Universität Ulm

Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Orthopädie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Reichel

Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebeserkrankungen
Sektionsleiter: Prof. Dr. med. R. Brenner

Einfluss von Traumatisierung und IL-6/sIL-6R Stimulation auf Zellvitalität und Metabolismus im humanen Knorpelgewebe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Charlotte Maria Zielen
Ulm
2013

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Brenner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Mario Perl
Tag der Promotion:	05.06.2014

Inhaltsverzeichnis

Abbkürzungsverzeichnis……...

1 Einleitung 1

1.1 Arthrose, Aufbau des Kniegelenks und des Knorpelgewebes 1

1.2 Pathologische Prozesse bei PTA 3

1.3 Proinflammatrische Zytokine im athrotischen Milieu 4

1.4 Zielsetzung 10

2 Material und Methoden 12

2.1 Material 12

2.1.1 Knorpel 12

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel 12

2.1.3 Chemikalien, Kits und Primer 15

2.1.4 Lösungen, Puffer, Zellkulturmedien und Objektträger 22

2.1.5 Computerprogramme 24

2.2 Methoden 26

2.2.1 Herstellung der Knorpelstanzkulturen 26

2.2.2 Traumatisierung und Stimulation der Knorpelstanzen 26

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität und Apoptose 28

2.2.3.1 Lebend-Totzellfärbung 28
2.2.3.2 Vorbehandlungen für die histologischen Färbungen 29
2.2.3.3 TUNEL-Assay 30
2.2.3.4 Aktive Caspase-3-Assay 30

2.2.4 Genexpressonsanalysen 32

2.2.4.1 RNA-Isolierung 32
2.2.4.2 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA 33
2.2.4.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (sqPCR) 34
2.2.4.4 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) 35

2.2.5 Überstandsanalysen 38

2.2.5.1 Stickstoffmonoxid (NO) – Bestimmung. 38
2.2.5.2 Prostaglandin-E2 (PGE2) ELISA 39
2.2.5.3 Interleukin-1ß ELISA 40
2.2.5.4 TNFα ELISA 40
2.2.5.5 Cytometric Bead Array (CBA) 41

2.2.6 Statistik 42

3 Ergebnisse 43

3.1 Bestimmungen von Zellvitalität und Apoptose 43

3.1.1 Auswertung der Lebend-Totzellfärbung 43

3.1.2 Auswertung der Apoptose-Assays ... 46
3.1.2.1 TUNEL-Assay ... 46
3.1.2.2 Aktiver Caspase-3-Assay ... 48
3.2 Einfluss auf die Genexpression und Metaboliten-Freisetzung ... 49
3.2.1 Einfluss auf degradierende Prozesse der Zellmatrix ... 50
3.2.1.1 Genexpression von MMP1 ... 50
3.2.1.2 Genexpression von MMP13 ... 51
3.2.2 Einfluss auf den PGE2-Syntheseweg ... 52
3.2.2.1 Genexpression von COX2 ... 53
3.2.2.2 Genexpression von PTGES ... 55
3.2.2.3 Bestimmung von Prostaglandin-E2 (PGE2) im Überstand ... 56
3.2.2.5 Promotor Variante des COX2-Gen (-765 G → C) Polymorphismus ... 59
3.2.3 Einfluss auf den NO-Syntheseweg ... 60
3.2.3.1 Genexpression von iNOS ... 60
3.2.3.2 Bestimmung von NO im Überstand ... 62
3.2.4 Genexpression von Superperoxid-Dismutase-2 (SOD2) ... 64
3.2.5 Proinflammatorische Zytokine im Überstand ... 64
3.2.5.1 Freisetzung von IL-1ß ... 65
3.2.5.2 Freisetzung von IL-6 ... 66
3.2.5.3 Freisetzung von IL-8 ... 67
3.2.5.4 Freisetzung von TNFα ... 68
3.2.6 Weitere Faktoren im Überstand ... 68
4 Diskussion ... 70
4.1 Zellvitalität und Apoptoserate ... 70
4.2 Degradierende Prozesse der Zellmatrix ... 75
4.3 PGE2-Syntheseweg ... 77
4.4 NO-Syntheseweg ... 81
4.5 SOD2 ... 82
4.6 Proflammatorische Zytokine und weitere Faktoren im Überstand ... 84
4.7 Grenzen des Modells und Schlussfolgerung ... 86
5 Zusammenfassung ... 89
6 Literaturverzeichnis ... 91
Anhang ...
Danksagung ...
Lebenslauf ...

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
18S rRNA	18S ribosomale Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung
ABC-Methode	(Strept-) Avidin-Biotin-Complex Methode
Art.	Artikulatio, Gelenk
bp	Basenpaar
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CalceinAM	Calcein Acetoxymethyl
CCL5	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 5
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase-2
C_t	Crossing Point
dd	Delta-Delta
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Energie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EP	Prostaglandin-E-Rezeptor
ERK	Extrazellular Signal-regulierte Kinase
EtBr	Ethidiumbromid
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
FKS	Fötales Kälberserum
G	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glykoprotein130

h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HrP	Meerettichperoxidase/ Horseradish Peroxidase/
ICE	IL-1ß konvertierendes Enzym
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
J	Joule
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
l	Liter
L-NIL	N-iminoethyl-L-Lysin
M	Masse (Einheit: Kilogramm)
m	Meter
mA	Milliamper (10^{-3}Amper)
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
MFI	Fluoreszenzintensität, „mean fluorescent intensity“
mIL-6R	Membrangebundener Interleukin-6 Rezeptor
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
MMP1	Matrixmetalloprotease-1
MMP13	Matrixmetalloprotease-13
Mrd.	Milliarde
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NEAS	Nichtessentielle Aminosäuren
NED	N-1-napthylethylenediamindihydrochlorid
NF-ϰB	Nuklear Faktor kappa B
ng	Nanogramm (10^{-9} gramm)
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO_2^-	Nitrit
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
$ONOO^-$	Peroxynitrite
p	Statistische Signifikanz
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

PGE2	Prostaglandin E2
PGH2	Prostaglandin H2
PTA	Posttraumatische Arthrose
PTGES	Prostaglandin-E-Synthase
PTGS2	Prostaglandin-Synthase-2
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RANTES	“regulated and normal T cell expressed and secreted”
rpm	Umdrehung pro Minute
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
SB203580	p38MAPK-Inhibitior SB203580
sec	Sekunde
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6 Rezeptor
SOD2	Superoxiddismutase-2
sqPCR	Semiquantitive Polymerase-Kettenreaktion
STAT	Signal Transducers & Activators of Transcription
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TUNEL	TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase)-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	Volt
µl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
µM	Mikromolar (10^{-6} mol/Liter)

1 Einleitung

1.1 Arthrose, Aufbau des Kniegelenks und des Knorpelgewebes

Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit [127]. In Deutschland leiden 15 Millionen Menschen zeitweise oder chronisch unter Arthrose bedingten Schmerzen. Frauen sind 1,5-fach häufiger betroffen als Männer. Die betroffenen Gelenke sind überwärmt und geschwollen und lösen durch Schmerzen und Bewegungseinschränkung bei den Patienten einen starken Leidensdruck aus. Die Schmerzentstehung in der Arthrose und die Ursachen des entzündlichen Reizzustandes sind im Wesentlichen noch unverstanden, da der Knorpel selbst aneural ist und rein chondrale Defekte keine Schmerzen erzeugen. Erst die im Krankheitsverlauf zunehmende Einbeziehung von sekundären Gelenkstrukturen wie Synovialmembran, Meniski, Band- und Sehnenansätze und der Umbau des subchondralen Knochens bewirken das Auftreten von relevanten Symptomen. Im radiologischen Bild zeigen sich Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerosierung, Zysten- und Osteophytenbildung als typische Zeichen des arthrotischen Gelenks. Das Fortschreiten der Erkrankung wird durch Gelenkinstabilität, -Fehlstellung, Adipositas, Muskelschwäche, Traumen und dem voranschreitenden Alter begünstigt [18,39,126]. Nach neuen Erkenntnissen stellt auch der Diabetes Mellitus einen Risikofaktor dar [16]. Die Arthrose ist eine degenerative Erkrankung des Gelenkknorpels und der umliegenden Gelenkgewebe und derzeit nicht kurativ heilbar. Durch eine symptomatische Schmerztherapie wird der Leidensdruck gemindert, aber erst der chirurgische Eingriff mit Gelenkersatz ermöglicht einen kurativen Ansatz [58]. Die Kosten für das Gesundheitssystem lagen im Jahr 2004 für die Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems bei 24,46 Mrd. Euro und nahmen mit 10,9 % den drittgrößten Kostenfaktor für Behandlungen von Erkrankungen in Deutschland ein. Davon wurden 6,77 Mrd. Euro (= 27,7 %) für die Behandlung von Arthrose aufgewandt. Am Kniegelenk- als dem größten Gelenk am menschlichen Körper- zeigen 10 % aller Menschen älter als 55 Jahre Symptome, wovon ein Viertel erheblich in seiner Mobilität eingeschränkt ist. Ungefähr 12 % der Arthrosen werden durch Traumata (Verkehrs- oder Sportunfälle) ausgelöst. Dabei stehen Gelenksfrakturen, Knorpelzerstörung und die Verletzungen von Bändern und Menisken im

Vordergrund [18]. Diese Form der Arthrose wird als posttraumatische Arthrose (PTA) bezeichnet und betrifft vor allem jüngere Patienten. 76 % der PTA-Patienten sind jünger als 45 Jahre alt [18,35,80].

Das Kniegelenk ist ein Drehscharniergelenk, bei dem die Kondylen von Femur und Tibia, sowie die Patella artikulieren. Das Gelenk setzt sich dabei aus zwei Untergelenken zusammen, Artikulatio (Art.) Femurotibialis und Art. Femuropatellaris, die von einer gemeinsamen Kapsel umschlossen sind [13,34]. Die Gelenkflächen sind von hyalinem Knorpel überzogen. Dieser setzt sich aus der wasserhaltigen Knorpelmatrix (bis zu 90 %) und der alleinigen Zellkomponente, den hoch-differenzierten Chondrozyten, zusammen [40]. Die Zellen liegen in Knorpellakunen und sezernieren die Knorpelmatrix, sowie Matrix-metalloproteinasen (MMPs) und Zytokine. Teilungsfähige Chondroblasten befinden sich nur in der Proliferationszone nahe der Knochenepiphyse. Die Knorpelmatrix besteht zu 80 % aus Wasser und zu 20 % aus Kollagenen (im Wesentlichen Typ II, IX, X, XI und VI), Proteoglykanen, wie Aggrekan und Glykoproteinen [13]. Aggrekan, gebunden an Hyaluronsäure, ist durch die enthaltenen Chondroitin- und Keratansulfatgruppen stark negativ geladen und kann das 50-Fache seines Volumens an Wasser binden. Dies verleiht dem Knorpelgewebe seine gallertartige Konsistenz und damit seine biomechanischen Eigenschaften wie Druckelastizität, Viskosität und Verformbarkeit [13,95]. Der Gelenkknorpel besteht aus vier Zonen. (1) Die oberflächliche tangentiale Zone, bestehend aus dünnen Kollagenfibrillen und kleinen spindelförmigen Chondrozyten in tangentialer Anordnung mit einem hohen Anteil von Kollagen und niedrigen Anteil von Aggrekan. Der Wassergehalt ist in dieser Schicht am größten. (2) Die Mittlere Zone setzt sich aus radialen Bündeln dicker Kollagenfibrillen zusammen mit der höchsten Konzentration an Proteoglykanen und niedrigsten Konzentration an Wasser. Die Zellen sind oval/ rundlich und in Säulen angeordnet. (3) In der tiefen Zone verlaufenden Kollagenfasern senkrecht bis zum Tidemark, die Zellen sind wie in der mittleren Zone oder in Clustern angeordnet. (4) Die verkalkte Zone bildet die Grenze zwischen dem unverkalkten Gelenkknorpel und dem subchondralen Knochen. Von der oberflächlichen (1) zur tiefen Zone (4) nimmt die Zelldichte von 10 % zu 1 % ab, während Zellvolumen und der Anteil der Proteoglykane relativ zur Kollagenmasse zunehmen [40,75]. Der Gelenkknorpel ist

ein avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe, das ausschließlich per Diffusion von Synovia und subchondralem Knochen ernährt wird und nur eine geringe Kapazität zur Selbstheilung nach einer Fraktur oder Verletzung aufweist. Der Knorpel ist somit ein bradytrophes Gewebe.

