Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
- Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann -

des Fachbereichs Medizin der Phillips-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

„Einfluss des „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) auf die Sekretion der Matrix - Metalloproteinasen (MMP) 1- und 3 sowie der Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) 1- und 2 bei Kniegelenkssynovialfibroblasten bei der Osteoarthrose“

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Martin Bögemann
Werne

- Marburg 2008 -

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 09.09.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: **Prof. Dr. med. Matthias Rothmund**

Referent: **Priv.-Doz. Dr. med. Carsten Tibesku**

Koreferent: **Fr. Priv.-Doz. Dr. med. Carola Seifart**

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
- Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann -

des Fachbereichs Medizin der Phillips-Universität Marburg

Zusammenfassung

„Einfluss des „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) auf die Sekretion der Matrix - Metalloproteinasen (MMP) 1- und 3 sowie der Tissue inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) 1- und 2 bei Kniegelenkssynovialfibroblasten bei der Osteoarthrose“

Die Synovialfibroblasten sind neben den Chondrozyten und den Makrophagen/Monozyten zusammen mit den MMPs und den TIMPs bekanntermaßen an der Pathogenese der Osteoarthrose beteiligt. HGF ist als morphogenetischer Wachstumsfaktor bekannt und spielt bei vielen degradierenden Prozessen eine Rolle. Der Einfluss von HGF auf die MMPs und TIMPs im Rahmen der Osteoarthrose wurde bislang noch nicht überprüft.

Ziel: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des HGF auf die Expression von MMPs und TIMPs durch Gewebs- und Flüssigkeitssynovialfibroblasten bei osteoarthrotischem humanem Kniegelenksknorpel.

Methode: Die Synovialflüssigkeit und Kniegelenkskondylenknorpel von 41 Osteoarthrosepatienten wurden gewonnen und Synovialfibroblasten und Chondrozyten kultiviert, expandiert und stimuliert. Mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) sollte die HGF-Konzentration in Synovialflüssigkeit in Bezug zum Osteoarthrosegrad gezeigt werden. Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) sollte die Transkription von HGF und seines Rezeptors c-Met in Synovialfibroblasten nachgewiesen werden. Die Einengung der MMPs auf die durch HGF relevant regulierten erfolgte durch die PCR. Die Proteasenaktivität der relevanten proMMPs -1 und -3 wurde anhand der Zymographie überprüft. Der quantitative Einfluss von HGF auf die Sekretion der MMPs -1 und -3 und der TIMPs -1 und -2 durch Gewebs- und Flüssigkeitssynovialfibroblasten wurde mittels ELISA untersucht.

Ergebnisse: Der HGF-ELISA zeigte mit steigendem Osteoarthrosegrad ansteigende HGF-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit. HGF spielt also bei der Osteoarthrose des Kniegelenks eine Rolle. Die HGF- und c-Met-Transkription in Synovialfibroblasten wurde nachgewiesen, Synovialfibroblasten sind also Bildungs- und Wirkungsort von HGF. Die MMPs -1 und -3 werden durch HGF konzentrationsabhängig reguliert und werden im Gegensatz zu

MMP-8 und -13, die nicht reguliert werden, weiter verfolgt. Pro-MMP -1 und -3 werden vor allem bei Flüssigkeitssynovialfibroblasten als proteolytisch aktiv nachgewiesen. In der quantitativen Analyse der Sekretion von MMP-1 und -3 durch Synovialfibroblasten nach HGF-Stimulation ergibt sich eine statistisch signifikante, dosisabhängige Steigerung für MMP-1 und -3 ($p < 0{,}001$). TIMP-1 und -2 werden in Synovialfibroblasten durch HGF nicht konzentrationsabhängig reguliert.

Schlussfolgerung: Neben den bekannten Zytokinen (z.B. IL-1β oder TNF-α) scheint HGF in die Pathogenese der Osteoarthrose durch Induzierung der bekanntermaßen im Arthroseprozess beteiligten MMPs -1 und -3 involviert zu sein. Die Arbeit unterstreicht die Rolle der Synovialfibroblasten bei der Pathogenese der Osteoarthrose.

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
- Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs-Winkelmann -

des Fachbereichs Medizin der Phillips-Universität Marburg

Abstract

„Effect of Hepatocyte Growth Factor (HGF) on the secretion of Matrix Metalloproteinases (MMP) 1- and 3 and on Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) 1- and 2 on synovial fibroblasts of the knee in Osteoarthrosis"

It is known that synovial fibroblasts, next to chondrocytes and macrophages/monocytes promote the pathogenesis of osteoarthrosis together with MMPs and TIMPs. HGF is a morphogenetic growth factor that is involved in many degredating processes. The impact of HGF on MMPs and TIMPs has so far not been surveyed in the case of osteoarthrosis.

Objective: The intention of this thesis was to investigate the effect on HGF on the expression of MMPs and TIMPs by synovial fibroblasts in synovial tissue and in synovial liquid in Osteoarthrosis of the knee.

Method: Synovial liquid and cartilage of the knees of 41 patients with Osteoarthrosis was collected and synovial fibroblasts and chondrocytes cultivated, expanded and stimulated. The relationship between the concentration of HGF in synovial liquid and the degree of osteoarthrosis was to be shown by the means of Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to provide evidence for the transcription of HGF and its receptor c-Met in synovial fibroblasts. The confinement of the MMPs to those relevantly regulated by HGF was done with PCR as well. The detection of the activity of proteases of the relevant proMMPs -1 and -3 was established by Cymography. Finally the quantitative impact of HGF on the secretion of the MMPs -1 and -3 and of the TIMPs -1 and -2 by tissue- and liquid-synovial fibroblasts was investigated by ELISA.

Results: The HGF-ELISA showed an increasing HGF-concentration in synovial liquid with rising degree of severity of osteoarthrosis. So HGF plays a certain role with osteoarthrosis of the knee. The HGF- and c-Met-Transcription in synovial fibroblasts was confirmed. Thus synovial fibroblasts are a place of origin and effect of HGF. The MMPs -1 and -3 are concentration dependently regulated by HGF and in contrast to MMP -8 and -13, which are not, continued to be examined. Pro-MMP -1 and -3 show proteolytic activity especially in liquid

synovial fibroblasts. The quantitative analysis of the secretion of MMP -1 and -3 by synovial fibroblasts after stimulation by HGF proved a statistically significant dose-dependent increase of MMP -1 and -3 ($p < 0,001$). HGF does not regulate TIMP -1 and -2 in a dose-dependent way.

Conclusion: Next to the well known cytokines (e.g. IL-1β or TNF-α), HGF seems to be involved in the pathogenesis of osteoarthrosis by inducing MMP -1 and -3 which are established within the desease's development. This thesis underlines the importance of the role that synovial fibroblasts play in the pathogenesis of osteoarthrosis.

Meiner Familie und meiner Freundin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **10**

1.1 Die Osteoarthrose 10
1.2 Pathogenese der Knopeödestruktion 12
1.2.1 Die Struktur des hyalinen Knorpels 14
1.2.2 Die Struktur der Synovialis 18
1.2.3 Die Homöostase der kartilaginären Matrix 20
1.2.4 Die Zytokine 21
1.2.5 Die Matrix-Metalloproteinasen 25
1.2.6 Die Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen 34
1.2.7 Hepatocyte Growth Factor (HGF) 35
1.3 Fragestellung 36

2. Material und Methode **38**

2.1 Probenmaterial und Patienten 38
2.2 Verfahrensbeschriebung zur Herstellung von Monolayerkulturen 38
2.2.1 Isolierung, Expansion und Stimulation der Synovialfibroblasten und Chondrozyten 38
2.3.2 Probenvorbereitung 40
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl 41
2.3 Methoden der Analytik 41
2.3.1 Quantifizierung von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren 41
2.4 Verfahrensbeschreibung der Analytik 42
2.4.1 MMP-1 44
2.4.2 MMP-3 45
2.4.3 TIMP-1 46
2.4.4 TIMP-2 47
2.4.5 HGF 48
2.5 Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) 50
2.6 Zymographie 52
2.7 Statistische Analyse 52

3. Ergebnisse **54**

3.1 HGF-Spiegelbestimmung in der Synovialflüssigkeit 54
3.2 Korrelationsanalyse 54
3.3 Expression von HGF und c-Met in Synovialfibroblasten 55
3.4 Qualitative Analyse der Sekretion von MMP-1, -3, -8 und -13 durch Synovialfibroblasten unter HGF-Stimulation 56
3.5 Proteasenaktivität in Synovialfibroblasten (und Chondrozyten) unter HGF-Stimulation 57
3.6 Quantitative Analyse der Sekretion von MMP-1, und -3 durch Synovialfibroblasten unter HGF-Stimulation 58
3.7 Effekt von HGF auf die synoviale Synthese von TIMP-1 und TIMP-2 61

Inhaltsverzeichnis

4. Diskussion **63**

4.1 Methodendiskussion 63
4.1.1 Patientenkollektiv 63
4.1.2 Strukturgleichheit 63
4.1.3 Methodik 64
4.1.3.1 Zellkultur 64
4.1.3.2 Primärkultur 65
4.1.3.3 Monolayerkultur 65
4.1.3.4 RNA-Extraktion 66
4.1.3.5 Synthese der cDNA 67
4.1.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) 68
4.1.3.7 Gelelektrophorese 69
4.1.3.8 Zymographie 70
4.1.3.9 ELISA 70
4.2 Ergebnisdiskussion 71
4.3 Vergleich mit vorausgegangenen Untersuchungen zum Thema 75
4.4 Zusammenfassung 82

5. Literaturverzeichis **85**

6. Abbildungsverzeichnis **102**

7. Abkürzungsverzeichnis **104**

8. Danksagung **106**

9. Lebenslauf **107**

10. Verzeichnis der akademischen Lehrer **108**

11. Ehrenwörtliche Erklärung **109**

1. Einleitung

1.1 Die Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (OA), im englischen Sprachgebiet auch als Osteoarthritis bezeichnet, ist eine primär nichtentzündliche, progressive und degenerative Gelenkerkrankung. Sie ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung. Zwei Drittel der Bevölkerung über 60 leidet mit zunehmender Häufigkeit an dieser Erkrankung (Hough AJ 2001).

Erstmals prägte der deutsche Internist Friedrich von Müller 1913 den Begriff der Arthrose in der Absicht, diese primär nichtentzündliche und degenerative Gelenkerkrankung von den entzündlichen Arthritiden (primär chronische Polyarthritis, rheumatoide Arthritis, infektiöse Arthritis) abzugrenzen. Der angloamerikanische Begriff „Osteoarthritis“ impliziert zwar einen inflammatorischen Charakter der Arthrose, der aber nicht pathognomonisch ist und allenfalls sekundär im Krankheitsverlauf in Form einer Synovitis hinzutreten kann.

Die Arthrose zeigt eine typische Lokalisationsverteilung, wobei die folgenden Gelenke in absteigender Häufigkeit betroffen sind: Wirbelgelenke, Hüfte (Coxarthrose), Knie (Gonarthrose), Sprunggelenk, Fuß- und Zehengelenke, Schulter (Omarthrose), Handgelenk, Daumengrundgelenk, übrige Gelenke (Ling und Bathon 1998), (Petersson 2002). Im Anfangstadium ist die Erkrankung oft asymptomatisch. Durch die jahrzehntelange Progredienz kommt es jedoch im Endstadium oft zur völligen Destruktion der osteochondralen Gelenkstrukturen und damit häufig zur erheblichen Invalidisierung der Patienten. Klinisch steht -neben dem gelegentlichen Gelenkerguß- der, am Anfang bei Belastung, später in Ruhe auftretende und zum Schluss dauerhafte Gelenkschmerz bei endlagiger Bewegungseinschränkung mit kumulativem Verlust der Gelenksfunktion im Vordergrund. Die Symptomatik ist leitend bei der Diagnosefindung. Das Anfangstadium der Osteoarthrose liegt dabei oft weit vor dem eigentlichen, klinischen Erscheinungsbild. Die projektionsradiographischen Zeichen der Osteoarthrose (Gelenkspaltverschmälerung, Osteophyten, Geröllzysten, subchondrale Sklerosierung) sind 1957 von Kellgren und Lawrence (Kellgren und Lawrence 1957), (Ahlback 1968) beschrieben worden und werden seit 1961 von der WHO als allgemeingültige radiologische Kriterien der Osteoarthrose anerkannt (Menkes 1991).

Die OA ist die weltweit am häufigsten und weitesten verbreitete Erkrankung der Gelenke (Cicuttini und Spector 1995). Der signifikanteste Risikofaktor, an einer OA zu erkranken, ist das Alter (Elders 2000), (Felson; Zhang; Hannan; Naimark; Weissman; Aliabadi und Levy 1995), (Hart; Doyle und Spector 1999). Weiterhin ist aber noch das weibliche Geschlecht, Übergewicht, die allgemeine und die spezielle körperliche Belastung (z.B. viel Hockstellung) sowie die ethnische Zugehörigkeit von epidemiologischer Bedeutung (Cooper; Snow; McAlindon; Kellingray; Stuart; Coggon und Dieppe 2000), (Felson; Lawrence; Dieppe; Hirsch; Helmick; Jordan; Kington; Lane; Nevitt; Zhang; Sowers; McAlindon; Spector; Poole; Yanovski; Ateshian; Sharma; Buckwalter; Brandt und Fries 2000), (Hochberg 1991), (Felson und Chaisson 1997), (Felson; Nevitt; Zhang; Aliabadi; Baumer; Gale; Li; Yu und Xu 2002), (Zhang; Hunter; Nevitt; Xu; Niu; Lui; Yu; Aliabadiu und Felson 2004), (Zhang; Xu; Nevitt; Aliabadi; Yu; Qin; Lui und Felson 2001), (Inoue; Wicart; Kawasaki; Huang; Ushiyama; Hukuda und Courpied 2000), (Hoaglund und Steinbach 2001), (Oishi; Hoaglund; Gordon und Ross 1998), (D'Ambrosia 2005), (Ingvarsson 2000). Es gibt widersprüchliche Studien hinsichtlich der Bedeutung einer möglichen östrogenprotektiven Wirkung (Felson; Naimark; Anderson; Kazis; Castelli und Meenan 1987), (Kiel; Felson; Anderson; Wilson und Moskowitz 1987), (Zhang; McAlindon; Hannan; Chaisson; Klein; Wilson und Felson 1998), (Erb; Brenner; Gunther und Sturmer 2000). Zwillingsstudien und die Studien familiärer Risikofaktoren weisen auf die zunehmende Bedeutung genetischer Faktoren hin (Loughlin 2001), (Loughlin 2004). Die aktualisierten Daten der Chingford- (Hart et al. 1999), Lawrence- (Lawrence; Helmick; Arnett; Deyo; Felson; Giannini; Heyse; Hirsch; Hochberg; Hunder; Liang; Pillemer; Steen und Wolfe 1998), Bejing- (Zhang et al. 2001) und Framinghamstudie (Felson et al 1995), (Felson et al 1987) erhoben für die OA eine Inzidenz von ca. 1 bis 3,1% pro Jahr. Es wird geschätzt, dass 68% der über 55-Jährigen US-Bürger radiographisch nachweisbare Zeichen der Osteoarthrose zeigen. Von großer medizin-ökonomisch-soziologischer Bedeutung ist die zunehmende Prävalenz der OA der Bevölkerung bei zunehmendem Durchschnittsalter. Im Jahre 1995 lag die Prävalenz in den USA bei 15% und wird auf einen Wert von 18,2% im Jahre 2020 projiziert. Das Bevölkerungswachstum mit einberechnet ergäbe dies einen Anstieg der sypmtomatischen Arthrosepatienten von annährend 50% (Elders 2000), (Lawrence et al 1998).

Derzeit liegen über 50 Publikationen über kostenanalytische Erhebungen sozioökonomischer Auswirkungen vor (Rothfuss; Mau; Zeidler und Brenner 1997). Die

jährlichen Kosten der Gesellschaft für medizinische Versorgung, Lohn- und Produktionsausfall wurden 1999 in den Vereinigten Staaten auf 65 Milliarden US-Dollar geschätzt (Elders 2000). Die Osteoarthrose wird in primäre (endogene Systemfaktoren) und sekundäre (biomechanische Faktoren) Formen unterteilt. Eine tabellarische Anordnung der ätiologischen Faktoren ist in Abbildung 1.1 aufgeführt.

Endogene Systemfaktoren	Biomechanische Faktoren
• Lebensalter • Geschlecht • genetische Disposition • ethnische Zugehörigkeit • endokrine Systemerkrankungen • Hormontherapien • Medikamentennebenwirkungen (Kortikosteroide, NSAIDs) • Nahrungsmittelzusammensetzung	• Körpergewicht • körperliche Beanspruchung • Zwangshaltungen (hocken) • vorausgehende Verletzungen • Inkongruenz der Gelenkflächen • Achsenabweichung • neuromuskuläre Imbalance • muskuläre Instabilität

Abbildung 1.1 ordnet tabellarisch die ätiologischen Faktoren der Osteoarthrose (Frei nach Mandelbaum und Waddel 2005)

1.2 Pathogenese der Knorpeldestruktion

Im Gegensatz zur lange Zeit vorherrschenden Lehrmeinung, dass die Ursache der OA allein in Abnutzung und Trauma zu suchen sei, wird heute die Osteoarthrose als Endpunkt einer komplexen Serie von Ereignissen verstanden, bei der verschiedene Faktoren wie Übergewicht, anatomische Abweichungen oder Trauma sowie eine abweichende Knorpelphysiologie einschließlich Alter, genetische und metabolische Faktoren und Entzündungsprozesse zu biophysikalischen und biochemischen

Veränderungen führen, die in einem Knorpelzusammenbruch kulminieren (Mandelbaum und Waddell 2005). Beim Ablauf dieser biologischen Reaktionen an den beteiligten Geweben (Gelenkknorpel, Synovia) spielen insbesondere ihrer Zellen (Synoviozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Chondrozyten, Osteozyten) und ihrer Zellstoffwechselprodukte (modulatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen, Radikale), eine entscheidende Rolle.

Diese biologischen Reaktionskaskaden können infolge eines pathobiomechanischen Triggers über biochemische Veränderungen konsekutiv zum morphologischen Korrelat einer Knorpelläsion führen, falls die protektiven, kompensierenden oder rekonstruktiven Mechanismen des komplexen Gesamtsystems „Gelenk“ überfordert sind, die Integrität der Knorpelmatrix zu sichern (Berg van den WB 1993), (Soren; Cooper und Waugh 1988). Von dieser strukturellen Integrität der Knorpelmatrix hängt die biomechanische Funktion des Gelenks ab. Das metabolische Gleichgewicht der Knorpelmatrix, bei dem sich Anabolismus und Katabolismus die Waage halten, wird hierbei zur bedeutensden Grundlage des pathogenetischen Verständnisses.

Bei pathophysiologischer Betrachtung des destruierenden, meist zunächst fokalen Knorpelprozesses der Osteoarthrose, rücken zunehmend die molekularbiologischen und biochemischen Aspekte in den Vordergrund. Goldring stellte fest, dass multiple äthiologische Faktoren, einschließlich mechanische, biochemische und genetische Faktoren, zur Imbalance der Synthese und der Destruktion des Gelenkknorpels bei der OA beitragen. (Goldring 2000). Häufig wird in der Literatur zwischen biomechanischer, biochemischer und genetischer Ätiologie der OA unterschieden (Goldring 2000), (Howell 1986). Die Knorpeldestruktion stellt jedoch eine gemeinsame Endstrecke in der Pathogenese der Osteoarthrose dar, unabhängig von der auslösenden Ursache (Ehrlich; Armstrong; Treadwell, and Mankin 1986).

Die enzymatische Degradation der extrazellulären Knorpelmatrix mit Destruktion der Polyglykan- und Kollagenstruktur ist lange als pathomorphologisches Korrelat der Osteoarthrose bekannt (Kuettner 1992), (Poole AR 1986), (Woessner und Gunja-Smith 1991), deren Ausmaß oft direkt -neben der hiermit einhergehenden subchondralen Ossifikation- mit dem Schweregrad der Funktionsbeeinträchtigung des Gelenks assoziiert ist. Insbesondere spielen hierbei die destruktiven, kartilaginären enzymatischen

Proteinasen aus der Familie der zinkabhängigen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine führende Rolle (Kuettner 1992), (Martel-Pelletier; Cloutier und Pelletier 1986).

An dem morphologischen und biochemischen Regelkreis der Organstrukturen des Gelenkes, der die Homöostase der Gelenkbeanspruchung und der Gelenkerhaltung aufrecht erhält, sind das Synovialgewebe mit den Synoviozyten, die Zytokine, die Wachstumsfaktoren, die Enzyme und Enzyminhibitoren, die nichtenzymatischen Faktoren, die Chondrozyten und die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels beteiligt.

Wie groß der Anteil der verschiedenen Parameter bei der Pathogenese ist, konnte bisher nicht endgültig geklärt werden.

Dass das Knorpelgewebe gesunder Patienten suffiziente homöostatische Mechanismen aufweist, zeigt die Tatsache, dass es Menschen gibt, bei denen auch nach 6 bis 7 Lebensdekaden ein vollkommen intakter Gelenkknorpel vorliegt.

1.2.1 Die Struktur des hyalinen Knorpels

Menschliches Knorpelgewebe ist ein stoßabsorbierendes Stützgewebe, das aus Zellen (Chondrocyten) und den von ihnen produzierten interzellulären Substanzen (extrazelluläre Matrix) aufgebaut ist. Die Chondrozyten, die sich im Gewebe in einer arkadenförmigen Architektur anordnen, liegen dabei in Knorpelhöhlen, den sogenannten Chondronen (isogene Gruppen von ca. 10 Zellen). Obgleich die Chondrozyten die extrazelluläre Matrix produzieren und damit die Eigenschaften des Gewebes kontrollieren, machen sie nur bis zu 5% der Gesamtmasse aus (Buckwalter JA 1987). Der Hauptbestandteil des Knorpels ist mit 65 bis 80% das Wasser. Der übrige Anteil wird durch die extrazelluläre Matrix bestimmt (Mandelbaum und Waddell 2005) (Abbildung 1.2). Den histologischen Aufbau des Knorpels zeigt Abbildung 1.3.

Bestandteil	**Anteil in %**
Wasser	65 – 80
Chondrozyten	5
Kollagen	Restbestandteile
Andere Matrixproteine	
Hyaluronsäure	
Glykosaminoglykane / Aggrecan	
Kleine Proteoglykane	

Abbildung 1.2 Bestandteile des human hyalinen Knorpels [frei nach (Mandelbaum and Waddell 2005)]

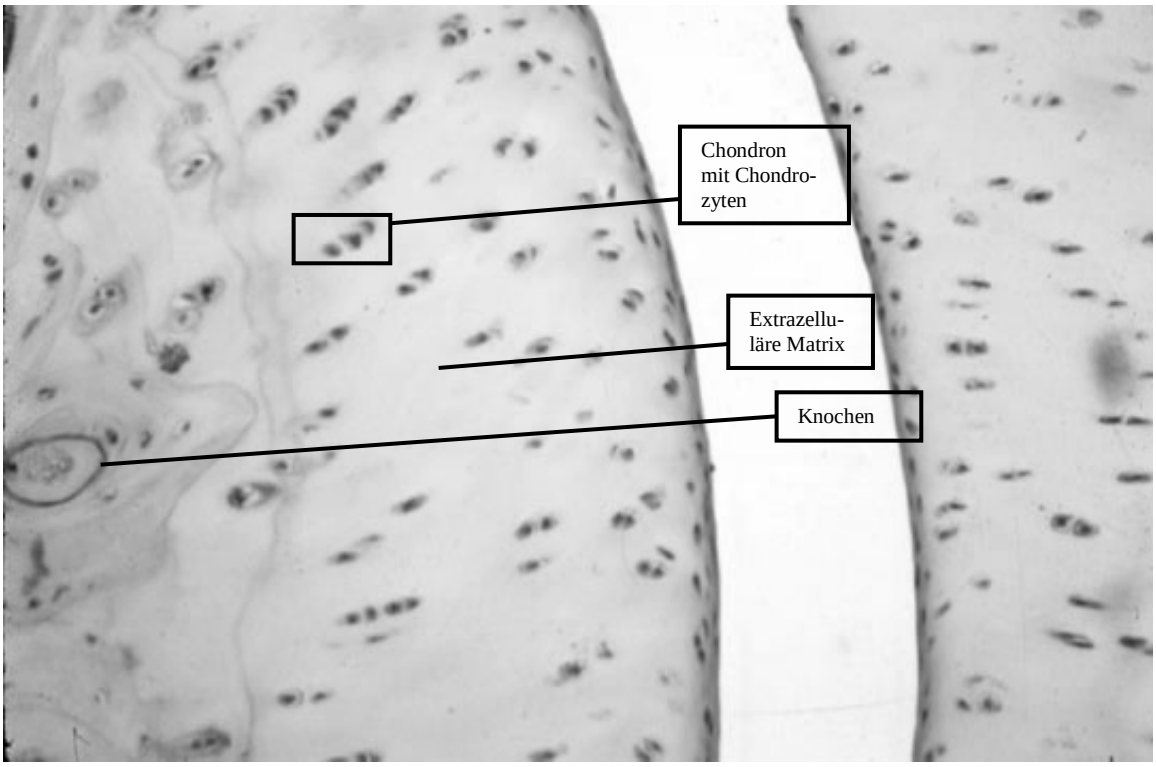

Abbildung 1.3: Histologische Darstellung artikulären hyalinen Knorpels [frei nach John D. Soule, Wm. H. Crawford].

Die Erkenntnis, dass Knorpel eine lebendige und dynamische Struktur und keine statische ist, war entscheidend für die Entwicklung unseres jetzigen Verständnisses der Pathophysiologie bei der OA. Gesunder Knorpel befindet sich in einem Fließgleichgewicht zwischen Matrixauf und -abbau. Die der Erkrankung Vorschub leistende Tatsache ist die andauernde Imbalance zwischen diesen beiden Vorgängen zugunsten des Matrixabbaus (Mandelbaum und Waddell 2005).

Der adulte Knorpel ist ein bradytrophes Gewebe ohne eigene Gefäßversorgung und Innervation. Die nutritive Versorgung des Chondrozyten erfolgt ausschließlich über den Nährstofftransport via Diffusion aus der Synovialflüssigkeit. Das quantitative Verhältnis zwischen Zellen und Matrix und die qualitative Zusammensetzung der Faserstruktur (Kollagenzusammensetzung) des Knorpels bestimmen die Knorpelart. Man unterscheidet den hyalinen Knorpel vom Faserknorpel und vom elastischen Knorpel (Benninghoff A 1993). Die Bezeichnung „hyalin“ weist dabei auf das homogen eosinophile Färbeverhalten des Gelenkknorpels bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung hin (Junqueira LC) und ist ein rein deskriptiver Begriff, von dem sich keine weiteren morphologischen oder pathogenetischen Aussagen ableiten lassen.

Die Chondrozyten, Synoviozyten und Osteozyten sind als weiterdifferenzierte Fibroblasten, von gleicher embryologische Herkunft und stammen von der mesenchymalen Zellreihe ab (Alberts B 1997).

Die Eigenschaft dieser differenzierten Bindegewebszelle durch die Sekretion der Interzellularsubstanz ihre eigene perizelluläre Umgebung zu gestalten und damit die Eigenart des Gewebes zu definieren, betont die Bedeutung dieser Zelle in ihrem Gewebe (Poole; Flint, and Beaumont 1987). Die biochemischen und biophysikalischen externen Einflüsse sind hierbei die maßgeblichen Prozesse für den metabolischen Status der Knorpelzelle (van de Loo; Joosten; van Lent; Arntz, and van den Berg 1995). In Kenntnis der potentiellen metabolischen Leistung zur Protein- und Kohlenhydratsynthese, zu der der hauptsächlich stoffwechselruhige Chondrozyt in der Lage ist, wird die Zellstruktur verständlich. Bei ultrastruktureller Betrachtung fällt das Organellenreichtum an rauem endoplasmatischen Retikulum, Mitochondrien und Golgiapparat auf (Junqueira LC).

Die gesunde Knorpelmatrix besteht aus Kollagenfasern, die mit Proteoglykankomplexen verflochten sind. Das Rückgrat jedes Proteoglykankomplexes ist ein langes Hyaluronsäuremolekül, das über Verbindungsproteine mit großen Glykosaminoglykanmolekülen (Aggrekan) vernetzt ist. Die komplette Struktur dieser Matrix stattet den Knorpel mit seinen wichtigsten biomechanischen Eigenschaften aus: Kompressibilität und Elastizität. Von allen Molekülen scheinen die Aggrekane die größte Rolle für diese Eigenschaften zu spielen (Moreland 2003), (Yamanishi; Boyle; Clark; Maki; Tortorella; Arner und Firestein 2002). Die Knorpelgrundsubstanz ist sehr wasserhaltig. Dabei weisen die Proteoglykane die größte Wasserbindungskapazität auf: 50 mg Proteoglykane binden 400 mg Knorpelwasser (Maroudas A 1986).

In diese nicht-fibrilläre Grundsubstanz sind fibrilläre Proteine (Kollagene) eingebettet. Kollagene sind die Hauptproteine der extrazellulären Matrix und repräsentieren mit 25-30% des Gesamtkörperproteins das größte Proteinkollektiv im Organismus (Alberts B 1997). Sie bestehen aus drei Polypeptidketten die eine Tripelhelix bilden und einen hohen Anteil an Glyzin, Prolin, Hydroxyprolin und Hydrolysin enthalten. Diese tripelhelikale Struktur des Kollagens führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen. Von den bekanntesten 5 Kollagenen (I, II, III, V, XI), der insgesamt 19 entdeckten Kollagentypen (Alberts B 1997), besteht der hyaline Gelenkknorpel zu über 90% aus Kollagen II (Burgeson und Nimni 1992), (Miller 1972).

