Abb. 7).

Dem Abbau von Hyaluronan kommt mindestens eine ebenso wichtige Rolle zu wie dem Aufbau. Die Halbwertszeit von Hyaluronan unterscheidet sich stark in den unterschiedlichen Geweben, von 6 Stunden im Knorpel über einem Tag in der Epidermis [30] bis zu 70 Tagen im Glaskörper des Auges [31]. Der Hyaluronan Umsatz innerhalb eines Gewebes ist abhängig von der lokalen Degradierungsrate oder der Freisetzung aus dem Gewebe ins vaskuläre/lymphatische System. Ins lymphatische System gelangt das Hyaluronan via zweier Rezeptoren, zum einen dem Hyaluronan Rezeptor für Endocytose (HARE) [32] sowie LYVE (lymphatic vessel endothelial HA Receptor) [33]. Der Hauptabbau des im Blut- oder Lymphgefäßsystem zirkulierenden Hyaluronans findet recht zügig in der Leber statt. Die Halbwertszeit von injiziertem Hyaluronan beträgt z.B. nur 10 Minuten beim Menschen. In der Knorpelmatrix findet der Abbau durch Aufnahme durch den CD44 Rezeptor [34] und anschließende Degradierung in den Lysosomen zu kleinen Fragmenten statt. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch die im Gewebe vorkommende Hyaluronidase sowie freie chemische Radikale Hyaluronan abbauen können.

## 1.5 Biologische Funktionen von Hyaluronan

Hyaluronan spielt in einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle, so z.B. bei der Organisation des Bindegewebes, der Embryonalentwicklung, der Zellmigration und Zellproliferation sowie der Wundheilung. Dabei ist die biologische Funktion des Polymers



**Abb. 8:** Netzwerk-Struktur von Hyaluronan

eng mit seinen besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie der Möglichkeit verknüpft, das Verhalten verschiedener Zellen über deren Rezeptoren zu beeinflussen [35].

Im embryonalen Gewebe stellt Hyaluronan die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix dar. Es konnte gezeigt werden, dass mesodermale Zellen des

Hühnerembryos während erster starker Proliferationsphasen eine Hyaluronidase sensitive Hülle ausbilden. In späteren Differenzierungsstadien wird dann das Hyaluronan durch CD44 vermittelte Endocytose aufgenommen und intrazellulär degradiert [36]. Eine erhöhte Synthese des Glycosaminoglycans wird auch während der Mitose von Fibroblasten sowie der Differenzierung von Teratokarzinomzellen gefunden [37;38]. Allgemein ist die Zellproliferation vom Zelltyp wie auch vom Molekulargewicht des synthetisierten Hyaluronans abhängig. Verschiedene Autoren wiesen nach, dass hohe Molekulargewichte des Polymers die Proliferation verschiedener Zellen in Kultur inhibierten, während niedrige Molekulargewichte diese stimulierten [39]. Insbesondere in der Embryonalentwicklung spielt die Zellbewegung eine große Rolle. Eine erhöhte Hyaluronankonzentration ist vor allem in Kompartimenten mit verstärkter Zellmigration zu finden [19]. Auch besitzen viele Tumore durch gesteigerte Hyaluronansynthese eine größere Invasivität [40]. Andere Tumore besitzen die Möglichkeit, in untransformierte Zellen eine erhöhte Hyaluronanproduktion zu stimulieren [41]. Es scheint also eine Verbindung zwischen Zellaggregation bzw. Kontaktinhibition sowie Molekulargewicht und Konzentration von Hyaluronan zu bestehen [42;43]. In diesem Zusammenhang spielt RHAMM (receptor for HA-mediated motility) eine wichtige Rolle.

Aufgrund der besonderen rheologischen Eigenschaften ist Hyaluronan in der Knorpelmatrix und insbesondere in der Synovialflüssigkeit (1,4 – 4 mg/ml) [44] von Knochengelenken eine von entscheidender Bedeutung. Es dient in der Synovialflüssigkeit zugleich als Stoßdämpfer und Schmiermittel. Bei Erschütterung dämpft es diese und verhindert/vermindert den Aufprall der Gelenkflächen. In diesem Zusammenhang ist auch die Thixotropie des Hyaluronans von Bedeutung. Ähnlich wie Ketchup verleiht es der Synovialflüssigkeit im unbewegten Zustand eine gewisse gelartige Festigkeit, wird das Gelenk, z.B. beim Laufen dann allerdings bewegt, erniedrigt sich die Viskosität und die „schmierenden“ Eigenschaften des Hyaluronans kommen zum Einsatz. In der Matrix sind die kontrollierte Synthese und der kontrollierte Abbau wichtig für die gesunde Zusammensetzung des Knorpels.

Hyaluronan ist ebenso ein wichtiger Bestandteil der Haut [45]. Die absolute Menge an Hyaluronan in der Haut soll 15 g betragen [46]. Man findet es sowohl in der Dermis (~ 0,5 mg/g Gewebe) als auch in der Epidermis (~ 0,1 mg/g Gewebe). Auch dort entfaltet es seine Eigenschaften als wasserbindendes Glycosaminoglykan. Die Matrix direkt um die Keratinozyten in der Epidermis hat eine genauso hohe Hyaluronankonzentration wie die Nabelschnur (4 mg/g Gewebe).

Hyaluronan kann im Körper vielfältige Aufgaben übernehmen. So vermittelt es über RHAMM und CD44 Signalwege, die für Zellbewegung und -proliferation, die Morphogenese, Regeneration, die Wundheilung und Tumorwachstum verantwortlich sind. [47-52]. In physiologischer Lösung kann Hyaluronan als osmotischer Puffer, Platzfüller, Schmiermittel, Wassergehaltsregulator und molekulares Sieb dienen. Kleine Moleküle wie Elektrolyte, Wasser etc können frei durch das Gelnetzwerk diffundieren, während größere Moleküle nicht permeieren können.

Bei den Bakterien beschränkt sich die biologische Funktion in erster Linie auf die Hyaluronanhülle. Beim Menschen sind vor allem mucoide Stämme der Serogruppe A von *Streptococcus pyogenes* für eine Vielzahl von Krankheitsbildern verantwortlich. Darunter sind z.B. Rachen- und Mandelentzündungen, Scharlach, Wundrosen und toxische Schockzustände [53]. Neben dem M-Protein ist die Hyaluronankapsel ein wichtiger Virulenzfaktor pathogener Streptokokken [54]. Sie ist nicht immunogen, da bakterielles Hyaluronan vom Hyaluronan des Bindegewebes nicht unterscheidbar ist. Außerdem schützt die Kapsel die Streptokokken durch eine hohe negative Ladungsdichte vor der Phagozytose durch Zellen des Immunsystems. Wessels [55] fand bei unbekapselten Mutanten eine 100-fach erniedrigte Virulenz im Gegensatz zum bekapselten Wildtyp. Eine weitere wichtige Funktion scheint die Hyaluronan-Hülle bei der Besiedlung stark aerober Bereiche, wie z.B.

des Nasen-Rachen Raumes zu spielen. Streptokokken sind zwar aerotolerant, zeigen aber unter anaeroben Bedingungen ein effizienteres Wachstum. Vermutlich schützt die Hyaluronan-Kapsel durch eine verminderte Sauerstoffdiffusion die Zellen vor zu hohen O<sub>2</sub>-Partialdrücken, so dass dadurch eine effektivere Besiedlung aerober Bereiche ermöglicht wird [56].

## 1.6 Praktische Bedeutung von Hyaluronan

Aufgrund seiner besonderen viskoelastischen und rheologischen Eigenschaften ist Hyaluronan ein wertvoller Naturstoff, der ein breites Anwendungsspektrum in biomedizinischen und industriellen Bereichen findet. So wird es in der Kosmetikbranche in Cremes eingesetzt, wobei man die wasserbindenden Eigenschaften des Hyaluronans ausnutzen möchte. Mit zunehmenden Alter kann die Haut durch Verlust bzw. Degradierung des hochmolekularen Hyaluronans in kleinere Fragmente nicht mehr so viel Wasser speichern wie in jungen Jahren. Eine lokale Therapie mit Hyaluronan macht hier Sinn. Es gibt sogar Therapien, in denen niedrigmolekulare Hyaluronanstücke (durch UV-Licht gespalten) auf die Haut gegeben und einmassiert werden, um anschließend durch Bestrahlung mit infrarotem Licht zu Polymerisierung angeregt werden. In anderen Anti-Aging Ratgebern heißt es, man solle Hyaluronan oral zu sich nehmen. Da das Glycosaminoglycan im Magen/Darmtrakt allerdings abgebaut wird, erscheint diese Maßnahme wenig erfolgsversprechend im Hinblick auf eine faltenfreie Haut. Als subkutane Injektion können Falten mit Hyaluronan unterspritzt werden und so zu verminderter Faltentiefe führen.

Intraartikuläre Injektionen von Hyaluronan sind eine Behandlungsmöglichkeit für Arthrose. Der Hyaluronangehalt in der Synovialflüssigkeit sinkt bei Arthrose und zugleich verringert sich das Molekulargewicht von 4-5 Tausend Kilodalton auf 500 Kilodalton infolge der Infiltration von proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, freier Radikale und Proteinase. Durch die verminderte Hyaluronan Konzentration und/oder ein verändertes Molekulargewicht ist die Viskosität der Synovialflüssigkeit zu niedrig und es kommt zu einer Fehlfunktion des betroffenen Gelenkes. Die Viskosität soll mithilfe von Hyaluronaninjektionen wieder erhöht werden. Dieses Verfahren wird unter anderem in den U.S.A, Kanada, Japan und großen Teilen der EU angewandt. Allerdings gibt es größere Unterschiede in der Molekülgröße des Hyaluronans, welches injiziert wird. So beträgt z.B. das Molekulargewicht des Präparats Hyalgan® (Fidia, Italien) 500-730 Kilodalton, während Orthovisc® (Anika, USA) eine

Molekülgröße von 1000 – 2900 Kilodalton besitzt. Die therapeutischen Effekte von Hyaluronan Injektionen auf arthrotische Gelenke sind intensiv in vitro, in vivo und klinisch untersucht worden [57-65]. Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass Hyaluronan den Schmerz der Patienten vermindern konnte und die Funktion des jeweiligen Gelenkes verbesserte. Der analgetische Effekt der Injektionen war äquivalent oder stärker als nach Glucocortikoidgabe [66] oder nichtsteroidalen antiinflammatorischen Arzneimitteln (NSAIDs) [57]. Andere Veröffentlichungen besagen hingegen, dass es keinen Unterschied zwischen Hyaluronan und Plazebo-Gabe gibt. Der Effekt nach Hyaluronan Injektionen für einige Wochen hielt bis zu zwei Monate an, was nicht mit der kurzen Halbwertszeit von Hyaluronan in der Synovialmembran von einem Tag – bei arthrotischen Gelenken sogar noch kürzer – vereinbar zu sein scheint [67]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass auch neben den rein physikochemischen Effekten des Hyaluronans auch pharmakologische Effekte zum Teil eine Rolle spielen. Hier kommen vielleicht die immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Aspekte des Hyaluronans, welche Abhängig vom Molekulargewicht sind, zum tragen [68].

Zum Benetzen und Feuchthalten des Auges gibt es auf dem deutschen Markt das Präparat Hylumed®, welches Hyaluronan in einer Konzentration von 0,1% beinhaltet. Des weiteren wird Hyaluronan auch bei Augenoperationen angewendet, um die Einsetzung künstlicher Linsen zu ermöglichen. Hyaluronan kann am Auge nicht nur allein, sondern auch in Kombination mit anderen Stoffen verabreicht werden. Generell haben topisch angewandte am Arzneimittel am Auge eine niedrige Bioverfügbarkeit in Folge der precornealen Clearance, welche zu einer raschen Drainage der Stoffe führt [69]. Die Arzneistoffe können nach Abtransport vom Auge systemische Nebenwirkungen erzeugen, welche insbesondere bei  $\beta$ -Sympathomimetika wie Timolol gefährlich werden können. Eine Möglichkeit, die lokale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen am Auge zu erhöhen und systemische Nebenwirkungen zu vermindern ist die Erhöhung der Viskosität der Formulierung mit Hyaluronan. So wurde bereits gezeigt, dass für Stoffe wie Pilocarpin und Timolol [70], Tropicamid [71] und Gentamycin [72] eine verlängerte Verweildauer auf der Cornea/erhöhte Bioverfügbarkeit erreicht werden konnte.

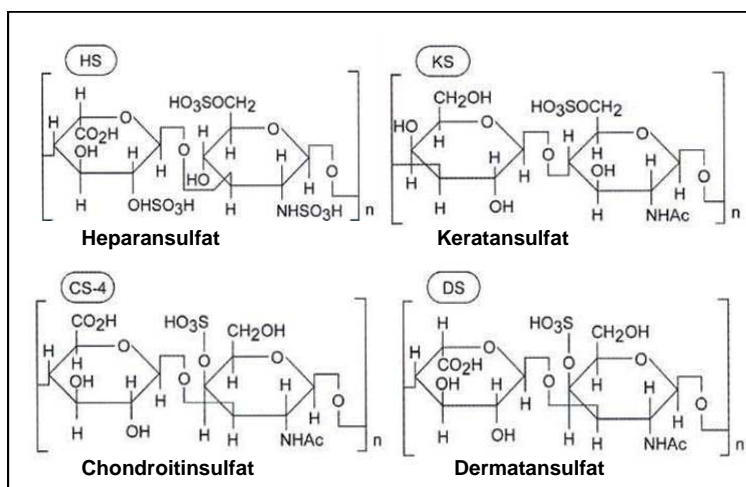
In der Nase hat sich auch die Anwendung von Hyaluronan zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von kleinen Arzneistoffen und Peptiden durchgesetzt. Dies soll eine Folge der guten Bioadhäsion und Penetrationssteigerung von Hyaluronan sein [73]. So wurde z.B. gezeigt, dass die Bioverfügbarkeit von nasal verabreichten Vasopressin verdoppelt werden konnte in Anwesenheit von Hyaluronan. Diese Effekte traten bei Verwendung von hochmolekularem Hyaluronan auf (über 300 Kilodalton), mit niedrigmolekularem Hyaluronan konnte kein

Effekt beobachtet werden. In der Tat scheint die Hyaluronan vermittelte Penetrationssteigerung der Hauptgrund für die verstärkte Aufnahme zu sein, da die Zilienschlagfrequenz in der Nasenmucosa nicht vermindert ist.

Durch obige Ergebnisse an Auge und Nase ermutigt, wurden auch Tests mit verdünnten Hyaluronanlösungen (0,1-0,2 %) und Insulin zur Inhalation gemacht. Dabei konnte eine verstärkte Aufnahme bei mit Hyaluronan versetzten Insulinlösungen versus Insulinlösungen ohne Hyaluronan beobachtet werden.

Hyaluronan wurde desweiteren in Systemen zur verzögerten Freisetzung von Proteinen nach Implantation getestet. Abhängig von Größe und Konzentration konnte gezeigt werden, dass Liberationskinetiken nullter Ordnung erreicht werden konnten [74]. In jüngerer Zeit wird es auch gern als Gel zur Wundversorgung benutzt. Die Wundheilung wird durch Hyaluronan durch den positiven Einfluss auf das Wachstum von Epithelzellen im Corneum beschleunigt.

## 1.7 Proteoglykane



**Abb. 9:** Die sulfatierten Glycosaminoglykane des Knorpels

Die Glycosaminoglykane sind mit Ausnahme des Hyaluronans alle mehr oder weniger stark sulfatiert. Aufgrund dieser Sulfatgruppen besitzen sie eine höhere Anzahl negativer Ladungen pro Disaccharideinheit im Vergleich zum Hyaluronan. Ein weiterer Unterschied zum Hyaluronan ist ihre Bindung an Core-Proteine (Proteoglykane). In Abbildung 9

sind die Strukturen der sulfatierten Glycosaminoglykane aufgeführt. Im Knorpel kommen in größeren Mengen das Chondroitinsulfat, welches am C4 und an der C6 Position sulfatiert sein kann, sowie das Keratansulfat, vor. Das Chondroitinsulfat kann mit 25 - 40 Disaccharideinheiten deutlich längere Ketten bilden als das Keratansulfat (vergleiche Abbildung 2). Nach der Ausschleusung durch die Knorpelzellen bilden das Aggrekan und das Hyaluronan in der Matrix Aggregate aus hunderten von Aggrekanen, die wie die Borsten einer Flaschenbürste über das Link-Protein an das Hyaluronan gebunden sind. Durch ihre Wasserbindung sind

diese Aggregate für den enormen hydrodynamischen Druck verantwortlich, dem durch das zugfeste Kollagennetzwerk entgegengewirkt wird. Dieses Netzwerk steht allerdings unter ständiger Beanspruchung, jeder Defekt oder Schwächung des Knorpelzellverbundes kann zu einem zusätzlichen Einstrom von Wasser führen. Der normale Wasseranteil im Knorpel beträgt 70 %. Dieses steht in einem ständigen Austausch mit der Gelenkflüssigkeit. Die Synovialflüssigkeit besteht aus einem Ultrafiltrat des Serums und den Produkten der Synovialzellen, welche unter anderem Proteinasen, Kollagenasen, Hyaluronan und Prostaglandine bilden.

Früher wurde die Funktion der Proteoglykane vor allem mit ihrer großen Wasserbindungskapazität in Zusammenhang gebracht. Durch die hohe negative Ladungsdichte ziehen sie insbesondere  $\text{Na}^+$ -Ionen an und führen bedingt durch eine starke Hydratisierung zu einem hohen Turgor im Knorpelgewebe. Die innermolekularen Abstoßungskräfte führen zu einer Immobilisation der Polysaccharidketten und zu einer partiellen Immobilisation des eingeschlossenen Wassers. Das dreidimensionale Netzwerk der Hyaluronan-Aggregatkomplexe wirkt wie ein Filter, durch den kleine Moleküle wie Glucose und Aminosäuren ungehindert passieren können, Makromoleküle in ihrer Diffusion dagegen behindert oder im Extremfall sogar ganz ausgeschlossen werden. Durch Zerstörung dieser Struktur kommt es zum Verlust der „Sieb“-Funktion. Das eingeschlossene Wasser dieser Aggregate wirkt zudem schockabsorbierend und schützt das jeweilige Gelenk vor harten Stößen. In den letzten Jahren drängt eine weitere Funktion der Proteoglykane immer weiter in den Fokus der Wissenschaft. John Scott von der Universität Manchester gelang es 1988 mittels Elektronenmikroskopie die Querstreifung von Kollagenfibrillen unter dem Mikroskop zu analysieren. Er konnte bestimmten Banden jeweils eine gewisse Bindungspräferenz einzelner Proteoglykane zuordnen. Diese Bindungen kommen über die nach außen stehenden Hydroxylgruppen von Hydroxyprolin und Hydroxylysin der Kollagentripelhelix zustande. Die Proteoglykanverbindungen sind nach Scott bivalent und verbinden je zwei Kollagenfibrillen miteinander. In der extrazellulären Matrix gibt es viele verschiedene Brücken, Bindungen, Assoziationen und auch Abstoßungskräfte der Makromoleküle untereinander, die bis dato noch nicht in allen Einzelheiten erfasst sind. Sie tragen jedoch entscheidend zur Erhaltung der Integrität der Knorpelmatrix bei. Sinkt der Proteoglykangehalt im Knorpel ab, führt dies auch zu einem Abbau des Kollagennetzwerkes [75].

## 1.8 Kollagenabbau und Matrixmetalloproteasen

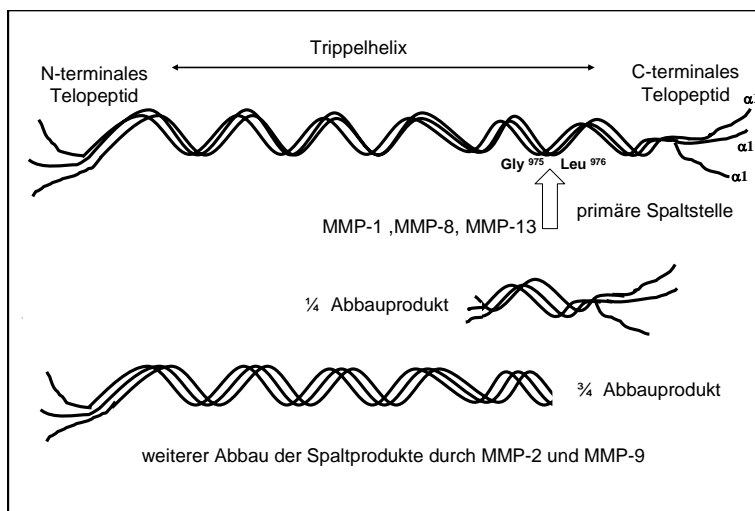
Die Kollagene stellen quantitativ die bedeutendsten Proteine des Organismus dar und sind die strukturgebenden Proteine von Haut, Sehnen, Bändern, Knorpel, Knochen und Basalmembranen. Es ist eine Vielzahl von verschiedenen Kollagentypen bekannt. Ihnen allen ist gemein, dass sie aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind, die identisch oder verschieden sein können. Die drei linksgängigen helikalen Stränge organisieren sich in manchen Abschnitten zu einer rechtsgängigen Superhelix. Diese Konformation ist durch sich wiederholende Triplet-Sequenzen aus Glycin-X-Y bedingt, denn jeder dritte Rest eines Strangs führt direkt durch das Zentrum, wo nur die kleinste Aminosäure Platz findet. In der X und Y Position findet man besonders häufig Prolin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin. Dies spielt in unseren Ergebnissen eine Rolle, weil wir zur Analyse des Kollagengehaltes die seltene Aminosäure Hydroxyprolin gemessen haben, die fast ausschließlich nur im Kollagen in nennenswerten Mengen auftritt. Im Knorpel kommen die Kollagene vom Typ II, Typ IX und XI vor und bilden gemeinsame Strukturen aus. Dabei bildet ein dünner Strang aus Kollagen XI das Zentrum der im Knorpel vorkommenden Kollagenfibrillen, um die sich eine dickere Schicht aus Kollagen Typ II Fasern legt. An, beziehungsweise in die äußere Schicht dieses Gebildes sind Fragmente des Kollagen IX assoziiert. Sie treten vermutlich in Wechselwirkung mit anderen Knorpelmolekülen, wie zum Beispiel dem Matrilin [76]. Knorpelzellen sind auch in der Lage, Kollagen X zu bilden, welches ein kurzkettiges Kollagen darstellt. Dieses Kollagen wird in vivo allerdings nur in der Wachstumsphase von hypertrophierenden Knorpelzellen gebildet, die später die Knochensubstanz bilden oder sich zu Osteoblasten umwandeln [77]. In der normalen Organisation der Matrix spielt Kollagen X aber keine Rolle.

Die Matrixmetalloproteasen gehören einem umfassenden proteolytischen System an, das seit seiner Entdeckung in den 1960er Jahren in der Kaulquappe intensiv untersucht wurde. Das System besteht aus einem aktivierenden Schenkel, den MMPs, und einem inhibierenden Schenkel, den TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) [78]. Zur Zeit sind 22 humane MMPs und 4 TIMPs beschrieben. Im Falle der MMPs gibt es eine numerische Nomenklatur sowie gebräuchliche Synonyme, die benutzt werden (MMP-1 – Kollagenase 1, MMP-2 – Gelatinase A, MMP-3 – Stromelysin-1, etc.).

Die MMP-Gene sind induzierbar durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Phorbol ester, Stress und onkogene Transformation. TGF- $\beta$  und Glucocorticoide besitzen eine supprimierende Wirkung. Insgesamt sind die komplexen Interaktionen verschiedener Faktoren noch nicht



vollständig geklärt und sollen hier auch nicht weiter behandelt werden. Die MMPs werden als pro-MMPs, also Zymogene, in den Extrazellularraum sezerniert und dann durch bereits aktivierte MMPs oder diverse Serinproteasen aktiviert. MMPs sind in der Lage, eine Vielzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix zu verdauen [79]. Dies ist zum Beispiel bei der Wundheilung [80], aber auch beim invasiven Wachstum von Tumoren von Bedeutung. In vielen malignen Geweben ist eine Überexpression von MMP's nachgewiesen, sie gelten als Schlüsselfaktoren für Invasion, Metastasierung und Angiogenese. Weiterhin spielen die MMPs eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Differenzierung von Geweben und allgemein der Zellmigration [81].



**Abb. 10:** Abbau der Kollagentripelhelices durch MMPs

Im Speziellen haben wir uns auf die Matrixmetalloproteasen 2 und 9 konzentriert, da bekannt ist, dass diese beiden Proteasen Schlüsselenzyme bei degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen sind [82;83]. Die beiden Enzyme besitzen eine große Substratspezifität bezüglich denaturierter Kollagene und anderer Matrixproteine [84].

Verschiedene Matrixmetalloproteasen sind in gesundem Knorpel anders exprimiert als in krankem Knorpel [85]. So konnten in der Synovialflüssigkeit von Rheumapatienten [86] und von Patienten mit Arthrose [87] erhöhte MMP-2 und MMP-9 Level nachgewiesen werden. MMP-2 und MMP-9 werden auch als Gelatinase A und B bezeichnet. Man kann sie mithilfe einer Gelatin-Zymographie nachweisen, da die beiden Proteasen in Acrylamidgel eingebettete Gelatine verdauen können und nach einer Coomassie-Färbung die entsprechenden Bereiche dann nicht gefärbt hervortreten. Im Knorpel können MMP-2 und -9 Kollagenfibrillen, die durch die Kollagenasen (MMP-1,8 und 13) in sogenannte  $\frac{1}{4}$  -  $\frac{3}{4}$  Fragmente zwischen Gly<sup>975</sup> und Leu<sup>976</sup> der  $\alpha 1$ (II) Kette gespalten worden sind [88], weiterverdauen (Abb.10). Ihnen kommt also eine entscheidende Rolle beim Knorpelabbau zu. Die so genannten Kollagenasen MMP-1, MMP-8 und MMP-13 werden alle direkt im Knorpel von Chondrozyten gebildet [89-91]. IL-1 $\alpha$  als ein proinflammatorisches Zytokin ist in der Lage, die Synthese der Matrixmetalloproteasen zu erhöhen [92] und spielt damit bei der Auslösung und Unterhaltung der rheumatoiden Arthritis sowie der Arthrose eine Rolle durch die Induzierung des Kollagen

II Abbaus. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Knorpelabbau scheint nicht die Spaltung der intakten Helices und deren weiterer Abbau zu sein, sondern der beschleunigte Abbau der  $\frac{1}{4}$  und  $\frac{3}{4}$  Bruchstücke durch MMP-2 und MMP-9 [93].

Nach der Entdeckung der Kollagenase 1 im Jahr 1962 durch Gross und Lapierre [94] wurde schnell die mögliche pharmakologische Wirkung von MMP-Inhibitoren erkannt. Neben dem potenziellen Einsatz als (lebenslanges!) Arthrosemittel erschien auch eine Therapie der rheumatoiden Arthritis, Osteoporose und von invasiven Krebstumoren vielversprechend. Bereits 1969 gab es mehrere sehr potente Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen. Nahezu alle forschenden Pharmaunternehmen starteten in dieser Hinsicht Programme, in den darauf folgenden 30 Jahren wurden hunderte von MMP-Inhibitoren entwickelt und in der Literatur beschrieben [95]. Von der ersten Generation dieser Inhibitoren mit geringer Bioverfügbarkeit wurden bis heute Inhibitoren mit großem Wirkspektrum auf mehrere Metalloproteasen, hoch spezifischen Hemmstoffen für nur eine Protease, gut verfügbaren und metabolisch stabilen Inhibitoren kreiert. Mehrere Strategien zur Hemmung können dabei verfolgt werden: Die Verminderung der Expression, eine gehemmte Aktivierung durch andere Proteasen, die Inhibierung des Enzyms oder eine Erhöhung der TIMP Aktivität.

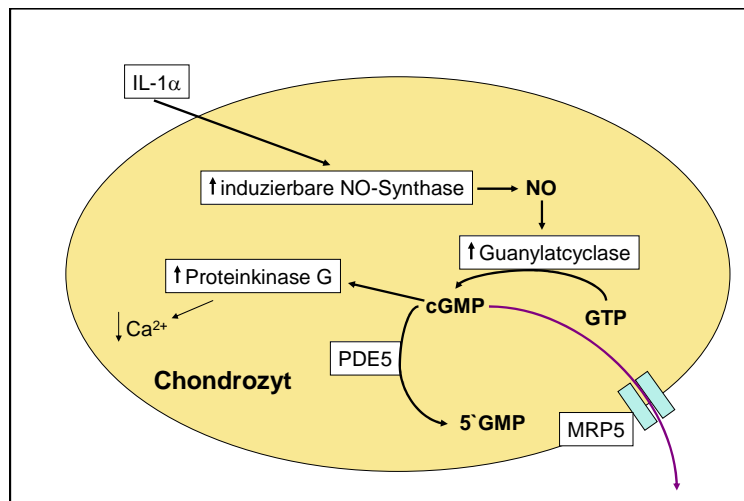
Nur sind bis heute bis auf eine Ausnahme keine von diesen Substanzen auf den Markt gekommen. Die Substanzen zeigten *in vitro* zwar eine Verminderung der Metalloproteasenaktivität, teilweise im nano- und sogar picomolaren Bereich, doch konnten diese Ergebnisse *in vivo* nicht wiederholt werden. Mittlerweile forschen nur noch vereinzelt Pharmafirmen an der Entwicklung von Proteaseinhibitoren. Das Gros der Programme ist eingemottet und für gescheitert erklärt. Andere Ansätze zur Entwicklung eines Medikaments zur Behandlung der Arthrose sind im Moment nicht zu erkennen.

## 1.9 Induzierung einer Arthrose mit IL-1

Wie bereits beschrieben, werden erhöhte IL-1 Spiegel in arthrotischen Gelenken gefunden. In noch deutlich höheren Konzentrationen liegt es in Gelenken vor, welche von rheumatischen Erkrankungen betroffen sind. Dies ist auch nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass Interleukin-1 ein Entzündungsmediator ist und rheumatische Arthritis mit einer Entzündung des Gelenkes einhergeht. Sehr gut untersucht ist der Effekt von IL-1 auf den Knorpel. So wird die Proteoglykansynthese herunterreguliert und in höheren Konzentrationen beginnt ein Abbau der Proteoglykane im Knorpel [96;97]. Interleukin-1 $\beta$  wird durch enzymatische

Prozessierung durch Caspase-1 aus einem IL-1 Vorläuferprotein gewonnen. Durch die enzymatische Prozessierung des gleichen Vorläuferproteins durch Calpain wird IL-1 $\alpha$  gebildet. Somit entstehen IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$  aus einem Vorläuferprotein. Beide Produkte binden an den gleichen Rezeptor. IL-1 wird von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Endothelzellen und anderen Zelltypen produziert. Eine solche Hochregulierung des Knorpelabbaus durch IL-1 ähnelt stark dem Knorpelabbau wie er bei Arthrose und rheumatoider Arthritis vorkommt [98]. Der Inhibierung der Proteoglykansynthese steht eine gesteigerte Hyaluronansynthese entgegen [99;100]. Diese ist zum einen auf eine gesteigerte HAS2 Expression zurückzuführen. Da HAS2 von den drei Synthesen ohnehin schon für die Synthese des Hyaluronans am dominantesten ist, ist der Effekt bei einer verstärkten Expression dementsprechend ausgeprägt [101]. Weiterhin wurde auch eine verstärkte CD44 Expression beobachtet in arthrotischem Knorpel beobachtet, was auf einen gesteigerten Umsatz des Hyaluronans im Knorpel hindeutet [102]. Aufgrund dieser Tatsachen erschien das Zytokin Interleukin-1 $\alpha$  geeignet, um bei bovinen Knorpelstücken in vitro Arthrose auszulösen [103-105].

### 1.10 Interleukin-1 $\alpha$ und die cGMP-Signalkaskade



**Abb. 11:** Signalweg von IL-1 $\alpha$ , cGMP betreffend

Da die in den Versuchen eingesetzten Inhibitoren darauf untersucht wurden, inwieweit sie mit der cGMP-Signalkaskade interagieren, soll an dieser Stelle kurz darauf eingegangen werden. IL-1 $\alpha$  erhöht die Expression der induzierbaren NO-Synthase (i-NOS) und fördert so die NO Produktion in der Zelle (Abb. 11).

NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclase, welche dann vermehrt cGMP aus GTP bildet. Zum einen werden durch cGMP Proteinkinasen aktiviert, daneben cGMP abhängig Ionenkanäle geöffnet und die Aktivität der PDE5 (Phosphodiesterase5) reguliert. Der intrazelluläre cGMP Spiegel wird reguliert durch die Guanylatcyclase einerseits und der abbauenden Phosphodiesterase

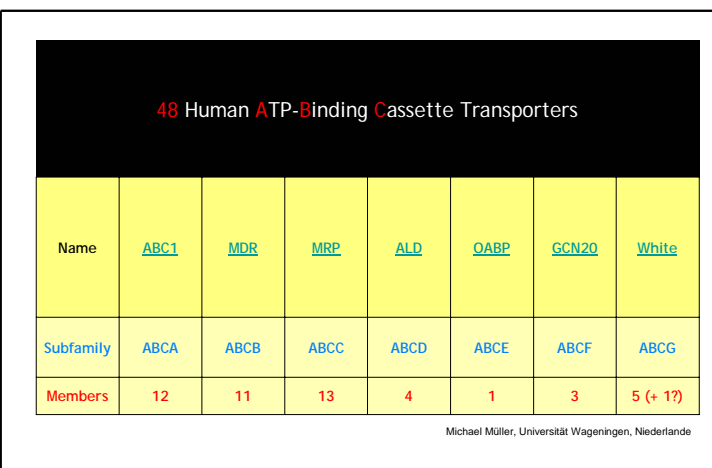
andererseits. Die Phosphodiesterasen bilden eine Superfamilie mit elf Mitgliedern. Sie sind in der Lage cAMP und cGMP zu spalten. Die PDE5, 6 und 9 sind cGMP spezifisch. Die PDE 1-3, 10 und 11 können cAMP und cGMP spalten, die restlichen Phosphodiesterasen spalten nur cAMP. Es gibt einmal die lösliche Guanylatcyclase sowie eine membrangebundene Form. Die lösliche Guanylatcyclase kann durch Nitromonoxid (NO) induziert werden. Die cGMP abhängigen Proteinkinasen finden sich in besonders hoher Konzentration in den glatten Muskelzellen, den Thrombozyten und im Kleinhirn. Therapeutisch genutzt wird NO in vielen NO-freisetzenden Vasodilatoren (Nitroglycerin, Isosorbiddinitrat, etc.), die die intrazelluläre cGMP Konzentration erhöhen. Dies führt zu einer verstärkten Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinasen, welche zu einer verminderten intrazellulären Calcium-Konzentration führen und so zu einer Erschlaffung der glatten Muskelzelle. Die Gefäße können sich weiten. Ein erhöhter Calcium-Efflux wird dabei durch die Phosphorylierung der in der Membran lokalisierten Calcium-ATPase erreicht, die anschließend vermehrt Calcium herausschleust und das Membranpotenzial so absenkt. Einen ähnlichen Ansatz sollte auch mit Phosphodiesterase5 Hemmstoffen verfolgt werden. Die PDE5 spaltet cGMP in 5`-GMP und unterbricht so die Signalkaskade. Mit der Entwicklung spezifischer PDE5 Inhibitoren sollte die Palette der vasodilatatorischen Medikamente, die das Herz entlasten, erweitert werden. Die Medikamente zeigten auch vielversprechende blutdrucksenkende Effekte, als starke Nebenwirkung bei männlichen Patienten fielen allerdings die verstärkten Erektionen auf. Denn in den Blutgefäßen des Penis ist die PDE5 stark exprimiert, durch einen verminderten cGMP Abbau erschlafft die Ringmuskulatur in den Arterien des Corpus cavernosum und die Gefäße werden weitgestellt. Bei sexueller Erregung kann so dann leichter Blut in die Schwellkörper fließen. Diese ursprüngliche Nebenwirkung wurde in Medikamenten wie Viagra®, Levitra® und Cialis® zur Hauptwirkung gemacht. Die Herkunft der Medikamente zeigt gleichzeitig, warum herzkranken Patienten, die bereits blutdrucksenkende Medikamente einnehmen, besonders vorsichtig bei der gleichzeitigen Einnahme von PDE5 Hemmstoffen sein müssen. Immer wieder wird bei der Anwendung von Viagra® von Sehstörungen berichtet. Dies kommt durch die gleichzeitige Hemmung der PDE6 zustande, welche ausschließlich in den Zäpfchen und Stäbchen der Netzhaut vorkommt. Eine durch PDE6 erniedrigte cGMP Konzentration löst hier eine Hyperpolarisation der Sehzellen aus, ist diese gehemmt, kommt es zu Störungen der visuellen Wahrnehmung [106]. Pfizer hat den Wirkstoff von Viagra®, Sildenafil mittlerweile auch als Medikament gegen pulmonare Hypertension unter dem Namen Revatio® mit 20mg pro Tablette auf den Markt gebracht. Interessanterweise sind diese Medikamente auch die Ersten, die wirksam zum Artenschutz

beigetragen haben, da die Jagd auf seltene Tiere, deren Inhaltstoffe traditionell insbesondere in Asien zur Potenzsteigerung eingesetzt wurden, seit der Markteinführung deutlich zurückgegangen ist.

Die PDE5 Hemmer besitzen neben dieser Wirkung auch noch einen inhibitorischen Einfluß auf den MRP5 Kanal, ein Mitglied der ABC Transporter Familie. Während für die Hemmung der PDE5 nanomolare Konzentrationen ausreichen, ist für die Hemmung des MRP5 Transporters eine rund 1000fach höhere Konzentration im  $\mu$ molaren Bereich nötig [107]. Bei diesen Konzentrationen wurden auch keine toxischen Effekte in Zellkultur beobachtet [108]. PDE5 Hemmer wie Sildenafil erhöhen die cGMP Konzentration intrazellulär und cGMP wird gleichzeitig von MRP5 transportiert. Deshalb wird dieser Signalweg bei unseren Untersuchungen eine gesonderte Rolle spielen.

### 1.11 ABC Transporter

Bei der Aufnahme in den Körper oder von seinem Entstehungsort im Körper muss jeder exogene und endogene Stoff zahlreiche Zellmembranen im Körper passieren, um zu seinem



48 Human ATP-Binding Cassette Transporters							
Name	ABC1	MDR	MRP	ALD	OABP	GCN20	White
Subfamily	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG
Members	12	11	13	4	1	3	5 (+ 1?)

Michael Müller, Universität Wageningen, Niederlande

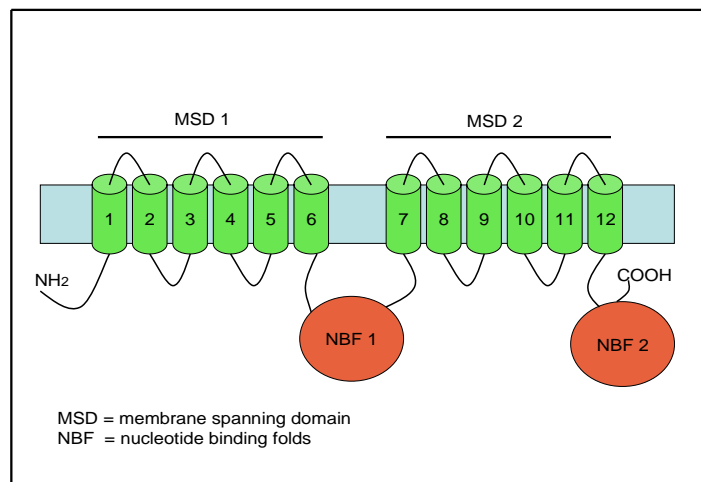
**Abb. 12:** ABC Transporter Familien

Wirkort zu erreichen oder zur Ausscheidung gebracht zu werden. Für diesen Transport stehen zwei unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung. Entweder kann der Stoffaustausch rein passiv oder aktiv erfolgen. Der passive Transport kann durch Diffusion von nichtpolaren Stoffen durch die Zellmembran erfolgen oder von geladenen Molekülen über Ionenkanäle, die entlang eines Konzentrationsgradienten arbeiten. Ionenkanäle können offen oder geschlossen vorliegen und durch Signalmoleküle in ihrer Funktion moduliert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten ABC Transporter gehören zur Kategorie des primär aktiven Transportes.

Die ABC Transporter bestehen aus vier Domänen, zwei integralen Membrandomänen und zwei cytoplasmatischen, ATP bindenden Domänen [109]. Sie befinden sich in der

Zellmembran und transportieren unterschiedlichste Substrate wie Zucker, Aminosäuren und Xenobiotika aus der Zelle hinaus nach außen. Diese größte Familie transmembranärer Proteine kommt sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten vor. Sogar in Pflanzen wurden sie nachgewiesen. Die ABC (ATP-binding-cassette) Transporter lassen sich in sieben Unterfamilien mit insgesamt 48 Mitgliedern einteilen (Abb. 12). Da die zu transportierenden Stoffe gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden, ist für den Transport Energie durch die Hydrolyse von ATP notwendig. Das ATP bindet dabei an zwei hochkonservierte Regionen, die so genannten Walker A und Walker B Sequenzen. Diese werden auch als NBF (Nucleotide binding folds) bezeichnet (Abb. 13).

ABC Transporter sind in jedem Gewebe des Körpers vorhanden. Besonders in den Fokus der Forschung gelangten diese Transporter, als sich herausstellte, dass sie an der Resistenzentwicklung von Krebstumoren beteiligt waren. Manche Tumore exprimieren bestimmte ABC



**Abb. 13:** Topologie des MRP5 Kanals

Transporter wie MDR-1 (Multidrug resistance) oder MRPs (multidrug related protein) besonders hoch und vermindern durch Transport von Chemotherapeutika aus der Zelle deren Konzentration in der Zelle und damit die Wirkung. So ist der MDR-1 Transporter (in der Literatur auch als P-gp, Phospho-Glykoprotein beschrieben) in der Lage, die Konzentration von cytotoxischen Substanzen wie Doxorubicin, Daunorubicin, Mitoxantron, Paclitaxel und Colchicin in der Zelle zu verringern und somit Ihre Wirkung abzuschwächen. Transfiziert man z.B. Doxorubicin sensitive Zellen mit dem MDR1 Gen, so werden diese Zellen resistent gegen diese Substanz. In metastasierenden Lungsarkom- Zellen konnte klinisch nachgewiesen werden, dass innerhalb von nur einer Stunde die Genexpression von MDR1 erhöht war [110]. Des weiteren vermitteln die vielen ABC Transporter allerdings auch Resistenzen für Antibiotika und Antimykotika sowie für Herbizide bei Pflanzen. Bei Pflanzen sind sogar schon 129 unterschiedliche ABC Transporter identifiziert worden. Das gut charakterisierte p-Glycoprotein (p-GP) oder auch MDR-1 kommt auch physiologisch in mehreren Geweben vor [111], so zum Beispiel in den Nieren, der Leber, dem Darm, Endothelzellen der Blut/Hirn Schranke und auch in dem Endometrium des schwangeren

Uterus, hier dient der Transporter als Schutzfunktion, da er giftige Stoffe, die das Kind mit dem Blut der Mutter aufnimmt, aus den Zellen wieder hinaus transportiert.

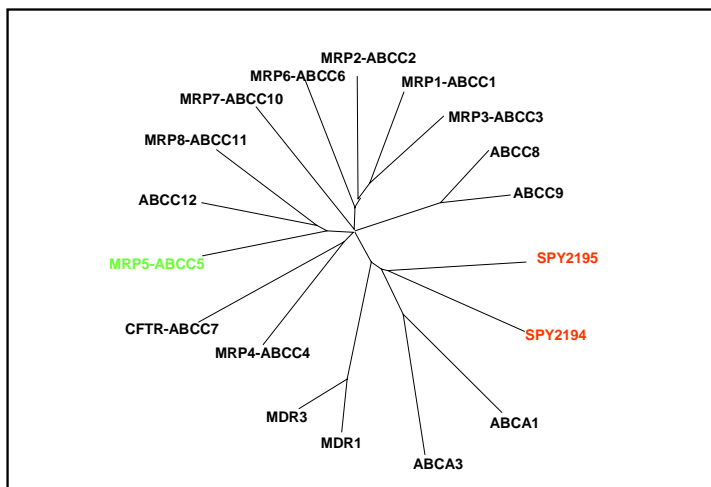
Die MRP-Familie kommt im Vergleich zu der MDR Familie in geringerer Expression in allen Säugetierzellen vor, diese Transporter katalysieren selektiv den Transport von organischen Anionen, Glutathion, glucuronierten und sulfatierten Konjugaten von Zytostatika wie Anthrazyklinen oder Vinca Alkaloiden [112]. Die ABC Transporter MRP4, MRP5 und MRP8 nehmen eine besondere Stellung ein in der MRP Familie, da ihnen am N-terminalen Ende eine dritte membranintegrale Pro-Domäne fehlt [113]. Die beiden membranintegralen Domänen bilden in der Membran eine Art Pore, durch die dann selektiv die entsprechenden Substrate transportiert werden. MRP4 und MRP5 sind in der Lage, den Transport von cAMP und cGMP aus der Zelle zu kontrollieren, während MRP4 aber eine deutlich geringere Affinität zu diesen Substraten aufweist [114-116]. Allerdings scheinen diese physiologischen Substrate nicht das „Haupt“substrat zu sein, denn der Transport der cyclischen Nucleotide hat auf die intrazellulären Konzentration nur einen untergeordneten Einfluss [117].

Dies liegt zum einen an dem Phosphodiesterasesystem, dass sehr viel effektiver bei höheren cGMP/cAMP Spiegel aktiviert wird und cGMP/cAMP abbaut und zum anderen an dem Umstand, dass der Transport der cyclischen Nucleotide bei physiologischen Konzentrationen nur mäßig bis gar nicht stattfindet [114]. MRP5 konnte zuerst im Urogenitalgewebe nachgewiesen werden [118], was nicht uninteressant ist, wenn man bedenkt, dass cGMP eine wichtige Rolle bei der erektilen Dysfunktion spielt und das PDE5 Hemmer wie Sildenafil (Viagra®) auch den MRP5 Kanal hemmen. Andere gehen mittlerweile von einer ubiquitären Verteilung dieses Kanals aus [110]. Der Nachweis von MRP5 gestaltet sich auch deshalb als nicht so einfach, da es für das Protein keine gut funktionierenden Antikörper gibt [119].

Um eine Resistenz durch ABC Transporter zu verhindern, wurden und werden für alle möglichen Transporter Inhibitoren entwickelt, die eine Ausschleusung der Medikamente aus den Zellen verhindern und so deren Wirksamkeit erhöhen. Gibt es zum Teil für ein und denselben Transporter mehrere Substrate, so ist es bei den Hemmstoffen für die ABC Transporter noch viel diversifizierter. So hemmen zum Beispiel eine Vielzahl von Stoffen aus folgenden Stoffgruppen den MDR 1 Kanal: Analepika, Antidepressiva, Antiestrogene, Antimykotika, Antihistaminika, Malariamittel, Calcium-Kanal Blocker, Diuretika, Immunsuppressiva, Neuroleptika, Steroidhormone und andere. Besonders prominente Beispiele sind Verapamil und Cyclosporin A. Sie gehören zur 1. Generation der Inhibitoren, mittlerweile sind bessere Inhibitoren in der Entwicklung, die speziell für den Zweck der ABC Transporter-Hemmung geschaffen wurden. Bei Verapamil ist ein Einsatz des R-Isomers als

MDR1 Inhibitor sogar relativ unproblematisch möglich, weil es wie das S-Isomer auch MDR1 hemmt, es aber als Ca-Kanal Blocker unwirksam ist und so keine kardialen Nebenwirkungen aufweist. Ein riesiger Vorteil der Gabe dieser Inhibitoren zu den Chemotherapeutika ist auch die gleichzeitige Dosisreduktion und damit auch eine Verminderung der Nebenwirkungen der eingesetzten Chemotherapeutika.