1.2 Pathologische Prozesse bei PTA

Im gesunden Knorpel liegt ein Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen vor. Kommt es zu einem Trauma oder anderen induktiven Stimuli (oxidativer Stress, Alterung), wird die Homöostase des Knorpels gestört [15,40] und es erfolgt eine Entzündungsreaktion [113,121]. Initial werden die Chondrozyten und Synoviozyten durch die mechanische Verletzung aktiviert und produzieren verstärkt proinflammatorische Zytokine und Knorpelproteinasen [20,113,121]. Durch die Zytokinsekretion kommt es zu einer sowohl autokrinen als auch parakrinen Aktivierung der Chondrozyten [20]. Knorpelproteinasen wie MMPs und Aggrekanasen degradieren Knorpelkollagene und Proteoglykane, so dass eine zunehmende Selbstzerstörung des Knorpels erfolgt und es zu einem irreversiblen Verlust der Zugeigenschaften und der strukturellen Integrität des Knorpelgewebes kommt [20,103,121,128]. Dadurch entstehende sekundäre Knorpelabbauprodukte wie Fibronektin können eine Synovitis induzieren [103]. Durch Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren werden mononukläre Entzündungszellen (Lymphozyten, Makrophagen) in den Gelenkspalt rekrutiert, die wiederum die Inflammation perpetuieren und Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNFα) sezernieren. Die proinflammatorischen Zytokine, IL-1, TNFα und Interleukin-6 (IL-6) schaffen ein entzündliches Umfeld, das wiederum die erhöhte Synthese von Proteinasen aus Chondrozyten und Synovialzellen begünstigt [20,103,128]. Der Überschuss von Proteinasen verstärkt den Knorpelabbau und führt, wenn die Entzündung nicht unterbrochen wird, zur Zerstörung des Gelenks [103].

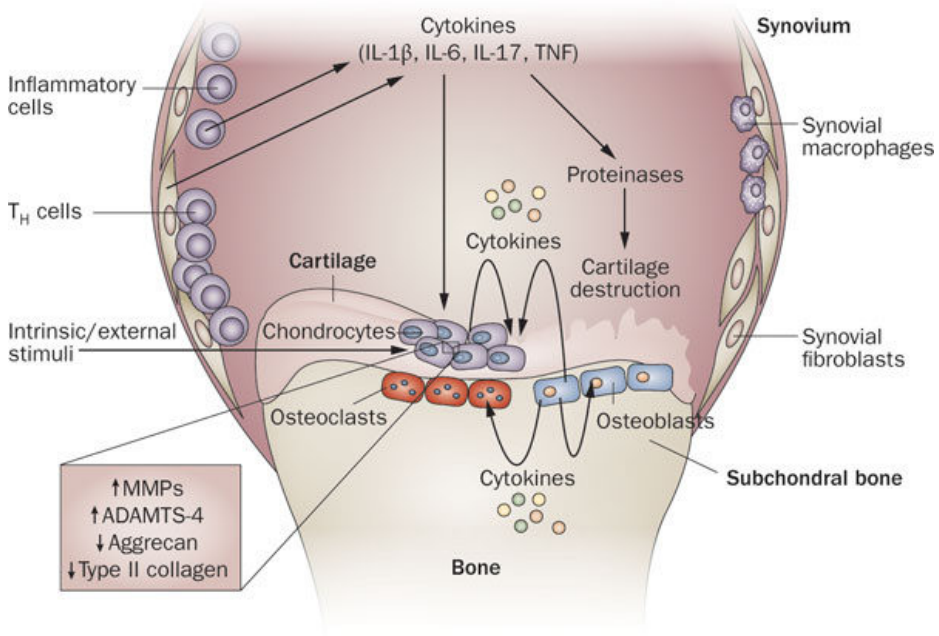


Abb. 1: Proinflammatorische Zytokine im arthrotischen Milieu. Die Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-1ß, TNF und IL-6, sind im arthrotischen Milieu erhöht. Diese Zytokine treiben die Pathogenese der Arthrose durch verschiedenste Mechanismen, wie Hemmung anabolischer Effekte und Förderung katabolischer und inflammatorischer Reaktionen voran, was zur Strukturzerstörung führt. ADAMTS, A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs; IL, Interleukin; MMP, Matrixmetalloproteinase; TNF, Tumor-Nekrose-Faktor [58].

Neuere Untersuchungen zeigen, dass gleichzeitig zur beschriebenen Inflammation auch ein Rückgang der Entzündungsreaktion erfolgt. Der Entzündungsrückgang wird als aktiver Prozess beschrieben, der essentiell für eine angemessene Immunantwort, für den Schutz des umliegenden Gewebes und die Rückkehr zur Homöostase ist. Neben den bekannten inhibitorischen Zytokinen wie TGFß und IL-10 spielen auch potente aktive biochemische Lipidmediatoren, wie Lipoxin A und Resolvin D1, eine entscheidende Rolle bei diesem endogenen lokalen Homöostaseausgleich der Arthrose [32,69].

1.3 Proinflammatorische Zytokine im athrotischen Milieu

Die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, die bei der Entstehung von Arthrose eine große Rolle spielen, sind IL-1, TNFα und IL-6 [25,58,123].

Zytokine der IL-1-Familie sind die wichtigsten Mediatoren der akuten posttraumatischen Entzündungsreaktion [35,73]. Von IL-1 kommen zwei Isoformen, IL-1α und IL-1ß, mit ähnlichen Eigenschaften vor [27,104]. Chondrozyten bilden primär IL-1ß [71]. Erhöhte IL-1-Expression wurde u.a. nach

mechanischen Gelenkverletzungen beschrieben und korreliert mit dem Schweregrad des Knorpelschadens [73]. IL-1 wird von Chondrozyten, Synoviozyten und infiltrierenden entzündlichen Zellen exprimiert. IL-1 induziert Gelenkschmerzen, fördert den Knorpelmatrixabbau durch Induktion Matrix-abbauender Enzyme (MMP1, MMP3, MMP13) [31] und hemmt sowohl die Synthese von Matrixkomponenten, darunter Kollagen Typ II und Aggrekan, als auch die anabole Wirkung von Wachstumsfaktoren wie IGF-1[25,51,58,123]. IL-1ß wird von einer intrazellulären Protease, dem IL-1ß konvertierendem Enzym (ICE), Caspase 1, prozessiert und aktiviert [104]. IL-1ß bindet an den IL-1 Rezeptor 1 (IL-1R1) und induziert Signale über den NFκB- oder MAPK-Weg. In Chondrozyten wird u.a. der p38MAPK-Signalweg [36] bevorzugt, dem außerdem eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der PTA zugeschrieben wird [15,28]. Die biologische Aktivität von IL-1ß wird u.a. durch den IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1Ra), der unter anderem von Chondrozyten und synovialen Fibroblasten produziert wird, antagonistisch gehemmt [25,89]. Über IL-1ß ist bekannt, dass es die Gene COX2, iNOS und PTGES in Chondrozyten hochreguliert und die IL-6 Produktion induziert [25,76]. Von IL-1, IL-6 und TNFα ist bekannt, dass sie potente Aktivatoren der Superoxid-Dismutase 2 (SOD2) sind [2,78].
TNFα löst über den TNF Rezeptor 1 (TNFR1) und TNFR2 verschiedene Signalkaskaden aus. TNFR1 liegt in arthrotischen Chondrozyten und arthrotischen synovialen Fibroblasten erhöht vor [5]. Wie bei IL-1ß erfolgt die intrazelluläre Signalgabe von TNFα über den NFκB- und den MAPK-Signalweg. TNFα kann zur Apoptoseinduktion in Chondrozyten beitragen und zeigt dabei einen stärkeren Einfluss als IL-1ß [21]. Wie auch IL-1ß stimuliert TNFα die Produktion von iNOS, COX2 und die Freisetzung von NO und PGE2. NO und PGE2 treiben die entzündlichen Vorgänge und die Zerstörung des Knorpels weiter voran, indem sie die Synthese von anabolen Molekülen (Kollagen, Proteoglykan) und den IL-1Ra hemmen [25].

Unter normalen Bedingungen produzieren Chondrozyten wenig IL-6. In der Arthrose werden Chondrozyten und Synoviozyten durch IL-1ß und TNFα zur IL-6 Produktion [43,54,58,124] angeregt. Bei Trauma wird eine lokale und systemische Freisetzung von IL-6 direkt induziert [47,56]. So liegt IL-6 im athrotischen Gewebe erhöht vor und kann als pleiotropes Zytokin über zwei unterschiedliche

Signalwege Zielzellen aktivieren. Im klassischen Signalweg stimuliert IL-6 die Zellen über einen membrangebundenen Interleukin-6-Rezeptor (mIL-6R), der durch Ligandenbindung die Assoziation mit dem Rezeptor-Protein Glykoprotein 130 (gp130) signalisiert. Gp130 dimerisiert, was zur Aktivierung der Janus-Kinasen führt und die anschließende Phosphorylierung von Tyrosin-Resten im zytoplasmatischen Teil von gp130 bewirkt. Dies führt zur Bindung der Phosphatase Src-Homologie-Domänen enthaltende Tyrosin-Phosphatase-2 (SHP-2) und der Aktivierung des Ras/Raf/MEK/MAPK-Weg. Darüber hinaus werden die monomeren STAT3 und/ oder STAT1 (Signal Transducer und Aktivator von Transkription)-Proteine rekrutiert, diese phosphorylieren und translozieren als STAT1-Dimere/ STAT3-Dimere in den Zellkern, was die Transkription von Zielgenen bewirkt. Interessanterweise besitzen überwiegend Makrophagen, Neutrophile, Hepatozyten und einige T-Zellen (TH1, TH17) [118] den mIL-6R an der äußeren Membran, während alle Zellen gp130 auf der Zelloberfläche tragen. Alle anderen Zellen können deshalb nur durch den Trans-Signalweg aktiviert werden. Hierbei reagieren die Zielzellen nicht auf IL-6 allein, sondern auf einen Komplex bestehend aus IL-6 und einer natürlich vorkommenden löslichen Form des Interleukin-6-Rezeptors (sIL-6) [108]. IL-6/sIL-6Rα unterdrückt die Differenzierung von Chondrozyten und bewirkt durch eine erhöhte Expression von Knorpel-Matrixproteinen die Reparatur von arthrotischem Knorpel [87]. Wie Aida et al. 2012 zeigen konnte, erhöht IL-6/sIL-6R die Expression von MMP-1 und MMP13 und verringert die von MMP2 (n=4) [3]. Zusätzlich potenziert IL-6 mit seinem löslichen Rezeptor die katabolen Wirkungen von TNFα und IL-1ß im Abbau und Verlust von Proteoglykanen aus bovinem Knorpel [30]. Die Aktivität des IL-6/sIL-6R Komplexes wird von dem löslichen gp130 (sgp130) reguliert, welches im Plasma zirkuliert und als spezifischer Inhibitor des Trans-Signalwegs fungiert. [108]. Ein erhöhter BMI und hohe IL-6 Werte sind mit einem Risiko für radiologisch sichtbare arthrotische Schädigungen assoziiert [62,70]. Die Bedeutung von IL-6 bei inflammatorischen Erkrankungen wie der systemischen Verlaufsform der juvenilen rheumatoiden Arthritis (Still-Syndrom) wird durch einen Therapieansatz mit dem neuartigen monoklonalen Antikörper Tocilizumab belegt. Tocilizumab ist ein Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptor-blockierender humanisierter monoklonaler Antikörper, das erste IL-6-blockierende Therapiekonstrukt, das zur Therapie einer

rheumatoiden Arthritis und der juvenilen rheumatoiden Arthritis zugelassen wurde. Toclizumab blockiert den klassischen und den Trans-Signalweg [118].

