

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann -

**Zytokin-abhängige Regulation der Genexpression von Aggrekanasen und
bone morphogenetic proteins in arthrotischen Synovialfibroblasten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Schmeil, Sebastian

aus Gelsenkirchen

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Fuchs

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Meffert

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Winkelmann -
Referent: Prof. Dr. S. Fuchs
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. R. Meffert

ZUSAMMENFASSUNG

Zytokin-abhängige Regulation der Genexpression von Aggrekanasen und bone morphogenetic proteins in arthrotischen Synovialfibroblasten

Schmeil
Sebastian

Das Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der Synovialfibroblasten für die Pathogenese der Osteoarthrose näher zu ergründen. Von Interesse war dabei, welchen Effekt Zytokine auf die Expression matrixdegradierender Proteasen und anaboler Wachstumsfaktoren durch Synovialfibroblasten von Arthrosepatienten haben. Hierzu wurden Synovialfibroblasten von fünf Arthrosepatienten kultiviert und mit Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), der Zytokinkombination IL-1 β / TNF- α , Transforming growth factor- β (TGF- β), und Onkostatin-M (OSM) stimuliert. Anschließend wurde mittels Polymerase chain reaction (PCR) die Genexpression folgender Faktoren analysiert: Aggrekanase-1, Aggrekanase-2, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) und cartilage derived morphogenetic protein-1 (CDMP-1). Die folgenden Ergebnisse konnten beobachtet werden:

1. Die Genexpression der Aggrekanase-1 wurde durch IL-1 β , TGF- β , OSM und die Zytokinkombination TNF- α /IL-1 β stimuliert.
2. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Suppression der BMP-4-Genexpression durch TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , sowie die Zytokinkombination IL-1 β / TNF- α .
3. Ebenfalls supprimiert wurde die Genexpression des CDMP-1 durch TNF- α , IL-1 β , TGF- β und die Zytokinkombination IL-1 β /TNF- α .
4. Die Zytokinstimulation hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression der Aggrekanase-2 und des BMP-2.

Die Ergebnisse heben den pathogenetischen Stellenwert der Synovialfibroblasten als regulierbare Synthesestätten matrixdegradierender Proteasen und anaboler Wachstumsfaktoren hervor. Insbesondere die gegensätzliche Regulation der Aggrekanase-1 im Vergleich zu den Wachstumsfaktoren BMP-4 und CDMP-1 bekräftigt die Hypothese, dass Synovialfibroblasten an der Entstehung eines anakatabolen Ungleichgewichtes der kartilaginären Homöostase beteiligt sind, welches für die Pathogenese der Arthrose verantwortlich gemacht wird.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2005

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Osteoarthrose	1
1.2	Der Knorpel	2
1.3	Aufbau und Funktion der Synovialis	5
1.4	Die Homöostase des Knorpels	7
1.5	Die Matrix-Metalloproteinasen	9
1.6	Die Aggrekanasen	10
1.7	Die bone morphogenetic proteins	16
1.8	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Patienten und Probenmaterial	18
2.2	Zellbiologische Grundlagen	18
2.3	Isolation und Kultivierung der Synovialfibroblasten	19
2.4	Stimulation der Synovialfibroblasten	20
2.5	Isolation der RNA	21
2.6	Die RT-PCR	22
2.7	Die cDNA-Synthese	22
2.8	Die PCR	23
2.9	Die Gelelektrophorese	25
2.10	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Aggrekanase-1	27
3.2	Aggrekanase-2	30
3.3	BMP-2	33
3.4	BMP-4	36
3.5	CDMP-1	39
4	Diskussion.....	42
4.1	Aggrekanase-1 und Aggrekanase-2	45
4.2	BMP-2, BMP-4 und CDMP-1	50
5	Literaturverzeichnis	55
6	Lebenslauf	65
7	Danksagung.....	67
8	Materialien und Chemikalien.....	I

1 Einleitung

1.1 Die Osteoarthrose

Die Osteoarthrose ist definiert als eine primär nichtentzündliche, progressive, degenerative Erkrankung der Gelenke. Bis heute sind die Ursachen und Entstehungsmechanismen der Arthrose nicht vollständig geklärt.

Abzugrenzen ist die Arthrose gegenüber den entzündlichen Arthritiden, wie der rheumatoiden oder der infektiösen Arthritis. Obwohl die entzündliche Komponente ein wesentliches Unterscheidungskriterium darstellt, kann auch eine Arthrose, insbesondere im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit, in entzündlichen Schüben verlaufen und die klassischen Symptome einer Entzündung (Rötung, Schwellung und Schmerzen) aufweisen (43). Ein solcher Schub wird auch als aktivierte Arthrose bezeichnet und tritt im Unterschied zu den Arthritiden sekundär im arthrotisch veränderten Gelenk auf.

Die Abgrenzung der Arthrose gegenüber den entzündlichen Gelenkerkrankungen kommt in der englischen Bezeichnung der Arthrose als Osteoarthritis nicht zur Geltung. Ein weiteres Charakteristikum der Arthrose ist ihre Progredienz. Sie entwickelt sich meist über Jahre oder Jahrzehnte und bleibt zunächst häufig völlig asymptomatisch. Wenn sie symptomatisch wird, ist das klinische Leitsymptom der Schmerz, welcher zunächst als Belastungs- und Anlaufschmerz, später auch als Ruhe- und Dauerschmerz auftritt. Hinzu kommt häufig eine zunehmende Bewegungseinschränkung des betroffenen Gelenkes, welche teils auf den Schmerz, teils auf degenerative Umbauprozesse des arthrotischen Gelenkes zurückgeführt werden kann. Häufig ist es bereits lange vor dem Auftreten erster klinischer Symptome möglich, derartige Umbauprozesse radiologisch nachzuweisen. Die typischen radiologischen Zeichen einer Arthrose sind eine Verschmälerung des Gelenkspaltes, subchondrale Sklerosierung, osteophytäre Anbauten und Geröllzysten und wurden bereits 1957 von Kellgren und Lawrence beschrieben (55). Grundsätzlich kann jedes Gelenk von einer Arthrose betroffen sein, besonders häufig tritt sie jedoch als Gonarthrose oder Coxarthrose an den lasttragenden Gelenken der unteren Extremität auf.

Die Ursachen der Arthrose sind vielfältig. Nach ätiologischen Gesichtspunkten unterscheidet man zwischen primärer und sekundärer Arthrose. Die Entstehung der primären oder auch idiopathischen Arthrose ist weitgehend ungeklärt. Für sie werden endogene, genetische Faktoren verantwortlich gemacht. Eine sekundäre Arthrose entsteht infolge einer pathologischen Veränderung (19;42). So können zum Beispiel biomechanische Veränderungen zu einer Fehlbelastung eines Gelenkes und schließlich zu einer Arthrose führen. Beispiele für solche „präarthrotische Deformitäten“ sind angeborene sowie erworbene Gelenkfehlstellungen, Achsabweichungen oder posttraumatische Gelenkinkongruenzen (24). Auch eine übermäßige Belastung eines Gelenkes, sei es durch Übergewicht oder durch die Ausübung bestimmter beruflicher oder sportlicher Tätigkeiten, steigert das Risiko einer Arthroseentstehung. Ein wesentlicher weiterer Risikofaktor ist das Alter (18). Ebenfalls können zahlreiche endokrine, metabolische oder auch hämatologische Erkrankungen wie die Hämophilie die Entstehung einer Arthrose begünstigen.

Ist eine Arthrose, gleich welcher Ursache, einmal eingetreten, bleibt sie irreversibel und ist noch keiner kausalen Therapie zugänglich. Die Behandlung beschränkt sich auf symptomatische und progredienzverlangsamende Maßnahmen. In vielen Fällen ist der endoprothetische Gelenkersatz unvermeidlich.

Als der häufigsten aller Gelenkerkrankungen kommt der Arthrose auch eine enorme sozioökonomische Bedeutung zu (52). Schätzungsweise beträgt die Prävalenz arthrotischer Gelenkveränderungen in den USA bei über 55-Jährigen 68%. Es wird außerdem geschätzt, dass die Arthrose durch Produktionsausfälle und medizinische Behandlung in den USA jährlich Kosten in Höhe von 65 Milliarden Dollar verursacht (23). In Anbetracht der demographischen Gesellschaftsentwicklung und der Veränderung der Altersstruktur der Bevölkerung muss damit gerechnet werden, dass die Volkskrankheit Arthrose auch in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen wird.

1.2 *Der Knorpel*

Der adulte Gelenkknorpel besitzt einzigartige biomechanische Eigenschaften, wie beispielsweise seine Reißfestigkeit und Elastizität, welche ein jahrzehntelanges Funktionieren garantieren. Eine wesentliche Aufgabe des Gelenkknorpels besteht darin, eine fast

reibunglose Beweglichkeit der Gelenkflächen zu gewährleisten, so dass trotz hoher Gewalteinwirkungen kein nennenswerter Abrieb am Gewebe auftritt. Seine elastische Verformbarkeit ermöglicht es ihm, hohe, punktförmig ansetzende Druckkräfte auf eine breite Knochenunterlage zu verteilen. Dadurch wird der unter dem Knorpel liegende Knochen mit seinen zerbrechlichen Spongiosabälkchen geschützt. Nicht zuletzt werden Druckstöße infolge hoher Bewegungsenergien im Gewebe durch Flüssigkeitsverschiebungen gemildert.

Knorpelgewebe besteht einerseits aus Zellen, den Chondrozyten, und andererseits aus der von ihnen produzierten Interzellulärsubstanz, der extrazellulären Matrix (EZM). Der biomechanische Funktionsträger des Knorpels ist die extrazelluläre Matrix, während die Chondrozyten, obwohl sie nur etwa 5% der Gesamtmasse ausmachen, für deren Aufbau und Erhalt verantwortlich sind. Aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzungen der extrazellulären Matrix werden verschiedene Formen des ausdifferenzierten Knorpels unterschieden: Hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel. Elastischer Knorpel ist beispielsweise am Aufbau der Ohrmuschel beteiligt, Faserknorpel am Aufbau der Symphyse oder der Zwischenwirbelscheiben. Bestandteil der Gelenke ist der hyaline Knorpel, der wegen seiner bläulich durchscheinenden Beschaffenheit glasartig (griechisch *hyalos*) genannt wird (59).

Knorpel ist weder innerviert, noch vaskularisiert. Daher erfolgt seine Nutrition mit Sauerstoff und Nährstoffen, genauso wie der Abtransport von Stoffwechselprodukten durch Diffusion über die Synovialflüssigkeit. Dennoch weisen Chondrozyten eine beachtliche metabolische Aktivität zur Protein- und Kohlenhydratsynthese auf, was an ihrem Reichtum an rauem endoplasmatischem Retikulum und ihrem großen Golgi-Apparat erkennbar ist (88). Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels besteht hauptsächlich aus Wasser, Kollagen und Proteoglykanen (57). Der Anteil des Wassers beträgt etwa 60-80% der Gesamtmasse, Kollagene und Proteoglykane machen ca. 70%, bzw. 25% des Knorpeltrockengewichtes aus. Das Kollagen bildet durch seine arkadenförmige Fibrillenordnung eine Rahmenkonstruktion, die dem Knorpel als strukturelles Grundgerüst seine Zug- und Reißfestigkeit verleiht. Außerdem wirkt das Kollagennetzwerk einer unkontrollierten Schwellneigung des Knorpels entgegen, welche auf der starken, osmotisch bedingten Wasserbindungskapazität der extrazellulären Matrix beruht (15). Von den derzeit bekannten 14 Kollagentypen kommt im Gelenkknorpel vorrangig der Typ II

(90-95%) vor, in dem sich die Proteinketten zopfartig zu einer Tripelhelix durch intermolekulare H-Brücken zusammenfügen (16). Diese helikale Anordnung des Kollagens schützt die Peptidbindungen im Inneren des Moleküls vor dem Angriff durch Peptidasen. Kollagen Typ IX und XI sind an Quervernetzungen beteiligt und tragen somit zu einer Stabilisierung im Kollagengerüst des Knorpels bei. Die Zwischenräume der extrazellulären Grundsubstanz werden ausgefüllt von hochmolekularen Proteoglykanen. Dies sind riesige Molekülaggregate- am besten untersucht ist das Aggrekan- mit einer zentralen Kohlenhydratkette, der Hyaluronsäure. Daran sind unter Beteiligung der Linkproteine die eigentlichen Proteoglykaneinheiten gebunden. Sie bestehen aus jeweils einem Proteinstrang, dem Coreprotein, an dem über hundert Kohlenhydratseitenketten gebunden sind (40;84). Die Struktur gleicht einer Flaschenbürste (s. Abbildung 1). Die Kohlenhydratseitenketten, die Glykosaminoglykane, besitzen negativ geladene Carboxyl- und Sulfatgruppen, die positive Gegenionen vom Verlassen des Knorpels zurückhalten. Die Glykosaminoglykan-Monomere des artikulären Knorpels sind Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat. Sie liegen als Ketten unterschiedlicher Länge vor, die aus sich wiederholenden Disachariduntereinheiten bestehen. Beispiele der sich wiederholenden Untereinheiten sind N-Acetylgalactosamin, Glucuronsäure, Chondroitinsulfat, N-Acetylglucosamin, Galactose und Keratansulfat.

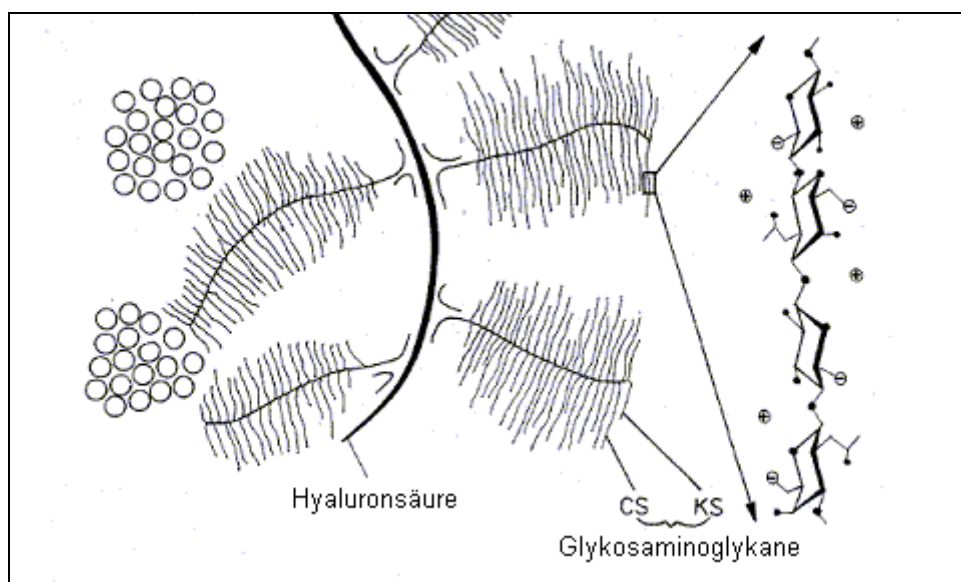


Abbildung 1: Darstellung der Proteoglykanstruktur nach Lippa (64)

CS = Chondroitinsulfat, KS = Keratansulfat

Die Glykosaminoglykane binden auf Grund ihres polaren Charakters Wasser. Die „Flaschenbürsten“ sind also von einer dicken Wasserhülle umgeben. Die Retention des Wassers durch die Proteoglykane in der extrazellulären Matrix bewirkt einen bestimmten Turgor und Schwellungsdruck des Knorpels, der bei Druckeinwirkung Deformationen verhindert (54). Eine weitere Aufgabe der Proteoglykane besteht darin, die Matrixkollagene zu „maskieren“. Das heißt, sie bilden eine Art Schutzhülle, welche ebenfalls die Peptidbindungen des Kollagens vor proteolytischer Aktivität schützt. Analog dazu versteht man unter einer „Demaskierung“ des Kollagens einen Verlust genau dieser Schutzhülle, welcher, initiiert durch enzymatische Degradation der Proteoglykane, als ein frühes Stadium in der Pathogenese der Osteoarthritis aufgefasst wird. Die Produktion der Proteoglykane erfolgt intrazellulär in den Chondrozyten und Synoviozyten, die Aggregation dagegen im extrazellulären Raum. Die Umsatzrate der Proteoglykane ist deutlich höher als die der Kollagene; ihre Halbwertszeit beträgt 400 bis 800 Tage.

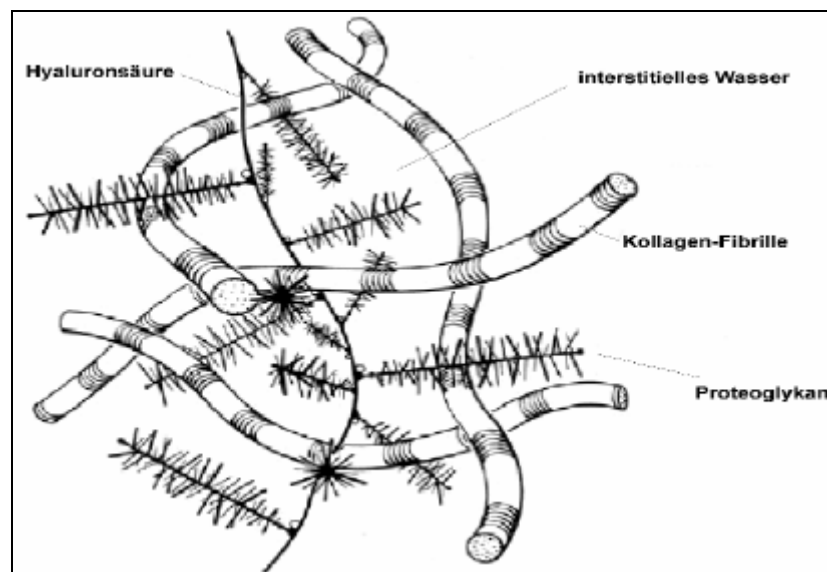


Abbildung 2: Darstellung der extrazellulären Matrix nach Martinek (68)

1.3 Aufbau und Funktion der Synovialis

Die Gelenkkapsel ist mit Synovialmembran (Intima synovialis), subsynovialer Schicht (Subintima) und fibröser Gelenkkapsel dreischichtig aufgebaut. Die subsynoviale Schicht ist vasukularisiert, enthält freie Nervenenden und bildet den Übergang zwischen

Synovialis und fibröser Gelenkkapsel, die für die physikalische Stabilität verantwortlich ist. Weiterhin enthält die Subsynovia Lymphozyten, Leukozyten, sowie Plasma-, Mast- und Fettzellen. Ähnlich wie der Gelenkknorpel enthält auch die Synovialis eine extrazelluläre Matrix, welche sich unter Anderem aus verschiedenen Kollagenen und Proteoglykanen zusammensetzt (7). Die Synovialmembran besteht aus einer zweireihigen Zellschicht mit zwei unterschiedlichen Typen von Synovialisdeckzellen.

Die makrophagenähnlichen Typ-A Deckzellen entstehen aus Knochenmarkstammzellen und werden dem Monozyten-Makrophagen-System zugeordnet (22). Sie stehen im Dienste der Immunabwehr und zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Phagozytose aus. Außerdem können sie IgG Fc-Rezeptoren und C3-Rezeptoren exprimieren und sind so in der Lage, Immunglobuline und Komplementfaktoren zu binden (92).

Typ-B Synoviozyten sind Bindegewebszellen im engeren Sinn und werden deshalb auch als Synovialfibroblasten bezeichnet. Ihre Aufgabe besteht in der Bildung der Synovia. So produzieren sie beispielsweise Hyaluronsäure, welche der Synovia ihre viskösen Eigenschaften verleiht (81). Neben ihrer Syntheseleistung verhindert die Synovialis die Diffusion großer Moleküle in die Gelenkhöhle. Entsprechend enthält die Synovia Elektrolyte, kleine Moleküle wie Glukose, Laktat und Sauerstoff in vergleichbarer Zusammensetzung mit dem Blutplasma. Der Gesamteiweißspiegel ist relativ gering. Die Mehrzahl der dem Plasma entstammenden Proteine weist ein niedriges Molekulargewicht auf. Die Synovia ist fibrinogenlos, enthält keine Gerinnungsfaktoren und gerinnt deshalb *in vitro* nicht. Dieses Plasmadialysat stellt die Ernährung des bradytrophen, nicht vaskularisierten Knorpels und der schlecht versorgten Gelenkbestandteile wie z.B. Bänder und Menisken sicher. Die Funktionen der Synoviozyten reichen weit über die bisher genannten hinaus. Großenteils sind sie noch nicht verstanden und werden gegenwärtig intensiv erforscht. Man geht davon aus, dass die Synoviozyten ein kleiner Baustein in einem komplexen und vielschichtigen System sind, an dem auch die anderen zellulären und extrazellulären Strukturen des Gelenkes beteiligt sind. In diesem System leisten die Synoviozyten ihren Beitrag zur Erschaffung und Aufrechterhaltung eines empfindlichen Gleichgewichtes. Durch intensiven Informationsaustausch mit ihrer Umgebung und durch die Synthese und Sezernierung verschiedener Botenstoffe und Enzyme greifen sie in diese Homöostase ein.