Die drei dominierenden Bestandteile des Knorpels sind somit die Kollagene, die Proteoglykanaggregate und das Proteoglykan Hyaluron. Sie sind für annähernd 90 % des Knorpeltrockengewichtes verantwortlich (Kuettner 1992).

Im wesentlichen sind der Gehalt und Zustand von Proteoglykanen für die Viskosität (Greiling H 1995) und der Gehalt und Zustand von Kollagenfibrillen für die Elastizität und die Reißfestigkeit des Gelenkknorpels verantwortlich (Schenk RK 1986).

Diese drei biomechanischen Eigenschaften (Viskosität, Elastizität und Reißfestigkeit) definieren die Funktionseigenschaft des hyalinen Knorpels.

1.2.2 Die Struktur der Synovialis

Neben dem Knorpelbestandteil eines Gelenks trägt auch noch die Synovia an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen bei: Die nichtkartilaginäre Oberfläche des Gelenkinnenraumes wird von einer zweilagigen, als Synovialis bezeichneten Zellschicht, ausgekleidet.

Sie setzt sich aus der inneren (intimalen) und äußeren (subintimalen) synovialen Schicht zusammen. Die Intima besteht aus 1-4 Lagen von synovialen Deckzellschichten und ist mit Blutgefäßen, Lymphgefäßen und Nervenstrukturen versorgt. Die Subintima enthält spärlich Blut- und Lymphgefäße.

Zwischen der Intima und der Subintima existiert im Gegensatz zu anderen serösen Häuten keine Basalmembran. Daneben finden sich im Synovialgewebe Makrophagen, Leukozyten, Lymphozyten sowie Plasma-, Mast- und Fettzellen (Benninghoff A 1993).

Bereits 1962 hat Barland (Barland; Novikoff und Hamerman 1962) die von den Fibroblasten abstammenden (Alberts B 1997) Typ-A und Typ-B Synoviozyten der Intima beschrieben. Obwohl beide embryologisch von den Mesenchymzellen abgeleitet werden (David DV 1946), wird die Typ-A Zelle von den Stammzellen des Knochenmarks gebildet (Edwards und Willoughby 1982). Der makrophagenähnliche Synoviozyt wird morphologisch und funktionell dem Monozyten-Makrophagen-System zugeordnet. So wie die Makrophagen besitzen die vermehrt in der Abwehrfunktion stehenden A-Synoviozyten die Fähigkeit, Fc-Rezeptoren und C_3-Rezeptoren zu exprimieren und sind so in der Lage, Immunglobuline und Komplement zu binden (Theofilopoulos; Carson; Tavassoli; Slovin; Speers; Jensen und Vaughan 1980).

Der Typ-B Synoviozyt hingegen hat ein eher fibroblastenähnliches Aussehen und Funktion, indem er reichlich extrazelluläre Matrix sezerniert. Außerdem exprimiert er Uridindiphosphoglukosedehydrogenase (UDPGD) (Pitsillides; Wilkinson; Mehdizadeh; Bayliss und Edwards 1993). Dieses Enzym ist für die Hyaluronsäuresynthese verantwortlich. Die Markierbarkeit des B-Synoviozyten mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Mab67) ist ebenfalls ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zu den A-Synoviozyten (Stevens; Mapp und Revell 1990). Die durchschnittliche Lebensdauer dieser beiden Zelltypen wird mit einer Halbwertzeit von ca. 2 Wochen angegeben (Henderson und Pettipher 1985).

Wie für das Bindegewebe charakteristisch enthält die Synovialis reichlich extrazelluläre Matrix, die sich aus Kollagenen (I,III,IV,V,VI), Proteoglykanen und Fibronektin zusammensetzt (Ashhurst; Bland und Levick 1991).

Die Hauptaufgabe des Synovialis ist die Ernährung des avaskulären Knorpels und der weiteren intraartikulären bradytrophen Gelenkstrukturen (Binnenbänder, Menisken). Außerdem dient die Sekretion von Synovialflüssigkeit der Erhöhung der Gleitfähigkeit und der Stabilität der Gelenkmechanik sowie der intraartikulären, biochemischen Homöostase (Henderson B 1987). Die Synovialis kontrolliert somit die Menge und die Zusammensetzung der Gelenkflüssigkeit.

Synovialflüssigkeit besteht aus dem Dialysat des Blutplasmas und enthält damit plasmaäquivalente Konzentrationen von niedermolekularen Substanzen (Benninghoff A 1993). Hinzu kommen die Syntheseprodukte des Knorpels und der Synovia. Das Hyaluron, welches die B-Synoviozyten sezernieren (Pitsillides et al. 1993), verleiht der Gelenkflüssigkeit die visköse Eigenschaft. Synoviozyten und Chondrozyten produzieren bei vornehmlich glykolytischer Stoffwechsellage reichlich Laktat. Aufgrund der Pufferkapazität der Synovia reguliert sich ihr pH-Wert zwischen 7,3-7,6.

Jegliche Substanz, die über die Synovialgefäße in Gelenknähe transportiert wird, muss zuvor durch die nicht frei permeablen Strukturen des Gefäßendothels und der extrazellulären Matrix diffundieren. Großmolekularen Proteinen und Leukozyten ist daher physiologischerweise der Zutritt in das Synovium und in die Gelenkhöhle nicht möglich. Der Abtransport der Substanzen erfolgt über das lymphatische System des Subsynoviums. Der Umsatz ist dabei unabhängig vom Molekulargewicht. Durch die negative Bilanz der zu- und abfließenden Flüssigkeiten erzeugt das Synovium so einen negativen subatmosphärischen Druck von ca. - 4 mm Hg (Simkin und Benedict 1990).

Aus dieser zentralen Rolle der Synovialis für die Gelenkphysiologie ergeben sich die möglichen pathologischen Einflüsse für Gelenkerkrankungen. Wird die Synovialis biomechanisch oder biochemisch stimuliert, reagiert sie mit der Produktion von Zytokinen (Interleukinen: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α), Wachstumsfaktoren (basic fibroblast growth factor: bFGF, transforming growth factor-β: TGF-β), Eicosanoiden und freien Radikalen (Simkin 1991). Durch die Erhöhung der Permeabilität in den Synovialgefäßen kann es nach Eintritt makromolekularer Proteine zum vermehrten

Flüssigkeitseintritt und zur Infiltration immunkompetenter Zellen in die Synovialis kommen.

Damit ist die Synovialis umfangreich an immunmodulatorischen und –regulatorischen Prozessen der Gelenkphysiologie beteiligt.

1.2.3 Die Homöostase der kartilaginären Matrix

Sowohl die Chondrozyten einerseits als auch die extrazelluläre Matrix andererseits tragen zur Herstellung eines funktionellen Fließgleichgewichtes (Homöostase) bei und sorgen damit für die Aufrechterhaltung der Viskosität, Elastizität und Reißfestigkeit des hyalinen Knorpels.

Die Grundlage dieser Homöostase ist der Informationsaustausch der zellulären und extrazellulären Einheiten untereinander. Diese Informationen sind für den Chondrozyten essentiell, um sich den ständig veränderten biochemischen Einflüssen und den veränderten biomechanischen Belastungen anzupassen.

Auf äußere Einflüsse reagiert das Knorpelgewebe mit stetigem Zellumsatz und Strukturumbau. Trotzdem der hyaline Knorpel ein bradytrophes Gewebe darstellt, ist die Struktur der Extrazellulärmatrix (ECM) keinesfalls statisch. Die Halbwertzeit der Proteoglykane liegt bei einigen Wochen bis Monaten, die der Kollagene wird auf einige Jahre geschätzt (Petit B 1995).

Die Interaktion der Chondrozyten untereinander und mit der ECM geschieht auf unterschiedlichen Kommunikationsebenen. Kommunikationsmittel sind dabei jeweils Botenstoffe (Mediatoren), welche durch Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine repräsentiert werden. An dieser Interaktion beteiligen sich in noch nicht ausreichend bekanntem Maße die Synovialfibroblasten des Synoviums und der Synovialflüssigkeit.

Die Homöostase ist für die Knorpelphysiologie von grundlegender Wichtigkeit. Wird sie in irgendeiner Form durch gleichgewichtsbelastende Faktoren gestört, kommt es durch pathophysiologische Vorgänge zu einer substantiellen Gewebsschädigung. Daraus kann eine Funktionsbeeinträchtigung resultieren. Veränderte biologische Strukturen der extrazellulären Matrix (Proteoglykanreduktion, Kollagenumbau) führen wiederum zu

veränderten biomechanischen Eigenschaften des Knorpels. Der Knorpel würde hierdurch sein essentielles Bauprinzip einbüßen.

Dies stellt den Eingang zu einem Circulus vitiosus dar, der, falls er nicht durch Kompensationsmechanismen (z. B. Inhibitoren der MMPs) oder durch rekonstruierende Prozesse (Reparation) aufgehalten wird, zu einer fortwährenden Knorpeldestruktion und damit zu einer klinisch apparenten Osteoarthrose führt. Die Knorpelhomöostase stellt also eine conditio sine qua non für die Integrität und die Funktion der Knorpelmatrix dar. Die Osteoarthrose definiert sich somit über ein aus dem Ruder gelaufenes physiologisches Gleichgewicht zu Ungunsten der Reparation (Dean; Martel-Pelletier; Pelletier; Howell und Woessner 1989).

1.2.4 Die Zytokine

Zytokine sind lösliche Proteine von geringem Molekulargewicht, die für die Immunantwort auf Antigene produziert werden. Sie funktionieren als chemischer Botenstoff zur Regulation des Immunsystems. Sie werden von nahezu allen immunkompetenten und anderweitig an der Immunantwort beteiligten Zellen produziert, besonders aber von den T-4-Helfer-Lymphozyten. Die Aktivierung anderer zytokinproduzierender Zellen löst bei ihnen die Synthetisierung und Sekretion eigener Zytokine aus. Diese Zytokine sind in der Lage an spezifische Zytokinrezeptoren anderer Zellen des Immunsystems zu binden und deren Aktivität entweder zu stimulieren oder zu inhibieren. Zytokine sind pleiotropisch (sie können an verschiedenen Zelltypen wirken), redundant (verschiedene Zytokine können die gleiche Funktion ausüben) und multifunktional (ein Zytokin kann verschiedene Funktionen ausüben). Zytokine können sowohl antagonistisch als auch agonistisch wirken.

Zu der Familie der Zytokine gehören die proinflammatorischen, immunregulatorischen und wachstumsstimulierenden Zytokine, die Chemokine, die Interferone und weitere Entzündungsmediatoren. Zu dieser letztgenannten Untergruppe zählen die Prostaglandine, die Leukotriene, neurogene Mediatoren und die Histamine (biogene Amine).

Die Zytokine werden über autokrine, parakrine und zum Teil endokrine Mechanismen sezerniert. Die Produktion und Sekretion geschieht schnell, die Wirkung setzt aber

langsam -über Stunden- ein. Ihre Wirkung an der Zielzelle entfalten sie nach Bindung an spezifische, hochaffine Zytokinrezeptoren, infolgedessen es durch Signaltransduktion zur Bildung von mRNA und zur Induktion oder Repression der Proteinsynthese kommt.

Die bisher bekanntesten, für den Arthroseprozess verantwortlichen Zytokine, mit Auflistung sowohl entzündungsfördernder als auch entzündungshemmender Botenstoffe, sind die Interleukine IL-1α, IL-1β, IL-4 (Bendrups; Hilton; Meager und Hamilton 1993), (Dechanet; Taupin; Chomarat; Rissoan; Moreau; Banchereau und Miossec 1994), IL-6 (Guerne; Zuraw; Vaughan; Carson und Lotz 1989), (Nietfeld; Wilbrink; Helle; van Roy; den Otter; Swaak und Huber-Bruning 1990), (Pelletier; McCollum; Cloutier und Martel-Pelletier 1995), IL-8 (Lotz; Terkeltaub und Villiger 1992), IL-10 (Hart; Ahern; Smith und Finlay-Jones 1995), IL-11 (Maier; Ganu und Lotz 1993), IL- 13 (Jovanovic; Pelletier; Alaaeddine; Mineau; Geng; Ranger und Martel-Pelletier 1998), IL-17 (Jovanovic; Di Battista; Martel-Pelletier; Jolicoeur; He; Zhang; Mineau und Pelletier 1998), der Leukämieinhibitorfaktor (LIF) (Lotz; Moats und Villiger 1992), (Villiger; Geng und Lotz 1993), Arachidonsäurederivate (Colantuoni; Quintero; Panasyuk; Abderrahim und Mitrovic 2005), NO (Chan; Caron; Rosa und Orth 2005) und TNF-α. Hinzu kommt der IL-1Rezeptorantagonist, er ist ein natürlicher kompetitiver Antagonist mit Affinität zum Il-1 Rezeptor (Arend 1993). Zu den Interleukinen IL-1α, IL-1β und dem Tumornekrosefaktor TNF-α gibt es bei der Osteoarthrose ausreichend valide Daten (Aggarwal; Kohr; Hass; Moffat; Spencer; Henzel; Bringman; Nedwin; Goeddel und Harkins 1985), (Alaaeddine; DiBattista; Pelletier; Cloutier; Kiansa; Dupuis und Martel-Pelletier 1997), (Amin 1999), (Bertolini; Nedwin; Bringman; Smith und Mundy 1986), (Dinarello 1996), (Dingle; Page Thomas und Hazleman 1987), (Ganu; Hu; Melton; Winter; Goldberg; Haqqi und Malemud 1994), (Nietfeld et al. 1990), (Plows D 1995), (Siders; Klimovitz und Mizel 1993), (Smith; Triantafillou; Parker; Youssef und Coleman 1997), (van de Loo et al. 1995), (Westacott; Atkins; Dieppe und Elson 1994), die in dem komplex verwobenen pro- und antiinflammatorischen Zytokinalgorhythmus die prominente und wesentliche Schlüsselfunktion dieser proinflammatorischen Zytokine IL-1α, IL-1β und TNF-α bei der Generierung von kartilaginären Proteasen belegen.

Interleukin-1 liegt in zwei wirkungsgleichen Isoformen (IL-1α, IL-1β) vor. Das hauptsächlich als Vorstufe synthetisierte Pro-IL-1β ist 31 KD groß (Siders et al. 1993) und wird durch das IL-1β-converting-enzyme (Wilson; Black; Thomson; Kim; Griffith;

Navia; Murcko; Chambers; Aldape und Raybuck 1994), (Kronheim; Mumma; Greenstreet; Glackin; Van Ness; March und Black 1992) in die 17 KD große, bioaktive, signalreiche Sequenz transformiert. Es wird, neben den Epithel- und Endothelzellen, den Fibroblasten und Chondrozyten, von den Monozyten und Makrophagen gebildet.

Die zwei Isoformen des IL-1 werden bei der Osteoarthrose in erster Linie von der Synovialmembran -vorwiegend extrazellulär- synthetisiert (Pelletier; DiBattista; Roughley; McCollum und Martel-Pelletier 1993). Die Bildung wird durch Lipopolysacharid, TNF-α, Kontakt mit CD-4 Monozyten und vor allem IL-1 selbst ausglöst. Die biologische Aktivität an den Zielzellen des Gelenkgewebes (Fibroblasten, Chondrozyten) entfaltet das IL-1 über die Bindung an zwei spezifische Oberflächenrezeptoren (IL-1R Typ I und Typ II) (Slack; McMahan; Waugh; Schooley; Spriggs; Sims und Dower 1993). Nachgewiesen ist die signifikant erhöhte Anzahl an IL-1R Typ I -Rezeptoren bei Chondrozyten und Fibroblasten bei der Osteoarthrose (Martel-Pelletier; McCollum; DiBattista; Faure; Chin; Fournier; Sarfati und Pelletier 1992), wodurch die Sensitivität dieser proteasenproduzierenden Zellen für dieses Interleukin-1 erheblich gesteigert wird. Aus der größeren Affinität des IL-1β zum IL-1R Typ I–Rezeptor scheint sich die größere biologische Aktivität des IL-1β abzuleiten. Die Bedeutung des IL-1R Typ II-Rezeptors ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Die Hochregulation der proteasen- und prostaglandinproduzierenden Gene in den Chondrozyten konnte in *in vitro* Untersuchungen für das IL-1 und das TNF-α gezeigt werden. Des weiteren konnte die inhibierende Wirkung von IL-1 und TNF-α auf die Synthese von Kollagen II und Proteoglykanen (Aggrekan) in der Knorpelmatrix gezeigt werden (Le und Vilcek 1987), (Thumb 1995).

IL-1 und TNF-α unterhalten durch autokrine Stimulation ihre eigene Synthese und stimulieren Synovialzellen und Chondrozyten auch zur Produktion anderer Zytokine (IL-6, IL-8, LIF). Zusammengefasst sind IL-1 und TNF-α in der Lage, die Bildung einer Vielzahl anderer Interleukine in immunkompetenten Zellen zu stimulieren.

Im Gegensatz zu TNF-α (Tumornekrosefaktor) ist IL-1 auch in hoher Konzentration nicht zytotoxisch. Der zum Teil auch in löslicher Form vorliegende IL-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) stellt einen natürlich vorkommenden Inhibitor der IL-1 Wirkung dar. Die biologischen Effekte des IL-1 und TNF-α sind konzentrationsabhängig.

Der Tumornekrosefaktor-α wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von stimulierten T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen freigesetzt (Vassalli 1992). Für die Pathogenese der Osteoarthrose ist er so bedeutsam wie das Interleukin-1.

Das TNF-α–Protein besteht aus 157 Aminosäuren bei einer Größe von 17 KD und wird nach Abspaltung von 76 Aminosäuren des Prähormons durch das TNF-α –converting-enzyme (TACE) als dreieckige Kegelstruktur sezerniert (Aggarwal et al. 1985). TACE ist ein Adamalysin-Enzym und auch für die Expression der TNF-α-Rezeptoren an den Zielzelloberflächen erforderlich (Black; Rauch; Kozlosky; Peschon; Slack; Wolfson; Castner; Stocking; Reddy; Srinivasan; Nelson; Boiani; Schooley; Gerhart; Davis; Fitzner; Johnson; Paxton; March und Cerretti 1997). Von TNF-α sind gegenwärtig zwei Subtypen bekannt, die sich anhand ihres Molekulargewichts unterscheiden und daher an spezifischen Rezeptoren binden (TNF-R55 und TNF-R75). Bei der Osteoarthrose spielt besonders das TNF-R55 eine herausragende Rolle, da hier der RN-R55-Rezeptor hochreguliert ist (Loetscher; Pan; Lahm; Gentz; Brockhaus; Tabuchi und Lesslauer 1990), (Schall; Lewis; Koller; Lee; Rice; Wong; Gatanaga; Granger; Lentz; Raab und 1990), (Alaaeddine et al. 1997), (Westacott et al. 1994).

Interleukin-6 (Hepatocyte Stimulating Factor, Plasmocytoma Growth Factor oder β-2-Interferon) (Gramatzki M 1992), ist ein äußerst vielseitiges Inerleukin, dass verschiedenste Zelltypen zum Ziel hat. IL-6 wird von Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Keratinozyten, aktivierten T-Zellen und von Mesangiumzellen gebildet. Es ist in die pathogenetischen Mechanismen der Osteoarthrose ähnlich eingebettet wie IL-1 und TNF-α, indem es die Anzahl immunkompetenter Zellen im Synovialgewebe erhöht (Guerne et al. 1989), die Proliferation der Chondrozyten stimuliert und die biologischen Effekte des IL-1 bei der Matrix-Metalloproteinasen-Synthese und der Proteoglykansyntheseinhibition verstärkt (Nietfeld et al. 1990). Außerdem ist es an der Regulation der Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) beteiligt. Eine Übersicht über Herkunft und Zielzellen des IL-6 gibt Abbildung 1.4.

	Herkunft	↑↓Zielzellen				
		Endothel	T-Zellen	Makrophagen	Fibroblasten	Knorpel
TNF-α	Monozyten Makrophagen T-Zellen Mastzellen NK-Zellen	↑Proliferation ↑↑Adhäsions-moleküle ↑ IL-1	↑Proli-feration	↑ IL-1 ↑ HLA-DR	↑Proliferation ↑IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF ↑ PGE_2,	↓Proteogly-kansynthese ↑Knochen-resorption
IL-1	Monozyten Makrophagen Endothelien Epithelien Fibroblasten Chondrozyten	↑Proliferation ↑↑Adhäsions-moleküle	↑Proli-feration		↑IL-6,IL-1, GM-CSF ↑Kollagenase und Stromelysin-synthese in Chondrozyten	↓Proteogly-kansynthese ↑Knochen-resorption ↑Kollagenase u.Stromelysin-synthese
IL-6	Monozyten Makrophagen Fibroblasten T-Zellen Keratinozyten Epithelien		Differen-zierung zyto-toxischer T-Zellen		↑IL-1-Wir-kung ↑Plasminogen aktivator ↑TIMP(vitro)	↑TIMP(vitro)

Abbildung 1.4 stellt die biologischen Effekte der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-α an den Zielzellen dar. (↑= erhöhte, ↓=erniedrigte; zusammengestellt nach (Aggarwal et al. 1985), (Alaaeddine et al. 1997), (Amin 1999), (Bertolini et al. 1986), (Dinarello 1996), (Ganu et al. 1994), (Gramatzki M 1992), (Plows D 1995), (Siders et al. 1993), (van de Loo et al. 1995), (Westacott et al. 1994)).

1.2.5 Die Matrix-Metalloproteinasen

Die Metalloproteinasen gehören zu der Familie der Proteinasen, zu der außer den Metalloproteinasen auch noch die Aspartat-, Cystein- und Serinproteinasen gehören (Alberts B 1997), (Stryer L 1993).

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zählen neben den Astacins, Serralysins und Adamalysins (ADAMs, ADAMTs) zu der Superfamilie der Metalloproteinasen (Martel-Pelletier J 2001). Mit der Subfamilie der membranständigen Matrix-Metalloproteinasen

(MT-MMP) gehören dieser ständig wachsenden Familie der Matrix-Metalloproteinasen zurzeit 25 Subtypen an (siehe Abbildung 1.5).

Die MMPs wurden 1962 von Gross und Lapiere zuerst beschrieben (Gross und Lapiere 1962). Inzwischen werden 25 verschiedene Subtypen der MMP-Familie unterschieden. (Puente; Sanchez; Overall und Lopez-Otin 2003). Zuletzt konnte von Lohi et al. (März 2001) das 25. und jüngste Familienmitglied beschrieben werden: das Epilysin (MMP-28) (Lohi; Wilson; Roby und Parks 2001)].

MMP	**Synonym**
MMP-1	Kollagenase-1, interstititielle Kollagenase, Fibroblastenkollagenase.
MMP-2	Gelatinase A, 72 KD Gelatinase, Typ IV-Kollagenase (72 KD)
MMP-3	Stromelysin-1, Transin-1
MMP-7	Matrilysin (PUMP-1)
MMP-8	Kollagenase-2, neutrophile Kollagenase
MMP-9	Gelatinase B, 92 KD Gelatinase, Typ IV-Kollagenase (92 KD)
MMP-10	Stromelysin-2, Transin-2
MMP-11	Stromelysin-3
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase
MMP-13	Kollagenase-3, Rattenkollagenase
MMP-14	MT-1MMP, Membran-Typ-MMP-1
MMP-15	MT-2MMP, Membran-Typ-MMP-2
MMP-16	MT-3MMP, Membran-Typ-MMP-3
MMP-17	MT-4MMP, Membran-Typ-MMP-4
MMP-18	Kollagenase-4, Xenophus-Kollagenase
MMP-19	
MMP-20	Enamelysin
MMP-21	
MMP-22	

MMP-23	CA-MMP
MMP-24	MT-5MMP, Membran-Typ-MMP-5
MMP-25	MT-6MMP, Membran-Typ-MMP-6, Leukolysin
MMP-26	Endometase, Matrylysin-2
MMP-27	
MMP-28	Epilysin

Abbildung 1.5 stellt die aktuell beschriebenen Matrix-Metalloproteinasen tabellarisch zusammen. Stand Februar 2006 (nach (Birkedal-Hansen; Cobb; Taylor und Fullmer 1976), (Chin; Murphy und Werb 1985), (Nagase; Barrett und Woessner 1992), (Nagase H 1993), (Okada; Nagase und Harris 1987), (Wu; Lark; Chun und Eyre 1991)).

Der Name der MMPs leitet sich aus der Zinkabhägigkeit der Proteinase ab. Sie sind Endopeptidasen. Die Matrix-Metalloproteinasen können -derzeit- in 3 Kollagenasen, 2 Gelatinasen, 3 Stromelysine und 6 membranständige Peptidasen untergruppiert werden, wobei das Matrylisin (MMP-7), die Makrophagen Elastase (MMP-12), das MMP-19, das Enamalysin (MMP-20), das MMP-26 und das Epilysin (MMP-28) diesen Subgruppen nicht zugeordnet werden können. Die Forscher D. Howell, R.W. Moskowitz, H. Nagase, die Pelletiers und J.F. Woessner haben die MMP-Forschung geprägt und ihre Ergebnisse in ungezählten Publikationen in verschiedensten Zeitschriften und Fachbüchern berichtet (Barret AJ 1998), (Dean et al. 1989), (Nagase und Woessner 1999), (Nagase et al. 1992), (Nagase H 1993), (Pelletier; Martel-Pelletier; Howell; Ghandur-Mnaymneh; Enis und Woessner 1983), (Sapolsky AL 1976), (Woessner und Gunja-Smith 1991), (Woessner 1999), (Woessner 1991), (Woessner 1998).

Die Eigenschaft, die Proteinasen zu Matrixmetalloproteinasen macht, ist nicht zwingend die Fähigkeit zur Degradation der ECM. Das Stromelysin-3 (MMP-11) und das CA-MMP (MMP-23) sind dazu beispielsweise nicht in der Lage (Mucha; Cuniasse; Kannan; Beau; Yiotakis; Basset und Dive 1998). Die Zugehörigkeit zu der Familie der MMPs wird vielmehr durch *strukturelle* und *funktionelle* Gemeinsamkeiten definiert (Vu und Werb 2000).

MMPs sind aktiv bei neutralem pH-Wert, enthalten zwei Zinkionen und drei Calciumionen als notwendigen integralen Bestandteil ihrer Struktur und benötigen zur

Aktivierung durch Plasminfaktoren zusätzlich Ca^{++}. Die nahe Verwandtschaft dieser methioninenthaltenden „**Met-zinc**ins“ ergibt sich aus der topologischen und sequenziellen Äquivalenz charakteristischer Aminosäurenketten. Als die wesentlichen Strukturmerkmale der Metzincins lassen sich verschiedene Domänen benennen: Die Prodomäne ist eine aus 80-90 Aminosäuren bestehende Polypeptidkette. Wird diese Peptidkette entfernt und somit das aktive Zentrum freigegeben und durch Konfirmationsänderung aktiviert, so ist die MMP nun für die eigentliche proteolytische Aktivität bereit. Die katalytische Domäne (das aktive Zentrum) bindet die 2 namensgebenden Zinkionen. Zusammen mit drei Calciumionen sind die Zinkionen über 3 Histidin- und einen Methioninbaustein kovalent an das Enzym gebunden. Diese Eigenschaft wiederholt sich in sämtlichen MMPs und spiegelt sich in einer Aminosäurengrundstruktur der MMPs wider: **H**Exx**H**xxGxx**H**S/Txxxxxx**M**. Eines der beiden Zinkionen hat eine strukturelle das andere eine am aktiven katalytischen Prozess teilnehmende Funktion (Stocker; Grams; Baumann; Reinemer; Gomis-Ruth; McKay und Bode 1995). Die katalytische Domäne ist 170-190 Aminosäuren lang und ist mit Ausnahme der Gelatinase A, dem Matrilysin und dem CA-MMP über eine kurze prolinreiche Peptidkette an eine haemopexin-like (vitronectin-like) Domäne geknüpft. Sie besteht aus 210 Aminosäuren. Der Name der Domäne leitet sich aus der strukturellen Ähnlichkeit zum Plasmaprotein Hämopexin ab, das als β-Globulin Häm binden kann. Die haemopexin-like Domäne der MMPs ist daher auch für die Substrataffinität verantwortlich. Daneben soll diese Domäne auch für die Komplexbindung an TIMPs von Bedeutung sein. Von diesem „Standarddesign“ der MMPs unterscheiden sich nur die Gelatinasen A und B (entsprechend MMP 2 und 9), die noch über eine zusätzliche gelatinebindende und das CA-MMP, dass über eine zusätzliche immunglobulinbindende Domäne verfügen.

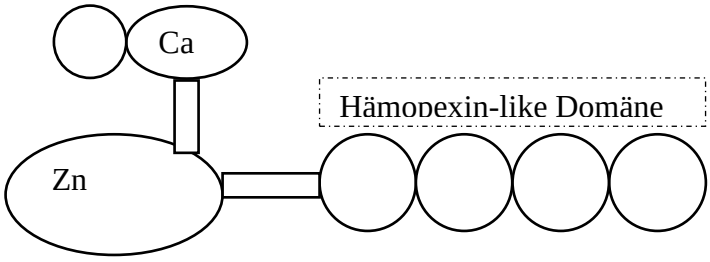

Abbildung 1.6 skizziert die Anordnung der strukturcharakteristischen MMP-Domänen (Egeblad M 2002).