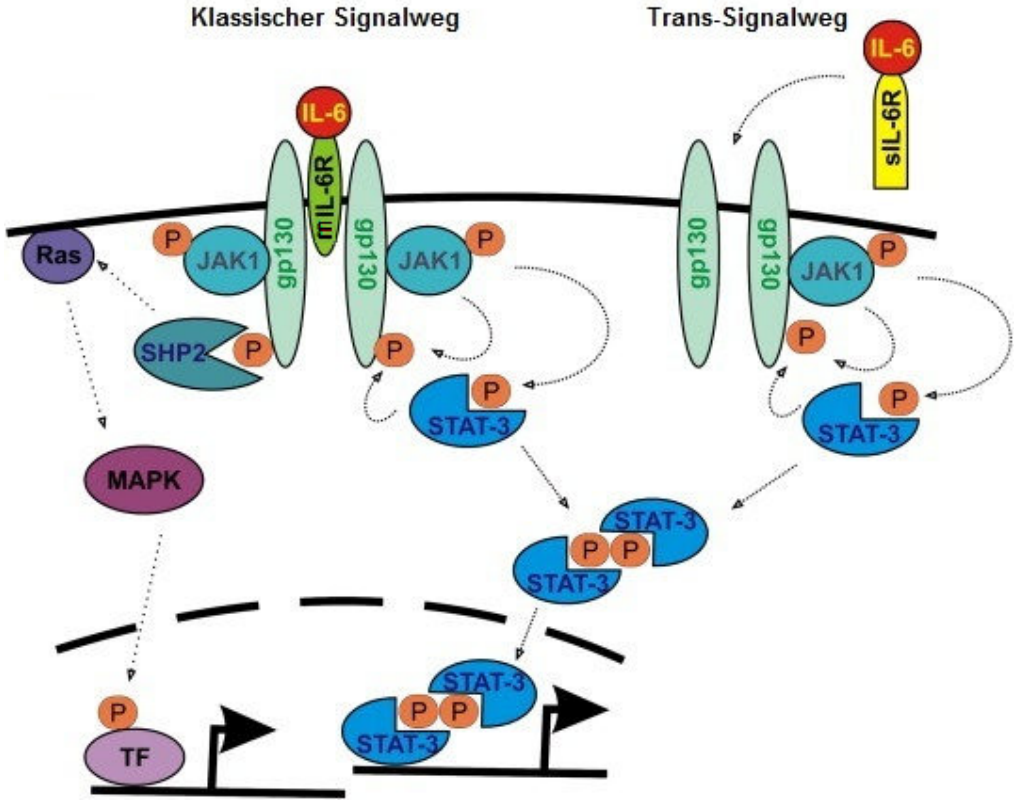


Abb. 2: IL-6-Signalwege. IL-6 bindet an mIL-6R, was die Homodimerisierung von gp130 bewirkt. JAKs werden aktiviert und phosphorylieren an den Tyrosinresten in den zytoplasmatischen Domänen von gp130. Dies rekrutiert STATS, die an gp130 binden durch JAKs phosphoryliert werden und als die STATs-Homodimere in dem Zellkern wandern und Gen-Transkription bewirken. Ein weiterer Weg der durch IL-6 aktiviert wird, ist der MAPK-Weg. Die Aktivierung von JAKs führt zur Phosphorylierung der Tyrosinreste an gp130. SHP2 wird rekrutiert. Letztlich wird Ras aktiviert, was den MAPK-Weg auslöst. Durch weitere Phosphorylierungsprozesse können MAPKs Transkriptionsfaktoren aktivieren. Der andere Signalweg von IL-6 wird Trans-Signalweg bezeichnet. Der sIL-6R wird über Proteolyse oder alternatives Spleißen generiert. Der IL-6/sIL-6R Komplex bindet gp130 und löst die gleichen molekularen Mechanismen aus, wie im klassischen Signalisierungsschema dargestellt wurden. JAK1, Janus-Kinase 1; gp130, Glykoprotein 130; MAPK, MAPKinase; mIL-6R, membrangebundener IL-6R; P, Phosphorylierung; sIL-6R, löslicher IL-6 Rezeptor, STAT-3, Signal Transducer und Aktivator von Transkription; TK, Transkriptionsfaktor. (Modifiziert nach Spooren et al. 2011) [119].

Der MAPK-Weg ist ein zentraler Signalweg, der bei IL-1, TNFα und IL-6 eine Rolle spielt. Es existieren drei unterschiedliche Mitogen Aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Familien, ERK (Extrazellular Signal-regulierte Kinase), p38MAPK und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) [122]. Alle sind hochkonservierte Serin/Threonin Proteinkinasen, die in synovialen Fibroblasten von TNFα, IL-1 und IL-6 aktiviert werden [109]. In der Arthrose ist besonders der p38MAPK-Weg hervorzuheben

[122]. Es kommen vier Isoformen von p38 vor, wobei die Unterform p38α die Hauptrolle in entzündlichen Prozessen einnimmt [110]. Das aktivierte Ras-Protein kann die MAP-Kinase-Kaskade induzieren, die Transkriptionsfaktoren stimuliert. Es kommt zur Induktion und Expression unterschiedlicher Gene. Hervor zu heben sind COX2, iNOS und MMP13. P38MAPK reguliert die IL-1 induzierte Produktion von IL-6 und IL-8 und induziert die Expression von COX2, MMP1 und MMP3 in Fibroblasten, sowie die Freisetzung von NO [122]. Die Hemmung von p38MAPK unterdrückt die durch TNFα und IL-1 induzierte IL-6 Freisetzung in Chondrozyten [9,15,65].

Cyclooxygenasen, die konstitutive Cycloxygenase-1 (COX1) sowie die induzierbare COX2, synthetisieren aus Arachidonsäure Prostaglandin H2 (PGH2). Aus PGH2 wird durch die Prostaglandin-E-Synthase (PTGES) das Produkt Prostaglandin E2 (PGE2) hergestellt. PGE2 ist ein Gewebshormon, das als pleiotroper Bioregulator über vier verschiedene G-Protein-gekoppelte Prostaglandin-E-Rezeptoren (EP) unterschiedliche Reaktionen im humanen Körper bewirkt [8,38,101]. Der EP4 ist in arthrotischem Knorpelgewebe hochreguliert [8]. PGE2 bewirkt im menschlichen Körper neben der Entzündungsreaktion Gefäß- und Bronchiendilatation, sowie Fieber und Schmerzvermittlung. Im Knorpelgewebe ist PGE2 an der Chondrozytenproliferation und Matrixsynthese beteiligt [44,101]. PGE2 hemmt die Aggrekan-Synthese und fördert die Degradation von Aggrekan und Kollagen Typ II [8,74] durch die Hochregulation von MMP13 und ADAMTS [19,39]. Andererseits kann PGE2 als antiinflammatorisches Molekül die Expression und Synthese von IL-1ß, TNFα, iNOS, MMP1 und MMP3 supprimieren [44,82], Glukokortikoidrezeptoren in Chondrozyten erhöhen, Effekte von Vitamin D vermitteln und die Differenzierung und Profileration von Knorpelgewebe fördern [21,26]. Ob PGE2 Apoptose stoppen kann wird hingegen kontrovers diskutiert [21,53]. PGE2 induziert die IL-6 Produktion in humanen Chondrozyten und synovialen Fibroblasten direkt [124,125]. Arthrotischer Knorpel weist eine erhöhte COX2-Genexpression auf, was wiederum eine Konzentrationssteigerung von PGE2 zur Folge hat [1,7,44,74].

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein multifunktionales Signalübertragungsmolekül, das durch NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet wird. Es existieren drei Isoformen der NOS, die beiden konstitutiven Synthasen neurale NOS (nNOS) und endotheliale NOS (eNOS), sowie die induzierbare iNOS. Die konstitutiven NOS werden durch Ca^{2+}-Calmodulin oder Enzymneusynthese angeregt [101]. Die induzierbare iNOS ist schon bei niedrigen Ca^{2+}-Konzentrationen in nichtstimulierten Zellen aktiv und wird nur über Enzyminduktion z.B. durch proinflammatorische Zytokine (IL-1ß, TNFα) und Lipopolysaccharide aktiviert [1,38,44,99]. NO ist ein sehr reaktives und toxisches Radikal, das innerhalb von Sekunden in inaktives Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (HNO_3^-) abgebaut wird. NO wirkt direkt lokal oder indirekt durch einen cGMP-vermittelten Signalweg. Folgen sind die Relaxation der glatten Muskulatur, eine Hemmung der Thrombozytenaggregation und Förderung weiterer Signalkaskaden. Im Knorpel generiert NO reaktive Stickstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrite ($ONOO^-$) und Hydroxyl-Radikale, die die Knorpelzerstörung weiter vorantreiben [2,14,101] und beeinflusst durch Aktivierung von MMPs [1] den Abbau der Matrix [61]. NO erhöht proapoptotische Faktoren wie p53, die über den intrinsichen Signalweg Apoptose auslösen [1]. Außerdem führt NO zur Osteophytenbildung [1]. Bentz et al. 2012 konnte nachweisen, dass der iNOS-Inhibitor, N-iminoethyl-L-Lysin (L-NIL), die IL-1β-induzierte NO-Freisetzung und iNOS-Aktivität blockiert und die ROS-Produktion und Apoptose in Chondrozyten verringert. Möglicherweise könnte L-NIL einen Therapieansatz in der Behandlung von Arthrose darstellen [14].

Studien deuten darauf hin, dass p38MAPK-Inhibitoren einen Ansatz in der Athrosetherapie liefern [122]. In der Wissenschaft hervorzuheben ist die Substanz SB203580, ein Pyridinylimidazol, das kompetitiv an der ATP-Bindestelle der p38MAPK bindet (Molekülstruktur und genaue Bezeichnung im Anhang) [130] und inflammatorische Vorgänge im Knorpelgewebe blockieren kann [9,55,110,111]. Wie Joos at al. 2009 zeigen konnte, spielt vor allem die durch IL-1ß induzierte p38MAPK eine entscheidende Rolle in der Signalkaskade bei Apoptose, Entzündung und Proteoglykanverlust [55].

1.4 Zielsetzung

Nach einem Trauma werden im Gelenk chondral und osteochondral komplexe inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt, die zu einem vermehrten Zelltod und dem Abbau von Knorpelmatrix führen. Dabei kommt es durch Trauma oder induzierte Mediatoren wie IL-1 zu einer zentralen p38MAPK Aktivierung der Chondrozyten mit Freisetzung von IL-6 und MMP13 [28,57,122]. In vivo liegt ein Gemisch verschiedener proinflammatorischer Faktoren vor, die potente Aktivatoren der Knorpeldegradation sind und eine Stimulation der iNOS bewirken. Diese ist bei Chondrozyten aus arthrotischem Gelenkknorpel vermehrt nachweisbar und führt über die Bildung von NO zur Apoptoseinduktion von Chondrozyten [2,14].
Das nach Trauma im Kniegelenk freigesetzte IL-6 wird hauptsächlich von Chondrozyten und Synovialzellen freigesetzt [54,58]. Wie Vorversuche der Arbeitsgruppe von Prof. Brenner zeigten, wird der größte Teil des IL-6 als Antwort auf Faktoren, die vom traumatisierten Knorpel freigesetzt werden, von Synovialzellen gebildet.
Die zugrunde liegenden Mechanismen der PTA bzw. die initialen Prozesse nach einem Knorpeltrauma sind nur teilweise verstanden. Insbesondere die Rolle von IL-6 und sIL-6R bei der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, Apoptose, und katabolen Prozessen wie der Aktivierung von iNOs und MMPs ist unklar.

In der vorliegenden Doktorarbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat IL-6/sIL-6R auf ein akutes Knorpeltrauma?
- Welche Auswirkung hat die IL-6/sIL-6R-Stimulation und die Traumatisierung des Knorpels auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion von Chondrozyten?
- Welche Auswirkung hat die IL-6/sIL-6R-Stimulation und die Traumatisierung auf die Induktion der Gen-Expression von MMP1, MMP13, COX2, PTGES, iNOS und SOD2?
- Welche Auswirkung hat die IL-6/sIL-6R-Stimulation und die Traumatisierung auf die Freisetzung von PGE2 und Nitrit, sowie

proinflammatorischer Zytokine (IL-1ß, IL-6, IL-8), IL-10 und RANTES („regulated and normal T cell expressed and secreted“) im Gewebekulturüberstand?