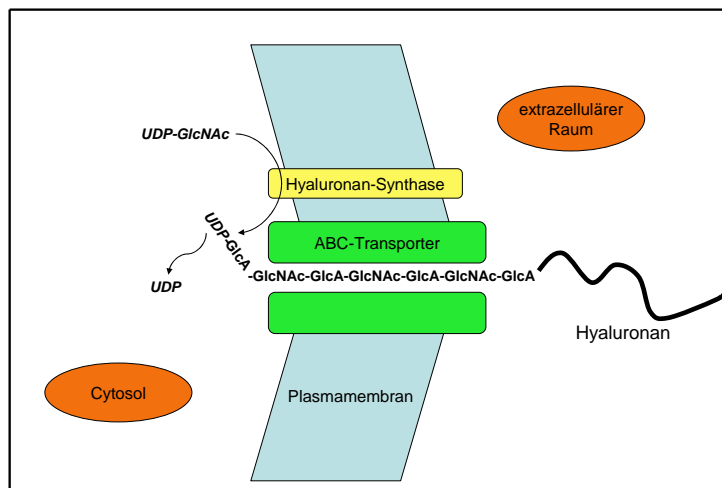
### 1.12 Arbeitshypothese und Zielsetzung



**Abb 14:** Verwandtschaftsgrad zwischen Hyaluronantransporter der Streptococcen (rot) und humanen ABC-Transportern. (MRP5-grün)

Da der Hyaluronantransporter in Streptococcen einen hohen Verwandtschaftsgrad zu den eukaryontischen ABC Transportern aufweist (Abb.14) [29], wollen wir per interspezies PCR mit DNA aus bovinem Knorpel untersuchen, ob und gegebenenfalls welche dieser Transporter im Knorpel zu finden sind. Bei den Transportern, die

identifiziert werden können, sollen dann in Zell- und Organkultur die dafür bekannten Inhibitoren eingesetzt werden, um zu überprüfen, ob und wie stark sie die Hyaluronanausschleusung der Knorpelzellen hemmen können. Dafür ist es nötig, einen geeigneten Test zu finden, in dem wir die Hyaluronanproduktion und -seznierung induzieren können, damit ein möglicher Effekt der Inhibitoren auf die Hyaluronan-



**Abb. 15:** Neues Modell der Hyaluronansekretion

ausschleusung leichter nachweisbar ist. Bei geeigneten Inhibitoren, welche die Hyaluronanproduktion senken, wird dann am Knorpel untersucht, welchen Einfluss

- a) eine erhöhte Hyaluronanausschleusung auf den Knorpel und



- b) eine mit Inhibitoren des ABC Transporters erreichte Verminderung der erhöhten Hyaluronanausschleusung auf den Knorpel hat.

Dazu wollen wir die Proteoglykankonzentration und der Kollagengehalt im Knorpel messen. Für beide Parameter müssen wiederum erst funktionierende Tests erarbeitet werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Arbeitsgruppen, die Proteoglykane und Kollagene im Kulturmedium der Zellen nachweisen, möchten wir den Anteil dieser Proteine direkt in der Knorpelmatrix bestimmen. Mit unseren Versuchen wollen wir folgende Hypothese unter Berücksichtigung des neuen Modells der Hyaluronanausschleusung (Abb. 15) untermauern oder widerlegen [120;121]:

Die ersten Veränderungen in der extrazellulären Matrix gehen mit einer Überproduktion von Hyaluronan einher. Dies führt in der Folge zu einer verstärkten Wassereinlagerung und einer Aufweichung des Knorpels. Die Aggregation der Proteoglykane mit Hyaluronan in der Matrix findet nur noch unvollständig statt, da das richtige Verhältnis gestört ist, es wird verhältnismäßig viel mehr Hyaluronan als Aggrekan produziert [122]. Des Weiteren werden die noch vorhandenen Proteoglykane durch die überschießende Hyaluronanproduktion aus dem Knorpel gedrückt. Die MMPs (MatrixMetalloProteasen), die die Kollagentripelhelices spalten und verdauen können, sind vermutlich in der Lage, leichter durch den Knorpel zu diffundieren. Dies trägt zum einen dazu bei, dass die unterschiedlichen pro-MMPs sich gegenseitig leichter aktivieren können und dass sie sich zum anderen leichter an die Kollagene anlagern können. In vorherigen Versuchen konnte Prehm bereits zeigen, dass zum einen Inhibitoren verschiedener ABC Transporter die Hyaluronanausschleusung vermindern können und dass ABC-Hemmer wie Valspodar und Nicardipin den Proteoglykangehalt in bovinen Knorpelschnitten erhöhen können. Wir möchten das neue Modell der Hyaluronanausschleusung in Abbildung 15 mit Experimenten bestätigen. Diese Arbeit möchte weitere, möglichst selektive ABC-Hemmer untersuchen und deren Einfluss auf arthrotischen bovinen Knorpel zusammenhängend beleuchten. Zusammenfassend soll der Einfluss der Überproduktion eines nativen und wichtigen Bestandteils der extrazellulären Matrix, des Hyaluronan, auf die Knorpelmatrix und den Kollagenabbau untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Biologisches Material

humane Fibroblasten

bovine Chondrozyten

Schlachtereier Irmer, Nottuln

boviner Knorpel

Schlachtereier Irmer, Nottuln

#### 2.1.2 Oligonucleotide

T7: 5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3`

USB,Amersham,Braunschweig

Alle Primer wurden bei der MWG Biotech AG, Ebersberg, bestellt und nach Lieferung als 10 picomolare Lösungen eingesetzt.

5`-human ABCA1

5`-ACC TGT ATT GTT TGC CAC CAC GAT

3`-human ABCA1

3`-ATT CAA CTT CAT TTC CTG CTG TCT GC

5`-human MDR1 (ABCB1)

5`-ACC CAA ATC TAC CAG GCT GTG TCT CG

3`-human MDR1

3`-CTG TCC AAT CTA AGC CAT CCA ACT GC

5`-human ABCB5

5`-TCA AGC TGC ACT GGA GAA GGA TAC

3`-human ABCB5

3`-AAG GGG TCT GAA GGC TCT GGT TTA

5`-human MRP1 (ABCC1)

5`-CCA TGG CAG ACA GTA GAC AGA ACA AC

3`-human MRP1

3`-CCG AAA AGT GGG AGT AGA TAG GTG AG

5`-human MRP4 (ABCC4)

5`-GTG AAG CGC CTG GAA TCT ACA ACT CG

3`-human MRP4

5`-TTC TTC CCA CAA TGC CAA CCT TTT CT

5`-human MRP5 (ABCC5)

5`-GCC CTG CTC CGC CAC TGT AAG ATT

3`-human MRP5

5`-TCC GGA ACT GCT GTG CGA AAG ATA AA

5`-human MRP6 (ABCC6)

5`-GTC CGC CAC CTG TCC ACC TAC CTA TG

3`-human MRP6

5`-TGA GCA GCT TGG GGA CAG TGA ACC

5`-human MRP7 (ABCC10)

5`-CTG GTG GGC TTG TCG CTG TCT TAT GC

3`-human MRP7	3`-AGA TAG CTC CGG CCC CCT TCA CC
5`-human MRP8 (ABCC11)	5`-AGC GCA TCC GTG TGA CCA GTG AAG TT
3`-human MRP8	5`-CAG CTC CAG TGC CCC ATT GAC GA
5`-human MRP9 (ABCC12)	5`-GGT GGA TGA TGC CGG GCT ACT CTC
3`-human MRP9	5`-TGG TGG CTG GCA AAG GAC AAA ACA AG
5`-human ABCF1	5`-CGC TTC GGC CTG GAG AGT CAC
3`-human ABCF1	5`-TAG GGG GAT GCC AAG GAT AAG G

### 2.1.3 Nährmedien

LB-Medium:	Bacto-Trypton	1,0 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	0,5 %
SOC-Medium	Bacto-Trypton	2,0 %
	Hefeextrakt	0,5 %
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glucose	20 mM
Agarplatten:	LB-Medium	
	Agar-Agar	1,5 %
	Ampicillin	100 µg/ml

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) als Standardmedium,  
 vor Gebrauch versetzt mit: 10 % FCS (fötales Kälberserum)  
 1 % Penicillin/Streptomycin

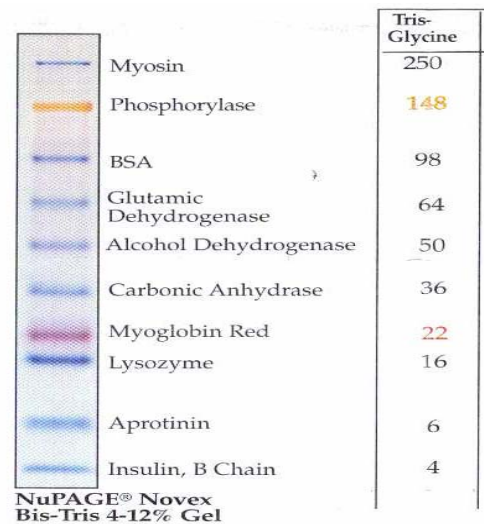
### 2.1.4 Standardlösungen und Puffer

10x TE-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 50 mM EDTA
50x TAE-Puffer	2 M Tris/HCl 2 M Eisessig 0,5 M EDTA
PBS, pH 7,5:	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 130 mM NaCl

### 2.1.5 Marker

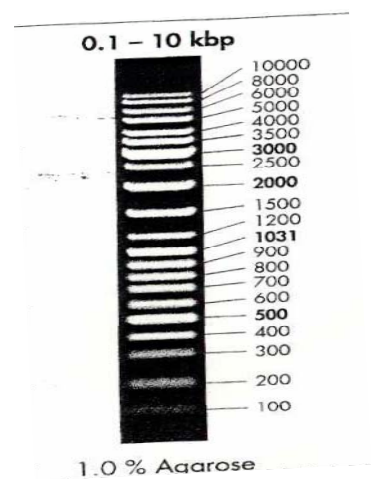
Proteinmarker: SeeBlue Plus 2, Invitrogen

Rechts die Molekulargewichte in Kilodalton.



DNA Größenmarker: peqGold Leiter-Mix

Die durch höheren DNA-Gehalt stärkeren Banden bei 500bp, 1031bp, 2000bp und 3000bp erleichtern die Bestimmung.



## 2.1.6 Chemikalien

Ascorbinsäure	Sigma	Pyruvat	Sigma
Papain	Sigma	N-Ethylmaleimide	Sigma
DEPC	Roth	β-Aminopropionitril	Sigma
Trequinsin	Sigma	PBS-Salz	Biochrom
sämtliche Primer	MWG	4-trans-Hydroxyprolin	Fluka
Collagenase 1A	Sigma	Zaprinast	Sigma
Taq DNA Polymerase	Promega	ABTS Tabletten	BM
Dipyridamol	Sigma	ABTS Puffer	BM
EDC	Sigma	Glycin	Roth
Omniscript RT Kit	Quiagen	Chymotrypsin	Sigma
RNase Inhibitor	Eppendorf	Agar	Applichem
Verapamil HCl	Sigam	Hefeextrakt	Applichem
Bromo-cGMP	Sigma	Coomassie Brillant Blue R-250	Biorad
Dibutyryl-cGMP	Sigma	DMSO	Roth
Interleukin 1a	Sigma	Acrylamid/Bisacrylamid	Applichem
[ <sup>14</sup> C]L-Proline	ICN	p-Aminophenylmercuricacid	Sigma
[ <sup>35</sup> S]Sulfat	ICN	Saccharose	Roth
Trypsin	Gibco	Ethidiumbromid	Applichem
Penicillin/Streptomycin 1/100	Gibco	Tetraethylammoniumchlorid	Fluka
Fungizone	Gibco	Triton X-100	Sigma
Tenoxicam	Sigma	dNTP-Set	Rot
Pepsin	Sigma	Peroxidase	Sigma
Ammoniumbicarbonat	Fluka	Griess Reagenz	Sigma
Alamar Blue	Biosora	L-Thyroxin	Sigma
UDP-[ <sup>14</sup> C]Glucuronsäure	NEN	all-trans-Retinsäure	Sigma
[ <sup>3</sup> H]Glucosamin	NEN	Mercaptopurin	Sigma
Na-Citrat	Sigma	p-Nitrophenyphosphat	Sigma
NaCl	Sigma	Harnstoff	Roth
Na-EDTA	Sigma	SDS	Serva
Citronensäure	Roth	Roti-Histol	Roth
Essigsäure	Roth	Roti-Histokitt	Roth
Benzbromaron	Sigma	Silymarin	Sigma
Streptavidin-Horseradish-		biotinyliertes Hyaluronan	Calbiochem
Peroxidase Conjugat	Amersham	Isosorbiddinitrat	Fluka
NaOH Plätzchen	Merck	Vanadiumtrichlorid	Fluka
Alcianblau 8GS	Chroma	Benzamidin	Sigma
Acetonitril	Roth		

Vardenafil HCl war eine freundliche Gabe der Firma Bayer, Leverkusen

Tadalafil HCl war eine freundliche Gabe der Firma Eli Lilly, Indianapolis, USA

## 2.1.7 Geräte

Analysenwaage, Typ AE163	Mettler, Gießen
Autoklav	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Brutschrank B6060	Heraeus, Düsseldorf
Coulter Counter Z1	Beckman Instruments GmbH, Klosterneuburg
DNA Sequenzieranlage	
ELISA PlattenReader Synergy HAT	BIOTEK
Elektrophorese-Kammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
Geldokumentationsanlage	MWG-Biotech, München
Mikroskop Axiovert 100 mit Photoaufsatz MC 80	Zeiss, Jena
Parr Bombe	Eigenbau der Institutswerkstatt
Elektrophorese Spannungsquelle: Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 300/150	Pharmacia, Freiburg
PCR Gerät "Mastercycler personal"	Eppendorf, Hamburg
Speedvac	Bachhofer,
Szintillationszähler	
Tischschüttler Thermoshake	Gerhardt, Bonn
Universalwaage	Sartorius, Göttingen
UV-Vis Recording	Shimadzu, München
Spectralphotometer UV-160	
Zentrifugen:	
Eppendorf-Minizentrifuge Typ 5412 (r = 8,5 cm)	Eppendorf, Hamburg
Rotana P für die Zellkultur (r = 13,5 cm)	Hettich

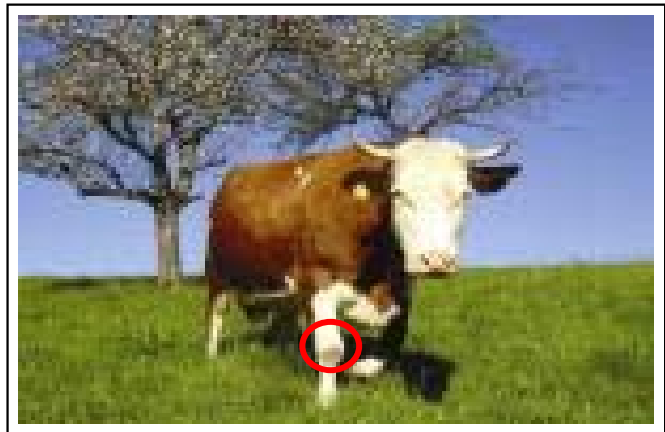
weitere, in jedem Labor vorhandene Geräte werden nicht expliziert aufgeführt.

## 2.2. Allgemeine Methoden

### 2.2.1 Zell- und Organkultur

#### 2.2.1.1 Isolierung boviner Chondrozyten aus Knorpel

Die Rinderknie wurden nach dem Schlachten des Tieres großzügig aus dem Bein herausgesägt. Die Haut war zuvor abgezogen worden. Die Knie wurden dann bei 4 °C aufbewahrt und wurden am nächsten Morgen im Institut sofort bearbeitet. Nach äußerlicher Desinfektion (Keimverminderung) des Gewebes mit 70 %igem Ethanol wurde unter der



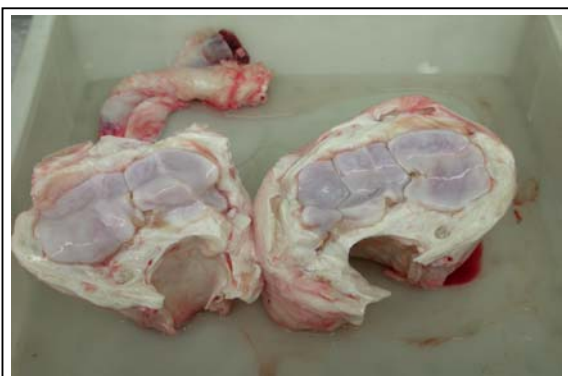
**Abb.16:** eingekreistes Gelenk wurde entnommen

Sterilwerkbank mit einem Skalpell das umgebende Gewebe entfernt und durch Tasten die Gelenkspalte erfühlt. An dieser entlang wurde mit einem sterilen Skalpell dann das Gelenk

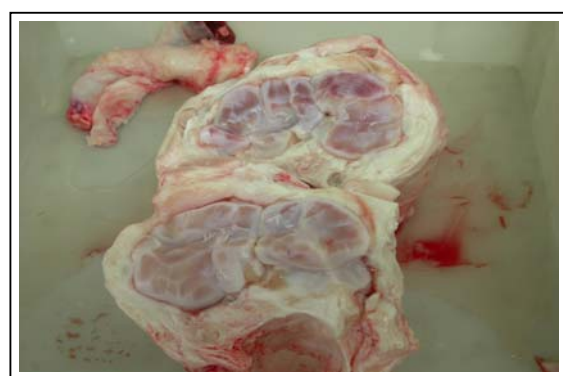


**Abb. 17:** vom Bein getrenntes Kuhknie ohne Haut

vorsichtig aufgeschnitten. Waren die Gelenkflächen komplett freigelegt und getrennt, wurde die Knorpeloberfläche mit kaltem sterilen PBS zur Entfernung von Blutresten und der Synovialflüssigkeit gespült. Mit einer neuen, sterilen Klinge (Aesculap AG, Größe 23) wurden dann die Knorpelstücke aus der Knorpeloberfläche



**Abb. 18:** Knorpel im geöffneten Knie



**Abb. 19:** Knie nach Knorpelentnahme

herausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, nicht zu tief in den Knorpel zu schneiden, um keine hypertrophen Chondrozyten in den Proben zu haben. Die Knorpelstücke wurden auf mehrere Petrischalen mit jeweils 30 ml DMEM + 10 % FCS, 2 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % Fungizone (Amphotericin B) gegeben. Nach den ersten 24 Stunden wurden die Knorpelstücke dann in normalem Medium weiterkultiviert (10 % FCS, 1 % Pen/Strep, kein Fungizone). Waren die Knorpel am Tag nach der Entnahme nicht durch Mikroorganismen befallen, konnten die Versuche gestartet werden.

### 2.2.1.2 Einbettung der Chondrozyten in Alginatbeads

Zu einer Petrischale mit Knorpelstücken wurde 3 mg/ml Kollagenase 1A, welche zuvor in PBS gelöst und sterilfiltriert worden war, zugegeben. Der Verdau blieb über Nacht im Brutschrank. Am nächsten Tag wurde das Medium mit dem aus der Matrix gelösten Knorpelzellen in eine 20 ml Spritze vorsichtig aufgesogen und durch einen sterilen Swinex-Filter mit drei übereinander gelegten Nylonmembranen (Porengröße 100  $\mu\text{m}$ ) in ein 50 ml Tube gedrückt. Die Zellen wurden dann zehn Minuten bei 604 g abzentrifugiert und das Sediment wieder in zehn Milliliter warmen DMEM aufgenommen und mit der Pipette vorsichtig durchmischt. Dann wurden die Zellen wieder für zehn Minuten bei 604 g abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Vor der letzten Zentrifugation nahm man 100  $\mu\text{l}$  der durchmischten Zellsuspension in 10 ml isotonischer Kochsalzlösung auf und zählte diese Lösung im Coulter Counter. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde entsprechend der Zellzahl in warmem Alginat aufgenommen (1,2 % Alginat in 0,9 %iger NaCl-Lösung). Es sollten sich ca. 1,25 Millionen Chondrozyten in 1 ml Alginatlösung befinden. Diese Lösung wurde mit einer Pipette vorsichtig durchmischt und dann in eine 2 ml Spritze aufgesogen. Durch eine 22 G Kanüle wurde dann die Alginatlösung mit den Zellen in zuvor vorbereitet 24-Loch Platten mit 500  $\mu\text{l}$  einer 102 mM  $\text{CaCl}_2$  Lösung gepresst. In jedes Loch wurden neun Tropfen getropft, die Platte blieb dann 10 min stehen, damit das Alginat auspolymerisieren konnte. Das negativ geladene Alginat war in der Lage, mit Calcium-Ionen Gele zu bilden. Dieses stark negativ geladene Gel, in dem die Chondrozyten dann eingebettet waren, imitierte die natürliche Knorpelmatrix. Es konnte gezeigt werden, dass de-differenzierte humane Chondrozyten in negativ geladenen Alginatbeads wieder den typischen Chondrozytenphänotyp annahmen [123;124].



Knorpelzellen von Menschen und Rindern, die in Alginatbeads kultiviert wurden, behielten für lange Kulturzeiten ihren Phänotyp [125;126]. Es ist weiterhin bekannt, dass zum Beispiel bovine Chondrozyten in solchen Kulturen insbesondere die knorpelspezifischen Moleküle wie Kollagen Typ II und Aggrekan für bis zu acht Monate bilden können [123]. Nach der Gelbildung wurden die Alginatbeads einmal mit isotonischer Kochsalzlösung, und dann dreimal mit DMEM gewaschen, um überschüssiges Calcium zu entfernen. Ein weiterer Vorteil der Alginatbeads war, dass die Chondrozyten begannen, wieder eine Matrix mit Proteoglykanen und Kollagenen aufzubauen, sowie die Möglichkeit, nach Beendigung eines Versuchs die Alginatbeads mit 55 mM Natriumcitrat-Lösung wieder aufzulösen und die Zellzahl per Coulter Counter zu bestimmen.

### 2.2.1.3 Zellkultur

Bovine Knorpelzellen wurden bei 7,5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Im Normalfall wurde alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt. Adhärente Zellen wurden kurz vor der Passage einmal kurz mit warmem PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Dann erfolgte eine ca. 5-10 minütige Behandlung mit Trypsin/EDTA, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1:3 geteilt und umgesetzt. Zur Lagerung der Zellen wurden die Zellen in 2 ml Medium mit 10 % DMSO suspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Isolierung cytoplasmatischer RNA aus bovinen Chondrozyten mit dem RNeasy Kit

Es wurden ca. zehn Millionen Zellen eingesetzt. Vor der Isolierung wurde dem RLN-Puffer 1000 U/ml RNasin und 1 mM DTT zugegeben und der Puffer auf Eis vorgekühlt. Nachdem der Knorpel über Nacht in Kollagenase aufgelöst worden war, wurde das Medium mit den Zellen durch einen Swinex-Filter (Porengröße 100  $\mu\text{m}$ ) gepresst und die Zellen bei 340 g abzentrifugiert um das Pellet dann in kühlem PBS aufzubewahren. Das Zellpellet wurde durch leichtes Klopfen gelockert und 175  $\mu\text{l}$  kalter RLN-Puffer hinzugegeben, dieser Ansatz wurde dann für 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde für zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert, das Sediment (die Zellkerne) verworfen und mit dem Überstand weiter gearbeitet. Zum Überstand gab man 600  $\mu\text{l}$  Puffer RLT, welcher 6  $\mu\text{l}$  14,5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt. Dazu wurden 430  $\mu\text{l}$  absoluter Ethanol gegeben und der Ansatz mit einer Pipette gut durchmischt. 700  $\mu\text{l}$  des Lysats wurden auf eine RNeasy Säule aufgetragen und 15 sec bei 18625 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die restliche Probe aufgetragen und ebenfalls zentrifugiert. Dann wurde 700  $\mu\text{l}$  Puffer RW1 auf die Säule gegeben und für 15 sec zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Gefäß überführt, 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer wurden aufgetragen und für 15 sec zentrifugiert. Dann wurden weitere 500  $\mu\text{l}$  RPE-Puffer auf die Säule pipettiert, 2 min zentrifugiert und die Säule vorsichtig aus dem Tube entfernt, ohne den Durchlauf zu berühren. Sie wurde in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, 30  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser direkt auf die Membran gegeben und 1 min bei 18.625 g zentrifugiert. Dann konnte die RNA Konzentration gemessen werden.

### 2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA/DNA

Die fotometrische Bestimmung von DNA beruht auf deren Absorptionsmaximum im kurzwelligen Spektralbereich bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine Einheit der optischen Dichte (OD), unter Verwendung einer Glasküvette mit der Schichtdicke 1 cm, der Konzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ . Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Um Proteinverunreinigungen in Nukleinsäureproben zu bestimmen, wurde der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm gebildet. Lag das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 war die Verunreinigung durch Proteine gering.

### 2.2.2.3 Umschreiben der RNA in DNA

Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurden zwischen 50 ng - 2 µg RNA eingesetzt. Normalerweise wurde allerdings 1µg boviner RNA für die Reaktion mit dem Omniscript Reverse Transkriptase Set genommen. Alle benötigten Lösungen wurden aufgetaut, kurz gevortext, zentrifugiert und dann auf Eis gestellt. RNasin wurde in eiskaltem 1xRT-Puffer auf 25 % verdünnt. Folgender Ansatz wurde zur RT-Reaktion benötigt:

Random Primer(Octamere) 100 pmol/µl	2 µl
10 x Puffer RT	2 µl
dNTP-Mix	2 µl
RNasin (10 U/µl)	1 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNA	(insg. 1 µg) x µl
DEPC-Wasser	ad 20 µl

In der Kontrolle wurde anstatt der RNA-Lösung in entsprechender Menge DEPC-Wasser zugesetzt. Die Ansätze blieben noch 10 min bei Raumtemperatur stehen bevor sie für 60 min bei 37 °C inkubiert wurden. Danach wurden sie bis zum Gebrauch bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist die wichtigste Methode, um definierte DNA-Sequenzabschnitte gezielt zu amplifizieren. Grundsätzlich besteht der PCR-Zyklus aus drei Schritten. Im Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNA durch Inkubation bei 95 °C aufgeschmolzen, an die einzelsträngige DNA lagern sich im Hybridisierungsschritt zwei kurze, genspezifische Oligonucleotide an (typischerweise 16-26mere), von denen ausgehend die Synthese des Zweitstranges in 5` → 3`-Richtung durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase im Extensionsschritt bei 72 °C durchgeführt wird. Durch eine Wiederholung dieses Zyklus wird eine (nahezu) exponentielle Amplifikation der Matrize ermöglicht. Die gezielte Amplifikation von Genabschnitten ermöglicht einen qualitativen und quantitativen Nachweis von Genen.

Für jede PCR wurde ein Ansatz von 25 µl hergestellt. Hierzu wurden

0,5 µl dNTPs

2,5 µl 10x ThermoPolPuffer (inkl. 2 mM MgSO<sub>4</sub> Endkonzentration)

1,5 µl 5` Primer

1,5 µl 3` Primer

2,5 µl DNA (aus der RT-Reaktion)

16,5 µl Wasser

zusammen pipettiert. Das jeweilige PCR Programm richtete sich nach den verwendeten Primern. Für die MRP5 Primer ist hier ein Programm exemplarisch aufgeführt:

1. 95°C      2 min
2. Pause (um 0,5 µl Taq-Polymerase zuzugeben)
3. 95°C
4. 52°C      30 sec
5. 72°C      45 sec
6. 3-5 3 x wiederholen
7. 95°C      30 sec
8. 54,5°C    30 sec
9. 72°C      45 sec
10. 7-9 3 x wiederholen
11. 95°C     30 sec
12. 57°C     30 sec
13. 72°C     45 sec
14. 11-13    30 x wiederholen
15. 72°C     5 min
16. 4°        hold

#### 2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

6 x Ladepuffer:      0,2 % Bromphenolblau  
                              0,2 % Xylencyanol  
                              60 mM EDTA  
                              60 % Glycerin

DNA Fragmente mit einer Größe von 100-10.000 Basenpaaren wurden in 1 %igen Agarosegelen mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels (30 ml) wurde 0,3 g Agarose eingewogen und in 30 ml TAE Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht. Ein Gewichtsverlust wurde anschließend durch destilliertes Wasser ersetzt. Zur Visualisierung der DNA Fragmente wurde Ethidiumbromid zugesetzt (Endkonzentration 0,2 µg/ml) und die Flüssigkeit in eine Gelkammer gegossen. Vor dem Gelauftrag wurde je 5 µl PCR-Probe mit 2 µl 6x Ladepuffer und 5 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Es wurde eine Spannung von 70 Volt angelegt und im Horizontalgelsystem aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf eine UV Lampe gelegt und fotografiert.

#### 2.2.2.6 Gelextration

Zur Isolierung der DNA aus einem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit benutzt. Zuerst wurde mit einem sauberen Skalpell die betreffende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Der Gelstreifen wurde in einem kleinen Röhrchen gewogen und die dreifache Menge QG Puffer hinzugegeben. Um das Gel aufzulösen, wurde das Röhrchen für 10 min bei 50 °C inkubiert und alle 2-3 min gevortext. Nach dem Auflösen des Gels sollte der Puffer immer noch gelb sein, was einem pH von etwa 7,5 entsprach. Denn nur bei diesem pH band die DNA optimal an die Membran. Dann wurde das Gewicht des Gelstreifens als Isopropanol zugesetzt. Eine QIAquick spin Säule wurde in ein 2 ml Auffanggefäß gesetzt und die Probe auf die Säule pipettiert und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule wieder in das Sammelgefäß gesetzt. Durch hinzufügen von 500 µl Puffer QG und Zentrifugation für 1 min wurden die letzten Agarosereste entfernt. Zum Waschen wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und ebenfalls für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Säule noch einmal leer für 1 min zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Dann wurde die Säule in eine saubere 1,5 ml Tube gegeben und 50 µl von Puffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) genau in die Mitte der Säule pipettiert und 1 min bei 16.060g zentrifugiert. Die DNA Konzentration des Durchflusses konnte danach gemessen werden und die DNA anschließend bei -20 °C eingefroren werden.

### 2.2.2.7 Topo-TA Klonierung

Um das aufgereinigte PCR Fragment zu vervielfachen wurde das TOPO TA Cloning KIT von Invitrogen benutzt. Dazu wurden 80  $\mu$ l 2 %iger X-Gal auf LB-Platten ausgestrichen. Für den Transformationsansatz wurden One-shot-Zellen auf Eis aufgetaut. Der Ansatz bestand aus 2  $\mu$ l des PCR Produkts, 1  $\mu$ l pCRII-TOPO-TA-Vektor und 3  $\mu$ l Wasser. Dieser wurde vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt. Bei der Transformation wurden dann 2  $\mu$ l des Transformationsansatzes zu den kompetenten One-shot Zellen hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 sec bei 42 °C erwärmt um danach sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt zu werden. Durch diesen Hitzeschock wurde die Zellmembran für kurze Zeit stark durchlässig gemacht und das Plasmid konnte in die Zellen aufgenommen werden. Es wurden 250  $\mu$ l warmes SOC-Medium hinzugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden dann 10, 50 und 100  $\mu$ l auf die Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C gehalten. Am nächsten Tag wurden von den Platten einzelne Kolonien gepickt und in Röhrchen mit 5 ml SOC Medium (mit Ampicillin) gegeben. Nach einer weiteren Nacht bei 37 °C wurden die Zellen bei 4 °C und 604 g für 10min abzentrifugiert und anschließend die Plasmid cDNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Die Zellen wurden in 250  $\mu$ l Puffer P1 resuspendiert und in ein Röhrchen überführt. Wichtig ist, dass dem Puffer zuvor RNase A zugesetzt wurde. Dann fügte man 250  $\mu$ l Puffer P2 zu und mischte den Ansatz durch fünfmaliges Umschütteln des Röhrchens. Ein zu starkes Schütteln und Vortexen war zu vermeiden, da sonst genomische DNA freigesetzt wurde. Nach Zugabe von 350  $\mu$ l Puffer N3 wurde die Lösung nach erneutem fünfmaligem Umschütteln milchig. Es entstand nach zehnminütigem Zentrifugieren ein weißes Sediment. Währenddessen steckte man eine QIAprep spin Säule in die Vakuumabsaugvorrichtung, den Überstand gab man dann auf diese Säule, durch Anlegen des Vakuums wurde dieser dann abgesaugt. Die Säule wurde noch mit 500  $\mu$ l Puffer PB und danach mit 750  $\mu$ l Puffer PE gewaschen. Die Säule wurde dann in ein Röhrchen gesetzt und für 1 min zentrifugiert, um letzte Pufferreste zu entfernen. Die Säule wurde anschließend in ein sauberes Tube überführt und 50  $\mu$ l Puffer EB (s.o.) in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einminütigem Inkubieren wurde für 1 min zentrifugiert. Die gewonnene DNA wurde dann mit ECO R1 für 2 Stunden verdaut und anschließend auf ein Gel aufgetragen.

### 2.2.2.8 DNA-Sequenzierung

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz wurde das ABI Prism® BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reacting Kit genutzt. Bei diesem Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt. Die Generierung der Sanger-Abbruch-Fragmente wurde durch zyklische Wiederholung eines Reaktionsablaufes erreicht. Die eingesetzten Komponenten sowie das Temperaturprotokoll gleichen denen einer PCR. Es ist jedoch zu erwähnen, dass nur ein Cy5-markierter Primer zur Hybridisierung und Initiation der Zweitstrangsynthese eingesetzt wurden. Es fand somit im Gegensatz zur PCR keine exponentielle, sondern eine lineare Amplifizierung statt. Die fluorenzoptische Auswertung der Sequenz erfolgte computer-gestützt.

## 2.2.3. Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1a Proteinbestimmung nach Lowry (höher konzentrierte Proben)

Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 0,2 ml aufgefüllt, mit 1 ml Reagenz 3 vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 0,1 ml Reagenz 4 hinzugefügt, der Ansatz kräftig geschüttelt und weitere 30 min inkubiert. Bezug nehmend auf eine Eichgerade aus 0, 10, 20, 40, 60, 80 µg BSA (bovines Serum Albumin), konnte der Proteingehalt der Probe bei einer Wellenlänge von 660 nm im Fotometer bestimmt werden.

Material:	Reagenz 1	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	18,0 g
	NaOH	3,6 g
	Na-Tartrat	1,4 g
	SDS	9,0 g auf 1000 ml H <sub>2</sub> O
	Reagenz 2	
	CuSO <sub>4</sub> – 5H <sub>2</sub> O	3,6 g auf 100 ml H <sub>2</sub> O
	Reagenz 3	1 % Reagenz 1 + 99 % Reagenz 2
	Reagenz 4	1:1 Folin-Ciocalten/H <sub>2</sub> O

### 2.2.3.1b Proteinbestimmung nach Bradford (niedrig konzentrierte Proben)

Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und mit 300 µl Bradford-Reagenz (Biorad, fünffach verdünnt mit H<sub>2</sub>O) vermischt. Nach fünf Minuten konnte die Proteinkonzentration an Hand einer Eichgeraden von BSA-Standards bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch ermittelt werden. Da diese Proteinbestimmung auf Mikrotiterplatten durchgeführt wurde, erfolgte die Auswertung im Synergy HT Reader mit der zugehörigen Software der Firma Biotek.

### 2.2.3.2a Coomassie-Färbung

Polyacrylamidgele wurden für ca. 30 min in die Färbelösung gelegt und bei Raumtemperatur auf einer Wippe leicht geschwenkt. Die Gele wurden anschließend solange in Entfärbelösung gelegt, bis sich die Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben. Nach Auswaschen der Essigsäure und organischen Lösemittel mit Wasser konnte das Gel getrocknet werden.

Färbelösung:	Coomassie-Blue R250	0,25 % (w/v)
	Methanol	50,00 % (w/v)
	Eisessig	10,00 % (w/v)
Entfärbelösung:	Methanol	50,00 % (w/v)
	Eisessig	10,00 % (w/v)

### 2.2.3.2b Silberfärbung

Bei geringen Proteinkonzentrationen (10 ng - 1 µg) wurde aufgrund der wesentlich höheren Empfindlichkeit eine Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurde nach der Gelelektrophorese das Gel erst für eine Stunde fixiert mit 100 ml 40 % (v/v) Ethanol/ 10 % (v/v) Essigsäure und anschließend die Proteine mit dem gleichen Volumen Inkubationslösung über Nacht vernetzt. Danach wurde das Gel dreimal für 10 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und nachfolgend für eine Stunde mit 100 ml Silbernitratlösung (0,2% (w/v) AgNO<sub>3</sub> / 0,02% (v/v) Formaldehyd) behandelt. Nach wiederholtem, zweimaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O erfolgte das Entwickeln des



Gels mit 100 ml einer Lösung aus 2,5 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  / 0,02% (v/v) Formaldehyd solange, bis sich braunefärbte Proteinbanden gut vom Hintergrund abhoben. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Waschen in 5 %iger Essigsäure.

Inkubationslösung:	Ethanol	30,0 % (v/v)
	Na-Acetat	0,5 M
	Natriumthiosulfat	0,2 % (w/v)
	Glutaraldehyd	0,13 % (v/v)

### 2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gele wurden in Gelkassetten der Firma Invitrogen gegossen und bei 150 Volt in den Invitrogen X-Cell System laufen gelassen. Proben wurden vor dem Auftragen in reduzierendem Puffer 5 min gekocht. Es wurden entweder 7,5 %ige oder 10 %ige Gele angefertigt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung

10 % SDS

10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)

TEMED

Laufpuffer: Glycin 192 mM (14,1 g/l), Tris 25 mM (3,03 g/l), SDS 10,0 g/l

Zusammensetzung 7,5 %iges Gel (10 %iges):

Trenngel:	Sammelgel (3,5%):
2,9 ml $\text{H}_2\text{O}$ (2,4 ml)	1,9 ml $\text{H}_2\text{O}$
1,5 ml Trenngelpuffer (1,5 ml)	750 $\mu\text{l}$ Sammelgelpuffer
1,5 ml Acrylamidlösung (2 ml)	350 $\mu\text{l}$ Acrylamid
60 $\mu\text{l}$ 10 %iges SDS (60 $\mu\text{l}$ )	30 $\mu\text{l}$ 10 %iges SDS
40 $\mu\text{l}$ 10 %iges APS (40 $\mu\text{l}$ )	15 $\mu\text{l}$ 10 %iges APS
6 $\mu\text{l}$ TEMED (6 $\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$ TEMED

Nachdem das Trenngel in die Gelkassette bis zum 3. Teilstrich eingefüllt wurde, wird Butanol vorsichtig darüber gegeben, um eine glatte und ebene Oberfläche zu erhalten. Nach 15 min wird das polymerisierte Gel dreimal mit Wasser gewaschen und nach dem letzten Waschgang die obere Kante vorsichtig mit Zellstoff getrocknet. Darauf wird dann das Sammelgel gegossen. In das flüssige Sammelgel wird der Kamm geschoben und das Gel bis zum Gebrauch in feuchten Papiertüchern mit einer Plastiktüte darum bei 4 °C aufbewahrt.

#### 2.2.3.4 Gelatin Zymographie

2 x nicht reduzierender Puffer:      2,8 ml H<sub>2</sub>O  
   1,0 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8  
   3,2 ml 10 %iges SDS  
   0,8 ml Glycerin  
   0,2 ml Bromphenolblau-Lösung

Inkubationspuffer:                            50 mM Tris/HCl pH 8,0  
   5 mM CaCl<sub>2</sub>  
   1 μM ZnSO<sub>4</sub>

Für die Gelatin-Zymographie wurden 7,5 %ige Acrylamidgele verwendet, die 0,1 % Gelatine enthielten. Die Mediumproben wurden mit einem zweifach nicht reduzierendem Puffer versetzt und nicht gekocht, um nicht die Aktivität der Matrix Metalloproteasen zu zerstören. Die Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese bei 120 Volt laufen gelassen. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel zweimal 30 min in 2,5 %igem Triton-X 100 gewaschen, dann für dreimal 10 min in Wasser gewaschen, um das Triton-X 100 wieder zu entfernen. Danach wurde das Gel für fünf Tage bei 37 °C in Inkubationspuffer geschwenkt. Nach diesen fünf Tagen wurde das Gel für zwei Stunden in Coomassie gefärbt und anschließend solange in Entfärbelösung gelegt, bis man deutlich die hellen, durchscheinenden Banden, wo die Matrixmetalloproteasen die Gelatine verdaut hatten, in dem ansonsten Blau gefärbten Gelen erkennen konnte. Die Gele wurden nach kurzem Wässern gescannt und getrocknet.

### 2.2.3.5 Casein Zymographie

Für die Casein Zymographie wurden 7,5 % Acrylamidgele mit 0,1 % Casein benutzt. Hier konnte man MMP-13 nachweisen. Wenn keine Banden in der Casein Zymographie auftreten, welche in der Gelatinzymographie zu sehen waren, lässt dies auf MMP-2 schließen. Ansonsten war der Ablauf wie unter 2.2.3.4 bereits beschrieben.

### 2.2.3.6 Hyaluronidase-Zymographie, modifiziert nach Stern [127]

Um die Aktivität der Hyaluronidasen nachzuweisen, wurden 7,5 %ige Acrylamidamidegele mit 1 mg/ml Hyaluronan versetzt. Die Gele enthielten kein SDS. Für die Mediumproben wurde der gleiche Probenpuffer benutzt wie in 2.2.3.4. Nach dem Lauf des Gels wurde dieses in einem Natriumformiatpuffer bei pH 3,7 für 24 Stunden inkubiert. Die Gele wurden nach Waschen in Essigsäure in Alcianblaulösung gefärbt und anschließend in 7 %iger Essigsäure entfärbt. Hyaluronidaseaktivitäten zeigten sich durch Banden im hellblau gefärbten Gel ab.

### 2.2.3.7 TCA-Fällung

Zum Nachweis von MMP-9 mittels Westernblot wurden Knorpelstücke für drei Tage kultiviert und je 1 Milliliter Medium mit 140 µl 1 %igem Triton X-100 und 260 µl 60 %igem TCA über Nacht auf Eis gefällt. Die Proben wurden am nächsten Tag für zwanzig Minuten bei 16.060 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Sediment wird zweimal mit Ethanol gewaschen und für je fünf Minuten bei 16.060 g abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde das Sediment mit einem Milliliter Aceton gewaschen, ebenfalls für fünf Minuten bei 16.060 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen, während das Sediment bei 37 °C getrocknet wurde. Das Sediment wurde dann in Probenpuffer aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C gekocht. Die Lösung wurde für zwei Minuten bei 16.060 g zentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen.

## 2.2.3.8 WesternBlot

## Lösungen:

Transferpuffer      40 ml 25 x Tris-Glycin Puffer (18,2 g Tris, 90,0 g Glycin, pH 8,3)  
                          200 ml Methanol  
                          760 ml H<sub>2</sub>O

Für den Western Blot wurden Proteinproben humaner Fibroblasten von 10-100 µg auf ein 3,5 %iges Sammelgel mit 7,5 %igem Trenngel aufgetragen und wie beschrieben durch Acrylamidgel-Elektrophorese bei 150 Volt analysiert. Das Gel wurde auf eine PVDF (**Polyvinylidenfluorid**) Membran passender Größe gelegt und in einer Sure Lock X-Cell II Blot Modul bei 25 Volt für zwei Stunden geblottet. Die PVDF Membran wurde dann für 1,5 Stunden in 2 % Blockpulver/PBS bei Raumtemperatur blockiert. Als erster Antikörper wurde anti-Human MRP5 aus Ratte, 1:20 in (MMP-9 1:1000) 2 % Blockpulver in PBS/0,1 % Tween verdünnt und über das Wochenende (über Nacht) bei 4 °C auf einen Schüttler auf der Membran gelassen. Die PVDF Membran wurde dann dreimal in PBS/0,05 % Tween gewaschen. Als 2. Antikörper wurde ein Kaninchen-Anti-Ratte-Peroxidase-Konjugat 1:5000 in 2 % Blockpulver PBS /0,05 % Tween-20 verdünnt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Auch danach wurde die Membran dreimal mit PBS /0,05 % Tween-20 gewaschen und anschließend mit ECL-Reagenz detektiert.

## 2.2.4 Biochemische und analytische Methoden

### 2.2.4.1 ELISA-Hyaluronanmessung

Probenvorbereitung:

Vor den Versuchen wurden die in den Alginatebeads eingebetteten Chondrozyten für zwei Wochen in DMEM mit 10 % FCS kultiviert, damit sie neue extrazelluläre Matrix synthetisieren konnten. Bei Versuchsstart wurden die Alginatebeads dann in serumfreiem DMEM unter Zugabe von 2 ng IL-1 $\alpha$ /ml/Tag sowie den Inhibitoren kultiviert. Die Inhibitoren waren in DMSO gelöst. Um in allen Proben den gleichen Anteil an DMSO zu haben, wurde die 10 millimolaren Stammlösungen entsprechend verdünnt. Beispiel:

50  $\mu$ M Inhibitor entsprach 5  $\mu$ l Stammlösung auf 995  $\mu$ l Medium. Für die 25  $\mu$ M Probe wurde ein Aliquot der Stammlösung mit DMSO 1:1 verdünnt und wieder 5  $\mu$ l auf 995  $\mu$ l Medium gegeben. Entsprechend ergeben sich andere Konzentrationen. In der Kontrolle und den nur mit IL-1 $\alpha$  behandelten Proben wurden in diesem Fall 5 $\mu$ l reines DMSO hinzu pipettiert. Nach drei Tagen in Kultur wurden die Medienproben gesammelt und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren. Die Alginatebeads wurden in 55 mM Natriumcitrat aufgelöst und die Zellzahl bestimmt. Jeweils ein Versuch wurde immer mit Knorpel/Chondrozyten aus nur einem Tier durchgeführt, um individuelle Unterschiede auszublenden.

Puffer und Reagenzien

Puffer A:

2 M NaCl, 41 mM MgSO<sub>4</sub>-7-H<sub>2</sub>O in PBS

Puffer B:

Puffer A plus 0,05 % Tween-20

Citrat-Phosphat Puffer 0,1 M:

C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O 3,5 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 8,95 g; pH: 5,3; auf 500 ml mit Aqua dest.

HABP Puffer:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 6,164 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 0,312 g

1,5 M NaCl

0,3 mM Guanidinium-HCl

0,08 % BSA

0,02 % NaN<sub>3</sub>

pH 7.0 auf 1 Liter mit Aqua dest.

Blockreagenz:

0,5 % Milchpulver in PBS

Acht Hyaluronan Standards von 600 ng/ml – 0,00768ng/ml

(120 ng/ml; 24 ng/ml; 4,8 ng/ml; 0,96 ng/ml; 0,192 ng/ml; 0,0384 ng/ml)

Ansetzen der Hyaluronan-beschichteten Platten

0,92 mg s-NHS (N-Hydroxysuccinimid-3-sulfonsäure) wurden in 5 ml Hyaluronanlösung (0,2 mg/ml) gelöst. In einem anderen Röhrchen wurden 6,15 mg EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid) in 5 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann wurden die beiden Lösungen kurz vor Gebrauch gemischt. In eine 96-Loch Platte wurden je 100 µl pro Loch gegeben. Die Platte inkubierte über Nacht bei 4 °C.