1.4 Die Homöostase des Knorpels

Die klassischen Erklärungsmodelle zur Pathogenese der Osteoarthritis legen den Schwerpunkt auf die mechanischen Belastungen. Danach wird der Knorpel, vergleichbar mit einem Stoßdämpfer, als statisches Gebilde betrachtet, welches im Laufe der Zeit verschleißt.

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die biochemischen Prozesse im Gelenk hat sich in den letzten 30 Jahren ein weiteres, biochemisches Erklärungsmodell etabliert, welches die herkömmlichen Modelle ergänzt (103). Eine Kernaussage dieses Modells liegt darin, dass der Knorpel trotz seiner Eigenschaft als bradytrophes Gewebe keineswegs statisch und passiv ist. Als äußerst dynamisches Gewebe unterliegen der Knorpel und insbesondere die extrazelluläre Matrix einem ständigen Wandel. Die strukturelle und funktionelle Integrität des Knorpels wird als das Ergebnis einer Vielzahl anaboler und kataboler Vorgänge verstanden, die gleichzeitig ablaufen und sich unter physiologischen Bedingungen gegenseitig ausgleichen. An der Erschaffung und Erhaltung dieses Fließgleichgewichtes sind die Chondrozyten, die Synoviozyten und die extrazelluläre Matrix, ebenso wie Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen beteiligt. Nur durch einen intensiven Informationsaustausch untereinander können sie die empfindliche kartilaginäre Homöostase aufrechterhalten.

An diesem Austausch sind zahlreiche Botenstoffe, wie Hormone, Wachstumsfaktoren und in besonderem Maße modulatorisch wirkende Zytokine beteiligt. In diesem Zusammenhang werden auch mechanische Belastungen nicht nur als direkte Effektoren gesehen, welche zum Beispiel durch Abrieb eine Veränderung der Knorpelstruktur hervorrufen, sondern als biochemische Triggerreize, die auf indirektem Wege über eine Zytokinstimulation Reaktionen im Knorpel erzeugen. Das beste Beispiel dieser Interaktion ist eine chronische Entlastung des Knorpels, die zur signifikanten Reduktion der Proteoglykansynthese und des Aggregationsgrades führt und somit wesentlich die mechanischen Eigenschaften des Knorpels verändert (36;83). Der genaue Mechanismus dieser Signalübertragung ist nicht endgültig geklärt. Gerät das Fließgleichgewicht durch ein Überwiegen der katabolen Einflüsse aus dem Ruder, und kann dieser Zustand nicht durch eine kompensatorische Steigerung der anabolen Einflüsse ausgeglichen werden, resultiert eine strukturelle Schädigung des Knorpels. Dies ist der Ausgangspunkt für die

Entwicklung einer Arthrose. Der wichtigste Angriffspunkt für die anabolen und katabolen Einflüsse sind die Eiweißbestandteile der extrazellulären Matrix, also die Kollagene und die Proteoglykane. Einer der ersten Schritte in der Pathogenese der Arthrose ist eine proteolytische Spaltung der Proteoglykane. Dadurch werden die Kollagene für Proteasen leichter zugänglich, was zu einem Aufbrechen des Kollagengerüsts führt. Daraus resultiert eine Hyperhydratation der Proteoglykane. Makroskopisch schwillt der Knorpel dadurch an. Dabei wird er aber auch weicher, unelastischer und verletzungsanfälliger (14;71). Die Knorpeloberfläche raut im weiteren Verlauf auf, es entstehen Fissuren bis schließlich die Knorpelschicht dünner wird oder gar bis auf den Knochen komplett verloren geht.

Die entscheidenden katabolen Mechanismen in der Arthroseentstehung sind einerseits eine verringerte Synthese extrazellulärer Matrixbestandteile und andererseits eine gesteigerte Spaltung dieser Matrixbestandteile durch proteolytische Enzyme. Mitverantwortlich für das Überwiegen der katabolen Einflüsse im Rahmen der Arthroseentstehung ist die Wirkung verschiedener Zytokine. Diese vermitteln ihre Information über spezifische Rezeptoren an der Oberfläche ihrer Zielzelle. Die Effekte, die sie dadurch in der Zielzelle hervorrufen sind vielfältig. Sie können beispielsweise die Proteinbiosynthese beeinflussen und dadurch aktivierend oder inhibierend auf die Synthese und Sekretion bestimmter Proteine einwirken. Solche Proteine können im Kontext des Knorpelstoffwechsels matrixdegradierende Enzyme sein. Inzwischen ist für sehr viele Zytokine eine Beteiligung im „Konzert der Knorpelhomöostase“ nachgewiesen. Einigen kommt dabei eine besonders herausragende Rolle zu.

Interleukin-1 zeigte in zahlreichen Studien eine hohe Potenz in der Induktion kataboler Prozesse (8;78;97) im Gelenkknorpel. Das ehemals auch als „Katabolin“ bezeichnete IL-1 liegt in zwei Isoformen (IL-1 α , IL-1 β) und wird im Knorpel von Chondrozyten, Fibroblasten und Makrophagen gebildet. Die Wirkung des IL-1 erfolgt über zwei spezifische Rezeptoren (IL-1R Typ I und Typ II). Bei Arthrosepatienten findet man eine deutlich erhöhte Anzahl von Typ I Rezeptoren auf den Chondrozyten. Dadurch werden sie für die katabolen Einflüsse des IL-1 sensibilisiert (66). Dies gilt besonders für IL-1 β , welches eine höhere Affinität zu diesen Rezeptoren hat. Weiterhin steigert IL-1 die Synthese matrixdegradierender Proteasen und inhibiert die Kollagen- und Aggrecansynthese (30;78).

Eine ähnlich große Bedeutung auf der katabolen Seite der Matrixhomöostase hat der Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Er wurde früher auch als „Kachektin“ bezeichnet. TNF- α wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen als inaktive Vorstufe synthetisiert und anschließend durch das TNF- α -converting-enzyme in seine aktive Form überführt (2). Auch für TNF- α existieren spezifische Rezeptoren, die bei Arthrosepatienten stärker exprimiert werden (105). Der Einfluss von TNF- α auf den Proteoglykanmetabolismus ähnelt dem des IL-1 (101).

Zytokine beeinflussen sich auch gegenseitig in Aktivität und Synthese. So wird die Wirkung von Interleukin-6 (IL-6), einem weiteren proinflammatorischen Zytokin, durch IL-1 verstärkt (79). IL-6 wird von Monozyten, Lymphozyten und Fibroblasten gebildet. Ihm werden ähnliche Einflüsse auf den Knorpelmetabolismus zugeschrieben wie dem IL-1. In der Synovia von arthrotischen und besonders von arthritischen Gelenken findet man erhöhte IL-6-Konzentrationen (38).

Die beiden am besten untersuchten Gruppen matrixdegradierender Enzyme sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und die Aggrecanasen.

1.5 Die Matrix-Metalloproteinasen

MMPs sind eine große, strukturell und funktionell sehr vielfältige Gruppe proteolytischer Enzyme (74;76). Sie heißen Metalloproteinasen, weil sie Zinkionen enthalten. Die große Familie der MMPs wird weiter unterteilt in verschiedene Untergruppen, wie Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) und einige andere. Gemeinsamkeit der MMPs ist ihre Aktivität in Geweben mesenchymalen Ursprungs, also insbesondere im Bindegewebe, zu dem auch der Knorpel gehört. Hauptsächlich von Chondrozyten und Synovialfibroblasten als inaktive Vorstufen sezerniert, entfalten sie nach extrazellulärer Aktivierung ihre Wirkung als Proteasen. Im Knorpel besonders stark vertretene MMPs sind die Gelatinase-A und -B (MMP-2 und MMP-9), die Kollagenase-1, -2, -3 (MMP-1, MMP-8 und MMP-13); außerdem das Stromelysin-1 (MMP-3). Opfer der proteolytischen Aktivität der MMPs sind die Eiweißbestandteile der EZM, also die Kollagene und Proteoglykane. Dabei ist die Substratspezifität der meisten MMPs relativ gering

(10;110). Eine MMP kann demnach verschiedene Matrixproteine spalten; ebenso ist eine bestimmte Peptidbindung für mehrere MMPs zugänglich. Dennoch zeigen MMPs bestimmte Substratpräferenzen.

Da die MMPs ein sehr potentes Werkzeug auf der katabolen Seite der Matrixhomöostase darstellen, unterliegt ihre Aktivität einer fein abgestimmten Regulation. Einerseits wird bereits ihre Synthese und Sezernierung durch inhibierend und aktivierend wirkende Zytokine reguliert, andererseits existieren mit den „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMPs) spezifische Antagonisten der MMPs. Diese Glykoproteine sind in der Lage, die Aktivität der MMPs durch Bindung an deren aktives Zentrum zu inhibieren. Sie stellen damit einen wichtigen Gegenpol der MMPs in der Homöostase des Knorpels dar (20;53;67;107).

1.6 Die Aggrekanasen

Neben den MMPs zählen auch die Aggrekanasen zu den Metalloproteinasen, da auch sie in ihrem katalytischen Zentrum Zinkionen enthalten. Eine Untergruppe der Metalloproteinasen sind die Adamalysine, welche sich wiederum in zwei Subklassen unterteilen lassen: ADAM (**a** disintegrin **and** metalloproteinase) und ADAMTS (**a** disintegrin **and** metalloproteinase with thrombospondin motif) (67). Letzteren gehören die Aggrekanasen an. ADAMs sind an die Zellmembran gebunden. Damit entfalten sie ihre Wirkung hauptsächlich an Proteinen der Zelloberfläche. Ihre Bedeutung für den Stoffwechsel der EZM ist bisher kaum bekannt. Im Gegensatz dazu werden die erst vor wenigen Jahren entdeckten Proteasen der ADAMTS-Familie sezerniert und nehmen damit eine zentrale Rolle in der Homöostase der EZM ein.

Über die bislang 19 identifizierten Mitglieder der ADAMTS-Familie ist nur wenig bekannt. Von vielen kennt man weder die Funktion, noch das Substrat ihrer proteolytischen Aktivität. Seit der Entdeckung von ADAMTS-1 im Jahre 1997 (58) sind die Erkenntnisse über diese Proteasen jedoch stetig gewachsen. Es wird immer deutlicher, dass sie an zahlreichen Schauplätzen in regulatorische Systeme involviert sind. Neben ihrer pathogenetischen Bedeutung für die Osteoarthritis spielen sie auch bei der Entstehung vieler anderer Erkrankungen eine große Rolle.

Es ist bekannt, dass Mutationen bestimmter ADAMTS-Mitglieder zu genetisch bedingten Krankheiten führen.

Eine Mutation von ADAMTS-13 beispielsweise führt aufgrund einer fehlerhaften Prozessierung des Von Willebrand Faktors zur Thrombotisch Thrombozytopenischen Purpura, einer erblichen Blutgerinnungsstörung (98). Eine Mutation des ADAMTS-3-Gens verursacht eine Störung der posttranslationalen Kollagenprozessierung und damit eine fehlerhafte Anordnung der Fibrillen. Dies führt zur Dermatosparaxis, einer Erbkrankheit, bei der die Haut der Betroffenen sehr verletzlich und fragil ist (26). Nicht zuletzt setzen Krebsforscher einige Hoffnung in die Erforschung der ADAMTS-Familie. Durch eine Blockade des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-Rezeptors inhibiert ADAMTS-1 die endotheliale Zellproliferation und verursacht dadurch eine Suppression der Angiogenese- möglicherweise auch in Tumoren (65).

ADAMTS	SYNONYM	SUBSTRAT	VORKOMMEN/ PATHOLOGISCHE BEDEUTUNG
ADAMTS-1		Versikan, Brevikan, Aggrekan, VEGF-R	Angiogenese, Inflammation
ADAMTS-2	Prokollagen I/II-Propeptidase	Prokollagen I/II	Ehlers-Danlos-Syndrom, Dermatosparaxis
ADAMTS-3		Prokollagen I/II	Dermatosparaxis
ADAMTS-4	Aggrekanase-1	Aggrekan	Knorpeldegradation
ADAMTS-5	Aggrekanase-2 (=ADAMTS-11)	Aggrekan	Knorpeldegradation
ADAMTS-13	VWF cleaving Protease	Von Willebrand Faktor	Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura

Tabelle 1 zeigt die ADAMTS-Mitglieder mit bekannter Funktion

Neben ihrer Eigenschaft, Proteine zu spalten verbindet die verschiedenen ADAMTS-Mitglieder ihre große strukturelle Ähnlichkeit. Mit geringer Variation enthalten alle:

- **eine Pro-Domäne**

Diese Domäne am N-terminalen Ende des Proteins besteht aus etwa 220 -300 Aminosäuren. Sie ist reich an Cystein und wird nach der Sezernierung von einer Pro-Protein-Konvertase abgespalten. ADAMTS-Proteasen werden also als Zy-mogene synthetisiert

- **eine katalytische Domäne**

In dieser Region befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms. Hier erfolgt die katalytische Spaltung des jeweiligen Substrates. Durch die besondere Aminosäuresequenz in dieser Domäne können hier die für die Proteaseaktivität essentiellen Zinkionen gebunden werden.

- **eine Disintegrin-ähnliche Domäne**

Diese 60-90 Aminosäuren lange Domäne weist Ähnlichkeit zu Disintegrinen in Schlangengift auf. Ihre genaue Funktion ist unbekannt.

- **eine Thrombospondin-Domäne**

Diese Domäne ist bei allen ADAMTS-Mitgliedern fast identisch. Sie stellt den wichtigsten strukturellen Unterschied zu den ADAMs dar und spielt wahrscheinlich eine große Rolle in der Substraterkennung.

- **eine cysteinreiche Domäne**

Auch in dieser Domäne besteht eine große strukturelle Übereinstimmung zwischen den verschiedenen ADAMTS-Mitgliedern.

- **einen Spacer**

Er ist zwischen 127 und 221 Aminosäuren lang und weist die größte strukturelle Variabilität aller Domänen auf.

- **eine weitere Thrombospondin-Domäne**

- **eine C-terminale Domäne (4;62;91;100;104).**

Als Mitglieder der ADAMTS-Familie nehmen die beiden Aggrekanasen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Knorpeldegradation ein. Neben den MMPs sind sie die effektivsten bekannten knorpeldegradierenden Enzyme. Die Aggrekanasen spalten ihr spezifisches Substrat- das Aggrekan- an einer genau festgelegten Stelle. Die Spaltung erfolgt in der so genannten interglobulären Domäne (IGD) des Aggrekans. Das Core-Protein des Aggrekans besteht aus insgesamt 3 globulären Domänen. Die N-terminale Domäne G1 ist gemeinsam mit dem Link-Protein an der Bindung zwischen den über hundert einzelnen Aggrekanmonomeren und der zentralen Hyaluronsäure beteiligt. Etwas kürzer ist die in der Mitte des Aggrekans gelegene Domäne G2, und am C-terminalen Ende befindet sich die Domäne G3. Zwischen den Domänen G2 und G3 sind die zahlreichen Glykosaminoglykane, hauptsächlich Keratansulfat (KS) und Chondroitinsulfat (CS) gebunden. Sie verleihen dem Aggrekan seine hydrophilen Eigenschaften (41). In der IGD zwischen G1 und G2 befinden sich die beiden entscheidenden Schnittstellen für Aggrekanasen und MMPs (s. Abbildung 3). Wird das Aggrekan in der IGD gespalten, so bleibt nur die Domäne G1 an die zentrale Hyaluronsäure gebunden. Der Rest des Aggrekans und damit auch seine Wasserbindungskapazität geht verloren.

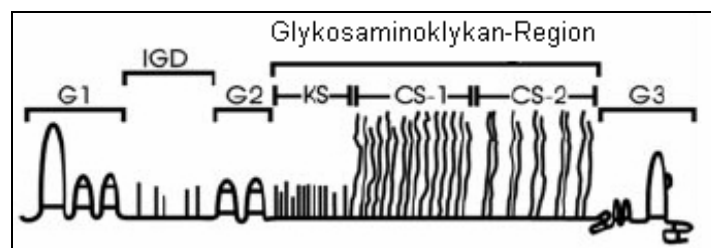


Abbildung 3: Domänenstruktur des Aggrekans modifiziert nach Fosang (29)

Die Schnittstelle der MMPs befindet sich an der Stelle $\text{Asn}^{341} \downarrow \text{Phe}^{342}$. Die Aggrekanasen spalten an der Stelle $\text{Glu}^{373} \downarrow \text{Ala}^{374}$. In geringem Maße spalten die Aggrekanasen auch an der MMP-Schnittstelle und umgekehrt (106). Die Schnittstelle der Aggrekanasen war schon bekannt, bevor die Aggrekanasen überhaupt entdeckt worden sind. Die Lokalisation der Schnittstellen wurde durch die Verwendung von Antikörpern gegen bestimmte Neopeptide ermöglicht (s. Abbildung 4). Dabei handelt es sich um die Enden der Aggrekanbruchstücke, die durch die enzymatische Spaltung entstehen. Je nach dem, an welcher Stelle die Spaltung erfolgt, haben diese Bruchstückenden eine unterschiedli-

che Sequenz und können von verschiedenen Antikörpern als Neoepitop erkannt werden. Nachdem man herausgefunden hatte, dass nur die $\text{Asn}^{341} \downarrow \text{Phe}^{342}$ Schnittstelle durch MMPs entsteht, bezeichnete man die $\text{Glu}^{373} \downarrow \text{Ala}^{374}$ Schnittstelle als Aggrekanasen-Schnittstelle, ohne die verantwortliche Protease zu kennen (46). Erst 1999 wurde zuerst die Aggrekanase-1 (94) und kurz darauf die Aggrekanase-2 (1) identifiziert. Inzwischen sind weitere Schnittstellen identifiziert worden, an denen Aggrekan durch Aggrekanasen gespalten wird. Sie befinden sich zwischen den Domänen G2 und G3, also in der Glykosaminoglykanregion, spielen aber wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle (96). Aggrekanasen werden in erster Linie von Chondrozyten (47) und Synovialfibroblasten (50) synthetisiert.

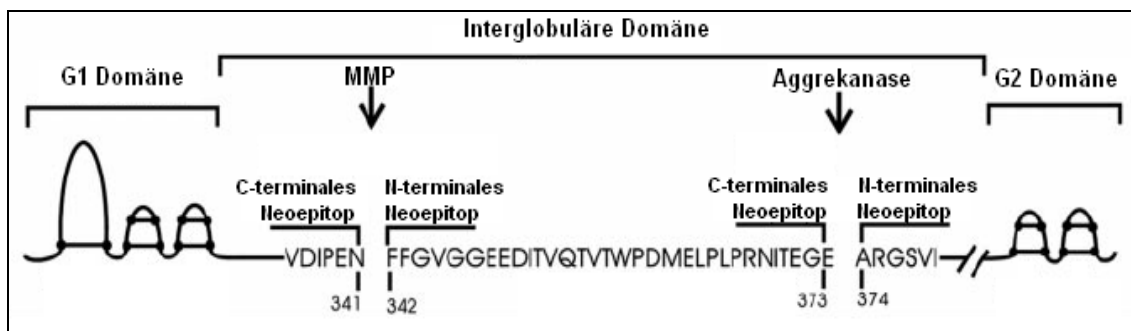


Abbildung 4: Die Interglobuläre Domäne modifiziert nach Fosang (29)

Das Wissen über die Regulation der Synthese und Sezernierung der Aggrekanasen ist noch lückenhaft. Insbesondere über die Beeinflussung der Aggrekanasensynthese in Synovialfibroblasten ist wenig bekannt. In Chondrozyten konnte eine Steigerung der Aggrekanasensynthese durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen nachgewiesen werden. Interleukin-1 und Onkostatin M steigern synergistisch die Synthese der Aggrekanase-1, während die Aggrekanase-2 unbeeinflusst bleibt (56). In Knorpelkulturen konnte auch gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von IL-1 und $\text{TNF-}\alpha$ ein erhöhter Aggrekanabbau durch Spaltung an der Aggrekanasenschnittstelle stattfindet (6). Der gleiche Effekt ist für IL-6 in Knorpelkulturen beschrieben (27). Weiterhin ist nachgewiesen, dass unter der Stimulation mit $\text{TGF-}\beta$ sowohl der Aggrekankatabolismus, als auch die Expression der Aggrekanase-1 in Chondrozyten aus arthrotischen Gelenken gesteigert wird. Die Synthese der Aggrekanase-2 dagegen wird durch $\text{TGF-}\beta$ nicht be-

einflusst (70). Auch bei den Synovialfibroblasten ist eine Beeinflussung der Aggrekanasensynthese durch TGF- β beschrieben. Ähnlich wie in Chondrozyten wird auch hier die Synthese der Aggrekanase-1 stimuliert, während die Aggrekanase-2 weitgehend unbeeinflusst bleibt. Außerdem ist die Stimulierbarkeit der Synovialfibroblasten durch TGF- β bei der rheumatoiden Arthritis deutlich größer als bei der Osteoarthritis (111). Genaue Erkenntnisse über eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der beiden Aggrekanasen untereinander oder zwischen Aggrekanasen und MMPs liegen gegenwärtig noch nicht vor. Ebenso wenig ist genau bekannt, welche Aggrekanase quantitativ die größte Rolle in der Degradation des Aggrekans spielt. Dies ist auch im Vergleich zwischen Aggrekanasen und MMPs nicht klar. Allerdings wurde in IL-1-stimulierten Knorpelkulturen festgestellt, dass die Aggrekandegradation zu 90 % auf Aggrekanasen und innerhalb der Aggrekanasenfamilie zu 75 % auf die Aggrekanase-1 zurückzuführen ist (95). Inwiefern diese Ergebnisse auch in vivo und unter physiologischen Stimulationsverhältnissen gelten ist unklar.