- Ist es möglich diese Vorgänge mit dem p38MAPK-Inhibitors (SB 203580) zu hemmen?
- Inwieweit beeinflusst eine mögliche Kostimulation von TNFα und IL-6/sIL-6R die proinflammatorischen und katabolen Prozesse bei einem initialen Knorpeltrauma?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Knorpel

Der verwendete Knorpel wurde aus humanen Kniegelenken gewonnen, die bei totalen Kniegelenkendoprothese-Implantationen entfernt und durch künstliche Kniegelenke ersetzt wurden. Vor der Operation wurden die Patienten aufgeklärt und deren Zustimmung eingeholt (siehe Anhang). Es wurden insgesamt 18 Kniegelenke verarbeitet, wobei nur Knorpel verwendet wurde, der makroskopisch keine arthrotische Schädigung aufwies. Nach der Entnahme wurde das Resektat steril in isotonische Kochsalzlösung überführt und bis zur Verarbeitung (max. 2 h) bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

AbiPrism Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Allegra 64R Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Ausgießstation	Leica EG1140H, Solms
Biopsiestanze (d = 6 mm)	Stiefel Laboratorium, Offenbach am Main
Brutschrank Cytoperm	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank	Memmert GmbH+Co. KG, Schwabach
BD FACSArray(TM) Bioanalyzer	BD Biosciences, USA, CA, San Jose
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
Dewargefäß	Isotherm KG, Gräfenhainichen
Diamant-Schreiber	VWR, Bruchsaal
Doppelklingenskalpell	Universität Ulm

Drop-Tower	Universität Ulm
Dynatech Reader / MRX Microplate Reader	Dynatech Laboratories
Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
GelDocXR, PC 170	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GS-15R Centrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Heiz- und Magnetrührplatte	Bender & Hohlbein, Zürich
Histokinette 2000	Reichert Jung, Nussloch
Histosette	Simport, Beloeil, Kanada
IKA-VIBRAX-VXR-Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Kamera am Mikroskop AxioCam Mrc	Zeiss, Göttingen
Konisches Röhrchen (50 ml)	Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg
Kryoröhrchen (1,2 ml)	Nalgene, Darmstadt
Metallkugeln (d = 9 mm)	Sartorius, Göttingen
MicroAMP Optical-Reaktionsplatten (96-Well)	Applied Biosystems, Darmstadt
Microton blade	Feather, Japan
Mikrodismembrator S	Sartorius BBI Systems, Melsungen
Mikrotom	Reichert Jung, Nussloch
Mikroskop- Axioskop 2 Mot Plus	Zeiss, Göttingen
Microtiter Platte (96-Well)	Brand GmbH, Wertheim
Mikrowellengerät	LG, UK

Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Nierenschale	Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshöfen
Objektträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Paraffinstreckbad	Medax GmbH & Co KG, Kiel
Paraffinstreckplatte	Medax GmbH & Co KG, Kiel
PCR-Tubes	Peqlab, Erlangen
Petrischale	Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg
Pinzette	Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg
Pipette discovery comfort 10 µl	ABIMED GmbH, Langenfeld
Pipette discovery comfort 20 µl	ABIMED GmbH, Langenfeld
Pipette discovery comfort 200 µl	ABIMED GmbH, Langenfeld
Pipette discovery comfort 1000 µl	ABIMED GmbH, Langenfeld
Pipettenspitzen 10 µl	Promega AG, Mannheim
Pipettenspitzen 20 µl	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen 200 µl	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Pipettenspitzen 1000 µl	Axygen Bioscience, Langenfeld
Pipettierhilfe „Pipetus”	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co, Berlin
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Brand GmbH, Wertheim
Reaktionsgefäße (15 ml)	Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg
Robocycler Gradient 96	Strategene Europe, Amsterdam

Serologische Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpellgriff	Aesculap, Tuttlingen
Skalpellklinge (11er, 23er)	Aesculap, Tuttlingen
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Teflongefäß	Sartorixs, Göttingen
Tischautoklav Tuttnauer 2540EL	Systec GmbH, Wellenberg
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Trockenschrank	Binder (Schichte)
Ultraschallbad Brausch 2200	Bender & Hoben, München
Vortex Genie	Bender & Hohlbein, Zürich
Waage Precisa 400M	Altenrath GmbH, Zürich
Wasserbad	GFL GmbH, Burgwedel
Zellkulturplatte (24-Well)	Becton Dickson, Heidelberg

2.1.3 Chemikalien, Kits und Primer

3-Aminoprohyl-Triethoxysilane- Aceton-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Aceton	Riedel-de Haën, Seelze
AEC+Substrat Chromogen	Dako GmbH, Hamburg
Anti ACTIVE- Caspase-3 pAb	Promega GmbH, Mannheim
Ascorbinsäure-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Basenpaarleiter (100 bp)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Biotinylated Link Universal	Dako GmbH, Hamburg
Blocking Reagent (Protein Block)	Dako GmbH, Hamburg
Bor acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Brij-35	Thermo Scientific GmbH, Bonn
Coral Load PCR Buffer (10x)	Qiagen GmbH, Hilden
DMEM (Dulbecco's MEM)	Biochrom AG Biotechnologie, Berlin
DNase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
dNTPs	Qiagen GmbH, Hilden
Dulbecco’s PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Ethanol absolut (96 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Extran	Merck, Darmstadt
FCS (Fötales Kälberserum)	Biochrom KG, Berlin
Flüssigstickstoff	Universität Ulm
Fluorescence Mounting Medium	Dako GmbH, Hamburg
Formaldehyd Solution (37 %)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ham’s F12	Biochrom KG, Berlin
Hämalaun nach Mayer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hot Star Taq Plus DNA-Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden

Hyaluronidase (1 mg/ml PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Interleukin-1ß (human)	Peprotech, Rocky Hill, NJ
Interleukin-6 (human)	Peprotech, Rocky Hill, NJ
Isopropanol (99 %)	Ölfabrik Schmidt, Ulm
Kaisers-Glycerin-Gelatine	Merck, Darmstadt
KAPA SYBR Fast qPCR ABI Prism	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Le Agarose	Lonza, Rockland, Me USA
Löslicher Interleukin-6 Rezeptor (human)	Peprotech, Rocky Hill, NJ
Na2EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NEAS (nicht essentielle Aminosäuren)	Biochrom KG, Berlin
Oligo dt Primer (10 µM)	Biomers, Ulm
Paraplast plus	Mc Cormick Scientific, Maarn
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Pyruvat	Biochrom KG, Berlin
Reinigungskonzentrat mit Korrosionsschutz	Bandelin electronic, Berlin
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
S-Dako 30 Antibody Dilution Reagent	Dako GmbH, Hamburg
SB203580	Merckle, Blaustein
SES1/ SolA	Biochrom AG, Berlin
SES1/ SolB	Biochrom AG, Berlin
Spüllösung/ migation Solution Aqua	Delta Select, Dreieich
Streptavidin-HRP	Dako GmbH, Hamburg
TNFα (human)	Peprotech, Hamburg
Tris-base	Amersham plc, Little Chalfont, UK
Tri-Sodium-Citrate Dihydrate	Fluka Analytical, Steinheim, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TritonX-100	Merck, Darmstadt
TUNEL-Enzym	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TUNEL-Label	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Wasserstoffperoxid (30 %)	Otto Fischar GmbH Co & KG, Saarbrücken
Xylol (Xylene)	Prolabo, Bruchsaal
Zinkchlorid	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie

	GmbH, Taufkirchen
Wasser (destilliert)	Universität Ulm
Wasser (HPLC-Reinheitsgrad)	Aplli Chem Synthesis Sevices, Darmstadt

Kits

Griess Reagent System	Promega, Mannheim
Hot Star Taq Plus Buffer Set	Qiagen GmbH, Hilden
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	BD Biosciences, USA, CA, San Jose
Interleukin-1 ELISA Kit	R&D Systems, Bad Nauheim
LIVE/DEAD Viability/Cytoxoxicity Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Omniscript RT Kit (200)	Qiagen GmbH, Hilden
Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit	Biotrend, Köln
RNeasy Lipid Mini Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TNFα ELISA Kit	R&D Systems, Bad Nauheim

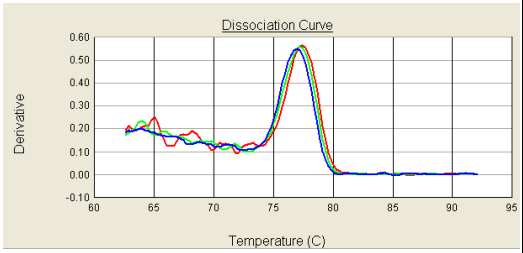
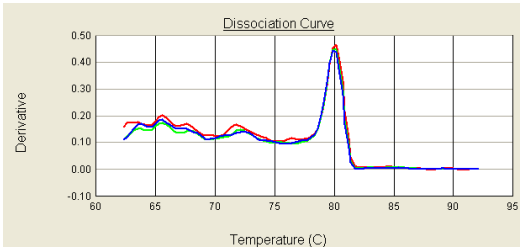
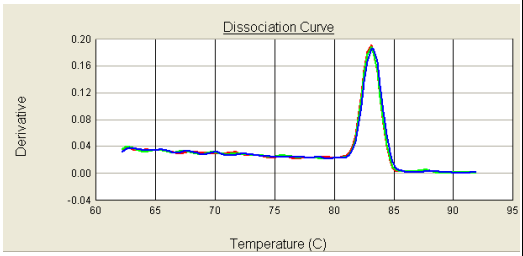
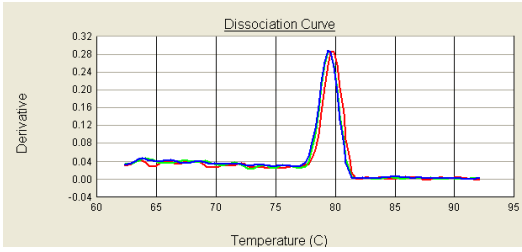
Primer

Tabelle 1: Zielgene der verwendeten Primer, „GenBank“-Zugangsnummer, Amplifikationslänge, Anwendungen und Sequenzen.

Zielgene, „GenBank“-Zugangsnummer	Amplifikations-länge (bp)	Anwendung	Sequenz (5’→3’)
GAPDH NM_002046	188	sqPCR	Forward: GAGTCCACTGGCGTCTTCAC Reverse: GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT
18S rRNA NM_022551	65	qPCR	Forward: CGCAGCTAGGAATAATGGAATAGG Reverse: CATGGCCTCAGTTCCGAAA
MMP1 NM_001145938	146	qPCR	Forward: TTCGGGGAGAAGTGATGTTC Reverse: ATCTCTGTCGGCAAATTCGT
MMP13 NM_002427	97	qPCR	Forward: TCCTCTTCTTGAGCTGGACTCATT Reverse: CGCTCTGCAAACTGGAGGTC
COX2 NM_000963	123	qPCR	Forward: CCCTTGGGTGTCAAAGGTAA Reverse: GGCAAAGAATGCAAACATCA
PTGES NM_004878	155	qPCR	Forward: CCCCCAGTATTGCAGGAG Reverse: GGAAGACCAGGAAGTGCATC
iNOS NM_000625	117	qPCR	Forward: ATTCACTCAGCTGTGCATCG Reverse: TCAGGTGGGATTTCGAAGAG
SOD2 NM_001024466.1	116	qPCR	Forward: GGAAGCCATCAAACGTGACT Reverse: CCCGTTCCTTATTGAAACCA

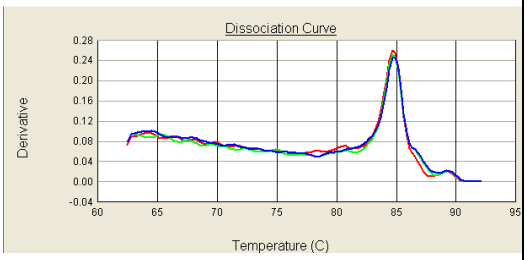
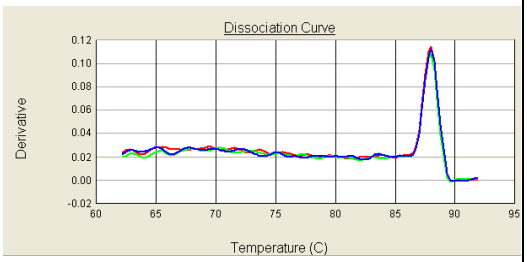
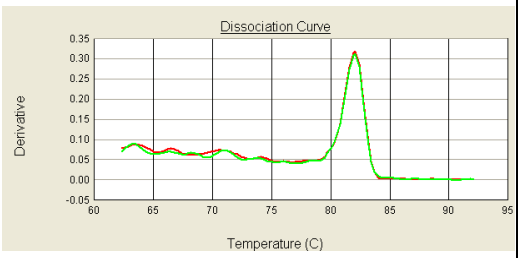
sqPCR, semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion; qPCR, quantitative Echtzeit PCR; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 18S rRNA, 18S ribosomale Ribonukleinsäure; MMP1, Matrixmetalloproteinase-1; MMP13, Matrixmetalloproteinase-13; COX2, Cyclooxygenase-2; PTGES, Prostaglandin-E-Synthase; iNOS, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; SOD2, Superoxid-Dismutase-2 [88].