Die Endopeptidasen der MMP-Familie sind an den vielschichtigsten und vielfältigsten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der strukturgebenden makromolekularen Komponenten (Kollagene, Proteoglykane, etc.) des Binde- und Stützgewebes beteiligt; daneben spielen Exopeptidasen und Glykosidasen nur eine untergeordnete Rolle. Die dynamische Strukturveränderung der ECM ist eine Grundvoraussetzung für die Anpassungsfähigkeit des Gewebes auf äußere und innere Einflüsse und biologischen Erfordernisse. Hierzu gehören Prozesse wie die Embryogenese, die Morphogenese, die Immunogenese, die Angiogenese, die Gewebsreparation und die Gewebsdegradation.

Die MMPs sind so mitbeteiligt an Proliferation, Differenzierung, Invasion, Migration und dem Tod der Zelle. Erst eine überschießende oder zu geringe Bildung der MMPs führt zu pathologischen Prozessen. Matrixdestruktive MMPs werden hauptsächlich von Zellen der mesenchymalen Zelllinie sezerniert. (siehe Abbildung 1.7).

Physiologische Prozesse	Pathologische Prozesse
• Embryogenese • Morphogenese • Ovulation • Cervixdilatation • Endometriumzyklus • Knorpel-/Knochenwachstum • Wundheilung • Angiogenese • Entzündung • Zelltod • Immunreaktion • Nervenwachstum	• Emphysem • Lungenfibrosen • Hautulzerationen • Leberzirrhose • Glomerulonephritiden • Arthritis • Neoplasien • Neoplastische Filialisierung • Zahnfleischerkrankungen • Magenulzerationen • Hornhautulzerationen • Myokardiopathien • Gefäßsystemerkrankungen • Morbus Alzheimer • Guillian-Barré-Syndrom

Abbildung 1.7 führt beispielhaft physiologische und pathologische Erkrankungen auf, bei denen MMPs involviert sind (zusammengestellt nach (Barret AJ 1998), (Greiling H 1995), (Nagase and Woessner 1999), (Simkin 1991), (Stryer L 1993)).

Zu den Induktoren der MMPs zählen hauptsächlich die Wachstumsfaktoren, die Zytokine, die Hormone, onkogenetische Faktoren und physikalischer Streß, zu den Supressoren zählen das TGF-β, die Retinoidsäure und die Glukokortikoide. Mit Ausnahme von MMP-11 und einiger membranständigen MMPs, welche intrazellulär durch serinähnliche Proteasen aktiv werden, werden die MMPs im Allgemeinen als inaktive Pro-Enzyme (Zymogene) sezerniert.
Die Aktivierung geschieht im wesentlichen durch proteolytische Enzyme wie Plasmin (Martel-Pelletier; Faure; McCollum; Mineau; Cloutier und Pelletier 1991), Trypsin und Cysteinproteasen (Cathepsinen), die die Abspaltung der Propeptidkette durch

Unterbrechung der Zink-Cystein-Bindung (Cystein-switch) katalysieren (Nagase und Woessner 1999).

Die Aufgabe der MMPs im Gelenk ist die Regulation der Knorpelphysiologie (Remodellierung des Knorpelgewebes). Durch das Aufrechterhalten des Fließ-gleichgewichtes aus Matrixsynthese und Matrixdegeneration sind sie maßgeblich an der Adaptation des Knorpels an biochemische und biomechanische Begebenheiten beteiligt.

Durch die Fähigkeit der MMPs die makromolekulare Struktur des Knorpel auflösen zu können sind sie auch am normalen Strukturumsatz (turnover) der ECM beteiligt. Im gesunden stoffwechselruhigen Gewebe bleiben dabei die Kollagenasen I und III, das Stromelysin (-1,-2,-3) und die Gelatinase unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (Nagase H 1993).
Für die Pathogenese der Osteoarthrose spielen vor allem folgende MMPs eine entscheidende Rolle: die Gelatinase-A (MMP-2), die Kollagenase-2 (MMP-8) und die Gelatinase-B (MMP-9), die interstitielle Kollagenase-1 (MMP-1) (Billinghurst; Dahlberg; Ionescu; Reiner; Bourne; Rorabeck; Mitchell; Hambor; Diekmann; Tschesche; Chen; Van Wart und Poole 1997), (Chin et al. 1985), (Fernandes; Martel-Pelletier; Lascau-Coman; Moldovan; Jovanovic; Raynauld und Pelletier 1998), (Vincenti; Coon; Mengshol; Yocum; Mitchell und Brinckerhoff 1998), das Stromylesin-1 (MMP-3) (Chin et al. 1985), (Gunja-Smith; Nagase und Woessner 1989), (Mehraban; Lark; Ahmed; Xu und Moskowitz 1998), (Murphy; Hembry und Reynolds 1986), (Okada; Shinmei; Tanaka; Naka; Kimura; Nakanishi; Bayliss; Iwata und Nagase 1992), (Saus; Quinones; Otani; Nagase; Harris und Kurkinen 1988), (Wu et al. 1991) und die Kollagenase-3 (MMP-13) (Billinghurst et al. 1997), (Fernandes et al. 1998), (Vincenti et al. 1998).
Natürlich tragen auch die Cathepsine (Keyszer; Redlich; Haupl; Zacher; Sparmann; Engethum; Gay und Burmester 1998), die Aggrekanasen und die membranständigen Matrix-Metalloproteinasen (MT-MMP) und eine Vielzahl weiterer substratspaltender Enzyme zur Degradation der ECM bei. Einen Überblick zu der Substratspezifität dieser vier Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1,-3,-8,-13) gibt Abbildung 1.8.

Die aktivierten Kollagenasen (MMP-1, -8 und –13) sind in der Lage, intakte Tripelhelixstrukturen des nativen Kollagens in thermolabile (bei 37 °C spontan zerfallende) Fragmente zu spalten. Die beiden Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) durchtrennen die einzelnen vordegradierten, denaturierten Kollagenpolypeptidketten in

weitere kleinere Fragmente. Die Gelatinasen zeigen eine besondere Substratspezifität zum -im hyalinen Knorpel wenig repräsentierten- Kollagen IV. Sie können native Tripelhelixstrukturen des fibrillären Kollagens I, II und III nicht aufspalten.

Die drei Stromelysine (MMP-3, MMP-10 und MMP-11) sind wiederum Proteinasen mit einem breiten Substratspektrum; sie zerlegen natives Kollagen und Proteoglykane gleichermaßen in große, aber lösliche Fragmente.

Kinetische Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass die Kollagenase-1 (MMP-1) eine Präferenz für das Kollagen III und II hat. Kollagentyp II wird hierzu im Vergleich 5fach langsamer degradiert. Kollagenase-2 (MMP-8) zeigt diese Präferenz für den Kollagentyp I. Das breiteste Wirkungsspektrum der drei Kollagenasen besitzt die Kollagenase-3 (MMP-13), ihre Präferenz liegt beim Kollagentyp II, welches im Vergleich zur Degradationsgeschwindigkeit der Kollagenase-1 eine 10fach schnellere Spaltungsgeschwindigkeit aufweist.

Darüber hinaus sind MMPs auch in der Lage „nicht-matrix“-Proteine zu proteolysieren.

MMP	Name	Substrat	Expression
MMP-1	Kollagenase-1, Interstitielle Kollagenase	Kollagen-Typ I, II, III, V, VII, VIII, X, Aggrekan, Gelatine,	Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten, Keratinozyten, Endothel- und Epithelzellen, Makrophagen, Hepatozyten
MMP-3	Stromelysin-1, Prokollagenaktivator	Kollagen-Typ II, IV, V, IX, X, XI, Aggrekan, Gelatine, Elastin, Proteoglykan, Fibronektin, pro-MMP-1, -8, -9, Laminin, Prokollagenase	Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten, Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen, Gefäßmuskelzellen
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen-Typ I, II, III, IV, V, IX, X, XI, Aggrekan, Gelatine, Laminin, Fibronektin,	Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten
MMP-8	Kollagenase-2, neutrophile Kollagenase	Kollagen-Typ I, II, III, VII, X, Gelatine, Entactin, Aggrecan, Tenascin	Monozyten/Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen, Granulozyten, Fibroblasten, Plasmazellen, Chondrozyten

Abbildung 1.8 zeigt in tabellarischer Übersicht die Herkunft und Substratspezifität des MP-1, MMP-3, MMP-13 und -8 (nach (Birkedal-Hansen et al. 1976), (Chin et al.1985), (Nagase et al. 1992), (Nagase und Woessner 1999), (Okada et al. 1987)).

1.2.6 Die Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen

Die oben beschriebenen matrixdegradierenden Eigenschaften der MMPs bedingen die Notwendigkeit eines Gegenpols zur Gegenregulation bei überschießender Funktion der MMPs. Ohne diesen regulativen Partner wäre der Eingang in pathphysiologische Prozesse die Folge.

Neben dem α_2-Makroglobulin sind hier vor allem spezifische Gewebsinhibitoren zu nennen (Carmichael; Sommer; Thompson; Anderson; Smith; Welgus und Stricklin 1986), (Stetler-Stevenson; Brown; Onisto; Levy und Liotta 1990), (Wick; Burger; Brusselbach; Lucibello und Muller 1994).
Die sogenannten „tissue inhibitors of metalloproteinases" (TIMP) sind multifunktional und spielen im metabolischen Gleichgewicht von Anabolismus und Katabolismus der ECM eine herausragende Rolle. Die bisher beschriebenen TIMPs (1-4) sind Glykoproteine mit einer Länge von ca. 180 Aminosäuren und einer Größe von 20 KD, die insgesamt eine große Strukturhomologie aufweisen. Über eine komplexe, nichtkovalente und äquimolare Bindung des TIMPs an das aktive Zentrum der Metalloproteinasen inhibieren sie proteolytischen Funktionen der MMPs. Dabei binden TIMPs bevorzugt an einzelne MMPs. TIMP-1 antagonisiert vorzugsweise das MMP-1 und TIMP-2 inhibiert primär das MMP-2, wobei der MMP-2/TIMP-2-Komplex eine zusätzliche inhibierende Bindung mit dem MMP-1 eingehen kann. Dies wird auch als „large inhibitor of metalloproteinases" (LIMP) bezeichnet (Curry; Clark; Bigg und Cawston 1992). TIMP-1 und 2 spielen von den bekannten TIMPs die mit Abstand wichtigste Rolle bei der Inhibition der Proteolyse durch MMPs bei der Arthrose. Sie sind qualitativ in der Lage praktisch alle MMP-Subtypen zu hemmen. Quantitativ reduzieren die beiden Vertreter der TIMPs zusammen die MMP-Aktivität um 90% (Hughes CE et al. 1998) und reduzieren die Kollagenolyse in arthrotischem Knorpel auf null (Ellis AJ et al. 1994).

TIMPs sind in allen Körpergeweben und Körperflüssigkeiten des Organismus präsent. Die Gewebsinhibitoren werden durch verschiedene Stimuli, zu denen Wachstumsfaktoren (TGF-β, IGF-1), antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-11) und Steroidhormone zählen, von den mesenchymalen Zellen sezerniert.

1.2.7 Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) und der Scatter Factor (SF) wurden ursprünglich als zwei unabhängige Faktoren identifiziert und charakterisiert. Dem HGF wurde wachstumsstimulierende Wirkung und dem SF „Scatterfaktoraktivität“ (die Fähigkeit Gewebe zu desintegrieren) zugeschrieben. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß beide Eigenschaften auf den gleichen Faktor zurückgehen. HGF ist also identisch mit dem SF. HGF wird von mesenchymalen Zellen gebildet und ist ein heparinbindendes Glykoprotein mit mitogenem, motogenem und morphogenetischem Effekt auf eine Vielzahl von Zelltypen (Gherardi und Stoker 1991). In Vivo existiert HGF in zwei Formen, einem biochemisch inaktiven Monomer (z.B. in plazentarem Gewebe) und in einem biologisch aktivem Heterodimer (z.B. in Serum).

Ende der 90er Jahre wurde erstmals die mögliche Teilnahme des HGF an Prozessen wie Knorpelreparation, Matrixremodeling und Chondrozytenmigration aufgezeigt (Pfander; Cramer; Weseloh; Pullig; Schuppan; Bauer und Swoboda 1999), (Koch; Halloran; Hosaka; Shah; Haskell; Baker; Panos; Haines; Bennett; Pope und Ferrara 1996).

HGF vermittelt seine Wirkung mittels des Protoonkogens c-Met, einem Rezeptor aus der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (Naldini; Weidner; Vigna; Gaudino; Bardelli; Ponzetto; Narsimhan; Hartmann; Zarnegar und Michalopoulos 1991). Sowohl HGF als auch c-Met werden nachweislich von Gelenkknorpel und Synovia exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass HGF die Proteoglykansynthese steigert und somit der OA eigentlich entgegenwirken sollte (Takebayashi; Iwamoto; Jikko; Matsumura; Enomoto-Iwamoto; Myoukai; Koyama; Yamaai; Matsumoto und Nakamura 1995), (Wakitani; Imoto; Kimura; Ochi; Matsumoto und Nakamura 1997). Im Gegensatz dazu zeigte Reboul 2001 auf, dass HGF die Produktion von MMP 13 in Chrondrozyten induziert. (Reboul; Pelletier; Tardif; Benderdour; Ranger; Bottaro und Martel-Pelletier 2001). In einer kürzlich erschienenen Studie konnte ein anaboler oder kataboler Einfluß von HGF auf Chondrozyten widerlegt werden (Bau; McKenna; Soeder; Fan; Pecht und Aigner 2004). Bau verwendete für seine Untersuchungen jedoch physiologische und nicht arthrotisch veränderte Chondrozyten, so dass die Schlussfolgerung aus dieser Arbeit noch weiter überprüft werden sollte. Der Einfluss des HGF auf die Synovialfibroblasten, als neben den Chondrozyten zweite wichtige Produktionsstätte kataboler Enzyme, wurde bislang noch nicht detailliert untersucht.

1.3 Fragestellung

HGF und c-Met werden sowohl in Chondrozyten wie auch in der Synovia exprimiert (Takebayashi et al. 1995), (Wakitani et al. 1997). Ein Einfluss von HGF auf die Synthese kataboler Enzyme in Knorpel konnte ausgeschlossen werden (Bau et al. 2004). Hingegen konnte von Feuerherm 2001 gezeigt werden, dass HGF bei der rheumatoiden Arthritis in der Synovialflüssigkeit erhöht exprimiert wird (Feuerherm; Borset; Seidel; Sundan; Leistad; Ostensen und Faxvaag 2001).

Hieraus lassen sich mehrere Hypothesen ableiten:

1.) **Auch bei der Osteoarthrose könnte eine Induktion von katabolen Enzymen (MMPs) in Synovialgewebe durch HGF erfolgen.**

Voraussetzung hier für sind:

2.) **Es besteht ein Zusammenhang zwischen HGF-Konzentration in der Synovialflüssigkeit und dem Schweregrad der Osteoarthrose** (hierzu soll das ELISA-Meßverfahren angewendet werden).

3.) **HGF und c-Met kommen relevanten Mengen in Synovialgewebe oder Synovialflüssigkeit von Osetoarthrosepatienten vor** (der Nachweis soll mittels der semiquantitativen PCR erfolgen).

4.) **Die entscheidenden MMPs werden unter HGF-Stimulation konzentrationsabhängig reguliert** (auch dieser Hypothese wird mit der PCR nachgegangen).

5.) **Es kommt durch eine konzentrationsanhängige Induktion von gewebsständigen Synovialfibroblasten oder von Synovialfibroblasten der Synovialflüssigkeit durch HGF zu einer qualitativen bzw. semiquantitativen Erhöhung der Aktivität vom MMPs und TIMPs** (um dies zu zeigen soll die Zymographie dienen, zur Quantifizierung der Induktion das ELISA Meßverfahren angewendet werden sowie zur Überprüfung der Signifikanz die statistische Analyse durchgeführt werden).

Treffen also all diese Hypothesen zu, so ergibt sich abschließend:

6.) **Es existiert ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Effekt der HGF-Stimulation von gewebsständigen Synovialfibroblasten und Flüssigkeitssynovialfibroblasten auf die MMP-1- und MMP-3-Sekretion und**

auf die Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2. HGF ist also ein weiterer pathogenetischer Faktor bei der Osteoarthrose.

2. Material und Methode

2.1 Probenmaterial und Patienten

Als Probenmaterial wurde frisch und steril entnommene Synovialflüssigkeit von 41 Osteoarthrosepatienten verwendet (18 männlich und 23 weiblich), die bei der endoprothetischen Versorgung durch die Klinik für allgemeine Orthopädie des Universitätsklinikums Münster entnommen wurde. Die Einteilung des Schweregrads der Arthrose erfolgte anhand von standardisierten Röntgenbildern der Kniegelenke im a.p.-Strahlengang durch jeweils 2 unabhängige Orthopäden nach Kellgren und Lawrence (Kellgren und Lawrence 1957) sowie nach Ahlbäck (Ahlback 1968). Von den Patienten, bei denen die operativen Kniegelenkersatzversorgung vorgenommen wurde, lag bei 8 eine Osteoarthrose im Stadium 0 bis II (im folgenden als leichte Osteoarthrose bezeichnet), bei 13 eine Osteoarthrose im Stadium III (im folgenden als mäßige Osteoarthrose bezeichnet) und bei 20 eine Osteoarthrose im Stadium IV (im folgenden als schwere Osteoarthrose bezeichnet) vor. Das mittlere Alter lag bei 63,8 Jahre bei einer Spannweite von 32 – 87 Jahren.

2.2 Verfahrensbeschreibung zur Herstellung der Monolayerkulturen

2.2.1 Isolierung, Expansion und Stimulation der Synovialfibroblasten und Chondrozyten

Kulturen von Synovialfibroblasten sowohl von der Synovialmembran als auch aus der Synovialflüssigkeit der Patienten SA-28, WB-38, FJ-21, MH-36 und BU-46 wurden etabliert.

Zum Herauslösen der Synovialfibroblasten aus dem Gewebeverband wurde das steril entnommene Synovialgewebe zerkleinert und mit einer 0,5%igen-Trypsin- und 0,2%igen-EDTA-Lösung (PAA-Laboratories) enzymatisch für 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Die Gewebe/Enzymlösung wurde daraufhin durch 100µm Nylonsiebe filtriert, um verbliebene Gewebereste zu entfernen. Durch Zentrifugation bei 500 g für 10

Minuten wurden die freien Synovialfibroblasten pelletiert, zur Neutralisierung des Trypsins in 20 ml Komplettmedium resuspendiert und erneut pelletiert.

Die Synovialfibroblasten aus den Synovialflüssigkeiten wurden nach der Verdünnung (1:8) mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Gibco, BRL, Eggenstein Deutschland) durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 g pelletiert, in serumfreien Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Sowohl die Zellen aus dem Gewebe, als auch die Zellen aus der Flüssigkeit, wurden in DMEM/High Glucose supplementiert und mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS; Gibco,BRL), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphothericin (P/S/A; Gibco, BRL) (Dehm P 1971) resuspendiert.

Zur Kultivierung der SF wurden die Zellen auf 75cm^2 Zellkulturflaschen gegeben. Nicht adhärente Zellen wurden durch regelmäßigen Mediumersatz alle 2-4 Tage entfernt. Die Expansion der SF erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 bis zur Ausbildung einer adhärenten Monolayerschicht nach 2-4 Wochen.

Für die Stimulationsexperimente wurden Gewebs- und Flüssigkeitssynovialfibroblasten verwendet, die sich im Stadium der dritten Passage befanden. Vor der Stimulierung wurden die Zellen gewaschen und für 24 Stunden in ein Hungermedium (DMEM mit 5% FCS) gegeben.

Die Synovialfibroblastenkulturen wurden vierfach mit rekombinantem menschlichem HGF mit Konzentrationen von 0, 10, 20 und 40 ng/ml in DMEM mit 0,2 % FCS ergänzt stimuliert. Ebenfalls erfolgte bei jeder Zelllinie die Stimulation mit IL-1β und TNF-α (jeweils 10 ng/ml). Nach 48 Stunden wurden die Überstände abpipettiert, bei 1000g für 10 Minuten zentrifugiert und bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren. Für die später erfolgende Stratifizierung wurden Zellzählungen von stimulierten und nichtstimulierten Zellen vorgenommen.

Knorpelgewebe der Femurcondylen von 4 Patienten wurde unter sterilen Kautelen gewonnen. Die Gewebefragmente wurden in Würfel mit einer Kantenlänge von 1 mm geschnitten und 4-mal mit Krebs-Puffer (Dehm P 1971) gewaschen, der 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2.5 µg/ml Fungizone zur Reduktion von Keimwachstum enthielt. Nach zweimaligem Waschen mit calciumfreiem Dulbecco's modified eagles medium (DMEM, Gibco-BRL, Karlsruhe, Germany), wurden die Knorpelstückchen für 16-24 Stunden zusammen mit 1.5 mg/ml Kollagenase B (Roche,

Mannheim) and 1 mM Cystein inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde zur Entfernung von Verunreinigungen gefiltert und erneut dreimalig in calciumfreiem DMEM gewaschen. Die erhaltenen Zellen wurden nun in 1 ml zweiprozentiger "low-melting-temperature" Agarose (FMC, Rockland, ME) in DMEM resupendiert. Die Zellen wurden nun in mit einprozentiger Agarose vorbeschichteten 35 mm Petrischalen ausgesiedelt. In der noch flüssigen „low-melting-temperature" Agarose konnten die Chondrozyten nun bis auf die Grenzschicht zur einprozentigen "high-melting-temperature" Agarose absinken, dort sedimentieren und eine Monolayerschicht ausbilden. Um die Erstarrung der "low-melting-temperature" Agarose einzuleiten, wurden die Petrischalen für 15 Minuten bei 4°C aufbewahrt und anschließend bei 37°C, fünfprozentiger CO_2-Atmosphäre und 99% Luftfeuchtigkeit (Tschan; Hoerler; Houze; Winterhalter; Richter und Bruckner 1990) kultiviert. Die zur Zellernährung regelmäßig erneuerte DMEM-Lösung wurde um 60 µg/ml ß-Aminopropionitril, 25 µg/ml Ascorbinsäure, 1 mM Cystein, 1 mM Pyruvat, 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin ergänzt. Zum Vergleich der Proteasenaktivität wurde die Hälfte jeder Zelllinie der Chondrozyten mit 40 ng/ml HGF stimuliert.

Alle rekombinanten Zytokine wurden von der Firma R&D Systems (Norderstadt, Deutschland) erworben.

2.2.2 Probenvorbereitung

Die Überstände wurden vor der Probenauftragung bei Raumtemperatur aufgetaut und -je nach ELISA-Bestimmung- unverdünnt oder in den Verdünnungen 1:20 bis 1:100 in Doppel-Ansätzen in die ELISA-kits des Biotrak™ ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech eingebracht.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

100 µl resuspendierte Zellen wurden in 10 ml Isoton-II (Coulter) verdünnt und in einem Zellzahlgerät (Coulter) gezählt. Die Anzahl der Zellen pro ml wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers und der jeweils eingesetzten Verdünnungen berechnet.

2.3 Methoden der Analytik

2.3.1 Quantifizierung von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren

Um Matrix-Metalloproteinasen in ng/ml-Bereich nachzuweisen und zu bestimmen (quantitative und qualitative Analyse) bedarf es eines Messprinzips, welches in der Lage ist, niedrige Konzentrationen des zu messenden Enzyms zu erfassen. Dies wird im Allgemeinen mit der immunchemischen Messmethodik erzielt.

Das Prinzip immunologischer Nachweistechniken ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Wird die Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem markierten Reaktionspartner kombiniert, kann die Empfindlichkeit (Sensitivität) immunchemischer Bestimmungsmethoden erheblich erhöht werden. Bei diesen indirekten Nachweistechniken ist die Spezifität durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion und die Sensitivität durch die Sichtbarmachung (Farbindikator) eines enzymmarkierten Reaktionspartners gegeben (Sheehan C 1990).

Zum Einsatz kommen Liganden-Immunoassays, die diese Reaktion auf einer Mikrotiterplatte im Flüssigkeitsfilm einer festen Phase ablaufen lassen. Der Antikörper für das zu bestimmende Antigen ist an die feste Phase gekoppelt. Bei Zugabe der Patientenprobe bindet das Antigen der Probe an diesen im Überschuss vorliegenden Antikörper. Die Menge des gebundenen Antigens wird durch die Zugabe des markierten Zweitantikörpers, der über eine weitere Bindungsstelle (Epitop) des an den Primärantikörper gebundenen Antigens bindet, unter Bildung eines „Sandwich“ ermittelt (Abbildung 2.2). Dies erfordert mindestens zwei Epitope des Antigens. Zur Bindung des Antigens werden monoklonale Antikörper, zur Bindung der markierten Liganden werden poly- und monoklonale Antikörper eingesetzt.

Zur Enzymmarkierung des Liganden (Label) werden alkalische Phosphatase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase oder Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet. Eingeschaltete

Waschvorgänge zwischen den Inkubationsschritten entfernen ungebundene Probenbestandteile und Antikörper.

Im abschließenden Verfahrensschritt wird ein spezifisches Substrat (z.B. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, TMB) als Farbindikator inkubiert. Der Reaktionsumsatz des Substrats wird durch Hinzufügen einer Stopperlösung (1 molare Schwefelsäure) beendet.

Durch die anschließende photometrische Messung der Probenabsorbanz bei 450 nm (HRP), mit Hilfe eines Spektrometers, wird der Anteil des markierten Reaktionspartners (enzymmarkierte Antikörper) gemessen, anhand dessen der Anteil des Antigens in der Patientenprobe quantitativ und qualitativ erfasst werden kann (Greiling H 1995b). Der Messwert kann über eine hierbei erhobene Eichkurve (Standardkurve) in eine Konzentrationsangabe (ng/ml) umgerechnet werden.

Dieser enzymmarkierte (**E**nzym**L**inked) Nachweis, der die Bindung des Primärantikörpers -der immunologisch an die Festphase gebundenen ist (**I**mmuno**S**orbent)- mit einem Antigen einer Probenlösung (**A**ssay) voraussetzt, gibt diesem Laborverfahren seinen Namen ELISA.

2.4 Verfahrensbeschreibung der Analytik

Verwendete Reagenzien und Geräte

- Mikrotiterplatte* mit 96 wells (12 x 8 well strips), die mit Primärantikörper gegen die jeweiligen MMPs/TIMPs beschichtet sind
- Probenpuffer* (Assay buffer), zusammengesetzt aus: Phosphatpuffer, Sodiumchlorid, Rinderalbumin und wahlweise EDTA und Tween^{TM} 20, zur Verdünnung der Standardlösungen, der Proben und z.T. des Peroxidasekonjugat
- Standardlösungen* mit standardisierten Konzentrationen des lyophilisierten Antigens (MMP/TIMP)
- Meerrettichperoxidasekonjugierte monoklonale und polyklonale Antikörper* (Peroxidasekonjugat)
- polyklonaler Zweitantikörper*, bei dem MMP-1 ELISA-kit: rabbit-Anti-MMP-1
- Waschlösungen* mit Phosphatpuffer und Tween^{TM} 20
- TMB-Substrat* als Farbindikator (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)

- Destilliertes Wasser
- Spektrophotometer mit den Messbereichen 450 nm und 630 nm
- 1 molare Schwefelsäure als Stopperlösung
- Mikrotiterplattenschüttler

* im Materialbestand des Biotrak™ ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech enthalten

Verfahrensschritte:

Mit den aus den oben aufgeführten Probenvorbereitungen erhaltenen Überständen und Extrakten der 6 Zelllinien wurden zunächst Testmessungen durchgeführt. Die Testreihen mit unterschiedlichen Verdünnungsansätzen (1:10 bis 1:100) der Proben wurden zur Ermittlung der zu erwartenden Konzentrationen durchgeführt.

Verdünnungen, die im linearen Meßbereich der entsprechenden ELISA-Kits lagen, d.h. innerhalb der jeweiligen Standardkurven, wurden zur Bestimmung der einzelnen MMPs und TIMPs ausgewählt. In Abbildung 2.1 ist die Spezifität und Sensitivität der einzelnen ELISA-kits angegeben.

Nach Äquilibration der Proben und Materialien auf Raumtemperatur, Herstellung der Standardverdünnungsreihe und Reagenzienvorbereitung nach den Angaben des Herstellers, wurden im Einzelnen folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

Elisa-kit	**Spezifität**	**Sensitivität**
MMP-1	ProMMP-1, MMP-1, MMP-1/TIMP-Komplex	bis 1,70 ng/ml
MMP-3	ProMMP-3, MMP-3, MMP-3/TIMP-Komplex	bis 2,35 ng/ml
TIMP-1	*TIMP1-Komplex mit aktivem MMP-1,2,3,9, ProMMP9	bis 1,25 ng/ml
TIMP-2	*TIMP2-Komplex mit aktivem MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9	bis 3,00 ng/ml
HGF	Natürliches und rekombinantes humanes HGF	bis 40 pg/ml

Abbildung 2.1 Spezifität und Sensitivität der ELISA-kits des Biotrak^{TM} ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech

Für alle MMP-ELISA-kits gilt, dass sie kein α_2-makroglobulingebundenes Enzym erfassen und keine Kreuzreaktionen zu anderen Enzymen der MMP/TIMP-Familie aufweisen. *= freies, nicht gebundenes TIMP-1, bzw. TIMP-2.

2.4.1 MMP-1

1. 100 µl der seriell verdünnten Standardreihe und 100 µl der, je nach zuvor ermittelter Erfordernis verdünnten, Probenlösungen wurden in den ELISA eingebracht.
2. Im ersten Inkubationschritt wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und bei Raumtemperatur für exakt 2 Stunden auf einem Mikrotiterplattenschüttler befestigt.
3. Zum Waschgang wurden die wells mit Waschlösung gefüllt und durch mehrmaliges Ausschlagen auf Zellpapier gründlich entleert; dies wurde viermal in Folge wiederholt.
4. Es wurden 100µl Antiserum (rabbit-Anti-MMP-1) in die vorgesehenen wells pipettiert und für weitere 2 Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (MMP-1) der Probe inkubiert.
5. Waschgang wie unter 3. aufgeführt.
6. 100 µl Peroxidasekonjugat (donkey anti-rabbit-HRP Antikörper) wurden in die wells zugegeben und für 1 Stunde inkubiert.
7. Waschgang wie unter 3. aufgeführt.
8. Zuführung von 100 µl TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) in die wells mit einer anschließenden 30-minütigen Reaktionsphase (Farbumschlag).