Letztlich bleibt festzuhalten, dass die Aggrekanasen genau wie die MMPs in ein komplexes und vielschichtiges regulatorisches System eingebettet sind, in dem insbesondere die Rolle der Synovialfibroblasten zu einem großen Teil noch ungeklärt ist. Es mehren sich Erkenntnisse, dass die Aktivität der Aggrekanasen nicht nur auf der Syntheseebene reguliert wird, sondern auch durch posttranslationale Inhibition. So konnte beispielsweise für TIMP-3 und $\alpha 2$ Makroglobulin ein inhibitorischer Effekt auf die Aktivität der Aggrekanasen nachgewiesen werden (93). Die TIMP-3 Expression wird in Chondrozyten und Synovialfibroblasten durch TGF- β und durch OSM hochreguliert (60;89). Die wenigen Erkenntnisse über die Regulation der Aggrekanasen, aber auch insgesamt über die Regulation der Knorpelhomöostase beschränken sich fast ausschließlich auf katabole Einflussfaktoren. So ist für zahlreiche Zytokine eine Steigerung der Synthese matrixdegradierender Proteasen beschrieben, während über die Beeinflussung anaboler Prozesse in der extrazellulären Knorpelmatrix nur wenig bekannt ist. Zytokine, die beispielsweise die Synthese und Aktivität matrixdegradierender Proteasen herunterregulieren, sind bisher kaum beschrieben. Ansätze, die in diese Richtung gehen, liefern Studien über bone morphogenetic proteins (BMPs).

1.7 Die bone morphogenetic proteins

Bone morphogenetic proteins sind multifunktionale Regulatoren des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose. Die BMPs, von denen inzwischen mehr als ein Dutzend Subtypen bekannt sind, werden strukturell der TGF- β -Familie zugerechnet. Zu ihnen gehört auch das cartilage derived morphogenetic protein-1 (CDMP-1, BMP-14). Ursprünglich wurden BMPs als Proteine identifiziert, die während des Wachstums eine zentrale Rolle in der Regulation der Osteo- und Chondrogenese (109), ebenso wie in der Differenzierung von Sehnen und Bändern (32;45;108) spielen. BMPs haben einen stimulierenden Einfluss auf die Knorpelbildung während des Wachstums. Dies belegen beispielsweise Studien an Mäusen, bei denen während der Embryogenese experimentell sowohl eine Überexpression, als auch eine Unterexpression verschiedener BMPs ausgelöst wurde. Während die Unterexpression zu einer deutlich verringerten Knorpelbildung führte, war eine massive Knorpelhypertrophie Folge der Überexpression (99). Es mehren sich Erkenntnisse, dass BMPs nicht nur während des Wachstums die Knorpel- und Knochenbildung stimulieren, sondern auch im adulten ausdifferenzierten Knorpel und Knochen anabole Effekte haben. So konnte beispielsweise in Studien an humanen Chondrozyten gezeigt werden, dass unter der Stimulation mit CDMP-1 die Synthese extrazellulärer Matrixproteoglykane angeregt wurde (12). Die gleiche Wirkung wurde unter dem Einfluss von BMP-2 und BMP-4 beobachtet (37;77). Weitere Studien, in denen auch in vivo ein beschleunigender Effekt von BMPs auf die Reparatur experimentell induzierter Knochen- und Knorpeldefekte belegt wurde, heben das anabole Potential dieser Proteine hervor (21;44;51).

Bereits heute werden aus diesem Grunde in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Münster BMPs intraoperativ wegen ihrer osteoinduktiven Eigenschaften zur Verbesserung der Frakturheilung appliziert.

BMPs werden von Chondrozyten, Synovialfibroblasten und Makrophagen synthetisiert. Über die Regulation ihrer Synthese und Aktivität, insbesondere in Synovialfibroblasten, liegen bisher kaum Veröffentlichungen vor.

1.8 Fragestellung

Die biochemischen Erklärungsmodelle zur Pathogenese der Osteoarthrose machen ein Ungleichgewicht der kartilaginären Matrixhomöostase zugunsten kataboler Prozesse für den beschleunigten Abbau der extrazellulären Knorpelmatrix verantwortlich. Entscheidend mitbeteiligt an der enzymatischen Degradation der Knorpelmatrix und damit wesentliche katabole Einflussgrößen sind die beiden Aggrekanasen.

Auf der anderen Seite wird verschiedenen Wachstumsfaktoren, den bone morphogenetic proteins, ein großes Potential zur Induktion anaboler Mechanismen im Knorpel zugeschrieben. Dies gilt besonders für BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 (BMP-14).

Noch lückenhaft ist das Wissen über die Synthesequellen der Aggrekanasen und insbesondere der Wachstumsfaktoren. Während sich die wissenschaftliche Literatur der letzten Jahre hauptsächlich mit der Erforschung der Chondrozyten beschäftigt, ist die Rolle der Synovialfibroblasten in diesem Zusammenhang vergleichsweise unklar. Daraus ergibt sich folgende Frage:

Werden die Aggrekanasen, BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 von Synovialfibroblasten von Arthrosepatienten exprimiert?

Unbestritten ist, dass zahlreiche anabole und katabole Mechanismen, welche für die Gestaltung der Knorpelhomöostase bedeutsam sind, dem regulativen Einfluss von Zytokinen unterliegen. So variieren Zytokine beispielsweise die Produktion matrixdegradierender Proteasen, ebenso wie die Kollagen- und Proteoglykansynthese. Die Erkenntnisse über die Regulation der Aggrekanasen in Synovialfibroblasten durch Zytokine sind noch unvollständig, über die Zytokinregulation der BMPs liegen kaum Veröffentlichungen vor. Daraus ergeben sich folgende Fragen:

Wird die Expression der Aggrekanasen und von BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 in Synovialfibroblasten durch Zytokine reguliert? Werden die Aggrekanasen als katabole Proteasen und die BMPs als anabole Wachstumsfaktoren möglicherweise unterschiedlich reguliert?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Probenmaterial

Als Probenmaterial wurde Synovialgewebe aus Kniegelenken von Osteoarthrosepatienten verwendet. Das Material wurde steril und frisch während der endoprothetischen Versorgung durch die orthopädische Abteilung des Universitätsklinikums Münster entnommen. Die fünf Patienten litten an Osteoarthrose des Schweregrades III bis IV*.

Patient	Alter (J)	Geschlecht	Arthrorestadium*
# 1	82	w	IV
# 2	63	m	IV
# 3	65	w	IV
# 4	65	m	IV
# 5	83	w	III

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der Patientendaten

*nach Kellgren und Lawrence (55)

2.2 Zellbiologische Grundlagen

Die auf den folgenden Seiten beschriebenen laboranalytischen Methoden wurden durchgeführt, um herauszufinden, wie eine Stimulation der Synovialfibroblasten durch unterschiedliche Zytokine die Genexpression verschiedener Proteine beeinflusst. Von besonderem Interesse war dabei die Expression der Aggrekanasen. Die durchgeführten Methoden basieren auf grundlegenden zellbiologischen Prozessen, auf welche daher zunächst kurz eingegangen wird.

In allen eukaryontischen Zellen, zu denen auch die Synovialfibroblasten gehören, läuft die Proteinbiosynthese nach einem festen Schema ab.

Der „Bauplan“ für die Proteine ist festgelegt in der DNA im Zellkern. Die Reihenfolge der Basen bestimmt die Reihenfolge der Aminosäuren und damit die Struktur des Proteins. Die entscheidenden Schritte von der Basensequenz zur Aminosäuresequenz sind die Transkription (Umschreibung) und die Translation (Übersetzung). Als Transkription bezeichnet man die Übertragung der genetischen Information der doppelsträngigen DNA auf die einzelsträngige m-RNA (messenger-RNA). Diese verlässt den Zellkern und gelangt zu den Ribosomen, wo die Translation stattfindet. Hier erfolgt die Übersetzung der Basensequenz der m-RNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Wird die Synthese eines bestimmten Proteins durch die Wirkung verschiedener Zytokine inhibierend oder stimulierend beeinflusst, so kann dies auf verschiedene Arten nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die zu untersuchenden Proteine direkt nachzuweisen und ihre Konzentration unter verschiedener Stimulation zu vergleichen. Es ist jedoch auch möglich, die Beeinflussung der Proteinbiosynthese indirekt durch einen Vergleich der m-RNA-Expression zu beurteilen. Wird die Synthese eines Proteins durch ein stimulierend wirkendes Zytokin gesteigert, so kann dies indirekt anhand des intrazellulären Gehaltes der korrespondierenden m-RNA bestimmt werden. Ein gesteigerter RNA-Gehalt resultiert entweder aus einer erhöhten Genexpression, oder aus einer höheren RNA-Stabilität. Für den Vergleich der m-RNA-Expression mussten mehrere Verfahrensschritte durchgeführt werden.

2.3 Isolation und Kultivierung der Synovialfibroblasten

Um die Synovialfibroblasten aus dem Gewebeverband herauszulösen, wurde das Synovialgewebe zerkleinert und in einer 0,5%igen Trypsin- und 0,2%igen EDTA-Lösung (PAA-Laboratories) enzymatisch für eine Stunde bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde das Gemisch aus Gewebe und Lösung durch 100 µm-Nylonsiebe filtriert, um verbliebene Gewebereste zu entfernen. Dann wurden die Synoviozyten für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert, was zur Bildung von Zellpellets führte. Nach Neutralisierung des Trypsins in 20 ml Kompletmedium und Resuspension der Zellen wurden diese erneut pelletiert.

Anschließend wurden die Zellen in DMEM/High Glukose-Medium gegeben, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS; Gibco-BRL), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin (P/S/A; Gibco-BRL) supplementiert war.

Die Zellen wurden zur Kultivierung auf 75 cm² Zellkulturflaschen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ausbildung einer adhärennten Monolayerschicht wurden die Zellen zur weiteren Expansion mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden gelöst, in Medium 1:6 verdünnt und erneut ausplattiert.

2.4 Stimulation der Synovialfibroblasten

Zunächst wurden die Synovialfibroblasten auf 24-Wellplatten (Lochplatten) verteilt. In jedes well wurden 500 µl des Zell-Medium-Gemisches in einer Konzentration von 10⁴ Zellen/ml gegeben. Es folgte eine Inkubation der Platten bei 37° C. Nach Erreichen einer etwa 70 %igen Konfluenz wurde das Medium erneuert; anschließend wurden die Zellen stimuliert. Die Stimulation erfolgte mit folgenden Zytokinen der Firma R&D Systems in einer Konzentration von jeweils 10 ng/ml: Interleukin-1α (IL-1α), Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), der Zytokinkombination IL-1β/ TNF-α, Transforming growth factor-β (TGF-β) und Onkostatin-M (OSM). Nach einer Inkubationszeit von genau 48 Stunden bei 37° C wurden die stimulierten Zellen „geerntet“ und zur weiteren Analyse vorbereitet. Es wurden jeweils vier wells mit einem Zytokin stimuliert.

2.5 Isolation der RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte durch Verwendung des RNeasy-Mini-Kits der Firma Qiagen. Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, dass unter Verwendung eines Säulensystems die RNA der zu untersuchenden Proben von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt wird. Dies gelang durch wiederholtes Waschen und Zentrifugieren der Säulen. Folgende Schritte wurden zur Isolation der RNA durchgeführt:

- Abnahme der Überstände und Waschen der Zellen mit 100 µl PBS pro well
- Lyse der Zellen durch Zugabe von 90 µl RLT-Lysepuffer pro well und Inkubation für 5 Minuten; anschließend Vereinigung von vier gleich stimulierten wells
- Zugabe von 350 µl Ethanol (70%) und Auftragen von 700 µl des Gemisches auf die Säule
- 15 Sekunden zentrifugieren bei 10000 rpm, anschließend Dekantieren der Flüssigkeit
- Auftragen von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule, erneutes Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 10000 rpm und Dekantieren der Flüssigkeit
- Auftragen von 500 µl RPE-Puffer, Zentrifugieren für 15 Sekunden bei 10000 rpm, Dekantieren der Flüssigkeit
- Wiederholung des letzten Schrittes, Zentrifugieren jedoch für zwei Minuten bei 14000 rpm
- RNA-Elution durch Auftragen von 30 µl DEPC-H₂O auf die Säulenmembran und erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 10000 rpm.

Nach der letzten Zentrifugation war die RNA isoliert und befand sich in den 30 µl DEPC-H₂O. Anschließend wurde sie sofort bei -80° C gelagert.

2.6 Die RT-PCR

Die isolierte Gesamt-RNA war bis zu diesem Zeitpunkt noch völlig unselektiert. Es ist also die vollständige RNA der Zelle isoliert worden. Dementsprechend machte die gesuchte m-RNA eines bestimmten Gens nur einen winzigen Bruchteil der isolierten RNA aus. Sie lag außerdem in Mengen vor, die so gering waren, dass eine quantitative Bestimmung nicht möglich war. Deshalb musste die gesuchte RNA zunächst identifiziert und dann so weit amplifiziert werden, dass sie quantitativ bestimmbar wurde. Dies gelang durch die PCR (polymerase chain reaction). Allerdings kann mit einer PCR keine einzelsträngige RNA, sondern lediglich doppelsträngige DNA vervielfältigt werden. Dieses Problem wurde gelöst, indem die RNA, mittels einer reversen Transkription in eine doppelsträngige cDNA umgeschrieben wurde. Bevor die PCR gestartet werden konnte, musste also aus der RNA eine cDNA (complementary DNA) synthetisiert werden. Die cDNA-Synthese erfolgte durch das Enzym Reverse Transkriptase, weshalb die Kombination aus cDNA-Synthese und anschließender PCR auch als RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) bezeichnet wird.

2.7 Die cDNA-Synthese

Die RNA wurde für 5 Minuten auf 70° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelegt. Dann wurden verschiedene Ingredienzien für die cDNA-Synthese hinzugefügt:

- 4 µl MMLV-RT (Reverse Transkriptase; Invitrogen)
- 16 µl RT-Puffer (5x; Invitrogen)
- 8 µl DTT (100 mM; Invitrogen)
- 4 µl Random Hexamere (100 pmol/µl; Promega)
- 4 µl dNTPs (80 mM; Invitrogen)
- 8 µl BSA (1mg/ml; Promega)
- 4 µl RNase-Inhibitor (Promega)
- 2 µl DEPC-H₂O.

Dieser 80 µl umfassende cDNA-Ansatz wurde anschließend für zwei Stunden bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Bei dieser Temperatur konnte die Reverse Transkriptase ihre enzymatische Aktivität am besten entfalten. Dabei formierte sie die freien Nukleotide (dNTPs) zu einem der RNA komplementären DNA-Strang.

Nach den zwei Stunden wurde die synthetisierte cDNA für 5 Minuten auf 95 ° C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelegt.

2.8 Die PCR

Mit der frisch synthetisierten cDNA war es nun möglich, die PCR durchzuführen. Dabei wurde die DNA exponentiell vervielfältigt. Durch die Verwendung spezifischer Primer, das sind kurze komplementäre Nukleotidsequenzen, wurde dabei nicht die vollständige cDNA vervielfältigt, sondern lediglich die cDNA-Fragmente, die von Interesse waren. In dieser Studie handelte es sich dabei um die Fragmente der beiden Aggrekanasen und einiger weiterer Proteine, von denen eine Regulation durch die verwendeten Zytokine angenommen wurde. Im Einzelnen handelte es sich um: Aggrekanase-1, Aggrekanase-2, BMP-2, BMP-4 und CDMP-1. Zur Kontrolle wurde die PCR auch mit GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) durchgeführt, einem Enzym des Citratzyklus, dessen Genexpression durch Zytokine nicht beeinflusst wird und daher unter allen Stimulationen unverändert bleibt. Die Amplifikationen wurden in folgenden Ansätzen durchgeführt:

- 4 µl cDNA
- 5 µl PCR-Puffer (10x; Promega)
- 5 µl MgCl₂ (25mM; Promega)
- 4 µl dNTPs (10mM; Promega)
- 2 µl Primer-Sense (100 ng/µl; Invitrogen)
- 2 µl Primer-Antisense (100 ng/µl; Invitrogen)
- 27,5 µl H₂O
- 0,5 µl Taq-Polymerase (Promega).

Die spezifischen Primer der untersuchten Expressionsprodukte haben folgende Basensequenzen:

Aggrekanase-1 Sense (5' → 3'):	ACC ACT TTG ACA CAG CCA TTC
Aggrekanase-1 Antisense (5' → 3'):	ACC CCC ACA GGT CCG AGA GCA
Aggrekanase-2 Sense (5' → 3'):	TGT GCT GTG ATT GAA GAC GAT
Aggrekanase-2 Antisense (5' → 3'):	GAC TGC AGG AGC GGT AGA TGG
BMP-2 Sense (5' → 3'):	ATG GAT TCG TGG TGG AAG TG
BMP-2 Antisense (5' → 3'):	GTG GAG TTC AGA TGA TCA GC
BMP-4 Sense (5' → 3'):	AGC ATG TCA GGA TTA GCC GA
BMP-4 Antisense (5' → 3'):	TGG AGA TGG CAC TCA GTT CA
CDMP-1 Sense (5' → 3'):	ATG AGA CTC CCC AAA CTC CTC AC
CDMP-1 Antisense (5' → 3'):	TGT CTG CCT GGT GCC TCC CT.

Die einzelnen Ansätze wurden in das PCR-Gerät (Biometra TRIO-Thermoblock) gegeben, das die optimalen Bedingungen für die exponentielle Vervielfältigung der cDNA schafft.

Im ersten Schritt wurden die Proben automatisch auf eine Temperatur von 94° C erhitzt. Bei dieser Temperatur erfolgte die Trennung der doppelsträngigen cDNA in zwei komplementäre Einzelstränge. Im zweiten Schritt wurden die Proben auf 60° C abgekühlt. Damit war die Annealing- (Anbindungs-) Temperatur erreicht. Damit ist gemeint, dass bei 60° C die Anbindung der Primer an die beiden Einzelstränge stattfand. Im letzten Schritt wurden die Proben wieder auf 72° C erwärmt. Bei dieser Temperatur entfaltete die Taq-Polymerase ihre optimale Wirkung. Sie verlängerte die Primer und komplettierte die Stränge durch Anlagerung der dNTPs. Damit hatte sich die DNA verdoppelt. Insgesamt wurden diese Schritte in 35 Zyklen wiederholt, wodurch die DNA um ein Vielfaches amplifiziert wurde. Abschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei einer Temperatur von 72° C belassen, um eventuelle Strangabbrüche vollständig aufzufüllen.

2.9 Die Gelelektrophorese

Die Auftrennung der in der PCR spezifisch amplifizierten Fragmente erfolgte elektrophoretisch über ein Agarosegel. Dazu wurde zunächst das 2%ige Agarosegel (Ultrapure Agarose; Gibco-BRL) in TAE-Puffer gegossen und mit 3 µl Ethidiumbromid versehen. Diese äußerst toxische Substanz interkalierte mit der DNA und machte sie unter UV-Licht sichtbar. Anschließend wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Loading-Puffer versehen, gründlich mit dem Vortex vermischt und auf das erhärtete Gel aufgetragen. Danach wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 70 Volt durchgeführt. Durch die PCR ist die DNA so stark amplifiziert worden, dass sie nun mittels UV-Licht nachgewiesen werden konnte. Das Ausmaß der Expression wurde mit einem speziellen Gerät (Gel Doc 1000; BioRad) fotografisch dokumentiert und ausgewertet.