Tabelle 2: Primer für die qPCR

Zielgen	End-konzen-tration (µM)	SYBR-Green PCR Master Mix	Schmelz-kurve	Dissoziationskurve (x-Achse:Temperatur, y-Achse: Änderung der Fluoreszenz)
18S rRNA	1	Applied Biosystems	76 °C	
MMP1	0,9	Applied Biosystems	80 °C	
MMP13	1	Invitrogen GmbH	>86 °C	
COX2	1	Invitrogen GmbH	79 °C	

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 2

Zielgen	End-konzen-tration (µM)	SYBR-Green PCR Master Mix	Schmelz-kurve	Dissoziationskurve (x-Achse:Temperatur, y-Achse: Änderung der Fluoreszenz)
PTGES	0,3	Peqlab Biotechnolo-gie	85 °C	
iNOS	0,3	Invitrogen GmbH	87 °C	
SOD2	1	Peqlab Biotechnolo-gie	82 °C	

18S rRNA, 18S ribosomale Ribonukleinsäure; MMP1, Matrixmetalloproteinase-1; MMP13, Matrixmetalloproteinase-13; COX2, Cyclooxygenase-2; PTGES, Prostaglandin-E-Synthase; iNOS, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; SOD2, Superoxid-Dismutase-2

2.1.4 Lösungen, Puffer, Zellkulturmedien und Objektträger

Formalin nach Lilie (pH 7.0):

900 ml Wasser (destilliert)

100 ml Formaldehyd (37 %)

6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat

4 g Natriumdihydrogenphosphat

Zink-Formalin:

200 ml	Wasser (destilliert)
20 ml	Formaldehyd (37 %)
2 g	Zinkchlorid

TBE-Puffer (pH 8.3):

1000 ml	Wasser (destilliert)
10,9 g	Tris-Base
5,5 g	Borsäure
0,93 g	Na2EDTA

Chondrozyten-Vollmedium:

178 ml	HAM's F12
178 ml	DMEM
40 ml	FCS (10 %)
2 ml	L-Glutamin (0,5 %)
2 ml	Penicillin/ Streptomycin (0,5 %)
800 µl	Ascorbinsäure-Phosphat (Stammlösung: 5 mg/ml, Endkonzentration: 10 mg/ml)

Chondrozyten-Leermedium:

193,8 ml	DMEM
2 ml	NEAS (1 %)
2 ml	Pyruvat (1 %)
1 ml	L-Glutamin (0,5 %)

1 ml	Penicillin/ Streptomycin (0,5 %)
200 µl	SES-1/ Solution A (0,1 %)
	SES-1/ Solution B wurde kurz vor Einsatz dem Medium im Verhältnis 1:1000 (0,1 %) zugeben

Lebend-Totzelllösung:

4 ml	PBS
1 µl	Calcein AM (4 nM)
4 µl	Ethidium Homodimer-1 (2 mM)

Objektträger, silanisiert

Extran (10 %)	Über Nacht
Wasser, fließend	5 min
3-Aminopropyl-Triethoxysilane-Aceton-Lösung (2 %)	5 min
Aceton	1 min
Aceton	1 min
Wasser (destilliert)	1 min
Wasser (destilliert)	1 min

Zum Abschluss wurden die silanisierten Objektträger an der Luft getrocknet und danach über Nacht bei 40 °C im Trockenschrank gelagert.

2.1.5 Computerprogramme

AbiPrism SDS 7000 System Software, 1.2.3	Applera GmBH, Darmstadt
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, Köln

Adobe Photoshop Lightroom, 2.7	Adobe Systems GmbH, Köln
AxioVision, 3.1	Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism 5	GraphPad, La Jolla, USA
FCAP Array Software 1.0.1	BD Biosciences, USA, CA, San Jose
Office Home and Student 2010	Microsoft, München
Quantity One 1D Analysis Software, 4.6	Bio-Rad Labaratories GmBH, München

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der Knorpelstanzkulturen

Die Präparation der Knorpelstanzen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde das Knorpelgewebe mit PBS befeuchtet, anschließend mit Hilfe einer 6 mm Durchmesser großen Biopsiestanze Stanzen aus makroskopisch intaktem Knorpelgewebe ausgestochen und mit einem Skalpell vom Knochen gelöst. Danach wurde das Gewicht der Stanzen bestimmt. Nach der Präparation wurden die Knorpelstanzen in 1 ml Chondrozyten-Vollmedium in 24-Well Zellkulturplatten im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.2 Traumatisierung und Stimulation der Knorpelstanzen

Nach Inkubation der Stanzen über Nacht erfolgte die Traumatisierung mittels Drop-Tower und die Stimulierung mit verschiedenen Zytokinen unter sterilen Bedingungen.

Vor der Traumatisierung wurde der Drop-Tower (Universität Ulm) samt Zubehör mit Isopropanol (75 %) desinfiziert und in die Sterilbank gestellt. Eine Aufnahme des Drop-Towers ist in den Abb. 3 und 4 zu sehen.

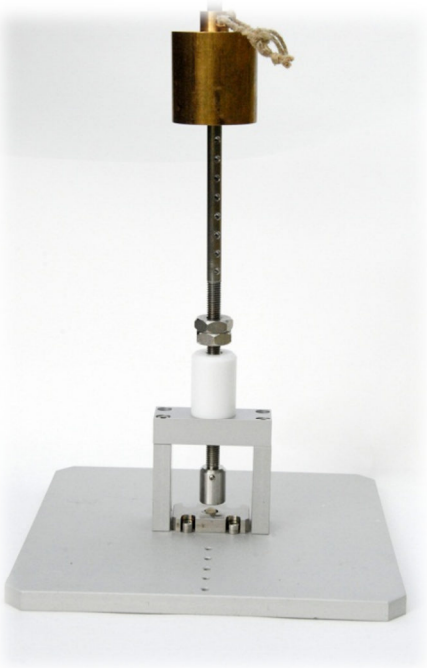


Abb. 3: Drop-Tower

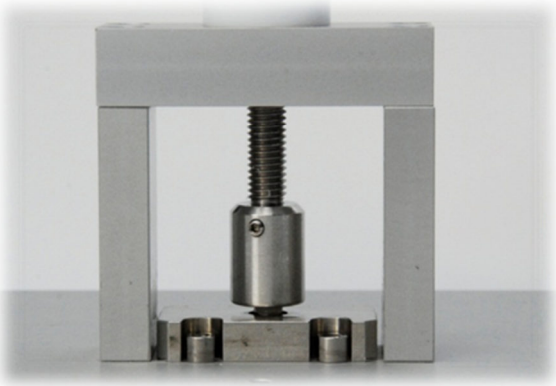


Abb. 4: Nahaufnahme Drop-Tower

Vor der weiteren Behandlung wurden die Knorpelstanzen zweimal in PBS gewaschen, um serumhaltiges Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Stanzen der Reihe nach in eine Vertiefung unter den Stempel des Drop-Towers gelegt (Abb. 3) und stumpf traumatisiert. Diese Methode der Traumatisierung des Knorpels wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brenner etabliert und publiziert [57].

Der Stempel des Drop-Towers (Abb. 3) wurde so eingestellt, dass er auf der Stanze auflag. Das Gewicht von 600 g wurde auf eine Höhe von 0,01 m justiert, so dass nach Entfernung des Haltestiftes eine Energie (E) von 0,59 J auf die Stanze übertragen wurde, gemäß der Formel $E = M \times G \times h$.

$$E = 0{,}6\,kg \times 9{,}81\,\frac{m}{s^2} \times 0{,}01\,m = 58{,}86\,\frac{kg \times m^2}{s^2} \approx 0{,}59\,J$$

Wobei bei dieser Formel M für die Masse, h für die Fallhöhe und G (G = 9,81 m²/s²) für die Erdbeschleunigung steht.

Nach dem Traumatisieren wurden die Stanzen in das entsprechend vorbereitete Leer- bzw. Chondrozyten-Stimulationsmedium überführt. Bei allen Ansätzen wurde die Inkubation nach 24 h beendet. Eine typische Ansatzreihe zeigt exemplarisch Abb. 5.

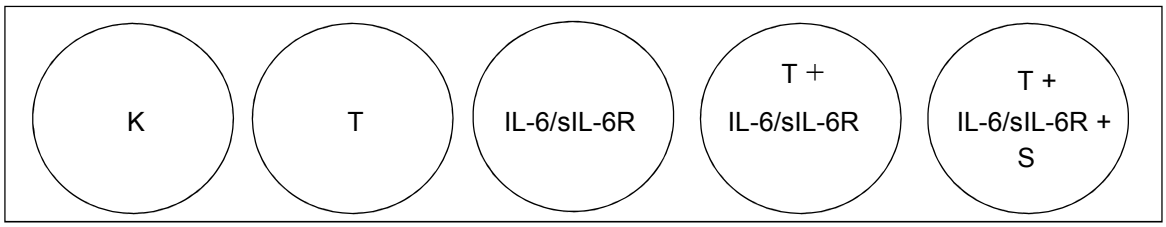


Abb. 5: Skizze des Versuchsansatzes. Fünf Knorpelstanzen wurden als Kreise dargestellt. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL6-R, Interleukin-6/ löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580 (p38MAPK-Inhibitior).

Für die Zellvitalitätsbestimmung wurde aus der Knorpelstanze mit einer Doppelskalpellklinge (11er) mittig eine sehr dünne Schicht herausgeschnitten (Abb. 6, C). Die übrig geblieben Knorpelrandhälften wurden für weitere histologische Färbungen verwendet (Abb. 6, A, B).



Abb. 6: Skizze der Knorpelstanzen. A, Knorpelstück für Aktive-3-Caspase-Assay; B, Knorpelstück für TUNEL-Assay; C, Knorpelscheibchen für Lebend-Totzellfärbung.

Die jeweiligen Überstände wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C eingefroren. Die Stanzen wurden bis zur Weiterverarbeitung in flüssigen Stickstoff für die geplanten Genexpressionsanalysen aufbewahrt und/ oder es wurde direkt die Zellvitalitätsbestimmung durchgeführt und anschließend die Stanzen für die histologischen Färbungen in verschiedenen Formalinlösungen konserviert (2.1.4).

2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität und Apoptose

2.2.3.1 Lebend-Totzellfärbung

Die Lebend-Tozellfärbung wurde mit Hilfe des LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit nach den Angaben der Firma Invitrogen GmbH durchgeführt. Hierbei werden die Stoffe Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) und Calcein Acetoxymethyl (AM) eingesetzt, die die Erfassung der Anzahl an lebenden und toten Zellen ermöglichen. EthD-1 tritt durch geschädigte Membranen ein und bindet dort an Nukleinsäuren. Dies führt zu einer orange-roten Fluoreszenzfärbung des Zellkerns (Emission 528/ 617 nm). Mit Calcein AM lässt sich die Lebensfähigkeit der meisten eukaryotischen Zellen bestimmen. Dabei wird das membranpermeable Calcein AM durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und in grün fluoreszierendes Calcein umgewandelt. Somit kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

Für die Färbung wurden vorbereitete Knorpelscheiben verwendet (2.2.2.). Diese wurden in der entsprechenden Färbelösung (2.1.4) 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Die Präparate wurden auf Objektträger gelegt, mit PBS befeuchtet, abgedeckt und zeitnah mikroskopiert, um so das Ausbleichen der fluoreszierenden Farbstoffe zu vermeiden. Eine zwischenzeitliche Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

Die Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) in 10-facher Vergrößerung untersucht. Die Belichtungszeiten wurden im grünen Kanal auf ca. 6 ms und im roten Kanal auf ca. 45 ms eingestellt. Es wurden 5 Blickfelder der Gewebepräparate digital aufgezeichnet (Software AxioVision; Zeiss), wobei ein Bereich mittig und je zwei an der Oberfläche und den tiefen Schichten des Knorpels ausgewählt wurden. Mit Hilfe der Z-Stapel-Option der Software konnten ca. 40 Fokusebenen zu einem Bild zusammengefügt werden. Dieses Bild wurde mit der Software Lightroom 2.7 bearbeitet und mittels PC-Programm Adobe Photoshop CS2 manuell ausgezählt.