9. Mit der Zugabe von 100 µl 1 molarer Schwefelsäure wurde die Reaktionsphase gestoppt, mit der die deutlich bläulich gefärbte Lösung sofort in eine gelbe Lösung umschlug.
10. Umgehende Messwerterhebung der Proben- und Standardlösungabsorbanzien mit Hilfe des Spektrophotometers bei 450 nm und 530 nm (Referenzfilter).

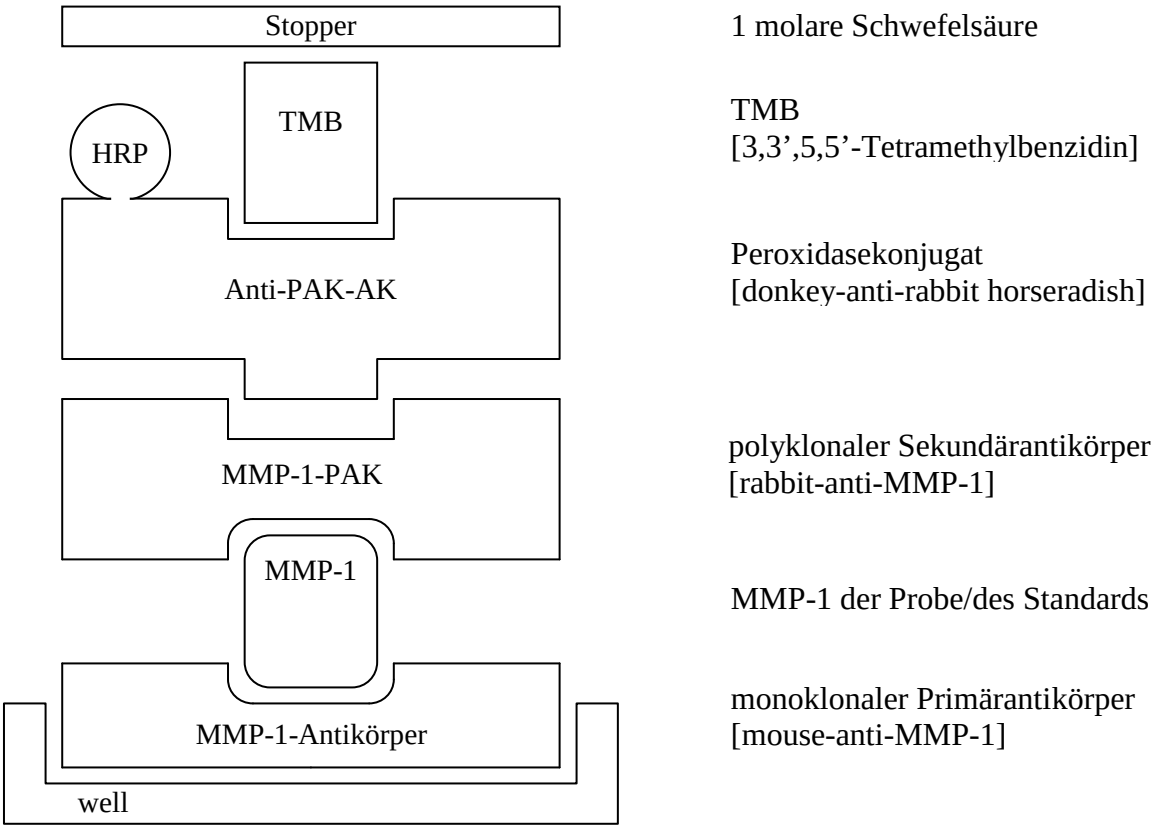

Abbildung 2.2 zeigt eine Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit MMP-1

2.4.2 MMP-3

1. 100 µl der seriell verdünnten Standardreihe und 100 µl der verdünnten Probenlösungen wurden in den ELISA eingebracht.
2. Im ersten Inkubationschritt wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und bei 4 C° für exakt 1 Stunde gelagert.
3. Zum Waschgang wurden die wells mit Waschlösung gefüllt und durch mehrmaliges Ausschlagen auf Zellpapier gründlich entleert; dies wurde viermal in Folge wiederholt.

4. Es wurden 100 µl kaltes (4C°) Peroxidasekonjugat (anti-MMP-3-HRPAntikörper) in die vorgesehenen wells pipettiert und für weitere 2 Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (MMP-3) der Probe bei 4 C° inkubiert.
5. Waschgang wie unter 3. aufgeführt.
6. Zuführung von 100 µl raumtemperiertem TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) in die wells mit anschließender 30-minütiger Reaktionsphase bei Raumtemperatur (Farbumschlag).
7. Mit der Zugabe von 100 µl 1 molarer Schwefelsäure wurde die Reaktionsphase gestoppt, mit der die deutlich bläulich gefärbte Lösung sofort in eine gelbe Lösung umschlug.
8. Umgehende Messwerterhebung der Proben- und Standardlösungabsorbanzien mit Hilfe des Spektrophotometers bei 450 nm.

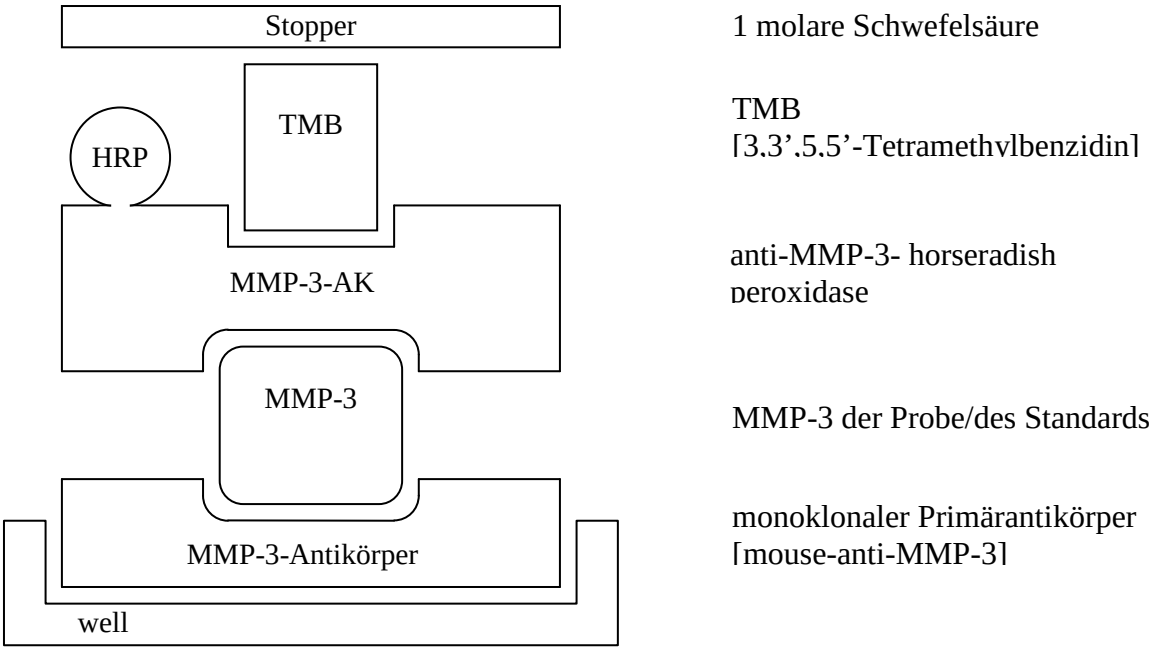

Abbildung 2.3 zeigt die Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit MMP-3

2.4.3 TIMP-1

1. 100 µl der seriell verdünnten Standardreihe und 100 µl der unverdünnten Probenlösungen wurden in den ELISA eingebracht.
2. Im ersten Inkubationschritt wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und bei Raumtemperatur für exakt 2 Stunden auf einem Mikrotiterplattenschüttler gelagert.

3. Zum Waschgang wurden die wells mit Waschlösung gefüllt und durch mehrmaliges Ausschlagen auf Zellpapier gründlich entleert; dies wurde viermal in Folge wiederholt.
4. Es wurden 100 µl Peroxidasekonjugat (anti-TIMP-1-HRP Antikörper) in die vorgesehenen wells pipettiert und für 2 weitere Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (TIMP-1) der Probe bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Waschgang wie unter 3. aufgeführt.
6. Zuführung von 100 µl raumtemperiertem TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) in die wells mit anschließenden 30 minütigen Reaktionsphase bei Raumtemperatur. (Farbumschlag).
7. Mit der Zugabe von 100 µl 1 molarer Schwefelsäure wurde die Reaktionsphase gestoppt, mit der die deutlich bläulich gefärbte Lösung sofort in eine gelbe Lösung umschlug.
8. Umgehende Messwerterhebung der Proben- und Standardlösungabsorbanzien mit Hilfe des Spektrophotometers bei 450 nm.

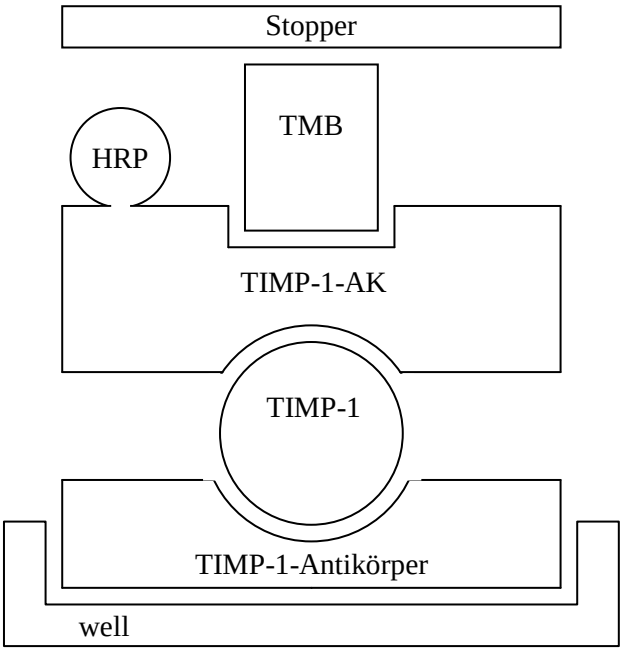

Abbildung 2.4 zeigt die Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit TIMP-1

2.4.4 TIMP-2

1. 100 µl der seriell verdünnten Standardreihe und 100 µl der unverdünnten Probenlösungen wurden in den ELISA eingebracht. Abweichend von den vorherigen

Schritten wurden die 100 µl Standardlösungen und die 100 µl Probenlösungen zuvor mit 100 µl Peroxidasekonjugat (anti-TIMP-2-HRP Antikörper) in Tubes gevortext.

2. Im ersten Inkubationsschritt wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und bei Raumtemperatur für exakt 2 Stunden auf einem Mikrotiterplattenschüttler gelagert.
3. Zum Waschgang wurden die wells mit Waschlösung gefüllt und durch mehrmaliges Ausschlagen auf Zellpapier gründlich entleert; dies wurde viermal in Folge wiederholt.
4. Zuführung von 100 µl raumtemperiertem TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) in die wells mit anschließender 30 minütigen Reaktionsphase bei Raumtemperatur. (Farbumschlag)
5. Mit der Zugabe von 100 µl 1 molarer Schwefelsäure wurde die Reaktionsphase gestoppt, mit der die deutlich bläulich gefärbte Lösung sofort in eine gelbe Lösung umschlug.
6. Umgehende Messwerterhebung der Proben- und Standardlösungabsorbanzien mit Hilfe des Spektrophotometers bei 450 nm.

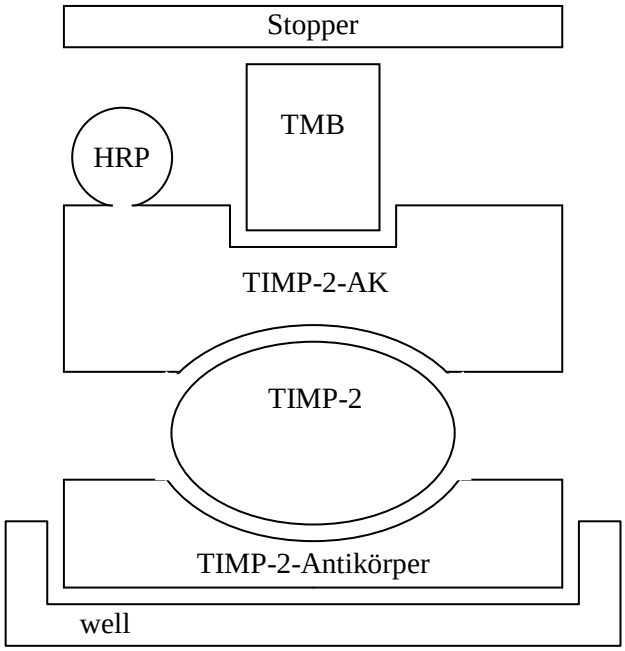

Abbildung 2.5 Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit TIMP-2

2.4.5 HGF

1. 50 µl der seriell verdünnten Standardreihe und 150 µl der verdünnten Probenlösungen wurden in den ELISA eingebracht.

2. Im ersten Inkubationschritt wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und bei 4 C° für exakt 2 Stunden gelagert.
3. Zum Waschgang wurden die wells mit Waschlösung gefüllt und durch mehrmaliges Ausschlagen auf Zellpapier gründlich entleert; dies wurde viermal in Folge wiederholt.
4. Es wurden 200 µl kaltes (4C°) Peroxidasekonjugat (anti-HGF-Antikörper) in die vorgesehenen wells pipettiert und für weitere 1 ¾ Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (HGF) der Probe bei 4 C° inkubiert.
5. Waschgang wie unter 3. aufgeführt.
6. Zuführung von 200 µl raumtemperiertem TMB-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin) in die wells mit anschließender 30-minütiger Reaktionsphase bei Raumtemperatur und Lichtschutz (Farbumschlag).
7. Mit der Zugabe von 50 µl 1 molarer Schwefelsäure wurde die Reaktionsphase gestoppt, mit der die deutlich bläulich gefärbte Lösung sofort in eine gelbe Lösung umschlug.
8. Umgehende Messwerterhebung der Proben- und Standardlösungabsorbanzien mit Hilfe des Spektrophotometers bei 450 nm.

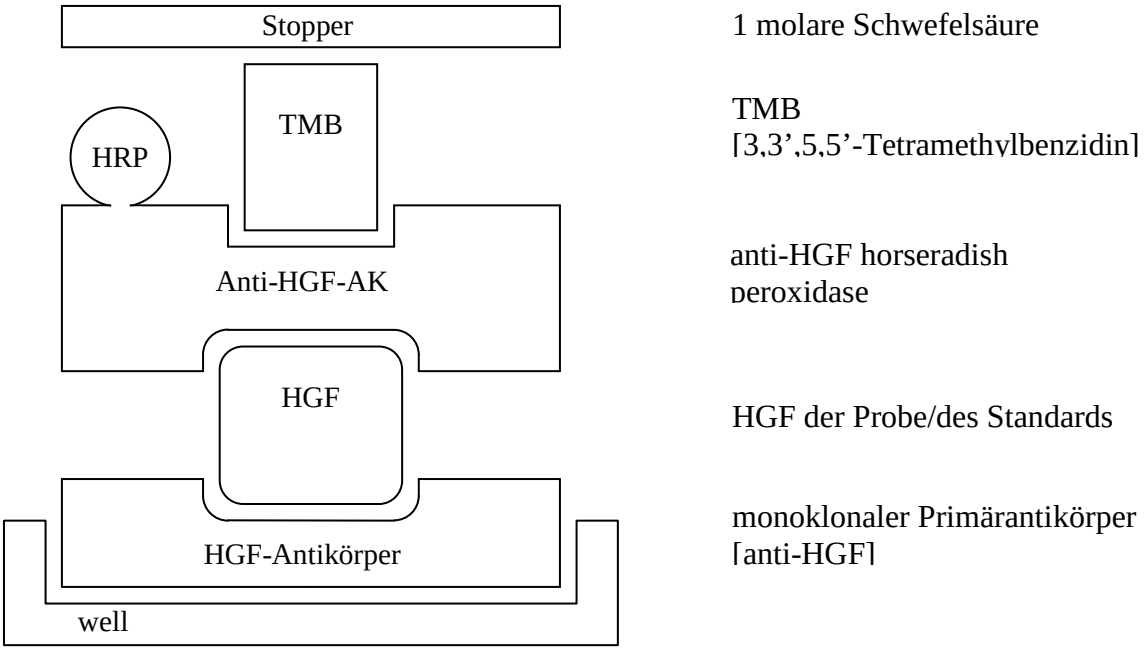

Abbildung 2.6 Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit HGF

2.5 Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Gesamt RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Spin Column Purification System präpariert (Quiagen, Hilden, Deutschland). Die cDNA wurde für eine Stunde bei 37 °C mit 500 ng Gesamt-RNA, random Hexameren und M-MLV reverese Transkriptase synthetisiert (Gibco-BRL). Die Transkripte von HGF, c-Met, MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13 und Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurden mittels spezifischer Primer bei einer Temperatur von 60 °C vervielfältigt. Die Amplifikation von 1/20 der hergestellten cDNA wurde durch Anwendung von Taq DNA-Polymerase (Promega, Heidelberg, Deutschland) an einem BioRad Thermocycler (Bio-Rad, München, Deutschland) für 35 Zyklen (bei Stimulationsexperimenten) oder 40 Zyklen (für die Basalexpression) durchgeführt. Hierbei wurde folgendes Protokoll angewendet: bei 94 °C für eine Minute Erhitzung, bei 60-64 °C für eine Minute und bei 72 °C für eine Minute einschließlich einer initialen Erhitzung auf 94 °C für drei Minuten und einer abschließenden Erhitzung auf 72 °C für zehn Minuten. GAPDH wurde zur internen Kontrolle der RNA Integrität und Normalisierung verwendet Alle PCR-Produkte wurden auf zweiprozentigen Agarosegelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels eines Fluometrie-Analyse-Systems (Gel Doc 1000, Bio-Rad, München, Deutschland) analysiert. Eine Übersicht über die Sequenzen und die Annealingtemeraturen der jeweiligen Primer gibt Abbildung 2.7.

Zielgen	Primersequenz (5’-3’)	Produktgröße (bp)	Annealingtemperatur (°C)
MMP-1	Sense: CTGAAGGTGATGAAGCAGCC Antisense: AGTCCAAGAGAATGGCCGAG	428	62
MMP-3	Sense: CTCACAGACCTGACTCGGTT Antisense: CACGCCTGAAGGAAGAGATG	294	58
MMP-8	Sense: ATGGACCAACACCTCCGCAA Antisense: GTCAATTGCTTGGACGCTGC	532	64
MMP-13	Sense: CTATGGTCCAGGAGATGAAG Antisense: AGAGTCTTGCCTGTATCCTC	390	62
TIMP-1	Sense: AGCGCCCAGAGAGACACC Antisense: CCACTCCGGGCAGGATT	670	62
TIMP-2	Sense: GGCGTTTTGCAATGCAGATGTAG Antisense: CACAGGAGCCGTCACTTCTCTTG	497	62
GAPDH	Sense: TCCACCACCCTGTTGCTGTA Antisense: TCCTGCACCACCAACTGCTT	527	62

Abbildung 2.7: verwendete Primersequenzen und Annealingtemperaturen

Sequenzen und Annealingtemperaturen der jeweiligen Primer angeben

2.6 Zymographie

Die Gelatin-Zymographie zum direkten Nachweis einer Gelatinase-Aktivität wurde von Heussen und Dowdle (1980) (Heussen und Dowdle 1980) erstmals beschrieben und später von Chen et al. (1987) (Chen und Chen 1987) modifiziert. Die Methode eignet sich also auch zum Nachweis einer Proteinasenaktivität durch MMPs und ihre Vorformen den proMMPs. Bei diesem Verfahren werden Peptidasen und Peptidasegemische unter nichtdenaturierenden Bedingungen einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen, bei der Gele zum Einsatz kommen, in deren Matrix Gelatin integriert ist. Die Gele werden anschließend inkubiert, bevor sie gefärbt werden. In dem auf diese Weise entstehenden Zymogramm stellen sich gelatinolytisch aktive Peptidasen in Negativ-Färbung dar.

Für die Gelatin-Zymographie wurden Kulturüberstände mit vierfach konzentriertem Probenladepuffer (4 mM EDTA, 4% SDS, 40% Glycerol, 0,04% Bromophenolblau, 40 mM Tris/HCl, pH 6,8) vermischt und der Elektrophorese auf einem 0,1% gelatinhaltigen 10% SDS-Polyacrylamidgel zugeführt. Vorgefärbte Proteinstandards (Sigma, Taufkichen, Deutschland) mit einer Spannweite von 180 kDa bis 26 kDa wurden als Marker für das Molekulargewicht verwendet. Die Gele wurden, zum Entfernen des SDS, zweifach für jeweils 30 Minuten in 2,5% Triton-X 100 gewaschen, mit distilliertem Wasser gespült und anschließend über 16 Stunden bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl pH 8,5 mit 5 mM $CaCl_2$ aktiviert. Schließlich wurden die Gele mit Coomassie Brilliantblau R250 (Serva, Heidelberg, Deutschland) gefärbt, um die Proteasenaktivität sichtbar zu machen, die dann mittels eines Fluorometrie-Analyse-Systems (Gel Doc 1000, Bio-Rad, München, Deutschland) analysiert wurde.

2.7 Statistische Analyse

Für den Expressionsvergleich zwischen den Gewebszelllinien und den Flüssigkeitszelllinien wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet. Er ist ein nichtparametrischer statistischer Rangsummentest für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben bei nicht normalverteilter Grundgesamtheit. Für diesen Unterschiedstest ist ein ordinales Datenniveau ausreichend, deswegen benötigt er nur Rangplätze. Der U-Test ist besonders geeignet Unterschiede in der zentralen Tendenz aufzufinden (Clauß G 1999), (Sachs L 1992). Signifikante Unterschiede durch die

verschiedenen Zytokine innerhalb der einzelnen Gruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Bei einer globalen Signifikanz wurde nachfolgend ein Paarvergleich durchgeführt, um das Signifikanzniveau zwischen einzelnen Zytokinen zu bestimmen.

3. Ergebnisse

3.1 HGF-Spiegelbestimmung in Synovialflüssigkeit

In einem Vorversuch wurde zunächst mittels eines HGF-ELISAs die HGF-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit unterschiedlichem Ausmaß der Osteoarthrose gemessen. Hierbei ergab sich ein signifikanter Konzentrationsanstieg des HGFs von milder OA zur mittelschweren OA ($p < 0,05$) und ein noch signifikanterer Anstieg von milder OA zur schweren OA ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 3.1). Hieraus ergab sich die Rationale zu weiterführenden Untersuchungen.

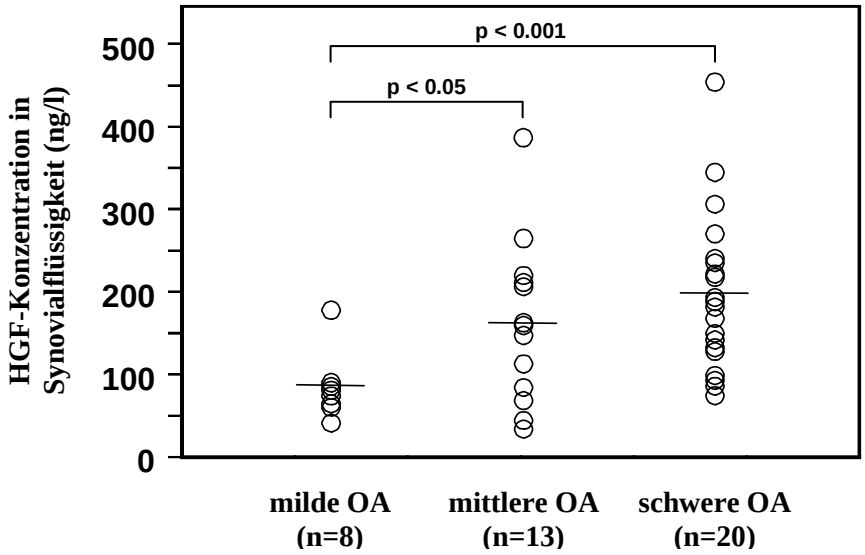

Abbildung 3.1: HGF-Spiegel in Synovialflüssigkeit bei OA verschiedenen Schweregrades.

3.2 Korrelationsanalyse

Die aus den ELISA-Untersuchungen gewonnenen Daten wurden einer Korrelationsanalyse zugeführt, bei der die HGF-Konzentration mit klinischen Parametern korreliert wurde. Hierbei ergab sich eine hochsignifikante Korrelation von HGF-Konzentration und dem Stadium der Gonarthrose nach Kellgren (Korrelationskoeffizient = 0,487, $p = 0,001$). Es bestanden keine weiteren signifikanten Korrelationen. Eine Übersicht über die Korrelationen gibt Abbildung 3.2.

	HGF (Korrelationskoeffizient r=)	HGF (Signifikanzniveau), [p=]
Alter	0,222	0,162
Geschlecht	0,125	0,438
Body Mass Index	0,22	0,894
Ahlbäck	**0,485**	**0,002**
Kellgren	**0,487**	**0,001**

Abbildung 3.2: Korrelationsanalyse von HGF mit klinischen Parametern

3.3 Expression von HGF und c-Met in Synovialfibroblasten

Um zu zeigen, dass HGF an der Regulation von katabolen Enzymen bei Synovialfibroblasten beteiligt ist, muss zunächst nachgewiesen werden, ob c-Met als der Rezeptor für HGF überhaupt in Synovialfibroblasten synthetisiert wird. Es wurden jeweils 5 repräsentative Zelllinien von freien Synovialfibroblasten (f-FLS) und von membranständigen Synovialfibroblasten (m-FLS) ausgewählt. Mittels der PCR wurden in beiden Synovialzelltypen sowohl HGF- als auch c-Met-Transskripte nachgewiesen. HGF kann also im osteoarthrotisch erkrankten Kniegelenk zumindest potentiell seinen möglichen knorpeldegradierenden Effekt entfalten. Einen Überblick über die Ergebnisse gibt die Abbildung 3.3.

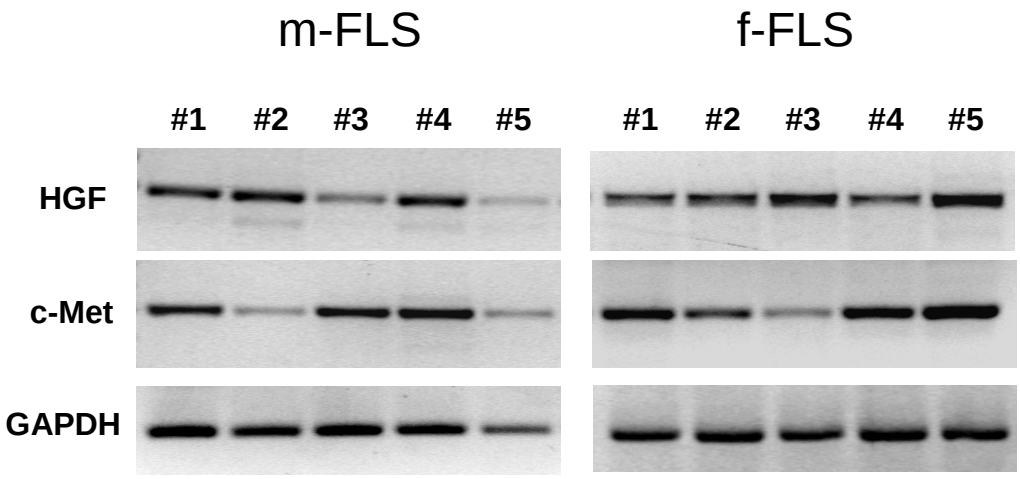

Abbildung 3.3: Expression von HGF und c-Met in Synovialfibroblasten (PCR)

3.4 Qualitative Analyse der Sekretion von MMP-1, -3, -8 und -13 durch Synovialfibroblasten unter HGF-Stimulation

Um zu zeigen, dass katabole Enzyme (MMPs) unter Stimulation mit HGF reguliert werden, wurden exemplarisch zwei Synovialfibroblastzelllinien jeweils mit 10, 20 und 40 ng/ml HGF stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen untersucht. Als Positivkontrolle wurden Synovialfibroblasten mit TNF-α und IL-1β stimuliert. Nach erfolgter Stimulation wurde mittels PCR auf das Vorliegen einer Hochregulation von MMP-1, -3, -8 und -13 untersucht. Hierbei ergab sich, dass MMP-8 und MMP-13 jeweils nicht durch HGF reguliert werden. MMP-13 wird eindeutig durch TNFα und IL-1β reguliert. Es zeigte sich im Gegensatz dazu aber eine eindeutige Hochregulation von MMP-1 und MMP-3. Beim MMP-3 lässt sich bereits bei dieser semiquantitativen PCR eine Dosisabhängigkeit ableiten. Da MMP-8 und 13 nicht durch HGF induziert wurden, wurden im Verlauf nur noch weiterführende Untersuchungen an MMP-1 und MMP-3 durchgeführt. Eine Übersicht zu den PCR-Untersuchungen der MMPs unter HGF-Stimulation gibt Abbildung 3.4.