2.10 Statistische Auswertung

Nach densitometrischer Quantifizierung der spezifischen Banden im Elektrophoresegel durch das Computerprogramm Multi Analyst erfolgte die statistische Analyse der Versuchsergebnisse. Dazu wurde der t-Test bei gepaarten Stichproben verwendet. Es folgte der Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Zytokinstimulationen mit den Mittelwerten der unstimulierten Kontrolle und die Prüfung auf signifikante Unterschiede. Bei diesem Test handelt es sich um einen parametrischen Zweistichprobentest für verbundene Stichproben.

3 Ergebnisse

Es ergaben sich durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen teilweise signifikante Auswirkungen auf das Expressionsverhalten der Synovialfibroblasten. Diese Auswirkungen werden hintereinander für die Syntheseprodukte Aggrekanase-1, Aggrekanase-2, BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 dargestellt. Veranschaulicht werden die Ergebnisse jeweils durch eine Abbildung der zugehörigen Gelelektrophorese, eine tabellarische Darstellung der densitometrischen Analyse, sowie eine graphische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Diagramms.

Auf den Abbildungen der Gelelektrophorese ist für jeden der fünf untersuchten Patienten das Resultat der Zytokinstimulation dargestellt. Neben einer unstimulierten Kontrolle wurden folgende Zytokine verwendet: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , die Zytokinkombination IL-1 β / TNF- α , TGF- β und OSM. Daraus ergeben sich für jedes Foto acht nebeneinander liegende Banden. Die Stärke der Banden repräsentiert den Expressionsstatus des untersuchten Gens. Sie verhält sich proportional zur Menge der spezifischen RNA, die sich nach 48-stündiger Zytokinstimulation in den Synovialfibroblasten befand. Sie zeigt also, wie sich die jeweilige Stimulation auf die Expression eines bestimmten Gens in den Zellen ausgewirkt hat: Ist die Bande bei einer bestimmten Zytokinstimulation stärker als die Bande in der unstimulierten Kontrolle, so wurde die Expression des Gens durch dieses Zytokin angeregt. Ist die Bande schwächer, wurde die Expression vermindert.

Bei jedem Patienten ist das Expressionsverhalten der GAPDH mit dargestellt, welches von den unterschiedlichen Zytokinen unbeeinflusst bleibt. Zur Objektivierung der Resultate wurden die Ergebnisse der Dichtemessung der jeweiligen Banden gegen die Dichtewerte der zugehörigen GAPDH-Banden normalisiert. Diese Werte dienten als Grundlage zur Bestimmung der Mittelwerte und der Standardabweichung aus den Einzelergebnissen der fünf Patienten. Anhand dieser Ergebnisse folgte anschließend die Prüfung auf Signifikanzen mit dem t-Test bei gepaarten Stichproben. Die DNA-Größenmarker am linken Rand jedes Bildes ermöglichen eine Abschätzung der Größe des jeweiligen PCR-Produktes, am rechten Bildrand ist die genaue Anzahl der Basenpaare angegeben

3.1 Aggrekanase-1

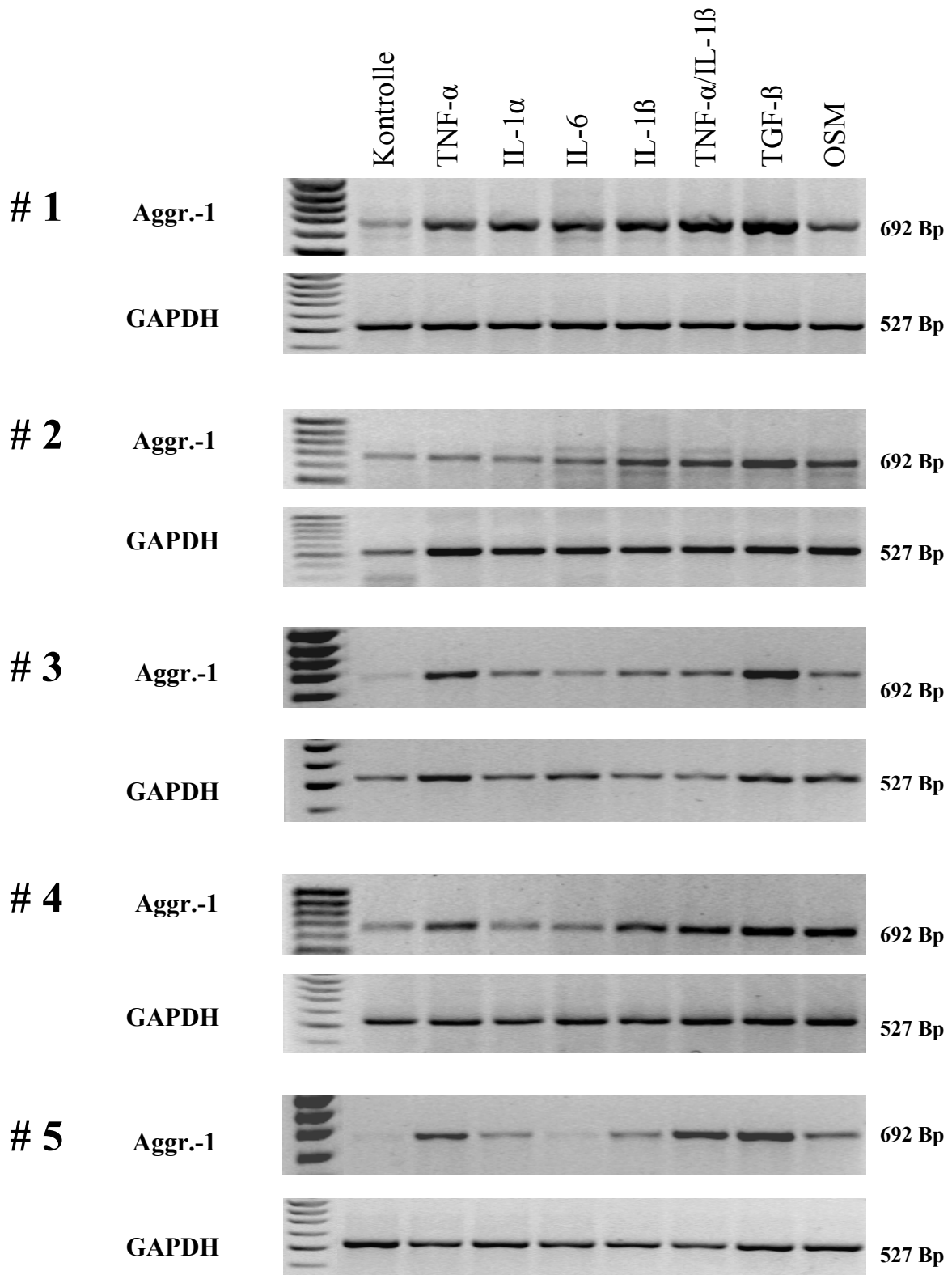


Abbildung 5: Gelelektrophorese der Aggrekanase-1-PCR

Die Expression des Aggrekanase-1 Gens zeigte unter verschiedenen Zytokinstimulationen signifikante Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

In den kultivierten Synovialfibroblasten wurde eine signifikante Steigerung der Expression des Aggrekanase-1-Gens durch die Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β , TGF- β , OSM und mit der Zytokinkombination TNF- α /IL-1 β hervorgerufen ($p < 0,05$, s. Abbildung 6). Die deutlichste Expressionssteigerung wurde dabei durch TGF- β ausgelöst. Bei allen fünf Patienten stimulierte TGF- β die Expression des Aggrekanase-1-Gens (s. Tabelle 3), wobei die Expression das 1,43-fache der unstimulierten Kontrolle betrug. Mit knapp dem 1,4-fachen Wert der Kontrolle erzielte auch die Zytokinkombination TNF- α /IL-1 β eine deutliche Expressionssteigerung. Keine signifikanten Effekte ergaben sich durch die Stimulation mit den Zytokinen TNF- α , IL-1 α und IL-6.

	Kontrolle	TNF- α	IL-1 α	IL-6	IL-1 β	IL-1 β / TNF- α	TGF- β	OSM
# 1	1	1,37	1,54	1,47	1,53	1,75	1,84	1,28
# 2	1	0,79	0,86	0,94	1,13	1,07	1,13	1,01
# 3	1	1,25	1,17	1,04	1,25	1,33	1,49	1,11
# 4	1	1,16	1,06	1,04	1,28	1,24	1,31	1,28
# 5	1	1,17	1,10	0,91	1,16	1,52	1,38	1,07

Tabelle 3: Zytokinvermittelte Regulation der Expression des Aggrekanase-1-Gens durch die fünf Zellkulturen. Die dargestellten Werte sind gegen GAPDH normalisiert. Die Expressionswerte der unstimulierten Kontrollen sind zur besseren Vergleichbarkeit = 1 gesetzt, die übrigen Werte geben die Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle an.

Interessant ist das Ergebnis der Stimulation mit TNF- α . Bei vier der fünf Patienten kam es zu einer deutlichen Expressionssteigerung des Aggrekanase-1-Gens, während bei Patient # 2 (s. Tabelle 3) eine leichte Senkung der Expression auftrat. Daraus ergab sich eine relativ breite Streuung der Ergebnisse und eine relativ große Standardabweichung des Mittelwertes (0,2). Diese Streuung ist dafür verantwortlich, dass die Stimulation mit TNF- α unter dem statistischen Signifikanzniveau blieb, während die Ergebnisse der OSM-Stimulation trotz eines identischen Mittelwertes signifikant waren.

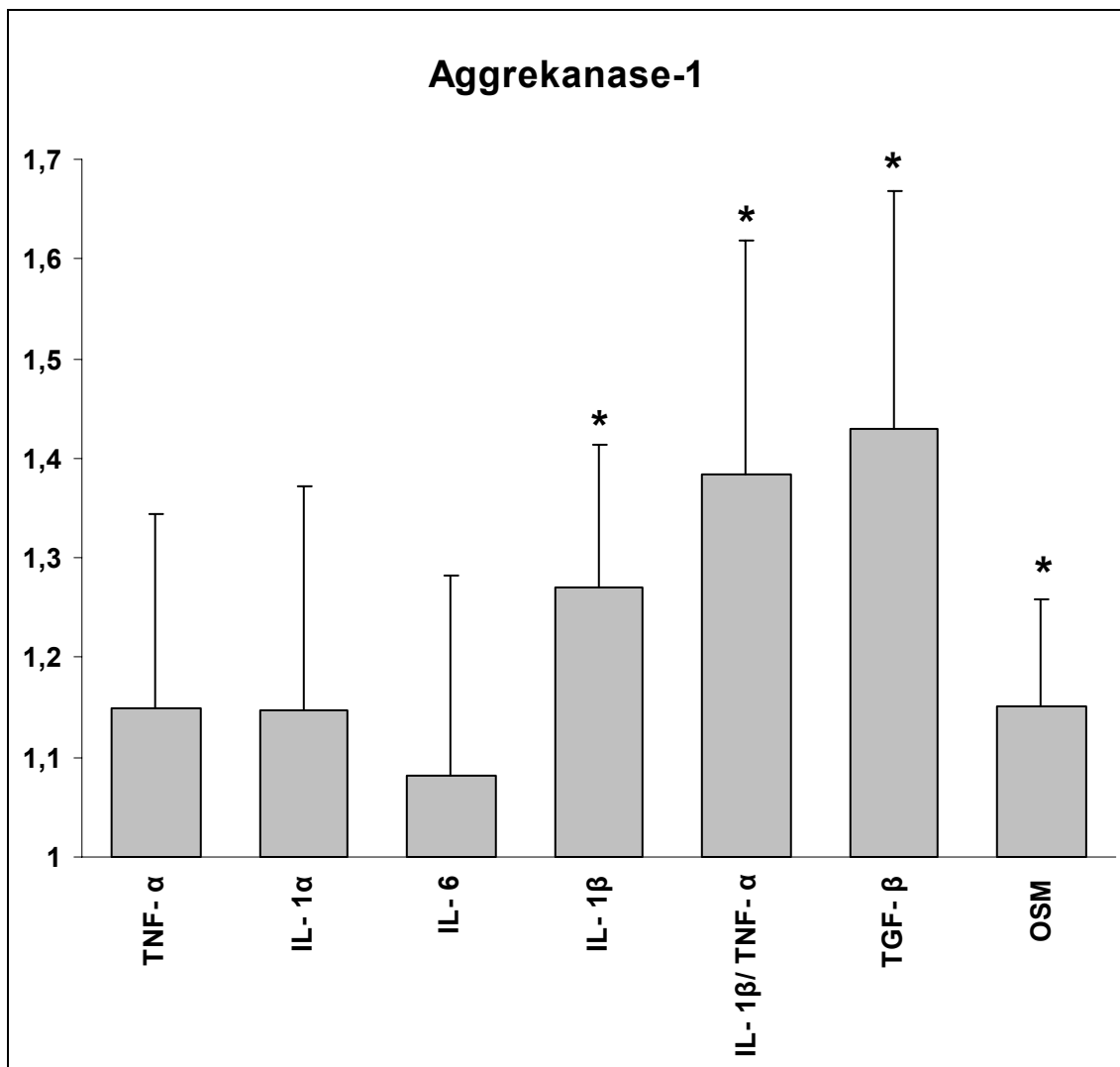


Abbildung 6: Zytokinstimulierte Expression des Aggrekanase-1-Gens durch Synovialfibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Bei den Mittelwerten handelt es sich um relative Expressionsunterschiede zur unstimulierten Kontrolle (Wert 1). * = signifikant ($p < 0,05$)

3.2 Aggrekanase-2

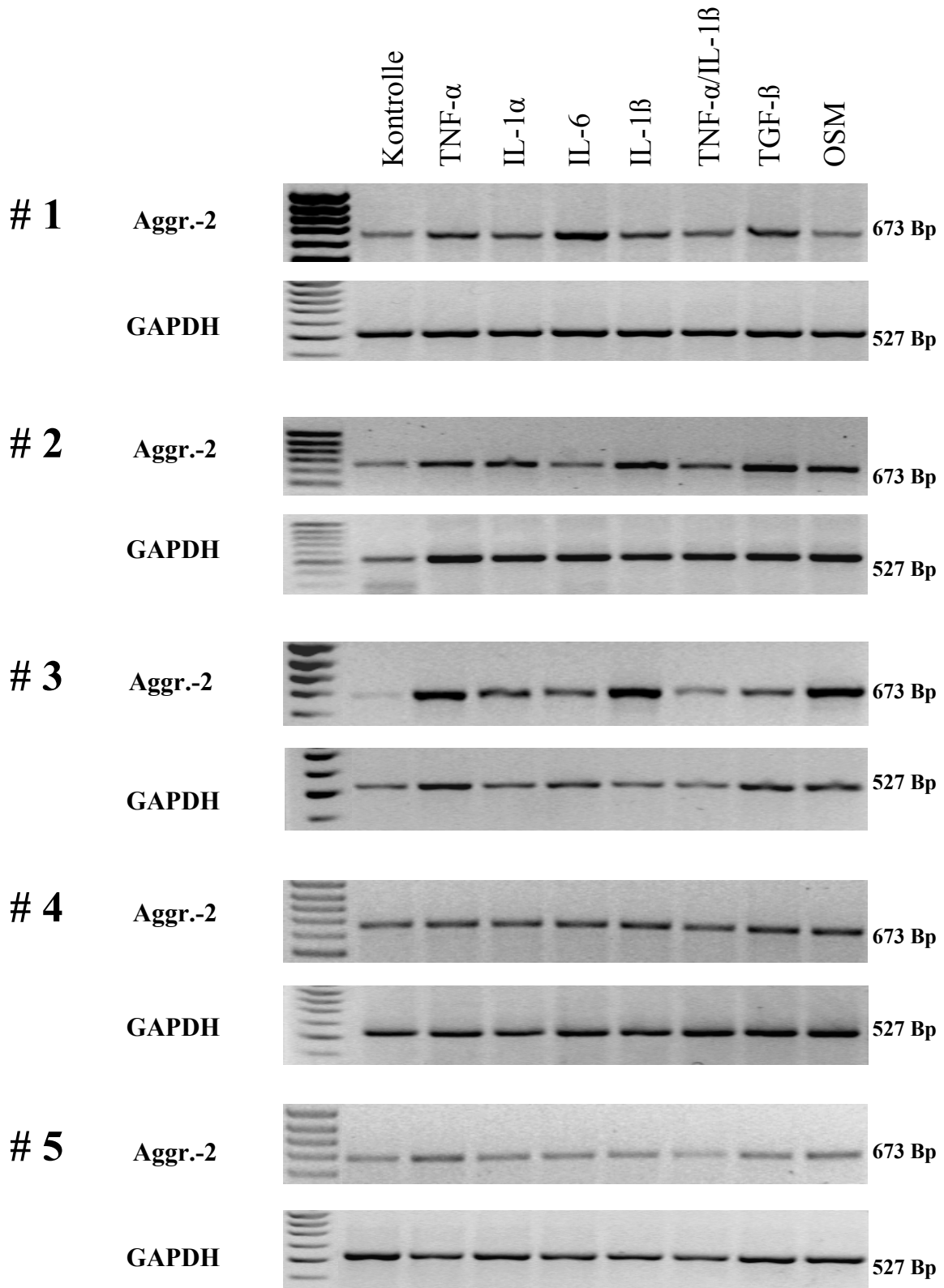


Abbildung 7: Gelelektrophorese der Aggrekanase-2-PCR

In den untersuchten Synovialfibroblasten zeigte die Expression des Aggrekanase-2-Gens ein einheitliches Bild, welches sich deutlich vom Ergebnis der Aggrekanase-1 unterschied. Keines der verwendeten Zytokine hatte einen statistisch signifikanten Effekt auf die Expression des Aggrekanase-2-Gens.

Den deutlichsten Effekt auf die Expression hatte mit einer gegenüber der Kontrolle 1,2-fachen Steigerung das Zytokin IL-1 β . Auffallend war jedoch, dass sich dieser Mittelwert aus sehr breit gestreuten Einzelwerten der fünf Patienten zusammensetzte. Dies drückte sich auch in der großen Standardabweichung der normalisierten Mittelwerte ($s=0,28$) und damit letztlich in einer fehlenden Signifikanz aus.

Bei Betrachtung der photographisch dokumentierten Ergebnisse der Gelelektrophorese (s. Abbildung 7) und der densitometrischen Messwerte (s. Tabelle 4) war die breite Streuung der Resultate ebenfalls erkennbar. Beim Vergleich der Bandenintensität der unstimulierten Kontrolle mit der IL-1 β -Bande fielen bereits mit bloßem Auge deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten auf. Bei Patient # 3 zeigte sich eine klare Intensitätszunahme der Bandenstärke infolge der Einzelstimulation mit IL-1 β und TNF- α .

	Kon- trolle	TNF- α	IL-1 α	IL-6	IL-1 β	IL-1 β / TNF- α	TGF- β	OSM
# 1	1	1,11	1,09	1,31	1,09	1,05	1,19	1,00
# 2	1	0,93	1,01	0,83	1,09	0,91	1,07	0,96
# 3	1	1,39	1,37	1,21	1,75	1,19	1,15	1,50
# 4	1	1,03	1,08	1,02	1,12	0,96	1,05	1,04
# 5	1	1,09	1,00	0,97	0,97	0,90	1,01	1,06

Tabelle 4: Zytokinvermittelte Regulation der Expression des Aggrekanase-2-Gens durch die fünf Zellkulturen. Die dargestellten Werte sind gegen GAPDH normalisiert. Die Expressionswerte der unstimulierten Kontrollen sind zur besseren Vergleichbarkeit = 1 gesetzt, die übrigen Werte geben die Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle an.

Ein ähnlicher Effekt konnte bei Patient # 2 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren bei den Patienten # 4 und # 5 kaum Auswirkungen der Stimulation zu erkennen.

Bei den Patienten # 2 und # 3 war ein weiterer bemerkenswerter Stimulationseffekt zu beobachten. Während die Einzelstimulation mit IL-1 β und TNF- α jeweils eine deutliche Intensitätszunahme der Bandenstärke bewirkte, hatte die gleichzeitige Stimulation mit beiden Zytokinen keinen Einfluss auf die Expression des Aggrekanase-2 Gens.