2.2.3.2 Vorbehandlungen für die histologischen Färbungen

Zur Vorbehandlung wurden die Knorpelstanzen mehrere Wochen in Formalin nach Lille für die TUNEL-Färbung und in Zinkformalin für die aktive Caspase-3-Färbung fixiert. Zur Paraffinierung wurden die Stanzen zwei Stunden gewässert, in der Histokinette dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung der Paraffinblöcke wurden 4 µm dicke Schnitte am Mikrotom angefertigt, im Wasserbad gestreckt und für die TUNEL-Färbung auf Superfrost und für die aktive-Caspase-3-Färbung auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung der Schnitte über Nacht wurden die Präparate mit einem Diamant-Schreiber umrandet und bei 60°C 30 min entparaffiniert. Daraufhin folgte die Rehydrierung der Schnitte in folgender Alkoholreihe:

Alkoholreihe	**Zeit**
Xylol	15 min (60°C)
Xylol	5 min (RT)
100 % Ethanol	2 min (RT)
100 % Ethanol	5 min (RT)
96 % Ethanol	2 min (RT)
75 % Ethanol	5 min (RT)

50 % Ethanol	5 min (RT)
Wasser (destilliert)	5 min (RT)

2.2.3.3 TUNEL-Assay

Mit dem TUNEL-Assay lassen sich apoptotische Zellen durch Fluoreszenzfärbung detektieren. Dabei steht der Begriff TUNEL für „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“. Die terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) bindet markierte dUTPs an die in der Apoptose entstandenen freien 3'-OH-Enden der DNA-Strangbrüche. Dann bindet eine an Avidin gekoppelte Peroxidase an diese Nukleotide und katalysiert eine Farbreaktion, die im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte 8 min mit Triton X100-Lösung (0,1 %) permeabilisiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Die Positivkontrolle wurde mit DNase (3 µg/ml) für 15 min inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Die Negativkontrolle wurde ausschließlich mit TUNEL-Label, alle anderen Schnitte wurden mit 5 µl TUNEL-Enzym und 45 µl TUNEL-Label behandelt und für 60 min bei 37 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Danach wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen. Die Gegenfärbung wurde mit Propidiumiodid (0,5 µg/ml) 3 min durchgeführt. Nach weiteren drei Waschschritten in PBS wurden die Schnitte mit Fluorescence Mounting Medium eingedeckt und zeitnah mikroskopiert. Wie bei der Zellvitalitätsanalyse beschrieben (2.2.3.1) wurden je fünf Bereiche der Präparate fotografiert. Danach wurden sie ohne Bearbeitung manuell ausgezählt. Alle Schritte wurden unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt [17,29,86].

2.2.3.4 Aktive Caspase-3-Assay

Der Aktive Caspase-3-Assay ist eine immunhistochemische Färbung. Dabei wird der Primärantikörper (Anti ACTIVE- Caspase-3 pAb) eingesetzt, der von einem biotinylierten Brückenantikörper erkannt wird. Das an die Meerrettichperoxidase (HrP) gekoppelte Streptavidin hat eine hohe Affinität für Biotin und bildet einen Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Methode). Nun kann die Peroxidase HrP das farblose Chromogen in eine braun-rote Farbe umwandeln.

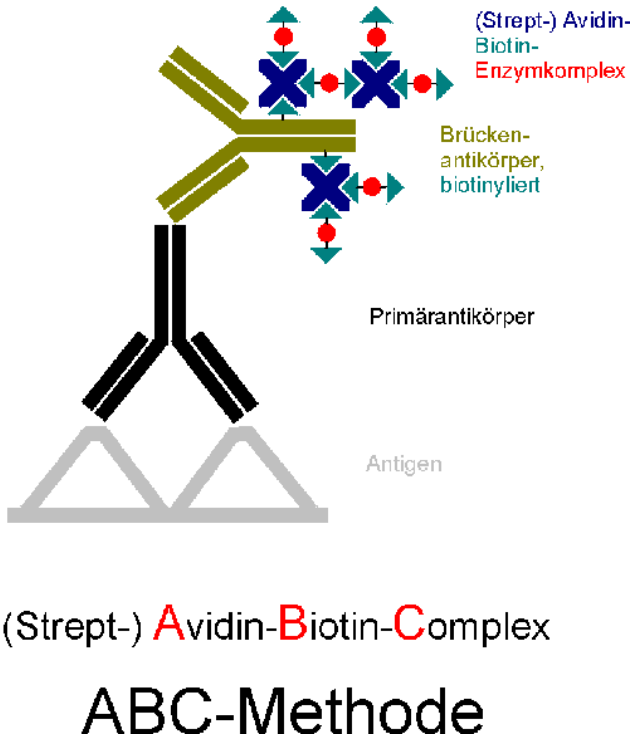


Abb. 7: Schematische Darstellung der ABC-Methode [90].

Nach der in 2.2.3.2 angegebenen Vorbehandlung wurden die Schnitte 60 min bei 37 °C mit Hyaluronidase (1 mg/ml PBS) inkubiert und zweimal in PBS gespült. Nun wurden die Schnitte mit Proteinase K (10 µg/ml) 10 min bedeckt und wieder zweimal in PBS gespült. Als Nächstes folgte die Behandlung mit Wasserstoffperoxid (3 %) für 20 min um endogene Peroxidasen im Präparat zu inaktivieren. Anschließend wurden die Schnitte einmal in destilliertem Wasser und mit einem „speziellen Waschschritt“ (zweimal PBS und einmal PBS + 1 Tropfen Brij) gespült, bevor das Blocking Reagent von Dako 30 min einwirkte. Dieses wurde danach abgegossen, je 100 µl Anti ACTIVE- Caspase-3 pAb Primärantikörper von Promega (1:150) pro Schnitt aufgetragen und 16 h bei 4 °C inkubiert. Als Positivkontrolle dienten humane Hautschnitte, da hier die Antigenpositivität bekannt ist [86]. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers PBS verwendet. Am nächsten Tag folgte der „spezielle Waschschritt“ für 15 min. Danach wurde der Brückenantikörper auf die Schnitte gegeben, 30 min inkubiert und wiederum mit dem „spezielle Waschschritt“ gespült. Daraufhin wurden die Schnitte mit Streptavidin 30 min inkubiert, wieder „speziell“ gewaschen und anschließend ca. 10 min mit Chromogenlösung behandelt. Nach einem weiteren Waschschritt in PBS und destilliertem Wasser, standen die

Schnitte 5 min in Hämalaun nach Mayer und wurden danach in Leitungswasser gebläut, nochmals in destilliertem Wasser gewaschen, mit 43 °C vorgewärmter Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckt und im Durchlicht mikroskopiert. Ein Ausschnitt des Präparats wurde bei einer Belichtungszeit von 68 ms in 10-facher Vergrößerung fotografiert., Nach Weißabgleich erfolgte die manuelle Zählung der Knorpelzellen, wobei Caspase-3 positive Zellen cytoplasmatisch rot gefärbt waren während die Kerne aller Zellen blau erschienen.

2.2.4 Genexpressionsanalysen

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Shreddern der Stanzen, Vorbereitung der RNA-Isolierung

Zur Isolation von RNA aus Knorpelgewebe wurden die Stanzen im ersten Schritt geshreddert. Hierzu wurden die in Flüssigstickstoff konservierten Stanzen (2.2.2) zusammen mit einer vorgekühlten Metallkugel in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Metallkugeln wurden zuvor im Ultraschallbad 10 min in Reinigungskonzentrat mit Korrosionsschutz und Wasser und dann 10 min in Ethanol absolut (96 %) gereinigt. Danach wurden die Röhrchen in ein ebenfalls gekühltes Teflongefäß überführt. Dieses wurde in einen Mikrodismembrator (Sartorius) eingespannt und bei 3000 rpm für 50 s geschüttelt. Nach dem Shreddern wurde zu jedem Röhrchen mit der gut pulverisierten Probe 750 µl Qiazol Lysis Reagent zugegeben und solange gevortext, bis das entstandene Knorpelpulver vollständig gelöst war. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die RNA-Isolierung.

RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben der Firma Qiagen GmbH mit dem RNeasy Lipid Mini Tissue Kit. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde gevortext und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 12000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation kam es zu einer Phasentrennung. Es entstanden drei Phasen. Die obere wässrige Phase enthielt die gewünscht RNA und wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit der gleichen Menge Ethanol (70 %) überführt. Das Gemisch wurde auf eine „RNeasy Mini spin Säule“ aufgetragen und bei 8.000 g für 1 min

zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 350 µl RW1-Puffer wurde wiederum bei 8.000 g für 1 min zentrifugiert. Danach wurde der DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 10 µl „DNase I stock solution“ mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Durch die DNase wurde chromosomale DNA verdaut, die sonst zu einer Verunreinigung der RNA geführt hätte. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei 8.000 g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Das gleiche Vorgehen wurde noch einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer durchgeführt. Danach wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gesteckt und zur Trocknung bei 12.000 g 1 min zentrifugiert. Nach erneutem Überführen der Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde die RNA mit 33 µl RNase-freiem Wasser bei 8.000 g 1 min eluiert. Der erhaltene Durchfluss enthielt die RNA. 18 µl davon wurden direkt im Anschluss in cDNA umgeschrieben (2.2.4.2), die restliche RNA wurde für eventuelle spätere Analysen nach Zugabe von 2 µl RNAse-Inhibitor bei – 80 °C asserviert.

2.2.4.2 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA

Direkt im Anschluss wurde aus der isolierten RNA mit Hilfe des „Omniscript Reverse Transcription“-Kit die stabilere komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. RNA und Reagenzien standen stets auf Eis. Die Reverse Transkriptase dieses Kits hat eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität und eine RNase H Aktivität. Durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität kommt es nach Anlagerung der zugegebenen Primer zur Bildung eines RNA-DNA-Hybridstranges. Mit Hilfe der RNase H Aktivität wird die RNA des Hybrid-Stranges abgebaut. Danach findet eine Dimerisierung des DNA-Stranges durch die DNA-Polymerase-Aktivität statt.

Für die Synthese wurde ein Mastermix hergestellt, bestehend aus:

3 µl RT-Puffer (10x)

3 µl DNTP-Mix (5 mM)

3 µl Oligo-dt-Primer (10 µM)

1,5 µl RNase-Inhibitor (10 U/µl)

1,5 µl Omniscript RT (4 U/µl)

Aus diesem Mastermix wurden je 12 µl mit je 18 µl RNA-Lösung vermischt und anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Inkubation 60 min bei 37 °C und weiteren 60 min bei 42 °C im Robocycler. Danach wurde die cDNA bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (sqPCR)

Bei der semiquantitativen Polymerase-Kettenreaktion (sqPCR) wird ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt. Welcher Abschnitt der DNA dies ist, wird durch den eingesetzten Primer festgelegt. Bei der sqPCR-Analyse wurde pro cDNA-Probe folgender Ansatz pipettiert:

Hot Star Taq Mastermix (2x):

200 µl CoralLoad PCR-Puffer (10x)

40 µl dNTP-Mix (jedes Nukleotid 10 mM)

750 µl Wasser (HPLC-Reinheitsgrad)

10 µl Taq-Polymerase

Ansatz:

10 µl Hot Star Taq Mastermix (2x)

0,5 µl GAPDH Primer reverse (20 pmol/µl)

0,5 µl GAPDH Primer forward (20 pmol/µl)

8 µl Wasser (HPLC-Reinheitsgrad)

1µl cDNA-Probe

Der Ansatz wurde abzentrifugiert und dann in den Robocycler zur Amplifikation gestellt. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet: 15 min bei 96 °C, 32 Zyklen für 1 min bei 95 °C, 1 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C und dann 20 min bei 72 °C.