Testdurchführung:

Da Serum in den Proben den ELISA sehr stark störte, wurden alle Versuche, bei denen Hyaluronan gemessen wurde, in serumfreien Medium durchgeführt. Dies war möglich, da nie mit adhärenen Knorpelzellen gearbeitet wurde, sondern nur mit in Alginatbeads eingebetteten Chondrozyten oder Knorpelstücken. Von den Mediumproben wurden je 50 µl in 96 Loch Platten pipettiert. Bei Bedarf konnten Proben mit sehr hohen Hyaluronankonzentrationen mit PBS verdünnt werden. Zu diesen Proben wurden dann 50 µl HABP-Puffer, in dem Aggrekan-Biotin 1:300 gelöst war, gegeben. Die Platte wurde dann eine Stunde bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die vorbereitete Hyaluronan-beschichtete Platte dreimal mit 300 µl Puffer B und einmal mit 300 µl Puffer A gewaschen. Anschließend wurden 200 µl des Blockreagenzes in jedes Loch pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit Puffer B gespült und dann die Proben der anderen Platte auf die Hyaluronan-beschichtete Platte übertragen. Die Hyaluronan-beschichtete Platte mit den Proben inkubierte dann eine weitere Stunde bei 37 °C und wurde dann dreimal mit Puffer B gewaschen. Es wurden 100 µl einer Lösung von 100 µl Streptavidin-Meerrettich Peroxidase in 10 ml PBS/Tween-20 0,1 % auf die Platte pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit wog man 5 mg o-Phenylendiamin in 10 ml Citrat-Puffer in

einem Glasröhrchen mit Alufolie ein. Die fertig inkubierte Platte wurde abschließend fünfmal mit Puffer B gewaschen und nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /mg Farbe zu der Farbstofflösung wurden je 100  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in die Löcher der Platte pipettiert. Die Platte wurde dann für 25 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend in einem Plattenreader bei 490 nm vermessen.

#### 2.2.4.2 Hyaluronan Synthase Assay

Der Aktivitätstest für die Hyaluronan-Synthase beruhte auf dem Einbau radioaktiv markierter Glucuronsäure in hochmolekulare Hyaluronan Ketten. Nicht eingebaute Nukleotidzucker wurden mit Hilfe der Papierchromatographie abgetrennt. Dazu wurden ca. 10 Millionen Zellen angezchtet und am Versuchstag mit zusätzlichem FCS stimuliert. Nach fünf Stunden wurden die Zellen geerntet, 10 min bei 604 g zentrifugiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dort wurde das Sediment mit 50 ml kaltem PBS gewaschen und nach dem Zentrifugieren in 30 ml kaltem PBS suspendiert. Die Zellen wurde dann in der Parr-Bombe für 15 min bei 50 atm aufgebrochen. Größere Bruchstücke wurden 5 min bei 604 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufgenommen und mit PBS auf 40 ml verdünnt. 50  $\mu\text{l}$  Membranlösung wurden dann 50  $\mu\text{l}$  eines Enzymsubstrates zugesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 10  $\mu\text{l}$  10 %igem SDS gestoppt. Für die Papierchromatographie wurden die Proben auf 3 MM Whatman-Papier aufgetragen und der Startfleck markiert. Die absteigende Chromatographie erfolgte über 24 Stunden, um nicht eingebaute Nukleotidzucker zu entfernen, während das hochmolekulare Hyaluronan am Startfleck verblieb. Anschließend wurde das Papier getrocknet, der Startfleck ausgeschnitten und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler ausgewertet.

Enzymsubstrat:        8  $\mu\text{M}$   $\text{UDP}^{[14\text{C}]}\text{GlcA}$  (300  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ )  
                          166  $\mu\text{M}$   $\text{UDP-GlcNac}$   
                          4 mM DTT  
                          20 mM  $\text{MgCl}_2$  in 50 mM Tris/Malonat, pH 7,0

Laufmittel:    600 ml A. bidest.  
                  60 ml Essigsäure, mit  $\text{NH}_3$  konz. auf pH 5,5 einstellen ad 2 l mit Ethanol p.a.

### 2.2.4.3 Histochemischer Nachweis des Hyaluronan im Knorpelgewebe

Knorpelstücke wurden fünf Tage in Kultur gehalten mit IL-1 $\alpha$  und Inhibitoren. Nach fünf Tagen wurden die Knorpelstücke im „Carnoy'schen Gemisch“ aus 30 % Chloroform, 10 % Essigsäure und 60 % absolutem Ethanol für nicht länger als sechs Stunden fixiert und dann in reinen Ethanol überführt. Ein längeres Fixieren war problematisch, da die Knorpelstücke dann spröde wurden. Die Knorpelstücke konnten dann in Paraffin eingebettet werden und anschließend ca. fünf  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben von den Paraffinblöcken mit Hilfe eines Microton abgeschnitten werden. Die Schnitte wurden rehydratisiert durch zweimaliges Waschen für fünf Minuten in Rotihistol, dann zweimal in 96 % Alkohol, dann in 70 %igem Alkohol und abschließend einmal in 50 %igem Ethanol. Zur Blockung der endogenen Peroxidase Aktivität wurden die auf Objektträger gezogenen Schnitte für 5 min in 3 %igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol geschwenkt. Danach wurden sie in  $\text{H}_2\text{O}$  und dann in PBS gewaschen. Als Kontrolle wurde je ein Schnitt jeder Probe mit 100 U/ml Streptomyces Hyaluronidase in Natriumacetatpuffer pH 5,0 für eine Stunde bei 37°C vorverdaut. Dieser Schnitt wurde danach dann zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden alle Schnitte mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  biotinyliertem Aggrekan in 10 %igem FCS, 90 %igem PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurde zweimal mit PBS gewaschen und 1/250 verdünntes Peroxidase gekoppeltes Streptavidin in 10 %igem FCS und 90 %igem PBS für 20 min bei 37 °C auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde 1 mg/ml o-Phenylendiamin in 0,05 M Natriumacetat pH 5,0/ 0,03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 10 min auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur im Dunklen stehen gelassen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde von den Schnitten abgesaugt, ein Tropfen Glycerin und ein Deckgläschen auf die Schnitte gegeben und die gelbe Färbung dann direkt fotografiert. Die mit Hyaluronidase vorverdauten Schnitte enthielten kein Hyaluronan mehr und dienten jeweils als Negativkontrolle.

### 2.2.4.4a Bestimmung der Proteoglykankonzentration im Knorpel nach Björnsson, [128]

Lösungen:

Extraktionslösung

4 M GuHCl

0,1 M Aminocaprinsäure



	5 mM Benzamidin
	10 mM N-Ethylmaleinimid
	0,5 mM Phenylmethylsulfonsäure
Alcian Blau Stamm Lösung	5g Alcian Blau 8GS in 100ml 0,018 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,4 M GuHCl
Reagenz 1	0,3 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,75 % Triton-X 100
Reagenz 2	2,5 ml Stammlösung 500 µl 10 %ige H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4 ml 8 M GuHCl 1,25 ml 10 %iges Triton-X 100 29,75 ml H <sub>2</sub> O
DMSO-Lösung	40 % DMSO in 0,05 M MgCl <sub>2</sub>
Messlösung	4 M GuHCl in 33 % 1-Propanol

Die Knorpelstücke wurden nach Beendigung des Experiments gewogen und in 2 ml Eppendorf-Gefäßen überführt. Nach Zugabe von je 1,5 ml Extraktionslösung wurde die Knorpelstücke für 72 Stunden bei 4 °C auf eine Wippe gestellt, um die Proteoglykane aus dem Knorpel zu extrahieren. Von den Proben wurden je 50 µl zur Messung verwendet. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden ebenfalls 50 µl von Standardlösungen mit Konzentrationen von 1, 2, 3, 5, 10 und 20 µg Chondroitinsulfat/ml verwendet. Zu den Standards wurden 50 µl einer 8 M GuHCl-Lösung gegeben und zu den Proben 50 µl einer 4 M GuHCl-Lösung. Dann wurden in alle Eppendorf-Gefäße 50 µl von Reagenz 1 pipettiert. Nach kurzem Mischen und Inkubieren für 15 min bei Raumtemperatur wurden je 750 µl von Reagenz 2 zu den Standards und Proben gegeben. Die Ansätze wurden gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 10 min bei 16.060 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Kanüle vorsichtig abgesaugt und das entstandene Sediment in 500 µl DMSO-Lösung aufgenommen und geschüttelt und gevortext. Die Ansätze wurden dann wieder für 10 min bei Raumtemperatur und 16.060 g zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Das blaue

Sediment wurde nun in 500µl Messlösung aufgenommen und nach Mischen und Auflösen des Sediments zweimal je 200 µl jeder Probe auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und die Absorption bei 600 nm gemessen. Es ist bei dieser, wie auch allen anderen Messungen zulässig, sich auf das Gewicht des nativen Knorpels zu beziehen, da dieses mit DNA Gehalt der Knorpelstücke direkt korreliert [129;130].

#### 2.2.4.4b Messung der Proteoglykankonzentration im Medium

Um die Proteoglykankonzentration im Medium zu messen, wurde den Proben der Alginatbeads oder Knorpelstücke das Medium entnommen und dieses dann am Rotationsverdampfer eingedampft und bis zur Messung eingefroren. Um eine genügend hohe Proteoglykankonzentration in den Proben zu erreichen wurden zwei bis drei Milliliter Medium gesammelt bei einer Kulturdauer von 5-10 Tagen. Zur Messung der Proteoglykane wurde wie beschrieben verfahren, allerdings wurde zu Beginn mit 100 µl 8M GuHCl und 100 µl Reagenz 1 gearbeitet.

#### 2.2.4.5 Messung der Proteoglykan-Synthese

Chondrozyten wurden wie oben beschreiben in Alginat eingebettet und zur Synthese einer Matrix zwei Wochen in Kultur gehalten. Den Alginatbeads wurde dann IL-1 $\alpha$  sowie die Inhibitoren in Konzentrationen bis 100 µM zugesetzt um zu überprüfen, wie stark die Proteoglykansynthese durch die Inhibitoren beeinflusst wird. Dazu wurde radioaktives [<sup>35</sup>S]-Sulfat frischem Medium zugesetzt (5 µCi/ml) und die Alginatbeads darin für 24 Stunden kultiviert. Das radioaktive Medium wurde am nächsten Tag entfernt und die Alginatbeads für dreimal 30 min in einer Calciumchlorid-Lösung (116 mg/l) gewaschen. Durch das Waschen wurde das nicht eingebaute, freie radioaktive Sulfat entfernt. Anschließend wurden die Beads in Natriumcitrat-Lösung (55 mM) aufgelöst und mit 3 ml Lumasafe Plus Lösung versetzt. Dann wurde die Radioaktivität der Proben im Counter bestimmt.

#### 2.2.4.6 Histochemische Anfärbung der Proteoglykane im Knorpel

Lösungen:

Paraldehyd 3,7 %

7,4 g Paraformaldehyd in 160 ml H<sub>2</sub>O  
auf 68°C erhitzen, +12 µl 10 N NaOH  
abkühlen lassen  
+ 20 ml 10x PBS pH 7,0  
+ 2 ml 10% Tween-20  
mit H<sub>2</sub>O auf 200ml auffüllen

Knorpelstücke wurden für fünf Tage in Medium mit IL-1 $\alpha$  und den Inhibitoren kultiviert. Dann erfolgte eine Fixierung der Stücke in 4 %igem Paraformaldehyd bei 4 °C für einen Tag. Die fixierten Knorpelstücke wurden dann in Paraffinblöcken eingebettet, in feine Streifen geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die Schnitte werden dann entparaffiniert (siehe oben) und in Wasser gebracht. Dann wurden sie für 3 min in 3 %ige Essigsäure gestellt. Anschließend erfolgte die Färbung für 30 min in 1 %iger Alcianblau 8GX, gelöst in 3 %iger Essigsäure pH 2,5. Danach wurden die Schnitte mit 3 %iger Essigsäure abgespült und in Aqua dest. gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit Kernechtrot für 5 min gegengefärbt und anschließend in Aqua dest. gewaschen. Nachdem die Schnitte dann in Xylol entwässert worden waren, wurden sie in Balsam eingeschlossen und nach dem Trocknen fotografiert.

#### 2.2.4.7 Kollagenfragmente

Knorpelstücke wurden für zwei Wochen mit IL-1 $\alpha$  kultiviert und bei jedem Mediumwechsel das „verbrauchte“ Medium gesammelt. Zu je 1 ml Kulturmedium wurden 100 µl Pepsinlösung (10 mg/ml Pepsin in 1 M HCl) gegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zugabe von 90 µl 1 M Tris wurde der pH Wert mit 1 M NaOH oder 1 M HCl auf 7,4 eingestellt. Die Kollagene (wie auch das Pepsin) wurden dann mit 4,5 M NaCl Endkonzentration über Nacht bei 4 °C gefällt und abzentrifugiert (18.625 g, 20 min, 4 °C). Das Sediment wurde in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit dem dreifachen Volumen eiskaltem absolutem Ethanol mindestens zwei Stunden bei -20 °C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (Bedingungen wie oben) wurde diese Prozedur solange wiederholt, bis kein Salz mehr in den

Proben vorhanden war, gegebenenfalls wurde sonst gegen Wasser dialysiert. Das Sediment wurde in wenig Wasser aufgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer so verdünnt und für 5 min gekocht, damit überall gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden. Nach der Elektrophorese bei 150 Volt wurde das Gel anschließend in Coomassie gefärbt.

#### 2.2.4.8 Messung des Hydroxyprolinegehalts [131]

Lösungen:

Extraktionslösung	4 M GuHCl in Inkubationspuffer
Inkubations-Puffer	0,1 M Tris /HCl pH 7,3 1 mM Iodacetamid 1 mM EDTA 10 µg/ml Pepstatin A
Verdau-Lösung	0,5 mg /ml $\alpha$ -Chymotrypsin in Inkubationspuffer
Citrat-Puffer	57 g Natriumacetat 37,5 g Natriumcitrat 5,5 g Citronensäure 385 ml 2-Propanol ad 1L mit H <sub>2</sub> O
Hydrolysierlösung	6 N HCl
Neutralisierlösung	6 N NaOH
Chloramin T Lösung	100 mg Chloramin-T 1 ml H <sub>2</sub> O 2 ml 2-Propanol 3 ml Citrat-Puffer

Ehrlichlösung	500 mg Ehrlichreagenz
	1,25 ml Ethanol
	1,25 ml Diethylenglycolmonoethylether

Knorpelstücke wurden für vier Wochen mit Retinsäure, IL-1 $\alpha$ , IL-17 und den Inhibitoren kultiviert. Nach Beendigung des Versuches wurden die Knorpelstücke gewogen und die Proteoglykane in 1 ml Extraktionslösung für 72 Stunden bei 4 °C unter leichtem Schwenken extrahiert. Nach 24 Stunden wurde die Extraktionslösung erneuert. Die Knorpelstücke wurden dann dreimal für zwei Stunden in der Inkubationslösung gewaschen, um alle Proteoglykan- und GuHCl-Reste zu entfernen. Da die gespaltenen und „anverdauten“ Kollagenhelices nicht gemessen werden sollten, wurden diese Kollagenstränge durch Zugabe von 500  $\mu$ l Verdauungslösung über Nacht bei 37 °C weiter abgebaut und so aus dem Knorpel entfernt. Am nächsten Tag wurden die Knorpelstücke noch in Inkubationspuffer gewaschen und schließlich 500  $\mu$ l Hydrolyseerlösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde in 1,8 ml Nunc-Cryovials gegeben und diese fest verschlossen. Die Hydrolyse des organischen Materials fand dann über Nacht bei 110 °C statt. Nach dem Abkühlen wurde 500  $\mu$ l Neutralisiererlösung hinzu gegeben. Die nicht gelösten Rückstände wurden abzentrifugiert und 25  $\mu$ l des Überstandes mit 975  $\mu$ l Citrat Puffer verdünnt. Von der Verdünnung wurden wiederum 200  $\mu$ l genommen und mit 100  $\mu$ l Chloramin-T Lösung versetzt. Nach dem Mischen wurden die Ansätze 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die 100  $\mu$ l Chloramin-T Lösung wurden auch zu einer Standardreihe mit 1; 2,5 ;5 ;10 ;15 ;20 ;25 und 30  $\mu$ g Hydroxyprolin/ml in Citrat Puffer gegeben. Nach den 20 min wurde 100  $\mu$ l 6,2 M Perchlorsäure zu den Proben gegeben und die Ansätze für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Zugabe von 100  $\mu$ l Ehrlichlösung und Mischen wurden alle Proben für 20 min bei 60 °C inkubiert. Die Proben wurden innerhalb von 30 min auf eine 96 Loch Platte pipettiert (200  $\mu$ l/ Loch, Doppelbestimmung) und in einem Plattenreader bei 565 nm gemessen.

#### 2.2.4.9 Messung der Kollagensynthese

Die Knorpelzellen wurden wie oben beschrieben in Alginat eingebettet (1,25 Millionen Zellen/ ml Alginat) und in DMEM/ 10 % FCS gehalten. Nach zwei Wochen wurde frisches Medium mit der Endkonzentration 1 mM Cystein, 1 mM Pyruvat, 60 µg/ml β-Aminopropionitril sowie 25 µg/ml Ascorbinsäure zugegeben, um die Kollagensynthese anzuregen. Nach einem Tag wurde das Medium erneut gewechselt und IL-1α sowie die Inhibitoren eingesetzt. Zusätzlich zu den oben genannten Stoffen wurde das Medium noch mit 1µCi /500 µl [<sup>14</sup>C]Prolin radioaktiv markiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Alginatbeads dreimal für 30 min in CaCl<sub>2</sub>-Lösung (116 mg/l) zur Entfernung des nicht eingebauten radioaktiven Prolins (und Hydroxyprolins). Nach Auflösung der Beads in 500 µl Natriumcitratlösung (55 mM) und Zugabe von 3 ml Lumasafe Plus konnte die Radioaktivität der Proben bestimmt werden.

#### 2.2.4.10 Peroxidase Infiltrationsassay

Für diesen Versuch wurden die Knorpelstücke für zwei Wochen kultiviert. Nach Ende des Versuchs wurden aus den Knorpelstücken mit Hilfe einer Lochstanze gleich große „Scheibchen“ mit 3 mm Durchmesser gestanzt. Peroxidase wurde aus zwei Gründen für diesen Versuch ausgewählt: Zum einen hat sie mit 66 Kilodalton ein ähnliches Molekulargewicht wie die Matrixmetalloproteasen und zum anderen lässt sie sich auch in großen Verdünnungen noch sehr gut nachweisen. Die Knorpelscheiben wurden dann für eine Stunde in Peroxidase Lösung gelegt (10 U/ml). Danach wurden die Knorpelscheiben in Aqua bidest. gewaschen. Jedes Knorpelstück wurde dann über Nacht bei 4 °C in 200 µl PBS geschüttelt, so dass die im Gewebe eingelagerte Peroxidase ins PBS zurück diffundieren konnte. Je 50 µl dieser Lösungen wurden auf einer Mikrotiterplatte dann mit 150 µl ABTS Lösung ((1 mg 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) in 1 ml ABTS Puffer) versetzt. Nach ca. 10 min war die Farbreaktion stark genug, so dass die Mikrotiterplatte bei 405 nm gemessen werden konnte.

## 2.2.4.11 Nitrit Bestimmung

Lösungen:

Vanadiumtrichloridlösung            8 %  $VCl_3$  in 1 N HCL

Griess Reagenz

Lösung I:                                0,2 g 1-Aminonaphthalin in 20 ml  $H_2O$   
nach sieden Überstand plus 150 ml 10 %iger Essigsäure

Lösung II:                                0,5 g Sulfanilsäure in 150 mL 10 %iger Essigsäure

Verwendung der beiden Lösungen im Verhältnis 1:1.

Die Knorpelstücke wurden für den entsprechenden Versuch für fünf Tage in serumfreien und phenolrotfreiem DMEM/F12 1:1 Medium gehalten. Phenolrotfreies Medium ist in diesem Fall vorzuziehen, da das Phenolrot die fotometrische Bestimmung stört. Nach Ende des Versuches wurden die Knorpelstücke gewogen und verworfen. Von den Mediumproben wurden jeweils 100  $\mu$ l mit 100  $\mu$ l  $VCl_3$ -Lösung und 100  $\mu$ l Griess Reagenz versetzt. Der Ansatz wurde gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Von den Proben wurden je zweimal 150  $\mu$ l auf Mikrotiterplatten übertragen und diese bei 540 nm gemessen.

## 2.2.4.12 Messung der alkalischen Phosphatase

Lösungen:

Lösung A                                0,5 % p-Nitrophenylphosphat in 1 M Diethanolamin-HCl

Lösung B                                2 M NaOH in 0,2 mM EDTA

Die alkalische Phosphatase wird in artikulärem Knorpel nur in geringem Maße produziert. Sie dient als ein Marker für hyperthrophe Chondrozyten. Die Knorpelstücke wurden für diesen Versuch über zwei Wochen mit 2 ng/ml IL-1 $\alpha$ , 25 ng/ml IL-17 und 2  $\mu$ M Retinsäure stimuliert. Das Medium wurde als Probe genommen und die Knorpelstücke gewogen. Zu 50  $\mu$ l Probe wurden 250  $\mu$ l Lösung A gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 300  $\mu$ l Lösung B hinzugegeben und die Extinktion bei 405 nm gemessen.

#### 2.2.4.13 Tierversuch

Der Tierversuch wurde an 24 männlichen Wistar Ratten durchgeführt. Die Genehmigungen der Ethik Kommission sowie des zuständigen Tierarztes lagen vor. Allen Tieren wurde ins rechte Knie des hinteren Laufs 50 µl einer Iodmonoacetatlösung (2mg/ml) zur Auslösung einer Arthrose gespritzt [132]. Das linke hintere Knie diente als Kontrolle. Die Tiere wurden in 8 Gruppen zu je 3 Tieren eingeteilt. Je eine Gruppe wurde in einem Käfig untergebracht. Die Tiere wurden im Zentraltierstall der Uniklinik Münster mit Essen versorgt und die Käfige regelmäßig vom dortigen Personal gereinigt. Die Tiere befanden sich in einem Raum, in dem ein Tag/Nacht Wechsel alle 12 Stunden stattfand. Zur Beruhigung hörten die Tiere über Tag ein paar Stunden Musik und als Abwechslung wurden zum Beispiel Klopapierrollen zum zernagen mit in die Käfige gegeben. Das Trinkwasser wurde in Absprache mit dem Personal ausschließlich von mir gewechselt. Der Versuch lief so, dass alle drei Tage eine weitere Gruppe den ABC-Transporter Inhibitor ins Trinkwasser bekam. Dafür wurde Verapamil ausgewählt, da es ein breites Spektrum an ABC Transportern hemmt und sich bis zu einer hinreichenden Konzentration in Wasser lösen lässt. Das Wasser hatte eine Endkonzentration von 0,375 mg Verapamil/ml Wasser. Da Ratten ca. 30 ml am Tag trinken, nahmen sie ca. 11,25 mg Verapamil/Tag zu sich. Gruppe 1 bekam sofort Verapamil ins Trinkwasser, Gruppe 2 nach 3 Tagen, Gruppe 3 nach 6 Tagen und so fort bis Gruppe 8, die kein Verapamil ins Trinkwasser gemischt bekam. Der Versuch endete nach 21 Tagen. Nach den drei Wochen wurden die Tiere unter Narkose mit Isofluran und Lachgas schmerzfrei getötet. Anschließend wurden die Knie freipräpariert und in 3,7 %iger Paraldehydlösung fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Gelenke für zwei Wochen in eine EDTA-Lösung zum Entkalken gegeben. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin und eine weitere Bearbeitung wie unter 2.2.4.6 beschrieben.

#### 2.2.4.14 Zytotoxizitätsassay

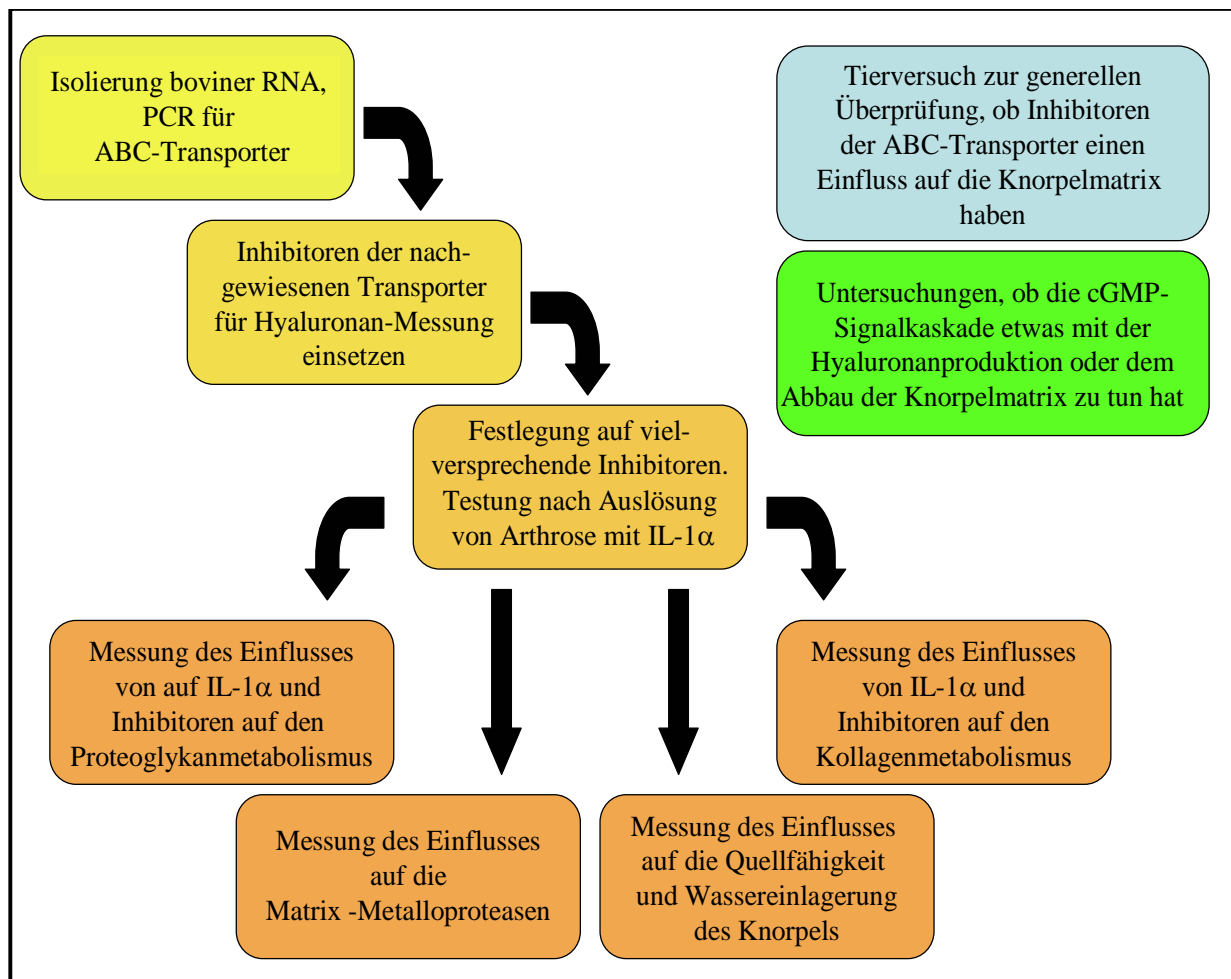
Um die eingesetzten Inhibitoren auch auf Ihre Zytotoxizität zu untersuchen, wurde der AlamarBlue™ Test verwendet. Mit diesem Test konnte man die Proliferation verschiedenster Zelllinien bestimmen wie auch die Zytoxizität einwirkender Substanzen. Der Test maß die metabolische Aktivität der Zellen, welche sich in einer Veränderung der Farbe des Redox-Indikators äußert. Zellen produzieren, wenn sie stoffwechselaktiv sind, ein reduziertes



Umfeld, die Farbe des Indikators ändert sich dann von der blauen und nicht fluoreszierenden, oxidierten Form, zur roten fluoreszierenden reduzierten Form. Die Zellen/Alginatbeads oder Knorpelstücke wurden 24 Stunden mit den entsprechenden Inhibitoren kultiviert, dann wurde das Medium gewechselt und wieder die Inhibitoren in den gleichen Konzentrationen zugesetzt. Dieses Mal wurde dem Medium allerdings auch AlamarBlue in einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden konnte die Fluoreszenz mit 530 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge gemessen werden. Als Kontrolle dienten jeweils nicht behandelte Proben. Anhand der erhaltenen Werte konnte die Toxizität der Inhibitoren auf Knorpelzellen beurteilt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Verlaufsplan der durchgeführten Versuche



Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass ABC Transporter beim Hyaluronanexport in Streptokokken eine bedeutende Rolle spielen. In der Arbeitsgruppe von Herrn Professor P. Prehm liefen auch bereits Versuche an humanen Fibroblasten und Untersuchungen des Einflusses von Inhibitoren verschiedener ABC Transporter auf die Hyaluronanausschleusung und die Hyaluronansynthese. Gleichzeitig versuchen wir ABC Transporter im Knorpel nachzuweisen, die eventuell für den Hyaluronanexport in Frage kommen. Da humaner Knorpel nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung steht, entschieden wir uns für bovinen Knorpel als Untersuchungsobjekt. Wenn ABC Transporter im Knorpel, dem für Arthrose relevanten Gewebe, identifiziert werden, können möglichst spezifische Inhibitoren für diese ABC Transporter an Knorpelstücken oder an Alginatbeads getestet werden. Bei den Inhibitoren, die den Hyaluronanexport besonders gut hemmen, dabei aber nur wenig bis gar nicht die Hyaluronansynthese beeinflussen und kaum toxisch sind, lohnt sich eine weitere Untersuchung am Knorpel. Weiterhin wird dann der Einfluss einer erhöhten

Hyaluronanproduktion auf die Knorpelmatrix untersucht und im gleichen Zug der verminderte Hyaluronanexport mit den ABC Transporter Inhibitoren. Zur Induzierung einer erhöhten Hyaluronanproduktion im Knorpel wird IL-1 dienen, da dieses Zytokin auch in vivo in erhöhten Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit arthrotischer Kniegelenke nachgewiesen werden kann. Zur Beurteilung der Knorpelmatrix werden folgende Parameter untersucht:

- Die Konzentrationen an Proteoglykanen in Knorpelstücken, deren Verlust findet im Frühstadium arthrotischer Veränderungen statt.
- Der Anteil an intakten, also nicht degradierten oder gespaltenen Kollagenfasern. Der Abbau von Kollagen gilt als Marker für die irreversible Schädigung der Knorpelstruktur, die von den Knorpelzellen nicht mehr oder nur ungenügend kompensiert werden kann. Werden an der Oberfläche des Knorpels im betreffenden Gelenk Kollagenfasern gespalten, kommt es zu einem Verlust der Matrix und Erosionen, die die Funktionalität des Gelenkes negativ beeinflussen.
- Den Einfluss von Hyaluronan und den Inhibitoren auf die Aktivität der Gelatinasen A und B, die im Knorpel für den Abbau von Kollagen II entscheidenden Anteil haben.
- Trägt Hyaluronan zu einer verstärkten Wassereinlagerung und Schwellung des Knorpels bei? Spielt die Hemmung des ABC Transporters in diesem Zusammenhang eine Rolle? Ein wichtiger Punkt, denn ob Hyaluronan auf die vorherigen Punkte einen Einfluss hat, ist so ohne weiteres nicht abzuschätzen. Wenn die bei arthrotischem Knorpel beschriebene Schwellung des Knorpels, so sie denn durch Hyaluronan verursacht wird, durch ABC Transporter Inhibitoren vermindert werden kann, wird weiter zu untersuchen sein, inwieweit dieser Effekt auch einen positiven Einfluss die anderen Matrixbestandteile besitzt.

Da wir mit einem Tierversuch nicht zu lange warten möchten, bis sich ein spezieller Transporter herauskristallisiert hat, wird zu Beginn der Arbeit ein Versuch mit Ratten durchgeführt mit einem ABC Transporter Inhibitor, der ein breites inhibitorisches Wirkspektrum aufweist. Die Knorpel der Ratten werden erste Aufschlüsse geben, ob ABC-Inhibitoren nach Arthroseauslösung mittels Iodacetat die Knorpelmatrix beeinflussen.

Die Beurteilung des cGMP Signalweges und dessen Beeinflussung ergibt sich zum einen durch die Auslösung der arthrotischen Veränderung mit IL-1 $\alpha$ , welche eine Erhöhung von cGMP nach sich zieht, zum anderen wird diese Fragestellung im Verlauf der Arbeit noch wichtiger, da einige Inhibitoren wiederum diesen Signalweg beeinflussen und ebenfalls zu erhöhten cGMP Spiegeln beitragen.

## 3.2 Untersuchungen zur Hyaluronanausschleusung

### 3.2.1 Nachweis von ABC Transportern

Nach der Entnahme des Knorpels aus den Rinderknien wurden die Knorpelstücke mit Kollagenase behandelt. Nach Filtration durch mit Nylonmembranen bestückten Swinexfilter und anschließendem Waschen in kaltem PBS waren die Chondrozyten fertig zur RNA Isolierung. Mit Ausnahme der Sequenz für MDR1 waren alle anderen Sequenzen für die ausgewählten ABC Transporter für Rinder unbekannt. Deshalb wurden die humanen Primer für die ABC Transporter bestellt. Es wurden in der Folge also Interspezies-PCR durchgeführt. Zwischen Rind und Mensch besteht eine ca. 91 prozentige Homologie der Gensequenzen. Bei den durchgeführten PCRs wurde diesem Umstand durch erniedrigte Annealingtemperaturen und höherer Zyklenzahl Rechnung getragen.

ABC Transporter	Substrate
MDR1	diverse Stoffgruppen
MRP1	anionische Konjugate
MRP4	Prostaglandine (nur MRP4), Methotrexat und cGMP
MRP5	
MRP6	u.a. Anthrazykline
MRP7	Xenobiotika+Glucuronsäure
MRP8	ähnlich MRP4/5
ABCA1	Cholesterol
ABCB5	Doxorubicin
ABCF1	u.a. Proteine

**Abb. 20:** Untersuchte ABC-Transporter und ihre Substrate

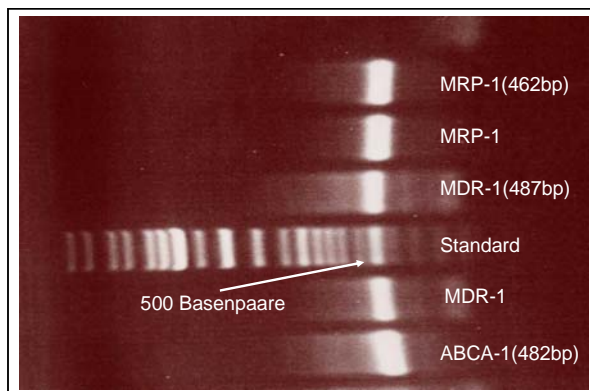
Da es nicht sinnvoll war, für alle 48 humanen ABC Transporter Primer zu bestellen und bei jedem erst in mehreren PCRs die optimalen Bedingungen herauszufinden, wurde im Vorfeld die Substratspezifität der Transporter recherchiert. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die ABC-Transporter gelegt, die etwas mit Hyaluronan oder im weiteren Sinne mit der extrazellulären Matrix zu tun haben sowie diejenigen, die anionische Substrate transportieren. Auf MDR1, der auch ABCB1 oder p-Glycoprotein genannt wird, wurden die Chondrozyten hin untersucht, da dieser Transporter ubiquitär in vielen Geweben vorkommt und gleichzeitig eine Vielzahl von Stoffgruppen transportieren kann [133]. Des weiteren wurde MDR1 bereits in Knorpeltumoren und in bovinen Chondrozyten der Wachstumsfuge nachgewiesen [134]. MRP1 (ABCC1) transportiert organische anionische Konjugate wie Cysteinyl-Leukotrien C4, Glutathion und Glutathion konjugierte Xenobiotika [135]. MRP1 sowie auch seine Homologe MRP2 - MRP6 sind alle dafür bekannt, konjugierte organische Anionen zu transportieren [136], weshalb diese Transporterfamilie besonders intensiv untersucht wurde. MRP4 und MRP5 weisen eine hohe Ähnlichkeit auf, ihnen fehlten im Gegensatz zu anderen Multidrug Related Proteins fünf transmembranäre Domänen am N-

Da es nicht sinnvoll war, für alle 48 humanen ABC Transporter Primer zu bestellen und bei jedem erst in mehreren PCRs die optimalen Bedingungen herauszufinden, wurde im Vorfeld die Substratspezifität der Transporter recherchiert. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die ABC-Transporter gelegt, die etwas mit Hyaluronan oder im weiteren

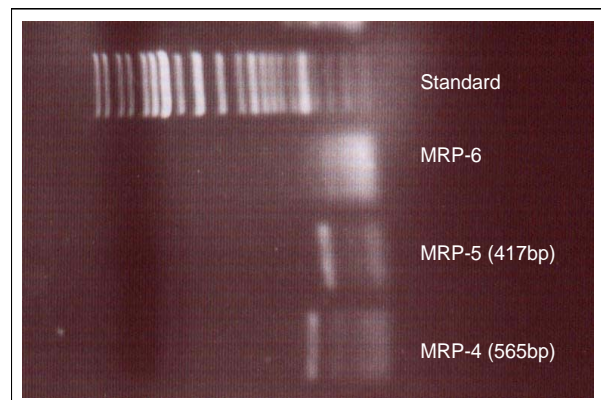
terminalen Ende [137]. Beide Transporter besitzen die Fähigkeit, Methotrexat und cyclische Nukleotide zu transportieren [138]. Für MRP5 sind der Transport weiterer organischer Anionen bekannt [139]. Darüber hinaus soll er eine besondere Affinität zu cGMP haben, dessen Transport allerdings mit PDE5 Hemmern wie Sildenafil und Trequinsin gehemmt werden kann [140].

MRP6 wurde ausgewählt, da bekannt ist, dass bei Patienten, welche eine Mutation in der Sequenz für MRP6 haben, die Krankheit Pseudoxanthoma elasticum oder auch Grönblad Strandberg Syndrom ausbricht. Bei dieser Krankheit kommt es zu einer Veränderung des Bindegewebes durch vermehrtes Auftreten von Proteoglykanen und Hyaluronan sowie einer Einlagerung von Mineralsalzen [141]. Die Bindegewebsfasern werden brüchig und es kommt zu Beeinträchtigungen der Haut, der Gefäße und des Herzkreislaufsystems. Infolge Einblutungen in die Netzhaut kommt es zum Verlust des zentralen Sehens.

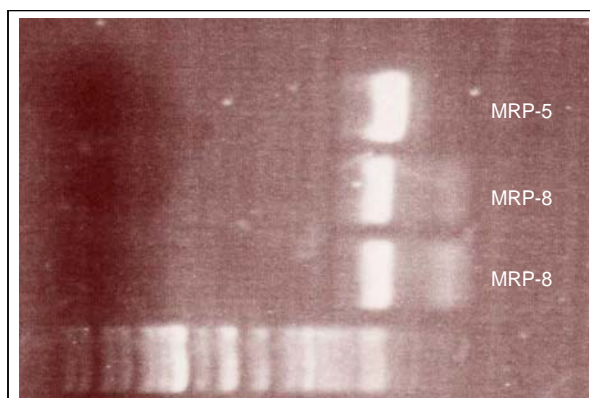
MRP7 (oder auch ABCC10) transportiert zum Beispiel 17 $\beta$ -Estradiol-(17 $\beta$ -D-Glucuronsäure),



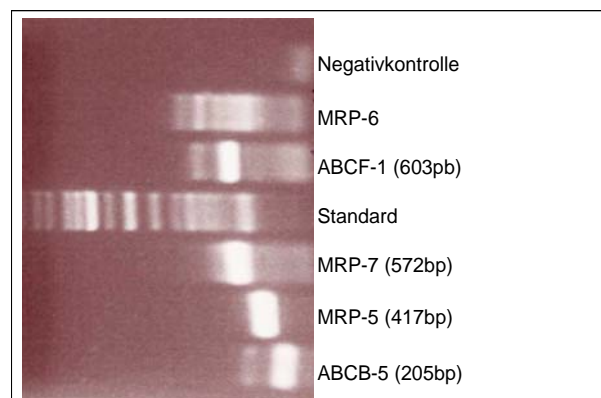
**Abb. 21:** PCR mit DNA aus bovinen Chondrocyten, Nachweis MRP-1, MDR-1 & ABCA-1



**Abb. 22:** PCR mit DNA aus bovinen Chondrocyten, Nachweis MRP-4 & MRP-5. MRP-6 nicht nachweisbar.



**Abb. 23:** PCR mit DNA aus bovinen Chondrocyten, Nachweis MRP-5(ABCC5) & MRP-8(ABCC11)



**Abb. 24:** PCR mit DNA aus bovinen Chondrocyten, Nachweis MRP-5, MRP-7, ABCB-5 & ABCF-1

also eine anionische Verbindung, die insbesondere deshalb interessant ist, weil sie konjugierte Glucuronsäure transportiert [142], eine Komponente der Dissaccharideinheit von Hyaluronan.

MRP8 und MRP9 wurden später ebenfalls noch getestet, als klar war, dass in den bovinen Chondrozyten MRP5 nachgewiesen konnte, da diese beiden ABC-Transporter eng mit MRP5 verwandt sind. Die Übereinstimmung beträgt 40 bzw. 42% der Aminosäuresequenz von MRP5 [143]. Aufgrund der hohen Verwandtschaft zu den bakteriellen Hyalurantransportern wurde auch die ABCA Transporterfamilie untersucht. Diese Familie spielt eine Rolle beim Fettstoffwechsel. So transportiert der ABCA1 Kanal zum Beispiel Cholesterol [144]. Neben diesen beschriebenen Transportern wurde auch auf ABCB5 und ABCF1 getestet.

Bis auf den MRP6 Transporter konnten alle eingesetzten Transporter im Knorpel nachgewiesen werden. Die Banden der Transporter mit der dazugehörigen Länge des PCR Produktes sieht man in den Abbildungen 21-24. Nach der PCR wurden die Banden der jeweiligen Transporter kloniert und sequenziert. Abschließend wurde eine Blastanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob die klonierten Sequenzen tatsächlich zu den jeweiligen Transportern gehörten. Da mit boviner DNA gearbeitet wurde, sollte eine Übereinstimmung von 91% zu den humanen Sequenzen der ABC Transporter gefunden werden, da dies der generellen Übereinstimmung der Nucleotidsequenz zwischen Mensch und Kuh entspricht. Als ein Beispiel einer solchen Blastanalyse ist Abbildung 25 eingefügt.

```

 >gi|5032100|ref|NM_005688.1| LUG Homo sapiens ATP-binding cassette, sub-famil
(ABCC5), mRNA
Length = 5838

Score = 513 bits (259), Expect = e-142
Identities = 377/414 (91%), Gaps = 2/414 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 72 aactgctgtgCGAAAGATAAAATCGGGAAAGGCAAGGTTTCGGCAGGAGGACGCAGTGAG 131
          |||
Sbjct: 4563 aactgctgtgCGAAAGATAAAATCGAGAAAGGCAAGGTTTCGGTAGGAGGACGCAGTGAG 4504

Query: 132 gggcccgccccaggcagggaaatggcaatgctccaaagaaaagagatgtggcagggcactgg 191
          |||
Sbjct: 4503 gggcccgccccaggcagggaaatggcaatgctctaaagaaaagagacttctgcaacag-gg 4445

Query: 192 gggagtttagcccttgacggcgatcttgttctctgCAGCAGCAAACATGGCATAGAACC GG 251
          |||
Sbjct: 4444 aggagtcagcccttgacagcgaccttgttctctgCAGCAGCAAACATGGCATAGAATCGG 4385

Query: 252 gagctgtcgTtggaaagaaggaccgatggggtgtcgaactccaccacctgcccctggggc 311
          |||
Sbjct: 4384 gaactgtcgTtggacagaaggaccgatggggtgtcgaactccaccacctgtccctggggc 4325

Query: 312 agcaccataatcctatcagagcctaggactgtgtgtaggcgatgggcaatcgTcagcatg 371
          |||
Sbjct: 4324 agcaccataatcctatcggagcctagaaccgtgtgtaggcgatgggcaatggTcagcatg 4265

Query: 372 gtgcagtcagcgaatgcttctcggatgggtctcttggatcagtaagtctgtctcggctcgtc 431
          |||
Sbjct: 4264 gtacagtcctgcaaatgcttctcggatgggtctcttgaatcaataagtctgtctctgt-gtc 4206

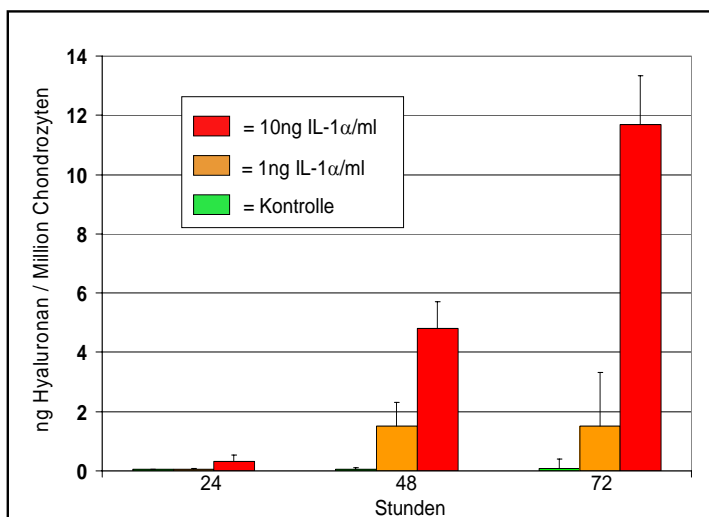
Query: 432 catggcagctgnggcttcatctagaatcagaatcttacagtgccggaccagggc 485
          |||
Sbjct: 4205 catggcagctgtggcttcatctaaaatcagaatcttacagtgccggagcagggc 4152

```

**Abb. 25:** Blastanalyse der bovinen MRP-5 Sequenz

### 3.2.2 Induzierung der Hyaluronansynthese mit IL-1 $\alpha$

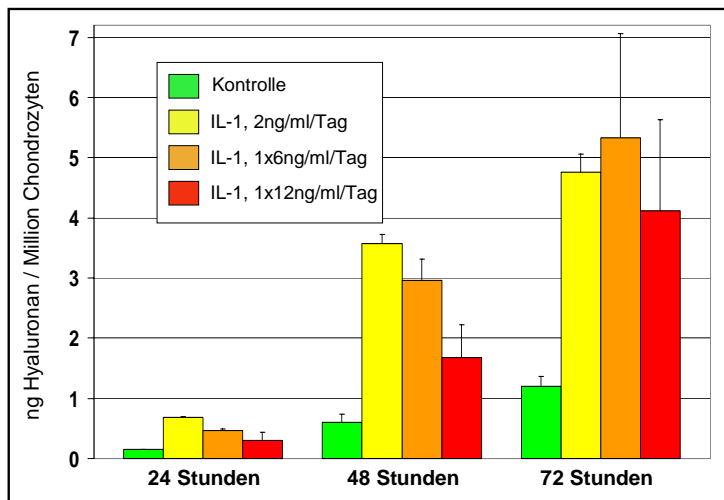
Zu Beginn der Arbeit wurde untersucht, wie viel IL-1 $\alpha$  über einen wie langen Zeitraum auf Chondrozyten einwirken muss, um eine deutlich vermehrte Hyaluronansynthese im Knorpel zu induzieren. Mit der richtigen Dosierung an IL-1 $\alpha$  wurde danach dann der Effekt einer gesteigerten Hyaluronansynthese auf die Knorpelmatrix analysiert. Für die Experimente wurden in Alginat eingebettete Chondrozyten eingesetzt, da die Alginatbeads ähnlich wie die Proteoglykane im Knorpel auch negativ geladen sind und die Knorpelzellen im Alginatgel genau wie im Knorpel keinen direkten Kontakt zueinander haben. Ein weiterer Vorteil ist, dass nach Beendigung eines Versuches die Alginattropfen in Natriumcitrat aufgelöst werden



**Abb. 26:** In Alginatbeads mit IL-1 $\alpha$  induzierte Hyaluronansynthese

konnten und ein Teil der Lösung zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt werden kann. Die Versuche wurden zu Beginn immer in DMEM mit zehnprozentigem FCS durchgeführt. Bei Messung der Mediumproben mit dem unter 2.2.4.1 beschriebenen ELISA Test konnten aber nur unwesentliche Unterschiede zwischen Kontrollen und mit IL-1 $\alpha$  versetzten Proben festgestellt werden. Es stellte sich heraus, dass FCS die ELISA Messung erheblich stört. Deshalb wurde der Test in serumfreien Medium durchgeführt. Dies war sowohl mit Alginatbeads als auch mit Knorpelgewebe möglich, bei adhären Zellen ist es dagegen schon schwierig, da sie beginnen, sich vom Untergrund abzulösen. Mit serumfreien Medium wurden signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und mit IL-1 $\alpha$  behandelten Proben erhalten. Bei der Frage nach der IL-1 $\alpha$  Konzentration wurde einfach nach der Methode „Versuch und Irrtum“ vorgegangen. Wir wollten einen Kompromiss finden zwischen einem sichtbaren Effekt einerseits und einem geringem Kostenaufwand andererseits. Als Ideal erwies sich eine Konzentration von 2ng IL-1 $\alpha$ /ml Medium/Tag. Dies ist im Verhältnis zu anderen in der Literatur benutzen Konzentrationen zwar eine relativ geringe Konzentration [145], durch die tägliche Gabe wirkt es aber kontinuierlich und es kommt der physiologischen Situation im Gelenk auch näher, denn dort liegen die Entzündungsmediatoren auch in konstanten Konzentrationen vor. IL-1 $\alpha$

wurde auch deshalb als Zytokin ausgewählt, weil es in arthrotischen Gelenken nachgewiesen



**Abb. 27:** Hyaluronansynthese in Alginatebeads

von IL-1 $\alpha$ . Die Hyaluronankonzentration steigt über drei Tage abhängig von der Höhe der IL-1 $\alpha$  Gabe. In einem weiteren Versuch wurde in Alginatebeads untersucht, ob eine einmalige Gabe von IL-1 $\alpha$  gegenüber der täglichen Gabe kleinerer Mengen vorteilhafter ist. Dafür wurde die Hyaluronankonzentration in Medium von Alginatebeads täglich über drei Tage gemessen (Abb.27). Die Hyaluronansynthese sprach bei der täglichen Gabe von 2 ng/ml im Durchschnitt am besten an, während höhere Dosen von bis zu 12 ng/ml am ersten Tag keinen deutlicheren Effekt zeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse, welche sich bei der Messung der Proteoglykane bestätigen sollten, wurde als Standardkonzentration für die IL-1 $\alpha$  Gabe 2 ng/ml/Tag über drei Tage in Kultur gewählt und für alle Versuche, in denen die Hyaluronanproduktion der Chondrozyten gemessen wurde, beibehalten.

wurde [146].