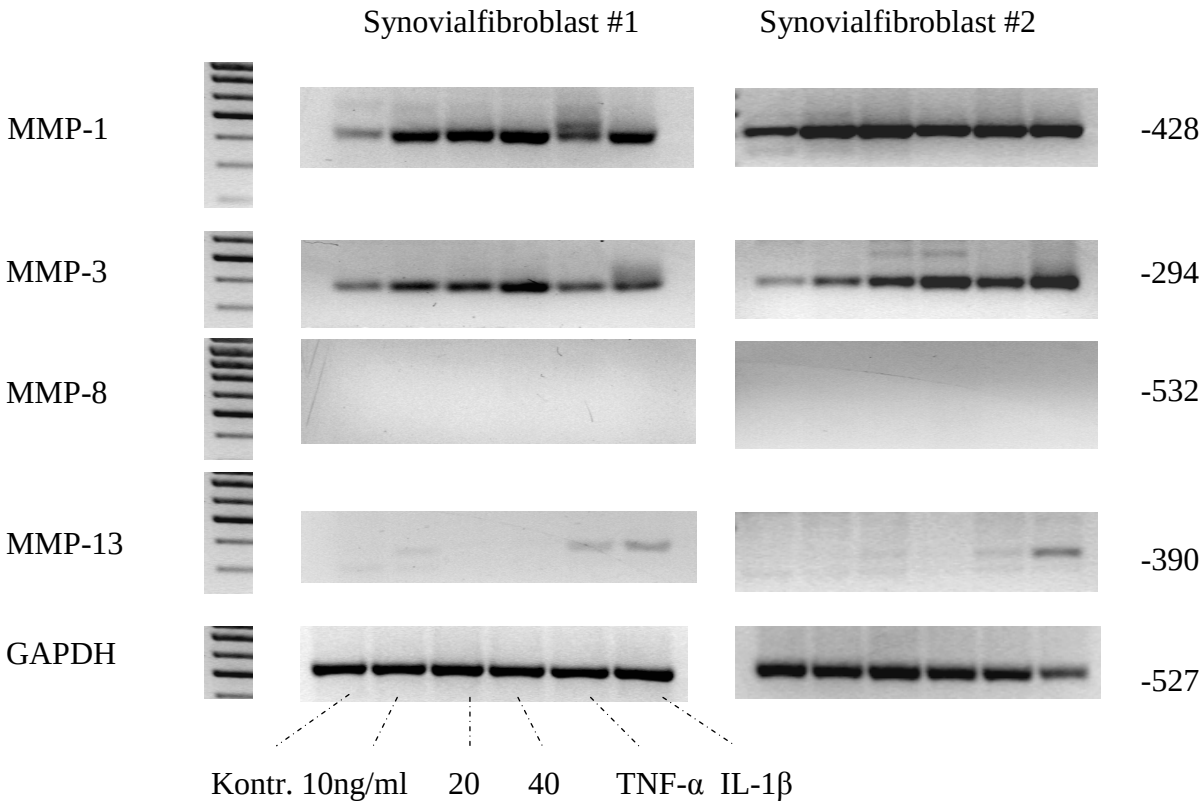

Abbildung 3.4: Expression von MMP-1, -3, -8 und -13 nach HGF-Stimulation in Synovialfibroblasten (PCR)

3.5 Proteasenaktivität in Synovialfibroblasten (und Chondrozyten) unter HGF-Stimulation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Synovialfibroblasten c-Met als Rezeptor für HGF aufweisen und dass unter HGF-Einfluß die MMP-1- und MMP-3-Synthese offenbar induziert werden, sollte nun der Nachweis der konzentrationsabhängigen Proteasenaktivität der MMPs unter HGF-Stimulierung geführt werden. Hierzu wurde die Zymographie verwendet. Es erfolgte eine Stimulation von Flüssigkeits- und Gewebssynovialfibroblasten mit HGF erneut in aufsteigender Konzentration (10, 20 und 40 ng/ml). Die Negativkontrolle wurde mit nicht stimulierten Zellen der gleichen Zelllinie durchgeführt. Die Postivkontrolle erfolgte wieder mit durch TNF-α und IL-1β stimulierten Zellen. Hier ergab sich eine deutliche Erhöhung der Proteasenaktivität bei proMMP-1 und proMMP-3, insbesondere bei Flüssigkeitssynovialfibroblasten. Eine Übersicht über die Zymographieuntersuchungen gibt Abbildung 3.5.

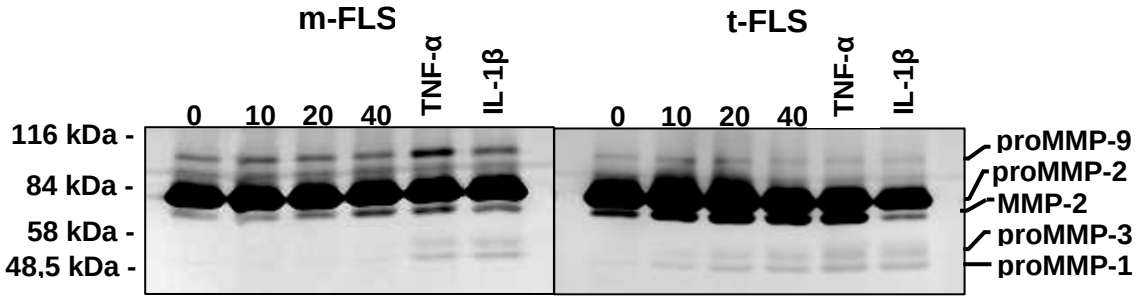

Abbildung 3.5 Effekt von HGF auf die Proteasenaktivität von Synovialfibroblasten

Zum Ausschluss eines Einflusses auf die HGF-induzierte MMP-Expression durch Chondrozyten erfolgte eine Kontrolle mittels Stimulationen an Primärkulturen von Chondrozyten von 4 zufällig ausgewählten Patienten aus dem Kollektiv. Es wurden Stimulationen mit 40 ng/ml HGF und entsprechende Zymographien durchgeführt. Es ergaben sich hierbei jeweils keine Veränderungen im Vergleich zur Negativkontrolle ohne HGF (Siehe Abbildung 3.6).

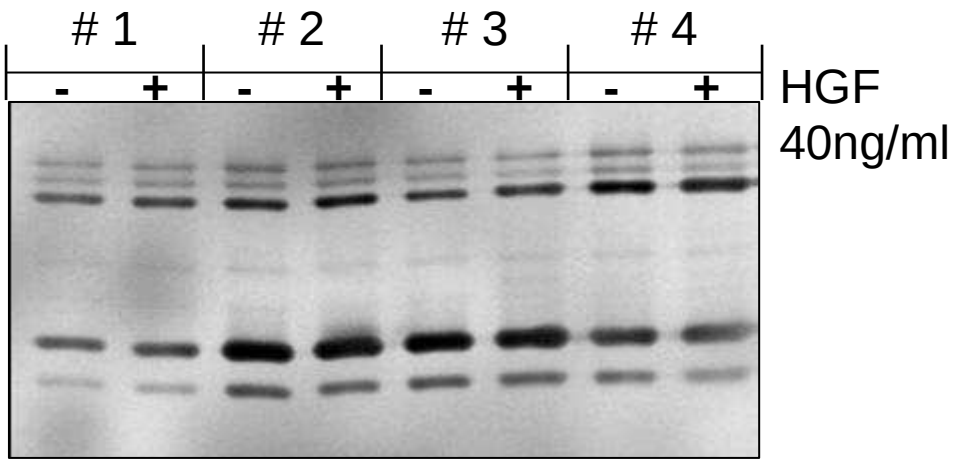

Abbildung 3.6 Effekt von HGF auf die Proteasenaktivität von Chondrozyten

3.6 Quantitative Analyse der Sekretion von MMP-1, -3, durch Synovialfibroblasten unter HGF-Stimulation

Um letztendlich quantitative Aussagen zum Einfluss von HGF auf die Synthese von MMP-1 und MMP-3 bei gewebsständigen Synovialfibroblasten und bei Flüssigkeitssynovialfibroblasten bei Osteoarthrosepatienten machen zu können, wurden ELISA-Analysen der MMP-1- und MMP-3-Konzentration in den jeweiligen Zelllinien nach Stimulation mit 0, 10, 20 und 40 ng/ml HGF durchgeführt, zur Kontrolle erfolgte die Stimulation derselben Zelllinien mit TNFα und mit IL-1β.

Nach statistischer Analyse ergab sich eine dosisabhängige Erhöhung der MMP-1- und MMP-3-Sekretion. Die Sekretion von MMP-1 war nach Stimulation mit 40 ng/ml HGF bei den Gewebssynovialfibroblasten im Vergleich zur Kontrolle bis zu 13-fach und bei den Flüssigkeitssynovialfibroblasten sogar bis zu 27-fach erhöht ($p < 0,001$). Hierbei lag die maximale MMP-1-Sekretion bei 135,89 ng/ml, die Basissekretion der Kontrolle bei 5,2 ng/ml. Dazu vergleichbar führte auch die Stimulation der verschiedenen Synovialfibroblasten mit HGF zu einem signifikanten, dosisabhängigen Anstieg der Sekretion von MMP-3, bis zu 12-fach bei den Gewebs- und bis zu 20-fach bei den Flüssgkeitssynovialfibroblasten ($p < 0,001$). Das Sekretionsmaximum lag hier bei 393,39 ng/ml bei einer basalen Sekretion von 24,9 ng/ml.

Beim Vergleich von unstimulierten Synovialfibroblasten mit durch 20 ng/ml HGF stimulierten ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,019$), beim Vergleich mit

durch 40 ng/ml HGF stimulierten Synovialfibroblasten sogar ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0{,}001$). Es liegt demnach eine statistisch signifikante dosisabhängige Hochregulierung von MMP-1 und MMP-3 nach HGF-Stimulation vor. Eine Übersicht über die Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen der MMP-Sekretion gibt Abbildung 3.7.

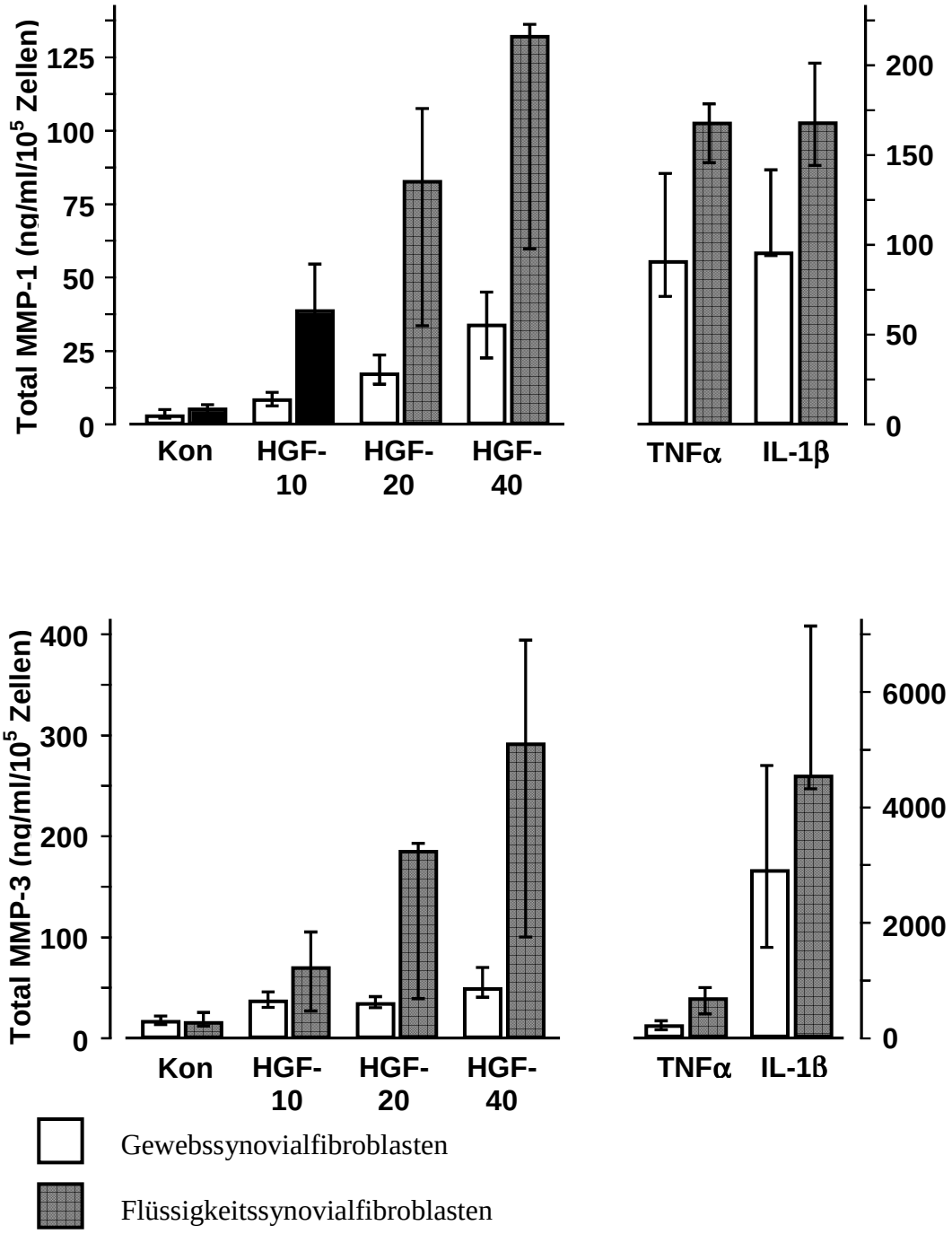

Abbildung 3.7: Mediane Konzentration von MMP-1 und MMP-3 nach Stimulation mit HGF, TNFα und IL-1β

3.7 Effekt von HGF auf die synoviale Synthese von TIMP-1 und TIMP-2

Um Aussagen zum Einfluss von HGF auf die Synthese der MMP-Antagonisten TIMP-1 und TIMP-2 zu gewinnen, wurde die Konzentration von TIMP-1 und TIMP-2 nach Stimulation mit 0, 10, 20 und 40 ng/ml HGF in Kulturüberständen von gewebsständigen und Flüssigkeitssynovialfibroblasten mittels ELISA gemessen. Für beide TIMPs ergab sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Sekretion nach Stimulation durch HGF in verschiedenen Konzentrationen. Die mediane Spannweite für TIMP-1 lag zwischen 1088 ng/ml und 1305 ng/ml bei Gewebssynovialfibroblasten und zwischen 1115 ng/ml und 1147 ng/ml bei Flüssigkeitssynovialfibroblasten. Die Konzentration von TIMP-1 blieb geradezu konstant. Die Sekretion von TIMP-2 blieb ebenso bei ansteigenden HGF-Konzentrationen konstant. Im Vergleich zu TIMP-1 war hierbei die Konzentration relativ niedrig. Die mediane Spannweite lag zwischen 9,6 ng/ml und 11,7 ng/ml bei Gewebssynovialfibroblasten und zwischen 9,1 ng/ml und 13,4 ng/ml bei Flüssigkeitssynovialfibroblasten. Es bestand kein signifikanter Unterschied der TIMP-1 und -2 Konzentrationen zwischen den verschiedenen Synovialfibroblasttypen. Eine Übersicht über die ELISA-Untersuchungen der TIMPs-Sekretion gibt Abbildung 3.8.

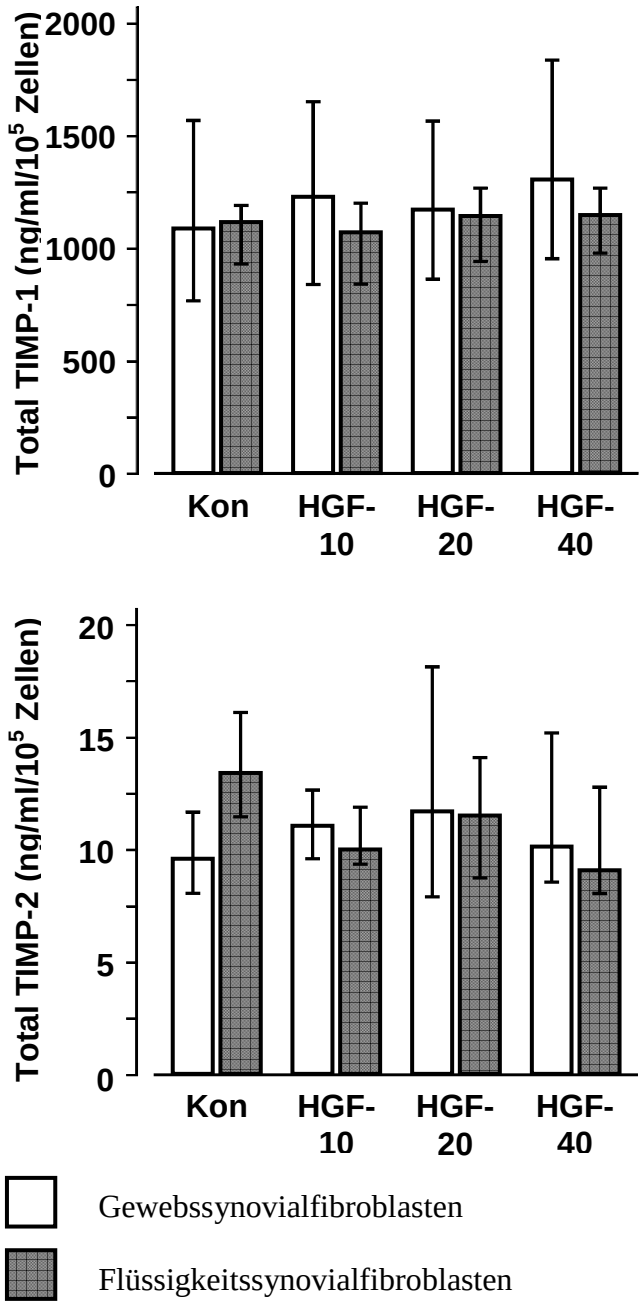

Abbildung 3.8: Mediane Konzentration von TIMP-1 und TIMP-2 nach Stimulation mit HGF

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Hepatocyte Growth Factors hinsichtlich seines Einflusses auf die MMP-1 und -3 sowie auf die TIMP-1 und -2-Sekretion bei osteoarthrotischen Synovialfibroblasten im allgemeinen und bei Gewebs- und Flüssigkeitssynovialfibroblasten im speziellen zu überprüfen.

Mit Hilfe von Zellkultur, Zymographie, PCR und ELISA konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter konzentrationsabhängiger Zusammenhang zwischen HGF-Stimulation und MMP -1 und -3 Sekretion besteht. Bei TIMP-1 und-2 konnte dieser Zusammenhang nicht dargelegt werden.

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Patientenkollektiv

Bei allen Patienten lag eine Gonarthrose vor. Sämtliche Patienten wurden der Operation zur Totalendoprothese (TEP) des Kniegelenks zugeführt.
Allerdings liegen durch die Auswahl von Patienten, die eine TEP bekamen, natürlich nur fortgeschrittenen Arthrosen vor. Weniger fortgeschrittene Erkankungssituationen werden nicht berücksichtigt. Es bleibt daher unklar, ob HGF auch bereits bei frühen Formen der Osteoarthrose für die Pathogenese eine Rolle spielt. In weiteren Untersuchungen sollte in Zukunft die Rolle des HGF in der frühen Erkrankungsphase überprüft werden. Ergäbe sich dabei kein HGF-Einfluß auf frühe osteoarthrotische Prozesse, so wäre der in dieser Arbeit postulierte pathogenitische Einfluß des HGF aus Synovialfibroblasten auf die Osteoarthrose möglicherweise doch eher ein sekundärer Effekt als Ausdruck eines Reparationsprozesses bei fortgeschrittener Gelenksdestruktion.

4.1.2 Strukturgleichheit

Die Schweregradeinteilung der Osteoarthrose nach Kellgren erfolgte durch zwei unabhängige Orthopäden. Sämtliche präparatorische und experimentelle Abläufe erfolgten durch die gleiche Person. Die Auswahl der Patienten wurde nicht auf Untergruppen reduziert. Material jedes Patienten, der sich einer Knie-TEP-Operation unterzog, wurde sukzessive verwendet, nur Gewebe eines Patienten wurde nicht in die

Untersuchung eingeschlossen, da er an einer Ochronose erkrankt ist, die als ursächlich für die Osteoarthrose erscheint und sonst die Strukturgleichheit negativ beeinflusst hätte.

4.1.3 Methodik

4.1.3.1 Zellkultur

Es wurde Kniegelenkssynovialgewebe und –flüssigkeit von fünf Patienten und Kniegelenksknorpelgewebe von 4 Patienten im Rahmen von Knie-TEP-Versorgungen entnommen. Ein Teil dieses Gewebes wurde für die Versuche zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung dieses Gewebes wurde unter strengsten hygienischen Kautelen vorgenommen, um eine sonst mögliche Kontaminationen des untersuchten Materials zu verhindern.

Die Synovialfibroblasten und Chondrozyten wurden aus ihrer Gewebematrix herausgelöst und jeweils vereinzelt.

Die Synovialfibroblasten wurden in Monolayerkultur ausgebracht und bildeten nach 2-4 Wochen einen einlagigen adhärenten Zellrasen.

Die Chondrozyten wurden nach der Vereinzelung in Monolayerkultur in low-melting Agarose ausgebracht. So konnte eine Dedifferenzierung der Chondrozyten durch zu intensiven interzellulären Kontakt vermieden werden. Die Chondrozyten wiesen nach Kultivierung einen differenzierten rundlichen Phänotyp auf.

Zellkulturen ermöglichen die gezielte Betrachtung der Auswirkungen von Veränderungen einzelner Parameter. Die komplexen Interaktionen in einem physiologischen Milieu werden reduziert und es kann eine Fokussierung auf spezielle Fragestellungen vollzogen werden. Die vielschichtigen Wechselwirkungen in vivo werden allerdings ausgeblendet. Dies bedeutet einerseits eine Vereinfachung und Abstrahierung von Zusammenhängen, andererseits können gerade dadurch die Untersuchungen als Grundlage und Werkzeug für weiterführende Forschungen in komplexeren Modellen gelten.

Allerdings muss man sich bei derartigen Systemen fortwährend eben diesen simplifizierten Modellcharakter vor Augen führen und jegliche Ergebnisse lediglich als Grundlage für weiterführende Untersuchungen sehen.

4.1.3.2 Primärkultur

Es gibt Hinweise darauf, dass Chondrozyten durch Durchlaufen der Zellkulturen bei der in vitro Expansion in zunehmendem Maße ihre Fähigkeit verlieren, einen qualitativ hochwertigen und stabilen Phänotyp einer artikulären Gelenkknorpelzelle zu bewahren (Dell'Accio et al 2001).

Um optimale Bedingungen für den Einsatz von Knorpelzellen bei der autologen Chondrozytentransplantation zu erhalten und eine höchstmögliche Qualität der zum Einsatz kommenden Chondrozyten sicherzustellen, ist es daher von Bedeutung auf ein Passagieren bzw. zu viele Populationsverdoppelungen der zu expandierenden Chondrozyten zu verzichten.

Mit Rücksicht darauf wurde für die Untersuchungen die Verwendung von Primärkulturen bevorzugt, um eine Interpretation der Ergebnisse unter vergleichbaren Bedingungen zu ermöglichen.

In gleichem Maße gilt dieses Prinzip auch für die Synovialfibroblasten (Stokes, D.G, 2001).

4.1.3.3. Monolayerkultur

Entzieht man den Chondrozyten die sie umgebende Matrix, wie dies bei der zweidimensionalen Monolayer-Kultur-Technik der Fall ist, so verändern sie ihren Phänotyp dahingehend, dass sie morphologisch Fibroblasten ähnlich werden. Sie nehmen ein längliches spindelförmiges Aussehen an (von der Mark, K 1977). Durch diesen Prozess der Dedifferenzierung wird auch die Zusammensetzung der synthetisierten Matrix verändert. Die Matrixproduktion wird vorwiegend auf Kollagen vom Typ-I und wenige Proteoglykane umgestellt (Lefevre V. 1990). Die Produktion von Kollagen-Typ-II, das die Qualität des hyalinen Gelenkknorpels zusammen mit den Proteoglykanen bestimmt, wird reduziert. Aggrecan wird zunehmend durch nicht aggregierende Proteoglykane ersetzt (Kuettner, K. 1982).

Die Produktion von TIMPs wird bei den so dedifferenzierten Chondrozyten gesteigert (Marlovits S, 2004).

Abgesehen von einzelnen Beispielen ist jedoch noch wenig über die quantitativen und qualitativen Veränderungen der Zytokinexpression bekannt, die durch den Stress des Matrixentzugs in der Monolayerkultur hervorgerufen werden.

Durch den Entzug des physiologischen Milieus könnten Stressbedingungen geschaffen werden, die denen des Entzuges von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen entsprechen. Den Chondrozyten könnte mit dem Verlust ihrer Matrix ein Kommunikationsmedium untereinander und mit dem restlichen Gelenk genommen werden. Die normale Steuerung der Proliferation und Differenzierung durch Wachstumsfaktoren und Zytokine könnte außer Kontrolle geraten.

Der Matrix-Entzug könnte bei Synovialfibroblasten und Chondrozyten zu ähnlichen Auswirkungen führen wie die Stressaktivierung durch Entzug von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren.

Jüngste Untersuchungen von stressaktivierten differenzierenden osteogenen und fibrogenen Zellen konnten diese als Produktionsstätten von TGF-b und BMP identifizieren. Diese Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen des Bindegewebes (Rodemann H. P. 1996, Gaissmaier C. 2000).

Die Einzelheiten, die diese Veränderung der isolierten Synovialfibroblasten und Chondrozyten in ihrem Phänotyp, ihrer Matrixproduktion und ihrer Mitogenität bewirken, sind bis heute nicht geklärt. Hier liegt möglicherweise ein Schlüssel zum Verständnis der Chondrogenese, der die Therapie von Gelenkknorpeldefekten entscheidend beeinflussen könnte.

4.1.3.4. RNA Extraktion

Zur RNA Extraktion wurde das RNEasy-Kit der Firma Qiagen verwendet. Ein spezifisches Puffersystem, bestehend aus hochkonzentrierten Salzpufffern ermöglicht die Fixierung von bis zu 100µg RNA pro Durchgang an eine Silikatgel-Membran.

Vor der Extraktion müssen die Proben lysiert und homogenisiert werden. Hierzu wird ein stark denaturierender Puffer (RLT) mit Guanidium Isothiocynat (GITC) als Wirkstoff eingesetzt. Dieser GITC-Puffer bewirkt eine sofortige und effektive Inaktivierung von RNase und ermöglicht somit die Gewinnung einer intakten RNA. Anschließend wird Ethanol hinzugefügt, um eine suffiziente Anbindung der RNA an der Gelmembran zu gewährleisten. Das Gemisch wird in eine dafür vorgesehene Zentrifugatiossäule aufgetragen und dann zentrifugiert. Es schließt sich ein Waschvorgang mit erneuter Zenrifugation an und letztlich wird die RNA von der Membran durch RNAse freies Wasser losgelöst. Die gewonnene RNA-Lösung wird in einem Eppendorf Cup

aufgefangen. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Extraktion ist die vorausgehende Lysierung und Homogenisierung der Proben, da es sich bei RNA um intrazelluläres Material handelt. Zur Lysierung und Spaltung der Zellmembran wurde der GITC-entaltende RLT Puffer eingesetzt. Dieser Schritt ist wichtig, um alle intrazelluläre RNA durch Auflösung der Zellmembran zu erhalten. Die Homogenisierung reduziert die erhöhte Viskosität, die durch die Lysierung der Zellen entstanden ist. Die Homogenisierung wurde durch wiederholtes Aspirieren des Zelllysates durch eine 25er Nadel erreicht. Der Hauptvorteil dieser Extraktionsmethode ist, dass sie äußerst zügig im Vergleich zu anderen Techniken vollzogen werden kann. Die Einarbeitung in die Technik ist schnell, und durch ihre Einfachheit bietet sie wenige Fehlermöglichkeiten. Die isolierte RNA kann außerdem umgehend der cDNA Synthese zugeführt werden.
Das immer bestehende Kontaminationsrisiko mit dem RNA spaltendem Enzym RNAse, lässt sich mit dieser Methode zwar verringern, ist jedoch nicht völlig auszuschalten. Diesem Risiko wurde durch Verwendung spezieller Arbeitsmittel begegnet. So kam bei der Extraktion und der anschließenden cDNA-Synthese ein separater RNAse-freier Pipettensatz zum Einsatz. Weiterhin wurden sterile Gefäße, RNAse-freie Chemikalien und sterile Pipetten verwendet. Latex-Handschuhe wurden während aller Arbeitsschritte getragen. Sterilität muss bei der RNA- Extraktion, der cDNA-Synthese und der PCR nicht eingehalten werden.
Äquivalente Mengen zur cDNA Synthese wurden durch konstante mittels voriger Zählung nachgewiesener Zellzahlen erreicht. Dadurch waren die Ergebnisse der anschließenden PCR untereinander vergleichbar.

4.1.3.5 Synthese der cDNA

An die Extraktion der RNA wurde umgehend die reverse Transkription angeschlossen. Eine Kryokonservierung der RNA wurde vermieden, um das Risiko einer Ausfällung der RNA Sequenzen durch Einfrieren und Auftauen auszuschließen. Zur reversen Transkription der Proben wurde immer der gleiche Kit eines Herstellers eingesetzt. Dieser Kit unterliegt zur Gewährleistung eines gleich bleibenden Qualitätsstandards einer strengen Kontrolle durch den Hersteller. Zum Zeitpunkt der reversen Transkription werden stets dieselben Reagenzienmischungen für die jeweiligen Proben eines Patienten verwendet. Die cDNA Synthese wurde in einem Wasserbad bei Körpertemperatur (37°C)

durchgeführt, das konstante Temperaturbedingungen gewährleistete. Identische Bedingungen für die reverse Transkription wurden somit sichergestellt.