Durch die Erhitzung auf 96 °C wird die Matrizen-DNA in Einzelstränge aufgesplittet. Bei 60 °C lagern sich dann die Forward und Reverse Primer jeweils an ihren komplementären Bereichen an. Nun werden die Primer an ihrem freien 3‘-OH-Ende durch die thermophile, hitzestabile Taq-Polymerase bei 72 °C mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Es kommt zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten DNA-Abschnitts. In der vorliegenden Arbeit wurde zur sqPCR nur der GAPDH-Primer eingesetzt. GAPDH ist die Abkürzung für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Dieses Enzym kommt in der Glykolyse vor. Es ist ein „housekeeping“ Gen und wurde als Maß für die Menge an cDNA in einer Probe verwendet.

Zur Analyse der Amplifikationsprodukte aus der semiquantitativen PCR wurde ein Agarosegel (2 %) mit 0,005 % Ethidiumbromid (EtBr) hergestellt. Anschließend wurden 5 µl Basenpaarleiter und je 7 µl der PCR-Produkte auf das Agarosegel aufgetragen, das sich in einer Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer befand. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung (120 V) wandern DNA-Fragmente aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen Richtung Pluspol, wobei größere DNA-Stücke langsamer wandern als Kleine. Die Amplifikate werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und erscheinen als DNA-Banden im Gel. Diese können unter UV-Licht sichtbar gemacht werden, da das EtBr in die DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Das Gel wurde nach einer Laufzeit von ca. 25 min mit UV-Licht bestrahlt (UV-Schirm: Gel Doc XR, Biorad), fotografiert und das Resultat ausgedruckt.

2.2.4.2 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Bei der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) kann man eine quantitative Aussage über die Menge an cDNA treffen. Das Prinzip entspricht dem einer normalen PCR. Um die exponentielle Phase zu identifizieren und für eine relative Quantifizierung zu nutzen, wurde bei der qPCR die Produktakkumulation in Echtzeit („Real Time“) verfolgt. Die Messung der Produktzunahme erfolgt störungsfrei anhand von Fluoreszenzlicht, das proportional zur Produktmenge generiert wird. Für die Quantifizierung wird der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green eingesetzt, der an doppelsträngige DNA bindet. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional mit der Menge an doppelsträngiger DNA zu. Die Anregung

durch UV-Licht sowie die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im „ABI PRISM 7000 SequenceDetection System“ (Applied Biosystems). Die erhaltenen Daten wurden mit der Software Abi Prism 7000 SDS am Computer aufgezeichnet und ausgewertet. Ein Beispiel für den Fluoreszenzverlauf wurde in Abb. 8 dargestellt. In der Abb. 8 wurde der dekadische Logarithmus des Fluoreszenzsignals gegen die Zykluszahl aufgetragen.

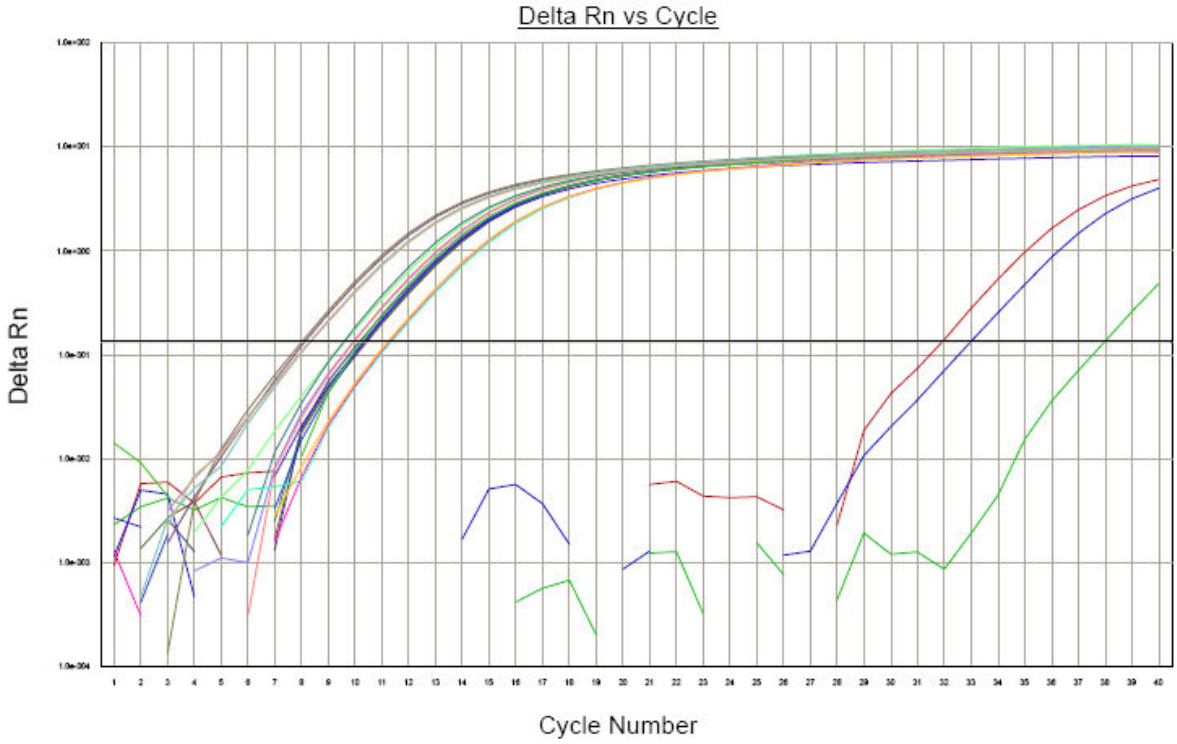


Abb. 8: Verlauf des Fluoreszenzsignals während der Amplifikation.

Fluoreszenzschwellenwert t ist mit einer schwarzen Linie eingetragen.

Die 20 µl Probenansätze wurden in „Fast OpticalReaction Plates (96-Well)“ pipettiert, mit folgender Zusammensetzung:

12 µl	10 µl SYBR-Green PCR Master Mix + 1 µl Primer Forward + 1 µl Primer Reverse
8 µl	2 µl cDNA (1:30 für 18S rRNA oder 1:2 für alle anderen Gene) + 6 µl Wasser (HPLC-Reinheitsgrad)

Es wurden jeweils Dreifach-Bestimmungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

Als Negativkontrolle wurden Leerproben ohne cDNA eingesetzt. Das qPCR Programm wurde wie folgt durchgeführt: Erst wurde 2 min bei 50 °C, dann 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend folgten 40 Zyklen je 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Nach der Amplifikation wurde die Schmelzkurve aufgezeichnet. Dabei wurden die DNA-Proben zuerst 15 sec lang bei 95 °C denaturiert, dann 20 sec auf 60 °C abgekühlt und anschließend wieder auf 95 °C erwärmt. Während dieses Prozesses wurde die Änderung der Fluoreszenz gemessen. Bei 95 °C ist kein wesentliches Fluoreszenzsignal vorhanden, da Einzelstränge vorliegen. Bei einer für den jeweiligen DNA-Strang spezifischen Temperatur kommt es wieder zur Dimerisierung und das Fluoreszenzsignal nimmt sprunghaft zu. Ein einzelner Peak in der Schmelzkurve zeigte an, dass nur ein Amplifikationsprodukt gebildet wurde. Waren mehrere Peaks zu sehen, entstanden unerwünschte PCR Produkte, wie Primer-Dimere (2.1.3 Tabelle 2). Bei der qPCR wurde die Genexpression des Zielgenes auf die endogene Kontrolle 18S rRNA bezogen. Um die aufgezeichneten Fluoreszenzkurven auswerten zu können, wurde ein Schwellenwert „threshold“ (t) mit Hilfe des Programm AbiPrism SDS automatisch festgelegt (Abb. 8, Seite 36). Der t-Wert lag oberhalb der Basislinie und damit am Anfang der exponentiellen Phase. Damit konnte der „Crossing Point“ (C_t) bestimmt werden. Der C_t-Wert entsprach der Anzahl der PCR Zyklen, ab der die Fluoreszenzwerte den „threshold“ übersteigen. Für die weitere Auswertung wurde folgende Formel verwendet:

$$X_n = X_m (1 + E_X)^{n-m}$$

X_n = Anzahl der Moleküle in Zyklus n ($n \geq m$)

X_m = Anzahl der Moleküle in Zyklus m

E_x = Effektivität der Amplifikation (zwischen 0-1)

In der exponentiellen Phase ist die maximale Effektivität der Amplifikation erreicht, weshalb E_x als 1 angenommen wurde:

$$X_n = X_m (1 + 1)^{n-m} = X_m (2)^{n-m}$$

Für das Verhältnis von Probe X_n zu Probe X_m gilt demnach:

$X_n / X_m = 2^{n-m}$

Der Gehalt der 18S rRNA in den Proben diente als endogene Kontrolle. Für die Normalisierung wurden daher zuerst die C_t-Werte der 18S rRNA von den entsprechenden C_t-Werten der Zielgen-Analysen subtrahiert. Dies ergab den ΔC_t-Wert. Um das Verhältnis einer Probe zur jeweiligen Kontrolle zu erhalten, wurden zuerst die ΔC_t-Werte voneinander abzogen ($\Delta C_{t\ \text{Probe (behandelt)}} - \Delta C_{t\ \text{Kontrolle}} = \Delta\Delta C_t$; entspricht m-n). Entsprechend o.g. Formel wurde die Zahl 2 mit $-\Delta\Delta C_t$ potenziert, um den relativen Quantifizierung (RQ)-Wert zu ermitteln. Die RQ-Werte geben also das Verhältnis der Menge an mRNA einer Probe, die beispielsweise stimuliert oder traumatisiert wurde, zur mRNA-Menge der Kontrolle an. Für eine bessere Darstellung wurde der dekadische Logarithmus der RQ-Werte aufgetragen [94].

2.2.5 Überstandsanalysen

Die bei -80°C konservierten Überstände der Gewebekulturen (2.2.2) wurden auf verschiedene Metabolite und Zytokine überprüft, die eventuell von den Knorpelstanzen an das Medium abgegeben wurden. Die bei den Bestimmungen zunächst erhaltenen auf das Volumen bezogenen Konzentrationen wurden anschließend auf das Gewicht der Knorpelstanzen bezogen (2.2.1).

2.2.5.1 Stickstoffmonoxid (NO) - Bestimmung

Die Stickstoffmonoxid (NO) - Konzentration im Überstand wurde mittels Griess-Assay nach Herstellerangaben bestimmt. Das von den Chondrozyten abgegebene NO wird schnell zu Nitrit (NO_2^-) weiter oxidiert. Deshalb wird beim Griess-Assay nicht das NO selbst, sondern die NO_2^- -Konzentration, die proportional zur NO-Konzentration ist, nachgewiesen.

Im Assay reagiert NO_2^- mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumion, welches im nächsten Schritt mit N-1-Naphthylethylendiamin Dihydrochlorid (NED) einen rot-violetten Azofarbstoff bildet.

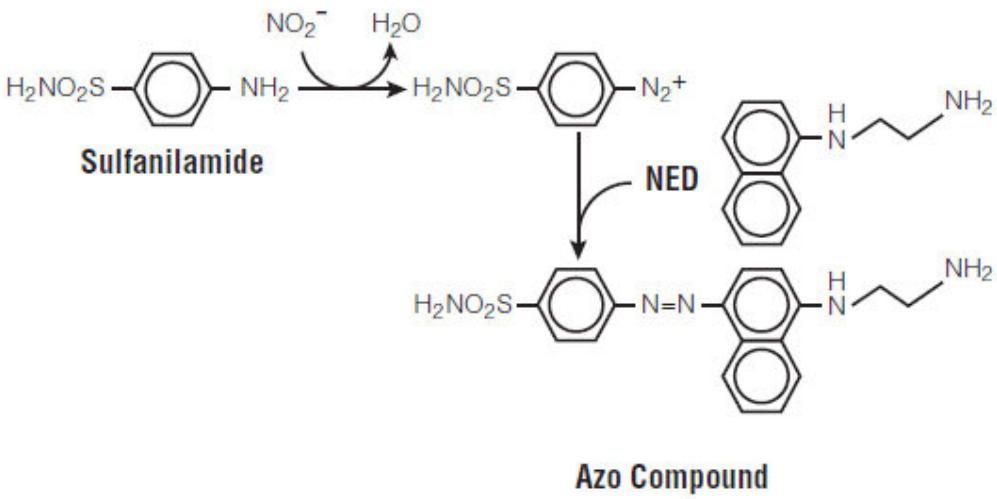


Abb. 9: Diazotierungsreaktion beim Griess-Assay. NED, N-1-Naphthylethylendiamin Dihydrochlorid; Azo Compound, Azofarbstoffverbindung [24].