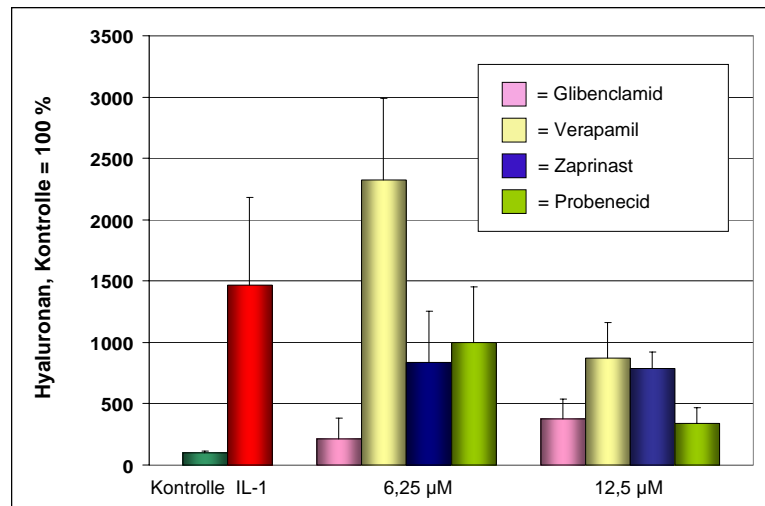
Aufgrund dieser Tatsache und er in der Einleitung beschriebenen Effekte, erschien das Zytokin Interleukin-1 $\alpha$  geeignet, um bei bovinen Knorpelstücken in vitro Arthrose auszulösen. Abbildung 26 zeigt die Hyaluronankonzentration im Medium von in Alginatebeads kultivierten Chondrozyten nach einmaliger Gabe



### 3.2.3 Inhibierung der Hyaluronanseznernierung mit verschiedenen ABC Trans – porter Inhibitoren

Von den in bovinen Knorpel nachgewiesenen ABC Transportern wurden die ABCA1, MDR1, MRP1 sowie MRP5 Kanäle näher auf ihre Beteiligung bei der Hyaluronanseznernierung untersucht. Dies sollte mit Hilfe entsprechender Inhibitoren dieser Transporter geschehen. Als Inhibitoren wurden Glibenclamid(ABCA1) [147] , Verapamil(MDR1), Probenecid(MRP1) und Zaprinast(MRP5) [148]

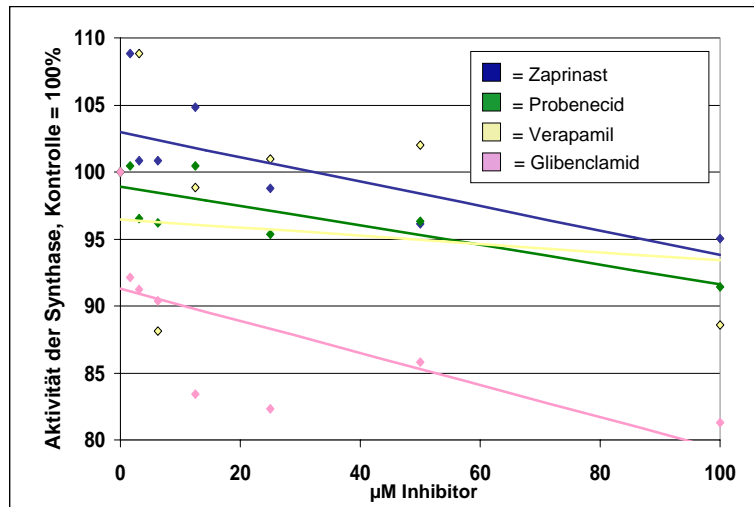
ausgewählt. Der Versuch wurde mit jeweils drei Knorpelstücken pro Loch einer 24-Loch Platte durchgeführt. Pro Messwert standen vier Proben zur Verfügung (Kontrolle und IL-1 $\alpha$  = sechs). Die Hyaluronkonzentration im Mediumüberstand wurde nach vier Tagen gemessen und Dreifachbestim-



**Abb. 28:** Hyaluronan im Medium von Knorpelkulturen

mungen durchgeführt. Wie auch bei den Alginatekulturen wurde jeden Tag 2ng IL-1 $\alpha$ /ml zu dem Medium gegeben. Mit IL-1 $\alpha$  wurde eine Erhöhung der Hyaluronkonzentration im Medium auf 1470 % des Kontrollwertes erreicht. Verapamil schien diesen Effekt bei 6,25  $\mu$ M noch zu übertreffen. Die übrigen Inhibitoren reduzierten die Hyaluronkonzentration im Medium. Einen besonders starken Effekt zeigte Glibenclamid, der ABCA1 Transporter Inhibitor. 6,25  $\mu$ M Probenecid und Zaprinast verminderten den Mediumgehalt des Glycosaminoglykans auf etwa 2/3 des mit IL-1 $\alpha$  stimulierten Messpunktes. Probenecid schien bei 12,5  $\mu$ M noch stärker wirksam zu sein als Zaprinast. Welche Effekte im Einzelnen an der verminderten Hyaluronkonzentration beteiligt sind, sollten Gegenstand weiterer Forschungen sein. Im Folgenden wurde der Einfluss dieser Inhibitoren auf die Hyaluronansynthese untersucht.

### 3.2.4 Untersuchung des Einflusses von ABC Transporthemmern auf die Hyaluronansynthese



**Abb. 29:** Hemmung der HA-Synthese durch die Inhibitoren

Um abschätzen zu können, ob der inhibitorische Effekt bei der Hyaluronansezernierung durch die Hemmung des jeweiligen ABC Transporters oder durch die Hemmung der Hyaluronansynthese zustande kam, wurde durch den Einbau [ $^{14}\text{C}$ ]Glucuronsäure aus UDP- $^{14}\text{C}$  GlcA die Syntheseaktivität an isolierten Chondrozytenmembranen

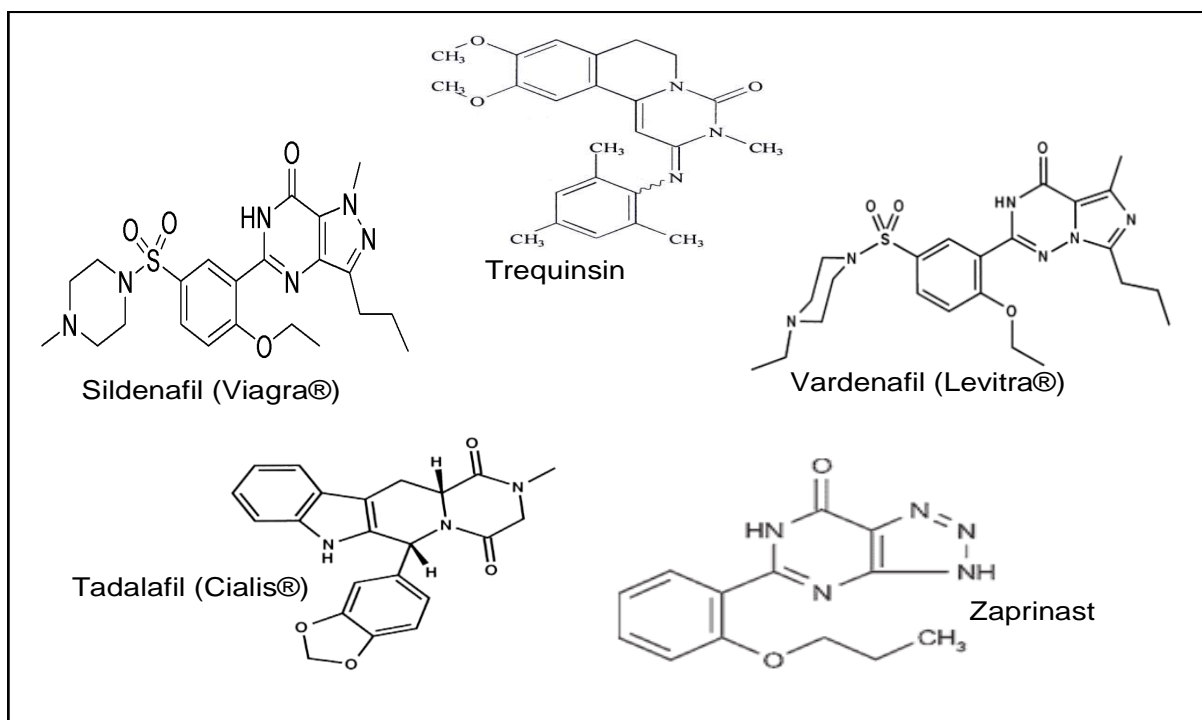
bestimmt. Dabei wurden die ABC-Transporter Inhibitoren Verapamil (MDR1), Probenecid (MRP1), Glibenclamid (ABCA1) und Zaprinast (MRP5) in einer Konzentration von 0-100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Im relevanten Konzentrationsbereich bis 50  $\mu\text{M}$  zeigte Glibenclamid eine gewisse Hemmung der Synthese (rosa Linie). Die anderen drei Substanzen beeinträchtigten die Hyaluronansynthese nicht signifikant.

### 3.2.5 Untersuchung des Einflusses von MRP5 Inhibitoren auf die Hyaluronansezernierung

Parallel zu meinen Untersuchungen an bovinem Knorpel und dem Nachweis von MRP5 untersuchte Herr Professor Prehm an humanen Fibroblasten den Hyaluronan-Export mit verschiedenen ABC Transporter Inhibitoren. Seine Ergebnisse wiesen ebenfalls auf MRP5 als möglichen Transporter für Hyaluronan hin [149]. In der parallel durchgeführten Dissertation von Herrn Diplom Biochemiker Tobias Schulz deuteten Arbeiten mit si-RNA Versuchen für ABC Transporter mit verschiedenen Zelllinien auf eine Beteiligung von MRP5 an der Hyaluronanausschleusung hin. Aufgrund dieser gemeinsamen Ergebnisse wurden die Untersuchungen zur Hyaluronanausschleusung auf den MRP5 Kanal fokussiert

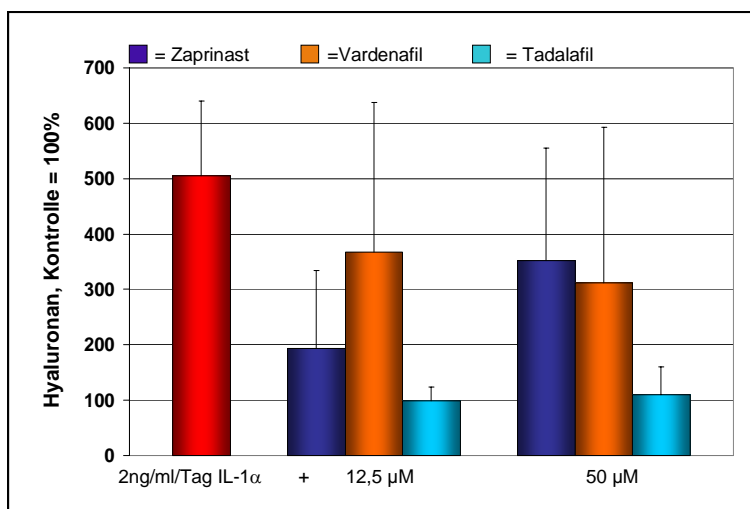
Als Inhibitoren für den MRP5 Transporter sind Zaprinast, Sildenafil und Trequinsin bekannt. Sie gehören alle zu den Phosphodiesterase Hemmstoffen. Dabei haben Zaprinast und dessen um ein Sulfonamid erweitertes Analogon Sildenafil eher Phosphodiesterase5 Präferenz, während Trequinsin besonders PDE3 und 4 hemmt. Die erst 2004 in den deutschen Markt eingeführten Medikamente Levitra® und Cialis® mit den Wirkstoffen Vardenafil und Tadalafil sind ebenfalls PDE5 Hemmer, so dass auch diese beiden Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung bezüglich des MRP5-Kanals getestet wurden. Insbesondere Vardenafil weist auch chemisch eine sehr große Ähnlichkeit zu Sildenafil auf (Abb 30).

Diese Inhibitoren mit MRP5 Präferenz wurden auf Alginatbeads getestet wie im Material und



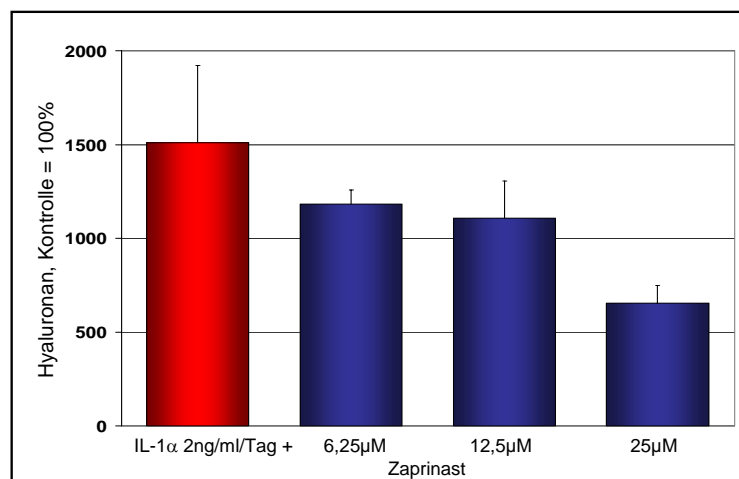
**Abb. 30:** Phosphodiesterase5 Inhibitoren

Methodenteil beschrieben. Da Knorpel ein sehr heterogenes Gewebe ist, spricht der Knorpel auf gleiche Dosen IL-1 $\alpha$  zum Teil unterschiedlich stark an. Neben der heterogenen Beschaffenheit des Knorpels mögen auch individuelle Unterschiede der Rinder (Alter, Haltung, Erbgut) eine Rolle spielen. Wir führten unsere Versuche zur Messung des Hyaluronans sowohl mit Knorpelstücken als auch mit Alginatbeads durch. Im Vordergrund stehen in diesem Teil die Versuche an Alginatbeads, da wir hier die Hyaluronankonzentration im Medium in direkte Korrelation zur Zellzahl stellen konnten und nicht wie bei den Knorpelstücken auf das Gewicht der einzelnen Stücke. Da in den Beads viele Chondrozyten als eine homogene Mischung vorliegen, erschien uns diese Methode reproduzierbarer und



**Abb. 31:** Hyaluronan im Überstand von Knorpeln mit Inhibitoren

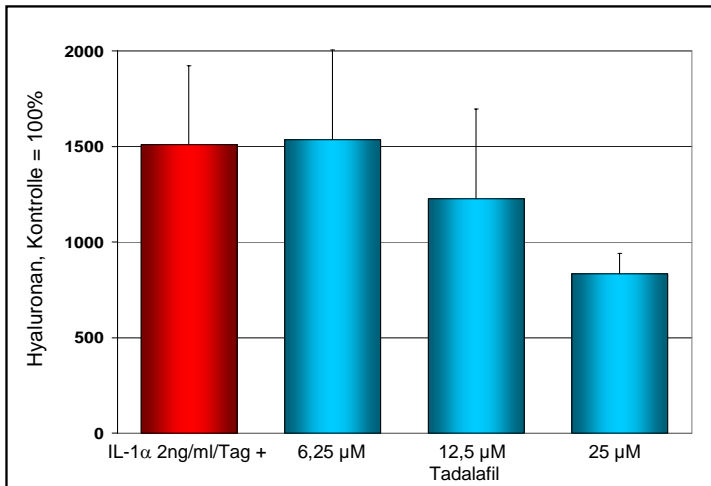
besseren Wiedererkennung und Zurechtfindung in dieser Arbeit sei noch folgendes angemerkt: IL-1 $\alpha$  oder Retinsäure sind in den Abbildungen jeweils rot eingefärbt, Zaprinst marineblau, Vardenafil orange und Tadalafil hellblau. Man erkennt eine rund fünffache Erhöhung der Hyaluronankonzentration im Überstand der Knorpel in den mit IL-1 $\alpha$  behandelten Proben (je sechs) im Vergleich zur Kontrolle. Bei den mit IL-1 $\alpha$  und den Inhibitoren inkubierten Knorpeln sieht man eine Reduzierung der Hyaluronankonzentration im Überstand. Im Fall von Tadalafil wird sogar der Kontrollspiegel erreicht. Der Nachteil der Messung



**Abb. 32:** Inhibierung der Hyaluronansekretion mit Zaprinst

an Knorpelstücken wird hier an den recht großen Fehlerbalken noch mal deutlich.

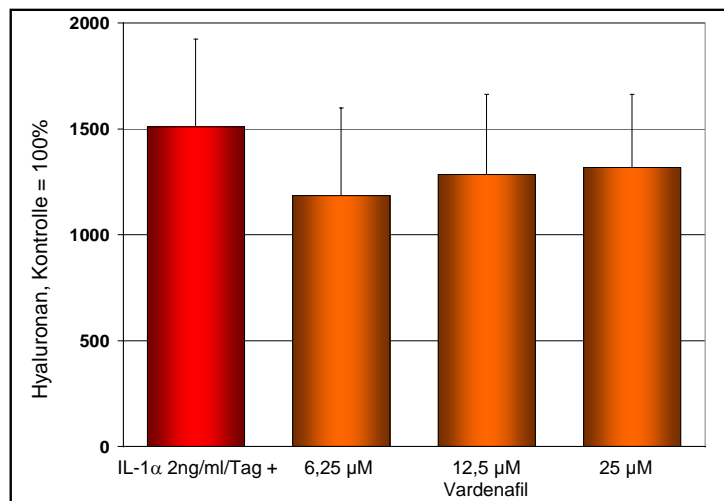
Auf der vorhergehenden Seite sieht man in Abbildung 32, wie Zaprinast die Hyaluronan-



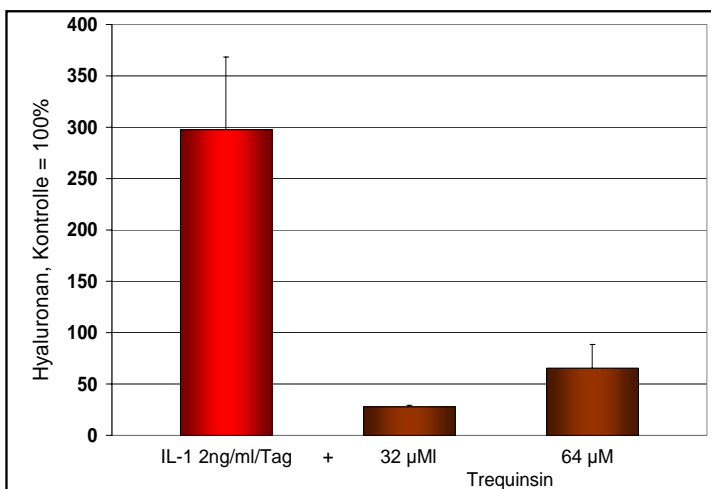
**Abb. 33:** Inhibierung der Hyaluronanausschleusung mit Tadalafil

Alginatbeads konnte eine reduzierte Konzentration von Hyaluronan im Medium verglichen mit den mit IL-1α allein inkubierten Proben nachgewiesen werden.

In der Abbildung 33 links ist Hyaluronankonzentration im Medium von Alginatbeadkulturen mit Tadalafil gemessen worden. Um 6,25 μM ist bei allen drei PDE-5



**Abb.34:** Inhibierung der Hyaluronanausschleusung mit Vardenafil



**Abb. 35:** Inhibierung der Hyaluronanausschleusung mit Trequinsin

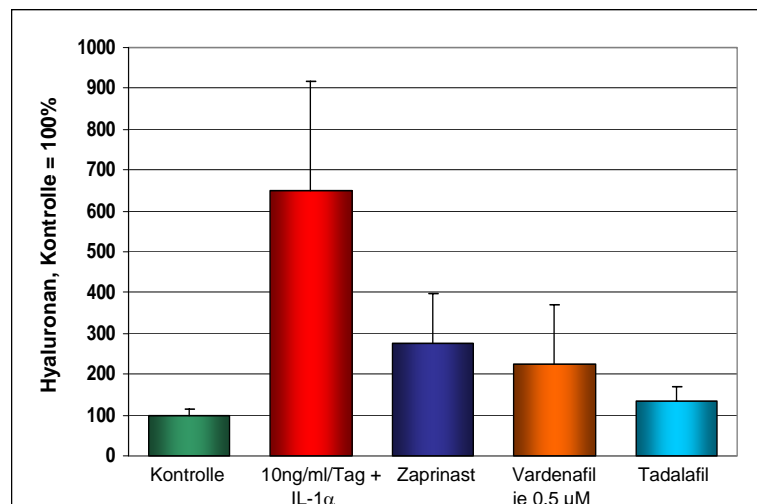
ausschleusung ins Medium in Alginatbeadkultur senkt. Deutlich zu erkennen der beschriebene Unterschied zwischen Knorpel und Alginatbeads:

Die Standardabweichungen sind in Abbildung 32 wie auch den anderen in Alginat durchgeführten Versuchen geringer. Die Ergebnisse aus den Versuchen mit Knorpelstücken bestätigten sich, auch mit

Inhibitoren die Wirksamkeitsgrenze betreffend einer reduzierten Hyaluronanausschleusung erreicht. Darunter sind bei den hier gewählten Versuchsbedingungen mit 2ng IL-1α/ml/Tag keine Effekte mehr zu beobachten. Auch bei Tadalafil bestätigten sich die Ergebnisse aus den Experimenten mit Knorpelstücken, bis auf den Hyaluronan-

spiegel der Kontrolle konnte Tadalafil die Hyaluronanausschleusung allerdings nicht zurückfahren. In Abbildung 34 ist die Hyaluronankonzentration im Medium von Alginatebeadkulturen mit IL-1 $\alpha$  und Vardenafil dargestellt. Der Effekt einer verminderten Hyaluronansekretion ist hier nicht so stark ausgeprägt wie bei Zaprinast und Tadalafil. Dies entspricht den mit Knorpelstücken gemessenen Werten. Wiederholungen dieser Versuche bestätigten den etwas schwächeren hemmenden Effekt von Vardenafil auf den MRP5 Transporter. Zu Beginn der Arbeit wurde auch der Einfluss von Trequinsin auf die Hyaluronanausschleusung gemessen. Es konnten sehr starke inhibitorische Effekte nachgewiesen werden, die die Hyaluronan-konzentration im Medium unter die der Kontrolle reduzierte, wie in Abbildung 35 zu sehen ist. Aufgrund des sehr hohen Preises für diese Substanz und der Tatsache, dass es im Gegensatz zu Vardenafil und Tadalafil nicht als zugelassenes Arzneimittel auf dem Markt ist, wurde Trequinsin für weitere Experimente nicht mehr berücksichtigt.

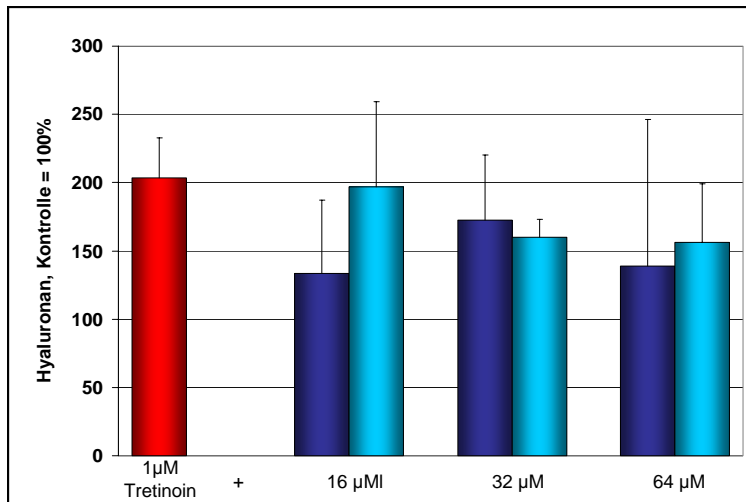
Für jeden Inhibitor wurden mindestens zwei Wiederholungen der Versuche im Konzentrationsbereich zwischen 6,25 -50  $\mu\text{mol/l}$  angesetzt, die die Ergebnisse der obigen Abbildungen im Trend wiedergaben. Um einen Effekt der PDE5 Hemmstoffe auch bei geringeren Konzentrationen zu sehen, wurde die IL-1 $\alpha$  Gabe von 2ng/ml/Tag auf 10ng/ml/Tag verfünffacht. Sonst blieb der Versuchsaufbau gleich und nach drei Tagen



**Abb. 36:** Reduzierte Hyaluronanausschleusung mit je 0,5 $\mu\text{M}$  der Inhibitoren

wurde das Medium von den Alginatebeads eingesammelt und die Beads aufgelöst um die Zellen zu zählen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind oben in Abbildung 36 aufgeführt. Dort sieht man bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 0,5  $\mu\text{mol/l}$  eine deutliche Senkung der Hyaluronanausschleusung. Wieder zeigte Tadalafil die größte Reduktion der Hyaluronankonzentration im Medium von den drei PDE5 Hemmstoffen. Dieser Versuch zeigte die verminderte Hyaluronanausschleusung auch bei geringeren Dosierungen. Die weiteren Versuche wurden wieder mit der bisherigen IL-1 $\alpha$  Konzentration von 2ng/ml/Tag durchgeführt, da noch höhere Dosierungen zum einen nicht die in vitro Bedingungen

realistisch imitieren und da ein höherer IL-1 $\alpha$  Einsatz für die Arbeitsgruppe unwirtschaftlich wäre.



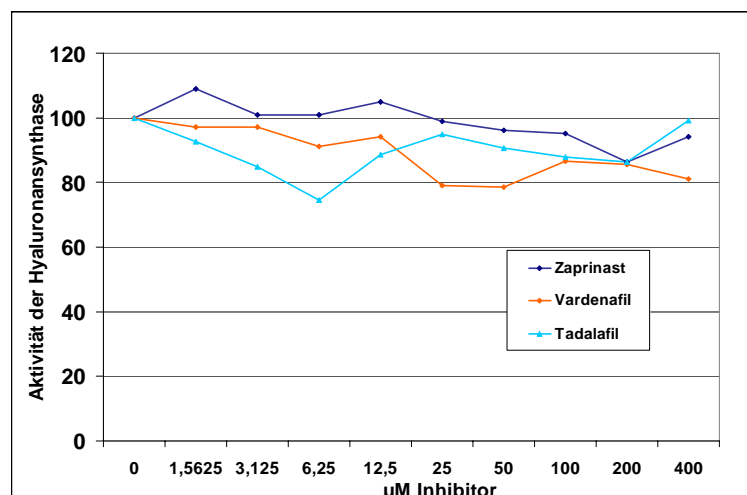
**Abb. 37:** Induzierung der HA-Synthese und Inhibierung der Ausschleusung mit Zaprinast und Tadalafil

Nach diesen Untersuchungen wurde der Einfluss von Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil auf die Hyaluronanproduktion nach Inkubation mit Retinsäure untersucht. Die all-trans-Retinsäure wirkt stimulierend auf die Hyaluronansynthese durch eine Erhöhung der HAS2 mRNA Expression in Chondrozyten [150]. Hier spielt also die

hormonartigen Wirkungen vieler Vitamin A Derivate eine Rolle. Wenn Hyaluronan über den MRP5 Transporter transportiert wird, müssten die PDE5 Inhibitoren auch nach Inkubation mit Retinsäure die Hyaluronanausschleusung vermindern. In Abbildung 37 links ist ein Versuch mit Retinsäure dargestellt. Die eingesetzte Menge von 1 µM Retinsäure führte zu einer moderaten Erhöhung der Hyaluronankonzentration um 100%, trotzdem konnte man mit den PDE5 Hemmstoffen eine vom Trend her reduzierte Hyaluronanausschleusung beobachten. Wir schließen daraus, dass die verminderte Hyaluronankonzentration im Medium nicht durch eine Hemmung des IL-1 $\alpha$  Signalweges durch die PDE5 Inhibitoren zustande kommt.

### 3.2.6 Auswirken der PDE5 Inhibitoren auf die Hyaluronansynthese

Um abzuschätzen, ob die Hemmung der Hyaluronanproduktion auf die Hemmung des MRP5 Kanals oder auf die Hemmung der Hyaluronansynthese zurückzuführen ist,



**Abb. 38:** Beeinflussung der Syntheseaktivität durch MRP5-Inhibitoren

wurde isolierte Chondrozyten-membranen mit den Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil und radioaktiven Sulfat inkubiert wie unter Material und Methoden beschrieben. In Abbildung 38 sieht man die Ergebnisse des Versuchs. Zaprinast zeigte so gut wie keine Hemmung, während Vardenafil und Tadalafil bei unterschiedlichen Konzentrationen die Syntheseaktivität ein wenig reduzierten, aber dieser Effekt kann nicht als Erklärung für die starke Senkung der Hyaluronansäuresynthese herangezogen werden. Die verminderte Hyaluronanproduktion nach Gabe der Inhibitoren ist also auf die Hemmung des MRP5 Kanals zurückzuführen.

### 3.2.7 Untersuchungen zur Toxizität der eingesetzten Stoffe

Um zu untersuchen, ob die eingesetzten Stoffe aufgrund einer toxischen Wirkung den Stoffwechsel und die Syntheseleistung der Chondrozyten beeinträchtigen, wurde mit dem Alamar-Blue® Assay die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen. Dabei wurde sowohl die Stoffwechselrate mit Alginatbeads und mit Knorpelstücken

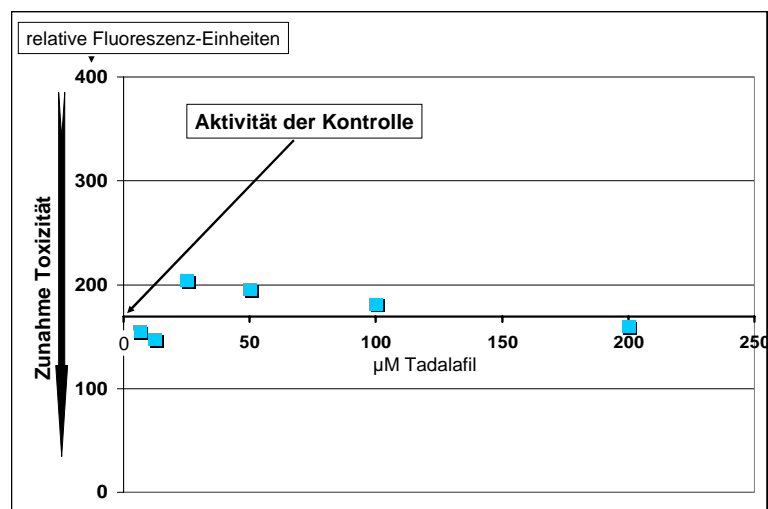


Abb. 39: Toxizität von Tadalafil, gemessen am Knorpel

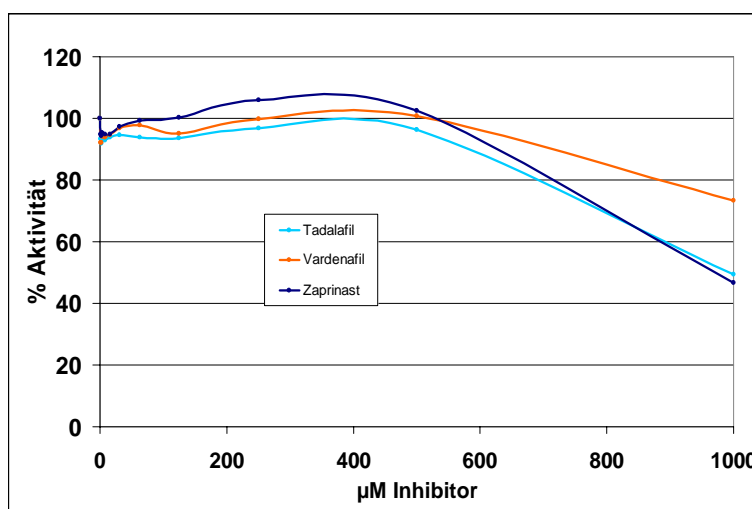


Abb. 40: Toxizität der MRP-5 Inhibitoren auf bov. Chondrozyten

gemessen. Die jeweiligen Proben wurden für 24 Stunden mit unseren Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil inkubiert und dann gemessen. In erster Linie beobachteten wir den Konzentrationsbereich bis 100 µM, denn dies war die höchste in unseren Versuchen eingesetzte Konzentration. Sowohl bei der Messung von Knorpel, wie in



Abbildung 39 mit Tadalafil gezeigt, sowie in Abbildung 40 mit allen drei Inhibitoren an in Alginate kultivierten bovinen Chondrozyten, konnten wir keine Verminderung der Stoffwechselaktivität bis 200  $\mu\text{mol/l}$  und deutlich darüber hinaus feststellen. Effekte, welcher Art auch immer, haben also nicht mit einer beeinträchtigten Vitalität unserer Zellen zu tun. Auch in der Literatur sind Zytotoxizitätsstudien zu MRP5 Inhibitoren beschrieben. In ihnen konnten ebenso keine toxischen Effekte in Zellkultur in diesem Konzentrationsbereich beobachtet werden [151].

### 3.2.8 Histochemischer Hyaluronannachweis im Knorpel

Nachdem in Überständen von Zell- und Organkulturen die Hyaluronankonzentration gemessen worden ist, wurde nun die Hyaluronankonzentration direkt im Knorpel histologisch untersucht. Dazu wurden Knorpelstücke für fünf Tage in DMEM kultiviert mit IL-1 $\alpha$  und den PDE5/MRP5 Inhibitoren Zaprinast und Tadalafil versetzt. Der Nachweis erfolgte wie in dem von uns eingesetzten ELISA mit biotinylierten Aggrekan. In den Abbildungen 41 - 44 sieht

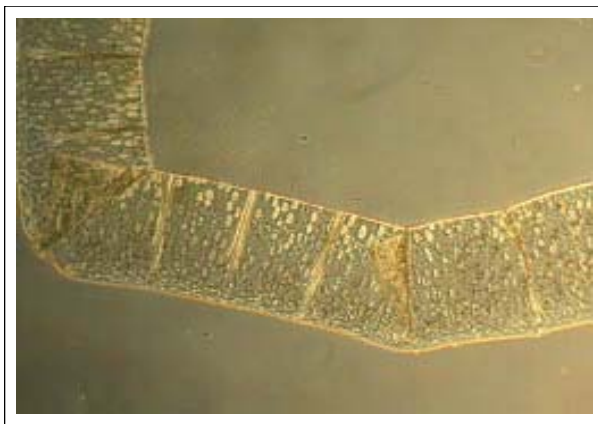


Abb. 41: Kontrolle

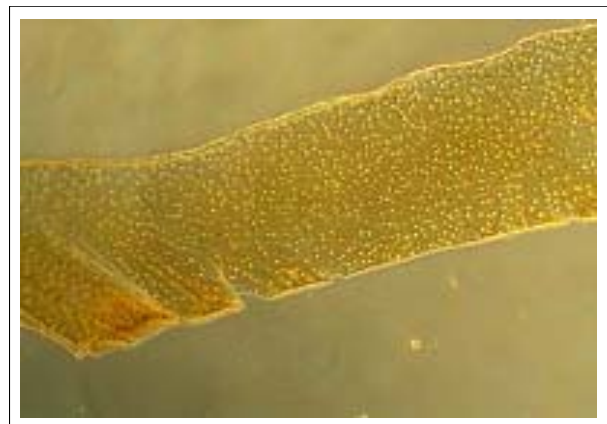


Abb. 42: Interleukin-1 $\alpha$

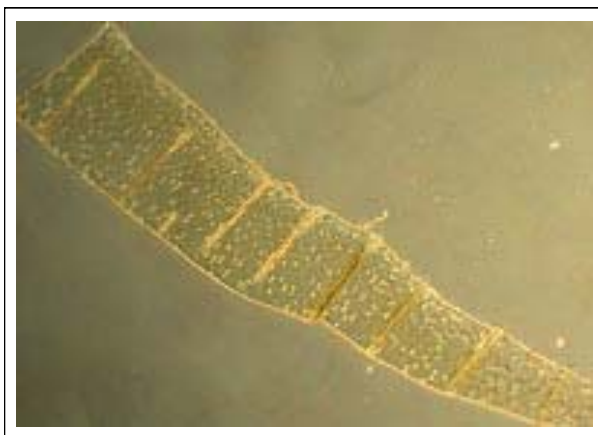


Abb. 43: IL-1 $\alpha$  + 25  $\mu\text{M}$  Zaprinast

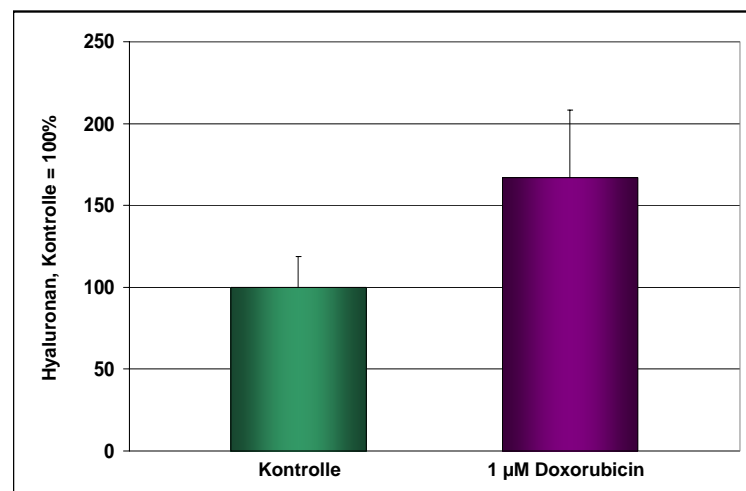


Abb. 44: IL-1 $\alpha$  + 25  $\mu\text{M}$  Tadalafil

man das Hyaluronan in den Knorpelschnitten gelb eingefärbt. Besonders achten sollte man bei der Fixierung der Schnitte darauf, nicht das normale Paraldehyd zu benutzen, sondern lieber auf das Carnoysche Gemisch zurückzugreifen. Bei der Fixierung in Paraldehyd kann das Hyaluronan aus dem Gewebe hinausdiffundieren und so später nicht mehr detektiert werden. Mit der Verwendung des Carnoyschen Gemisches für nicht länger als drei bis vier Stunden verhindert man den Verlust des Hyaluronans. In der Kontrolle erkennt man eine moderate Gelbfärbung, während man in dem mit Interleukin-1 $\alpha$  behandeltem Knorpel eine sehr intensive Gelbfärbung erkennen kann (Abb. 42). Es liegt also nicht nur eine höhere Hyaluronankonzentration außerhalb des Knorpels nach Inkubation mit IL-1 $\alpha$  vor, sondern auch innerhalb. In den Knorpelstücken, die mit den PDE5/MRP5 Inhibitoren inkubiert wurden, kann man eine deutliche Reduktion der gelben Hyaluronanfärbung feststellen. Die Ergebnisse aus vorherigen Untersuchungen bestätigen sich also auch hier: Es wird weniger Hyaluronan aus den Zellen nach außen transportiert. Nach Auswertung aller Schnitte konnte bei der Hyaluronanverteilung im Knorpel kein bestimmtes Muster erkannt werden. Die Überproduktion schien gleichmäßig über den ganzen Knorpel verteilt zu sein. Somit werden alle Zellen gleichermaßen von der Stimulierung angesprochen. Mit IL-1 $\alpha$  ist also eine Erhöhung der Hyaluronanproduktion im Knorpel nachzuweisen. Die PDE5 Hemmer Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil sind in der Lage, die Überproduktion an Hyaluronan in Zell- und Organkultur zu reduzieren.

Inwieweit nur der MRP5 Transporter allein an der Ausschleusung von Hyaluronan beteiligt ist, lässt sich nicht sagen. Das Hyaluronan auch durch andere ABC-Transporter hinausgeschleust werden könnte, können wir mit unseren Ergebnissen nicht ausschließen. Es

gibt aber sichere Hinweise auf die Beteiligung des MRP5 Transporters, wenn wir die obigen Experimente betrachten. Ein weiterer Versuch untermauert diese Theorie. Es wurden Alginatebeads für drei Tage mit Doxorubicin inkubiert. Doxorubicin (angelsächsisch: Adriamycin) induziert die MRP5 mRNA Expression [152]. In den



**Abb. 45:** Hyaluronanausschleusung mit Doxorubicin

in Abbildung 45 gezeigten Messungen zeigten die in einem  $\mu$ M Doxorubicin inkubierten

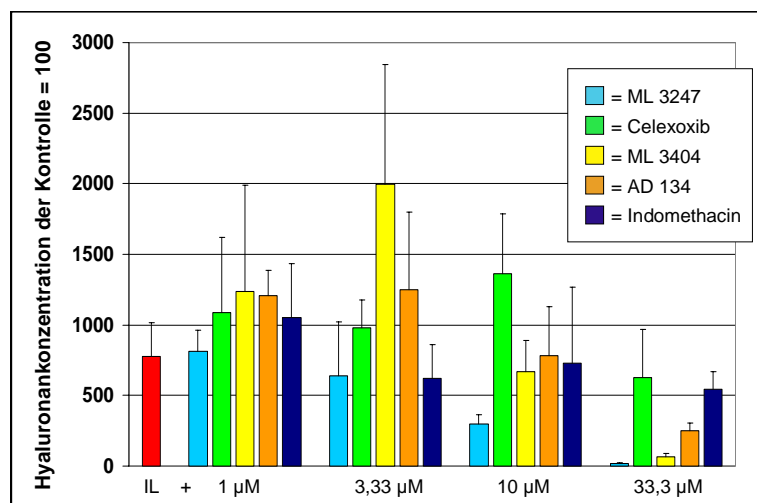
Chondrozyten eine Erhöhung der Hyaluronanproduktion um rund 2/3. Wir gehen deshalb fest von einer Beteiligung von MRP5 an der Ausschleusung von Hyaluronan in Chondrozyten aus und beleuchten in den nächsten Kapiteln den Einfluss einer MRP5 Hemmung auf die extrazelluläre Matrix.

### 3.2.9 Einfluss von entzündungshemmenden Stoffen auf die Hyaluronansekretion in Chondrozyten

Da zur Behandlung der Arthrose vor allem nicht-steroidale Antirheumatika zum Einsatz kommen, wurde untersucht, ob diese Stoffe einen Einfluss auf die Hyaluronanproduktion haben. Exemplarisch wurden fünf Substanzen in dem Test eingesetzt, die fünf Wirkmechanismen repräsentieren.

- ML 3247 dualer COX/LOX-Hemmstoff
- Celecoxib selektiver COX-2 Hemmstoff
- ML 3404 p38-MAP-Kinase-Hemmstoff
- AD 134 cPLA<sub>2</sub>α-Hemmstoff
- Indomethacin dualer COX-1/COX-2 Hemmstoff

Abbildung 46 zeigt die Effekte, die die Substanzen im Konzentrationsbereich von 1 -33 µM bewirkten. Bei der niedrigsten Konzentration (1 µM) beeinflussten die Testsubstanzen die Hyaluronankonzentration im Medium nur unbedeutend. Bei der höchsten Konzentration (33 µM) verursachten der duale Cox/Lox Hemmstoff ML 3247 und der p38 MAP-Kinase Hemmstoff eine weitgehende Hemmung der IL-1α induzierten Hyaluronanausschleusung.



**Abb. 46:** Einfluß von Entzündungshemmern auf die Hyaluronankonzentration im Medium

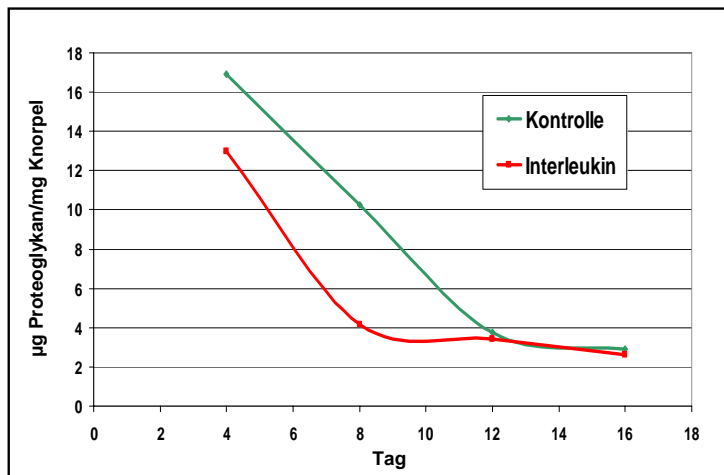
Auch der PLA<sub>2</sub>α-Hemmstoff reduzierte die Hyaluronankonzentration noch signifikant. Dagegen hemmten die beiden COX-Inhibitoren die Hyaluronankonzentration nicht oder nur wenig. Die alleinige Hemmung der Prostaglandinbiosynthese durch Blockade der COX kann demnach für die Hyaluronan-

ausschleusung nicht bedeutend sein. Die deutliche Hemmung der Ausschleusung durch den COX/LOX Hemmstoff weist aber auf eine Beteiligung der Leukotriene hin. Die Leukotrienbiosynthese wird auch bei Blockade der p38 MAP-Kinase und der PLA<sub>2</sub> $\alpha$  gehemmt, da diese in der Entzündungskaskade der LOX vorgestellt sind.