4.1.3.6 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die gewonnene cDNA wurde anhand der Polymerasenkettenreaktion auf die Expression verschiedener Gene untersucht. Als Ausgangsmaterial für die cDNA diente mRNA.

Die Problematik der Interpretation des untersuchten Expressionsverhaltens spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren von Synovialfibroblasten und Chondrozyten unter verschiedenen Zellkultivierungsverfahren liegt in den Beschränkungen der verwendeten Untersuchungsmethode:

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) mit von kultivierten Zellen gewonnener mRNA, die durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde (RT-PCR), und mit spezifischen Primern für die zu untersuchenden Faktoren, erlaubt lediglich eine Momentaufnahme der Produktion des eigentlichen Endproduktes der Genexpression, dem Genprodukt als Protein. Es kann nur eine Aussage über die Expression der mRNA getroffen werden. Aussagen über die tatsächliche mRNA Menge des zu untersuchenden Genes im Vergleich zu internen und externen Standards sind auch nicht möglich, da in den vorliegenden Untersuchungen ausschließlich die Methode der Endpunkt-PCR verwendet wurde. Die eigentliche Produktion des Proteins kann damit nicht beurteilt werden.

Weiterhin bietet die Amplifikation der Gensequenz bei der RT-PCR zahlreiche Variationsmöglichkeiten bezüglich der Stärke der Amplifikation. Um die Variationsbreite einzuschränken, wurden standardisierte Mengen an cDNA eingesetzt. Ein in Vorversuchen optimiertes Protokoll zur Herstellung des PCR Reagenzienmixes wurde als Standard für alle Versuche angewendet. Um Anhaltspunkte über die Amplifikationsstärke zu erhalten, wurde das

„housekeeping“ Gen GAPDH als interner Standard bei jedem Versuch parallel amplifiziert. Dieses Gen eignet sich als interner Standard, da es ubiquitär in humanen Zellen vorkommt und nahezu keiner Regulation seiner Expression unterliegt.

Spezifische Primer für die untersuchten Sequenzen wurden in Vorversuchen auf die optimalen Annealing Temperaturen untersucht. Hinsichtlich der Anzahl der Amplifikationswiederholungen wurde zur Optimierung der Ergebnisse darauf geachtet, dass sich die Amplifikationskurven noch in der exponentiellen Phase befanden. Die

Plateauphase, die sich bei Sättigung einzelner Reaktionspartner ergibt und keine verlässlichen Aussagen bezüglich vorhandener Unterschiede der Expression zulässt, wurde somit vermieden.

Zur Feststellung der Reinheit der Reagenzienmischungen und zur Kontrolle auf etwaige Kontaminationen wurden stets Negativkontrollen mitamplifiziert. Der verwendete PCR-Block gewährleistete konstante Temperaturbedingungen, konstante Längen der einzelnen Schritte der Polymerasekettenreaktion und konstante Zyklenzahl für die spezifischen Primer.

Die RT-PCR Methode kann aufgrund der oben aufgeführten Gründe nur als Screeningmethode angesehen werden, hat sich jedoch als solche, bei Beachtung einer weitgehenden Standardisierung der einzelnen Teilaspekte, als relativ aussagekräftig und zuverlässig bewährt.

Die Feststellung einer Expression von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf mRNA-Ebene lässt keinen Rückschluss zu auf eine eventuell stattfindende posttranslationale Modifikation oder auf die vielfältigen Interaktionen mit den diversen Rezeptoren der Zielzellen für diese Faktoren. Die Komplexität der intrazellulären Signaltransduktion hat einen wesentlichen Einfluss auf die Effekte der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Dies kann jedoch mit der verwendeten Methodik ebenfalls nicht vollständig erfasst werden.

Um eine vollständige Beurteilung des Einflusses der verschiedenen Kultivierungsverfahren auf die Produktion von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren zu ermöglichen, bedarf es einer quantitativen Untersuchung aller Regulations- und Produktionsschritte dieser Faktoren. Dies muss als Grundlage angesehen werden für das Verständnis des Einflusses dieser Faktoren auf die Biosynthese von extrazellulärer Matrix, den Metabolismus und das Wachstum von artikulärem Knorpelgewebe.

4.1.3.7 Gelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid (EtBr) besteht darin, dass dieser Markierungsstoff an die DNA-Moleküle bindet und bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht fluoresziert. PCR-Produkte lassen sich damit visualisieren und die Intensität der einzelnen Banden lässt bei standardisierten PCR-Bedingungen eine analoge Aussage über das Ausmaß der Transkription der untersuchten Faktoren zu. Die Intensität der

spezifischen Banden dient als Indikator für die Regulation der Genexpression und ermöglicht die Darstellung qualitativer und semiquantitativer Unterschiede. Die Position der einzelnen Banden wird in Relation zu einem mit aufgetragenen Eichmarker gesetzt und lässt eine Bestimmung der Basenpaarlängen zu. Die Spezifität der dargestellten Signalbanden ist somit gewährleistet. Ein Gesundheitsrisiko dieser Technik ist die mutagene Eigenschaft von EtBr. Da dieser Stoff durch Latex diffundiert, wurden beim Umgang mit ihm spezielle Handschuhe aus EtBr undurchlässigem Nitril verwendet.
Die nach der Elektrophorese im Gel visualisierten PCR-Produkte wurden zur Dokumentation digital mit einer Videokamera und angeschlossenem Computer mit spezieller anwendungsbezogener Software gespeichert (GelDoc).

4.1.3.8 Zymographie

Die Zymographie ist als Abwandlung der Gelelektrophorese den gleichen geringen komplizierenden Faktoren ausgesetzt. Durch das strikte Einhalten des vorgeschriebenen Protokolls konnte hier das Auftreten von Fehlern vermieden werden. Auch hier wurden entsprechende Eichmarker und Standards als Postivkontrollen und Negativkontrollen eingesetzt.

4.1.3.9 ELISA

Zur Quantifizierung der MMPs und TIMPs wurden ELISA-kits des Biotrak™ ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Alle methodenbedingten Fehlerquellen (Pipettierfehler, unterschiedliche Lagerungszeiten der Proben etc.) hatten durch das standardisierte Verfahren und die durchgeführte Doppelbestimmung der Proben nur sehr geringen Einfluss auf das Messergebnis und beeinflussen die Aussagekraft der Serum-HER-2 Werte nicht.
Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen und schnellen Handhabung, der routinemäßigen Durchführbarkeit und den quantitativen vergleichbaren Ergebnissen.

4.2 Ergebnisdiskussion

Seit der Entdeckung des hepatocyte growth factors oder scatter factors im Jahre 1987 (Stoker et al. 1987) ist bekannt, dass dieser Faktor an physiologischen und pathologischen Umbauprozessen beteiligt ist. Weiterhin ist seit langem bekannt, dass nicht nur der Gelenkknorpel selbst als Substrat der Osteoarthrose die Pathogenese der Arthrose unterhält, sondern dass auch die Synovialis mit den ihr innewohnenden membranständigen Synovialfibroblasten und die von ihr in die Synovialflüssigkeit abgeschiedenen Flüssigkeitssynovialfibroblasten an diesem Prozess beteiligt sind. Der Einfluß von HGF auf die Synovialfibroblasten bezüglich der Pathogenese der Osteoarthrose ist noch nicht hinreichend untersucht worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss des Hepatocyte Growth Factors hinsichtlich seines Einflusses auf die MMP-1 und -3 sowie auf die TIMP-1 und -2-Sekretion bei osteoarthrotischen Synovialfibroblasten im allgemeinen und bei Gewebs- und Flüssigkeitssynovialfibroblasten im speziellen, zu überprüfen.

Mit Hilfe der im experimentellen Teil dieser Dissertation angewandten Methoden der Zellkultur, Zymographie, PCR und ELISA konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter konzentrationsabhängiger Zusammenhang zwischen HGF-Stimulation und MMP -1 und -3 Sekretion besteht. Bei TIMP-1 und-2 existiert dieser Zusammenhang nicht.

Aus den im Ergebnisteil dieser Arbeit festgehaltenen Resultaten ergeben sich folgende Diskussionspunkte:

1) Bei der Auswertung der Expressionsmenge von MMP-1 und MMP-3 bei den Synovialfibroblasten nach Stimulation mit HGF in aufsteigender Konzentration ergibt sich jeweils ein hochsignifikanter (jeweils $p < 0{,}001$) konzentrationsabhängiger Matrixmetalloproteasenanstieg. Es liegt also eine größere Menge proteolytischer Enzyme vor als durch andere MMP-Quellen allein. Bekanntermaßen produzieren artikuläre Chondrozyten (Billinghurst et al. 1997), (Fernandes et al. 1998), (Goldring 2000), (Jasin und Dingle 1981), (Morales und Kuettner 1982) und auch Makrophagen (Hauser und Vaes 1978), (Janusz und Hare 1993) kollagendegradierende Enzyme. Es zeigt sich also, dass die Synovialfibroblasten unter HGF-Einfluß einen wichtigen Eckpfeiler bei der

Kollagenolyse der ECM darstellen und damit unter anderen ein wichtiger Faktor für die Pathogenese der Osteoarthrose sind.

2) Offenbar wird weiterhin, dass sich die Gewebssynovialfibroblasten und die Flüssigkeitssynovialfibroblasten hinsichtlich der Stärke der MMP-Sekretion voneinander unterscheiden. Die von der Synovialmembran abgeschiedenen Flüssigkeitssynovialfibroblasten exprimieren eine konstant und signifikant ($p = 0,019$) höhere Menge an MMPs als die Gewebssynovialfibroblasten. MMP-1 wurde bei Stimulation mit 40 ng/ml HGF durch die Flüssigkeitssynovialfibroblasten vierfach stärker exprimiert als durch die Gewebssynovialfibroblasten. Bei MMP-3 lag das Verhältnis sogar bei 6,1 : 1.

Dies könnte daran liegen, dass die Flüssigkeitssynovialfibroblasten dadurch, dass sie frei beweglich sind, in größerem Umfang mit ihrer Umgebung, also auch mit in der Synovialflüssigkeit befindlichen Zytokinen, aber auch Mediatoren wie HGF, interagieren können. Außerdem befinden sie sich physikalisch näher am Knorpel und können hiermit ggf leichter Wirkung an seiner Extrazellulärmatrix erzeugen. Diese Umstände führen wahrscheinlich, am ehesten parallel mit biomechanischen Belastungen („wear and tear“), zu der beobachteten Hochregulation der MMP-Synthese. Die Hochregulation kann durch Veränderung an jeglichem Punkt der Rezeptor-Genom-Protein-Sequenz erfolgen. Eine denkbare Variante wäre beispielsweise eine verstärkte Expression von c-Met als Rezeptor für HGF, was zu einer verstärkten Signaltransduktion in Richtung Genom und von da gegebenenfalls wieder über Transkription und Translation zu erhöhten Mengen an MMPs führen könnte.

Die so mit großem pathogenetischen Potential versehenen Flüssigkeits-synovialfibroblasten befinden sich bei fortgeschrittenerem Arthrosestadium mit größerer Wahrscheinlichkeit und in höherer Konzentration in der Synovialflüssigkeit und somit auch mit höherer Aufenthaltswahrscheinlicheit nahe der Knorpelextrazellulärmatrix und können die von ihnen gesteigert expremierten kollagenolytischen MMPs direkt dort zur Wirkung bringen, wo das pathologische Korrelat am größten ist.

3) Des Weiteren ergibt sich aus den Untersuchungsergebnissen eine hochsignifikante Korrelation zwischen HGF-Stimulation und radiologischem Arthrosegrad ($p = 0,002$) und zwischen HGF-Stimulation und AHL ($p = 0,001$). Dies ist insofern interessant, als dass sich hierdurch in Zukunft neue Diagnose- und dadurch Therapiemöglichkeiten ableiten lassen könnten. Man könnte so vielleicht nach Gelenkpunktion die Synovialflüssigkeit auf erhöhte HGF-Konzentration hin untersuchen und bei erhöhten Werten eine noch zu entwickelnde gezielte (molekulare) Therapie stadiengerecht einsetzen.

4) Für Alter ($p = 0,162$), Geschlecht ($p = 0,438$) und Body mass index ($p = 0,894$) ergeben sich keine signifikanter Zusammenhang mit der HGF-Stimulation. Dies zeigt, dass sich HGF gegebenenfalls als alters-, geschlechts- und BMI- unabhängiger (Prognose-) Marker für die Osteoarthrose eignen könnte. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieser Hypothese wären allerdings erforderlich.

5) Diese Arbeit konnte zeigen, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Expression von matrixdegradierenden MMPs durch HGF kommt. Welche genaue Rolle HGF im Gesamtorgan Gelenk und damit für die Pathogenese der Osteoarthrose spielt, bleibt noch unklar. Die Rolle der Zytokine, insbesondere von TNFα und IL1-β, für die Genese der Arthrose ist lange bekannt. Auch ist bekannt, dass es für sie bestimmte Schwellenwerte gibt (Dingle; Horner und Shield 1991), ab denen es entweder zu katabolen oder zu anabolen Prozessen an der ECM kommt. Diese Schwellenwerte können sich mitunter deutlich unterscheiden. Offenbar ist es so, dass hierbei der Schwellenwert für die Hemmung der ECM-Synthese deutlich unter dem Wert für die Destruktion der ECM liegt (Neidel und Zeidler 1993). Ob ein solches Schwellenwertprinzip ebenfalls für HGF existiert wurde bislang noch nicht untersucht.

Von den Zytokinen ist weiterhin seit langem bekannt, dass für sie physiologische Antagonisten wie beispielsweise Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1), Transforming Growth Factor-β (TGF-β) oder spezifische Il-1-Inhibitoren existieren (Rosenstreich DL 1987), (Dayer und Burger 1994). Sie werden von der Synovia synthetisiert (Fava; Olsen; Keski-Oja; Moses, und Pincus 1989), (Keyszer; Heer; Kriegsmann; Geiler; Keysser; Gay und Gay 1995) und regen über die Chondrozyten eine kompensierende Synthese der

ECM an und gleichen so teilweise die katabolen Effekte der Zytokine wieder aus (Hui; Rowan und Cawston 2001). Ob es solche parakrine Kompensationsmechanismen auch für HGF gibt, lässt sich aktuell noch nicht einordnen. Auch hier sind weitere klärende Untersuchungen zu fordern.

6) Bei der Expressionsanalyse von TIMP-1 und TIMP-2 ergab sich nach Stimulation mit HGF in aufsteigender Konzentration eine quasi konstante Expression. Dies bestätigt den bei den Zytokinen bereits bekannten Effekt, dass sie zu einer Imbalance zwischen MMP und TIMP führen (Martel-Pelletier J 1994), (Fuchs; Skwara; Bloch und Dankbar 2004). Dies dürfte daran liegen, dass HGF an noch unbekannter Stelle im Verlauf der Rezeptor-Signaltransduktion-Genom-Protein-Expressions-Kaskade einen für die MMPs induktiven und für die TIMPs repressiven Einfluss hat. Der Wirkort ist bislang nicht identifiziert. TIMPs werden hauptsächlich durch Agonisten wie TGF-β oder IGF-1 induziert. Insofern ist die Rolle von HGF in dieser TIMP-Achse noch nicht eindeutig charakterisierbar. Festzustehen scheint aber die Bedeutung der auch hier beobachteten MMP/TIMP-Imbalance für das eigentliche Ausmaß der Degradation der ECM (Dean et al. 1989). TIMPs komplexieren MMPs. Liegt also „zuviel“ MMP oder „zuwenig“ TIMP vor, so kommt es zu einem Überschuss an freiem, aktivem MMP, dass zur eigentlichen kollagenolytischem Wirkung in der Lage ist.

4.3 Vergleich mit vorausgegangenen Untersuchungen zum Thema

Seit dem Jahre 1997 wurden in diversen Arbeiten der Einfluß von Synovialfibroblasten und von HGF auf die cartlaginäre Homöostase und damit auf die Pathogenese der Osteoarthrose beleuchtet.

Carrie Langdon et al (Langdon 1997) konnte erstmals zeigen, dass Oncostatin M fähig ist, bei Synovialfibroblasten aus arthritisch veränderten Gelenken eine IL-1α-induzierte und chemoattractant protein-1-induzierte MMP-1-Sekretion hervorzurufen. Bei dieser in vitro-Untersuchung konnte damit als einem der ersten Versuche die Rolle der Synovialfibroblasten für Pathogenese von Arthritiden unterstichen werden. Die MMP-1-Sekretion wurde mittels ELISA nach OSM-Stimulation von Gewebssynovialfibroblasten gemessen. Interessanterweise kam es bei den Synovialfibroblasten bei neun von zehn Patienten mit rheumatoider Arthritis zum Nachweis eines signifikanten MMP-1-Anstiegs nach OSM-Stimulation aber nur bei einem von zehn Patienten mit Osteoarthrose. Die Arbeit unterstreicht die Bedeutung von OSM für entzündliche, degenerative Prozesse am Gelenk, zeigt aber vor allem die Bedeutung der Synovialfibroblasten bezüglich der Fähigkeit zur Synthese von matrixdegradierenden Enzymen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden - in diesem Fall flüssigkeits- und gewebsständig gesondert analysiert - Synovialfibroblasten und ihre Synthese von MMP-1 und -3 unter Stimulation jetzt von HGF untersucht. Wie schon von Langdon wurde auch in diesem Fall zur Quantifizierung ein ELISA verwendet. Es wurde ausschließlich Gewebe von Patienten mit Osteoarthrose und keines von Patienten mit rheumatoider Arthritis verwandt. Es konnte gezeigt werden, dass Synovialfibroblasten nicht nur bei der rheumatoiden Arthritis, sondern auch bei der Osteoarthrose, Synthese von proteolytischen Enzymen betreiben können. Unter der Voraussetzung der Stimulation mit HGF ergibt sich hier vor allem für die Flüssigkeitssynovialfibroblasten aus osteoarthrotischen Kniegelenken ein signifikanter Zusammenhang zum Ausmaß der Sekretion MMP1- und -3.

Ob ein synergistscher Effekt oder negetiver Effekt zwischen OSM- oder HGF-getriggerter Stimulation besteht, wurde bislang noch nicht untersucht. Sicher scheint zu sein, dass OSM für die Pathogenese der Osteoarthrose keine entscheidende Rolle spielt (Manicourt 2000).

In Jahre 1999 untersuchte D. Pfander in einer Arbeit das Expressions- und Verteilungsmuster von hepatocyte growth factor und seines Rezeptors, des Rezeptors des Protoonkogens c-Met, in physiologischem und osteoarthrotisch verändertem Kniegelenksknorpel (Pfander et al. 1999). Bei fünf Kontrollproben und 14 Knorpelproben aus osteoarthrostischen Gelenken erfolgte eine Schweregradeinteilung der Osteoarthrose anhand des Mankin Scores (Mankin et al. 1971). Hiernach wurde eine radioaktive in-situ Hybridisation und Immunhistochemie für die Expression von HGF und c-Met-Rezeptor durchgeführt.

Pfander konnte so sowohl HGF als auch c-Met-Rezeptor in der extreazellulärem Matrix direkt um die Chondrozyten herum als auch in den tiefergelegenen Knorpelanteilen nachweisen. In geringerer Konzentration wies er bei der Osteoarthrose c-met-Rezeptor-Färbung, aber auch in der oberflächlichen und in der Zwischenschicht, also letzlich in allen Schichten, nach. Bei normalem Knorpel war c-Met-Rezeptor in größerem Abstand zu den Chondozyten nicht nachweisbar. Bei osteoarthotisch verändertem Knorpel fand er eine gesteigerte Expression von HGF immunhistochemisch und eine gesteigerte HGF-RNA-Expression in der in-situ Hybridisation bei Chondrozyten der tiefen Knorpelzone.

Diese Ergebnisse legten also nahe, dass der Komplex HGF/c-Met in autokriner, parakriner Art und Weise bei physiologischem und osteoarthrotischem (Knie-)Gelenksknorpel regulierend beteiligt ist und so möglicherweise am gesteigerten Stoffwechsel bei osteoarthrotischem Knorpel beteiligt ist.

In den Experimenten zu dieser Arbeit bezog sich der Großteil der Untersuchungen auf den Einfluß von HGF auf die Aktivitäten von Synovialfibroblasten. Als Negativkontrolle wurde allerdings auch untersucht, ob nicht auch die Chondrozyten der gleichen Patienten, von denen die Synovialfibroblasten stammen, unter HGF-Stimulation an der Expression von MMP-1 oder MMP-3 beteiligt sind. Untersucht wurde dies in diesem Fall mittels Zymographie. Im Gegensatz zu Pfanders Arbeit wird hier also nicht die HGF-Produktion von Chondrozyen, sondern der Einfluß von HGF auf die Chondrozyten beleuchtet.

Hier wird unter Stimulation mit 40 ng/ml HGF gezeigt, dass zwar MMP-1 und -3 von Chondozyten gebildet, aber dass diese Bildung eben nicht HGF-konzentrationsabhängig ist. Dies legt nahe, dass Chondrozyten zwar als Bildungsort von HGF eine Rolle spielen, der Wirkort im Sinne der Genese der Osteoarthrose scheint aber ein anderer zu sein, nämlich, zumindest teilweise, die Synovialfibroblasten.

Der Zusammenhang von c-Met und Chondrozyten wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht.

In einer weiteren Arbeit untersuchte AJ Feuerherm 2001 die Expression von Osteoprotegerin (OPG) und hepatocyte growth factor bei physiologischem Knorpel im Vergleich zu Knorpel von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Feuerherm et al. 2001).
Feuerherm maß hierzu die Expressionsmengen von OPG, HGF und c-Met in Serum, Synovialflüssigkeit, Synovialgewebe und Knorpelgewebe bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, aber auch anderen Arthritiden. OPG und HGF im Serum und Synovialflüssigkeit wurden jeweils mittels ELISA quantifiziert. Eine semiquantitative Messung des Gehaltes von HGF und c-Met in Synovial- und Knorpelgewebe erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie.
Die Analyse ergab erhöhte Mengen an sowohl OPG als auch HGF in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit RA und auch bei anderen Arthritiden im Vergleich zur Negativkontrolle bei physiologischen Sera und Synovialflüssigkeiten. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Entzündung und den Mengen an OPG und HGF. HGF und auch c-Met konnten sowohl in Knorpel- als auch in Synovialgewebe immunhistochemisch in im Vergleich zur Negativkontrolle höherem Ausmaß nachgewiesen werden. Die stärksten Ausprägungen der jeweiligen Veränderungen ergaben sich für die Patienten mit rheumatoider Arthritis. In einer Subgruppenanalyse ergibt sich für HGF eine erhöhte Expression vor allem bei Knopelgewebe von Patienten mit Osteoarthrose. C-Met war über alle Subgruppen gleich verteilt.
Damit bestätigen sich die Ergebnisse Pfanders bezüglich der HGF- und c-Met-Konzentrationen im Knorpelgewebe.
In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Gewebe von Patienten mit Osteoarthrose verwendet und keines von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Beiden Arbeiten gemein ist aber die Tatsache, dass HGF in der Synovialflüssigkeit signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht ist, was die Rolle von HGF, neben der für die rheumatoide Arthritis, auch für die Osteoarthrose unterstreicht.
Sowohl in Feuerherms Arbeit als auch in der vorliegenden wurde ein ELISA zur Quantifizierung von HGF in Synovialflüssigkeit durchgeführt. Insofern besteht eine gute

Vergleichbarkeit der beiden Untersuchungen. In der hier beschriebenen Arbeit wurde keine weiterführende Untersuchung zu OPG durchgeführt.

Pascal Reboul veröffentlichte im Jahre 2001 eine Arbeit, in der er die Induktion von Kollagenase-3 (MMP-13) bei osteoarthrotischem Knorpelgewebe duch HGF untersuchte (Reboul et al. 2001).

Reboul analysierte hierzu die Kollagnase-3-Produktion in humanen Chondrozyten nach HGF-Stimulation. Die hierzu eingesetzen Methoden waren das Western- und Northern-blotting. Darüberhinaus wurde der intrazelluläre Signaltransduktionsweg der HGF-induzierten Kollagenase 3-Produktion untersucht.

Neben dem Northern- und Westernblotting wurden noch die Methoden der ELISA und RT-PCR angewendet.

Im Ergebnisteil der Arbeit offenbart sich, dass der hepatocyte growth factor die Bildung von MMP-13 auf Transkriptionsniveau bei humanen Chondrozyten induziert. Zusätzlich wird die hierfür verantwortliche Signaltransduktionskaskade weitestgehend aufgedeckt.

Diese Ergebnisse Rebouls bestätigten Bedeutung von HGF für die Pathogenese der Osteoarthrose, da sie als erste die Fähigkeit des HGF aufzeigten, durch MMP-Induktion am Knorpelremodeling in osteoarthrotischer Siatuation teilzunehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HGF-Induktion von Kollagenase-3 (MMP-13) bei Synovialfibroblasten durch die RT-PCR überprüft. Im Gegensatz zu Rebouls Ergebnissen, der diesen Zusammenhang, ebenfalls mittels RT-PCR, an Chondrozyten überprüfte, ergibt die Analyse hier keine Induktion von MMP-13. Im Gegensatz zeigt sich hier aber eine signifikante konzentrationsabhängige Induktion von MMP-1 und -3, welche wiederum in Rebouls Arbeit nicht untersucht worden ist.

Die Induktion von MMP-13 bei Chondrozyten auf der einen Seite und die Nicht-Induktion von MMP-13 bei Synovialfibroblasten auf der anderen Seite, dürfte, bei guter Vergleichbarkeit beider Arbeiten, in beiden Fällen wurde zur Analyse die RT-PCR verwendet, in der Untersuchung von verschiedenen Zellarten liegen. Beide sind zwar nachweislich an den Pathomechanismen der Osteoarthrose beteiligt, beide aber offensichtlich auf teilweise ganz verschiedene Art und Weise.

Beide Arbeiten bestätigen weiter, dass HGF in vielfätiger Weise in dem Osteoarthrosestoffwechsel eingreift. Es handelt sich um ein komplexes System und nicht um ein einfaches Substrat - Produkt - Modell.

Nagashima et al. veröffentlichten ebenfalls im Jahre 2001 im Journal of Rheumatology eine Arbeit, in der er die Rolle von HGF, des Hepatocyte Growth Factor-Aktivator (HGFA) und von c-Met in Synovialgewebe bei rheumatoider Arthitis und Osteoarthrose untersuchte (Nagashima et al. 2001).

Die Arbeitsgruppe untersuchte hierfür Proben von Synovialgewebe von zehn Patienten mit rheumatoider Arthritis, von vier Patienten mit Osteoarthrose und von zwei gesunden Individuen zur Kontrolle. Das Synovialgewebe wurde einer immunhistochemischen Färbung unterzogen, und die weitere Analyse der Expression erfolgte durch in-situ Hybridisation, Western blotting und RT-PCR.

Als Ergebniss erbrachte Nagashimas Arbeit, dass HGFA und c-Met in Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und Synovial lining-Zellen der Synovia in der Immunhistochemie jeweils stark angefärbt und damit stark expremiert werden. HGF selbst wurde in Immunhistochemie bei Makrophagen und Fibroblasten kaum und in Endothelzellen der Synovia sowohl bei der rheumatoiden Arthritis als auch bei der Osteoarthrose gar nicht expremiert.

Die RT-PCR wies RNA von HGF, HGFA und c-Met in beiden Erkrankungsmodalitäten nach, aber auch im physiologischen Kontrollgewebe.

Nagashima zieht hieraus den Schluß, dass HGF über den HGF-Aktivator an c-Met der Endothelzellen der Synovia bindet und hierüber eine Angiogenese induziert. Er stellt dies für die rheumatoide Arthritis und auch für die Osteoarthrose gleichermaßen fest.

Vergleicht man die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung von Nagashima, so zeigt sich, dass beide Arbeiten Hinweise dafür liefern, dass HGF an Synovialgewebe eine Reaktion im Sinne einer Osteoarthrosefördernden Wirkung induziert. Nagashima postuliert die Angiogenese, in der vorliegenden Arbeit wird die Induktion von MMP-1 und -3 gezeigt. Dies unterstreicht weiterhin die überaus komplexe Interaktion von verschiedenen Faktoren bei der Pathogenese der Osteoarthrose.

Der Einfluß von HGFA wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von HGF auf Synovialgewebe untersucht und nicht die Produktion von HGF oder c-Met durch das Synovialgewebe. Die beiden Untersuchungen lassen sich daher nur bedingt vergleichen, die Ergebnisse weisen im Sinne der Bedeutung von HGF aber in die gleiche Richtung.

Berno Dankbar et al. berichteten im Jahre 2007 von ihren Ergebnissen (Dankbar et al. 2007). Die Studiengruppe untersuchte die Induktion des Macrophagen Chemooattractant Protein-1 (MCP-1) und des Osteophyten-Inducing-Factors bei der Osteoarthrose durch HGF.

Zunächst wurden die Synovialflüssigkeiten von 41 Patienten bezüglich des Schweregrades der Erkrankung mit der Osteophytenformation korreliert, dann erfolgte eine anteroposteriore Weight-Bearing-Radiographie. Der Nachweis von HGF, c-Met und CD68 erfolgte durch Immunhistochemie. Die Auswirkung von HGF auf die Sekretion von MCP-1, TGF-β1 und Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) durch Synovialfibroblasten und Macrophagen wurde jeweils durch ELISA gemessen.