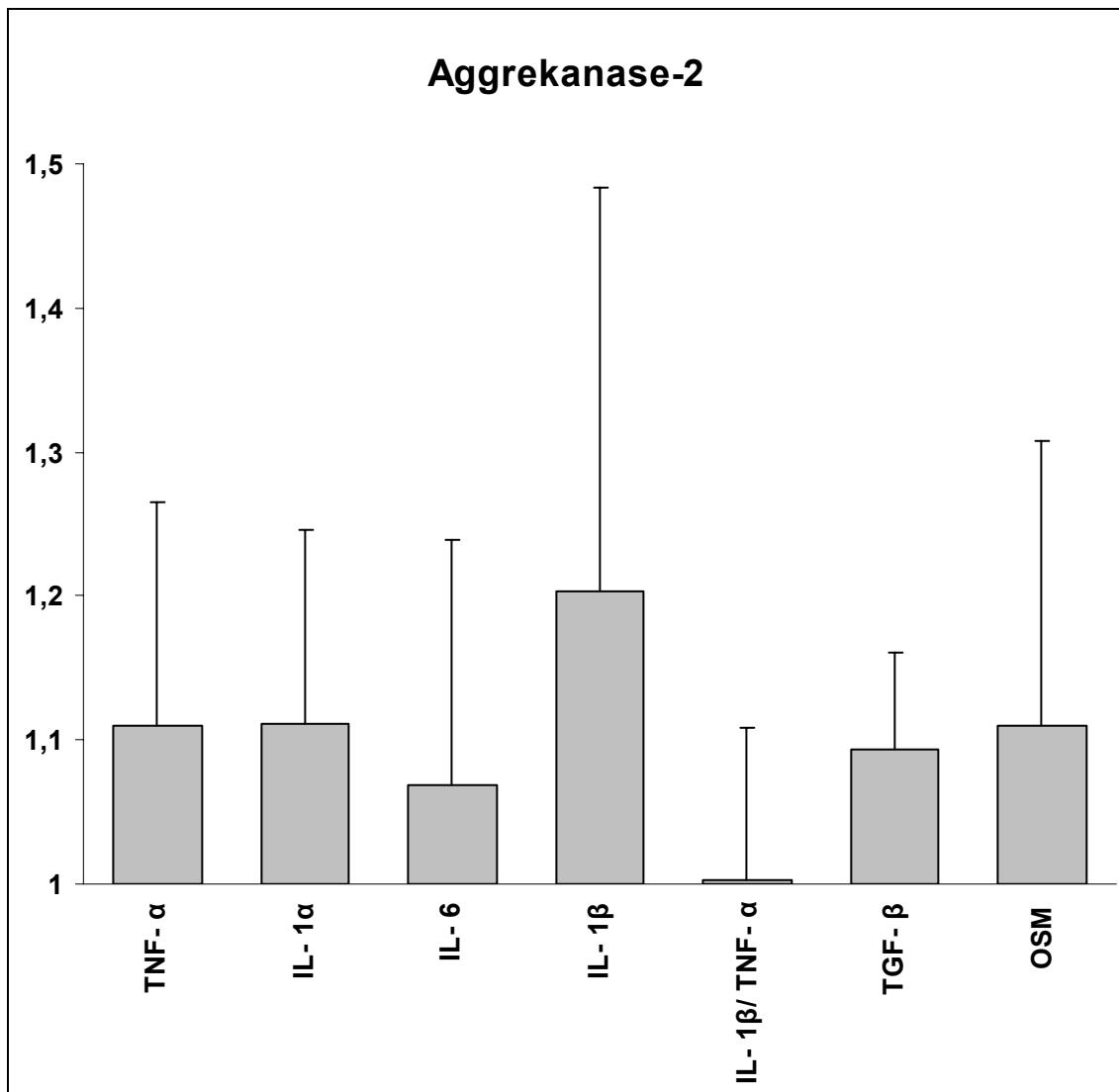


Abbildung 8: Zytokinstimulierte Expression des Aggrekanase-2-Gens durch Synovialfibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Bei den Mittelwerten handelt es sich um relative Expressionsunterschiede zur unstimulierten Kontrolle (Wert 1).

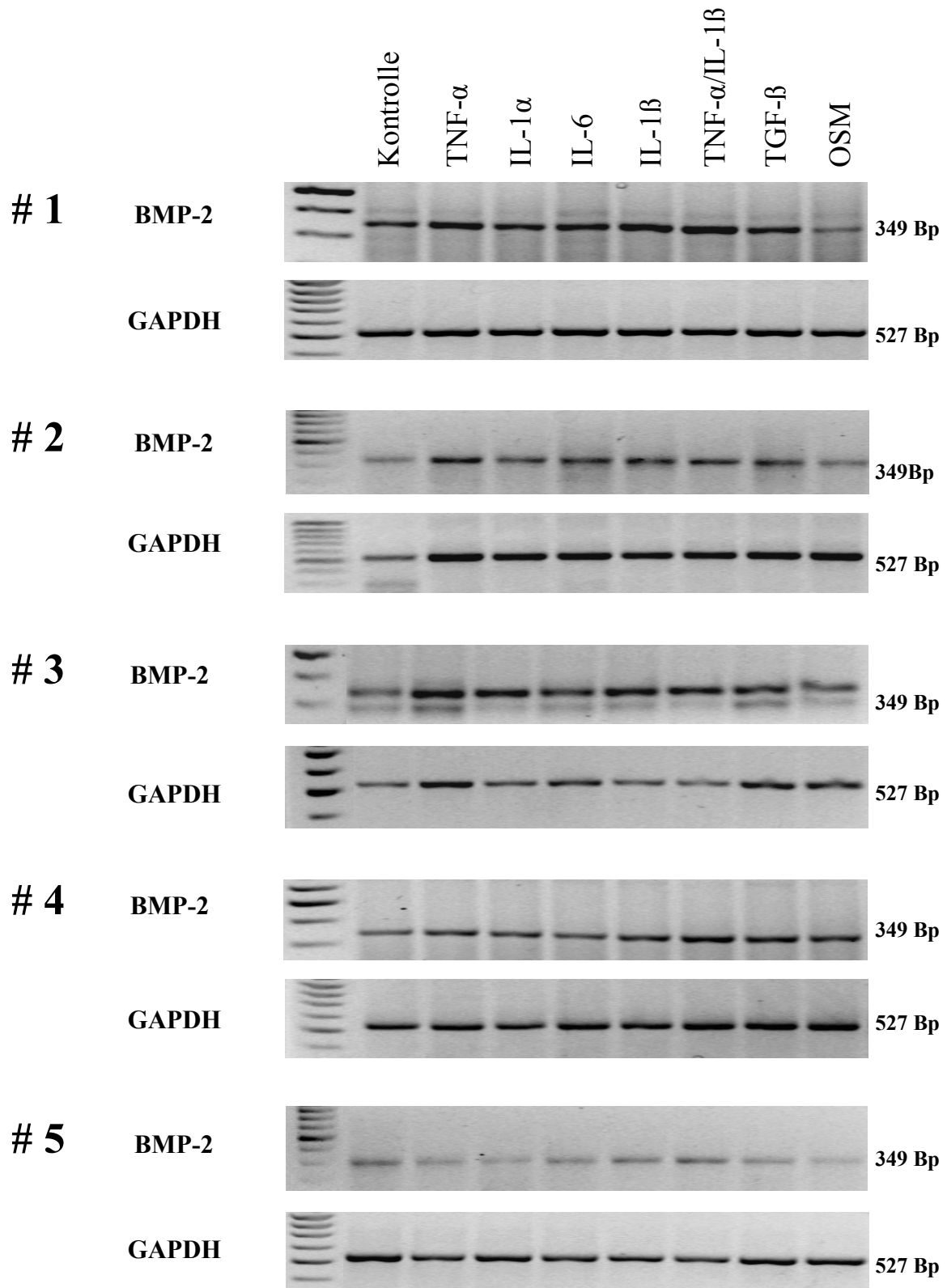
3.3 *BMP-2*

Abbildung 9: Gelelektrophorese der BMP-2-PCR

Infolge der Zytokinstimulation ergaben sich keine Auswirkungen auf die Expression des BMP-2-Gens in den untersuchten Synovialfibroblasten. Die statistische Analyse der Ergebnisse bestätigte, dass keine signifikanten Expressionsunterschiede durch die verwendeten Zytokine hervorgerufen wurden.

Bereits bei der Betrachtung der Elektrophoresegele (s. Abbildung 9) fiel auf, dass bei allen fünf Patienten die Bandenintensität unter den verschiedenen Zytokinen, ebenso wie im Vergleich zwischen Zytokinstimulationen und unstimulierter Kontrolle kaum Unterschiede aufwies. Der optische Eindruck eines deutlichen Stimulationseffektes bei Patient # 2, insbesondere unter der Stimulation mit TNF- α , wurde durch die Normalisierung gegen GAPDH relativiert.

Auch die densitometrische Analyse der Banden zeigte, dass die Auswirkungen der Stimulation gering waren. Keines der verwendeten Zytokine konnte bei allen Patienten einen einheitlichen Effekt auf die Expression hervorrufen. (s. Tabelle 5). Dementsprechend wiesen auch die Mittelwerte aus allen fünf Patienten nur geringe Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle auf (s. Abbildung 10).

	Kon- trolle	TNF-α	IL-1α	IL-6	IL-1β	IL-1β/ TNF-α	TGF-β	OSM
# 1	1	1,14	1,05	1,05	1,18	1,33	0,97	0,89
# 2	1	0,89	0,87	0,92	0,97	0,92	0,91	0,75
# 3	1	1,07	1,14	1,01	1,18	1,14	0,95	0,84
# 4	1	1,10	1,18	1,04	1,25	1,32	1,27	1,20
# 5	1	1,08	1,00	0,90	1,04	1,19	0,88	0,79

Tabelle 5: Zytokinvermittelte Regulation der Expression des BMP-2-Gens durch die fünf Zellkulturen. Die dargestellten Werte sind gegen GAPDH normalisiert. Die Expressionswerte der unstimulierten Kontrollen sind zur besseren Vergleichbarkeit = 1 gesetzt, die übrigen Werte geben die Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle an.

Die Mittelwerte, welche sich aus den Stimulationen mit TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und der Zytokinkombination TNF- α / IL-1 β ergaben, lagen knapp oberhalb des Ergebnisses der unstimulierten Kontrolle. Den deutlichsten Effekt hatte dabei die Zytokinkombination TNF- α / IL-1 β mit einer etwa 1,2-fachen Expressionssteigerung (s. Abbildung 10). Die Mittelwerte aus den Stimulationen mit IL-6, TGF- β und OSM lagen knapp unter der Kontrolle. Von ihnen wies die OSM-Stimulation mit einem knapp 0,9-fachen Wert der Kontrolle den deutlichsten Effekt auf. Das Signifikanzniveau wurde unter keiner der Stimulationen erreicht.

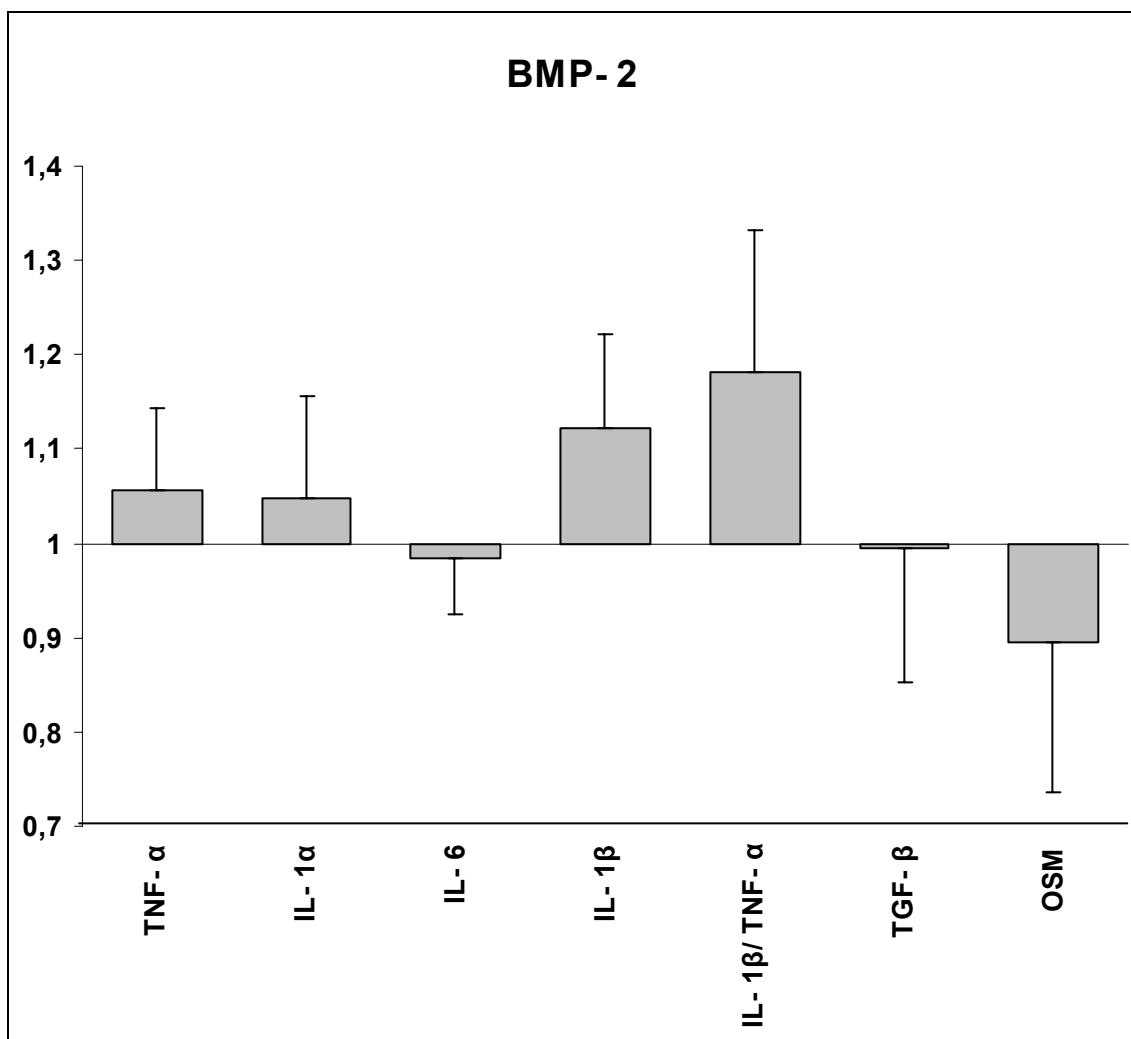


Abbildung 10: Zytokin-stimulierte Expression des BMP-2-Gens durch Synovial-fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Bei den Mittelwerten handelt es sich um relative Expressionsunterschiede zur unstimulierten Kontrolle (Wert 1).

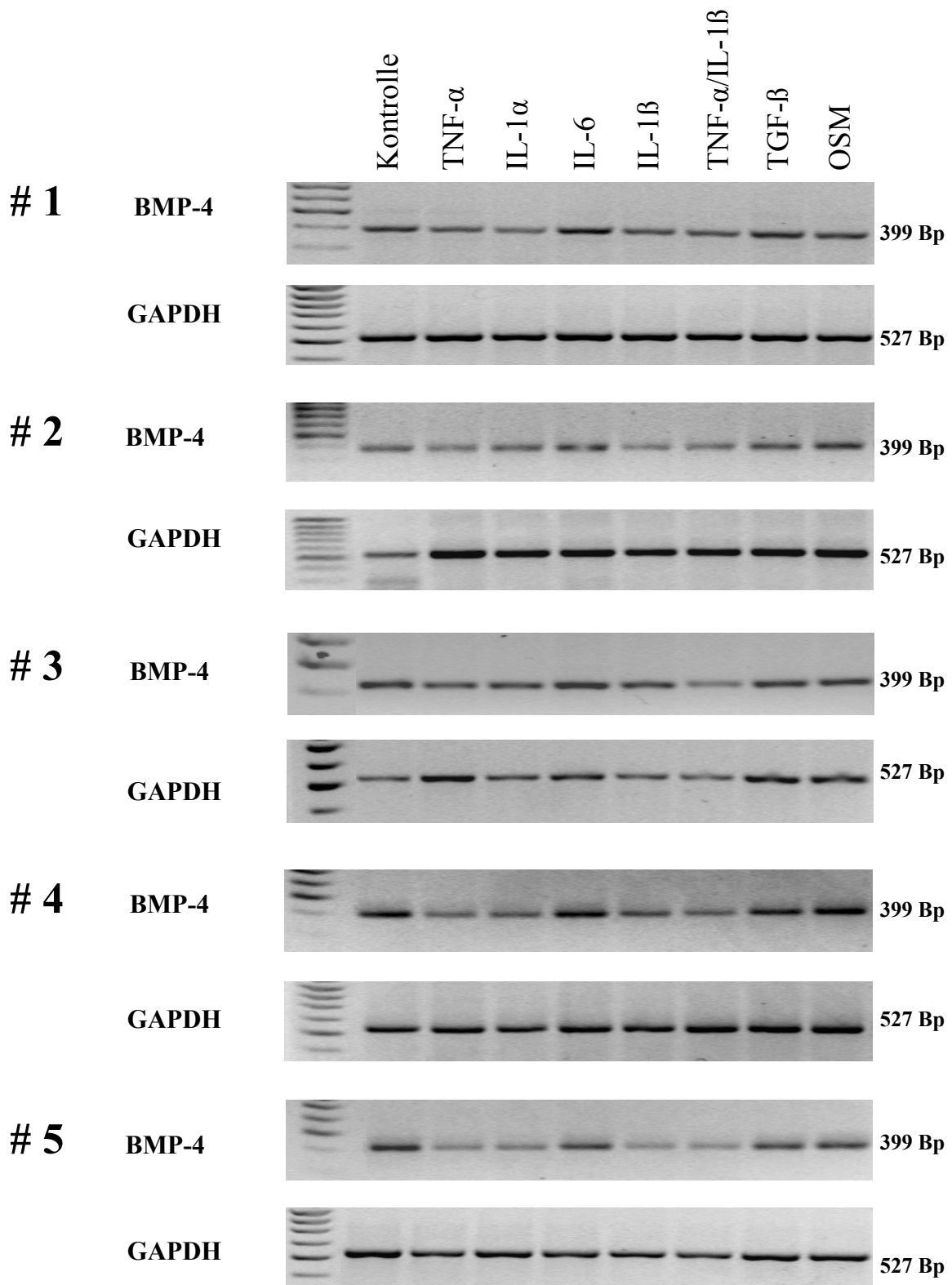
3.4 *BMP-4*

Abbildung 11: Gelelektrophorese der BMP-4-PCR

Im Gegensatz zum BMP-2-Gen zeigte die Stimulation der Synovialfibroblasten deutliche Effekte auf die Expression des BMP-4-Gens. Die Zytokine TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , sowie die Zytokinkombination IL-1 β / TNF- α bewirkten eine einheitliche Herunterregulation der Expression des BMP-4 Gens in den untersuchten Zellen. Unter der Stimulation mit IL-6, TGF- β und OSM konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der Genexpression beobachtet werden.

Ein einheitliches Expressionsmuster bei allen fünf Zelllinien konnte bereits bei Betrachtung der fotografisch dokumentierten Gelelektrophorese beobachtet werden (s. Abbildung 11). Während die Bandenintensität unter der Stimulation mit IL-6, TGF- β und OSM kaum von der Intensität der Kontrollbande zu unterscheiden war, erschienen die übrigen Banden deutlich schwächer. Die normalisierten Ergebnisse der densitometrischen Analyse bestätigten das visuelle Erscheinungsbild. Die Messwerte unter der Stimulation mit IL-6, TGF- β und OSM schwankten um den Wert der unstimulierten Kontrolle, während die Ergebnisse der übrigen Stimulationen bei allen Zelllinien teilweise weit darunter lagen (s. Tabelle 6). Entsprechend deutlich fiel die statistische Analyse der Mittelwerte aus den fünf Zelllinien aus.

	Kontrolle	TNF-α	IL-1α	IL-6	IL-1β	IL-1β/ TNF-α	TGF-β	OSM
# 1	1	0,84	0,80	1,01	0,87	0,89	1,03	0,99
# 2	1	0,65	0,79	0,83	0,74	0,73	0,78	0,82
# 3	1	0,77	0,93	1,04	0,97	0,99	0,97	1,02
# 4	1	0,80	0,90	0,97	0,91	0,80	0,92	1,01
# 5	1	0,78	0,79	0,93	0,77	0,74	0,93	0,97

Tabelle 6: Zytokinvermittelte Regulation der Expression des BMP-4-Gens durch die fünf Zellkulturen. Die dargestellten Werte sind gegen GAPDH normalisiert. Die Expressionswerte der unstimulierten Kontrollen sind zur besseren Vergleichbarkeit = 1 gesetzt, die übrigen Werte geben die Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle an.

Die Mittelwerte, welche sich aus der Stimulation mit den Zytokinen IL-1 β und der Zytokinkombination IL-1 β /TNF- α ergaben, lagen signifikant unter dem Mittelwert der Kontrolle ($p < 0,05$). Die supprimierenden Effekte der Zytokine TNF- α und IL-1 α auf die Expression des BMP-4-Gens in den Synovialfibroblasten waren sogar statistisch hoch signifikant ($p < 0,01$).

Der stärkste supprimierende Effekt auf die Expression des BMP-4-Gens konnte unter der Stimulation mit TNF- α beobachtet werden. TNF- α senkte die Genexpression verglichen mit der unstimulierten Kontrolle um knapp 25 % (s. Abbildung 12).