### 3.3 Proteoglykane

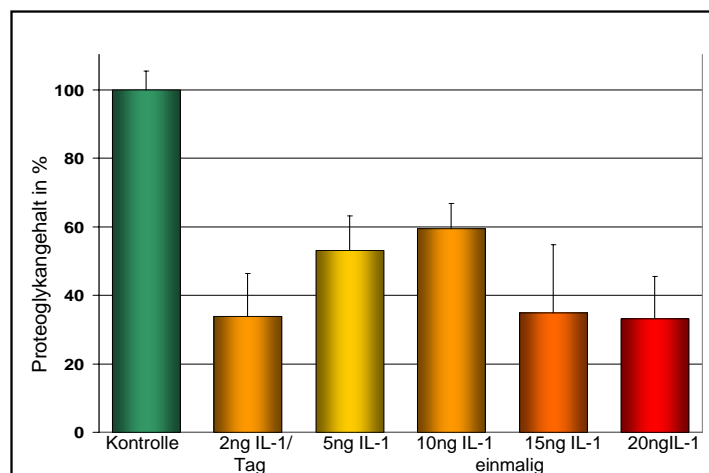
#### 3.3.1 Proteoglykane in bovinen Knorpelstücken

Nach Experimenten zur Beurteilung des Einflusses der PDE5 Inhibitoren auf die Hyaluronanausschleusung wurde untersucht, ob eine verminderte Hyaluronanproduktion Einfluss auf den Proteoglykangehalt im Knorpel hat. Für die Versuche wurde mit der



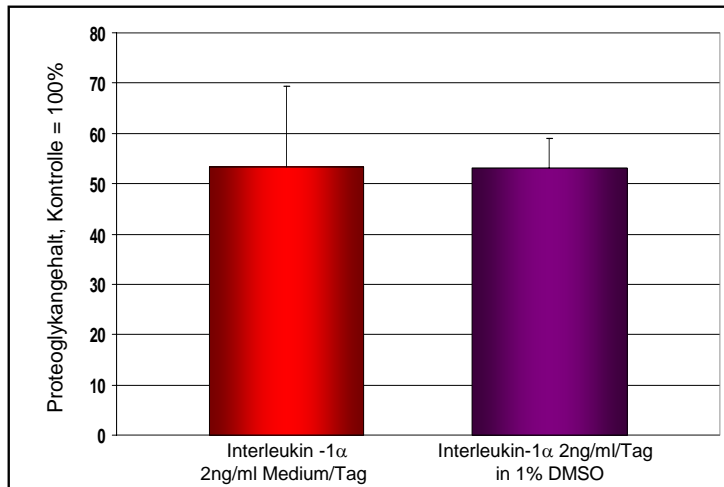
**Abb. 47:** Proteoglykangehalt nach 4 – 16 Tagen mit und ohne IL

Inkubation der Knorpelstücke spätestens 48 Stunden nach dem Tod des Tieres begonnen. Die Knorpelstücke wurden fünf Tage in Kultur gehalten. Dieser Zeitraum reicht aus, um Unterschiede zwischen den Kontrollen und den mit IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpelstücken deutlich zu erkennen (Abb. 47). Eine längere Kulturdauer wäre also „Verschwendung“ und führt weiterhin zu immer ungenaueren Ergebnissen, da der bovine artikuläre Knorpel auch bei normaler Kultur in DMEM innerhalb von 12-16 Tagen den Großteil seiner Proteoglykane verliert und in diesem Stadium dann nur schlecht Unterschiede zwischen „arthrotischem“ und gesundem Knorpel im Hinblick auf den Proteoglykangehalt auszumachen sind. Bevor die Experimente starteten, wurde auch für die Proteoglykane getestet, mit welchen Konzentrationen von IL-1 $\alpha$  es sinnvoll ist zu arbeiten. Hierbei stellte sich heraus, wie in Abbildung 48 gezeigt, dass jeden Tag 2ng IL-1 $\alpha$  pro ml einen besseren Effekt haben als einmalig 10 ng IL-1 $\alpha$  zu Beginn. Der Effekt war sogar ähnlich stark wie beim einmaligen Einsatz von 15 oder 20 ng IL-1 $\alpha$ . Es wurde also die gleiche Dosierung von IL-1 $\alpha$  eingesetzt, wie bei den Experimenten zur Hyaluronanausschleusung. Obwohl bei den Versuchen jeweils in allen Proben die gleiche



**Abb. 48:** Knorpel für 5 Tage mit IL-1 $\alpha$  in Kultur, Effekt auf Proteoglykangehalt

Konzentration von DMSO eingesetzt wurde, wurde der Einfluss von DMSO auf den Proteoglykangehalt der Knorpelstücke dennoch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass DMSO keinen Einfluss auf den Proteoglykangehalt der Knorpelproben hatte, wie in Abbildung 49 zu



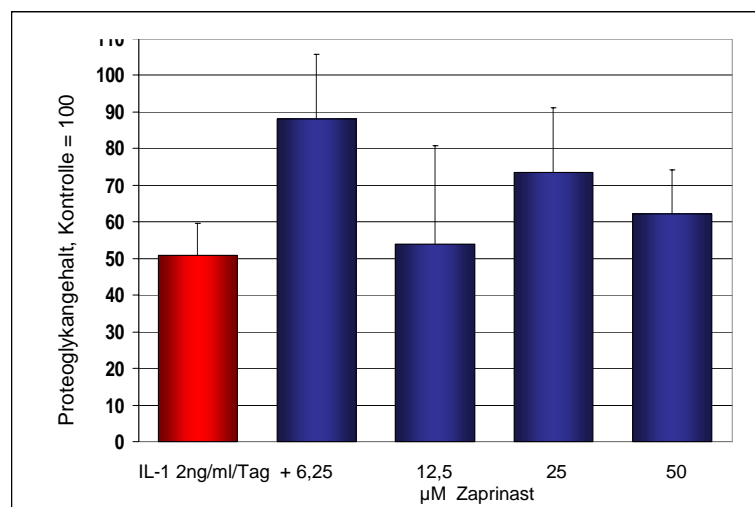
**Abb. 49:** Kein Einfluss von DMSO auf den Proteoglykangehalt im Knorpel

erkennen ist.

Die Versuche zur Messung des Proteoglykangehaltes wurden jeweils nach fünf Tagen beendet und die Proteoglykane mit 4 M Guanidinium HCl und Proteaseinhibitoren für weitere drei Tage extrahiert. Die MRP5/PDE5 Hemmer wurden für die Versuche in Konzentrationen zwischen 6,25 bis 50  $\mu\text{mol/l}$

eingesetzt. Wurden die Knorpelstücke mit Zaprinst und IL-1 $\alpha$  inkubiert, erkennt man eine besonders hohen Gehalt an Proteoglykanen bei 6,25  $\mu\text{mol/l}$  wie in Abbildung 50 zu sehen.

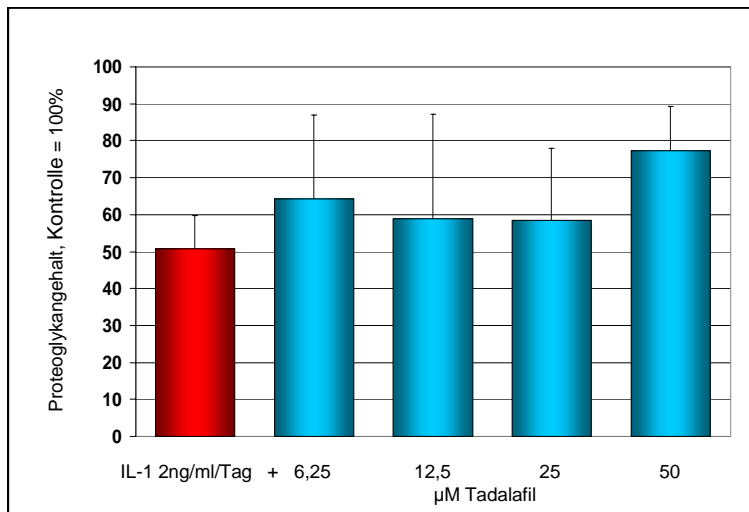
Bei einer Inhibitorkonzentration von 6,25  $\mu\text{mol/l}$  verbleiben knapp 40 % mehr Proteoglykane im Knorpel im Vergleich zu den mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Proben. Dieses „Phänomen“ tritt bei dieser Substanz auch bei anderen Versuchen auf. Zaprinst zeigte des Öfteren besonders in niedrigen Konzentrationen starke Effekte, sei es wie hier bei den



**Abb. 50:** Proteoglykangehalt mit Zaprinst

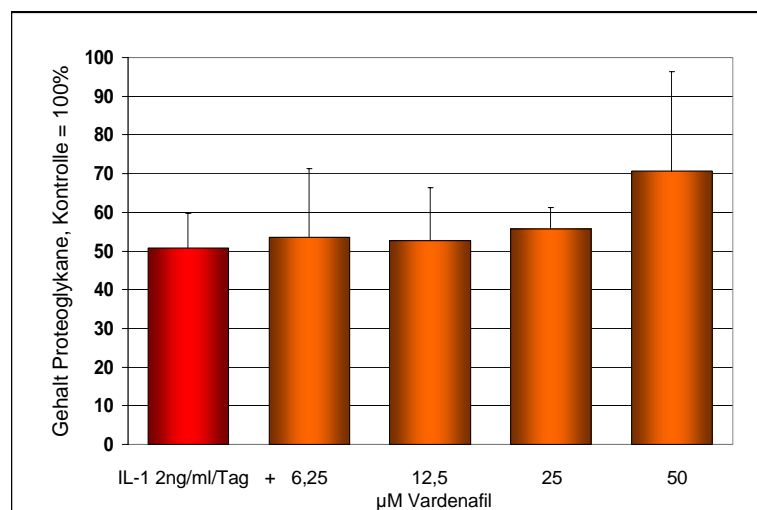
Proteoglykanen oder auch beim Hydroxyprolinegehalt. Inhibitorkonzentrationen von unter 5  $\mu\text{mol/l}$  zeigten allerdings keine signifikanten Effekte mehr. Allen Messungen des Proteoglykangehalts im Knorpel ist gemein, dass die mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Knorpelstücke relativ genau noch 50 % des Proteoglykangehaltes der Kontrollen enthielten. Dies bestätigte sich bei allen Experimenten. Die fotometrische Messmethode zur Bestimmung der Proteoglykankonzentration in den GuHCl-Extrakten war sehr robust, die Fehlerbalken resultieren bei diesen Messungen aus der bereits im vorherigen Kapitel angesprochenen

Heterogenität des Knorpels, der von Natur aus in einigen Bereichen einen höheren Gehalt an Proteoglykanen aufweist als an anderen. Für diesen Versuchsaufbau macht es auch keinen Sinn, mit den zwar vom Aufbau her homogeneren Alginatbeads zu arbeiten, da wir damit nur



**Abb. 51:** Proteoglykangehalt mit Tadalafil

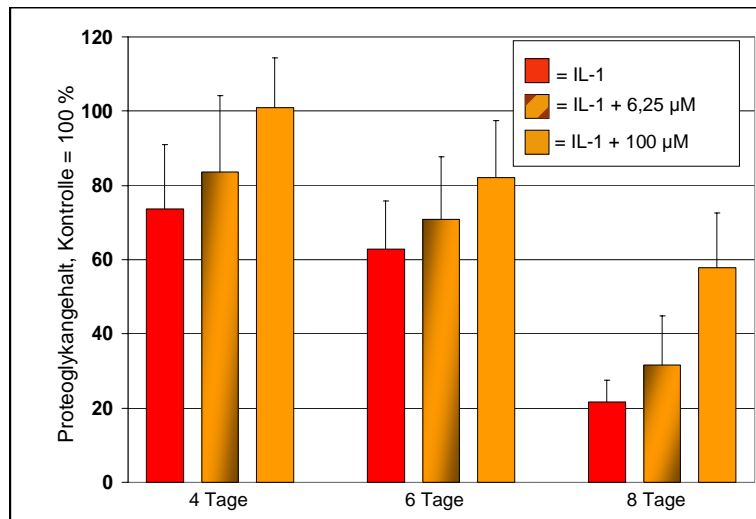
neu synthetisierte Proteoglykane messen könnten. Uns interessiert dagegen, wie sehr oder ob die PDE5/MRP5 Inhibitoren in der Lage sind, den durch vermehrte Hyaluronansynthese auftretenden Verlust der bereits im Knorpel vorhandenen Proteoglykane zu vermindern. In Abbildung 51 ist der verminderte Verlust der Proteoglykane mit Tadalafil dargestellt. Als bester Messpunkt kann hier mit 50  $\mu\text{mol/l}$  Tadalafil die Proteoglykankonzentration im Knorpel von 50 % auf knapp 80 % erhöht werden. Die im Vergleich zu den anderen beiden PDE5 Hemmern stärkere Verminderung der Hyaluronanausschleusung spiegelt sich im Gehalt an Proteoglykanen im Knorpel nicht 1:1 wieder. In Abbildung 52 sind die Konzentrationen an Proteoglykanen von mit Vardenafil inkubierten Proben dargestellt. Vardenafil zeigt von den drei Inhibitoren die schwächsten positiven Effekte auf den Proteoglykangehalt der Knorpelstücke. Konzentrationsabhängig steigt der Proteoglykangehalt der Proben von knapp über 50 % bei 6,25  $\mu\text{M}$  auf bis zu über 70 % bei einer Vardenafilkonzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$ . Hier stimmt die relativ betrachtet geringste Hyaluronanexporthemmung mit der geringsten Proteoglykankonzentration im Knorpel überein. Allerdings ist bei Vardenafil wie auch bei den beiden anderen PDE5 Inhibitoren die Proteo-



**Abb. 52:** Proteoglykangehalt mit Vardenafil

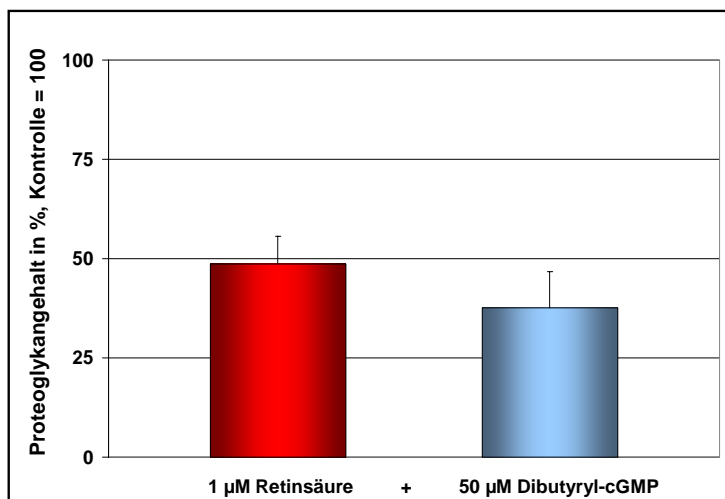
glykankonzentration im Knorpel an jedem Messpunkt im Vergleich zu den allein mit IL-1 $\alpha$  allein stimulierten Proben höher. Die Werte unterscheiden sind aufgrund des heterogenen

Gewebes nur selten signifikant, es lässt sich aber ein reproduzierbarer Trend aufzeigen. Der Proteoglykangehalt im Knorpel wurde mit Vardenafil nicht nur nach fünf Tagen, sondern auch in einem Experiment zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt, um einen Überblick über die Entwicklung des Proteoglykanverlustes in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration des Inhibitors zu erlangen. Für den Versuch wurden die Knorpelstücke wie in



**Abb. 53:** Proteoglykangehalt nach 4/6/8 Tagen mit Vardenafil

den obigen Versuchen auch täglich mit 2ng /ml IL-1 $\alpha$  behandelt und Proben nach vier, sechs und acht Tagen genommen. Wie bereits zu Beginn dieses Abschnittes erwähnt, verliert der bovine Knorpel auch ohne IL-1 $\alpha$  Einwirkung mit der Zeit einen Großteil seiner Proteoglykane (Abb. 47). Wird der Knorpel allerdings mit IL-1 $\alpha$  inkubiert, sinken in den so behandelten Proben noch deutlich schneller die Proteoglykankonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ab. Die roten Balken in Abbildung 53 zeigen die nur mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Proben und man erkennt einen zunehmenden Proteoglykanverlust nach sechs bzw. acht Tagen in Kultur. Bei diesem Verlauf ist auch mit 6,25  $\mu$ M Vardenafil ein erhöhter Gehalt in der Knorpelmatrix zu erkennen. Die retardierte Freisetzung der Proteoglykane ins Medium kann durch eine Erhöhung der Vardenafilkonzentration auf 100  $\mu$ M verstärkt werden. Besonders an Tag 8 kann man sich den Unterschied zwischen den Vardenafil und mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Knorpeln deutlich



**Abb. 54:** Proteoglykangehalt mit Retinsäure

machen: Der Gehalt an Proteoglykanen ist bei Gabe von 6,25  $\mu$ M Vardenafil schon um 50 % erhöht, bei 100  $\mu$ M sogar um knapp 300 %.

Nach den Untersuchungen der Wirkungen von IL-1 $\alpha$  auf den Proteoglykangehalt des Knorpels wurde auch die Wirkung von all-



trans-Retinsäure untersucht. Die Hyaluronanproduktion des Knorpels wurde durch Retinsäure wie in Kapitel 3.2 gezeigt erhöht. In unserem Experiment wurde der Knorpel für drei Tage mit 1  $\mu\text{M}$  Retinsäure inkubiert und die Proteoglykankonzentration des Knorpels wie in den Versuchen zuvor gemessen. In einem weiteren Ansatz wurde zu der Retinsäure 50  $\mu\text{M}$  Dibutyryl-cGMP gegeben, ein cGMP Analogon, welches durch die Zellmembran permeieren kann und von der PDE5 nicht zu 5'-GMP umgesetzt wird. Die Retinsäure reduzierte wie IL-1 $\alpha$  den Proteoglykangehalt der Knorpelproben auf unter 50 %. Zugabe von Dibutyryl-cGMP reduzierte den Proteoglykangehalt noch weiter (Abb. 54). Die erhöhte Expression der HAS2 führt neben einer erhöhten Hyaluronankonzentration also zu einer verstärkten Verlust der Proteoglykane aus dem Knorpel.

### 3.3.2 Einfluss der PDE5/MRP5 Inhibitoren auf die Proteoglykansynthese

Um zu untersuchen, ob oder inwieweit eine erhöhter Proteoglykangehalt in den bovinen Knorpelstücken mit einer veränderten bzw. erhöhten Proteoglykansynthese zusammenhängt, wurde der Einfluss der PDE5/MRP5 Inhibitoren auf die Proteoglykansynthese gemessen. Dafür wurden Chondrozyten in Alginatbeads kultiviert und die Inhibitoren in Konzentrationen zwischen 12,5- und 100  $\mu\text{M}$  hinzugegeben. Die neu synthetisierten Proteoglykane wurden mit [ $^{35}\text{S}$ ]Sulfat für 24 Stunden markiert. Das nicht eingebaute Sulfat wurde anschließend mit einer mit Calciumchlorid versetzten physiologischen Kochsalzlösung aus den Beads gewaschen. Danach wurden die Alginatbeads in Natriumcitratlösung gelöst und die Radioaktivität der entstandenen Lösung bestimmt. In Abbildung 55 sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. Vardenafil hemmt die Proteoglykansynthese im Vergleich zu Zaprinast und Tadalafil am wenigsten. Die vier Meßpunkte pendeln um den 100 % Wert der Kontrolle. Zaprinast und Tadalafil hemmen die Proteoglykansynthese in Chondrozyten in Konzentrationen ab 25  $\mu\text{mol/l}$  um ca. 20 %.

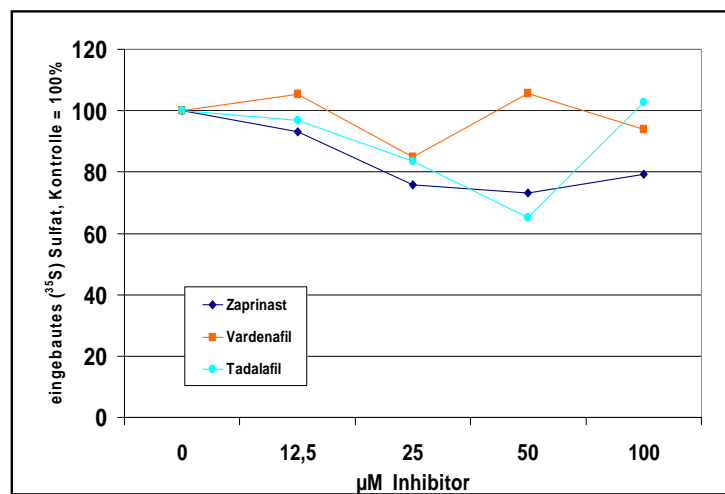


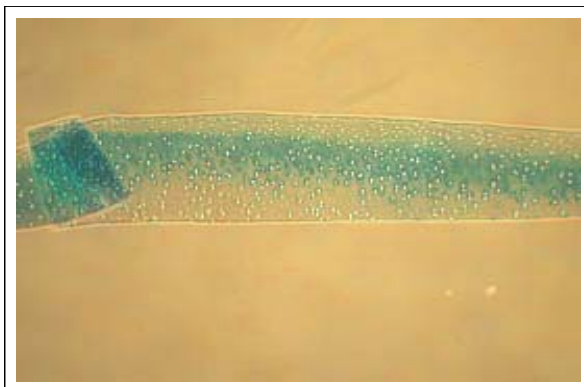
Abb. 55: Einbauraten von radioaktivem Sulfat in Proteoglykane

Die vier Meßpunkte pendeln um den 100 % Wert der Kontrolle. Zaprinast und Tadalafil hemmen die Proteoglykansynthese in Chondrozyten in Konzentrationen ab 25  $\mu\text{mol/l}$  um ca. 20 %.

Abweichungen sind nicht signifikant und zeigen auch keinen Trend auf. Eine vermehrte Proteoglykansynthese findet nicht statt, eine Erhöhung der Proteoglykankonzentration im Knorpel durch die PDE5/MRP5 Hemmer auf diesem Wege ist also wohl auszuschließen.

### 3.3.3 Proteoglykane in Schnitten boviner Knorpelstücke

Die Knorpelstücke wurden wie in den Versuchen zur Proteoglykanmessung für fünf Tage in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum kultiviert. Die Kontrolle blieb unbehandelt, während



**Abb. 56:** Kontrolle (Proteoglykane blau eingefärbt)



**Abb. 57:** Interleukin-1 $\alpha$



**Abb. 58:** IL-1 $\alpha$  + 25  $\mu$ M Zaprinast



**Abb. 59:** IL-1 $\alpha$  + 25  $\mu$ M Tadalafil



**Abb. 60:** IL-1 $\alpha$  + 25  $\mu$ M Vardenafil



**Abb. 61:** IL-1 $\alpha$  + 25  $\mu$ M Dibutyryl-cGMP

allen anderen Knorpelstücken pro Tag 2ng/ml IL-1 $\alpha$  zugegeben wurde. Dabei wurden die Knorpelstücke mit je 25  $\mu$ M der PDE5/MRP5 Inhibitoren inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Stücke über Nacht fixiert und bis zur Anfertigung der Schnitte in kaltem PBS aufbewahrt. Zur Visualisierung der Proteoglykane wurden die Schnitte mit Alcianblau gefärbt. In Abbildung 56 erkennt man die kräftige Blaufärbung der Kontrolle. In den Randbereichen des Knorpels ist die Färbung schwächer als in der Mitte des Knorpels, da aus den oberflächennahen Bereichen die Proteoglykane besonders schnell aus der Knorpelmatrix in das Kulturmedium diffundieren können. Einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle sieht man in Abbildung 57, dem mit IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpelstück. Hier ist nur noch eine ganz schwache Blaufärbung in einigen Bereichen zu erkennen. Dieser Knorpel hat einen Großteil seiner Proteoglykane verloren. In den Abbildungen 58, 59 und 60 sind Schnitte von Knorpeln fotografiert, die neben IL-1 $\alpha$  auch mit den PDE5/MRP5 Inhibitoren Zaprinast, Tadalafil und Vardenafil in einer Konzentration von 25  $\mu$ M behandelt worden sind. Alle drei Knorpel zeigen eine intensivere Blaufärbung im Vergleich zu Abbildung 57. In Abbildung 58 und 60 erkennt man, wie auch bei der Kontrolle erwähnt, einen einsetzenden Verlust der Proteoglykane an der Oberfläche des Knorpels. In Abbildung 59, dem mit Tadalafil inkubiertem Schnitt liegt eine recht homogene Verteilung der Proteoglykane im Knorpel vor. Die Knorpel enthalten allerdings im Vergleich zur Kontrolle geringere Proteoglykankonzentrationen in der extrazellulären Matrix. Es wurden auch Knorpel mit 25  $\mu$ M Dibutyryl-cGMP behandelt, um zu sehen ob ein erhöhter intrazellulärer cGMP Spiegel infolge der PDE5 Hemmung einen Einfluss auf die Proteoglykanretention hat. Die so behandelten Knorpelstücke zeigten keine gesteigerte Blaufärbung. Nach der Auswertung unserer Fotos kann man keinen positiven Effekt auf den Proteoglykangehalt durch Dibutyryl-cGMP, wohl aber durch die PDE5/MRP5 Inhibitoren ausmachen.

### 3.3.4 Proteoglykane im artikulärem Knorpel von Ratten nach Arthroseauslösung mit Iodacetat

Als wir den Tierversuch mit männlichen Wistar Ratten im Herbst 2003 durchführten, war uns bereits bewusst, dass ABC-Transporter etwas mit dem Transport von Hyaluronan zu tun haben könnten, die Involvierung von MRP5 in diesen Prozess war zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht bekannt. Um zu untersuchen, ob ABC-Transporter etwas mit dem Hyaluronanexport zu tun haben, und ob eine Hemmung der Transporter eine Retardierung der Arthrose-Ätiologie bedingen kann, entschieden wir uns in unserem Tierversuch die Substanz Verapamil einzusetzen. Verapamil wurde recht frühzeitig als Inhibitor des prominentesten ABC-Transporters, MDR1 bzw. p-Glycoprotein, bekannt. Darüber hinaus weist Verapamil für ein breites Spektrum der ABC Transporter inhibitorische Effekte auf. Wir konnten also mit dieser Substanz viele Transporter gleichzeitig hemmen, zumindest aber ihre Aktivität vermindern. Der Versuch war über drei Wochen angelegt. 24 acht Wochen alte männliche Wistarratten wurden in acht Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt. Die Tiere hatten zwei Wochen Zeit, um sich im Tierstall einzugewöhnen. Zu Beginn des Versuchs wurde jedes Tier mit einem Gemisch aus Lachgas und Isofluran betäubt. Den narkotisierten Tieren wurde mit einer feinen Nadel 20 µl einer Lösung von 2 mg Iodmonoacetat/ml isotonischer Kochsalzlösung in das rechte Kniegelenk injiziert. Dies diente der Induzierung einer Arthrose im Kniegelenk [153]. Die linken Knie der Ratten blieben unbehandelt und dienten später als Kontrolle. Die Tiere wurden in ihren Gruppen in acht Käfige verteilt. Gruppe 1 bekam zum Zeitpunkt  $t_{null}$  0,375 mg/ml Verapamilhydrochlorid über das Trinkwasser verabreicht. Gruppe 2 bekam nach drei Tagen Verapamil zum Trinkwasser, Gruppe 3 nach sechs Tagen und so fort. Gruppe 8 wurde über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen kein Verapamil zum Trinkwasser hinzugegeben. Die Tiere nahmen ca. 30 ml Wasser am Tag zu sich und wogen mindestens 250 Gramm. Damit nahm jedes mit Verapamil behandelte Tier eine Dosis von 45 mg Verapamil pro kg Körpergewicht zu sich. Die LD 50 für die orale Aufnahme von Verapamil-Hydrochlorid liegt bei 108 mg/kg Körpergewicht. Während der Versuchsdauer starb kein Tier, alle Ratten zeigten völlig normales Verhalten. Es war kein Unterschied zwischen nicht mit Verapamil-HCl behandelten Tieren und mit Verapamil-HCl behandelten Tieren auszumachen. Nach Ablauf der drei Wochen wurden die Tiere mit dem oben genannten Gasmisch narkotisiert und dann mit CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurden die Knie der Tiere für die histochemische Färbung der Proteoglykane präpariert. In den Abbildungen 62-65 sieht man jeweils auf der rechten Seite mehr oder minder blau gefärbt den Knorpel der Gelenk-



Abb. 62: Kontrolle

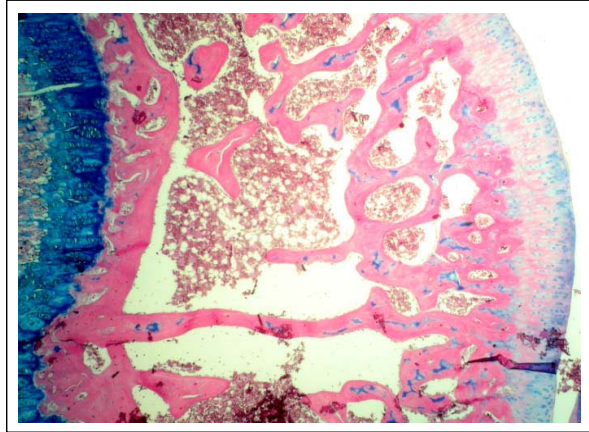


Abb. 63: Gruppe 8, nicht behandelt

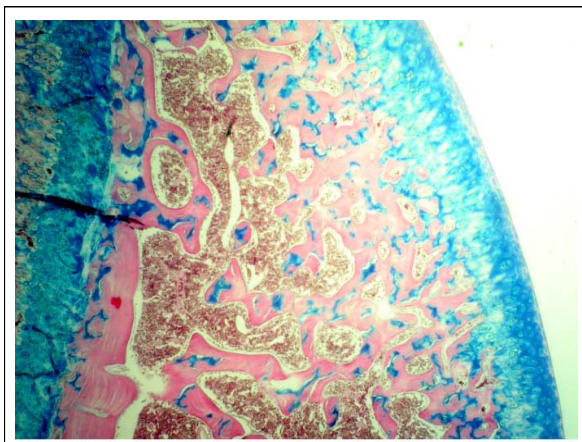


Abb. 64: Gruppe 1, von Beginn an behandelt

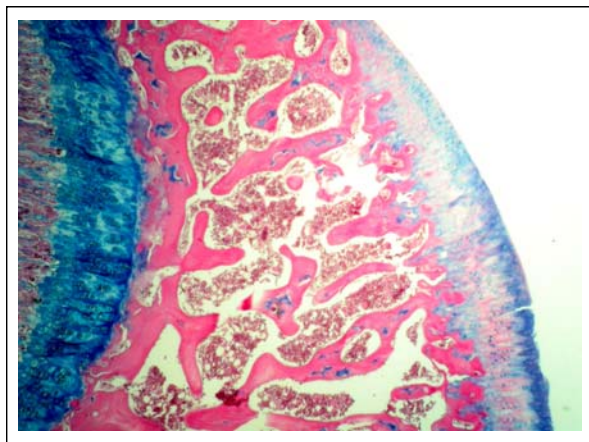
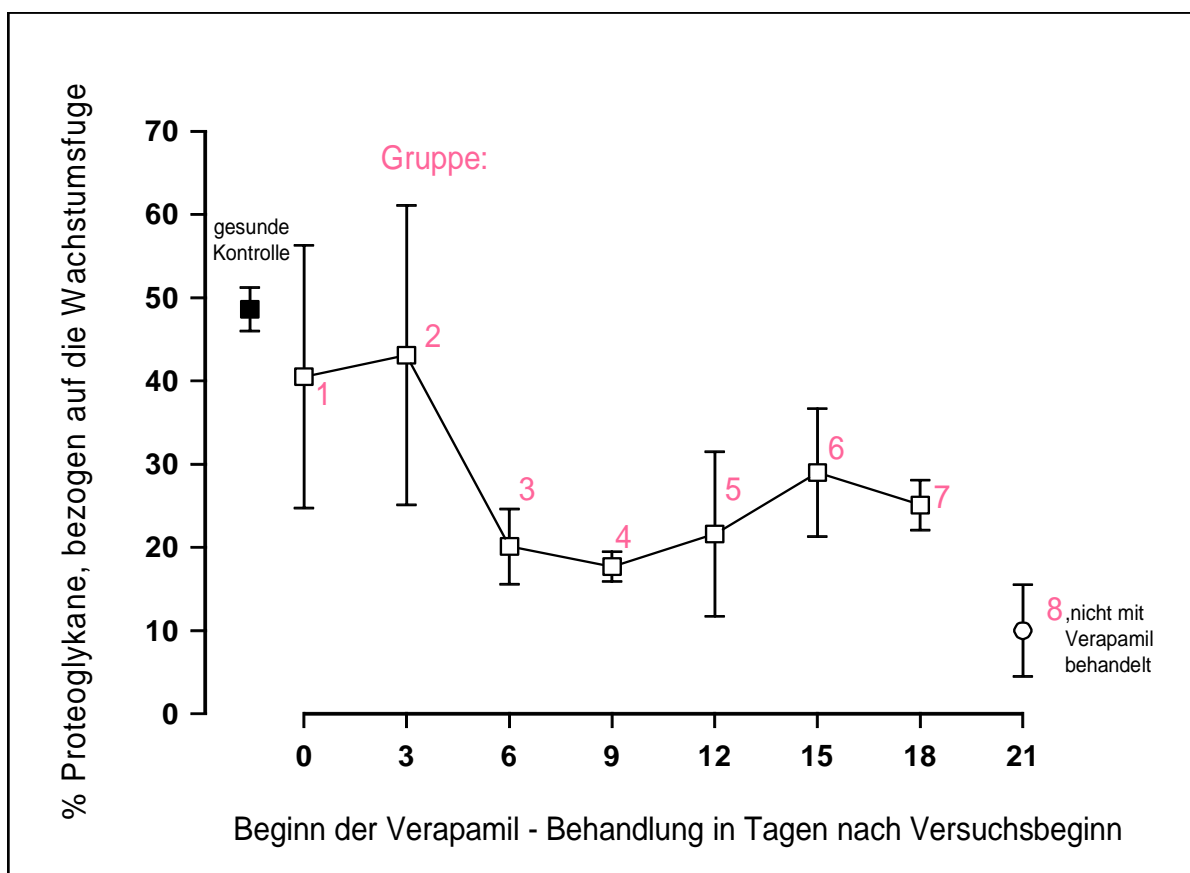


Abb. 65: nach 9 Tagen behandelte Ratte aus Gruppe 4

oberfläche und auf der linken Seite die intensiv blau gefärbten Proteoglykane der Wachstumsfuge. Zur weiteren grafischen Auswertung der Bilder wurde mit der Scion-Image Software die Blaufärbung der Gelenkoberfläche im Verhältnis zur Blaufärbung der Wachstumsfuge gesetzt. Dadurch wurden eventuelle winzige Abweichungen in der Schichtdicke der Schnitte herausgerechnet. Exemplarisch sind hier Fotos aus der Kontrollgruppe, Gruppe 1, Gruppe 4 und Gruppe 8 aufgeführt. In der Kontrolle erkennt man die durchgehend und homogen verteilten Proteoglykane. In dem Foto aus Gruppe 8 (Abbildung 63), also den Verapamil-unbehandelten Tieren erkennt man insbesondere in tieferen Knorpelschichten den Verlust der Proteoglykane. An der Gelenkoberfläche erkennt man dagegen noch eine schwache Blaufärbung. In der Tibia der sofort mit Verapamil behandelten Tiere in Abbildung 64 war im Vergleich zur Kontrolle zwar eine verminderte Blaufärbung auszumachen, es zeigte sich aber immer noch eine kräftige und homogene Alcianblaufärbung, so dass die Verapamil-Behandlung einen positiven Effekt auf den Proteoglykangehalt hatte. Ein Bild aus einer „Zwischengruppe“, die ungefähr zur Halbzeit mit der Verapamil-Behandlung startete, zeigt in Abbildung 65 zwar schon deutliche Proteoglykanverluste,

allerdings doch noch eine intensivere Blaufärbung der Gelenkoberfläche im Vergleich zu der unbehandelten Tibia. Nach Auswertung aller Bilder wurde untenstehende Grafik generiert (Abb. 66). Sie zeigt den Gehalt der Gelenkoberflächen an Proteoglykanen im Verhältnis zu dem Proteoglykangehalt der Wachstumsfugen. Das schwarze Quadrat auf der linken Seite zeigt den Proteoglykangehalt der Kontrollen, während der offene Kreis auf der rechten Seite den Proteoglykangehalt der unbehandelten Rattenkniee wiedergibt. Von links angefangen sind dann die Gruppen 1-7 aufgeführt. In dieser Grafik erkennt man, dass insbesondere eine recht frühe „Behandlung“ mit Verapamil-HCl einen deutlich positiven Effekt auf die Proteoglykankonzentration im Knorpel hat. Bei sofortiger



**Abb. 66:** Einfluß der verzögerten Behandlung auf den Knorpel

Verabreichung von Verapamil und bei Gabe nach drei Tagen ist dies der Fall, also in den Gruppen 1 und 2. Vielleicht aber viel interessanter ist die höhere Proteoglykankonzentration, die auch noch kurz vor Ende des Versuchs mit einer Verapamil-Gabe erreicht werden kann. Sogar noch in Gruppe 7, also nur drei Tage vor der Tötung der Tiere, war ein leicht erhöhter Proteoglykangehalt in den Knorpelproben zu erkennen. Besonders dieser Effekt so kurz vor Beendigung des Versuches erscheint sehr viel versprechend. Denn überträgt man diese

Ergebnisse auf arthrotische Veränderungen beim Menschen, könnte man auch im fortgeschrittenen Stadium den Krankheitsprozess verlangsamen. Dies ist insbesondere bei der Arthrose von großer Bedeutung, da die Entstehung arthrotischer Veränderungen in der Regel nicht mit Schmerzen einhergehen und deswegen erst spät eine Diagnose gestellt wird.

### 3.4 Kollagene und Matrixmetalloproteasen

#### 3.4.1 Messung der intakten Kollagenfibrillen im Knorpel

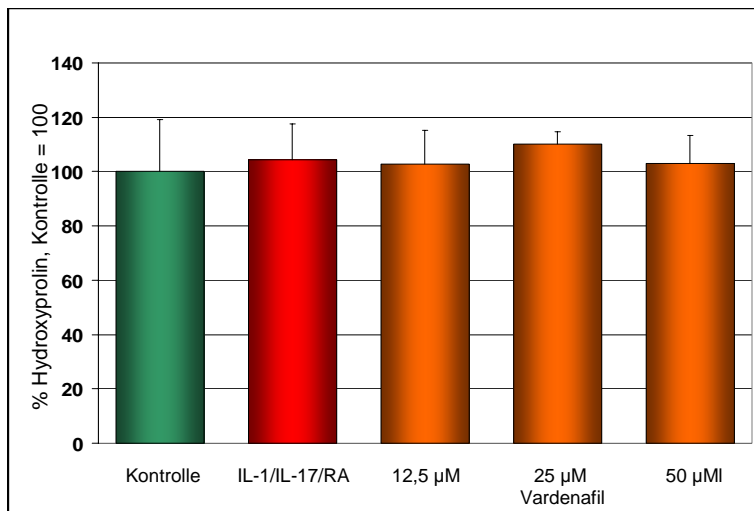
Es ist experimentell nicht einfach, im artikulärem Knorpel einen Kollagen II Abbau zu erzeugen, weshalb in vielen Arbeitsgruppen auf nasalen Knorpel zurückgegriffen wird, bei dem das Kollagengerüst nicht so widerstandsfähig ist. Mit IL-1 $\alpha$  allein ist ein Kollagen II Abbau in artikulärem Knorpel nicht zu erzeugen [154]. Da wir aber so nah wie möglich die Bedingungen in vivo imitieren wollten, konnten wir nur artikulären Knorpel verwenden. Nasenknorpel bildet keine Arthrose aus und besitzt eine andere Textur als der artikuläre Knorpel. Es galt also ein Modell zu entwickeln, mit dem in vertretbar langer Zeit an artikulären bovinen Knorpelstücken einen Kollagen II Abbau erzeugt werden konnte. Bis dato wurde der Kollagenabbau im Matrixgewebe durch den Anteil an freigesetztem Hydroxyprolin gemessen oder es wurden mit Antikörpern die offengelegten Epitope der  $\frac{1}{4}$  oder  $\frac{3}{4}$  Fragmente der Kollagenhelices detektiert (siehe Abbildung 10, Seite 17). Einen direkten Abfall der Kollagenkonzentration im Knorpel können diese Methoden nicht messen. Mit unserer modifizierten Methode nach Stegemann und Stalder können Unterschiede in der Hydroxyprolinkonzentration von arthrotischem und gesundem Knorpel direkt gemessen werden. Mit unserer Methode können wir auch im Knorpel einen Abfall der Hydroxyprolinkonzentration auf 75-80 % der Kontrollwerte erzeugen. Dies wurde zuvor nicht gezeigt. Neben IL-1 $\alpha$ , welches auch in allen anderen Experimenten eingesetzt wurde, setzten wir dafür zwei weitere Stoffe ein.

Zum einen setzten wir all-trans-Retinsäure ein, von der bekannt ist, dass sie knorpeldegradierende Eigenschaften aufweist [155] und die gleichzeitig über eine Induzierung der HAS2 Expression die Hyaluronanproduktion erhöht. Retinsäure besitzt als ein Vitamin A Derivat hormonartige Wirkungen und wirkt auch auf nucleäre Rezeptoren, die komplexe Aufgaben in der Regulierung verschiedener Gene besitzen. Zum anderen wurde Interleukin-17 gewählt. Dieses Zytokin erhöht in Kombination mit Interleukin-1 $\alpha$  die Anzahl gespaltener Kollagentriplehelices deutlich [156].

Die Knorpelstücke wurden in DMEM mit 2 ng IL-1 $\alpha$ , 25 ng IL-17 und 2  $\mu$ M Retinsäure kultiviert und das Medium inklusive der Zytokine alle zwei Tage ausgetauscht. Nach Beendigung des Experiments wurden die Knorpelstücke gewogen, die Proteoglykane mit GuHCl extrahiert, und anschließend alle degradierten Kollagenfibrillen mit  $\alpha$ -Chymotrypsin weiter verdaut, so dass die entstehenden Bruchstücke aus dem Knorpel heraus diffundieren

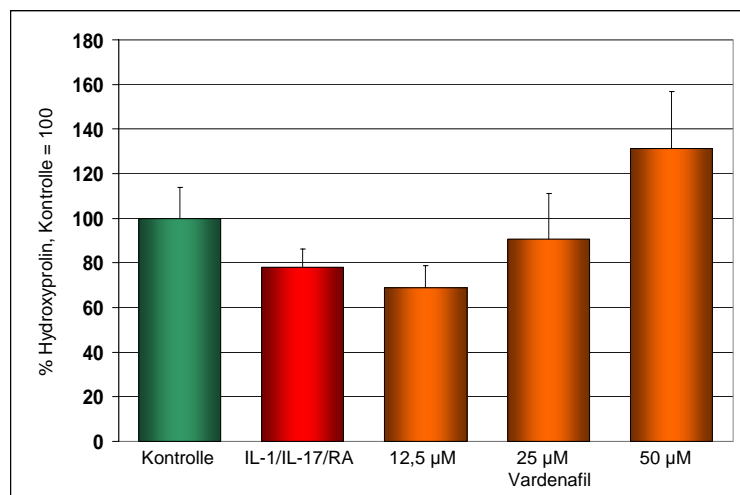


können. Zurück bleiben im Knorpel nur intakte Kollagenhelices, der Knorpel wird hydrolysiert und der Hydroxyprolinegehalt mit einer nach Stegemann & Stalder modifizierten Methode gemessen [157].

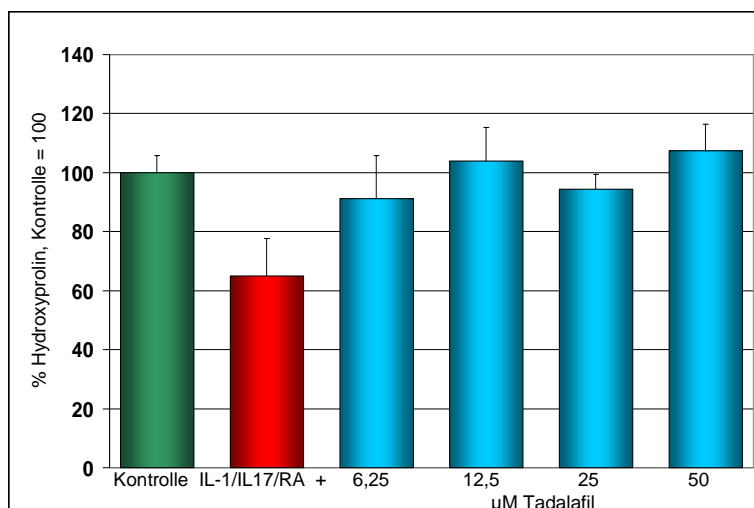


**Abb. 67:** Kein Unterschied im Hydroxyprolinegehalt nach zwei Wochen

in Abbildung 68 zu sehen ist. Die ABC-Inhibitoren Verapamil, Probenecid und Glibenclamid zeigten in diesem Versuch keine Wirkung im Vergleich zu den mit IL-1 $\alpha$ / IL-17 und Retinsäure behandelten Knorpelstücken. In Abbildung 68 sind Knorpelstücke mit den drei Zytokinen sowie Vardenafil in Konzentrationen von 12,5- bis 50



**Abb. 68:** Verminderter Kollagenabbau mit Vardenafil



**Abb. 69:** Hydroxyprolinegehalt mit Tadalafil

Werden die Knorpelstücke für zwei Wochen kultiviert, reicht diese Kulturdauer nicht aus, um einen messbaren Knorpelabbau zu erzeugen (Abbildung 67). Deshalb wurde die Kulturdauer von zwei auf vier Wochen verdoppelt. Diese Kulturdauer reicht aus, um einen messbaren Kollagenabbau zu erzeugen, wie

$\mu\text{mol/l}$  für 28 Tage inkubiert worden. Mit 12,5  $\mu\text{M}$  ist kein erhöhter Hydroxyprolinegehalt zu erkennen. Mit 25  $\mu\text{M}$  und besonders 50  $\mu\text{M}$  Vardenafil wurde dagegen ein deutlich höherer Hydroxyprolinanteil im Knorpel nachgewiesen. Mit Tadalafil (Abb. 69) konnten besonders beeindruckende Ergebnisse er-

zielt werden. Dieser PDE5/MRP5 Inhibitor zeigte schon in niedrigen Konzentrationen von 6,25  $\mu\text{M}$  einen höheren Hydroxyprolinanteil als die mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure behandelten Proben. Auch die Messwerte bei Konzentrationen von 12,5-, 25- und 50  $\mu\text{M}$  wiesen allesamt einen zur Kontrolle vergleichbaren Hydroxyprolingehalt auf. Diese Ergebnisse sind sehr deutlich und müssen noch mal hervorgehoben werden, wenn man den besonders starken Kollagenabbau in den „arthrotischen“ Proben auf 65 % im Vergleich zu den anderen Experimenten betrachtet. In Abbildung 70 sind die Ergebnisse für Zaprinast dargestellt. Wie auch in anderen Versuchen weist Zaprinast bei 6,25  $\mu\text{M}$  einen besonders

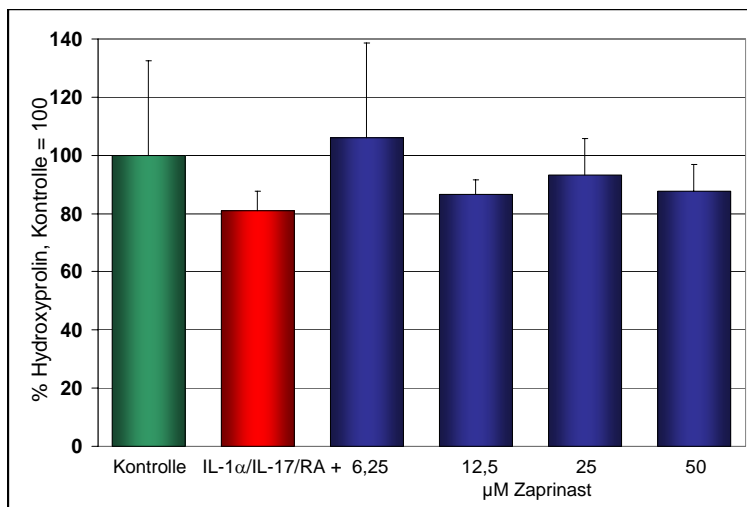


Abb. 70: Hydroxyprolingehalt mit Zaprinast

ausgeprägten Effekt auf und übersteigt sogar den Kollagengehalt der Kontrolle. Es ist ein ähnlicher Effekt zu beobachten wie bereits bei den Proteoglykanen. Auch die höheren Zaprinast Konzentrationen zeigen erhöhte Hydroxyprolinwerte im Vergleich zu den nur mit den Interleukinen und Retinsäure behandelten Proben auf.