Die Analyse erbrachte den Nachweis, dass HGF in sämtlichen Synovialflüssigkeiten nachgewiesen werden kann und mit dem Schweregrad der Erkrankung sowie mit dem Ausmaß der Osteophytenbildung korreliert. Die Immunhistochemie zeigte eine relativ schwache Färbung für HGF in der Synovia, allerdings schweregradabhängig eine zunehmende HGF-Färbung von Chondrozyten und deren unmittelbarer Umgebung. Weiterhin konnte ebenfalls schweregradabhängig eine erhöhte Anzahl von Makrophagen in der Synovia nachgewiesen werden. Die ELISA erbrachte einen konzentrationsabhängigen Zusammenhang zwischen HGF-Stimulation und MCP-1-Sekretion durch Flüssigkeitssynovialfibroblasten. TGF-β1 und BMP-2 wurden durch HGF nicht hochreguliert. Dankbar schlussfolgert, dass HGF die Entwicklung von Osteophyten durch Stimulation von MCP-1 und damit Attraktion von Makrophagen, vermittelt.

Die Untersuchung von Berno Dankbar ist im selben Labor mit dem gleichen Grundstock an Gewebe und teilweise den gleichen Assays erfolgt, quasi als Weiterführung zu den Ergebnissen, die der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegen. Daher sind die Ergebnisse naturgemäß sehr gut vergleichbar, wenn auch prinzipiell die gleichen Einschränkungen durch die verwendeten Methoden bestehen. Die Ergebnisse der Arbeit von Dankbar stützen die dieser Arbeit, denn auch hier ergeben sich weitere Hinweise dafür, dass HGF auf wieder andere Weise am Pathoprozess der Osteoarthrose beteiligt ist. Die immunhistochemischen Ergebnisse decken sich mit den vorher verglichenen Arbeiten, wenn auch in der vorliegenden Arbeit keine Immunhistochemie durchgeführt worden ist. Die HGF-Quantifizierung in der Synovialflüssigkeit erbrachte das gleiche Ergebnis, was die Validität der Daten bestätigt.

Zuletzt hat zum Thema HGF, Synovialfibroblasten und Osteoarthrose E. Anitua im Oktober 2007 eine Arbeit in Rheumatology veröffentlicht (Anitua 2007). Anitua untersuchte den Einfluß von Platelet-released Growth Factores (PRGFs) auf das Ausmaß der Sekretion von Hyaluronsäure und HGF durch Synovialfibroblasten.

Hierzu wurden Synovialfibroblasten von zehn Patienten mit Osteoarthrose isoliert und zunächst serumfrei kultiviert. Diese Synovialfibroblasten wurden dann für 72 Stunden entweder einem thrombozytenarmen Serum oder einem PRGFs-haltigen Serum ausgesetzt. Zusätzlich wurden Synovialfibroblasten zunächst für 48 Stunden mit IL-1β aktiviert und anschließend mit PRGFs kultiviert. Daraufhin wurden die jeweiligen Sekretionsmengen an Hyaluronsäure, MMP-1, -3 und -13, TIMP-1, TGF-β1, VEGF und HGF gemessen.

Die Analyse ergab eine signifikant erhöhte Hyaluronsäuresekretion unter PRGFs-Kultivierung. Auch HGF wurde vermehrt expremiert. Die MMPs, TIMP-1, TGF-β1 und VEGF werden hierdurch nicht beeinflusst. Die Synovialfibroblasten, die zuvor mittels IL-1β aktiviert worden waren, wiesen keine erhöhte HGF-Produktion unter PRGFs-Bedingungen auf.

Anitua leitet hieraus ab, dass eine intraartikuläre Applikation von PRGFs möglicherweise die Wiederherstellung des Hyaluronsäurespiegels begünstigen könnte, dass allerdings der Effekt von IL-1β auf die Synovialfibroblasten hierdurch nicht gelindert werden kann.

Auch diese Arbeit untersucht im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit den Effekt eines Stimulans auf die HGF-Sekretion durch Synovialfibroblasten und nicht den Effekt, den HGF selbst auf die Zellen ausübt. Wie aber auch andere bereits verglichene Arbeiten bestätigt auch die Arbeit von Anitua, dass HGF im Remodeling bei der Osteoarthrose eine Rolle spielt. Interessant ist die Tatsache, dass die Erhöhung der HGF-Sekretion unter PRGFs-Bedingungen nicht mit einer gleichzeitigen Erhöhung von MMP-1 und -3 einhergeht. Eine Abweichung durch verschiedene Meßmethoden kommt nicht in Frage, da in beiden Fällen hochspezifische ELISAs zur Analyse verwendet wurden. Am wahrscheinlichsten erscheint die Ursache hierfür in der Dosisabhängigkeit der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Beziehung zwischen HGF-Stimulation und MMP-Synthese zu liegen. Die Kultur von Synovialfibroblasten mit PRGFs und die hierdurch ausgelöste HGF-Sekretion kann wahrscheinlich in einem so kurzen Zeitraum (nur 72 Stunden) kein Konzentrationsniveau erreichen, das genügt, um die MMP-Sekretion messbar zu induzieren.

4.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt die vorliegende Arbeit vermuten, dass neben den bekannten Zytokinen auch HGF an der Pathogenese der Osteoarthrose beteiligt ist. MMP-1 und MMP-3 werden unter dem Einfluß von HGF offenbar von den Synovialfibroblasten, vor allem von den Flüssigkeitssynovialfibroblasten, produziert. Chondrozyten scheinen an diesem Prozess nicht beteiligt zu sein. Die Beteiligung der Makrophagen/Monozyten-Achse wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft. Zur Vervollständigung des Wissens über die Rolle von HGF im komplexen System Gelenk bei der Arthroseentstehung wäre eine solche Untersuchung durchaus interessant.

MMP-1 und MMP-3 konnten unter den nach heutigem Stand maßgeblichen Metalloproteinasen als durch HGF konzentrationsabhängig induzierbar identifiziert werden und sind somit wahrscheinlich, bei Vorhandensein von HGF in entsprechender Konzentrationen, an der Pathogenese der Osteoarthrose beteiligt. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die maßgeblichen TIMPs-1 und -2 im Gegensatz zu den ansteigenden MMPs auf stabilem Niveau gehalten werden.

Diese Arbeit bestätigt und unterstreicht die Bedeutung der Synovialfibroblasten für die Pathogenese der Osteoarthrose neben den Chondrozyten und den Makrophagen/Monozyten.

Wie bei in vitro-Experimentaufbau üblich, ist es trotz großer Mühe, den Komplex Gelenk zu simulieren, nicht möglich, die erhobenen Daten und damit die daraus abgeleiteten Ergebnisse 1 : 1 auf die in vivo-Situation zu übertragen. Natürlich muss man auch mit dem Vergleich verschiedener Studien vorsichtig sein, vor allem dann, wenn Knorpel/Synovialfibroblasten verschiedener Spezies verglichen werden, die möglicherweise mit Zytokinen ebenfalls verschiedener Spezies stimuliert worden sind. Auch bei den für die vorliegende Arbeit eingeschlossenen Patienten handelt es sich nicht um eine standardisierte Gruppe. Hier gibt es Störfaktoren wie Alter, Geschlecht, traumatische Ursache, Verschleiß, Stoffwechselerkrankungen und weitere Erkrankungsursachen, die nicht immer stratifizierbar sind und z.T. auf die verschiedenen Stimulatoren ganz unterschiedlich reagieren können.

Aus den vorgestellten Ergebnissen leiten sich einige weiterführende Fragen zu den Synovialfibroblasten im Rahmen der Pathogenese der Osteoarthrose im allgemeinen und im Zusammenspiel mit HGF im speziellen ab:

- Wie funktioniert der parakrine Austausch von Informationen zwischen Synovialfibroblasten, Chondrozyten und Makrophagen/Monozyten?
- Welche der Zellen dieses Systems ist die tragende Kraft; gibt es eine tragende Kraft?
- Geht das Krankheitsgeschehen von einem der Zelltypen aus, oder ist es ein parallel eingeleiteter Prozess?
- Was führt dazu, dass die Flüssigkeitssynovialfibroblasten stimulationsfreudiger sind als die Gewebssynovialfibroblasten? Könnte dies an einer direkten Kontaktaufnahme des Fibroblasten mit der ECM über spezifische Rezeptoren liegen (Zwei potentielle Kandidaten wurde mit CD44v5 und CD44v6 bereits identifiziert (Fuchs; Rolauffs; Arndt; Tibesku und Prehm 2003), (Fuchs; Dankbar; Wildenau; Goetz; Lohmann, und Tibesku 2004), (Tibesku; Szuwart; Ocken; Skwara und Fuchs 2005), (Tibesku; Szuwart; Ocken; Skwara und Fuchs 2006))? Gibt es weitere Kandidaten?
- Wie groß ist der Anteil der freiem MMPs, die durch die Synovialfibroblasten synthetisiert werden, und wie groß ist daher ihr Anteil am Arthrosegeschehen insgesamt?
- Welcher Prozess führt zu der diskordanten Induktion von MMPs und TIMPs durch HGF?
- Hat HGF Einfluss auf das Makrophagen/Monozytensystem im Rahmen der Arthroseentstehung?
- Wo wird HGF in der Rangfolge der arthrosefördernden Stimulatoren eingeordnet werden? Sollte sich eine große Bedeutung herausstellen, ist eine therapeutische Ausnutzung denkbar?
- Gibt es neben den Zytokinen und HGF weitere interessante Kandidaten, die für Stimulationsexperimente an Synovialfibroblasten aber auch Chondrozyten und Makrophagen/Monozyten in Frage kommen?

Insgesamt wird es interessant sein, zu beobachten, wohin die Forschung an den verschiedenen Zelltypen, degradierenden Enzymen und TIMPs führt. Ergeben sich letztendlich spezifische, vielleicht sogar kurative Therapieansätze? Am Horizont zeichnet

sich ein gentherapeutisches Modell ab. Erste Phase-I Studien geben Anlass zu Optimismus (Evans; Ghivizzani; Herndon und Robbins 2005). Ziel wird es hier sein, die Zellen zugunsten eines knorpelaufbauenden Fließgleichgewichts zwischen ECM-Synthese und –Degradation umzuprogrammieren. Dieses Therapiekonzept könnte die bisherige z.T. nebenwirkungsträchtige medikamentöse Therapie ablösen und als neuer Therapiestandard die Erkrankung auf ein unpathologisches Niveau zurückführen.

Ein weiterer Therapieansatz wäre eine molekulare Therapie, wie sie in abgewandelter Form bereits mit zum Teil revolutionären Erfolgen in der Onkologie zum Einsatz kommt. Ein Schlagwort ist in diesem Zusammenhang die Tyrosinkinaseinhibition. Bei diesem Ansatz müssten molekulare Zielstrukturen identifiziert werden, die möglichst nur in den Zielzellen vorkommen und natürlich entscheidend an der Pathogenese der Arthose teilhaben, sei es, dass sie im Rahmen der MMP-Produktion die Knorpeldegradation fördern oder dass sie im Rahmen der TIMP-Produktion eine knorpelprotektive Wirkung haben. Der entsprechende Wirkstoff müsste dann idealerweise die Regelkreise in knorpelanaboler Art und Weise hochspezifisch beeinflussen, ohne dass es Ausweichstoffwechselwege gibt und mit ebenfalls idealerweise minimaler Toxizität. Wie man sieht, ein schwieriges, teures und vor allem langwieriges Unterfangen.

Eine weitere Herausforderung wird die Galenik eines potentiellen Pharmakons sein. Es muss schließlich zum Wirkort gelangen. Dies ist aber zumindest bei den per Diffusion versorgten Chondrozyten nur eingeschränkt möglich.

Sollte eine kurative Therapie oder zumindest eine erkrankungsstabilisierende Therapie möglich sein, so würde sie sehr viele Betroffenen von einer erheblichen Ivalidisierung, einer teilweise nebenwirkungsreichen Pharmakotherapie und einer ggf. notwendigen Endoprothetik verschonen. Auch aus volkswirtschaftlicher Sicht wäre dies ein großer Schritt.

Die Pathogenese stellt also aufgrund ihrer außerordentlichen Komplexität auf allen Ebenen eine große Herausforderung für die Zukunft dar. Neue Erkenntnisse sind mit großer Spannung zu erwarten.

5. Literaturverzeichnis

Aggarwal, B. B.; Kohr, W. J.; Hass, P. E.; Moffat, B.; Spencer, S. A.; Henzel, W. J.; Bringman, T. S.; Nedwin, G. E.; Goeddel, D. V. und Harkins, R. N. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. J Biol Chem. 1985 Feb 25; 260(4):2345-54.

Ahlback, S. Osteoarthrosis of the knee. A radiographic investigation. Acta Radiol Diagn (Stockh). 1968; Suppl 277:7-72.

Alaaeddine, N.; DiBattista, J. A.; Pelletier, J. P.; Cloutier, J. M.; Kiansa, K.; Dupuis, M. und Martel-Pelletier, J. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. J Rheumatol. 1997 Oct; 24(10):1985-94.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. und Watson, JD. Molekularbiologie der Zelle. 1997.

Amin, A. R. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 1999 Jul; 7(4):392-4.

Anitua E.; Sánchez M.; Nurden AT.; Zalduendo MM.; de la Fuente M.; Azofra J. und Andía I. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients.Rheumatology (Oxford). 2007 Dec;46(12):1769-72. Epub 2007 Oct 17.

Arend, W. P. Interleukin-1 receptor antagonist. Adv Immunol. 1993; 54:167-227.

Ashhurst, D. E.; Bland, Y. S. und Levick, J. R. An immunohistochemical study of the collagens of rabbit synovial interstitium. J Rheumatol. 1991 Nov; 18(11):1669-72.

Barland, P.; Novikoff, A. B. und Hamerman, D. Electron microscopy of the human synovial membrane. J Cell Biol. 1962 Aug; 14:207-20.

Barret, AJ.; Rawlings, ND. und Woessner JF. Jr. Handbook of Proteolytic Enzymes. 1998.

Bau, B.; McKenna, L. A.; Soeder, S.; Fan, Z.; Pecht, A. und Aigner, T. Hepatocyte growth factor/scatter factor is not a potent regulator of anabolic and catabolic gene expression in adult human articular chondrocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Apr 16; 316(4):984-90.

Bendrups, A.; Hilton, A.; Meager, A. und Hamilton, J. A. Reduction of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta levels in human synovial tissue by interleukin-4 and glucocorticoid. Rheumatol Int. 1993; 12(6):217-20.

Benninghoff A. Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen, Bd.1. 1993.

Berg, van den, WB.; Kraan, van den, PM und Lent, van, PLEM. Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis. 1993.

Bertolini, D. R.; Nedwin, G. E.; Bringman, T. S.; Smith, D. D. und Mundy, G. R. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. Nature. 1986 Feb 6-1986 Feb 12; 319(6053):516-8.

Billinghurst, R. C.; Dahlberg, L.; Ionescu, M.; Reiner, A.; Bourne, R.; Rorabeck, C.; Mitchell, P.; Hambor, J.; Diekmann, O.; Tschesche, H.; Chen, J.; Van Wart, H. und Poole, A. R. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. J Clin Invest. 1997 Apr 1; 99(7):1534-45.

Birkedal-Hansen, H.; Cobb, C. M.; Taylor, R. E. und Fullmer, H. M. Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts. J Biol Chem. 1976 May 25; 251(10):3162-8.

Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F.; Castner, B. J.; Stocking, K. L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; Nelson, N.; Boiani, N.; Schooley, K. A.; Gerhart, M.; Davis, R.; Fitzner, J. N.; Johnson, R. S.; Paxton, R. J.; March, C. J. und Cerretti, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature. 1997 Feb 20; 385(6618):729-33.

Buckwalter, JA.; Hunziker, E.; Rosenberg, LC.; Coutts, R.; Adams, M. und Eyre, D. Articular cartilage: Composition and Structure. In: Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues. 1987.

Burgeson, R. E. und Nimni, M. E. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. Clin Orthop Relat Res. 1992 Sep; (282):250-72.

Carmichael, D. F.; Sommer, A.; Thompson, R. C.; Anderson, D. C.; Smith, C. G.; Welgus, H. G. und Stricklin, G. P. Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Apr; 83(8):2407-11.

Chan, P. S.; Caron, J. P.; Rosa, G. J. und Orth, M. W. Glucosamine and chondroitin sulfate regulate gene expression and synthesis of nitric oxide and prostaglandin E(2) in articular cartilage explants. Osteoarthritis Cartilage. 2005 May; 13(5):387-94.

Chen, J. M. und Chen, W. T. Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cells. Cell. 1987 Jan 30; 48(2):193-203.

Chin, J. R.; Murphy, G. und Werb, Z. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. J Biol Chem. 1985 Oct 5; 260(22):12367-76.

Cicuttini, F. M. und Spector, T. D. Osteoarthritis in the aged. Epidemiological issues and optimal management. Drugs Aging. 1995 May; 6(5):409-20.

Clauß G. Statistik. 1999.

Colantuoni, G.; Quintero, M.; Panasyuk, A.; Abderrahim, L. und Mitrovic, D. R. Do arachidonic acid and its metabolites, secreted by rheumatoid and osteoarthritic synovial tissue, account for the strong inhibition of DNA synthesis in cultured human articular chondrocytes? A novel approach to the mechanism of tissue damage. Joint Bone Spine. 2005 Dec; 72(6):533-9.

Cooper, C.; Snow, S.; McAlindon, T. E.; Kellingray, S.; Stuart, B.; Coggon, D. und Dieppe, P. A. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2000 May; 43(5):995-1000.

Curry, V. A.; Clark, I. M.; Bigg, H. und Cawston, T. E. Large inhibitor of metalloproteinases (LIMP) contains tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 bound to 72,000-M(r) progelatinase. Biochem J. 1992 Jul 1; 285 (Pt 1):143-7.

D'Ambrosia, R. D. Epidemiology of osteoarthritis. Orthopedics. 2005 Feb; 28(2 Suppl):s201-5.

Dankbar B.; Neugebauer K.; Wunrau C.; Tibesku CO.; Skwara A.; Pap T und Fuchs-Winkelmann S. Hepatocyte growth factor induction of macrophage chemoattractant protein-1 and osteophyte-inducing factors in osteoarthritis. J Orthop Res. 2007 May;25(5):569-77.

David DV. Synovial Membrane and Synovial Fluid of Joints. 1946.

Dayer, J. M. und Burger, D. Interleukin-1, tumor necrosis factor and their specific inhibitors. Eur Cytokine Netw. 1994 Nov-1994 Dec 31; 5(6):563-71.

Dean, D. D.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J. P.; Howell, D. S. und Woessner, J. F. Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. J Clin Invest. 1989 Aug; 84(2):678-85.

Dechanet, J.; Taupin, J. L.; Chomarat, P.; Rissoan, M. C.; Moreau, J. F.; Banchereau, J. und Miossec, P. Interleukin-4 but not interleukin-10 inhibits the production of leukemia inhibitory factor by rheumatoid synovium and synoviocytes. Eur J Immunol. 1994 Dec; 24(12):3222-8.

Dehm P, Prockop DJ. Synthesis and Extrusion of Collagen by Freshly Isolated Cells from Chick Embryo Tendon. 1971.

Dell'Accio F.; De Bari C. und Luyten FP: Molecular markers predictive of the capacity of expanded human articular chondrocytes to form stable cartilage in vivo. Arthritis Rheum 2001 Jul;44(7):1608-19

Dinarello, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996 Mar 15; 87(6):2095-147.

Dingle, J. T.; Horner, A. und Shield, M. The sensitivity of synthesis of human cartilage matrix to inhibition by IL-1 suggests a mechanism for the development of osteoarthritis. Cell Biochem Funct. 1991 Apr; 9(2):99-102.

Dingle, J. T.; Page Thomas, D. P. und Hazleman, B. The role of cytokines in arthritic diseases: in vitro and in vivo measurements of cartilage degradation. Int J Tissue React. 1987; 9(4):349-54.

Edwards, J. C. und Willoughby, D. A. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. Ann Rheum Dis. 1982 Apr; 41(2):177-82.

Egeblad M und Werb Z. New roles for the matrix metalloproteinases in the progression of cancer. 2002; 2, 163-176.

Ehrlich, M. G.; Armstrong, A. L.; Treadwell, B. V. und Mankin, H. J. Degradative enzyme systems in cartilage. Clin Orthop Relat Res. 1986 Dec; (213):62-8.

Elders, M. J. The increasing impact of arthritis on public health. J Rheumatol Suppl. 2000 Oct; 60:6-8.

Ellis AJ et al. The prevention of collagen breakdown in bovine nasal cartilage by TIMP, TIMP-2 and a low molecular weight synthetic inhibitor. 1994 May; 201, (1): 94-101.

Erb, A.; Brenner, H.; Gunther, K. P. und Sturmer, T. Hormone replacement therapy and patterns of osteoarthritis: baseline data from the Ulm Osteoarthritis Study. Ann Rheum Dis. 2000 Feb; 59(2):105-9.

Evans, C. H.; Ghivizzani, S. C.; Herndon, J. H. und Robbins, P. D. Gene therapy for the treatment of musculoskeletal diseases. J Am Acad Orthop Surg. 2005 Jul-2005 Aug 31; 13(4):230-42.

Fava, R.; Olsen, N.; Keski-Oja, J.; Moses, H. und Pincus, T. Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. J Exp Med. 1989 Jan 1; 169(1):291-6.

Felson, D. T. und Chaisson, C. E. Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. Baillieres Clin Rheumatol. 1997 Nov; 11(4):671-81.

Felson, D. T.; Lawrence, R. C.; Dieppe, P. A.; Hirsch, R.; Helmick, C. G.; Jordan, J. M.; Kington, R. S.; Lane, N. E.; Nevitt, M. C.; Zhang, Y.; Sowers, M.; McAlindon, T.; Spector, T. D.; Poole, A. R.; Yanovski, S. Z.; Ateshian, G.; Sharma, L.; Buckwalter, J. A.; Brandt, K. D. und Fries, J. F. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. Ann Intern Med. 2000 Oct 17; 133(8):635-46.

Felson, D. T.; Naimark, A.; Anderson, J.; Kazis, L.; Castelli, W. und Meenan, R. F. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum. 1987 Aug; 30(8):914-8.

Felson, D. T.; Nevitt, M. C.; Zhang, Y.; Aliabadi, P.; Baumer, B.; Gale, D.; Li, W.; Yu, W. und Xu, L. High prevalence of lateral knee osteoarthritis in Beijing Chinese compared with Framingham Caucasian subjects. Arthritis Rheum. 2002 May; 46(5):1217-22.

Felson, D. T.; Zhang, Y.; Hannan, M. T.; Naimark, A.; Weissman, B. N.; Aliabadi, P. und Levy, D. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum. 1995 Oct; 38(10):1500-5.

Fernandes, J. C.; Martel-Pelletier, J.; Lascau-Coman, V.; Moldovan, F.; Jovanovic, D.; Raynauld, J. P. und Pelletier, J. P. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. J Rheumatol. 1998 Aug; 25(8):1585-94.

Feuerherm, A. J.; Borset, M.; Seidel, C.; Sundan, A.; Leistad, L.; Ostensen, M. und Faxvaag, A. Elevated levels of osteoprotegerin (OPG) and hepatocyte growth factor (HGF) in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2001; 30(4):229-34.

Fuchs, S.; Dankbar, B.; Wildenau, G.; Goetz, W.; Lohmann, C. H. und Tibesku, C. O. Expression of the CD44 variant isoform 5 in the human osteoarthritic knee joint: correlation with radiological, histomorphological, and biochemical parameters. J Orthop Res. 2004 Jul; 22(4):774-80.

Fuchs, S.; Rolauffs, B.; Arndt, S.; Tibesku, C. O. und Prehm, P. CD44H and the isoforms CD44v5 and CD44v6 in the synovial fluid of the osteoarthritic human knee joint. Osteoarthritis Cartilage. 2003 Dec; 11(12):839-44.

Fuchs, S.; Skwara, A.; Bloch, M. und Dankbar, B. Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. Osteoarthritis Cartilage. 2004 May; 12(5):409-18.

Gaissmaier C.; Aicher W.K.; Ziegler B.; Wiech O.M.; Sell S.; Weise K.: Analysis of cytokine and matrix protease expression in stress-activated differentiating osteoblasts. ORS, Orlando 2000, USA

Ganu, V. S.; Hu, S. I.; Melton, R.; Winter, C.; Goldberg, V. M.; Haqqi, T. M. und Malemud, C. J. Biochemical and molecular characterization of stromelysin synthesized by human osteoarthritic chondrocytes stimulated with recombinant human interleukin-1. Clin Exp Rheumatol. 1994 Sep-1994 Oct 31; 12(5):489-96.

Gherardi, E. und Stoker, M. Hepatocyte growth factor--scatter factor: mitogen, motogen, and met. Cancer Cells. 1991 Jun; 3(6):227-32.

Goldring, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2000a Sep; 43(9):1916-26.

Goldring, M. B. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. Curr Rheumatol Rep. 2000b Dec; 2(6):459-65.

Gramatzki M. Zytokine im hämatolymphatischen System. In: Thomas L (Hrsg.). 1992: 933-937.

Greiling H. Proteoglycane. In: Biologie des Alterns, Platt D Hrsg. 1995a: 123-33.

Greiling H und Gressner AM. Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 1995b.

Gross, J. und Lapiere, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 1962 Jun 15; 48:1014-22.

Guerne, P. A.; Zuraw, B. L.; Vaughan, J. H.; Carson, D. A. und Lotz, M. Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis. J Clin Invest. 1989 Feb; 83(2):585-92.

Gunja-Smith, Z.; Nagase, H. und Woessner, J. F. Jr. Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase-3. Biochem J. 1989 Feb 15; 258(1):115-9.

Hart, D. J.; Doyle, D. V. und Spector, T. D. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. Arthritis Rheum. 1999 Jan; 42(1):17-24.

Hart, P. H.; Ahern, M. J.; Smith, M. D. und Finlay-Jones, J. J. Comparison of the suppressive effects of interleukin-10 and interleukin-4 on synovial fluid macrophages and blood monocytes from patients with inflammatory arthritis. Immunology. 1995 Apr; 84(4):536-42.

Hauser, P. und Vaes, G. Degradation of cartilage proteoglycans by a neutral proteinase secreted by rabbit bone-marrow macrophages in culture. Biochem J. 1978 May 15; 172(2):275-84.

Henderson, B. und Pettipher, E. R. The synovial lining cell: biology and pathobiology. Semin Arthritis Rheum. 1985 Aug; 15(1):1-32.

Henderson B und Edwards JCW. The Synovial Lining in Health and Diseases. 1987.

Heussen, C. und Dowdle, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Anal Biochem. 1980 Feb; 102(1):196-202.

Hoaglund, F. T. und Steinbach, L. S. Primary osteoarthritis of the hip: etiology and epidemiology. J Am Acad Orthop Surg. 2001 Sep-2001 Oct 31; 9(5):320-7.

Hochberg, M. C. Epidemiology of osteoarthritis: current concepts and new insights. J Rheumatol Suppl. 1991 Feb; 27:4-6.

Hough A. J. "Pathology of Osteoarthritis" Chpater 109, in Arthritis and Allied Consitions, 14th E. 2001.

Howell, D. S. Pathogenesis of osteoarthritis. Am J Med. 1986 Apr 28; 80(4B):24-8.

Hughes CE et al. Differential expression of aggrecanase and matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage. 1998 Nov; 273, (46): 30576-82.

Hui, W.; Rowan, A. D. und Cawston, T. Insulin-like growth factor 1 blocks collagen release and down regulates matrix metalloproteinase-1, -3, -8, and -13 mRNA expression in bovine nasal cartilage stimulated with oncostatin M in combination with interleukin 1alpha. Ann Rheum Dis. 2001 Mar; 60(3):254-61.

Ingvarsson, T. Prevalence and inheritance of hip osteoarthritis in Iceland. Acta Orthop Scand Suppl. 2000 Dec; 298:1-46.

Inoue, K.; Wicart, P.; Kawasaki, T.; Huang, J.; Ushiyama, T.; Hukuda, S. und Courpied, J. Prevalence of hip osteoarthritis and acetabular dysplasia in french and japanese adults. Rheumatology (Oxford). 2000 Jul; 39(7):745-8.

Janusz, M. J. und Hare, M. Cartilage degradation by cocultures of transformed macrophage and fibroblast cell lines. A model of metalloproteinase-mediated connective tissue degradation. J Immunol. 1993 Mar 1; 150(5):1922-31.

Jasin, H. E. und Dingle, J. T. Human mononuclear cell factors mediate cartilage matrix degradation through chondrocyte activation. J Clin Invest. 1981 Sep; 68(3):571-81.

Jovanovic, D.; Pelletier, J. P.; Alaaeddine, N.; Mineau, F.; Geng, C.; Ranger, P. und Martel-Pelletier, J. Effect of IL-13 on cytokines, cytokine receptors and inhibitors on human osteoarthritis synovium and synovial fibroblasts. Osteoarthritis Cartilage. 1998 Jan; 6(1):40-9.

Jovanovic, D. V.; Di Battista, J. A.; Martel-Pelletier, J.; Jolicoeur, F. C.; He, Y.; Zhang, M.; Mineau, F. und Pelletier, J. P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. J Immunol. 1998 Apr 1; 160(7):3513-21.

Junqueira LC und Carneiro J. Basic Histology.

Kellgren, J. H. und Lawrence, J. S. Radiological assessment of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1957 Dec; 16(4):485-93.

Keyszer, G.; Redlich, A.; Haupl, T.; Zacher, J.; Sparmann, M.; Engethum, U.; Gay, S. und Burmester, G. R. Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. Arthritis Rheum. 1998 Aug; 41(8):1378-87.

Keyszer, G. M.; Heer, A. H.; Kriegsmann, J.; Geiler, T.; Keysser, C.; Gay, R. E. und Gay, S. Detection of insulin-like growth factor I and II in synovial tissue specimens of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis by in situ hybridization. J Rheumatol. 1995 Feb; 22(2):275-81.