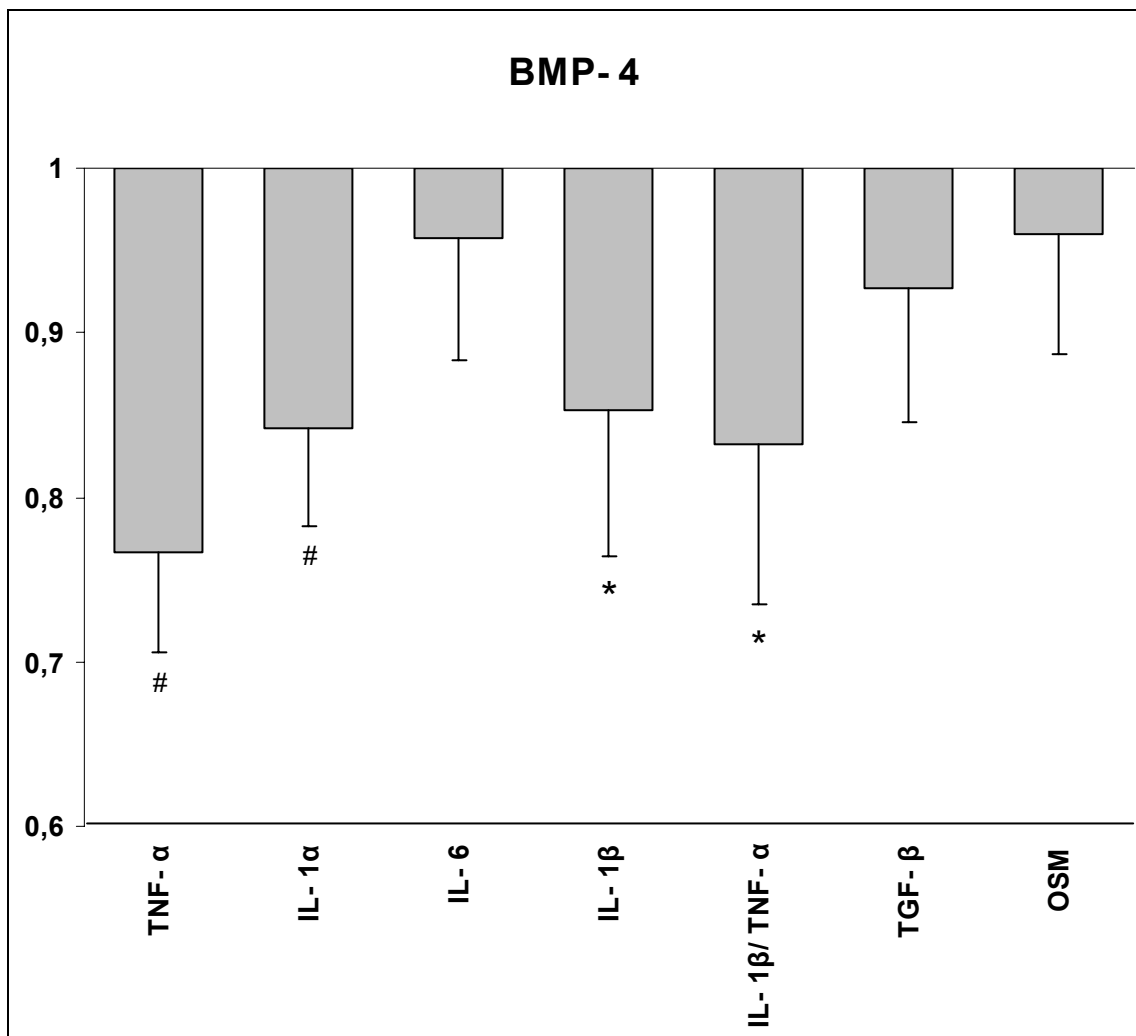


Abbildung 12: Zytokinstimulierte Expression des BMP-4-Gens durch Synovialfibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Bei den Mittelwerten handelt es sich um relative Expressionsunterschiede zur unstimulierten Kontrolle (Wert 1). * = signifikant ($p < 0,05$), # = signifikant ($p < 0,01$)

3.5 CDMP-1

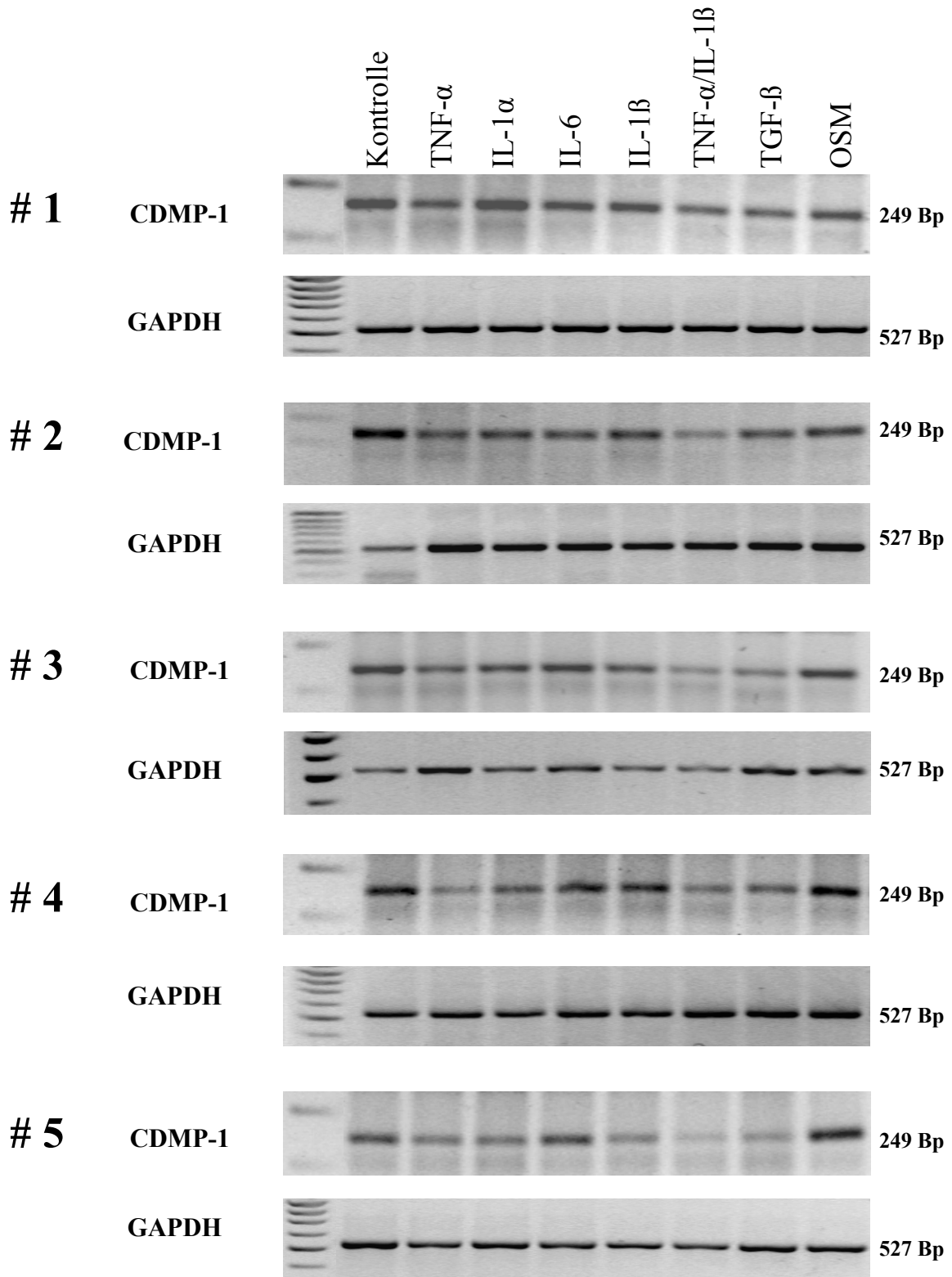


Abbildung 13: Gelelektrophorese der CDMP-1-PCR

Die Zytokinstimulation der Synovialfibroblasten hatte deutliche Auswirkungen auf die Expression des CDMP-1-Gens. Ähnlich wie bei BMP-4 konnte unter mehreren Stimulationen ein einheitlicher supprimierender Effekt auf die Genexpression beobachtet werden. Eine signifikante Suppression wurde durch die Zytokine TNF- α , IL-1 β , TGF- β , sowie durch die Zytokinkombination IL-1 β /TNF- α hervorgerufen. IL-1 α , IL-6 und OSM zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression. Dass die CDMP-1 Expression überwiegend herunterreguliert wurde, kam auch optisch besonders bei Betrachtung der Gelelektrophorese von Patient # 2 zur Geltung (s. Abbildung 13). Alle Stimulationsbanden waren teilweise deutlich schwächer als die der unstimulierten Kontrolle.

Die normalisierten Ergebnisse der densitometrischen Analyse zeigten ein einheitliches Bild. Bei allen fünf Patienten lagen sie unter nahezu jeder Stimulation unterhalb des Ergebnisses der unstimulierten Kontrolle (s. Tabelle 7). Eine signifikante Suppression der Expression des CDMP-1 Gens zeigte sich nach statistischer Analyse der Mittelwerte für IL-1 β ($p < 0,05$). Hoch signifikant waren die supprimierenden Effekte auf die Genexpression durch TNF- α , TGF- β und die Zytokinkombination IL-1 β /TNF- α ($p < 0,01$).

	Kontrolle	TNF- α	IL-1 α	IL-6	IL-1 β	IL-1 β / TNF- α	TGF- β	OSM
# 1	1	0,85	0,98	0,86	0,87	0,79	0,76	0,86
# 2	1	0,64	0,67	0,62	0,69	0,56	0,60	0,59
# 3	1	0,72	0,88	0,89	0,84	0,69	0,63	0,81
# 4	1	0,73	0,89	0,92	0,96	0,73	0,75	0,92
# 5	1	0,91	0,94	0,98	0,89	0,76	0,90	1,12

Tabelle 7: Zytokinvermittelte Regulation der Expression des CDMP-1-Gens durch die fünf Zellkulturen. Die dargestellten Werte sind gegen GAPDH normalisiert. Die Expressionswerte der unstimulierten Kontrollen sind zur besseren Vergleichbarkeit = 1 gesetzt, die übrigen Werte geben die Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle an.

Die stärkste Suppression der Genexpression wurde durch die Zytokinkombination IL-1 β /TNF- α hervorgerufen. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verminderte sie die Expression des CDMP-1-Gens um fast 30 % (s. Abbildung 14). Auch dies lässt sich schon bei der Betrachtung der Elektrophoresebilder vermuten. Bei allen fünf Patienten ist die Bande der Zytokinkombination die schwächste (s. Abbildung 13).

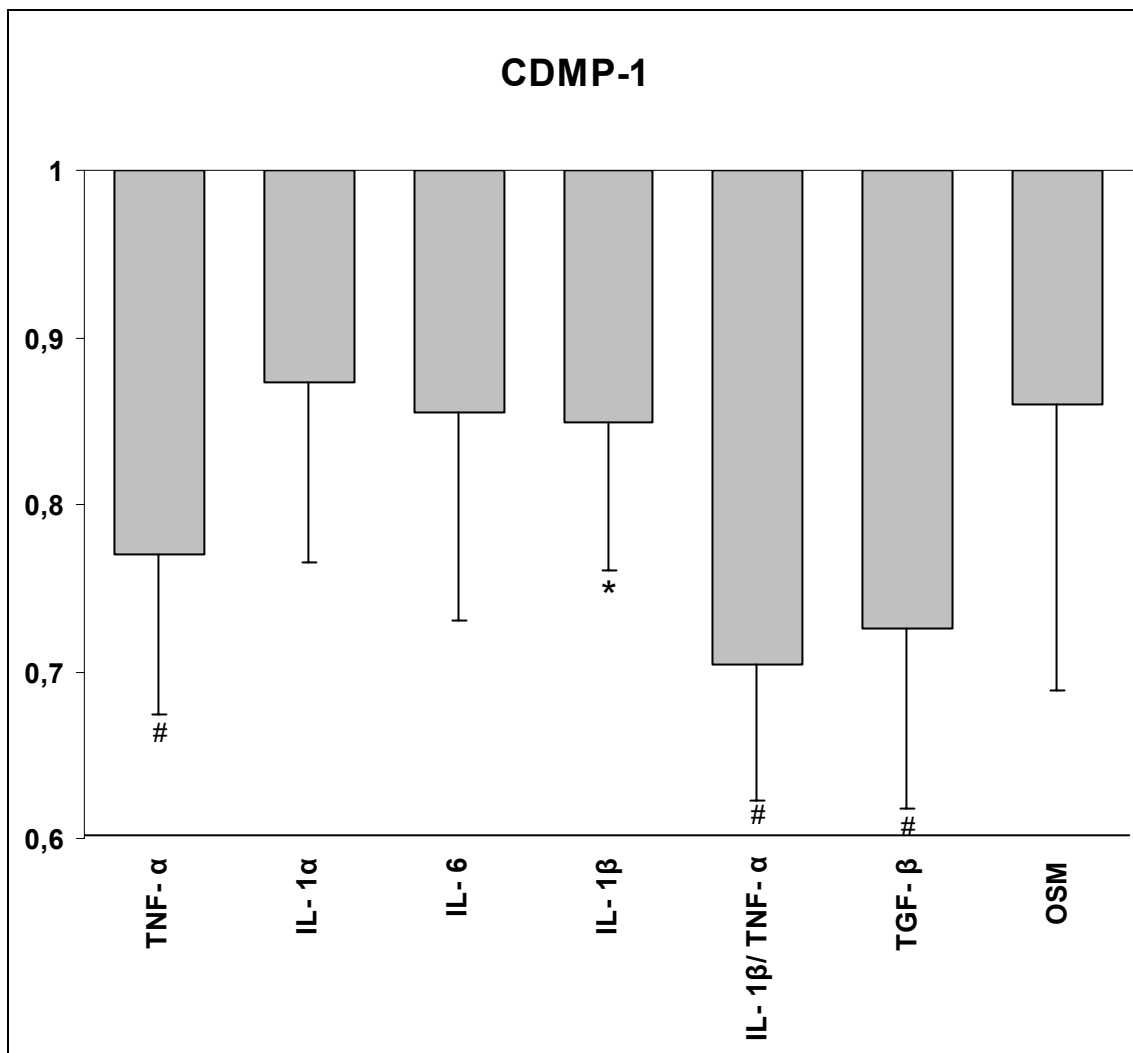


Abbildung 14: Zytokinstimulierte Expression des CDMP-1-Gens durch Synovialfibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Bei den Mittelwerten handelt es sich um relative Expressionsunterschiede zur unstimulierten Kontrolle (Wert 1). * = signifikant ($p < 0,05$), # = signifikant ($p < 0,01$)

4 Diskussion

Auf die Frage nach den Ursachen der Osteoarthritis bietet die wissenschaftliche Literatur noch keine eindeutige und vollständige Antwort. Sie liefert vielmehr verschiedene Erklärungsansätze, die sich in ihrer Gewichtung und Bedeutung in Laufe der letzten Jahrzehnte verändert haben.

Nach wie vor haben die klassischen Erklärungsmodelle zur Pathogenese der Arthritis, welche den Schwerpunkt auf biomechanische Faktoren legen, ihren unbestrittenen Stellenwert. Seit den 70er Jahren konzentriert sich der wissenschaftliche Fokus jedoch zunehmend auf die biochemischen und molekularbiologischen Prozesse im arthrotischen Gelenk. Diese Modelle stellen dabei weniger einen konkurrierenden Erklärungsansatz dar, der die klassischen Modelle widerlegt, sondern eher einen ergänzenden Ansatz, der die herkömmlichen Modelle vervollständigen soll.

Erste Veröffentlichungen die auf die Bedeutung proteolytischer Enzymaktivität für die Knorpeldegradation im Rahmen der Arthroseentstehung aufmerksam machten, entstammen den späten 70ern. Birkedal-Hansen beschrieb 1976 die Synthese einer Prokollagenase durch Synovialfibroblasten (11). Im gleichen Jahr veröffentlichte Sapolsky seine Ergebnisse über die proteoglykandegradierende Aktivität von Metalloproteinasen (86).

In den folgenden Jahren wuchs das Wissen über das molekularbiologische Zusammenspiel im Gelenk aufgrund intensiver Forschung und zahlreicher Publikationen mit rasantem Tempo an. Das Resultat dieser Entwicklung, die bis heute anhält und ihr Ende noch längst nicht erreicht hat, ist das Modell der kartilaginären Homöostase. Dieses Modell versteht die Integrität des Knorpels und insbesondere der extrazellulären Knorpelmatrix, als Ergebnis eines komplexen, dynamischen und vielschichtigen Systems anaboler und kataboler Einflussgrößen, welches die Struktur und Funktion des Knorpels über Jahrzehnte erhalten kann. Analog dazu wird der vermehrte Abbau extrazellulärer Matrix, wie er bei der Arthritis stattfindet, als Effekt eines pathologischen Ungleichgewichtes dieses Systems zugunsten der katabolen Faktoren verstanden. Auf der Erforschung dieser anabolen und katabolen Faktoren, ihrer Herkunft, ihrer Wirkung und ihrer Regulation liegt ein wesentlicher Schwerpunkt der Arthroseforschung der letzten 30 Jahre.

Große Fortschritte konnten auf dem Gebiet der Matrix-Metalloproteinasen verzeichnet werden. Zahlreiche Mitglieder dieser Enzymfamilie konnten in den letzten Jahren identifiziert und spezifiziert werden (74;76). Ihre tragende Rolle in der proteolytischen Degradation extrazellulärer Knorpelmatrix ist heute vielfach belegt (10;25;110). In der Pathogenese der Arthrose wird ihnen eine große Bedeutung beigemessen.

Die Regulation der MMPs findet auf mehreren Ebenen statt. Große Beiträge zu ihrer Erforschung leistete das Ehepaar Pelletier. Einerseits ist bekannt, dass die MMP-vermittelte Matrixdegradation dem Einfluss verschiedener Zytokine und Gewebshormone unterliegt. Diese modifizieren die MMP-Aktivität vornehmlich auf der Ebene ihrer Synthese. Insbesondere für die Zytokine IL-1 mit seinen Untergruppen und TNF- α konnte mehrfach ein stimulierender Effekt auf die Synthese und Aktivität verschiedener MMPs nachgewiesen werden (79;80).

Auf der anderen Seite wirken die tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) maßgeblich an der Regulation der MMPs mit. Sie entfalten ihre Wirkung als direkte Inhibitoren der MMPs nach ihrer Synthese und Sezernierung (20;67;72;107).

Seit der Entdeckung der Aggrekanase-1 (94) und Aggrekanase-2 (1) im Jahre 1999 kristallisiert sich zunehmend heraus, dass diese neben den MMPs eine wichtige Rolle bei der proteolytischen Degradation der Knorpelmatrix spielen und damit großen Anteil an der Gestaltung der kartilaginären Homöostase haben (5;28;48;61;75;85). Ähnlich wie die MMPs sind auch die Aggrekanasen eingebunden in ein komplexes regulierendes System stimulierender und inhibierender Mediatoren (6;70;93). Für mehrere Zytokine und Botenstoffe konnte ein Einfluss auf die Synthese und Aktivität der Aggrekanasen nachgewiesen werden. Ein Großteil der vorliegenden Erkenntnisse über die Regulation der Aggrekanasen wurde an Chondrozyten gewonnen. Noch lückenhaft ist dagegen das Wissen über die Bedeutung der Synovialfibroblasten in diesem Zusammenhang. Ziel dieser Arbeit war es, weitere Aufschlüsse über die Bedeutung der Synovialfibroblasten für die Pathogenese der Osteoarthrose zu gewinnen. Von Interesse war dabei, wie die Expression verschiedener kataboler und potentiell anaboler Syntheseprodukte in den Fibroblasten reguliert wird. Hierzu wurden Synovialfibroblasten von fünf Osteoarthrosepatienten zunächst kultiviert und mit verschiedenen Zytokinen stimuliert. Anschließend wurden mittels Reverse Transkriptase-PCR die Effekte der Stimulation auf die

Genexpression der Aggrekanase-1 (ADAMTS 4), Aggrekanase-2 (ADAMTS 5), des BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 bestimmt

Zur Stimulation der Synovialfibroblasten wurden folgende Zytokine verwendet: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , die Zytokinkombination IL-1 β / TNF- α , TGF- β und OSM. Diese Zytokine wurden gewählt, weil ihnen in zahlreichen Veröffentlichungen zentrale regulierende Eigenschaften in der Gestaltung der Matrixhomöostase nachgewiesen wurden. Bevor die erhobenen Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden, soll kurz darauf eingegangen werden, welche allgemeinen Aussagen und Schlussfolgerungen aufgrund der angewandten Versuchsmethoden zulässig sind. Die mittels PCR-Analyse erhobenen Ergebnisse zeigen den Expressionsstatus der untersuchten Gene an. Wird also beispielsweise unter einer bestimmten Zytokinstimulation die Expression des Aggrekanase-1-Gens gesteigert, so kann unter der Voraussetzung einer regelrecht ablaufenden Proteinbiosynthese darauf geschlossen werden, dass auch die Synthese der Aggrekanase-1 stimuliert wird. Eine sichere Aussage über die Synthese und insbesondere über die proteolytische Aktivität der Aggrekanase-1 kann jedoch nicht gemacht werden. Diese unterliegen möglicherweise weiteren regulierenden Mechanismen (posttranslationale Prozessierung, extrazelluläre Inhibition), welche durch die PCR nicht erfasst werden.