Wie beim Hyaluronan und den Proteoglykanen wurde auch für die Kollagene die Beeinflussung der Synthese durch die Inhibitoren untersucht. Chondrozyten wurden in Alginatbeads kultiviert und der neusynthetisierten Kollagene durch den Einbau von radioaktivem [ $^{14}\text{C}$ ]Prolin markiert. Nach 24 Stunden wurde das nicht eingebaute radioaktive Prolin aus den Beads herausgewaschen und das Alginat in einer Natriumcitratlösung aufgelöst. Die Messung der Radioaktivität erbrachte die in Abbildung 71 aufgeführten Ergebnisse. In mit IL-1 $\alpha$  behandelten Alginatbeads war der Anteil an eingebauten [ $^{14}\text{C}$ ]Prolin im Vergleich zur Kontrolle um die

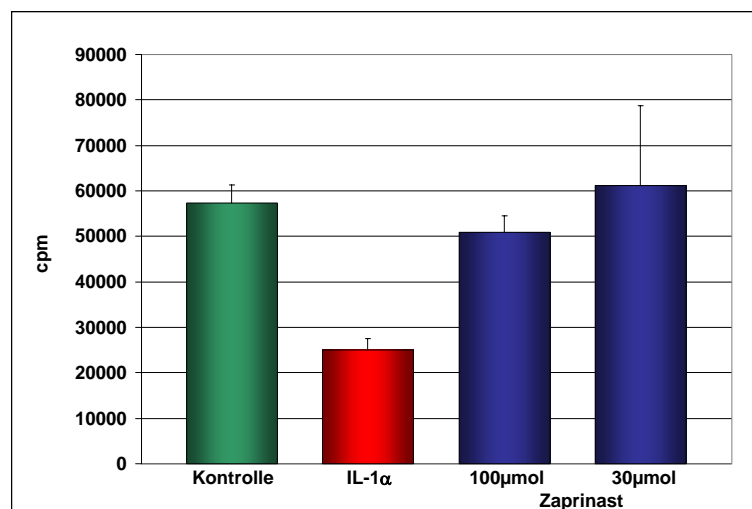
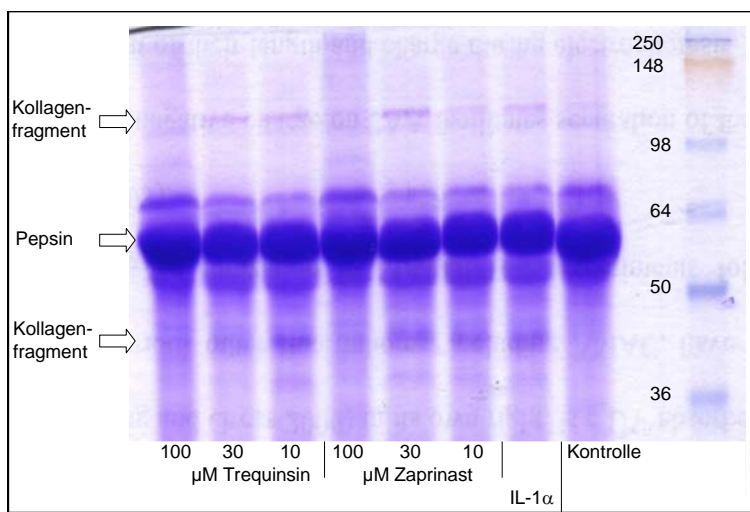


Abb. 71: Kollagensynthese mit IL-1 $\alpha$  & Zaprinast

Hälfte vermindert. Zaprinast in Konzentrationen von 30- und 100  $\mu\text{M}$  ohne IL-1 $\alpha$  beeinträchtigte die Kollagensynthese nicht.

### 3.4.2 Kollagenabbauprodukte im Medium

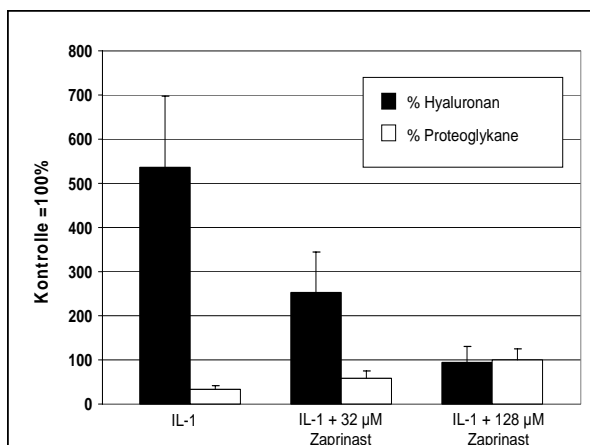
In diesem Versuch wurde untersucht, ob nach Behandlung mit IL-1 $\alpha$  allein und den PDE5/MRP5 Hemmstoffen Kollagenfragmente, also Bruchstücke abgebauter Kollagenfasern, im Medium von Knorpelkulturen nachgewiesen werden können. Dadurch kann man dann auf



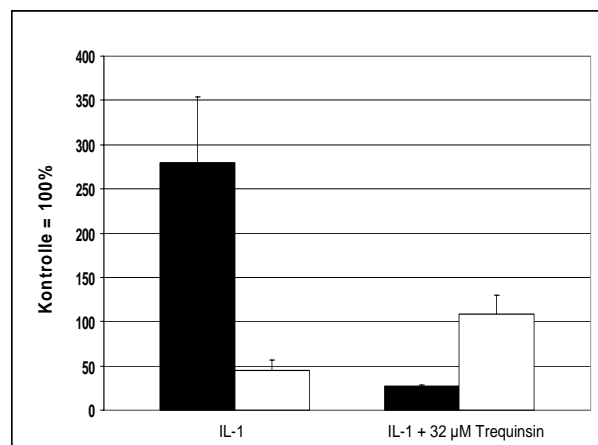
**Abb. 72:** aus Knorpel freigesetzte Kollagenfragmente im Medium

(wie auch das im Überschuß vorhandene Pepsin) mit 4,5 M Natriumchlorid ausgefällt. Die Methode wurde modifiziert nach Benya [158]. Je nach Gewicht der inkubierten Knorpelstücke wurden vergleichbare Mengen von Proteinen auf das 10 %ige Acrylamidgel aufgetragen und anschließend mit Coomassie Blue gefärbt (Abb. 72). In der Mitte des Gels sind bei den acht Proben die dicken Pepsinbanden zu erkennen. Im oberen Bereich des Bildes erkennt man schwache Banden von

den Kollagenabbau im Knorpel zurück schließen. Das Medium von Knorpelstücken, die für zwei Wochen mit IL-1 $\alpha$  und Zaprinast bzw. Trequinsin inkubiert wurden, wurde über diesen Zeitraum gesammelt und die Proteine mit Pepsin verdaut. Kollagene werden dabei nicht verdaut. Anschließend werden sie



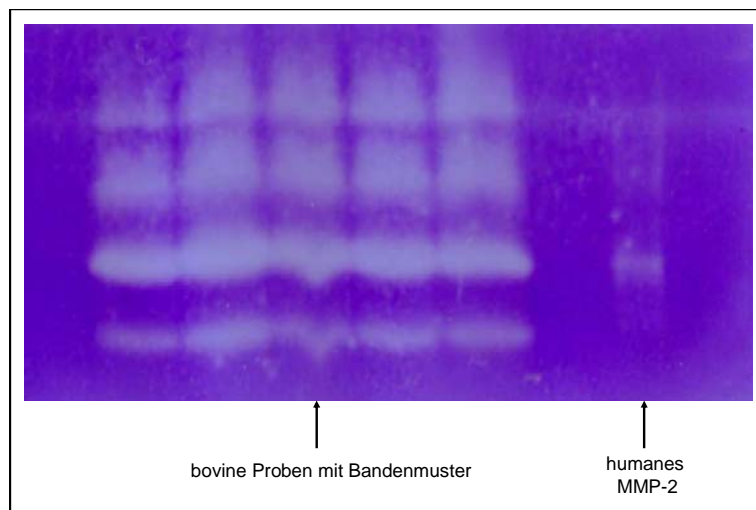
**Abb. 73:** Einfluss von Zaprinast auf die Hyaluronan Ausschleusung und den Proteoglykangehalt bei höheren Konzentrationen



**Abb. 74:** Einfluss von Trequinsin auf den Hyaluronanexport und Proteoglykangehalt

Kollagenabbauprodukten, bei der Kontrolle sowie den mit je 100  $\mu\text{M}$  Zaprinas und Trequinsin behandelten Proben erkennt man diese Bande allerdings nicht. Deutlicher werden die Unterschiede bei den kleinen Kollagenabbauprodukten, von denen mehr im Medium vorhanden sind, da diese ja auch einfacher aus der Knorpelmatrix hinaus in das Medium diffundieren können. Im Vergleich zwischen Kontrolle und Interleukin-1 $\alpha$  behandelten Knorpelstücken sieht man beim IL-1 $\alpha$  eine deutliche Bande, während man bei der Kontrolle keine Bande erkennen kann. Gibt man zum IL-1 $\alpha$  noch Trequinsin oder Zaprinas hinzu, so lässt die Intensität der Bande mit zunehmender Konzentration der MRP5 Inhibitoren nach. Der Effekt erscheint beim Trequinsin stärker ausgeprägt zu sein als beim Zaprinas. Eine Erklärung können die Abbildungen 73 bzw. 74 geben. Die Versuche zeigen in den schwarzen Balken die Hyaluronankonzentration im Medium von in Alginatebeads kultivierten Chondrozyten. Die weißen Balken zeigen die Proteoglykankonzentration in Knorpelstücken bei den entsprechenden Konzentrationen der Inhibitoren. Beim Zaprinas sind bei über 100 $\mu\text{mol/l}$  die Hyaluronankonzentration im Medium und die Proteoglykankonzentration des Knorpels wieder auf dem Spiegel der Kontrollen. Bei dieser Zaprinaskonzentration finden sich im Medium keine Kollagenabbauprodukte mehr. Bei einer Konzentration von 32  $\mu\text{mol/l}$  Zaprinas liegt die Hyaluronankonzentration noch bei 250 % des Kontrollwertes und der Proteoglykangehalt bei gut 60 %. Unter diesen Umständen finden sich Kollagenfragmente im Medium. Ähnlich verhält es sich beim Trequinsin. Hier ist bei einer Konzentration von 32  $\mu\text{M}$  die Hyaluronankonzentration schon unter dem Kontrollspiegel und der Proteoglykangehalt liegt bei 100 %. Auf dem Gel sieht man bei 30  $\mu\text{M}$  Trequinsin nur noch eine sehr schwache Bande für das kleinere Kollagenfragment. Es scheint also ein direkter Zusammenhang zwischen Hyaluronanausschleusung und Proteoglykangehalt des Knorpels einerseits sowie Kollagenabbau andererseits zu bestehen. Dieser Versuch fügt sich nahtlos in die vorhergegangenen ein und zeigt einen verminderten Verlust von Kollagenfragmenten aus und Abbau von Kollagen in der Knorpelmatrix bei gleichzeitiger Gabe der PDE5/MRP-5 Inhibitoren. Die Experimente aus Abbildung 73 und 74 zeigen darüber hinaus die Reproduzierbarkeit der in Kapitel 3.2 und 3.3 gemachten Untersuchungen.

### 3.4.3 Aktivität der Matrixmetalloproteasen



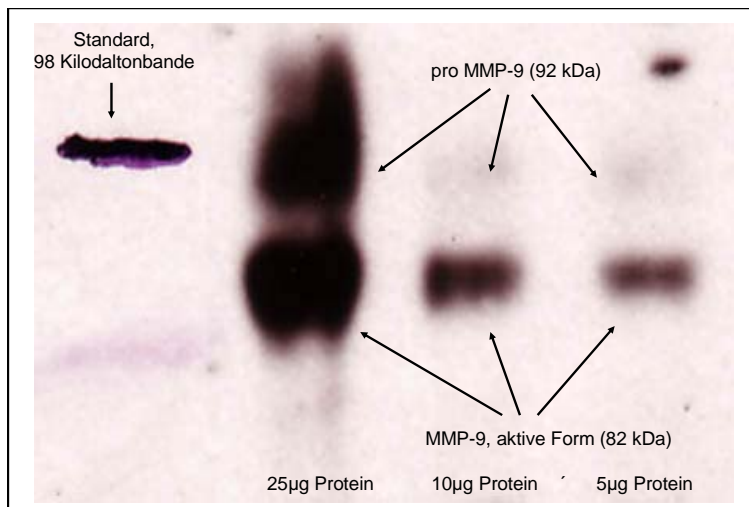
**Abb. 75:** MMP-2 in unseren Zymogrammen

Am Abbau der Kollagene im Knorpel sind in erster Linie die Matrixmetalloproteasen beteiligt. Für uns stellte sich die Frage, ob und wenn inwieweit eine Hemmung des MRP5 Transporters und die damit verbundene verminderte Hyaluronanausschleusung einen Einfluss auf die Synthese und/oder auf die Aktivität der Matrixmetalloproteasen haben.

Vielleicht geben uns diese Versuche eine Erklärung für den verminderten Kollagenabbau mit den PDE5/MRP5 Inhibitoren. Die Knorpelstücke werden kultiviert und die ins Medium sezernierten Matrixmetalloproteasen 2 und 9 können mit Hilfe der Gelatin-Zymographie nachgewiesen werden. Die Proteine werden mit einer normalen Arylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dem Gel ist Gelatine zugesetzt. Nach einer Inkubation in einem Tris/HCl Puffer mit Calcium und Zinkionen, welche die Matrixmetalloproteasen für Ihre Aktivität benötigen, wird das Gel in Coomassie Blue gefärbt. Die Stellen, an denen MMP-2 und MMP-9 die Gelatine verdaut haben, entstehen nicht gefärbte, helle Lysehöfe. Je nach Größe dieser Banden kann auf die Aktivität der MMPs in der Probe zurück geschlossen werden. Nachdem wir unter unseren Kulturbedingungen immer mehrere Banden feststellen konnten, galt es abzuklären, ob diese Banden auch zu den Gelatinasen A und B gehörten (MMP-2 und MMP-9). Im Fall von MMP-2 mit der pro-Form bei 72 Kilodalton und der aktiven Form bei 62 Kilodalton wurde eine Probe von humanem MMP-2 mitgelaufen lassen. Wie man in der Zymographie in Abbildung 75 sieht, läuft das humane MMP-2 auf Höhe der besonders prominenten Banden. Dies sind die zweiten von unten, sie laufen ein wenig unter die Standardbande von 64 kDa. Das sieht man in dieser Zymographie nicht, aber in Abbildung 79 ist das Gel hell genug, so dass man auch die dunklen Banden des Proteinstandards erkennen kann. Die MMP-2 Form mit 62 kDa läuft also wie erwartet. Die jeweils schwachen hellen Banden am unteren Ende der Zymographie sind nicht zu identifizierende Abbauprodukte der

Matrixmetalloproteasen. Damit ist geklärt, dass es sich um die zweite Bande von unten um die aktive Form von MMP-2 handelt.

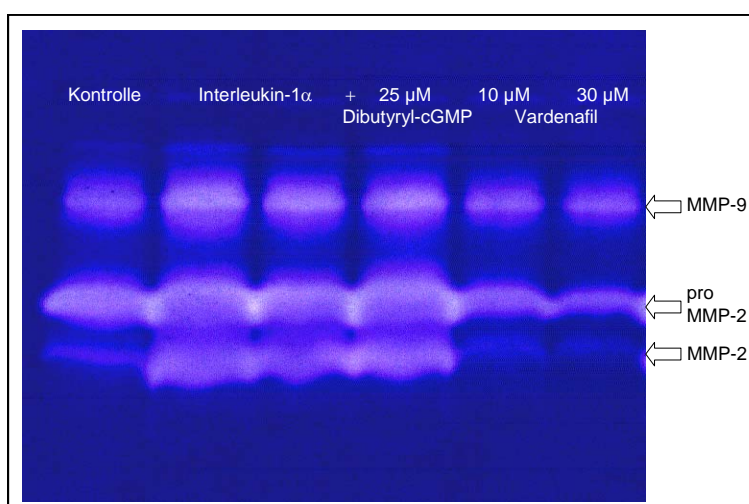
Im Falle von MMP-9 wurde uns ein Antikörper gegen dieses Enzym von Frau Dr. Dreier zur Verfügung gestellt. Das Medium



**Abb. 76:** Westernblot, Nachweis pro MMP-9 & MMP-9

einem Proteingewicht von 92 Kilodalton erkennen, sowie darunter die stärkere Bande der aktiven MMP-9 Form mit einem Molekulargewicht von 82 Kilodalton. Damit konnten wir unsere Versuche durchführen und davon ausgehen, dass in unseren Kulturen mit bovinen Knorpelstücken die Matrixmetalloproteasen-2 und -9 aus der Knorpelmatrix ins Medium gelangten und dort dann mit Hilfe von Gelatin-Zymographien nachgewiesen werden konnten.

Nun wurden die Aktivitäten der MMPs in den Knorpeln untersucht. In unseren Experimenten wurden Knorpelstücke mit den Inhibitoren für fünf Tage mit und ohne Interleukin-1 $\alpha$



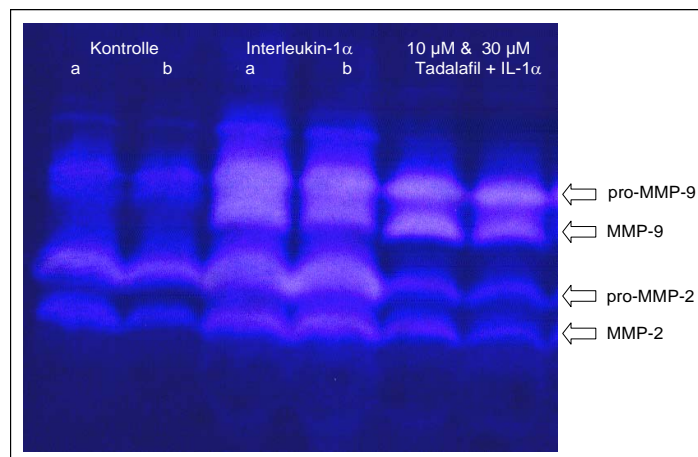
**Abb. 77:** Verminderte MMP Aktivität mit Vardenafil, nicht mit Dibutyryl-cGMP

gekultiviert. Das Medium von kultivierten Knorpeln wurde mit TCA gefällt und in mehreren Schritten die Proteine aufgereinigt. Der Westernblot wurde wie in Kapitel II beschrieben durchgeführt. Auf dem Blot kann man kurz unter der 98 Kilodaltonbande des SeeBlue® Plus2 Standards zum einen die Zymogenform von MMP-9 mit

inkubiert, die Knorpelstücke anschließend gewogen und eine auf das Gewicht bezogene äquivalente Menge von Medium auf die Gele aufgetragen. Die Entwicklung der Zymogramme erfolgte wie in Kapitel II beschrieben. Sowohl bei der Kontrolle als auch den mit Interleukin-1 $\alpha$  behandelten Knorpelproben konnte im

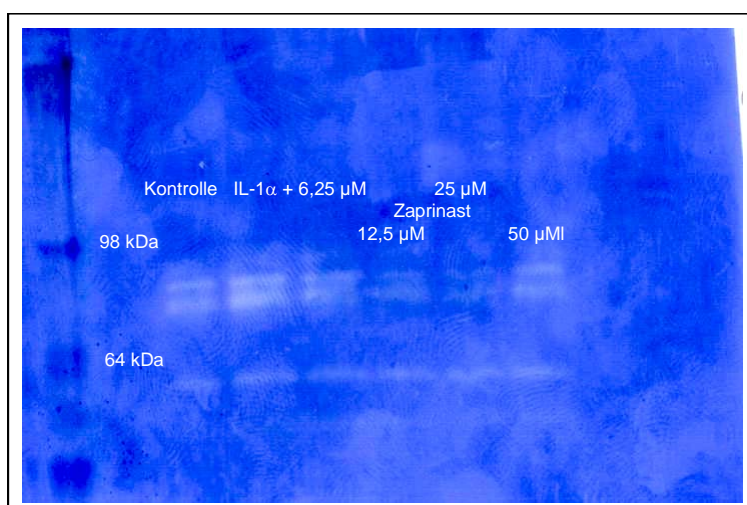
Medium immer MMP-2, pro MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden. In den meisten Fällen war die oberste Bande, welche pro-MMP-9 darstellte, nur schwach zu erkennen. Wenn

der Knorpel besonders aktiv war, konnte aber auch diese Bande stärker ausgeprägt vorliegen. In dem Zymogramm in Abbildung 77 erkennt man eine erhöhte MMP-Aktivität in den mit IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpelstücken. Eine gleichzeitige Inkubation der Knorpel mit 25  $\mu$ M Dibutyryl-cGMP und IL-1 $\alpha$  hat im Vergleich zu IL-1 $\alpha$  alleine keine reduzierte MMP-Aktivität zur Folge. Sowohl 10  $\mu$ M wie auch 30  $\mu$ M Vardenafil reduzieren die Aktivität der Matrixmetalloproteasen. MMP-9 wird schwächer, während die MMP-2 Aktivität nur noch zu erahnen ist und auf die Aktivität der Kontrolle reduziert wird. In Abbildung 78 wird die Aktivität der MMPs mit zwei Kontrollen, zwei mit IL-1 $\alpha$  aktivierten Proben sowie 10- und 30  $\mu$ mol/l Tadalafil gezeigt. IL-1 $\alpha$  steigert Aktivität der MMPs im Verhältnis zur Kontrolle deutlich. Tadalafil ist in den eingesetzten Konzentrationen in der Lage die MMP-9 Aktivität leicht zu reduzieren und senkt die MMP-2 Aktivität auf das Niveau auf das der Kontrollen ab. Als letzter PDE5/MRP5 Inhibitor wurde Zaprinast untersucht. In Abbildung 79 erkennt man sehr gut die Doppelbanden von pro-MMP-9 und MMP-9. Weniger stark ausgeprägt ist in diesem Zymogramm die MMP-2

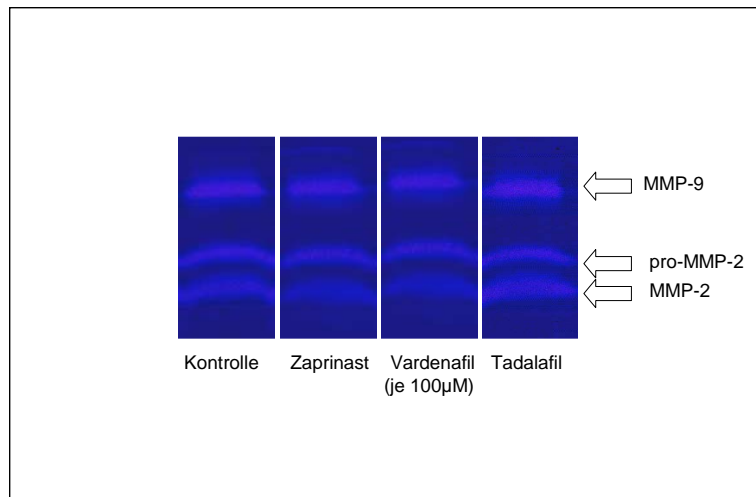


**Abb. 78:** Verminderte MMP-Aktivität mit Tadalafil

Aktivität. Wie bei Vardenafil und Tadalafil reduziert Zaprinast die MMP Aktivität sichtbar. Auf der linken Seite ist zur Orientierung ein Proteinstandard aufgetragen. Zaprinast besitzt wieder einen ausgeprägten Effekt bei 6,25  $\mu$ M im Vergleich zu 12,5- und 25  $\mu$ M.



**Abb. 79:** Zymogramm mit Zaprinast



**Abb. 80:** Keine verminderte MMP-Synthese durch die MRP-5 Inhibitoren

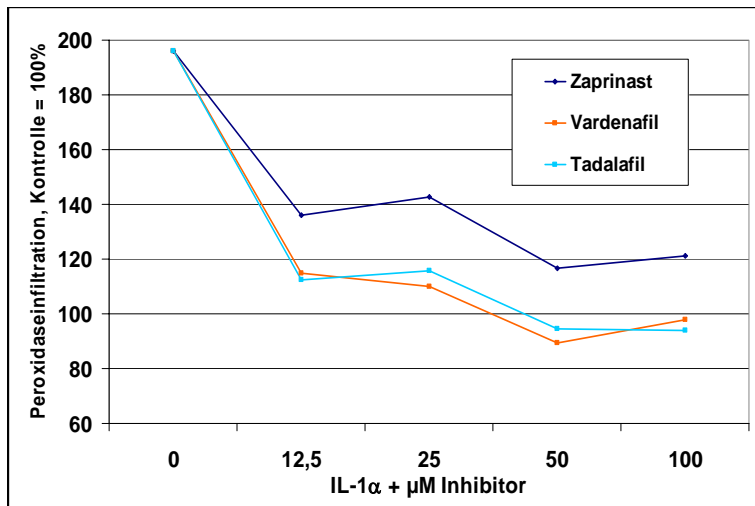
Um zu untersuchen, ob die reduzierte MMP Aktivität Folge einer reduzierten MMP Synthese seitens der Chondrozyten war, wurden die Knorpelstücke mit 100  $\mu$ M Zaprinast, Vardenafil oder Tadalafil ohne IL-1 $\alpha$  inkubiert. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den Aktivitäten festgestellt werden.

In Abbildung 80 sind die Banden für MMP-9, pro-MMP-2 und MMP-2 deutlich zu erkennen. Die reduzierte MMP Aktivität in den Zymogrammen 77, 78 und 79 ist also nicht eine Folge der reduzierten Synthese durch die PDE5/MRP5 Inhibitoren, sondern auf andere Gründe zurückzuführen.

#### 3.4.4 Messung der Diffusion von Proteinen im Knorpel nach Interleukin - 1 $\alpha$ Behandlung

Um abschätzen zu können, ob eine gesteigerte Hyaluronanproduktion infolge Interleukinbehandlung die Diffusionsgeschwindigkeit für die Matrixmetalloproteasen erhöht, wurde eine neue Methode entwickelt. Die Methode funktioniert nach einem einfachen Prinzip. Die Knorpelproben werden für zwei Wochen kultiviert. Dann werden Stücke gleicher Oberfläche und Größe aus dem Knorpel herausgestanzt und in eine Peroxidaselösung, einem Enzym mit ähnlichem Molekulargewicht wie die Matrixmetalloproteasen, gelegt. Die Peroxidase kann dann für eine Stunde in die Knorpelmatrix eindiffundieren. Dies geschieht in Abhängigkeit von dem Quellgrad und Wassergehalt des Knorpels. Nach einer Stunde werden die Stücke gründlich gewaschen und über Nacht in PBS gelegt. Je mehr Peroxidase zuvor in das Gewebe eingewandert ist, desto höher ist dann die Konzentration der Peroxidase im PBS. Anschließend kann die Peroxidasekonzentration sehr einfach mittels einer ABTS-Lösung fotometrisch bestimmt werden. In unserem Versuch wurde also Knorpel mit IL-1 $\alpha$  und den PDE5/MRP5 Hemmern für zwei Wochen kultiviert. Danach wurden die Knorpel wie gerade beschrieben behandelt. Die Abbildung 81 zeigt den Versuch, es wurden achtfach Bestimmungen durchgeführt. Inkubiert man die Knorpelstücke mit Interleukin-1 $\alpha$  allein, ist





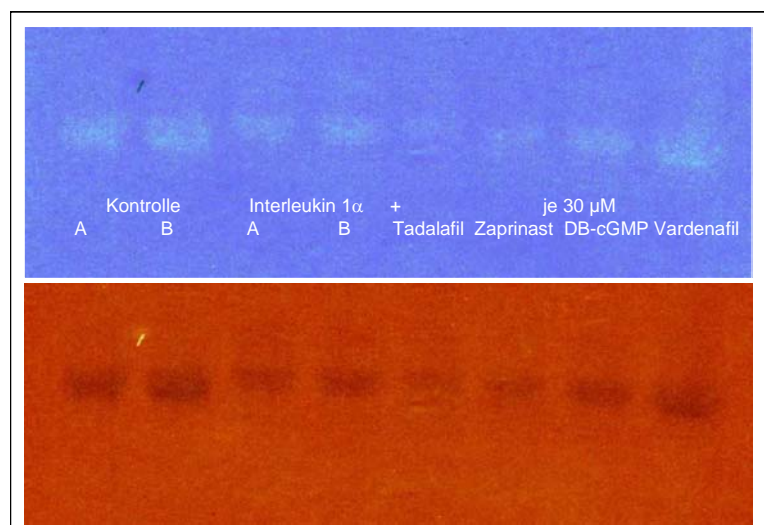
**Abb. 81:** Peroxidaseinfiltration in Knorpelmatrix mit IL-1 $\alpha$  und der MRP-5 Inhibitoren

die Peroxidaseinfiltration ins Gewebe doppelt so hoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Werden die Knorpelstücke über die zwei Wochen mit Zaprinst, Vardenafil oder Tadalafil behandelt, vermindert sich die Konzentration der ins Gewebe diffundierten Peroxidase deutlich und geht ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M

Vardenafil und Tadalafil bis auf den Kontrollspiegel zurück. Die mit Zaprinst inkubierten Knorpelstücke zeigen parallel versetzt eine höhere Peroxidasekonzentration in der extrazellulären Matrix, hier gehen die Werte bei 50  $\mu$ M auf 120 % des Kontrollspiegels zurück. Wir schließen aus diesen Ergebnissen, dass die Matrixmetalloproteasen in Knorpel, der mit IL-1 $\alpha$  behandelt wird, leichter hinein- und hindurchdiffundieren können als in unbehandelten Knorpel oder mit IL-1 $\alpha$  und den PDE5/MRP5 Hemmstoffen behandelten Knorpel. Dies kann als Erklärung für eine reduzierte Aktivität der Matrixmetalloproteasen nach Inkubation des Knorpels mit Zaprinst, Vardenafil oder Tadalafil gesehen werden.

### 3.4.5 Hyaluronan-Zymographie

Hyaluronan kann durch die Hyaluronidase verdaut werden. Es wurden schon viele Untersuchungen durchgeführt, um eine Korrelation zwischen Hyaluronidasespiegeln im Plasma oder der Synovialflüssigkeit und dem Vorliegen einer rheumatischen Arthritis oder Arthrose festzustellen. Während es weitgehend anerkannt ist, dass



**Abb. 82:** Hyaluronan-Zymographie

im Plasma erhöhte Hyaluronidasespiegel bei gleichzeitiger rheumatischer Arthritis nachgewiesen werden können, ist dies für eine arthrotische Erkrankung noch nicht hinreichend nachgewiesen worden [159]. Eine einfache semiquantitative Methode zur Aktivitätsbestimmung stellt die Hyaluronan Zymographie dar. Hierzu wird in ein Polyacrylamidgel Hyaluronan mit eingemischt. Nach Auftrennung der Proteine muss das Gel für gewisse Zeit bei pH 3,7 und 37 °C inkubiert werden, da hier das pH Optimum der Hyaluronidase liegt. Die Zymographie wurde wie bei Afify 1993 beschrieben durchgeführt [160]. Nach Inkubation wird das nicht verdaute Hyaluronan mit einer Alcianblaulösung gefärbt. Zwei Umstände führen zu einer etwas ungünstigen Ausgangslage bezüglich der Schärfe der Banden. Erstens wird das Gel hellblau gefärbt, so dass nur ein schwacher Kontrast zu den klaren Banden entsteht und zweitens teilt sich die Hyaluronidase in zwei Banden bei 42 und 50 kDa auf, die nach der Elektrophorese nicht scharf genug aufgetrennt werden. So kommt also das etwas unscharfe Zymogramm in Abbildung 82 zustande. Zum Zwecke einer stärkeren Kontrastierung ist einmal in der oberen Hälfte der Abbildung das Gel dunkler gemacht worden und in der unteren Hälfte die Farbgebung invertiert. Folgendes erkennt man dennoch recht deutlich: Die beiden Kontrollen zeigen eine höhere Hyaluronidase-Aktivität als die beiden Banden der mit IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpelproben. Von den mit IL-1 $\alpha$  und den Inhibitoren bzw. Dibutyryl-cGMP behandelten Proben ist noch erwähnenswert, dass die mit Vardenafil behandelte Probe ähnlich aktiv ist wie die Kontrolle. Eine Deutung dieses Befundes könnte sein, dass aus dem Knorpel weniger Hyaluronidase ins Medium gelangt, weil in den mit IL-1 $\alpha$  behandelten Proben ja innerhalb des Knorpels mehr Substrat für die Hyaluronidase vorhanden ist und sie deshalb nicht frei aus dem Knorpel diffundieren kann. Dies bringt uns zum nächsten Punkt. Es ist bekannt, dass Hyaluronan oligosaccharide in der Lage sind, die Produktion von Matrixmetalloproteasen erhöhen [161]. Die Fragmente sollen insbesondere die Transkription von MMP-9 und MMP-13 erhöhen.

### 3.5 Einflüsse des cGMP-Signalweges auf den Metabolismus von Hyaluronan, Proteoglykanen und Kollagen

#### 3.5.1 Versuche mit cGMP Analoga und anderen Modulatoren des cGMP-Signalwegs

Die MRP5 Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil hemmen mit einer 1000fach höheren Affinität die Phosphodiesterase5, die auch konstitutiv in Chondrozyten exprimiert wird [162]. Da die Phosphodiesterase5 cyclisches Guanosinmonophosphat abbaut, führt eine Hemmung dieses Enzyms zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP Spiegels. Da dieser Effekt untrennbar mit der MRP5 Hemmung verbunden ist, galt es zu untersuchen, ob ein erhöhter cGMP Spiegel bzw. eine Hemmung der Phosphodiesterase5 einen Einfluss auf die Matrixmoleküle besitzt. Zuvorderst wurde das nicht hydrolysierbare Dibutyryl-cGMP für diese Untersuchungen eingesetzt, welches die Chondrozytenmembran passieren kann und durch die Phosphodiesterase5 nicht abgebaut wird. Daneben wurde auch ein hydrolysierbares cGMP Analogon, das Bromo-cGMP, untersucht. Indem wir beide cGMP Analoga untersuchten, konnten wir gleichzeitig feststellen, inwieweit die Aktivität der Phosphodiesterase5 eine Rolle bei der Synthese von Hyaluronan spielt. Beim Dibutyryl-cGMP ist die Phosphodiesterase nicht aktiv, beim Abbau des Bromo-cGMP schon.

Neben diesen cGMP Analoga wurden auch weitere Modulatoren des cGMP Signalweges untersucht. Deren „Angriffspunkte“ sind in Abbildung 83 dargestellt. Zum einen noch ODQ, welches vom englischen Namen für die Substanz abgeleitet ist (1H-[1,2,4]-Oxadiazolo(4,3a)quinoxaline-1-one). ODQ ist ein selektiver und potenter Inhibitor der löslichen und NO-induzierbaren Guanylatcyclase [163]. Interleukin-1 induziert über NO die Guanylatcyclase, welche vermehrt cGMP bildet. Mit ODQ wurde untersucht, ob dieser Signalweg nach IL-1 $\alpha$  Gabe zu der Hyaluronan-überproduktion in Chondrozyten führt. Wenn ODQ die Hyaluronanproduktion nach IL-1 $\alpha$

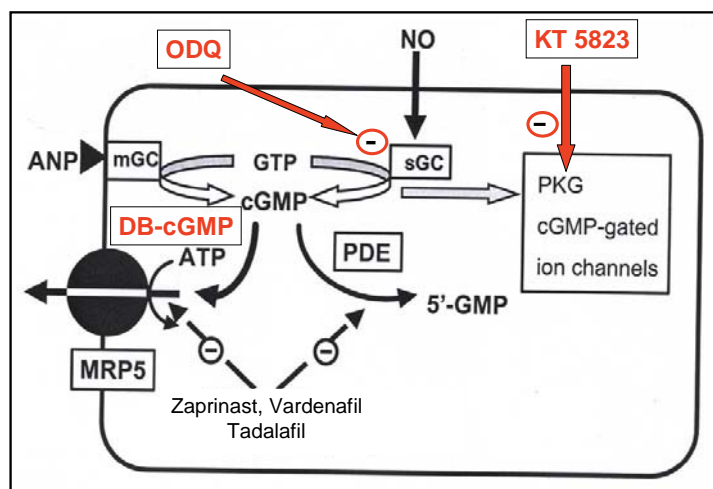
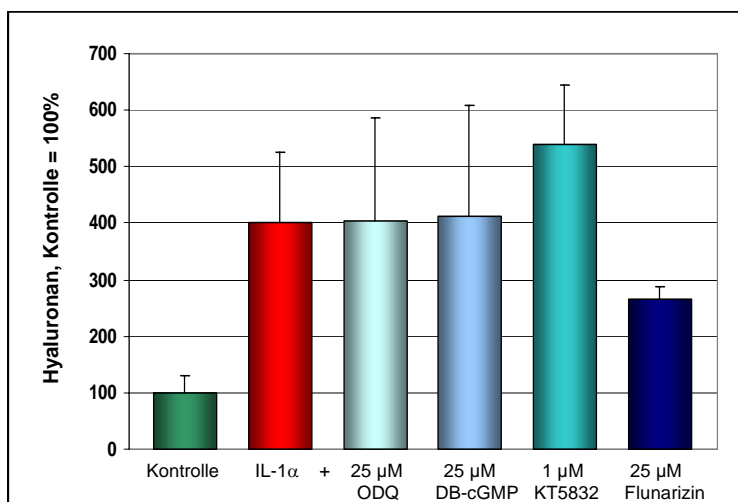


Abb. 83: Intrazelluläre Effekte der PDE5 Hemmung

Gabe hemmt, wäre dies ein Hinweis für Beteiligung von cGMP an der Hyaluronansynthese. Desweiteren wurde mit KT5823 ein Hemmstoff der Proteinkinase G untersucht. Die Proteinkinase G wird durch cGMP aktiviert und vermittelt einen verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Die Untersuchungen mit KT5832 werden Aufschluss darüber geben, ob die Proteinkinase G die Hyaluronansynthese beeinflusst. Mit Natriumnitroprussid wurde auch ein NO-Donator eingesetzt, der ganz am Anfang der Signalkaskade eingreift. Das atriale natriuretische Peptid aktiviert im Gegensatz zum NO nicht die lösliche Guanylatcylase, sondern die membranständige Guanylatcylase und bildet auf diesem Weg mehr cyclisches GMP. Als letzten Modulator wurde das Flunarizin untersucht, ein Calmodulin-Antagonist, was dann zu einer Aktivierung der Phosphodiesteraseaktivität führen soll.

In Abbildung 84 ist die Hyaluronankonzentration im Medium von in Alginatbeads

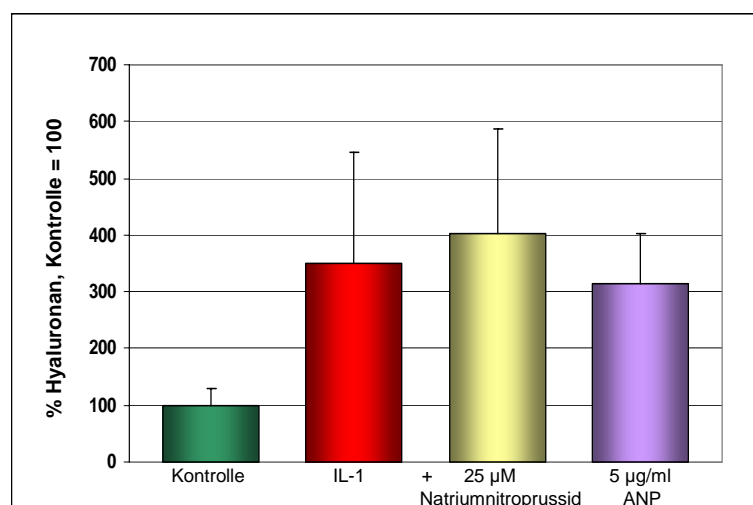


**Abb. 84:** Beeinflussung der Hyaluronankonzentration durch Modulatoren des cGMP-Signalweges

kultivierten Chondrozyten zu sehen. Weder 25  $\mu\text{M}$  Di-butyryl-cGMP noch eine Hemmung der löslichen Guanylatcylase mit ODQ beeinflusst die Hyaluronankonzentration im Medium nach Inkubation mit IL-1 $\alpha$ . Die Hemmung der Proteinkinase G mit 1  $\mu\text{M}$  KT5832 führt zu einer erhöhten Hyaluronankonzentration im Medium. Die Gabe von 25

$\mu\text{M}$  Flunizarin vermindert den Gehalt an Hyaluronan auf rund 2/3 des mit IL-1 $\alpha$  erzielten

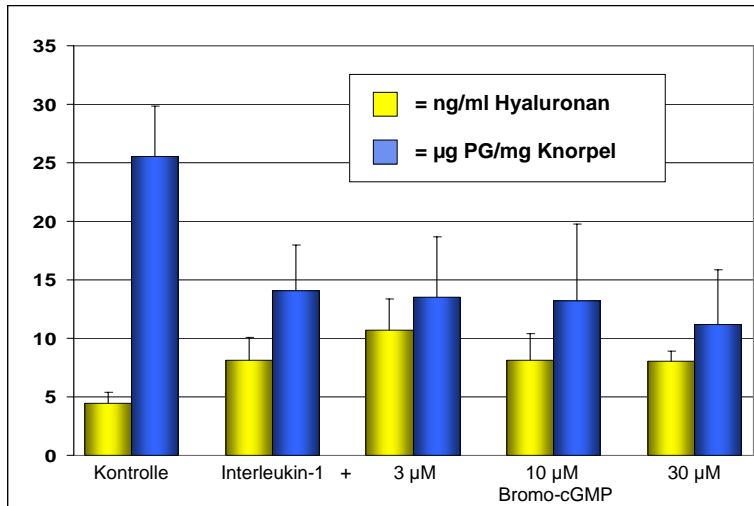
Wertes. In Abbildung 85 ist der gleiche Versuchsaufbau mit IL-1 $\alpha$  und 25  $\mu\text{M}$  Natriumnitroprussid und 5  $\mu\text{g/ml}$  des atrialen natriuretischen Peptides dargestellt. Diese beiden Stoffe führen nicht zu einer nennenswerten Änderung der Hyaluronankonzentration im Medium. Diesen Ergebnissen nach wirkt sich



**Abb. 85:** Einfluss von NO und atrialem natriuretischen Peptid auf die Hyaluronanausschleusung

weder eine Erhöhung noch eine Erniedrigung des intrazellulären cGMP Spiegels auf die Hyaluronansynthese aus.

Bromo-cGMP wirkte in Konzentrationen von 3-30  $\mu\text{M}$  auf bovine Knorpelstücke ein. Nach Beendigung des Versuchs wurde einmal die Hyaluronankonzentration im Überstand gemessen und die Proteoglykankonzentration in den Knorpelstücken. Die



**Abb. 86:** Einfluss von Bromo-cGMP auf Knorpelstücke

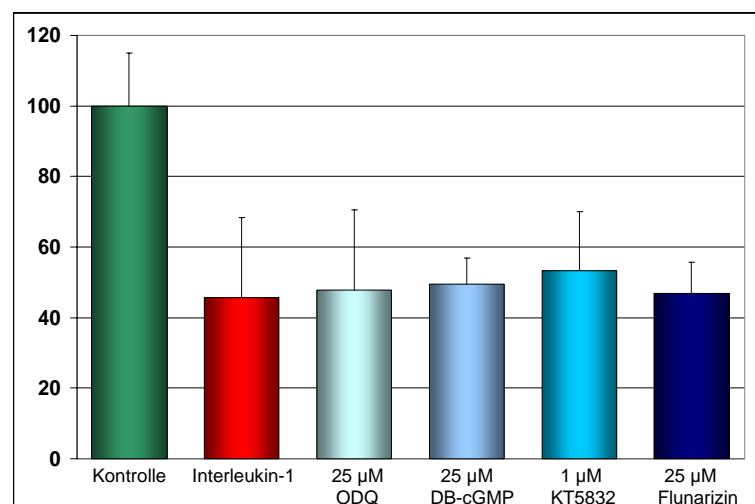
Hyaluronankonzentration wird in Abbildung 86 durch die gelben Balken dargestellt. Die Alcianblauen Balken stehen für die Proteoglykane. Erwartungsgemäß sinkt die Proteoglykankonzentration nach Inkubation mit IL-1 $\alpha$  ab. Die Zugabe von Bromo-cGMP in Konzentrationen von 3, 10 und 30  $\mu\text{M}$  verändert den Proteoglykan-

gehalt der Proben im Vergleich zu den nur mit IL-1 $\alpha$  inkubierten Knorpelstücken nicht. Die Hyaluronankonzentration wird durch Bromo-cGMP auch nicht signifikant beeinflusst.

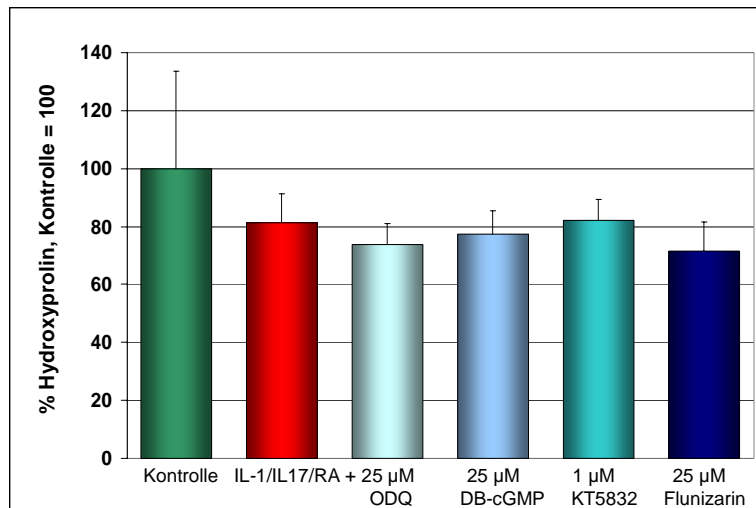
Der Einfluss von ODQ, Dibutyryl-cGMP, KT5832 und Flunarizin auf den Proteoglykangehalt des Knorpels wurde gemessen. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abbildung 87 zu sehen. Der Proteoglykangehalt der Knorpel sank nach IL-1 $\alpha$  Behandlung auf unter 50 % des Kontrollwertes ab. Keine der oben aufgeführten Substanzen führte zu einer Veränderung des Proteoglykangehalts im Knorpel.

Während KT5832 und Flunarizin

die Hyaluronansynthese in geringem Maße beeinflussten, ist bei diesen Substanzen hier kein Effekt zu erkennen.