Kiel, D. P.; Felson, D. T.; Anderson, J. J.; Wilson, P. W. und Moskowitz, M. A. Hip fracture and the use of estrogens in postmenopausal women. The Framingham Study. N Engl J Med. 1987 Nov 5; 317(19):1169-74.

Koch, A. E.; Halloran, M. M.; Hosaka, S.; Shah, M. R.; Haskell, C. J.; Baker, S. K.; Panos, R. J.; Haines, G. K.; Bennett, G. L.; Pope, R. M. und Ferrara, N. Hepatocyte growth factor. A cytokine mediating endothelial migration in inflammatory arthritis. Arthritis Rheum. 1996 Sep; 39(9):1566-75.

Kronheim, S. R.; Mumma, A.; Greenstreet, T.; Glackin, P. J.; Van Ness, K.; March, C. J. und Black, R. A. Purification of interleukin-1 beta converting enzyme, the protease that cleaves the interleukin-1 beta precursor. Arch Biochem Biophys. 1992 Aug 1; 296(2):698-703.

Kuettner K. E.; Memoli V.; Pauli B.; Wrobel N.; Thonar E.; Daniel J.: Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. II. Maintenance of collagen and proteoglycan phenotype. J Cell Biol 93: 751-757, 1982

Kuettner, K. E. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. Clin Biochem. 1992 Jun; 25(3):155-63.

Lawrence, R. C.; Helmick, C. G.; Arnett, F. C.; Deyo, R. A.; Felson, D. T.; Giannini, E. H.; Heyse, S. P.; Hirsch, R.; Hochberg, M. C.; Hunder, G. G.; Liang, M. H.; Pillemer, S. R.; Steen, V. D. und Wolfe, F. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. Arthritis Rheum. 1998 May; 41(5):778-99.

Le, J. und Vilcek, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. Lab Invest. 1987 Mar; 56(3):234-48.

Lefevre V.; Peeters-Joris C.; Vaes G.: Production of collagens, collagenase and collagenase inhibitor during the differentiation of articular chondrocytes by serial subculture. Biochem Biophys Acta 1051: 266-275, 1990

Ling, S. M. und Bathon, J. M. Osteoarthritis in older adults. J Am Geriatr Soc. 1998 Feb; 46(2):216-25.

Loetscher, H.; Pan, Y. C.; Lahm, H. W.; Gentz, R.; Brockhaus, M.; Tabuchi, H. und Lesslauer, W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. Cell. 1990 Apr 20; 61(2):351-9.

Lohi, J.; Wilson, C. L.; Roby, J. D. und Parks, W. C. Epilysin, a novel human matrix metalloproteinase (MMP-28) expressed in testis and keratinocytes and in response to injury. J Biol Chem. 2001 Mar 30; 276(13):10134-44.

Lotz, M.; Moats, T. und Villiger, P. M. Leukemia inhibitory factor is expressed in cartilage and synovium and can contribute to the pathogenesis of arthritis. J Clin Invest. 1992 Sep; 90(3):888-96.

Lotz, M.; Terkeltaub, R. und Villiger, P. M. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. J Immunol. 1992 Jan 15; 148(2):466-73.

Loughlin, J. Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol. 2001 Mar; 13(2):111-6.

Loughlin, J. Familial inheritance of osteoarthritis: documented family subsets. Clin Orthop Relat Res. 2004 Oct; (427 Suppl):S22-5.

Maier, R.; Ganu, V. und Lotz, M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. J Biol Chem. 1993 Oct 15; 268(29):21527-32.

Mankin HJ.; Dorfman H.; Lippiello L. und Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. J Bone Joint Surg Am. 1971 Apr;53(3):523-37.

Mandelbaum, B. und Waddell, D. Etiology and pathophysiology of osteoarthritis. Orthopedics. 2005 Feb; 28(2 Suppl):s207-14.

Manicourt DH, Poilvache P, Van Egeren A, Devogelaer JP, Lenz ME und Thonar EJ. Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2000 Feb;43(2):281-8.

Maroudas, A.; Katz, EP.; Wachtel, EJ. et al. Physicochemical properties and functional behavior of normal and osteoarthritic human cartilage. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC eds. 1986: 311-330.

Marlovits S, Hombauer M, Tamandl D, Vecsei V, Schlegel W: Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes in monolayer culture. Int J Mol Med 2004; 13:281-287.

Martel-Pelletier, J.; Cloutier, J. M. und Pelletier, J. P. Neutral proteases in human osteoarthritic synovium. Arthritis Rheum. 1986 Sep; 29(9):1112-21.

Martel-Pelletier, J.; Faure, M. P.; McCollum, R.; Mineau, F.; Cloutier, J. M. und Pelletier, J. P. Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage. J Rheumatol. 1991 Dec; 18(12):1863-71.

Martel-Pelletier, J.; McCollum, R.; DiBattista, J.; Faure, M. P.; Chin, J. A.; Fournier, S.; Sarfati, M. und Pelletier, J. P. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. Arthritis Rheum. 1992 May; 35(5):530-40.

Martel-Pelletier, J.; McCollum, R.; Fujimoto, N.; Obata, K.; Cloutier, JM. und Pelletier, JP. Excess of metalloproetases over tissue inhibitor of metalloproteases may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rhematoid arthritis. 1994; 70, 807-815.

Martel-Pelletier, J.; Welsch, DJ. und Pelletier, JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic disease. 2001; 15, (5): 805-29.

McCachren, S. S.; Greer, P. K. und Niedel, J. E. Regulation of human synovial fibroblast collagenase messenger RNA by interleukin-1. Arthritis Rheum. 1989 Dec; 32(12):1539-45.

Mehraban, F.; Lark, M. W.; Ahmed, F. N.; Xu, F. und Moskowitz, R. W. Increased secretion and activity of matrix metalloproteinase-3 in synovial tissues and chondrocytes from experimental osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 1998 Jul; 6(4):286-94.

Menkes, C. J. Radiographic criteria for classification of osteoarthritis. J Rheumatol Suppl. 1991 Feb; 27:13-5.

Miller, E. J. Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. Biochemistry. 1972 Dec 19; 11(26):4903-9.

Morales, T. I. und Kuettner, K. E. The properties of the neutral proteinase released by primary chondrocyte cultures and its action on proteoglycan aggregate. Biochim Biophys Acta. 1982 Jul 12; 705(1):92-101.

Moreland, L. W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. Arthritis Res Ther. 2003; 5(2):54-67.

Mucha, A.; Cuniasse, P.; Kannan, R.; Beau, F.; Yiotakis, A.; Basset, P. und Dive, V. Membrane type-1 matrix metalloprotease and stromelysin-3 cleave more efficiently synthetic substrates containing unusual amino acids in their P1' positions. J Biol Chem. 1998 Jan 30; 273(5):2763-8.

Murphy, G.; Hembry, R. M. und Reynolds, J. J. Characterization of a specific antiserum to rabbit stromelysin and demonstration of the synthesis of collagenase and stromelysin by stimulated rabbit articular chondrocytes. Coll Relat Res. 1986 Oct; 6(4):351-63.

Murphy, G.; McGuire, M. B.; Russell, R. G. und Reynolds, J. J. Characterization of collagenase, other metallo-proteinases and an inhibitor (TIMP) produced by human synovium and cartilage in culture. Clin Sci (Lond). 1981 Dec; 61(6):711-6.

Nagase, H.; Barrett, A. J. und Woessner, J. F. Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. Matrix Suppl. 1992; 1:421-4.

Nagase, H.; Brinckerhoff, C. E.; Vater, C. A. und Harris, E. D. Jr. Biosynthesis and secretion of procollagenase by rabbit synovial fibroblasts. Inhibition of procollagenase secretion by monensin and evidence for glycosylation of procollagenase. Biochem J. 1983 Aug 15; 214(2):281-8.

Nagase, H. und Woessner, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1999 Jul 30; 274(31):21491-4.

Nagase H und Woessner JF Jr. Role of endogenous proteinase in the degradation of cartilage. In: Woessner JF, Howell DS eds. 1993: 159-186.

Nagashima M.; Hasegawa J.; Kato K.; Yamazaki J.; Nishigai K.; Ishiwata T.; Asano G. und Yoshino S. Hepatocyte growth factor (HGF), HGF activator, and c-Met in synovial tissues in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. J Rheumatol. 2001 Aug;28(8):1772-8.

Naldini, L.; Weidner, K. M.; Vigna, E.; Gaudino, G.; Bardelli, A.; Ponzetto, C.; Narsimhan, R. P.; Hartmann, G.; Zarnegar, R. und Michalopoulos, G. K. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. EMBO J. 1991 Oct; 10(10):2867-78.

Neidel, J. und Zeidler, U. Independent effects of interleukin 1 on proteoglycan synthesis and proteoglycan breakdown of bovine articular cartilage in vitro. Agents Actions. 1993 May; 39(1-2):82-90.

Nietfeld, J. J.; Wilbrink, B.; Helle, M.; van Roy, J. L.; den Otter, W.; Swaak, A. J. und Huber-Bruning, O. Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. Arthritis Rheum. 1990 Nov; 33(11):1695-701.

Oishi, C. S.; Hoaglund, F. T.; Gordon, L. und Ross, P. D. Total hip replacement rates are higher among Caucasians than Asians in Hawaii. Clin Orthop Relat Res. 1998 Aug; (353):166-74.

Okada, Y.; Nagase, H. und Harris, E. D. Jr. Matrix metalloproteinases 1, 2, and 3 from rheumatoid synovial cells are sufficient to destroy joints. J Rheumatol. 1987 May; 14 Spec No:41-2.

Okada, Y.; Shinmei, M.; Tanaka, O.; Naka, K.; Kimura, A.; Nakanishi, I.; Bayliss, M. T.; Iwata, K. und Nagase, H. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. Lab Invest. 1992 Jun; 66(6):680-90.

Pelletier, J. P.; DiBattista, J. A.; Roughley, P.; McCollum, R. und Martel-Pelletier, J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. Rheum Dis Clin North Am. 1993 Aug; 19(3):545-68.

Pelletier, J. P.; Martel-Pelletier, J.; Howell, D. S.; Ghandur-Mnaymneh, L.; Enis, J. E. und Woessner, J. F. Jr. Collagenase and collagenolytic activity in human osteoarthritic cartilage. Arthritis Rheum. 1983 Jan; 26(1):63-8.

Pelletier, J. P.; McCollum, R.; Cloutier, J. M. und 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 Feb; 43:109-14.

Petersson, I. Medication a complement to other forms of pain management in osteoarthritis. Lakartidningen. 2002 Nov 14; 99(46):4647-50.

Petit, B.; Masuda, K. D.; 'Souza, A. et. al. Comparative studies of the rate of formation, compartmentalization and crosslinking of the collagenous network formed by fetal and adult articular chondrocytes in vitro. 1995.

Pfander, D.; Cramer, T.; Weseloh, G.; Pullig, O.; Schuppan, D.; Bauer, M. und Swoboda, B. Hepatocyte growth factor in human osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 1999 Nov; 7(6):548-59.

Pitsillides, A. A.; Wilkinson, L. S.; Mehdizadeh, S.; Bayliss, M. T. und Edwards, J. C. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell. Int J Exp Pathol. 1993 Feb; 74(1):27-34.

Plows, D.; Probert, L.; Georgopoulos, S.; Alexopoulou, L. und Kollias, G. The role of tumor necrosis factor (TNF) in arthritis studies in transgenic mice. 1995.

Poole, AR. Changes in the Collagen and Proteoglycan od Articular Cartilage in Arthritis. In: Connective Tissue: Biological and Clinical Aspects. 1986.

Poole, C. A.; Flint, M. H. und Beaumont, B. W. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. J Orthop Res. 1987; 5(4):509-22.

Puente, X. S.; Sanchez, L. M.; Overall, C. M. und Lopez-Otin, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. Nat Rev Genet. 2003 Jul; 4(7):544-58.

Reboul, P.; Pelletier, J. P.; Tardif, G.; Benderdour, M.; Ranger, P.; Bottaro, D. P. und Martel-Pelletier, J. Hepatocyte growth factor induction of collagenase 3 production in human osteoarthritic cartilage: involvement of the stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase pathway and a sensitive p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor cascade. Arthritis Rheum. 2001 Jan; 44(1):73-84.

Rodemann H.P.; Binder A.; Burger A.; Guven N.; Loffler H.; Bamberg M.: The underlying cellular mechanics of fibrosis. Kidney Int Suppl, 49: 32-36, 1996

Rosenstreich, DL.; Yost, SL.; Tu, JM. und Brown, KM. Interleukins and interleukin inhibitors: a review. 1987.

Rothfuss, J.; Mau, W.; Zeidler, H. und Brenner, M. H. Socioeconomic evaluation of rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a literature review. Semin Arthritis Rheum. 1997 Apr; 26(5):771-9.

Sachs L. Angewandte Statistik. 1992.

Sadouk, M. B.; Pelletier, J. P.; Tardif, G.; Kiansa, K.; Cloutier, J. M. und Martel-Pelletier, J. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. Lab Invest. 1995 Sep; 73(3):347-55.

Sapolsky, AL.; Altman, RD.; Howell, DS. und Woessner, JF. Jr. Metalloproteases of human articular cartilage that digest cartilage proteoglycan at neutral and acid pH. 1976.

Saus, J.; Quinones, S.; Otani, Y.; Nagase, H.; Harris, E. D. Jr und Kurkinen, M. The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3. Identity with stromelysin. J Biol Chem. 1988 May 15; 263(14):6742-5.

Schall, T. J.; Lewis, M.; Koller, K. J.; Lee, A.; Rice, G. C.; Wong, G. H.; Gatanaga, T.; Granger, G. A.; Lentz, R. und Raab, H. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. Cell. 1990 Apr 20; 61(2):361-70.

Schenk, RK.; Eggli, PS. und Hunzicker, EB. Articular cartiliage morphology. In: Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC eds. 1986: 3-22.

Sheehan C. Antigen-anibody binding. In: Sheehan C, Principles and laboratory diagnosis in clinical immunology. 1990: 115.

Siders, W. M.; Klimovitz, J. C. und Mizel, S. B. Characterization of the structural requirements and cell type specificity of IL-1 alpha and IL-1 beta secretion. J Biol Chem. 1993 Oct 15; 268(29):22170-4.

Simkin, P. A. Physiology of normal and abnormal synovium. Semin Arthritis Rheum. 1991 Dec; 21(3):179-83.

Simkin, P. A. and Benedict, R. S. Hydrostatic and oncotic determinants of microvascular fluid balance in normal canine joints. Arthritis Rheum. 1990 Jan; 33(1):80-6.

Slack, J.; McMahan, C. J.; Waugh, S.; Schooley, K.; Spriggs, M. K.; Sims, J. E. und Dower, S. K. Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors. J Biol Chem. 1993 Feb 5; 268(4):2513-24.

Smith, M. D.; Triantafillou, S.; Parker, A.; Youssef, P. P. und Coleman, M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. J Rheumatol. 1997 Feb; 24(2):365-71.

Soren, A.; Cooper, N. S. und Waugh, T. R. The nature and designation of osteoarthritis determined by its histopathology. Clin Exp Rheumatol. 1988 Jan-1988 Mar 31; 6(1):41-6.

Stetler-Stevenson, W. G.; Brown, P. D.; Onisto, M.; Levy, A. T. und Liotta, L. A. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. J Biol Chem. 1990 Aug 15; 265(23):13933-8.

Stevens, C. R.; Mapp, P. I. und Revell, P. A. A monoclonal antibody (Mab 67) marks type B synoviocytes. Rheumatol Int. 1990; 10(3):103-6.

Stoker M.; Gherardi E.; Perryman M. und Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. Nature. 1987 May 21-27;327(6119):239-42.

Stocker, W.; Grams, F.; Baumann, U.; Reinemer, P.; Gomis-Ruth, F. X.; McKay, D. B. und Bode, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. Protein Sci. 1995 May; 4(5):823-40.

Stokes, D.G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera- Velazquez, S., Jimenez, S.A.: Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type highmobility-group box (SOX) transcription factors. Biochem J, 360(Pt 2):461-70, 2001.

Stryer L. Biochemie. 1993: 239.

Takebayashi, T.; Iwamoto, M.; Jikko, A.; Matsumura, T.; Enomoto-Iwamoto, M.; Myoukai, F.; Koyama, E.; Yamaai, T.; Matsumoto, K. und Nakamura, T. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes. J Cell Biol. 1995 Jun; 129(5):1411-9.

Theofilopoulos, A. N.; Carson, D. A.; Tavassoli, M.; Slovin, S. F.; Speers, W. C.; Jensen, F. B. und Vaughan, J. H. Evidence for the presence of receptors for C3 and IgG Fc on human synovial cells. Arthritis Rheum. 1980 Jan; 23(1):1-9.

Thumb, N. Function of cytokines in cartilage degradation. Wien Med Wochenschr. 1995; 145(5):99-100.

Tibesku, C. O.; Szuwart, T.; Ocken, S. A.; Skwara, A. und Fuchs, S. Increase in the expression of the transmembrane surface receptor CD44v6 on chondrocytes in animals with osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2005 Mar; 52(3):810-7.

Tibesku, C. O.; Szuwart, T.; Ocken, S. A.; Skwara, A. und Fuchs, S. Expression of the matrix receptor CD44v5 on chondrocytes changes with osteoarthritis: an experimental investigation in the rabbit. Ann Rheum Dis. 2006 Jan; 65(1):105-8.

Tschan, T.; Hoerler, I.; Houze, Y.; Winterhalter, K. H.; Richter, C. und Bruckner, P. Resting chondrocytes in culture survive without growth factors, but are sensitive to toxic oxygen metabolites. J Cell Biol. 1990 Jul; 111(1):257-60.

van de Loo, F. A.; Joosten, L. A.; van Lent, P. L.; Arntz, O. J. und van den Berg, W. B. 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 Feb; 38(2):164-72.

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. Annu Rev Immunol. 1992; 10:411-52.

Villiger, P. M.; Geng, Y. und Lotz, M. Induction of cytokine expression by leukemia inhibitory factor. J Clin Invest. 1993 Apr; 91(4):1575-81.

Vincenti, M. P.; Coon, C. I. und Brinckerhoff, C. E. Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 1998 Nov; 41(11):1987-94.

Vincenti, M. P.; Coon, C. I.; Mengshol, J. A.; Yocum, S.; Mitchell, P. und Brinckerhoff, C. E. Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1). Biochem J. 1998 Apr 1; 331 (Pt 1):341-6.

von der Mark K.; Gauss V.; von der Mark H.; Muller P.: Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature 267: 531-532, 1977

Vu, T. H. und Werb, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. Genes Dev. 2000 Sep 1; 14(17):2123-33.

Wakitani, S.; Imoto, K.; Kimura, T.; Ochi, T.; Matsumoto, K. und Nakamura, T. Hepatocyte growth factor facilitates cartilage repair. Full thickness articular cartilage defect studied in rabbit knees. Acta Orthop Scand. 1997 Oct; 68(5):474-80.

Westacott, C. I.; Atkins, R. M.; Dieppe, P. A. und Elson, C. J. Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage. J Rheumatol. 1994 Sep; 21(9):1710-5.

Wick, M.; Burger, C.; Brusselbach, S.; Lucibello, F. C. und Muller, R. A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. J Biol Chem. 1994 Jul 22; 269(29):18953-60.

Wilson, K. P.; Black, J. A.; Thomson, J. A.; Kim, E. E.; Griffith, J. P.; Navia, M. A.; Murcko, M. A.; Chambers, S. P.; Aldape, R. A. und Raybuck, S. A. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. Nature. 1994 Jul 28; 370(6487):270-5.

Woessner, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J. 1991 May; 5(8):2145-54.

Woessner, J. F. Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins. Connect Tissue Res. 1998; 39(1-3):69-73; discussion 141-9.

Woessner, J. F. Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. Ann N Y Acad Sci. 1999 Jun 30; 878:388-403.

Woessner, J. F. Jr und Gunja-Smith, Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. J Rheumatol Suppl. 1991 Feb; 27:99-101.

Wu, J. J.; Lark, M. W.; Chun, L. E. und Eyre, D. R. Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage. J Biol Chem. 1991 Mar 25; 266(9):5625-8.

Yamanishi, Y.; Boyle, D. L.; Clark, M.; Maki, R. A.; Tortorella, M. D.; Arner, E. C. und Firestein, G. S. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. J Immunol. 2002 Feb 1; 168(3):1405-12.

Zhang, Y.; Hunter, D. J.; Nevitt, M. C.; Xu, L.; Niu, J.; Lui, L. Y.; Yu, W.; Aliabadi, P. und Felson, D. T. Association of squatting with increased prevalence of radiographic tibiofemoral knee osteoarthritis: the Beijing Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum. 2004 Apr; 50(4):1187-92.

Zhang, Y.; McAlindon, T. E.; Hannan, M. T.; Chaisson, C. E.; Klein, R.; Wilson, P. W. und Felson, D. T. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. Arthritis Rheum. 1998 Oct; 41(10):1867-73.

Zhang, Y.; Xu, L.; Nevitt, M. C.; Aliabadi, P.; Yu, W.; Qin, M.; Lui, L. Y., und Felson, D. T. Comparison of the prevalence of knee osteoarthritis between the elderly Chinese population in Beijing and whites in the United States: The Beijing Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum. 2001 Sep; 44(9):2065-71.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 ordnet tabellarisch die ätiologischen Faktoren der Osteoarthrose (Frei nach Mandelbaum & Waddel 2005)

Abbildung 1.2 Bestandteile des human hyalinen Knorpels [frei nach (Mandelbaum und Waddell 2005)]

Abbildung 1.3 Histologische Darstellung artikulären hyalinen Knorpels [frei nach John D. Soule und W. H. Crawford].

Abbildung 1.4 stellt die biologischen Effekte der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-α an den Zielzellen dar. (↑= erhöhte, ↓=erniedrigte; zusammengestellt nach (Aggarwal et al. 1985), (Alaaeddine et al. 1997), (Amin 1999), (Bertolini et al. 1986), (Dinarello 1996), (Ganu et al. 1994), (Gramatzki M 1992), (Plows D 1995), (Siders et al. 1993), (van de Loo et al. 1995), (Westacott et al. 1994))

Abbildung 1.5 stellt die aktuell beschriebenen Matrix-Metalloproteinasen tabellarisch zusammen. Stand Februar 2006 (nach (Birkedal-Hansen et al. 1976), (Chin et al. 1985), (Nagase et al. 1992), (Nagase H 1993), (Okada et al. 1987), (Wu et al. 1991))

Abbildung 1.6 skizziert die Anordnung der strukturcharakteristischen MMP-Domänen (Egeblad M 2002).

Abbildung 1.7 führt beispielhaft physiologische und pathologische Erkrankungen auf, bei denen MMPs involviert sind (zusammengestellt nach (Barret AJ 1998), (Greiling H 1995), (Nagase und Woessner 1999), (Simkin 1991), (Stryer L 1993))

Abbildung 1.8 zeigt in tabellarischer Übersicht die Herkunft und Substratspezifität des MMP-1, MMP-3, MMP-13 (modifiziert nach (Birkedal-Hansen et al. 1976), (Chin et al. 1985), (Nagase et al. 1992), (Nagase und Woessner 1999), (Okada et al. 1987))

Abbildung 2.2 Spezifität und Sensitivität der ELISA-kits des Biotrak™ ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech

Abbildung 2.3 zeigt eine Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit MMP-1

Abbildung 2.4 zeigt die Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit MMP-3

Abbildung 2.5 zeigt die Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit TIMP-1

Abbildung 2.6 Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit TIMP-2

Abbildung 2.6 Übersicht zu dem Aufbau des ELISA-kit HGF

Abbildung 2.7: verwendete Primersequenzen und Annealingtemperaturen Sequenzen und Annealingtemperaturen der jeweiligen Primer angeben

Abbildung 3.1: HGF-Spiegel in Synovialflüssigkeit bei OA verschiedenen Schweregrades.

Abbildung 3.2: Korrelationsanalyse von HGF mit klinischen Parametern

Abbildung 3.3: Expression von HGF und c-Met in Synovialfibroblasten (PCR)

Abbildung 3.4: Expression von MMP-1, -3, -8 und -13 nach HGF-Stimulation in Synovialfibroblasten (PCR)

Abbildung 3.5: Effekt von HGF auf die Proteasenaktivität von Synovialfibroblasten

Abbildung 3.6: Effekt von HGF auf die Proteasenaktivität von Chondrozyten

Abbildung 3.7: Mediane Konzentration von MMP-1 und MMP-3 nach Stimulation mit HGF, TNFα und IL-1β

Abbildung 3.8: Mediane Konzentration von TIMP-1 und TIMP-2 nach Stimulation mit HGF

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abkürzung	Bedeutung
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMT	A Disintegrin And Metalloprotease mit Thrombospondin
AK	Antikörper
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation.
cDNA	codogenic Desoxiribonucleic acid
c-Met	Mesenchymal epithelial transition factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FCS	Fetales Kälberserum
f-FLS	freie Synovialfibroblasten
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte und Marcrophage - Colonial stimulating factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRP	Horse radish peroxidase
IF	Interferon
IGF	Insulin like Growth Factor
IL	Interleukin
ISH	in situ Hybridisation
JNK	Jun N-terminal Kinase
KD	Kilo Dalton
Kon	Kontrolle
LIF	Leukämieinhibitorfaktor
LIMP	large inhibitor of metalloproteinases
Mab	monoklonaler Antikörper
m-FLS	membranständigen Synovialfibroblasten
MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	Matrix -Metalloproteinase
MT-MMP	Membranständige MMP
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	Non steroidal anti inflammatory drugs
OA	Osteoarthrose

Abkürzung	**Bedeutung**
OPG	osteoprotegerin
PAK	Peroxidaseantikörper
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE	Prostaglandin-E
RA	rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
SAPK	Stress-Activated Protein Kinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SF	Scatter Factor
TACE	TNF-α –converting-enzyme
TEP	Totalendoprothese
TGF	transforming growth factor
TIMP	Tissue inhibitor of Metalloproteinases
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
UDPGD	Uridindiphosphoglukosedehydrogenase

8. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für allgemeine Orthopädie des Universitätsklinikums Münster bedanken. Mein besonderer Dank hierbei gilt Herrn Dr. rer. nat. Berno Dankbar, meinem Betreuer bei dieser Arbeit, der mich seit dem Jahre 2001 in jeglicher nur denkbarer Weise perfekt unterstützt hat. Nicht weniger dankbar bin ich Frau Vera Eckervogt, die für mich in labortechnischer Hinsicht unverzichtbar war und wärend der oft langen Experimente eine immerwährende Quelle der Unterhaltung und Motivation war.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Carsten Tibesku, der sich nach seinem Umzug von Münster nach Marburg und von dort nach Straubing bereit erklärte, die Betreuung dieser Doktorarbeit auch weiterhin zu übernehmen.

Dank gebührt auch meiner Freundin Frau Maria del Rocio Luque Veleiro, die, vor allem während der experimentellen Phase zu dieser Arbeit, häufig auf mich verzichten musste.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Frau Hermine Bögemann und Herrn Manfred Bögemann dafür, dass sie mich früh mit dem Wissenschaftsvirus infiziert haben, ohne sie wäre es wohl nie zu dieser Arbeit gekommen.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Bögemann, Martin
Anschrift:	Gescherweg 59
	48161 Münster
	Telefon: 0251-8725620
	E-Mail: martinboegemann@gmx.de
Geburtsdatum und -ort:	20.12.1976 in Werne a.d. Lippe
Eltern:	Hermin Bögemann geb. Schäper, Verwaltungsangestellte Manfred Bögemann, Ingenieur
Familienstand:	Ledig

Schulische Ausbildung

1983-1987	Grundschule „auf den Äckern“ in Selm-Bork
1987-1996	Gymnasium St. Christophorus in Werne,
	Abschluß: Abitur (2,1)

Grundwehrdienst/Zivildienst

07/1996 – 07/1997	Zivildienst in der Krankenpflege, St. Christophorus-Krankenhaus, Werne a.d. Lippe

Studium

10/1997-06/2004	Westfälische Wilhelms-Universität Münster Humanmedizin Staatsexamen 03.06.2004 (1,6)

Beruflicher Werdegang

07/2004 – 10/2004	Arzt im Praktikum Klinik und Poliklinik für Urologie Universitätsklinikum Münster
Seit 10/2004	Assistenzarzt Klinik und Poliklinik für Urologie Universitätsklinikum Münster

10. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Münster waren Frau Prof. Zehnhoff-Dinnesen und die Herren Professoren Arolt, Assmann, Berdel, Böcker, Breithardt, Brinkmann, Brug, Busse, Domschke, Fürniss, Harms, Heindel, Hertle, Heuft, Hildebrand, Horst, Hucklenbroich, Joos, Jürgens, Karch, Keil, Kiesel, Kohl, Köpcke, Luger, Muthny, Nieschlag, Oberleitner, Pavenstädt, Peters, Rahn, Raschke, Ringelstein, Scheld, Schmitz, Senninger, Sibrowski, Speckmann, Stoll, Tölle, van Aken, Vogt und Winkelmann.

Meine akademische Lehrerin in Marburg war Frau Prof. Fuchs-Winkelmann.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel **„Einfluss des „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) auf die Sekretion der Matrix -Metalloproteinasen (MMP) 1- und 3 sowie der Tissue inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) 1- und 2 bei Kniegelenkssynovialfibroblasten bei der Osteoarthrose“** in der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie mit der Unterstützung durch Herrn Priv. – Doz. Dr. med. Carsten O. Tibesku ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.
Die Vorliegende Arbeit wurde in keinem Publikationsorgan veröffentlicht.

Münster, der 10.09.2008 _____

Martin Bögemann