Bei der densitometrischen Analyse der PCR-Ergebnisse handelt es sich um ein semi-quantitatives Messverfahren. Das bedeutet, die intrazellulär vorliegende Menge an RNA wurde nicht direkt gemessen, sondern es wurden aus der Dichtemessung der PCR-Bandenstärke Rückschlüsse auf die RNA-Menge gezogen. Durch exakte und standardisierte Durchführung der Densitometrie wurde versucht, mögliche Abweichungen und Verzerrungen zu minimieren.

Die folgende Interpretation der Ergebnisse ist in zwei Abschnitte untergliedert. Im ersten Teil werden die Auswirkungen der Zytokinstimulation auf die Genexpression der beiden Aggrekanasen diskutiert, die Ihre Wirkung als matrixdegradierende Proteasen auf der katabolen Seite der kartilaginären Homöostase entfalten.

Der zweite Abschnitt befasst sich mit den Effekten der Zytokinstimulation auf die Genexpression von BMP-2, BMP-4 und CDMP-1. Diesen Proteinen wird ein großes Potential in der Aktivierung anaboler Prozesse bei der Mitgestaltung der Knorpelhomöostase zugeschrieben.

4.1 Aggrekanase-1 und Aggrekanase-2

Die Genexpression der Aggrekanase-1 wurde durch die Zytokine IL-1 β , TGF- β , OSM und durch die Zytokinkombination TNF- α /IL-1 β stimuliert. Den deutlichsten Effekt zeigte dabei die Stimulation mit TGF- β . Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Expression des Aggrekanase-1-Gens in Synovialfibroblasten überhaupt durch Zytokine reguliert wird, andererseits sind sie ein Indiz dafür, dass diesen Zytokinen als Informationsträgern eine wesentliche Rolle im Kontext der proteasenvermittelten Matrixdegradation zukommt. Außerdem wird durch diese Ergebnisse die Bedeutung der Synovialfibroblasten als regulierbare Synthesstätte der Aggrekanase-1 für die kartilaginäre Homöostase hervorgehoben. Im Wesentlichen stehen diese Ergebnisse im Einklang mit anderen, zu diesem Thema veröffentlichten Daten. Yamanishini konnte ebenfalls einen deutlichen stimulierenden Effekt von TGF- β auf die Expression des Aggrekanase-1-Gens in humanen Synovialfibroblasten von Arthrosepatienten nachweisen (111). In Chondrozytenkulturen konnte gezeigt werden, dass TGF- β sowohl eine Expressionssteigerung des Aggrekanase-1-Gens, als auch einen beschleunigten Aggrekanabbau durch die Aggrekanase-1 bewirkt (70). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Wirkung von TGF- β auf die Genexpression der Aggrekanase-1 nicht durch posttranslationale Regulationsmechanismen aufgehoben wird. Die Rolle des TGF- β in der Gestaltung der Knorpelhomöostase scheint jedoch komplexer zu sein. Neben den beschriebenen offensichtlichen katabolen Effekten sind es gerade die anabolen Eigenschaften des TGF- β , wegen derer es ursprünglich als „growth factor“ bezeichnet wurde. So konnte beispielsweise in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden, dass TGF- β einen inhibierenden Effekt auf die Degradation der extrazellulären Knorpelmatrix und sogar eine beschleunigende Wirkung auf ihre Reparatur hat (39). Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Widerspruch liegt in der Existenz verschiedener TGF- β - und TGF- β -Rezeptor-Subtypen, deren unterschiedliche Funktion und Lokalisation im Einzelnen noch nicht aufgeklärt sind (73).

Neben TGF- β konnte auch IL-1 β die Genexpression der Aggrekanase-1 signifikant steigern. Damit bestätigt sich das in der Literatur vielfach beschriebene Potential dieses proinflammatorischen Zytokins zur Induktion der proteasenvermittelten Matrixdegradation auch in Synovialfibroblasten. Eine vergleichbare Rolle wird in zahlreichen Publika-

tionen dem TNF- α zugeschrieben (6;13;78;82). In Chondrozytenkulturen konnte bereits mehrfach eine stimulierende Wirkung von IL-1 β und TNF- α auf die Genexpression der Aggrecanase-1 und auf den Aggrecanase-1-vermittelten Proteoglykanabbau nachgewiesen werden (5;75). Die für TGF- β beschriebenen Effekte auf die Genexpression der Aggrecanase-1 zeigte Yamanishini in seiner Studie an Synovialfibroblasten von Arthrosepatischen in geringerer Ausprägung auch für IL-1 β und TNF- α (111). Dies kann nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie jedoch nur für IL-1 β bestätigt werden. TNF- α allein hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression des Aggrecanase-1-Gens. Auffallend ist jedoch, dass die Auswirkungen der TNF- α -Stimulation auf die Genexpression der Aggrecanase-1 eine interindividuelle Schwankung zwischen den fünf untersuchten Patienten aufwies. Während vier Patienten einen deutlichen Stimulationseffekt durch TNF- α zeigten, kam es bei einem sogar zu einer Expressionssenkung. Scheinbar weist die Ansprechbarkeit der Synovialfibroblasten auf TNF- α eine interindividuelle Variabilität auf. Einen anschaulichen Erklärungsansatz für diese Beobachtung bietet Westacott, der in seinen Untersuchungen an humanen Knorpelzellen Unterschiede in der Verteilung und Dichte von TNF- α -Rezeptoren auf der Chondrozytenoberfläche feststellte (105). Unklar ist allerdings, ob diese Unterschiede in der Rezeptorverteilung im Sinne einer genetischen Disposition angeboren sind, oder ob sie im Rahmen eines Adaptionsvorgangs der Chondrozyten an die pathobiochemischen Veränderungen im arthrotischen Gelenk erworben sind.

Eine signifikante Stimulation der Aggrecanase-1-Genexpression konnte TNF- α in Kombination mit IL-1 β auslösen. Dabei war der Stimulationseffekt der Zytokinkombination größer als die jeweilige Einzelwirkung der beiden Zytokine. Es ist also davon auszugehen, dass TNF- α und IL-1 β einen synergistischen Effekt auf die Genexpression der Aggrecanase-1 in den Synovialfibroblasten haben. Dieser kann darauf beruhen, dass beide Zytokine unabhängig voneinander wirken und die Wirkung der Kombination eine Summe der beiden Einzelwirkungen darstellt. Es ist jedoch auch denkbar, dass die beiden Zytokine sich gegenseitig stimulierend beeinflussen. Diese Theorie wird unterstützt durch eine tierexperimentelle in vivo-Studie aus Japan. Anhand einer Untersuchung an Kaninchensynovia konnte festgestellt werden, dass TNF- α einen stimulierenden Effekt auf die endogene IL-1 β -Produktion hatte (69).

Letztlich führte auch die Stimulation der Synovialfibroblasten mit OSM zu einer signifikanten Steigerung der Aggrekanase-1-Genexpression. Die wenigen bisher publizierten Ergebnisse über die Rolle von OSM bei der Arthroseentstehung können durch diese Studie bestätigt und ergänzt werden. In Chondrozytenkulturen wurde belegt, dass OSM besonders in Kostimulation mit TNF- α eine Steigerung der MMP-Synthese und eine Beschleunigung der enzymatischen Matrixdegradation induzierte (49). Damit bekräftigen die vorliegenden Ergebnisse die These, dass auch OSM die Synthese matrixdegradierender Proteasen in Synovialfibroblasten induzieren kann und somit eine bedeutende Einflussgröße auf der katabolen Seite der kartilaginären Matrixhomöostase darstellt.

Im Gegensatz zur Aggrekanase-1 hatte die Zytokinstimulation keine Auswirkungen auf die Expression des Aggrekanase-2-Gens. Keines der verwendeten Zytokine konnte in den Synovialfibroblasten die Genexpression der Aggrekanase-2 signifikant beeinflussen. Damit bestätigen diese Ergebnisse die überwiegende Mehrheit der bisher über die Regulation der Aggrekanase-2 publizierten Daten. In seiner bereits beschriebenen Studie an menschlichen Synovialfibroblasten kam auch Yamanishini zu der Schlussfolgerung, dass TGF- β , TNF- α und IL-1 β weder auf die Expression des Aggrekanase-2-Gens, noch auf die intrazelluläre Proteinkonzentration einen Einfluss hatten (111). Ähnliche Beobachtungen machte Vankemmelbeke, der ebenfalls an menschlichen Synovialfibroblasten die Stimulationswirkung von IL-1 α und Retinolsäure untersuchte und keine Auswirkungen auf die Genexpression der Aggrekanase-2 feststellen konnte (102). Mit den entsprechenden Ergebnissen über die Wirkung von OSM und die Zytokinkombination TNF- α /IL-1 β können ihre Resultate durch die vorliegende Studie bestätigt und ergänzt werden.

Durch zahlreiche weitere Studien, welche ähnliche Ergebnisse auch an Chondrozyten feststellen konnten, wird die Hypothese untermauert, dass die Expression der Aggrekanase-2 weder in Chondrozyten, noch in Synovialfibroblasten durch jene Zytokine reguliert wird, welche als Induzenten der Expression und Synthese anderer Proteasen, wie beispielsweise der MMPs oder der Aggrekanase-1 bekannt sind (75;95). Diese Ergebnisse sollten jedoch nicht dazu verleiten, die Bedeutung der Aggrekanase-2 als potente matrixdegradierende Protease für die Knorpelhomöostase abzuwerten. So konnte beispielsweise eine Arbeitsgruppe aus Erlangen anhand ihrer Forschungsergebnisse an menschlichen Chondrozyten bestätigen, dass die Genexpression der Aggrekanase-2

nicht reguliert wird. Gleichzeitig wiesen sie jedoch darauf hin, dass die konstitutive, unstimulierte Genexpression der Aggrekanase-2 deutlich größer war als die der Aggrekanase-1 (9). Diese Ergebnisse könnten auf eine unterschiedliche Rollenverteilung der beiden Aggrekanasen in der Gestaltung der Matrixhomöostase hinweisen. Es wäre zum Beispiel denkbar, dass die Aggrekanase-2 mit ihrer höheren kontinuierlichen basalen Expression, vergleichbar mit einem „Dauerläufer“, eher an der stetigen Aufrechterhaltung des kartilaginären Grundumsatzes beteiligt ist. Dafür ist aber ihre Expression und Aktivität weniger flexibel und nur begrenzt in der Lage, auf wechselnde Bedingungen im Knorpelmilieu, wie z.B. unterschiedliche Zytokinwirkungen, zu reagieren. Analog dazu hätte die Aggrekanase-1 die Rolle eines „Sprinters“. Sie ist mit ihrer geringeren konstitutiven Basisaktivität weniger an der Erhaltung des Grundumsatzes beteiligt, ihre Aktivität kann jedoch wegen ihrer variableren Expression besser an wechselnde Bedingungen angepasst werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Bedeutung der Synovialfibroblasten für die Pathogenese der Osteoarthritis als Produzenten der Aggrekanasen hervorheben. Es konnte gezeigt werden, dass beide Aggrekanasen von Synovialfibroblasten exprimiert werden. Insbesondere das Expressionsverhalten der Aggrekanase-1 lässt sich gut auf das anakatabole Modell der kartilaginären Homöostase übertragen. Genau die Zytokine, deren katabole Einflüsse auf die Matrixhomöostase vielfach belegt sind, stimulieren auch die Expression der Aggrekanase-1. Letztlich muss jedoch festgehalten werden, dass die Beeinflussung der Genexpression der Aggrekanasen durch Zytokine nur einen Bruchteil der Mechanismen darstellt, welche die Aktivität dieser Proteasen regulieren. Es existieren zahlreiche weitere regulierende Systeme, welche im Einzelnen und vor allem in ihrem Zusammenwirken weiterer Erforschung bedürfen.

Die herausragende Bedeutung dieser Regulationsmechanismen und der verschiedenen Möglichkeiten, sie zu beeinflussen, liegt darin, dass sie möglicherweise zukünftig Ziel einer kausalthérapeutischen Behandlung der Osteoarthritis sein könnten. Betrachtet man die heutigen Therapiekonzepte der Arthritis, welche in vielen Fällen auf einen endoprothetischen Gelenkersatz hinauslaufen, wären die medizinischen und sozioökonomischen Konsequenzen einer kausalen Therapie enorm. Einige Veröffentlichungen geben diesbezüglich Anlass zur Hoffnung:

Die Erforschung der Zytokinrezeptoren und ihrer spezifischen Antagonisten bietet einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt, über den beispielsweise die Einflüsse kataboler Zytokine auf die Matrixhomöostase abgefangen werden können. So konnte an menschlichen Chondrozytenkulturen gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Antikörpern gegen IL-1- und TGF- β -Rezeptoren die Aktivität matrixdegradierender Proteasen abgeschwächt und die Kollagensynthese angeregt wurde (3;87).

Einen weiteren Angriffspunkt für therapeutische Intervention könnte die posttranslationale Prozessierung verschiedener matrixdegradierender Proteasen darstellen. Es ist bekannt, dass die Aggrekanasen zunächst als inaktive Proenzyme synthetisiert werden und erst durch die Abspaltung bestimmter Proteindomänen in ihre proteolytisch aktive Form überführt werden. Eine Inhibition dieser Aktivierung könnte einen protektiven Effekt für die Matrixproteoglykane darstellen (104).

Nicht zuletzt unterliegt auch die proteolytische Aktivität bereits synthetisierter und sezernierter Aggrekanasen verschiedenen regulierenden Einflüssen. Mit dem TIMP-3 und dem α 2 Makroglobulin konnten bereits endogene Inhibitoren identifiziert werden, die eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der Aggrekanasen zeigten (35;93). Durch den Einsatz synthetischer Inhibitoren könnte auch an dieser Stelle in Zukunft ein pharmakotherapeutischer Therapieansatz zur Verfügung stehen.

Die Gemeinsamkeit all dieser möglichen Therapiestrategien liegt darin, dass sie auf der Idee basieren, an verschiedenen Schlüsselstellen in der Regulation der Matrixhomöostase katabole Einflüsse zu unterdrücken oder zu blockieren. Einen weiteren potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt stellt die Förderung und Aktivierung anaboler Prozesse im Knorpel dar. Mit diesem Thema beschäftigt sich der folgende zweite Abschnitt der Diskussion, in dem die Auswirkungen der Zytokinstimulation auf die Genexpression von BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 interpretiert werden.

4.2 *BMP-2, BMP-4 und CDMP-1*

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob und wie die Genexpression von BMP-2, BMP-4 und CDMP-1 in Synovialfibroblasten durch Zytokine reguliert wird. Das Expressionsverhalten für die drei untersuchten Wachstumsfaktoren zeigte dabei teilweise deutliche Unterschiede.

Keines der verwendeten Zytokine hatte einen signifikanten Effekt auf die BMP-2-Genexpression in den untersuchten Fibroblasten. Das BMP-2-Gen wurde zwar exprimiert, seine Expression schien dabei jedoch nicht durch die verwendeten Zytokine beeinflusst zu werden. Die einzigen beiden bisher veröffentlichten Studien, in denen die BMP-2 Genexpression in menschlichen Synovialfibroblasten untersucht wurde, beschreiben einen Stimulationseffekt durch IL-1 β und TNF- α (31;63). Allerdings stammen die in diesen Studien verwendeten Zellen von Patienten, die an rheumatoider Arthritis und nicht an Arthrose litten. Dieser Umstand erschwert den Vergleich der Ergebnisse und erklärt möglicherweise auch die abweichenden Beobachtungen. So ist es beispielsweise denkbar, dass Synovialfibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis einen anderen Aktivierungsstatus haben als bei der Osteoarthrose.

Interessant ist jedoch, dass auch an arthrotischen Chondrozyten eine deutliche Stimulation der BMP-2-Expression durch IL-1 β und TNF- α beobachtet wurde (34). In der Pathogenese der Arthrose scheint demnach die BMP-2-Synthese in Chondrozyten und Synovialfibroblasten unterschiedlich reguliert zu werden. Um weitere Informationen über die Regulation der BMP-2-Synthese in Synovialfibroblasten zu gewinnen, wären an dieser Stelle weiterführende Experimente sinnvoll. So könnten neben der Analyse der Genexpression Untersuchungen auf Proteinebene zusätzliche Informationen zu BMP-2-Synthese und Sezernierung liefern.

Neben BMP-2 exprimierten die Synovialfibroblasten auch BMP-4 und CDMP-1. Im Unterschied zur BMP-2-Genexpression hatte die Zytokinstimulation jedoch deutliche Auswirkungen auf die BMP-4- und CDMP-1-Expression. Dabei fiel auf, dass beide Wachstumsfaktoren ein ähnliches Expressionsmuster zeigten. Sowohl BMP-4, als auch CDMP-1 wurden in ihrer Expression durch IL-1 β , TNF- α und durch die Kombination der beiden Zytokine deutlich herunterreguliert. Zusätzlich wurde dieser Effekt auf die

BMP-4-Expression durch IL-1 α und auf die CDMP-1-Expression durch TGF- β ausgelöst. Weder für BMP-4, noch für CDMP-1 konnte eines der verwendeten Zytokine die Genexpression steigern.

Vergleichbare Veröffentlichungen liegen bisher nicht vor. Vielfach sind in der Literatur die anabolen Einflüsse von BMP-4 und CDMP-1 auf die Knorpelhomöostase beschrieben. Ebenso weisen einige Publikationen darauf hin, dass beide Wachstumsfaktoren von Chondrozyten aus arthrotischen Gelenken exprimiert werden (12;17). Studien, die sich mit der Regulation ihrer Expression, Synthese oder Aktivität beschäftigen, gibt es bisher nicht. Damit zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie erstmals, dass die Genexpression von BMP-4 und CDMP-1 in menschlichen Synovialfibroblasten durch Zytokine reguliert wird.

Geht man davon aus, dass die genannten Zytokine nicht nur die Genexpression, sondern auch die Proteinsynthese der beiden Wachstumsfaktoren supprimieren, ergeben sich daraus deutliche Konsequenzen für die kartilaginäre Homöostase. Es ist bekannt, dass insbesondere die Zytokine IL-1 und TNF- α durch eine Inhibition der Kollagen- und Proteoglykansynthese die Reparaturkapazität des Knorpels vermindern. Im Gegensatz dazu erfolgt eine Stimulation der Matrixsynthese unter dem Einfluss der BMPs. Demnach wäre es denkbar, dass die durch IL-1 und TNF- α induzierte verminderte Reparaturkapazität des Knorpels durch die Suppression dieser beiden Wachstumsfaktoren zustande kommt.

Eine interessante Beobachtung ergibt sich, wenn man die Expressionsmuster der beiden Wachstumsfaktoren mit dem der Aggrecanase-1 vergleicht. Dabei fällt auf, dass sich die Genexpression von BMP-4 und CDMP-1 nahezu spiegelbildlich zur Expression der Aggrecanase-1 verhält. Genau jene Zytokine, welche die Expression von BMP-4 und CDMP-1 herunterregulieren, nämlich IL-1 β , die Zytokinkombination TNF- α /IL-1 β und teilweise TGF- β , steigern die Genexpression der Aggrecanase-1. Ebenso ist bekannt, dass das Stimulationsmuster relevanter MMPs dem der Aggrecanase-1 sehr ähnlich ist. Fuchs et al. konnten belegen, dass Synovialfibroblasten aus arthrotisch veränderten Gelenken unter der Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und TNF- α zu einer Sekretionssteigerung verschiedener MMPs angeregt wurden (33). Bezieht man diese Beobachtungen auf das anakatabole Modell der kartilaginären Matrixhomöostase, ergibt sich die folgende mög-

liche Interpretation: Der Einfluss kataboler Zytokine fördert die Entstehung einer Imbalance zugunsten knorpelabbauender Mechanismen durch die Aktivierung matrixdegradierender Proteasen und eine gleichzeitige Inhibition anaboler Wachstumsfaktoren.

Verschiedene weiterführende Experimente wären denkbar, um diese Hypothese zu bestätigen. So müsste- analog zu den Ausführungen über die BMP-2-Expression- untersucht werden, ob die Suppression der BMP-4- und CDMP-1-Genexpression tatsächlich auch zu einer Senkung der intra- und extrazellulären Proteinkonzentration führt, um Aussagen über die Synthese und Sezernierung machen zu können.