**Abb. 87:** Beeinflussung des Proteoglykangehalts durch Mediatoren des cGMP-Signalwegs

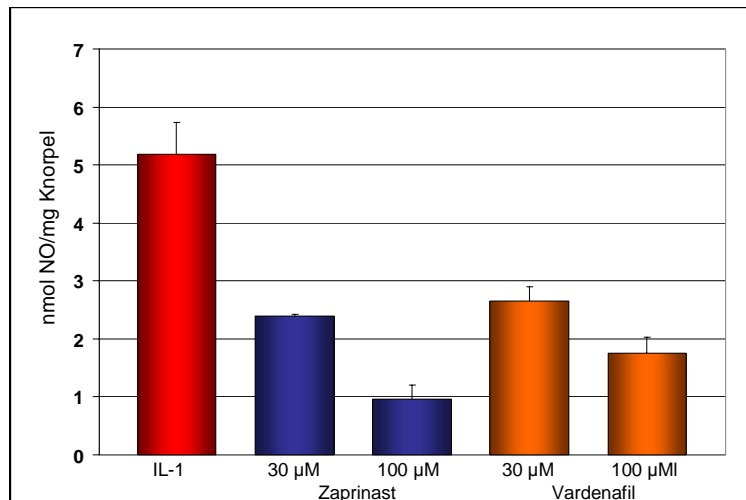


**Abb. 88:** Beeinflussung des Hydroxyprolingehaltes durch Modulatoren des cGMP-Signalweges

Nach der Hyaluronankonzentration im Medium und den Proteoglykanen im Knorpel wurde auch der Kollagengehalt der Knorpelstücke nach Inkubation mit den Modulatoren des cGMP-Signalweges untersucht. Um innerhalb von vier Wochen einen messbaren Kollagenabbau zu erzeugen, wurden die Proben mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure

inkubiert. Der Hydroxyprolinanteil so behandelten Knorpelstücke lag nach Beendigung des Experiments bei 80 %. Die mit ODQ, Dibutyryl-cGMP, KT5832 und Flunarizin zusätzlich behandelten Proben lagen mit ihren Hydroxyprolinwerten im gleichen Bereich. Eine Steigerung der Hydroxyprolinkonzentration war in Abbildung 88 ganz klar nicht zu erkennen.

### 3.5.2 NO-Produktion im Knorpel



**Abb. 89:** NO-Produktion im Knorpel nach IL-1 Gabe

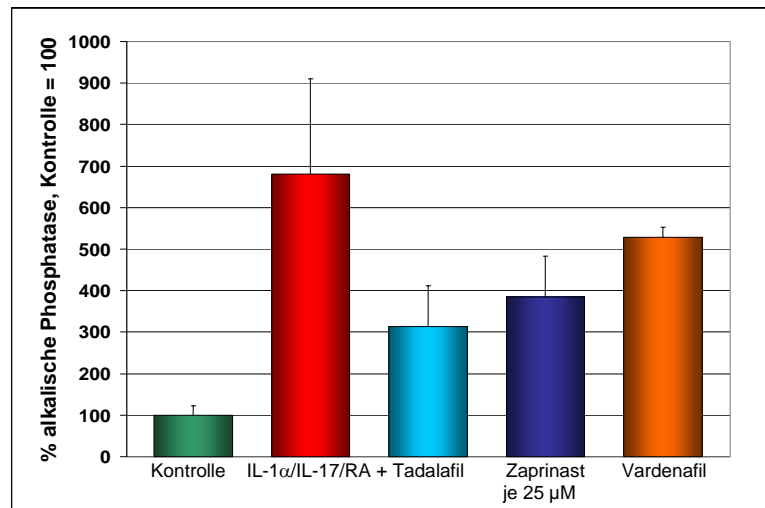
Interleukin-1 $\alpha$  erhöht in Chondrozyten die NO-Produktion [164-166]. NO spielt eine Rolle bei der Proliferation und Apoptose der Chondrozyten [167;168]. Mit den MRP-5 Inhibitoren wurde die NO Produktion im Knorpel deutlich gesenkt. In Abbildung 89 ist dies für Zaprinast und Vardenafil gezeigt. In der unbehandelten

Kontrolle konnte kein NO im Medium nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur, in denen gezeigt wurde, dass die Phosphodiesterase5 für die NO-Synthese benötigt wird und bei einer Hemmung auch weniger NO produziert wird [162]. Da NO an mehreren Stellen den Stoffwechsel von Chondrozyten beeinflusst, ist es durchaus vorstellbar, dass dieser NO hemmende Effekt mit zu der besseren Knorpelkonstitution nach Arthrose-Induktion durch IL-1 $\alpha$  Gabe beiträgt. In der Literatur ist man sich noch nicht völlig einig, ob NO direkt an der MMP-Synthese beteiligt ist, oder ob es im Zuge der Aktivierung der MMPs durch Zytokine wie Interleukin-1 $\alpha$  auch hochreguliert wird [169;170].

### 3.5.3 Messung der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist ein Indikator für den Übergang der Chondrozyten in ein hypertrophes Stadium. Artikulärer Knorpel produziert eher geringe Mengen davon. Unsere Messung fand zwei Wochen nach Beginn des Versuches zur Messung des Hydroxyprolinegehaltes statt. In Knorpel, der nur für wenige Tage mit IL-1 $\alpha$  allein behandelt wurde, konnte man keinen Unterschied zwischen den sehr niedrigen alkalischen Phosphatase-Spiegeln ausmachen. Wenn Chondrozyten hypertrophieren bilden sie neben der alkalischen Phosphatase vor allem Kollagen X und nicht mehr die Matrix aufbauenden Kollagene II, IX

und XI [171] [172]. Sie werden größer, sterben ab und calcifizieren. In arthrotischem Knorpel ist der Anteil an hypertrophen Chondrozyten im Vergleich zum gesunden Knorpel erhöht. Darum können erhöhte Spiegel von alkalischer Phosphatase auf eine vermehrte Anzahl von hypertrophen Chondrozyten hinweisen. In den Ergebnissen des Versuchs, zu sehen in Abbildung 90, wurde die alkalische Phosphatase in Überständen von Knorpelstücken gemessen, die bereits für zwei Wochen mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure behandelt worden waren. Die nur mit diesen Stoffen behandelten Knorpelproben wiesen knapp siebenmal höhere alkalische Phosphatasekonzentrationen auf im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die mit je 25  $\mu$ M der PDE5/MRP5 Inhibitoren behandelten Knorpel-



**Abb. 90:** Alkalische Phosphatase aus Knorpelstücken

proben zeigten verminderte Phosphatasespiegel im Medium. Dabei nahm die Senkung vom Tadalafil über Zaprinast bis zum Vardenafil hin ab. In den Knorpelstücken, die mit den PDE5 Hemmern behandelt wurden, war also die Anzahl an hypertrophen Chondrozyten vermindert.



## 4. Diskussion

### 4.1 Neue und überarbeitete Methoden

Um den Rahmen dieser Arbeit nicht unnötig aufzublähen, wurde darauf verzichtet, den Weg zu neuen oder modifizierten Methoden explizit aufzuzeichnen. Auch wenn die Beschäftigung mit der Methodik und deren Modifizierung den größten Teil der vorliegenden Arbeit ausgemacht hat. In Kapitel II sind alle Methoden ausführlich so dargestellt, wie sie im Verlauf der Arbeit auch zum Einsatz gekommen sind. Besonders hingewiesen sei auf die Messung der Proteoglykane in Knorpelstücken. Die Alcianblaumethode zeigte sich als robuster und genauer als die sonst vielfach in der Literatur benutzte Methode mit 1,9-Dimethyl-Methylenblau.

Die Methode zur Messung der Infiltration von Proteinen mit einem Molekulargewicht ähnlich dem der Matrixmetalloproteasen in bovinen Knorpel mittels Peroxidase wurde vollständig neu entwickelt. Sie stellt eine einfache und günstige Möglichkeit der Messung dar, in welchem Ausmaß Enzyme in die Knorpelmatrix hinein diffundieren können.

Die Methode zum Kollagenabbau und die Methodik der anschließenden Hydroxyprolin-Messung wurden fast vollständig umgearbeitet. Die Kombination aus IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure ist nicht zuvor in der Literatur beschrieben worden. Die Sensitivität der Hydroxyprolinmessung wurde durch Zugabe und/oder Austausch organischer Lösemittel erhöht. Bei dem ganzen Versuchsaufbau wurde auf hohe Praktikabilität und einem ökonomischen Mitteleinsatz Wert gelegt. So ist es mit dieser Methode möglich, innerhalb von 28 Tagen einen Kollagenabbau in artikulärem, bovinem Knorpel zu erzeugen und dies mit einem vertretbaren Einsatz an Zeit und Mitteln zu messen. Die ebenfalls durchgeführte Messung des Hydroxyprolinegehalts mittels HPLC und Fluoreszenzdetektor können wir hier nicht weiterempfehlen.

Die Beschreibungen zu der Kultivierung der Chondrozyten in Alginkulturen sind allesamt Erfahrungswerte aus über drei Jahren Arbeit mit dieser Kulturform, sie werden Neueinsteigern die Arbeit damit sicher erleichtern.

Nahezu alle anderen Methoden wurden ebenfalls überarbeitet und angepasst.

## 4.2 Nachweis der ABC-Transporter

Zu Beginn der Arbeit wurde mittels PCR untersucht, welche ABC Transporter in bovinen Chondrozyten exprimiert werden. Es konnten insgesamt neun ABC Transporter aus vier Unterfamilien nachgewiesen werden. Die Transporter der MRP-Unterfamilie (Multidrug-Related Protein) MRP4, MRP5 und MRP8 weisen eine besonders hohe Verwandtschaft auf.

ABC Transporterfamilien			
ABCA	ABCB MDR	ABCC MRP	ABCF
ABCA1	MDR1	MRP1	ABCF1
	ABCB5	MRP4	
		MRP5	
		MRP7	
		MRP8	

**Abb. 91:** ABC Transporter im bovinen Knorpel

Von den in Abbildung 91 aufgeführten neun Transportern wurden der ABCA1, MDR1, MRP1 und der MRP5 Transporter weiter untersucht, da die in der Literatur beschriebenen Substrate dieser Transporter aufzeigen, dass auch Hyaluronan von ihnen transportiert werden könnte. Diese Transporter schleusen negativ geladene

organische Moleküle aus der Zelle heraus. Als Inhibitoren für diese Transporter wurden Glibenclamid (ABCA1), Verapamil (MDR1), Probenecid (MRP1) und Zaprinast (MRP5) eingesetzt. Wurde die Hyaluronankonzentration im Medium von mit IL-1 $\alpha$  und den ABC-Inhibitoren kultivierten Knorpelstücken gemessen, erreichte Zaprinast, im Vergleich zum Verapamil und Probenecid ein recht selektiver Inhibitor für einen ABC Transporter, eine Hemmung der Hyaluronanausschleusung bei gleichzeitig der geringsten Hemmung der Hyaluronansynthese. Untersuchungen mit Doxorubicin, einem Antibiotikum aus *Streptomyces peuceticus*, zeigten an unstimulierten Chondrozyten in Alginatbeads in 1  $\mu$ molaren Konzentrationen eine Erhöhung der Hyaluronanproduktion um 62 %. Diese vermehrte Hyaluronanproduktion führen wir auf die durch Doxorubicin erhöhte Expression von MRP5 zurück. Gleichzeitig von Herrn Professor P. Prehm durchgeführte Inhibitorstudien an humanen Fibroblasten und Versuche einer parallel angefertigten Dissertation in der Arbeitsgruppe mit si-RNA für ABC Transporter deuteten ebenfalls auf MRP5 als den an der Hyaluronanausschleusung beteiligten ABC Transporter hin. Aufgrund dieser Ergebnisse gehen wir von MRP5 als einem Hyaluronantransporter in Chondrozyten aus. Bis dato können wir aber die Beteiligung von anderen ABC Transportern an der Hyaluronanausschleusung nicht ausschließen.

### 4.3 Verminderte Hyaluronanausschleusung

Da Chondrozyten einen gemäßigten Stoffwechsel haben und unter normalen Bedingungen nur wenig Hyaluronan produzieren, sind die Zellen in diesem „unstimulierten“ Zustand ungeeignet, um die Ausschleusung von Hyaluronan an ihnen zu testen. Man erkennt keine Unterschiede bei der Gabe der PDE5/MRP5 Inhibitoren. Um eine erhöhte Hyaluronansynthese zu erreichen, gibt es mehrere Möglichkeiten wie zum Beispiel eine Stimulierung mit FCS, Gabe von Retinsäure oder Inkubation mit Interleukin-1 $\alpha$ . Da wir uns mit unserem Modell so nah wie möglich an der realen Situation in vivo in arthrotischen Gelenken orientieren wollten, wurde in erster Linie mit Interleukin-1 $\alpha$  als stimulierendem Zytokin gearbeitet. Unsere Untersuchungen an bovinen Chondrozyten zeigten, dass eine Gabe von 2ng/ml IL-1 $\alpha$ /Tag optimal ist, um eine erhöhte Hyaluronanproduktion zu erreichen. Diese Konzentrationen (bis zu einem ng/ml) wurden auch in der Synovialflüssigkeit erkrankter Patienten bereits festgestellt [173-175].

Die Inkubierung der Chondrozyten in Alginatbeads war bei diesem Versuch von Vorteil, da man nach Beendigung des Versuches und Auflösung der Beads in Citratlösung die genaue Zellzahl messen konnte und auch ein aktiverer Stoffwechsel durch eine höhere Dichte der Chondrozyten im Vergleich zum Knorpel erzielt wurde. Da die Chondrozyten über lange Zeit in Alginatbeads ihre Form beibehalten und auch weiterhin knorpelspezifische Proteine bilden, bot sich diese Kulturform an [176]. Ein weiterer ganz entscheidender Vorteil ist die Tatsache, dass Knorpelstücke immer ein kleiner Ausschnitt aus einem Gelenk sind und so zwangsläufig ein recht heterogenes Gewebe darstellen. Dies ist durch die unterschiedlich starke Beanspruchung im Gelenk während des Lebens des Rindes nicht zu verhindern. Alginatbeads, hergestellt aus einer Zellsuspension, sind dagegen homogen.

Unsere Versuche zeigen, dass die PDE5/MRP5 Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil in der Lage sind, die Hyaluronanausschleusung der mit IL-1 $\alpha$  stimulierten Zellen zu reduzieren. Neben den Versuchen mit in Alginatbeads kultivierten Chondrozyten konnten wir dies auch in Organkultur an Knorpelstücken wiederholt werden. Die Konzentrationen der Testsubstanzen im Bereich von 6,25–50  $\mu$ mol/l, die wir für die Hemmung der Hyaluronanausschleusung einsetzten, decken sich mit den Werten in der Literatur [177]. Je stärker der MRP5 Kanal durch die Hyaluronanausschleusung „beansprucht“ wird, desto niedrigere Konzentrationen der MRP5 Inhibitoren reichen aus, um eine Erniedrigung der extrazellulären Hyaluronankonzentration zu erzielen. So wurde bei einer Stimulierung der Chondrozyten mit 10 ng/ml IL-1 $\alpha$  eine rund 50 %ige Hemmung der Ausschleusung bereits

bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{mol/l}$  der PDE5/MRP5 Inhibitoren beobachtet. Die reduzierten extrazellulären Hyaluronankonzentrationen wurden nicht durch eine Hemmung der Hyaluronansynthese hervorgerufen. Unsere Ergebnisse zeigen keine signifikante Inhibierung der Hyaluronansynthese durch Vardenafil und Tadalafil. Zaprinast beeinflusste die Hyaluronansynthese nicht. Untersuchungen zur Toxizität mit Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil an bovinen Chondrozyten ergaben keinen Einfluss auf den Stoffwechsel unterhalb von 200  $\mu\text{mol/l}$ . Diese Versuche wurden sowohl an Alginatbeads als auch mit Knorpelstücken durchgeführt. Eine verminderte Synthese in Folge eines gehemmten Stoffwechsels ist also nicht der Grund für die reduzierte Hyaluronanausschleusung.

Diese Versuche weisen eine verminderte extrazelluläre Hyaluronankonzentration sowohl in Zell- und Organkultur nach, wenn Chondrozyten mit IL-1 $\alpha$  und PDE5/MRP5 Inhibitoren inkubiert werden. Auch histochemisch konnten die genannten Ergebnisse bestätigt werden. Damit kann nach unserer Hypothese ein wichtiger Schritt auf dem Weg der Entstehung einer Arthrose unterdrückt werden. Die erhöhten extrazellulären Hyaluronankonzentrationen in der Knorpelmatrix führen neben der Aufweichung des Knorpels [178] zu einer Kaskade, die schließlich in der Zerstörung der Knorpelmatrix mündet.

In vivo wäre es interessant zu untersuchen, wie sich eine Kreuzbandresektion beim Hasen als anerkannte Methode zur Auslösung einer Arthrose nach unterschiedlichen Tagen auf die Hyaluronanproduktion im Knorpel auswirkt.

#### 4.4 Proteoglykangehalt im Knorpel

Wenn man an der Entstehung von Arthrose forscht, ist es unabdingbar, sich intensiv mit dem Abbau der Proteoglykane in der extrazellulären Matrix zu beschäftigen. Generell gilt ein Verlust/Abbau der Proteoglykane als erster Schritt auf dem Weg zur Entstehung einer Arthrose [Poole et al: Cellular biology of cartilage degradation; Academic Press p. 163-203 1995] [179]. IL-1 $\alpha$  kann durch eine verminderte Proteoglykansynthese zur allmählichen Reduktion der Proteoglykane im Knorpel führen. Beim Abbau der Proteoglykane sind aber vor allem Proteasen beteiligt [180], die je nach Stimulus (IL-1 oder Retinsäure) an unterschiedlichen Stellen des Proteinrückgrats von Aggrekan angreifen und die Proteinkette spalten [181]. Erhöhte Spiegel dieser Spaltprodukte finden sich zum einen in der Synovialflüssigkeit älterer Menschen und in der Synovialflüssigkeit unter Arthrose oder rheumatischer Arthritis leidender Patienten [182].

Weiterhin ist bekannt, dass neben der reduzierten Aggrekansynthese die Hyaluronansynthese durch IL-1 $\alpha$  und Retinsäure deutlich ansteigt [183;184]. Einen Zusammenhang zwischen erhöhter Hyaluronanproduktion und vermindertem Proteoglykangehalt im Knorpel stellten Matrixforscher allerdings bisher nicht her. Stattdessen konzentrierte sich die Forschung auf die Hemmung der Proteasen im Knorpel, um den Abbau von Proteoglykanen und anderen Matrixbausteinen zu verhindern. Nachhaltige Erfolge konnten damit trotz jahrzehntelanger Forschung und viel versprechender Ansätze aber nicht erreicht werden. Unserer Meinung nach gibt es dafür bei näherer Betrachtung zwei Gründe:

1. Mit einem Proteasehemmer einen Prozess aufhalten zu wollen, an dem sehr viele verschiedene Proteasen in teilweise komplizierten Mechanismen gegenseitiger Aktivierung und Hemmung beteiligt sind, ist einfach nicht möglich.
2. Die Proteasen sind erst in einem zweiten Schritt am Abbau der Proteoglykane beteiligt. Vor der erhöhten Proteaseaktivität setzt bereits eine vermehrte Hyaluronansynthese ein [179;185].

Unsere Arbeit zeigt, dass die überschießende Hyaluronanproduktion der primäre Grund für den Verlust der Proteoglykane im Knorpel ist. Die starke Hyaluronanproduktion „drückt“ die Proteoglykane praktisch aus dem Knorpel und eine vermehrte Wassereinlagerung findet statt. Die zuvor hohe negative Ladungsdichte wird vermindert, die Proteinketten des Aggrekans werden durch diese beiden Umstände leichter zugänglich für die verschiedenen Proteasen. In gesundem Knorpel liegen die Proteasen auch bereits in ihrer aktiven Form vor, doch erst durch die oben genannten Effekte der vermehrten Hyaluronanproduktion ändert sich das Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen so drastisch, dass es zu einem Verlust der Proteoglykane im Knorpel kommt. Hier bestätigen sich Ergebnisse der Matrixforschung, welche auf die fundamentale Bedeutung der Balance zwischen Hyaluronan- und Proteoglykansynthese für die Integrität der Knorpelmatrix verweisen [186].

In unseren Versuchen an Knorpelstücken mit PDE5/MRP5 Inhibitoren konnte eindeutig gezeigt werden, dass Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil den Proteoglykangehalt nach Inkubation mit IL-1 $\alpha$  erhöhen im Vergleich zu den mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Proben. Dies konnte durch Histochemie direkt im Knorpel und nach Extraktion der Proteoglykane aus dem Knorpel mittels einer fotometrischen Messung bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte ein Tierversuch mit Verapamil, einem Hemmstoff mehrerer ABC-Transporter, ebenfalls erhöhte Proteoglykangehalte im Knorpel von Rattenknien, bei denen durch intraartikuläre Iodacetatinjektion Arthrose ausgelöst wurde. Besonderes Augenmerk möchten wir auf die positiven Effekte der Inhibitorgabe kurz vor Ende des Versuches legen. Diese geben Anlass

zur Hoffnung, dass ein später Therapiebeginn bei der Arthrose sich trotzdem noch positiv auf die Zusammensetzung der Knorpelmatrix auswirkt. Da die erhöhten Proteoglykangehalte nicht auf eine vermehrte Proteoglykansynthese zurückzuführen sind, können wir einen klaren Zusammenhang zwischen einer verminderten Hyaluronanproduktion und einem erhöhtem Proteoglykangehalt im Knorpel feststellen [186].

#### **4.5 Einfluss einer reduzierten Hyaluronanausschleusung auf den Kollagenabbau**

Eine arthrotische Veränderung des Gelenkknorpels ist mit einer Zerstörung des Kollagennetzwerkes in der Knorpelmatrix verbunden, wodurch es schließlich zur Erosion des Knorpels und dem Funktionsverlust/-behinderung des betroffenen Gelenkes kommt. Völlig zu Recht wird in der Forschung ein großes Augenmerk auf die Möglichkeiten zur Erhaltung des Kollagennetzwerkes gelegt, um pathologische Veränderungen der Knorpelmatrix zu verhindern. Wie in Kapitel 4.4 der Proteoglykanverlust als erster Schritt bei der Entstehung einer Arthrose gilt, so gilt der Abbau von Kollagen II Fibrillen als zweiter Schritt auf diesem Weg [179]. Wie bereits bei den Proteoglykanen, wurde für das Kollagen noch in deutlich stärkeren Umfang daran geforscht, Inhibitoren für die Kollagen-abbauenden Proteasen zu entwickeln. In der Einleitung wurde auf diese Entwicklung schon eingegangen. Die Ergebnisse sind nicht befriedigend und bis dato ist nur ein Proteaseinhibitor als zugelassenes Medikament bekannt. Viele Pharmaunternehmen haben Programme für solche Matrixmetalloproteasehemmer unterhalten und haben diese inzwischen eingestellt.

Wir stimmen mit der Literatur überein, dass ein Kollagenabbau erst nach dem Verlust der Proteoglykane aus der Knorpelmatrix einsetzt. Dies zeigten auch unsere Versuche deutlich. So konnten nach 12-16 Tagen nur noch knapp 20 % des ursprünglichen Proteoglykangehaltes im Knorpel nachweisen, erst nach 28 Tagen konnten wir aber erst den Abbau von Kollagenfasern messen. Nicht konform gehen wir in der Einschätzung, dass der Proteoglykanverlust der erste Schritt und der Kollagenabbau der zweite Schritt ist. Wie oben beschrieben sehen wir die erhöhte Hyaluronanproduktion nicht nur zeitlich als ersten Schritt, sondern gestützt durch unsere Ergebnisse zusammen mit dem Proteoglykanverlust als Ursache für die Kollagendegradierung an. Dies korreliert auch vom zeitlichen Ablauf mit den in vivo Prozessen [186].

Da in Organkultur eine Degradierung von bovinem Typ II Kollagen mit IL-1 $\alpha$  allein nicht zu erzeugen ist [187], untersuchten wir zuerst eine dafür geeignete Methode, die es uns erlaubte, in einem praktikablen Zeitraum Kollagenabbau zu erzeugen. In unseren Versuchen inkubierten wir Knorpelstücke mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und all-trans Retinsäure, um innerhalb von vier Wochen ein Abbau von Kollagen II zu erzeugen. Diese Kombination haben wir in dieser Form so zum ersten Mal angewandt. Eine Inkubationsdauer von 14 Tagen reichte nicht aus, um einen messbaren Kollagenabbau zu erzeugen, darum wurde die Kulturdauer auf vier Wochen erhöht. Nach vier Wochen enthält der mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure behandelte Knorpel nur noch 75-80 % des Hydroxyprolinanteils der Kontrolle. Wir haben somit eine Methode zur Induzierung einer Kollagendegradierung geschaffen, die dazu noch mit einer relativ einfachen Nachweismethode fotometrisch gemessen werden kann.

Die PDE5/MRP5 Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil vermindern nach vier Wochen den Anteil an degradiertem Kollagen im Knorpel im Vergleich zu den nur mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure behandelten Proben. Den stärksten Effekt erzeugte Tadalafil, der Hydroxyprolingehalt im Knorpel war hier schon bei einer Konzentration von 6,25  $\mu$ M nur knapp unter dem Hydroxyprolin Spiegel der Kontrolle. Messungen der Kollagenabbauprodukte im Medium erbrachten weitere Ergebnisse, die auf einen verminderten Kollagenabbau durch MRP5 Inhibitoren schließen lassen. Die aus dem Knorpel freigesetzten Kollagenfragmente konnten in den mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Proben nachgewiesen werden. Bei steigenden Konzentrationen von den Phosphodiesterase-Inhibitoren Trequinsin und Zaprinast wurden keine Kollagenfragmente mehr im Medium nachgewiesen. Das Verschwinden der Kollagenfragmente korrelierte bei diesem Versuch sehr genau mit einem Absinken der extrazellulären Hyaluronankonzentration auf Kontrollniveau und gleichzeitigem Ansteigen des Proteoglykangehaltes auf das Kontrollniveau. Bei Zaprinast ist dies erst bei einer Konzentration um 100  $\mu$ M erreicht, bei dieser Konzentration sind keine Kollagenfragmente mehr zu detektieren. Bei Trequinsin liegen der Hyaluronan- und Proteoglykanspiegel schon bei 32  $\mu$ M wieder auf Kontrollniveau, hier sieht man bereits bei 30  $\mu$ M Trequinsin keine Kollagenfragmente mehr im Medium.

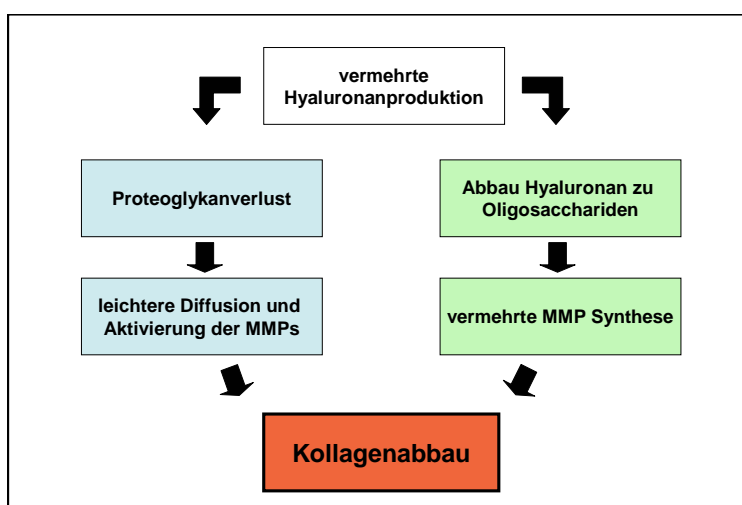
Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl die verminderte Hyaluronanausschleusung und die verringerte Wassereinlagerung einerseits sowie die höhere physiologische Proteoglykankonzentration und der dadurch bedingten negativen Ladungsdichte andererseits den Abbau der Kollagene vermindern. Die Wirkungen der PDE5/MRP5 Inhibitoren auf den höheren Proteoglykangehalt im Knorpel bietet den

Kollagenfasern Schutz vor dem Angriff der Proteasen, wie in der Literatur beschrieben: „Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage“ [188].

Die Aktivität der Matrixmetalloproteasen wurde durch Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil im Vergleich zu den mit IL-1 $\alpha$  allein inkubierten Knorpeln vermindert. Diese Reduzierung der Aktivität kam jedoch nicht durch eine verminderte Synthese zustande, sondern durch eine verminderte Aktivierung der Matrixmetalloproteasen. Diese könnte an einer erschwerten Diffusion der Proteasen in Knorpelkulturen mit PDE5/MRP5 Inhibitor + IL-1 $\alpha$  im Vergleich zu IL-1 $\alpha$  allein liegen. In einem Experiment, in dem die Peroxidaseinfiltration ins Knorpelgewebe in einer Stunde gemessen wurde, wiesen IL-1 $\alpha$  behandelte Knorpel doppelt so hohe Peroxidasekonzentrationen auf wie die Kontrolle. Wurde den IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpelstücken Zaprinast, Vardenafil oder Tadalafil zugegeben, sank die Peroxidasekonzentration im Knorpel bei 50  $\mu$ M Inhibitor bis auf Kontrollspiegel ab. Die von uns entwickelte Methode ist einfach durchzuführen und lässt aufgrund der vergleichbaren Molekulargewichte von Peroxidase und den Matrixmetalloproteasen Rückschlüsse auf die Migrationsfähigkeit der MMPs durch den jeweiligen Knorpel zu. Infolge einer verminderten Hyaluronansynthese quillt der Knorpel nicht so stark an, die hohe Ladungsdichte der Proteoglykane bleibt erhalten und die MMP können nicht so leicht durch die Matrix diffundieren und deswegen nur vermindert

- a) sich gegenseitig aktivieren und
- b) sich an die Kollagenhelices anlagern und sie spalten.

Im Knorpel spaltet die Hyaluronidase das Hyaluronan in kleinere Bruchstücke. Im Medium von mit und ohne IL-1 $\alpha$  inkubierten Knorpelstücken erkennt man eine stärkere Aktivität der



**Abb. 92:** Hyaluronaneffekte

Hyaluronidase in der Kontrolle. Aufgrund der weitaus höheren Hyaluronankonzentration in den IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpeln kann die dann „permanent“ Substrat gebundene Hyaluronidase gar nicht aus dem Knorpel herausdiffundieren. Die Hyaluronanbruchstücke können ihrerseits weiter zu einer Induzierung der MMP Produktion

beitragen. Hyaluronan würde dann einen positiven Feedback anschieben [189]. Unsere



Versuche zum Kollagenabbau konnten zeigen, dass die PDE5/MRP5 Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil in der Lage sind, den nach Hyaluronanüberproduktion einsetzenden Abbau des Kollagennetzwerkes zu vermindern.

#### 4.6 NO- und alkalische Phosphatase Produktion im Knorpel

Neben den Matrixkomponenten und den MMPs wurden auch in den Überständen von Knorpelstücken die Konzentrationen von NO (Nitroxid) und der alkalischen Phosphatase bestimmt. Mit den PDE5/MRP5 Inhibitoren wurde in beiden Fällen niedrigere Konzentrationen im Medium im Vergleich zu den allein mit IL-1 $\alpha$  behandelten Proben gemessen. Die niedrigeren NO Spiegel könnten Folge der PDE5 Hemmung sein, da die PDE5 an der NO Bildung über die Aktivierung der iNOS beteiligt ist [190]. Die reduzierten Spiegel der alkalischen Phosphatase mit Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil lassen auf eine geringere Anzahl hypertropher Chondrozyten schließen. Da die Hypertrophierung der Chondrozyten sowohl durch NO als auch durch eine vermehrte Hyaluronanproduktion ausgelöst wird, spielen hier der PDE5 und der MRP5 Effekt zusammen eine Rolle und sorgen für eine höhere Zahl gesunder Chondrozyten, die mit ihrem Stoffwechsel zur Erhaltung/Reparatur der extrazellulären Matrix beitragen können.

#### 4.7 Zusammenhänge zwischen IL-1 $\alpha$ Wirkung, PDE-5 Hemmung, Hyaluronanausschleusung und dem cGMP-Signalweg

IL-1 $\alpha$ Wirkungen		
Signalmoleküle	Matrixkomponenten	Enzyme
NO	Aggrekan ↓	iNOS
IL-6	Kollagen II ↓	Guanylatcyclase
Interferon $\gamma$	Hyaluronan ↑	PLA <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>		COX-2
		MAPK
		MAPK Kinase
		Tyrosinkinase

**Abb. 93:** IL-1 $\alpha$  Wirkungen, hochregulierte Signalmoleküle und Enzyme

Unsere Versuche mit Modulatoren des cGMP-Signalwegs wurden durchgeführt, um eine eventuelle Beteiligung von cGMP an der Hyaluronansynthese zu untersuchen. Für die Experimente wurden verschiedene Substanzen, die im cGMP Signalweg eine Rolle spielen, eingesetzt.

Folgende Überlegungen spielten hier eine Rolle:

1. Unterbrechen die PDE5/MRP5 Inhibitoren die IL-1 $\alpha$  Signalkaskade und hemmen deshalb die Hyaluronanausschleusung bzw. -produktion?
2. Beeinflusst die erhöhte cGMP-Konzentration in den Chondrozyten infolge der PDE5 Hemmung die Hyaluronanproduktion in irgendeiner Weise?

IL-1 $\alpha$  vermittelt über den IL-1 Rezeptor (IL-1RI) sowie dem IL-1-receptor accessory protein (IL-1RAcP) seine Wirkungen. Die wichtigsten Wirkungen von IL-1 $\alpha$  sind in Abbildung 93 dargestellt [184;191-199].

In unseren Versuchen konnte weder das durch die PDE5 hydrolisierbare cGMP Analogon Bromo-cGMP noch das nicht durch die PDE5 abbaubare Dibutyryl-cGMP eine Beeinflussung der Hyaluronanproduktion nachgewiesen werden. cGMP kann auch selbst durch den MRP5 Kanal transportiert werden [200], dies geschieht jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil, so dass erhöhte cGMP Spiegel keinen hemmenden Einfluss auf die Hyaluronanausschleusung ausüben. Ein erhöhter cGMP Spiegel wirkt sich normalerweise negativ auf die Knorpelmatrix aus, denn die Kollagen und Proteoglykansynthese werden reduziert [201]. Weiterhin stimuliert cGMP die Synthese von Matrixmetalloproteasen [202]. Es vermittelt wie IL-1 und NO Effekte, die zur Hypertrophie und Apoptose von Chondrozyten führen [203].

Der cGMP Signalweg hat keinen Einfluss auf die Hyaluronanausschleusung in Chondrozyten. Weder NO aus Natriumnitroprussid, was über die lösliche Guanylatcyclase die cGMP Bildung induziert, noch die Gabe von atrialem natriuretischen Peptid, welches die membranständige Guanylatcyclase der Chondrozyten induziert und auf diesem Wege die cGMP Konzentration in der Zelle erhöht, beeinflussen die extrazellulären Hyaluronankonzentrationen. Mit ODQ, einem Hemmstoff der löslichen Guanylatcyclase war auch kein Unterschied zwischen den mit IL-1 $\alpha$  allein behandelten Proben auszumachen. Mit KT5832, einem Hemmstoff der Proteinkinase G, welche durch cGMP aktiviert wird, wurden höhere Hyaluronankonzentrationen gemessen. Dagegen erniedrigte Flunarizin, ein Calmodulin und Calcium Antagonist die extrazelluläre Hyaluronankonzentration. Diese beiden Ergebnisse lassen sich vielleicht deuten, wenn man einen Zusammenhang zum Calcium-Influx herstellt. KT5832 hemmt die Proteinkinase G, die die Calciumkanäle schließt und die intrazelluläre Calciumkonzentration erniedrigt. KT5832 erhöht also die Calciumkonzentration innerhalb der Zelle. Flunarizin vermindert als Calciumantagonist die intrazelluläre Calciumkonzentration. Es scheint also ein Zusammenhang zwischen Calciumkonzentration und Hyaluronanproduktion zu bestehen.

Die genaue Regulierung der Hyaluronansynthese ist heute nur zum Teil bekannt. Die Aktivierung der Hyaluronansynthese scheint mit der Aktivierung der Proteinkinase C zusammenzuhängen, welche NO und cGMP unabhängig über eine Tyrosinkinase verläuft [204]. Es konnte mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Proteinkinase C Aktivator, eine Stimulierung der Hyaluronansynthese gezeigt werden [205]. Die Proteinkinase C wird sowohl von TGF als auch von IL-1 $\alpha$  aktiviert [206;207]. Eine verminderte extrazelluläre Hyaluronankonzentration nach IL-1 $\alpha$  Behandlung und den PDE5/MRP5 Inhibitoren muss somit der Hemmung des MRP5 Kanals zugeschrieben werden.

Die vier Substanzen Dibutyryl-cGMP, ODQ, KT5832 und Flunizarin wurden auch eingesetzt, um den Einfluss dieser Stoffe auf den Proteoglykan- und Kollagengehalt des Knorpels zu untersuchen. Die Versuche zeigten jeweils keinen Unterschied zu den allein mit IL-1 $\alpha$  behandelten Knorpelproben. Auch histologische Untersuchungen zum Proteoglykangehalt und Messungen der MMP Aktivität in Gelatin-Zymogrammen zeigten keinen Effekt von Dibutyryl-cGMP im Vergleich zu den allein mit IL-1 $\alpha$  inkubierten Proben. Vor dem Hintergrund des infolge PDE5 Hemmung vermittelten erhöhten cGMP Spiegels und dessen Induzierung von MMP Synthese und Hypertrophie ist es umso bemerkenswerter, dass die Hemmung der Hyaluronanausschleusung die „negativen“ Effekte auf die Knorpelmatrix mehr als aufwiegen. Dies verdeutlicht nachhaltig die therapeutische Potenz, welche in der Hemmung des MRP5 Kanals bei arthrotischen Veränderungen des Knorpels schlummert.

#### 4.8 Unser Entwurf zur Entstehung der Arthrose

Nach der Beobachtung des Einflusses von MRP5 Inhibitoren auf die Knorpelmatrix und Überlegungen zum zeitlichen und ursächlichen Ablauf der Entstehung einer Arthrose postulieren wir folgenden Entstehungsweg:

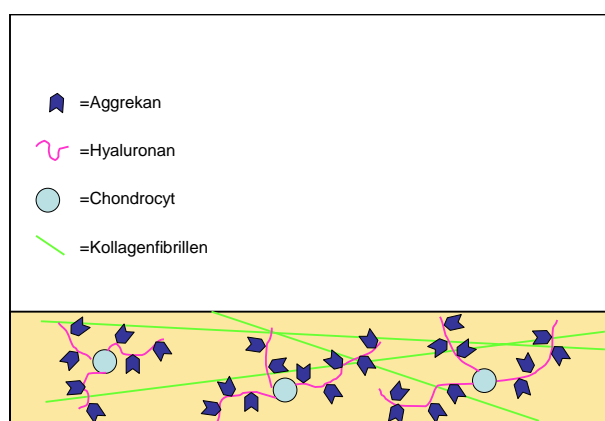


Abb. 94: Knorpel im normalen Zustand

Der Knorpel produziert, ausgelöst durch einen Auslöser unklaren Ursprungs (meist Traumata), IL-1 und verändert seine Syntheseaktivität. Man ist sich nicht ganz sicher, wodurch eine Arthrose genau ausgelöst werden kann. Man kann einmal die primären Arthrosen mit einer weitgehend

unbekannten Ursache sowie die sekundären Arthrosen als Folge einer primären Ursache

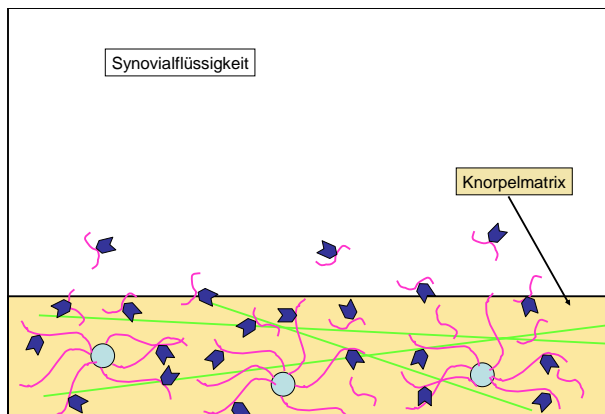


Abb. 95: vermehrte Hyaluronansynthese

unterscheiden. Die primären Arthrosen haben einen Anteil von 80 %. Bei den sekundären Arthrosen kann man Formen wie die chemische, neurologische, hormonelle, entzündliche und mechanische Arthrose unterscheiden. In Frage kommen Traumata des Gelenkes durch starke Stöße oder unnatürlich starkes Verdrehen der Gelenkflächen gegeneinander. Eine zu starke

mechanische Beanspruchung des Gelenkes oder eine dauerhaft erhöhte sportlich oder beruflich bedingte Belastung (Verschleiß) können ebenfalls zu einer Arthrose führen. Wird das Gelenk für längere Zeit nicht bewegt und dadurch die Chondrozyten im Knorpel nicht mit genügend Nährstoffen versorgt, kann dies auch zur Arthrose führen. Einen sehr entscheidenden Einfluss auf das Risiko, eine Arthrose zu entwickeln, ist letztlich das Alter.

Die Inzidenz nimmt mit zunehmenden Alter überproportional stark zu. Die Entstehung der Arthrose stellt sich unserer Meinung wie folgt dar: Zu Beginn produzieren die Knorpelzellen vermehrt Hyaluronan und vermindern gleichzeitig ihre Proteoglykansynthese (Abbildung 95). Da die beiden Komponenten in der Matrix aneinander binden und so die charakteristische

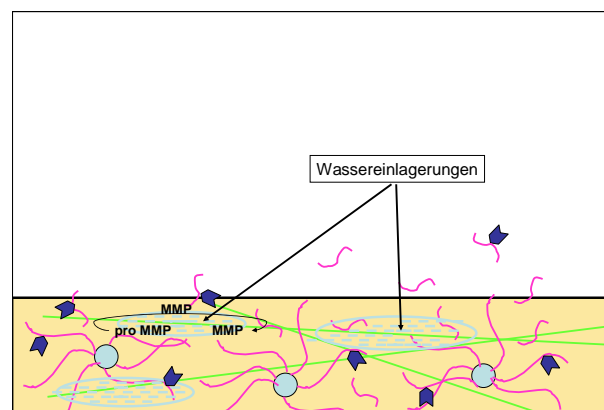


Abb. 96: Wassereinlagerung führt zur Schwellung

„Flaschenbürste“ bilden, wirkt sich eine veränderte Syntheserate störend auf diese Aggregation aus. Es können weniger Proteoglykane an die Hyaluronanketten binden, dazu werden die wenigen nachsynthetisierten Proteoglykane auch noch von dem vermehrt nachproduziertem Hyaluronan schneller als im gesunden Knorpel aus der Matrix in die Synovialflüssigkeit gedrückt. Zum einen enthält der Knorpel dann also weniger Proteoglykane durch eine verminderte Synthese und zum anderen verliert er sie

veränderte Syntheserate störend auf diese Aggregation aus. Es können weniger Proteoglykane an die Hyaluronanketten binden, dazu werden die wenigen nachsynthetisierten Proteoglykane auch noch von dem vermehrt nachproduziertem Hyaluronan schneller als im gesunden Knorpel aus der Matrix in die Synovialflüssigkeit gedrückt.

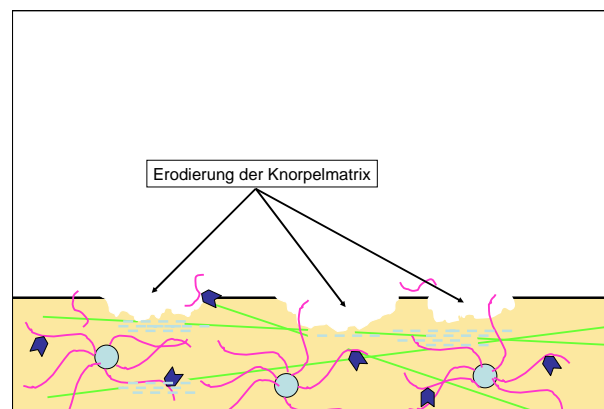


Abb. 97: Erosion der Knorpelmatrix

durch die überschießende Hyaluronanproduktion (Abb. 95). Dieser fundamentale erste Schritt führt zur einer Kaskade von Ereignissen, die schließlich zur Ausbildung einer Arthrose führen. Ganz wichtig ist die Erhöhung des Wasseranteils im Knorpel (Abb. 96). Der Knorpel schwillt an, das noch intakte Kollagenetzwerk verhindert erst eine noch stärkere Aufquellung des Knorpels. Durch die Wassereinlagerung können Proteine wie die Matrixmetalloproteasen leichter durch den Knorpel diffundieren. Diese erleichterte Diffusion führt auch zu einer leichteren und zügigeren Aktivierung der Matrixmetalloproteasen aus den pro-Formen. Weiterhin sind die Kollagenhelices durch den erhöhten Wasseranteil leichter zu erreichen und so durch die Proteasen leichter abzubauen. Die Diffusion verschiedener Proteasen wird ebenfalls durch den Verlust der Proteoglykane erleichtert. Sie haben zuvor mit ihrer hohen negativen Ladungsdichte die Kollagenfasern eingebettet und sowohl die freie Diffusion als auch eine Anlagerung von Proteasen an die Kollagenhelices erschwert [208;209]. Der Knorpel ist durch seine visco-elastischen Eigenschaften in der Lage, Druck von außen gut zu widerstehen. Übt eine höhere Hyaluronankonzentration mit vermehrter Wassereinlagerung allerdings aus dem Inneren des Knorpels Druck aus, reißen Dermatanbrücken, welche die Kollagenfasern verbinden, auseinander. Dies ist eine Erklärung für die bei einer Arthrose zu beobachtenden Risse in der Knorpelmatrix. Die erhöhte Aktivität der Metalloproteasen, eine geringere mechanische Belastbarkeit und die verminderte Regenerationsfähigkeit führen schließlich zu einem Abbau der Knorpelmatrix (Abb. 97). Werden die Kollagenfasern gespalten und weiterverdaut, kann weiteres Wasser in den Knorpel eingelagert werden. In diesem Stadium findet dann ein positiver Feedback statt, der Verlust der Knorpelmatrix wird durch einen Abbau der Kollagenfasern weiter verstärkt. Die Chondrozyten hypertrophieren, bilden Kollagen X und gehen schließlich über in die Apoptose. Die Ausbildung der so genannten Lacunen um die Chondrozyten und der Eintritt in ein hypertrophes Stadium wird durch die vermehrte Hyaluronanproduktion begünstigt [1].

Die Schutzmechanismen des Körpers bringen in dieser Situation auch nichts mehr. Es werden als Kompensationsmechanismus Osteophyten an den Rändern des Gelenkes ausgebildet, um die Gelenkfläche zu vergrößern und Entlastung zu schaffen. Doch sind diese Osteophyten nicht von intaktem Knorpel bedeckt, so dass sie für die Gelenkfunktion nutzlos sind. Ein weiterer Mechanismus ist die Verminderung der Belastung durch unnatürliche Haltung des Körpers, so entstehen dann Haltungsschäden des Körpers, die auch durch unnatürliche Belastung anderer Gelenke in zur Ausbildung einer Arthrose führen.

Kurz zusammengefasst vermuten wir den folgenden Ablauf bei der Entstehung einer Arthrose, bestätigt durch unsere Experimente:

- 1. Verletzung, Reizung oder Traumatisierung des Knorpels**
- 2. Induzierung der Zytokinproduktion (IL-1)**
- 3. Hyaluronanüberproduktion und reduzierte Proteoglykansynthese**
- 4. Verlust der Proteoglykane, vermehrte Wassereinlagerung**
- 5. vermehrte Infiltration des Knorpels durch Proteasen, Kollagenabbau**
- 6. Dedifferenzierung und Hypertrophierung der Chondrozyten, letztendlich Apoptose**

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit zum Thema „Untersuchungen zum Hyaluronan Export aus Chondrozyten bei arthrotischen Vorgängen“ hat in drei Bereichen Resultate erbracht:

### A) Hemmung der arthrotischen Veränderungen

Die PDE5/MRP5 Inhibitoren Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil sind in der Lage, in bovinem Knorpel durch IL-1 $\alpha$  ausgelöste arthrotische Veränderungen zu vermindern. Dies geschieht wohl durch die Hemmung der Hyaluronanausschleusung durch den MRP5 Transporter, der in Chondrozyten nachgewiesen werden konnte. Damit greifen die Substanzen auf einer ersten Stufe der Arthroseentstehung ein und sind so in der Lage, den Proteoglykangehalt im Knorpel zu erhöhen, die Quellung des Knorpels zu vermindern, die Aktivität der Matrixmetalloproteasen zu reduzieren und den Kollagenabbau zu verringern.