Die gegensätzlichen Expressionsmuster von BMP-4 und CDMP-1 auf der einen und Aggrecanase-1 und MMPs auf der anderen Seite könnten auch auf einen regulativen Zusammenhang hinweisen. So wäre es möglich, dass die Wirkung der Zytokine auf die Aggrecanase-1- und MMP-Expression indirekt über die Suppression von BMP-4 und CDMP-1 zustande kommt. Das würde bedeuten, dass BMP-4 und CDMP-1 ihre anabole Funktion in der Knorpelhomöostase nicht nur als Induzenten der Matrixsynthese, sondern auch als endogene Inhibitoren der Synthese matrixdegradierender Proteasen entfalten. Eine solche Wirkung könnte sowohl autokrin, als auch parakrin erfolgen. Dies wäre als weiterer Beleg für das große anabole Potential der beiden Wachstumsfaktoren zu verstehen. Untermuert wird diese Annahme durch eine Studie, in der eine Suppression der MMP-1-Synthese durch die Stimulation mit BMPs ausgelöst wurde (90). Allerdings wurden diese Ergebnisse an menschlichen Osteoblasten gewonnen.

Es sind entsprechend weitere Experimente notwendig, um diese Theorie zu überprüfen. Aufschlussreiche Erkenntnisse könnte man beispielsweise gewinnen, indem man untersucht, welchen Effekt die Stimulation mit BMP-4 und CDMP-1 auf die Genexpression der Aggrecanase-1 und verschiedener MMPs in Synovialfibroblasten und Chondrozyten hat. Eine Suppression der Proteasenexpression spräche dabei für eine inhibierende Wirkung der beiden Wachstumsfaktoren.

Auf der Suche nach einem weiteren möglichen Ansatzpunkt für die Behandlung der Arthrose stellen die BMPs sicherlich eine interessante Option dar. Möglicherweise können die anabolen Effekte dieser Wachstumsfaktoren therapeutisch genutzt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Gesamtkontext der biochemischen Prozesse im Knorpel, die für die Arthroseentstehung von Bedeutung sind, lässt sich folgendes festhalten:

Neben den Chondrozyten nehmen die Synovialfibroblasten eine zentrale Rolle in der Gestaltung der kartilaginären Matrixhomöostase als regulierbare Produzenten kataboler Proteasen, wie der Aggrecanasen und anaboler Wachstumsfaktoren, wie der BMPs ein. Die Expression anaboler und kataboler Produkte wird in den Synovialfibroblasten unterschiedlich und teilweise gegensätzlich reguliert. Möglicherweise trägt diese gegensätzliche Regulation zur Entstehung einer homöostatischen Imbalance zugunsten kataboler Mechanismen und damit letztlich zur Pathogenese der Arthrose bei.

Die Ergebnisse haben aber auch neue Fragen aufgeworfen. Besonders interessant könnten weitere Erkenntnisse über die regulativen Interaktionen zwischen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen sein. So ist zum Beispiel der mögliche Einfluss der BMPs auf die Expression matrixdegradierender Proteasen noch näher zu ergründen.

Kritisch anzumerken bleibt, dass die Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten gewonnen wurden und damit nicht bedenkenlos auf die Verhältnisse im erkrankten Gelenk übertragen werden können. Dadurch bleiben viele Variablen unberücksichtigt, die unter physiologischen Bedingungen das Verhalten der Synovialfibroblasten beeinflussen können. Das Zusammenspiel der Synovialzellen mit ihrer „natürlichen Umgebung“, also zum Beispiel die Kommunikation mit den Chondrozyten, Monozyten und den extrazellulären Matrixbestandteilen wird ebenso wenig erfasst wie der Einfluss mechanischer Reize.

Betrachtet man allein die Anzahl der Publikationen über die biochemischen Prozesse bei der Arthroseentstehung, die in den letzten Jahren erschienen sind, wird ersichtlich, dass das Wissen über dieses Thema mit rasantem Tempo wächst. Ebenso deutlich zeigt sich jedoch, wie vielschichtig die Pathogenese der Arthrose ist. Eine große Herausforderung der Arthroseforschung liegt deshalb darin, diese zahllosen punktuellen Erkenntnisse zu einem Gesamtbild zusammenzufügen, um die komplexen regulatorischen Mechanismen der Arthroseentstehung zu verstehen.

Den enormen Forschungsaufwand, der auf diesem Gebiet betrieben wird, rechtfertigt die Aussicht auf eine mögliche kausale Therapie der Osteoarthrose. Es besteht die be-

rechtigte Hoffnung, dass es irgendwann möglich sein wird, einen verschlissenen Knorpel durch eine therapeutisch ausgelöste Verschiebung der kartilaginären Homöostase auf die anabole Seite zur Reparation anzuregen. Es bleibt abzuwarten, wann die erste Endoprothese auf diesem Wege vermieden werden kann.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Abbaszade I, Liu RQ, Yang F, Rosenfeld SA, Ross OH, Link JR et al. Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem* 1999; 274(33):23443-23450.
- (2) Amin AR. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7(4):392-394.
- (3) Amin AR. Type II interleukin-1beta receptor: a candidate for gene therapy in human arthritis. *Clin Orthop* 2000;(379 Suppl):S179-S188.
- (4) Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(6):981-985.
- (5) Arner EC. Aggrecanase-mediated cartilage degradation. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2(3):322-329.
- (6) Arner EC, Hughes CE, Decicco CP, Caterson B, Tortorella MD. Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6(3):214-228.
- (7) Ashhurst DE, Bland YS, Levick JR. An immunohistochemical study of the collagens of rabbit synovial interstitium. *J Rheumatol* 1991; 18(11):1669-1672.
- (8) Aydelotte MB, Raiss RX, Caterson B, Kuettner KE. Influence of interleukin-1 on the morphology and proteoglycan metabolism of cultured bovine articular chondrocytes. *Connect Tissue Res* 1992; 28(1-2):143-159.
- (9) Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 2002; 46(10):2648-2657.
- (10) Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1534-1545.
- (11) Birkedal-Hansen H, Cobb CM, Taylor RE, Fullmer HM. Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1976; 251(10):3162-3168.
- (12) Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Graninger WB, Luyten FP, Erlacher L. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and -2 are endogenously expressed in

- healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(5):394-401.
- (13) Bonassar LJ, Sandy JD, Lark MW, Plaas AH, Frank EH, Grodzinsky AJ. Inhibition of cartilage degradation and changes in physical properties induced by IL-1beta and retinoic acid using matrix metalloproteinase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 1997; 344(2):404-412.
 - (14) Broom ND. Abnormal softening in articular cartilage: its relationship to the collagen framework. *Arthritis Rheum* 1982; 25(10):1209-1216.
 - (15) Bruckner P, van der RM. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* 1994; 28(5):378-384.
 - (16) Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop* 1992;(282):250-272.
 - (17) Chen AL, Fang C, Liu C, Leslie MP, Chang E, Di Cesare PE. Expression of bone morphogenetic proteins, receptors, and tissue inhibitors in human fetal, adult, and osteoarthritic articular cartilage. *J Orthop Res* 2004; 22(6):1188-1192.
 - (18) Cicuttini FM, Spector TD. Osteoarthritis in the aged. Epidemiological issues and optimal management. *Drugs Aging* 1995; 6(5):409-420.
 - (19) Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(5):995-1000.
 - (20) Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989; 84(2):678-685.
 - (21) Edwards CJ, Francis-West PH. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31(1):33-42.
 - (22) Edwards JC. The origin of type A synovial lining cells. *Immunobiology* 1982; 161(3-4):227-231.
 - (23) Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl* 2000; 60:6-8.
 - (24) Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 2000; 133(8):635-646.
 - (25) Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynauld JP et al. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and

- early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* 1998; 25(8):1585-1594.
- (26) Fernandes RJ, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR et al. Pro-collagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem* 2001; 276(34):31502-31509.
- (27) Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biol* 2000; 19(6):549-553.
- (28) Fosang AJ, Last K, Maciewicz RA. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent. *J Clin Invest* 1996; 98(10):2292-2299.
- (29) Fosang AJ, Last K, Stanton H, Weeks DB, Campbell IK, Hardingham TE et al. Generation and novel distribution of matrix metalloproteinase-derived aggrecan fragments in porcine cartilage explants. *J Biol Chem* 2000; 275(42):33027-33037.
- (30) Fosang AJ, Tyler JA, Hardingham TE. Effect of interleukin-1 and insulin like growth factor-1 on the release of proteoglycan components and hyaluronan from pig articular cartilage in explant culture. *Matrix* 1991; 11(1):17-24.
- (31) Fowler MJ, Jr., Neff MS, Borghaei RC, Pease EA, Mochan E, Thornton RD. Induction of bone morphogenetic protein-2 by interleukin-1 in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248(3):450-453.
- (32) Francis-West PH, Parish J, Lee K, Archer CW. BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res* 1999; 296(1):111-119.
- (33) Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(5):409-418.
- (34) Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 3:59-66.
- (35) Gendron C, Kashiwagi M, Hughes C, Caterson B, Nagase H. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. *FEBS Lett* 2003; 555(3):431-436.
- (36) Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res* 1988; 6(6):777-792.
- (37) Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J et al. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II

- collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(7):559-567.
- (38) Guerne PA, Zuraw BL, Vaughan JH, Carson DA, Lotz M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J Clin Invest* 1989; 83(2):585-592.
- (39) Hardingham TE, Bayliss MT, Rayan V, Noble DP. Effects of growth factors and cytokines on proteoglycan turnover in articular cartilage. *Br J Rheumatol* 1992; 31 Suppl 1:1-6.
- (40) Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992; 6(3):861-870.
- (41) Hardingham TE, Fosang AJ. The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:86-90.
- (42) Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* 1999; 42(1):17-24.
- (43) Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8):2173-2177.
- (44) Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res* 2003; 21(4):573-583.
- (45) Hotten GC, Matsumoto T, Kimura M, Bechtold RF, Kron R, Ohara T et al. Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors* 1996; 13(1-2):65-74.
- (46) Hughes CE, Caterson B, Fosang AJ, Roughley PJ, Mort JS. Monoclonal antibodies that specifically recognize neoepitope sequences generated by 'aggrecanase' and matrix metalloproteinase cleavage of aggrecan: application to catabolism in situ and in vitro. *Biochem J* 1995; 305 (Pt 3):799-804.
- (47) Hughes CE, Little CB, Buttner FH, Bartnik E, Caterson B. Differential expression of aggrecanase and matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage. *J Biol Chem* 1998; 273(46):30576-30582.
- (48) Hughes CE, Little CB, Caterson B. Measurement of aggrecanase-generated interglobular domain catabolites in the medium and extracts of cartilage explants using Western blot analysis. *Methods Mol Biol* 2003; 225:89-98.
- (49) Hui W, Rowan AD, Richards CD, Cawston TE. Oncostatin M in combination with tumor necrosis factor alpha induces cartilage damage and matrix metallo-

- proteinase expression in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 2003; 48(12):3404-3418.
- (50) Ilic MZ, Vankemmelbeke MN, Holen I, Buttle DJ, Clem RH, Handley CJ. Bovine joint capsule and fibroblasts derived from joint capsule express aggrecanase activity. *Matrix Biol* 2000; 19(3):257-265.
- (51) Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop* 2003; 32(9):429-436.
- (52) Jackson DW, Simon TM, Aberman HM. Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S14-S25.
- (53) Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Reboul P, He Y, Jolicoeur FC et al. Modulation of TIMP-1 synthesis by antiinflammatory cytokines and prostaglandin E2 in interleukin 17 stimulated human monocytes/macrophages. *J Rheumatol* 2001; 28(4):712-718.
- (54) Katz EP, Wachtel EJ, Maroudas A. Extrafibrillar proteoglycans osmotically regulate the molecular packing of collagen in cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1986; 882(1):136-139.
- (55) Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16(4):494-502.
- (56) Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD, Porter S, Edwards DR, Hogan A et al. The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 2002; 46(4):961-967.
- (57) Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992; 25(3):155-163.
- (58) Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997; 272(1):556-562.
- (59) Leonhardt H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme, 1990.
- (60) Li WQ, Zafarullah M. Oncostatin M up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression in articular chondrocytes via de novo transcription, protein synthesis, and tyrosine kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent mechanisms. *J Immunol* 1998; 161(9):5000-5007.

-
- (61) Little CB, Flannery CR, Hughes CE, Mort JS, Roughley PJ, Dent C et al. Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem J* 1999; 344 Pt 1:61-68.
- (62) Longpre JM, Leduc R. Identification of pro-domain determinants involved in ADAMTS-1 biosynthesis. *J Biol Chem* 2004.
- (63) Lories RJ, Derese I, Ceuppens JL, Luyten FP. Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10):2807-2818.
- (64) Lupp D. Biochemie und Pathobiochemie des hyalinen Gelenkknorpels. *Klinische Sportmedizin* 2000;(12):29-39.
- (65) Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem* 2003; 278(26):23656-23665.
- (66) Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S et al. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 1992; 35(5):530-540.
- (67) Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15(5):805-829.
- (68) Martinek V. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Gelenkknorpels. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2003; 6:166-170.
- (69) Matsukawa A, Yoshimura T, Miyamoto K, Ohkawara S, Yoshinaga M. Analysis of the inflammatory cytokine network among TNF alpha, IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist, and IL-8 in LPS-induced rabbit arthritis. *Lab Invest* 1997; 76(5):629-638.
- (70) Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P et al. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(4):296-305.
- (71) Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984; 17(5):377-394.
- (72) Murphy G, McGuire MB, Russell RG, Reynolds JJ. Characterization of collagenase, other metallo-proteinases and an inhibitor (TIMP) produced by human synovium and cartilage in culture. *Clin Sci (Lond)* 1981; 61(6):711-716.
- (73) Mussener A, Funa K, Kleinau S, Klareskog L. Dynamic expression of transforming growth factor-betas (TGF-beta) and their type I and type II receptors

- in the synovial tissue of arthritic rats. *Clin Exp Immunol* 1997; 107(1):112-119.
- (74) Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF, Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992; 1:421-424.
- (75) Nagase H, Kashiwagi M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(2):94-103.
- (76) Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31):21491-21494.
- (77) Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation. *Dev Biol* 1994; 162(1):18-28.
- (78) Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. *J Rheumatol Suppl* 1989; 18:19-27.
- (79) Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:109-114.
- (80) Pelletier JP, Roughley PJ, DiBattista JA, McCollum R, Martel-Pelletier J. Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum* 1991; 20(6 Suppl 2):12-25.
- (81) Pitsillides AA, Wilkinson LS, Mehdizadeh S, Bayliss MT, Edwards JC. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell. *Int J Exp Pathol* 1993; 74(1):27-34.
- (82) Pratta MA, Scherle PA, Yang G, Liu RQ, Newton RC. Induction of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1):119-133.
- (83) Richardson DW, Clark CC. Effects of short-term cast immobilization on equine articular cartilage. *Am J Vet Res* 1993; 54(3):449-453.
- (84) Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994; 28(5):385-397.
- (85) Sandy JD, Verscharen C. Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo. *Biochem J* 2001; 358(Pt 3):615-626.

-
- (86) Sapolsky AI, Keiser H, Howell DS, Woessner JF, Jr. Metalloproteases of human articular cartilage that digest cartilage proteoglycan at neutral and acid pH. *J Clin Invest* 1976; 58(4):1030-1041.
- (87) Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol* 2002; 169(1):507-514.
- (88) Schiebler, Schmidt, Zilles. *Anatomie*. 7 ed. Springer, 1997.
- (89) Su S, DiBattista JA, Sun Y, Li WQ, Zafarullah M. Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in articular chondrocytes is mediated by serine/threonine and tyrosine kinases. *J Cell Biochem* 1998; 70(4):517-527.
- (90) Takiguchi T, Kobayashi M, Suzuki R, Yamaguchi A, Isatsu K, Nishihara T et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblast differentiation and suppresses matrix metalloproteinase-1 production in human bone cells isolated from mandibulae. *J Periodontal Res* 1998; 33(8):476-485.
- (91) Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(1):33-44.
- (92) Theofilopoulos AN, Carson DA, Tavassoli M, Slovin SF, Speers WC, Jensen FB et al. Evidence for the presence of receptors for C3 and IgG Fc on human synovial cells. *Arthritis Rheum* 1980; 23(1):1-9.
- (93) Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Easton A, Korte-Sarfaty J, Fok K et al. Alpha2-macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes. *J Biol Chem* 2004; 279(17):17554-17561.
- (94) Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999; 284(5420):1664-1666.
- (95) Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(6):539-552.
- (96) Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, Austin J, Ross OH, Abbaszade I et al. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem* 2000; 275(24):18566-18573.
- (97) Towle CA, Hung HH, Bonassar LJ, Treadwell BV, Mangham DC. Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5(5):293-300.

-
- (98) Tsai HM. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Mol Med* 2002; 80(10):639-647.
- (99) Tsumaki N, Nakase T, Miyaji T, Kakiuchi M, Kimura T, Ochi T et al. Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res* 2002; 17(5):898-906.
- (100) Tucker RP. The thrombospondin type 1 repeat superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(6):969-974.
- (101) Van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ, Van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38(2):164-172.
- (102) Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, Ilic MZ, Handley CJ, Kelner GS et al. Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* 2001; 268(5):1259-1268.
- (103) Wang J, Verdonk P, Elewaut D, Veys EM, Verbruggen G. Homeostasis of the extracellular matrix of normal and osteoarthritic human articular cartilage chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11(11):801-809.
- (104) Wang P, Tortorella M, England K, Malfait AM, Thomas G, Arner EC et al. Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 2004; 279(15):15434-15440.
- (105) Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ. Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. *J Rheumatol* 1994; 21(9):1710-1715.
- (106) Westling J, Fosang AJ, Last K, Thompson VP, Tomkinson KN, Hebert T et al. ADAMTS4 cleaves at the aggrecanase site (Glu373-Ala374) and secondarily at the matrix metalloproteinase site (Asn341-Phe342) in the aggrecan interglobular domain. *J Biol Chem* 2002; 277(18):16059-16066.
- (107) Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878:388-403.
- (108) Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 1997; 100(2):321-330.
- (109) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242(4885):1528-1534.

-
- (110) Wu JJ, Lark MW, Chun LE, Eyre DR. Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. *J Biol Chem* 1991; 266(9):5625-5628.
- (111) Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC et al. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol* 2002; 168(3):1405-1412.

6 Lebenslauf

Name	Sebastian Schmeil
Adresse	Vollmerweg 56 48159 Münster
Geburtsdatum	05. April 1977
Geburtsort	Gelsenkirchen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Volkhard Schmeil, Polizeibeamter Monika Schmeil-Rust, Grundschullehrerin
Schulbildung	
08/1983-06/1987	Besuch der Martinischule in Herten-Westerholt
08/1987-06/1996	Besuch des Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasiums in Gelsenkirchen
06/1996	Abitur
Zivildienst	
08/1996-09/1997	Pflegerische Tätigkeit in einer geriatrischen Tagesklinik des Gertrudis Hospital in Herten-Westerholt

Hochschulausbildung

1997-2004	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
09/1999	Ärztliche Vorprüfung
09/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003-03/2004	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Münster
05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2004	Approbation als Arzt

7 Danksagung

An erster Stelle danke ich Frau Professor Dr. Susanne Fuchs für die Überlassung dieses Themas und die Bereitstellung der verwendeten Gewebeproben. Sie nahm sich immer die Zeit, auf meine Fragen zu antworten und konnte durch fachkundige Hilfestellung bei der Lösung vieler Probleme helfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Berno Dankbar. Für die Entstehung dieser Arbeit war seine kompetente und vor Allem geduldige Anleitung in allen Phasen entscheidend. Von den grundlegenden Verhaltensregeln im Labor über die korrekte Durchführung der verwendeten Verfahren bis hin zur Einarbeitung in das wissenschaftliche Thema stand mir Herr Dankbar stets zur Seite. Mit Fragen konnte ich mich immer- selbst im Urlaub auf dem Campingplatz- an ihn wenden.

Außerdem möchte ich Frau Vera Eckervogt danken, die mir nicht nur mit ihrer Erfahrung in vielen Situationen half, sondern auch als gute Seele des Labors zur Erheiterung an einigen langen Labortagen beitrug.

Herrn Andrej Tschugunow und Herrn Marcel Langer danke ich für die Einweisung in die für diese Arbeit benutzten Computerprogramme.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern Monika Schmeil-Rust und Volkhard Schmeil dafür, dass sie mir verständnisvoll die für diese Arbeit notwendigen Freiräume gewährt haben.

8 Materialien und Chemikalien

BSA	Bovines Serumalbumin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothrethiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
H ₂ O	Wasser
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P/S/A	Penicillin/Streptomycin/Amphotercin
RLT-Puffer	RNA-Lysepuffer (enthält Guanidinthiocyanat)
RW 1-Puffer	RNA-Waschpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
Rpm	Rotationen pro Minute
TAE	TRIS-Acetat-EDETA
Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase (gewonnen aus dem Bakterium Thermus aquaticus)