### B) Ätiologie der Arthrose

Diese Arbeit beleuchtet die Entstehung der Arthrose aus einem ganz neuen Blickwinkel. Die Ergebnisse zeigen, dass eine überschießende Hyaluronanproduktion in der Ätiologie der Arthrose zeitlich und ursächlich ganz nach vorne eingeordnet werden muss. Die vermehrte Hyaluronanproduktion infolge der Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 im betroffenen Gelenk führt zu

- einem Verlust der Proteoglykane aus dem Knorpel
- einer vermehrten Wassereinlagerung
- erleichterten Diffusion der Matrixmetalloproteasen durch die Knorpelmatrix
- erhöhten Aktivität und der Matrixmetalloproteasen und Verdau der Kollagenhelices
- Hypertrophie der Chondrozyten und schließlich Apoptose
- Erosion der Knorpelmatrix und Funktionsbeeinträchtigung des Gelenkes

Unsere Ergebnisse erklären gleichzeitig, warum Forschungen an Proteasehemmern, einem nach geschalteten Schritt im Krankheitsverlauf, so wenig erfolgreich verliefen.

### C) Methoden

Die Methode zur Messung der Infiltration des Knorpels von ähnlich großen Proteinen wie die Matrixmetalloproteasen mittels Peroxidase wurde vollständig neu entwickelt. Die Methode zur Induzierung eines Kollagenabbaus mit IL-1 $\alpha$ , IL-17 und Retinsäure ist so ebenfalls noch nicht zuvor beschrieben worden.

## 6. Ausblick

Diese Arbeit trägt zu einem neuen Verständnis zur Entstehung der Arthrose bei. Die pharmazeutische Forschung muss sich einem Paradigmenwechsel unterwerfen, will sie wirksame Medikamente gegen eine Krankheit auf den Markt bringen, die die bundesdeutsche Gesellschaft jährlich über 12 Milliarden Euro kostet. Die jahrzehntelange Forschung an Proteasehemmern ist in einer Sackgasse verlaufen. Es konnten trotz aufwendigster Forschungsprogramme fast aller großen Pharmaunternehmen kein geeignetes Medikament zur Behandlung einer Arthrose entwickelt werden. Diese Arbeit begründet, warum die Forschung an Proteaseinhibitoren das falsche Konzept zu sein scheint und nicht die erhofften Erfolge liefern kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine neue Zielstruktur auf, mit der wirksam der Krankheitsverlauf bei Arthrose verlangsamt werden kann.

Wir konnten weiterhin eine Möglichkeit aufzeigen, mit der man die Überproduktion des Hyaluronans vermindern kann. Dies soll keineswegs als die einzige mögliche Lösung hier propagiert werden. Die Hemmung des MRP5 Kanals, der an der Ausschleusung des Hyaluronans aus der Zelle beteiligt ist, scheint aber ein viel versprechender Ansatz zu sein. Die eingesetzten PDE5 Hemmstoffe Zaprinast, Vardenafil und Tadalafil dürften dagegen kaum geeignet sein, um beim Menschen als Arthrosemedikament eingesetzt zu werden. Die ca. 1000fach stärkere inhibitorische Wirkung auf die Phosphodiesterase5 würde zu nicht tolerierbaren Nebenwirkungen führen. Von Seiten der pharmazeutischen Chemie würde es sich anbieten, die Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich der MRP5 Hemmung zu untersuchen. Als Angriffspunkte einer zukünftigen Therapie wären auch ein Eingriff in den Signalweg der Hyaluronansynthese möglich oder eine Hemmung der Hyaluronansynthase.



**Literaturverzeichnis**

- [1] C.A.Poole, A.Matsuoka, and J.R.Schofield, Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage, *Arthritis Rheum.* 34 (1991) 22-35.
- [2] T.I.Morales and V.C.Hascall, Correlated metabolism of proteoglycans and hyaluronic acid in bovine cartilage organ cultures, *J.Biol.Chem.* 263 (1988) 3632-3638.
- [3] A.Maroudas, G.Palla, and E.Gilav, Racemization of aspartic acid in human articular cartilage, *Connect.Tissue Res.* 28 (1992) 161-169.
- [4] H.J.Mankin and A.Z.Thrasher, Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage, *J.Bone Joint Surg.Am.* 57 (1975) 76-80.
- [5] R.W.Jubb and H.B.Fell, The breakdown of collagen by chondrocytes, *J.Pathol.* 130 (1980) 159-167.
- [6] W.Puhl and P.Scharf, Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis, *Ann.Rheum.Dis.* 56 (1997) 441.
- [7] K.E.Kuettner, E.J.M.A.Thonar, Cartilage integrity and homeostasis, In: Klippel, J. H. and Dieppe, P. A. (Eds.), *Rheumatology*, Mosby, London, 1998, p. 6.1-6.16.
- [8] J.A.Buckwalter and L.C.Rosenberg, Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein, *J.Biol.Chem.* 257 (1982) 9830-9839.
- [9] J.C.Pita, F.J.Muller, S.M.Morales, and E.J.Alarcon, Ultracentrifugal characterization of proteoglycans from rat growth cartilage, *J.Biol.Chem.* 254 (1979) 10313-10320.
- [10] W.Knudson, D.J.Aguiar, Q.Hua, and C.B.Knudson, CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: An ultrastructural and biochemical analysis, *Exp.Cell Res.* 228 (1996) 216-228.
- [11] C.B.Knudson, Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix, *J.Cell Biol.* 120 (1993) 825-834.
- [12] E.J.Thonar, M.B.Sweet, A.R.Immelmán, and G.Lyons, Hyaluronate in articular cartilage: age-related changes, *Calcif.Tissue Res.* 26 (1978) 19-21.
- [13] M.W.Holmes, M.T.Bayliss, and H.Muir, Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size, *Biochem.J.* 250 (1988) 435-441.
- [14] A.Maroudas, Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport, *Biorheology* 12 (1975) 233-248.
- [15] A.Maroudas, R.Scheiderman, O.Popper, The rolle of water, proteoglycan, and collagen in solute transport in cartilage, In: Kuettner, K., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., and Hascall, V. C. (Eds.), *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Raven Press, New York, 1992, pp. 355-371.

- [16] K.Meyer and J.W.Palmer, The polysaccharide of the vitreous humor, *J.Biol.Chem.* 107 (1934) 629-634.
- [17] J.E.Scott, Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications, *Ciba.Found.Symp.* 143 (1989) 6-15.
- [18] T.C.Laurent, Structure of hyaluronic acid, In: Balazs, E. A. (Ed.), *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*, Academic Press, New York, 1970, pp. 703-732.
- [19] T.C.Laurent and J.R.Fraser, Hyaluronan, *FASEB J.* 6 (1992) 2397-2404.
- [20] A.Markovitz and A.Dorfman, Hyaluronic acid synthesizing system from group A *Streptococcus*, *Methods Enzymol.* 5 (1962) 155-158.
- [21] P.Prehm, Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase, *Biochem.J.* 211 (1983) 181-189.
- [22] P.Prehm, Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth, *Biochem.J.* 211 (1983) 191-198.
- [23] P.Prehm, Inhibition of hyaluronate synthesis, *Biochem.J.* 225 (1985) 699-705.
- [24] M.X.Triscott and I.van de Rijn, Solubilization of hyaluronic acid synthetic activity from streptococci and its activation with phospholipids, *J.Biol.Chem.* 261 (1986) 6004-6009.
- [25] P.H.Weigel, V.C.Hascall, and M.Tammi, Hyaluronan synthases, *J.Biol.Chem.* 272 (1997) 13997-14000.
- [26] A.P.Spicer and T.K.Nguyen, Mammalian hyaluronan synthases: investigation of functional relationships in vivo, *BIOCHEMICAL.SOCIETY.TRANSACTIONS.* 27 (1999) 109-115.
- [27] C.Heldermon, P.L.DeAngelis, and P.H.Weigel, Topological organization of the hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes*, *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 2037-2046.
- [28] P.L.DeAngelis, J.Papaconstantinou, and P.H.Weigel, Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*, *J.Biol.Chem.* 268 (1993) 19181-19184.
- [29] G.Ouskova, B.Spellerberg, and P.Prehm, Hyaluronan release from *Streptococcus pyogenes*: Export by an ABC transporter, *Glycobiology* 14 (2004) 931-938.
- [30] R.Tammi, A.M.Saamanen, H.I.Maibach, and M.Tammi, Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture, *J.Invest.Dermatol.* 97 (1991) 126-130.
- [31] J.R.E.Fraser, T.C.Laurent, and U.B.G.Laurent, Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover, *J.Intern.Med.* 242 (1997) 27-33.

- [32] B.Zhou, J.A.Weigel, L.Fauss, and P.H.Weigel, Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE), *J.Biol.Chem.* (2000).
- [33] S.Banerji, J.Ni, S.X.Wang, S.Clasper, J.Su, R.Tammi, M.Jones, and D.G.Jackson, LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan, *J.Cell Biol.* 144 (1999) 789-801.
- [34] E.J.Menzel and C.Farr, Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses, *CANCER LETTERS.* 131 (1998) 3-11.
- [35] Abatangelo, G. and Weigel P.H. Redefining Hyaluronan, Wheley, Amsterdam, 2000.
- [36] B.P.Toole, S.I.Munaim, S.Welles, and C.B.Knudson, Hyaluronate-cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during limb development, *Ciba.Found.Symp.* 143 (1989) 138-145.
- [37] M.Brecht, U.Mayer, E.Schlosser, and P.Prehm, Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis, *Biochem.J.* 239 (1986) 445-450.
- [38] P.Prehm, Induction of hyaluronic acid synthesis in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid, *FEBS Lett.* 111 (1980) 295-298.
- [39] R.L.Goldberg and B.P.Toole, Hyaluronate inhibition of cell proliferation, *Arthritis Rheum.* 30 (1987) 769-778.
- [40] W.Knudson, C.Biswas, X.Q.Li, R.E.Nemec, and B.P.Toole, The role and regulation of tumour-associated hyaluronan, *Ciba.Found.Symp.* 143 (1989) 150-159.
- [41] W.Knudson, C.Biswas, and B.P.Toole, Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81 (1984) 6767-6771.
- [42] B.P.Toole, Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins, *Curr.Opin.Cell Biol.* 2 (1990) 839-844.
- [43] J.J.Hopwood and A.Dorfman, Glycosaminoglycan synthesis by cultured human skin fibroblasts after transformation with Simian virus 40, *J.Biol.Chem.* 252 (1977) 4777-4785.
- [44] L.Sundblad, The chemistry of synovial fluid with special regard to hyaluronic acid, *Acta Orthop.Scand.* 20 (1950) 105-113.
- [45] L.Juhlin, Hyaluronan in skin, *J.Intern.Med.* 242 (1997) 61-66.
- [46] J.Banks, J.W.Kreider, V.P.Bhavanandan, and E.A.Davidson, Anionic polysaccharide production and tyrosinase activation in cultured human melanoma cells, *Cancer Res.* 36 (1976) 424-431.
- [47] J.Cichy and E.Pure, The liberation of CD44, *J.Cell Biol.* 161 (2003) 839-843.
- [48] H.Ponta, L.Sherman, and P.A.Herrlich, CD44: from adhesion molecules to signalling regulators, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4 (2003) 33-45.

- [49] M.I.Tammi, A.J.Day, and E.A.Turley, Hyaluronan and homeostasis: a balancing act, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 4581-4584.
- [50] A.J.Day and G.D.Prestwich, Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 4585-4588.
- [51] E.A.Turley, P.W.Noble, and L.Y.Bourguignon, Signaling properties of hyaluronan receptors, *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 4589-4592.
- [52] B.P.Toole and V.C.Hascall, Hyaluronan and tumor growth, *Am.J.Pathol.* 161 (2002) 745-747.
- [53] V.A.Fischetti, D.E.Bessen, O.Schneewind, and D.E.Hruby, Protection against streptococcal pharyngeal colonization with vaccines composed of M protein conserved regions, *Adv.Exp.Med.Biol.* 303 (1991) 159-167.
- [54] McCarty, M. *Streptococci*, Lippincott, Philadelphia, 1990.
- [55] M.R.Wessels, A.E.Moses, J.B.Goldberg, and T.J.DiCesare, Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88 (1991) 8317-8321.
- [56] P.P.Cleary and A.Larkin, Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci, *J.Bacteriol.* 140 (1979) 1090-1097.
- [57] M.C.Hochberg, Role of intra-articular hyaluronic acid preparations in medical management of osteoarthritis of the knee, *Semin.Arthritis Rheum.* 30 (2000) 2-10.
- [58] V.Listrat, X.Ayral, F.Patarnello, J.P.Bonvarlet, J.Simonnet, B.Amor, and M.Dougados, Arthroscopic evaluation of potential structure modifying activity of hyaluronan (Hyalgan(R)) in osteoarthritis of the knee, *Osteoarthritis Cartilage* 5 (1997) 153-160.
- [59] A.Schiavinato, E.Lini, D.Guidolin, G.Pezzoli, P.M.-M.Botti, R.Cortivo, A.De Galateo, and G.Abatangelo, Intraarticular sodium hyaluronate injections in thePond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II.Morphological findings, *Clin.Orthop.* (1989) 286-299.
- [60] M.C.Hochberg, E.Vignon, and E.Maheu, Session 2: clinical aspects. Clinical assessment of hand OA, *Osteoarthritis.Cartilage.* 8 Suppl A (2000) S38-S40.
- [61] O.Miltner, U.Schneider, C.H.Siebert, C.Niedhart, and F.U.Niethard, Efficacy of intraarticular hyaluronic acid in patients with osteoarthritis--a prospective clinical trial, *Osteoarthritis.Cartilage.* 10 (2002) 680-686.
- [62] F.Tascioglu, C.Oner, and O.Armagan, The effect of low-dose methotrexate on bone mineral density in patients with early rheumatoid arthritis, *Rheumatol.Int.* 23 (2003) 231-235.
- [63] M.M.Aldur, C.C.Denk, H.H.Celik, and A.B.Tascioglu, An accessory fissure in the lower lobe of the right lung, *Morphologie.* 81 (1997) 5-7.

- [64] I.Uthman, J.P.Raynauld, and B.Haraoui, Intra-articular therapy in osteoarthritis, *Postgrad.Med.J.* 79 (2003) 449-453.
- [65] M.I.Hamburger, S.Lakhanpal, P.A.Mooar, and D.Oster, Intra-articular hyaluronans: a review of product-specific safety profiles, *Semin.Arthritis Rheum.* 32 (2003) 296-309.
- [66] J.Kirwan, Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee?, *Knee.* 8 (2001) 93-101.
- [67] J.R.Fraser, W.G.Kimpton, B.K.Pierscionek, and R.N.Cahill, The kinetics of hyaluronan in normal and acutely inflamed synovial joints: observations with experimental arthritis in sheep, *Semin.Arthritis Rheum.* 22 (1993) 9-17.
- [68] P.Ghosh and D.Guidolin, Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent?, *Semin.Arthritis Rheum.* 32 (2002) 10-37.
- [69] T.Jarvinen, K.Jarvinen, A.Urtti, D.Thompson, and V.J.Stella, Sulfbutyl ether beta-cyclodextrin (SBE-beta-CD) in eyedrops improves the tolerability of a topically applied pilocarpine prodrug in rabbits, *J.Ocul.Pharmacol.Ther.* 11 (1995) 95-106.
- [70] C.Bucolo, A.Spadaro, and S.Mangiafico, Pharmacological evaluation of a new timolol/pilocarpine formulation, *Ophthalmic Res.* 30 (1998) 101-106.
- [71] R.Herrero-Vanrell, A.Fernandez-Carballido, G.Frutos, and R.Cadorniga, Enhancement of the mydriatic response to tropicamide by bioadhesive polymers, *J.Ocul.Pharmacol.Ther.* 16 (2000) 419-428.
- [72] C.A.Moreira, Jr., A.T.Moreira, D.K.Armstrong, R.W.W.-C.Jelliffe, P.E.Liggett, and M.D.Trousdale, In vitro and in vivo studies with sodium hyaluronate as a carrier for intraocular gentamicin, *Acta Ophthalmol.Copenh.* 69 (1991) 50-56.
- [73] F.Castellano and G.Mautone, Decongestant activity of a new formulation of xylometazoline nasal spray: a double-blind, randomized versus placebo and reference drugs controlled, dose-effect study, *Drugs Exp.Clin.Res.* 28 (2002) 27-35.
- [74] S.Surini, H.Akiyama, M.Morishita, T.Nagai, and K.Takayama, Release phenomena of insulin from an implantable device composed of a polyion complex of chitosan and sodium hyaluronate, *J.Control Release* 90 (2003) 291-301.
- [75] M.A.Pratta, W.Yao, C.Decicco, M.D.Tortorella, R.Q.Liu, R.A.Copeland, R.Magolda, R.C.Newton, J.M.Trzaskos, and E.C.Arner, Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage, *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 45539-45545.
- [76] B.Budde, K.Blumbach, J.Ylostalo, F.Zaucke, H.W.Ehlen, R.Wagener, L.la-Kokko, M.Paulsson, P.Bruckner, and S.Grassel, Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX, *Mol.Cell Biol.* 25 (2005) 10465-10478.
- [77] T.F.Linsenmayer, R.D.Eavey, and T.M.Schmid, Type X collagen: a hypertrophic cartilage-specific molecule, *Pathol.Immunopathol.Res.* 7 (1988) 14-19.

- [78] M.D.Sternlicht and Z.Werb, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 17 (2001) 463-516.
- [79] H.Nagase and J.F.Woessner, Jr., Matrix metalloproteinases, *J.Biol.Chem.* 274 (1999) 21491-21494.
- [80] T.H.Vu and Z.Werb, Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology, *Genes Dev.* 14 (2000) 2123-2133.
- [81] J.F.Woessner, Jr., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling, *FASEB J.* 5 (1991) 2145-2154.
- [82] J.Martel-Pelletier, D.J.Welsch, and J.P.Pelletier, Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases, *Best.Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 15 (2001) 805-829.
- [83] G.Murphy, V.Knauper, S.Atkinson, G.Butler, W.English, M.Hutton, J.Stracke, and I.Clark, Matrix metalloproteinases in arthritic disease, *Arthritis Res.* 4 Suppl 3 (2002) S39-S49.
- [84] G.Murphy, V.Knauper, S.Atkinson, G.Butler, W.English, M.Hutton, J.Stracke, and I.Clark, Matrix metalloproteinases in arthritic disease, *Arthritis Res.* 4 Suppl 3 (2002) S39-S49.
- [85] M.W.Lark, E.K.Bayne, J.Flanagan, C.F.Harper, L.A.Hoerner, N.I.Hutchinson, I.I.Singer, S.A.Donatelli, J.R.Weidner, H.R.Williams, R.A.Mumford, and L.S.Lohmander, Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints, *J.Clin.Invest* 100 (1997) 93-106.
- [86] Y.Yoshihara, H.Nakamura, K.Obata, H.Yamada, T.Hayakawa, K.Fujikawa, and Y.Okada, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis, *Ann.Rheum.Dis.* 59 (2000) 455-461.
- [87] L.C.Tetlow, D.J.Adlam, and D.E.Woolley, Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes, *Arthritis Rheum.* 44 (2001) 585-594.
- [88] J.Gross, E.Harper, E.D.Harris, P.A.McCroskery, J.H.Highberger, C.Corbett, and A.H.Kang, Animal collagenases: specificity of action, and structures of the substrate cleavage site, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 61 (1974) 605-612.
- [89] M.B.Goldring, J.R.Birkhead, L.F.Suen, R.Yamin, S.Mizuno, J.Glowacki, J.L.Arbiser, and J.F.Apperley, Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes, *J.Clin.Invest* 94 (1994) 2307-2316.
- [90] A.A.Cole, S.Chubinskaya, B.Schumacher, K.Huch, G.Szabo, J.Yao, K.Mikecz, K.A.Hasty, and K.E.Kuettner, Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase, *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 11023-11026.

- [91] P.G.Mitchell, H.A.Magna, L.M.Reeves, L.L.Lopresti-Morrow, S.A.Yocum, P.J.Rosner, K.F.Geoghegan, and J.E.Hambor, Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage, *J.Clin.Invest* 97 (1996) 761-768.
- [92] S.Chubinskaya, K.Huch, K.Mikecz, G.Cs-Szabo, K.A.Hasty, K.E.Kuettner, and A.A.Cole, Chondrocyte matrix metalloproteinase-8: up-regulation of neutrophil collagenase by interleukin-1 beta in human cartilage from knee and ankle joints, *Lab Invest* 74 (1996) 232-240.
- [93] L.D.Kozaci, C.J.Brown, C.Adcocks, A.Galloway, A.P.Hollander, and D.J.Buttler, Stromelysin 1, neutrophil collagenase, and collagenase 3 do not play major roles in a model of chondrocyte mediated cartilage breakdown, *Mol.Pathol.* 51 (1998) 282-286.
- [94] J.Gross and C.M.Lapiere, Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 48 (1962) 1014-1022.
- [95] R.A.Greenwald, Thirty-six years in the clinic without an MMP inhibitor. What hath collagenase wrought?, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 878 (1999) 413-419.
- [96] J.A.Tyler, Articular cartilage cultured with catabolin (pig interleukin 1) synthesizes a decreased number of normal proteoglycan molecules, *Biochem.J.* 227 (1985) 869-878.
- [97] H.P.Benton and J.A.Tyler, Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 154 (1988) 421-428.
- [98] J.Martel-Pelletier, Pathophysiology of osteoarthritis, *Osteoarthritis.Cartilage.* 6 (1998) 374-376.
- [99] Y.Nishida, A.L.D'Souza, E.J.Thonar, and W.Knudson, Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 1315-1326.
- [100] D.Hammerman and D.D.Wood, Interleukin 1 enhances synovial cell hyaluronate synthesis, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 177 (1984) 205-210.
- [101] Y.Nishida, C.B.Knudson, J.J.Nietfeld, A.Margulis, and W.Knudson, Antisense inhibition of hyaluronan synthase-2 in human articular chondrocytes inhibits proteoglycan retention and matrix assembly, *J.Biol.Chem.* 274 (1999) 21893-21899.
- [102] K.Ostergaard, D.M.Salter, C.B.Andersen, J.Petersen, and K.Bendtzen, CD44 expression is up-regulated in the deep zone of osteoarthritic cartilage from human femoral heads, *Histopathology* 31 (1997) 451-459.
- [103] S.R.Goldring and M.B.Goldring, The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis, *Clin.Orthop.Relat Res.* (2004) S27-S36.
- [104] Y.Niki, H.Yamada, S.Seki, T.Kikuchi, H.Takaishi, Y.Toyama, K.Fujikawa, and N.Tada, Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice, *J.Clin.Invest* 107 (2001) 1127-1135.

- [105] Y.Niki, H.Yamada, T.Kikuchi, Y.Toyama, H.Matsumoto, K.Fujikawa, and N.Tada, Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice, *J.Immunol.* 172 (2004) 577-584.
- [106] J.A.Beavo, Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms, *Physiol Rev.* 75 (1995) 725-748.
- [107] S.K.Kulkarni and C.S.Patil, Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects, *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* 26 (2004) 789-799.
- [108] S.Pratt, R.L.Shepard, R.A.Kandasamy, P.A.Johnston, W.Perry, III, and A.H.Dantzig, The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites, *Mol.Cancer Ther.* 4 (2005) 855-863.
- [109] P.Borst and R.O.Elferink, Mammalian ABC transporters in health and disease, *Annu.Rev.Biochem.* 71 (2002) 537-592.
- [110] A.H.Dantzig, D.P.de Alwis, and M.Burgess, Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy, *Adv.Drug Deliv.Rev.* 55 (2003) 133-150.
- [111] M.Wiese and I.K.Pajeva, Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers, *Curr.Med.Chem.* 8 (2001) 685-713.
- [112] G.D.Kruh and M.G.Belinsky, The MRP family of drug efflux pumps, *Oncogene* 22 (2003) 7537-7552.
- [113] E.Bakos, R.Evers, G.Szakacs, G.E.Tusnady, E.Welker, K.Szabo, H.M.de, D.L.van, P.Borst, A.Varadi, and B.Sarkadi, Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain, *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 32167-32175.
- [114] G.Jedlitschky, B.Burchell, and D.Keppeler, The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides, *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 30069-30074.
- [115] Z.S.Chen, K.Lee, and G.D.Kruh, Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine, *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 33747-33754.
- [116] R.A.van Aabel, P.H.Smeets, J.G.Peters, R.J.Bindels, and F.G.Russel, The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP, *J.Am.Soc.Nephrol.* 13 (2002) 595-603.
- [117] G.Reid, P.Wielinga, N.Zelcer, M.De Haas, L.van Deemter, J.Wijnholds, J.Balzarini, and P.Borst, Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5, *Mol.Pharmacol.* 63 (2003) 1094-1103.



- [118] A.T.Nies, H.Spring, W.F.Thon, D.Keppler, and G.Jedlitschky, Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system, *J.Urol.* 167 (2002) 2271-2275.
- [119] G.L.Scheffer, M.Kool, M.Heijn, H.M.de, A.C.Pijnenborg, J.Wijnholds, H.A.van, M.C.de Jong, J.H.Hooijberg, C.A.Mol, L.M.van der, J.M.de Vree, d.van, V, R.P.Elferink, P.Borst, and R.J.Scheper, Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies, *Cancer Res.* 60 (2000) 5269-5277.
- [120] P.Prehm, Inhibitors of hyaluronan export prevent proteoglycan loss from osteoarthritic cartilage, *J.Rheumatol.* 32 (2005) 690-696.
- [121] P.Prehm and U.Schumacher, Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters, *Biochem.Pharmacol.* 68 (2004) 1401-1410.
- [122] D.Hamerman, J.Sasse, and M.Klagsbrun, A cartilage-derived growth factor enhances hyaluronate synthesis and diminishes sulfated glycosaminoglycan synthesis in chondrocytes, *J.Cell Physiol.* 127 (1986) 317-322.
- [123] H.J.Hauselmann, R.J.Fernandes, S.S.Mok, T.M.Schmid, J.A.Block, M.B.Aydelotte, K.E.Kuettner, and E.J.Thonar, Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads, *J.Cell Sci.* 107 ( Pt 1) (1994) 17-27.
- [124] J.Bonaventure, N.Kadhom, L.Cohen-Solal, K.H.Ng, J.Bourguignon, C.Lasselín, and P.Freisinger, Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads, *Exp.Cell Res.* 212 (1994) 97-104.
- [125] H.J.Hauselmann, M.B.Aydelotte, B.L.Schumacher, K.E.Kuettner, S.H.Gitelis, and E.J.Thonar, Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads, *Matrix* 12 (1992) 116-129.
- [126] S.S.Mok, K.Masuda, H.J.Hauselmann, M.B.Aydelotte, and E.J.Thonar, Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools, *J.Biol.Chem.* 269 (1994) 33021-33027.
- [127] A.M.Afify, M.Stern, M.Guntenhoner, and R.Stern, Purification and characterization of human serumhyaluronidase, *Arch.Biochem.Biophys.* 305 (1993) 434-441.
- [128] S.Björnsson, Quantitation of proteoglycans as glycosaminoglycans in biological fluids using an alcian blue dot blot analysis, *Anal.Biochem.* 256 (1998) 229-237.
- [129] R.C.Billinghurst, L.Dahlberg, M.Ionescu, A.Reiner, R.Bourne, C.Rorabeck, P.Mitchell, J.Hambor, O.Diekman, H.Tschesche, J.Chen, W.H.van, and A.R.Poole, Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage, *J.Clin.Invest* 99 (1997) 1534-1545.
- [130] A.P.Hollander, T.F.Heathfield, C.Webber, Y.Iwata, R.Bourne, C.Rorabeck, and A.R.Poole, Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay, *J.Clin.Invest* 93 (1994) 1722-1732.

- [131] C.D.Hoemann, J.Sun, V.Chrzanowski, and M.D.Buschmann, A multivalent assay to detect glycosaminoglycan, protein, collagen, RNA, and DNA content in milligram samples of cartilage or hydrogel-based repair cartilage, *Anal.Biochem.* 300 (2002) 1-10.
- [132] C.Guingamp, P.Gegout-Pottie, L.Philippe, B.Terlain, P.Netter, and P.Gillet, Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1670-1679.
- [133] B.T.Zhu, A novel hypothesis for the mechanism of action of P-glycoprotein as a multidrug transporter, *Mol.Carcinog.* 25 (1999) 1-13.
- [134] R.N.Rosier, R.J.O'Keefe, L.A.Teot, E.J.Fox, T.A.Nester, J.E.Puzas, P.R.Reynolds, and D.G.Hicks, P-glycoprotein expression in cartilaginous tumors, *J.Surg.Oncol.* 65 (1997) 95-105.
- [135] Q.Mao, R.G.Deeley, and S.P.Cole, Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles, *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 34166-34172.
- [136] P.Borst, R.Evers, M.Kool, and J.Wijnholds, A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins, *J.Natl.Cancer Inst.* 92 (2000) 1295-1302.
- [137] A.H.Schinkel and J.W.Jonker, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv.Drug Deliv.Rev.* 55 (2003) 3-29.
- [138] Z.S.Chen, K.Lee, S.Walther, R.B.Raftogianis, M.Kuwano, H.Zeng, and G.D.Kruh, Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system, *Cancer Res.* 62 (2002) 3144-3150.
- [139] J.Wijnholds, C.A.Mol, L.van Deemter, M.De Haas, G.L.Scheffer, F.Baas, J.H.Beijnen, R.J.Scheper, S.Hatse, E.De Clercq, J.Balzarini, and P.Borst, Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 7476-7481.
- [140] G.Jedlitschky, B.Burchell, and D.Keppeler, The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides, *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 30069-30074.
- [141] D.P.Germain, P.Boutouyrie, B.Laloux, and S.Laurent, Arterial remodeling and stiffness in patients with pseudoxanthoma elasticum, *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 23 (2003) 836-841.
- [142] Z.S.Chen, E.Hopper-Borge, M.G.Belinsky, I.Shchavezleva, E.Kotova, and G.D.Kruh, Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10), *Molecular Pharmacology* 63 (2003) 351-358.
- [143] J.Tammur, C.Prades, I.Arnoold, A.Rzhetsky, A.Hutchinson, M.Adachi, J.D.Schuetz, K.J.Swoboda, L.J.Ptacek, M.Rosier, M.Dean, and R.Allikmets, Two new genes from

- the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12, *Gene* 273 (2001) 89-96.
- [144] I.Goldiner, d.van, V, K.E.Vandenberghe, M.A.van Wijland, Z.Halpern, T.Gilat, F.M.Konikoff, R.J.Veldman, and A.K.Groen, ABCA1-dependent but ApoA-I-independent cholesterol efflux mediated by fatty acid-bile acid conjugates (FABACs), *Biochem.J.* (2006).
- [145] C.Xu, B.O.Oyajobi, A.Frazer, L.D.Kozaci, R.G.Russell, and A.P.Hollander, Effects of growth factors and interleukin-1 alpha on proteoglycan and type II collagen turnover in bovine nasal and articular chondrocyte pellet cultures, *Endocrinology* 137 (1996) 3557-3565.
- [146] E.A.Morris, B.S.McDonald, A.C.Webb, and L.J.Rosenwasser, Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions, *Am.J.Vet.Res.* 51 (1990) 59-64.
- [147] M.Agassandian, S.N.Mathur, J.Zhou, F.J.Field, and R.K.Mallampalli, Oxysterols trigger ABCA1-mediated basolateral surfactant efflux, *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 31 (2004) 227-233.
- [148] A.H.Schinkel and J.W.Jonker, Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview, *Adv Drug Deliv.Rev.* 55 (2003) 3-29.
- [149] P.Prehm and U.Schumacher, Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters, *Biochem.Pharmacol.* 68 (2004) 1401-1410.
- [150] K.Saavalainen, S.Pasonen-Seppanen, T.W.Dunlop, R.Tammi, M.I.Tammi, and C.Carlberg, The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene, *J.Biol.Chem.* (2005).
- [151] S.Pratt, R.L.Shepard, R.A.Kandasamy, P.A.Johnston, W.Perry, III, and A.H.Dantzig, The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites, *Mol.Cancer Ther.* 4 (2005) 855-863.
- [152] M.Yoshida, T.Suzuki, T.Komiya, E.Hatashita, K.Nishio, N.Kazuhiko, and M.Fukuoka, Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin, *Int.J.Cancer* 94 (2001) 432-437.
- [153] C.Guingamp, P.Gegout-Pottie, L.Philippe, B.Terlain, P.Netter, and P.Gillet, Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1670-1679.
- [154] L.D.Kozaci, D.J.Buttler, and A.P.Hollander, Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 164-174.
- [155] J.T.Dingle, P.Horsfield, H.B.Fell, and M.E.Barratt, Breakdown of proteoglycan and collagen induced in pig articular cartilage in organ culture, *Ann.Rheum.Dis.* 34 (1975) 303-311.

- [156] P.J.Koshy, N.Henderson, C.Logan, P.F.Life, T.E.Cawston, and A.D.Rowan, Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines, *Ann.Rheum.Dis.* 61 (2002) 704-713.
- [157] H.Stegemann and K.Stalder, Determination of hydroxyproline, *Clin.Chim.Acta* 18 (1967) 267-273.
- [158] P.D.Benya and J.D.Shaffer, Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels, *Cell* 30 (1982) 215-224.
- [159] H.Nagaya, T.Ymagata, S.Ymagata, K.Iyoda, H.Ito, Y.Hasegawa, and H.Iwata, Examination of synovial fluid and serum hyaluronidase activity as a joint marker in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients (by zymography), *Ann.Rheum.Dis.* 58 (1999) 186-188.
- [160] A.M.Afify, M.Stern, M.Guntenhoner, and R.Stern, Purification and characterization of human serumhyaluronidase, *Arch.Biochem.Biophys.* 305 (1993) 434-441.
- [161] C.Fieber, P.Baumann, R.Vallon, C.Termeer, J.C.Simon, M.Hofmann, P.Angel, P.Herrlich, and J.P.Sleeman, Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases, *J.Cell Sci.* 117 (2004) 359-367.
- [162] Y.Geng, L.Zhou, W.J.Thompson, and M.Lotz, Cyclic GMP and cGMP-binding phosphodiesterase are required for interleukin-1-induced nitric oxide synthesis in human articular chondrocytes, *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 27484-27491.
- [163] N.bi-Gerges, L.Hove-Madsen, R.Fischmeister, and P.F.Mery, A comparative study of the effects of three guanylyl cyclase inhibitors on the L-type Ca<sup>2+</sup> and muscarinic K<sup>+</sup> currents in frog cardiac myocytes, *Br.J.Pharmacol.* 121 (1997) 1369-1377.
- [164] R.M.Palmer, M.S.Hickery, I.G.Charles, S.Moncada, and M.T.Bayliss, Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 193 (1993) 398-405.
- [165] J.Stadler, M.Stefanovic-Racic, T.R.Billiar, R.D.Curran, L.A.McIntyre, H.I.Georgescu, R.L.Simmons, and C.H.Evans, Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide, *J.Immunol.* 147 (1991) 3915-3920.
- [166] M.Stefanovic-Racic, J.Stadler, H.I.Georgescu, and C.H.Evans, Nitric oxide and energy production in articular chondrocytes, *J.Cell Physiol* 159 (1994) 274-280.
- [167] F.J.Blanco, R.L.Ochs, H.Schwarz, and M.Lotz, Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am.J.Pathol.* 146 (1995) 75-85.
- [168] F.J.Blanco and M.Lotz, IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE<sub>2</sub>, *Exp.Cell Res.* 218 (1995) 319-325.
- [169] W.E.Horton, Jr., I.Udo, P.Precht, R.Balakit, and K.Hasty, Cytokine inducible matrix metalloproteinase expression in immortalized rat chondrocytes is independent of nitric oxide stimulation, *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 34 (1998) 378-384.

- [170] K.Sasaki, T.Hattori, T.Fujisawa, K.Takahashi, H.Inoue, and M.Takigawa, Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes, *J.Biochem.(Tokyo)* 123 (1998) 431-439.
- [171] T.M.Schmid and H.E.Conrad, A unique low molecular weight collagen secreted by cultured chick embryo chondrocytes, *J.Biol.Chem.* 257 (1982) 12444-12450.
- [172] M.K.von der, T.Kirsch, A.Nerlich, A.Kuss, G.Weseloh, K.Gluckert, and H.Stoss, Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy, *Arthritis Rheum.* 35 (1992) 806-811.
- [173] H.P.Benton and J.A.Tyler, Inhibition of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin I, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 154 (1988) 421-428.
- [174] E.A.Morris, B.S.McDonald, A.C.Webb, and L.J.Rosenwasser, Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions, *Am.J.Vet.Res.* 51 (1990) 59-64.
- [175] M.L.Cameron, F.H.Fu, H.H.Paessler, M.Schneider, and C.H.Evans, Synovial fluid cytokine concentrations as possible prognostic indicators in the ACL-deficient knee, *Knee.Surg.Sports Traumatol.Arthrosc.* 2 (1994) 38-44.
- [176] H.J.Hauselmann, R.J.Fernandes, S.S.Mok, T.M.Schmid, J.A.Block, M.B.Aydelotte, K.E.Kuettner, and E.J.Thonar, Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads, *J.Cell Sci.* 107 ( Pt 1) (1994) 17-27.
- [177] S.Pratt, R.L.Shepard, R.A.Kandasamy, P.A.Johnston, W.Perry, III, and A.H.Dantzig, The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites, *Mol.Cancer Ther.* 4 (2005) 855-863.
- [178] C.A.Poole, A.Matsuoka, and J.R.Schofield, Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage, *Arthritis Rheum.* 34 (1991) 22-35.
- [179] R.C.Billinghurst, W.Wu, M.Ionescu, A.Reiner, L.Dahlberg, J.Chen, H.van Wart, and A.R.Poole, Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 664-672.
- [180] R.L.Smith, Degradative enzymes in osteoarthritis, *Front Biosci.* 4 (1999) D704-D712.
- [181] R.Sztrolovics, R.J.White, P.J.Roughley, and J.S.Mort, The mechanism of aggrecan release from cartilage differs with tissue origin and the agent used to stimulate catabolism, *Biochem.J.* 362 (2002) 465-472.
- [182] L.S.Lohmander, P.J.Neame, and J.D.Sandy, The structure of aggrecan fragments in human synovialfluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* 36 (1993) 1214-1222.

- [183] Y.Nishida, A.L.D'Souza, E.J.Thonar, and W.Knudson, Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage, *Arthritis Rheum.* 43 (2000) 1315-1326.
- [184] A.L.D'Souza, K.Masuda, L.M.Otten, Y.Nishida, W.Knudson, and E.J.Thonar, Differential Effects of Interleukin-1 on Hyaluronan and Proteoglycan Metabolism in Two Compartments of the Matrix Formed by Articular Chondrocytes Maintained in Alginate, *Arch.Biochem.Biophys.* 374 (2000) 59-65.
- [185] L.D.Kozaci, D.J.Buttle, and A.P.Hollander, Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 164-174.
- [186] T.I.Morales and V.C.Hascall, Correlated metabolism of proteoglycans and hyaluronic acid in bovine cartilage organ cultures, *J.Biol.Chem.* 263 (1988) 3632-3638.
- [187] C.Xu, B.O.Oyajobi, A.Frazer, L.D.Kozaci, R.G.Russell, and A.P.Hollander, Effects of growth factors and interleukin-1 alpha on proteoglycan and type II collagen turnover in bovine nasal and articular chondrocyte pellet cultures, *Endocrinology* 137 (1996) 3557-3565.
- [188] M.A.Pratta, W.Yao, C.Decicco, M.D.Tortorella, R.Q.Liu, R.A.Copeland, R.Magolda, R.C.Newton, J.M.Trzaskos, and E.C.Arner, Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage, *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 45539-45545.
- [189] C.Fieber, P.Baumann, R.Vallon, C.Termeer, J.C.Simon, M.Hofmann, P.Angel, P.Herrlich, and J.P.Sleeman, Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteinases, *J.Cell Sci.* 117 (2004) 359-367.
- [190] Y.Geng, L.Zhou, W.J.Thompson, and M.Lotz, Cyclic GMP and cGMP-binding phosphodiesterase are required for interleukin-1-induced nitric oxide synthesis in human articular chondrocytes, *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 27484-27491.
- [191] M.Lotz, F.J.Blanco, K.J.von, J.Dudler, R.Maier, P.M.Villiger, and Y.Geng, Cytokine regulation of chondrocyte functions, *J.Rheumatol.Suppl* 43 (1995) 104-108.
- [192] J.Stadler, M.Stefanovic-Racic, T.R.Billiar, R.D.Curran, L.A.McIntyre, H.I.Georgescu, R.L.Simmons, and C.H.Evans, Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide, *J.Immunol.* 147 (1991) 3915-3920.
- [193] R.M.Palmer, M.S.Hickery, I.G.Charles, S.Moncada, and M.T.Bayliss, Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 193 (1993) 398-405.
- [194] D.Beasley, J.H.Schwartz, and B.M.Brenner, Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells, *J.Clin.Invest* 87 (1991) 602-608.
- [195] J.Gronich, M.Konieczkowski, M.H.Gelb, R.A.Nemenoff, and J.R.Sedor, Interleukin 1 alpha causes rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells, *J.Clin.Invest* 93 (1994) 1224-1233.

- [196] Y.Geng, F.J.Blanco, M.Cornelisson, and M.Lotz, Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes, *J.Immunol.* 155 (1995) 796-801.
- [197] F.J.Blanco and M.Lotz, IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE<sub>2</sub>, *Exp.Cell Res.* 218 (1995) 319-325.
- [198] N.W.Freshney, L.Rawlinson, F.Guesdon, E.Jones, S.Cowley, J.Hsuan, and J.Saklatvala, Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27, *Cell* 78 (1994) 1039-1049.
- [199] Y.Geng, R.Maier, and M.Lotz, Tyrosine kinases are involved with the expression of inducible nitric oxide synthase in human articular chondrocytes, *J.Cell Physiol* 163 (1995) 545-554.
- [200] G.Jedlitschky, B.Burchell, and D.Keppeler, The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides, *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 30069-30074.
- [201] R.K.Studer, K.Decker, S.Melhem, and H.Georgescu, Nitric oxide inhibition of IGF-1 stimulated proteoglycan synthesis: role of cGMP, *J.Orthop.Res.* 21 (2003) 914-921.
- [202] C.A.Manacu, J.Martel-Pelletier, M.Roy-Beaudry, J.P.Pelletier, J.C.Fernandes, F.S.Shipkolye, D.R.Mitrovic, and F.Moldovan, Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and upregulates collagenase production, *Arthritis Res.Ther.* 7 (2005) R324-R332.
- [203] F.J.Blanco, R.L.Ochs, H.Schwarz, and M.Lotz, Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide, *Am.J.Pathol.* 146 (1995) 75-85.
- [204] L.Klewes and P.Prehm, Intracellular signal transduction for serum activation of the hyaluronan synthase in eukaryotic cell lines, *J.Cell Physiol.* 160 (1994) 539-544.
- [205] C.L.Anggiansah, D.Scott, A.Poli, P.J.Coleman, E.Badrick, R.M.Mason, and J.R.Levick, Regulation of hyaluronan secretion into rabbit synovial joints in vivo by protein kinase C, *J.Physiol* (2003).
- [206] H.S.Wang, W.H.Tung, K.T.Tang, Y.K.Wong, G.J.Huang, J.C.Wu, Y.J.Guo, and C.C.Chen, TGF-beta induced hyaluronan synthesis in orbital fibroblasts involves protein kinase C betaII activation in vitro, *J.Cell Biochem.* 95 (2005) 256-267.
- [207] Y.K.Wong, K.T.Tang, J.C.Wu, J.J.Hwang, and H.S.Wang, Stimulation of hyaluronan synthesis by interleukin-1beta involves activation of protein kinase C betaII in fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy, *J.Cell Biochem.* 82 (2001) 58-67.
- [208] A.Maroudas, R.Scheiderman, O.Popper, The role of water, proteoglycan, and collagen in solute transport in cartilage, In: Kuettner, K., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., and Hascall, V. C. (Eds.), *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Raven Press, New York, 1992, pp. 355-371.
- [209] A.Maroudas, Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport, *Biorheology* 12 (1975) 233-248.

An dieser Stelle möchte ich Allen, die diese Arbeit unterstützt haben, „Danke“ sagen.

Zuvorderst Herrn Professor Prehm, der mir dieses sehr interessante Thema überlassen hat und stets mit guten Ratschlägen und Anregungen zum Fortgang der Arbeit beigetragen hat. Gleichzeitig wusste er durch seine besonnene Art auch in schwierigen Zeiten, wo es mal nicht so gut lief, mich zu beruhigen und mir die nötige Zuversicht zu geben.

Herrn Professor Dr. Lehr möchte ich ganz herzlich für die Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Chemie und Pharmazie danken, Seine guten Korrekturvorschläge und die Mühe, die er sich mit mir gemacht hat. Gleichzeitig ein „Dankeschön“ an seinen netten Arbeitskreis für die freundliche Aufnahme.

Weiterhin möchte ich mich bei unseren MTAs für ihren großen Einsatz und ihre Geduld bedanken. Zum einen Angelika Blanke für Ihre Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten, Ute Rasmussen für die tolle Arbeit in der Zellkultur sowie auch besonders Reiner Schulz, der immer eine große Unterstützung bei allen technischen Fragestellungen war und gleichzeitig einen Großteil der Hyaluronan Elisa Messungen durchgeführt hat.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Anne Forsberg, die mich sehr bei der histochemischen Färbung der Schnitte unterstützt hat und unzählige Arbeitsstunden dafür aufwenden musste.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die immer hilfsbereit zur Stelle waren, wenn es galt, ein Problem zu lösen. Besonders hervorheben muss man hier Rita Dreier, die mich mit Ihrem Know-How bei Fragestellungen zu den Kollagenen sehr unterstützt hat.

Danke auch an meinen Mitdoktoranden Tobias Schulz und allen Mitarbeitern der AG 06, mit denen ich besonders eng zusammengearbeitet habe.

Nicht zuletzt auch einen besonderen Dank an die Sekretärinnen, die Mitarbeiter aus der Werkstatt und unseren Hausmeister, die immer erfolgreich bemüht gewesen sind, für alle Mitarbeiter möglichst ideale Arbeitsbedingungen zu schaffen und alle Wünsche zu erfüllen.

---



Vielen Dank Mama und Papa für die Unterstützung und meinen sehr guten Freunden aus Everswinkel, weil sie mir viel Rückhalt gegeben haben.

---

**Lebenslauf**

Barthold Deiters, geboren am 15.04.1978 in Warendorf  
Familienstand ledig  
Vater August Deiters  
Mutter Hildegard Deiters, geborene Schwermann

**Schulbildung:**

Grundschule Everswinkel 1984–1988  
Gymnasium Laurentianum Warendorf 1988–1997  
Erlangung der Hochschulreife am 10.6.1997 in Warendorf  
Wehrdienst beim 192. Panzergrenadierbatallion in Ahlen Juli 1997–März 1998

**Studium:**

Pharmaziestudium an der WWU Münster April 1998-April 2002  
Praktisches halbes Jahr in der Apotheke am Kirchpark, Telgte Mai 2002-Oktober 2002  
Praktisches halbes Jahr am Institut für pharmazeutische  
Biologie und Phytochemie November 2002-März 2003

**Prüfungen:**

1. Staatsexamen 11. April 2000  
2. Staatsexamen 24. April 2002  
3. Staatsexamen 25. Juni 2003  
Erlangung der Approbation als Apotheker 23. Juli 2003

**weitere Tätigkeiten:**

Tutor für allgemeine und anorganische Chemie am  
Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie April 2000-April 2002  
Fernstudium zum Diplom Fachjournalisten an der  
deutschen Fachjournalisten Schule, Berlin Januar-Dezember 2006  
Praktikum in der Corporate Affairs Abteilung,  
Wyeth Pharma GmbH, Münster April-Mai 2006

Beginn der Dissertation im Juli 2003 am Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Prehm. Betreuung im Fachbereich 12, Chemie und Pharmazie, durch Herrn Professor Dr. Lehr.

---