Zuerst wurden je 50 µl einer Verdünnungsreihe des Nitritstandards in Triplikaten auf einer Microtiter-96-Well-Platte in folgenden Konzentrationen aufgetragen:

Tabelle 3: Verdünnungsreihe des NO_2^--Standards

Konzentration (µM)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0

Dann wurden die aufgetauten Überstände gevortext und ebenfalls 50 µl auf die 96-Well-Platte aufgetragen, diesmal in Duplikaten. Nun wurde zu jedem Well 50 µl Sulfanilamid-Lösung (1 % Sulfanilamid in 5 %iger Phosphorsäure) zugegeben und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nun wurden 50 µl NED-Lösung (0,1 % NED in Wasser) zugegeben und weitere 10 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Proben im Dynatech Reader (Dynatech Laboratories) photometrisch bei 530 nm vermessen. Die OD-Werte der jeweiligen Proben konnten mit Hilfe der Standardreihe in Microsoft Excel ausgewertet und bestimmten Nitrit-konzentrationen zugeordnet werden.

2.2.5.2 Prostaglandin-E2 (PGE2) ELISA

Das Gewebshormon Prostaglandin E2 (PGE2) wurde mit dem “Enzyme Immunoassay Kit” von Biotrend bestimmt. Die 96-Well Platte des ELISA war mit einem mausspezifischen Ziege-Antikörper beschichtet der spezifische PGE2

Maus-Antikörper bindet. Dieser erkennt die gesamte Menge an freiem PGE2, sowie das eingesetztes PGE2–Konjugat (an alkalische Phosphatase gekoppeltes PGE2), die um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Das zugegebene Substrat wurde von dem Enzym in einen gelben Farbstoff umgewandelt. Die Extinktion der Proben konnte bei 450 nm bestimmt werden. Ein Standard wurde parallel zu den Proben aufgetragen, die Standardkurve mit einem Polynom zweiten Grades angenähert (Microsoft Exel) und die PGE2-Konzentrationen daraus ermittelt. Die PGE2-Konzentration wurde auf das Gewicht der Knorpelstanzen normiert. Die Sensitivität des Kits lag bei 29,1 pg/ml.

2.2.5.3 Interleukin-1ß ELISA

Die Interleukin-1ß (IL-1ß) Konzentration wurde mittels Sandwich-ELISA nach Herstellerangaben der Firma R&D Systems bestimmt. Die ELISA-Platte ist mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für IL-1ß, vorbeschichtet. Nach Probenzugabe bindet nun das Antigen in den Proben an diesen Antikörper. Nach Zugabe eines Enzym-markierten polyklonaler IL-1ß Antikörper wird das zugebene Substrat in einen Farbstoff umgesetzt. Dessen optische Dichte wurde bei 450 nm gemessen und lag proportional zur IL-1ß Konzentration. Die Sensitivität liegt bei <1 pg/ml.

2.2.5.4 TNFα ELISA

Der TNFα ELISA wurde mit einem TNFα ELISA Kit von R&D Systems nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Diesem ELISA liegt die quantitative Sandwich-Methode zugrunde, bei dem ein spezifischer TNFα-Antikörper an der Microtiterplatte gebunden ist und der Überstand mit dem nachzuweisenden Antigen dazugeben wird. Die Farbintensität ist proportional zu der Menge an TNFα und wurde bei 450 nm bestimmt. Die Sensitivität des ELISA liegt bei 1,6 pg/ml.

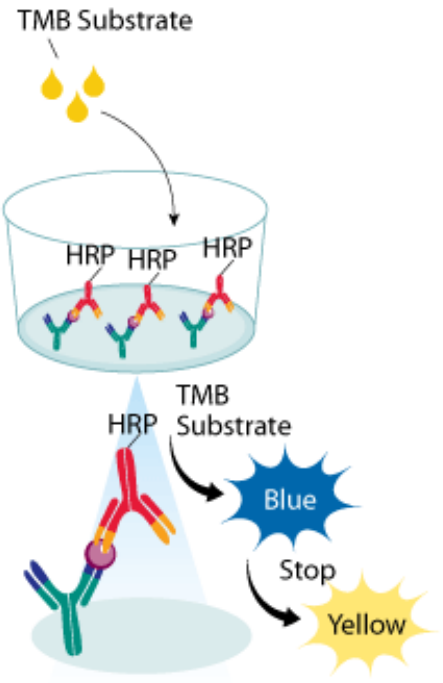


Abb. 10: Schematische Darstellung der Reaktion im ELISA. TMB Substrate, Tetramethylbenzidine Substrat; HRP, Meerettichperoxidase-konjungierter Detektionsantikörper. Modifiziert nach R&D Symstems [100].

2.2.5.5 Cytometric Bead Array (CBA)

Der Cytometric Bead Array (CBA) ist eine durchflusszytometrische Analysemethode, mit der es möglich ist, mehrere Analyte aus einer einzigen Probe gleichzeitig zu quantifizieren. Dem CBA liegt die Sandwich-ELISA Methode zugrunde. Die CBA-Technologie beruht auf der Bestimmung von Partikeln (beads), die sich anhand Ihrer Fluoreszenzintensiät (MFI, mean fluorescent intensity) unterscheiden lassen [84]. An jede dieser Bead-Populationen (Capture Beads) ist ein Antikörper, spezifisch für den zu bestimmenden Analyten, kovalent gebunden (Abb. 11, A). Die MFI eines mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten, spezifischen Zweitantikörpers (Detection Reagent), zeigt die Quantität des Analytes, im Vergleich zu einer Standardkurve mit bekannter Konzentration an (Abb. 11, B). Die Unterscheidung von bis zu 74 verschiedenen Bead-Populationen gelingt anhand der unterschiedlichen MFI (Abb. 11, C) der verwandten Farbstoffe. Es wurden 300 Events pro Beadpopulation gemessen (BD FACSArray (TM) Bioanalyzer, BD Biosciences, USA, CA, San Jose) und mit der dazugehörigen FCAP Array Software analysiert [11,12,84].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine IL-1ß, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 und TNFα, sowie CD178 (FasL) und CCL5 (RANTES) im Überstand mit dem CBA

bestimmt. Die Sensitivität der einzelnen Analyte lag bei IL-1ß, 2,3 pg/ml; IL-6, 1,6 pg/ml; IL-8, 1,2 pg/ml; IL-10, 0,13 pg/ml; TNF-a, 0,7 pg/ml; CD178 (FasL), 2,6 pg/ml; CCL5 (RANTES), 0,002 pg/ml.

Der CBA detektiert sowohl humanes IL-6 und IL-1ß, sowie das extern zugegebene rekombinante humane IL-6 und IL-1ß.

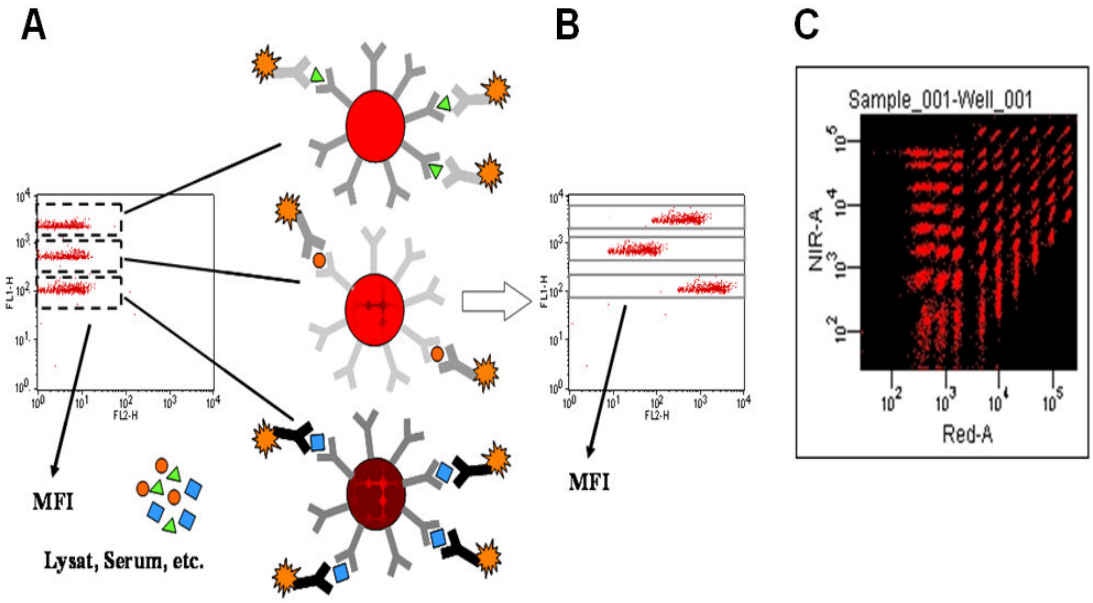


Abb. 11: Die Technik des Cytometric Bead Array. (A) Beadpopulation mit kovalent gebundenen Antikörpern. (B) Quantität des Analyts. (C) Unterscheidung von verschiedenen Beadpopulationen anhand von zwei MFIs. MFI, Fluoreszenzintensität [12].

2.2.6 Statistik

Die aus den Analysen erhaltenen Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism ausgewertet. Die Einzelwerte wurden aufgetragen und der Median berechnet. Von einer Normalverteilung konnte nicht ausgegangen werden. Deshalb wurde ein zweiseitiger, gepaarter exakter Wilcoxon-Test, der für kleine Stichproben empfohlen wird, durchgeführt und die statistische Signifikanz berechnet. In den Abbildungen wurden die Signifikanzniveaus als Sternchen dargestellt (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Die Lineare Regression wurde benutzt um die Korrelation zwischen PTGES und PGE2, sowie iNOS und NO zu überprüfen. Der Korrelationskoeffizient (r) wurde verwendet, um die Größe und Richtung der Korrelation zu bestimmen. Zusätzlich wurde die Signifikanz der Korrelation berechnet. Effekte über 1,5 wurden als tendenzielle Änderung gewertet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Traumatisierung unter gleichzeitiger Stimulation mit Interleukin 6 (IL-6) und dem löslichem IL-6-Rezeptor (sIL-6R) nach 24 h auf humanes Knorpelgewebe untersucht. Das Material wurde aus humanen Kniegelenken gewonnen, die bei totalen Kniegelenkendoprothese-Implantationen entfernt worden waren. Zunächst wurde die Vitalität der Chondrozyten und die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt. Anschließend wurde die Expression von Genen mit der quantitativen PCR (qPCR) analysiert und die Metabolitenfreisetzung im Gewebekulturüberstand gemessen. Besonderen Wert wurde auf degradierende Prozesse der Zellmatrix, den PGE2-Entzündungsweg und den NO-Syntheseweg gelegt. Zusätzlich wurde eine Zytokin-Kombination von IL-6/sIL-6R und Tumornekrosefaktor α (TNFα) im Knorpeltrauma-Modell exemplarisch getestet. IL-1ß wurde als Positivkontrolle mitgeführt, da die proinflammatorische Wirkung von IL-1ß aus Vorarbeiten bekannt war. Insgesamt wurde Gewebe von 18 Spendern ausgewertet.

3.1 Bestimmungen von Zellvitalität und Apoptose

Nach Behandlung und Inkubation der Stanzen wurde das Knorpelgewebe mikroskopisch untersucht. Dabei wurde mit Hilfe der Lebend-Totzellfärbung die Vitalität der Chondrozyten bewertet und in weiteren Assays apoptotische Prozesse untersucht.

3.1.1 Auswertung der Lebend-Totzellfärbung

Um die Vitalität des Knorpels zu bestimmen, wurden die Knorpelstanzen nach 24 h +/- Behandlung angefärbt, mikroskopiert und ausgezählt (2.2.3.1). Ein typisches Beispiel zeigen folgende Bilder eines Spenders.

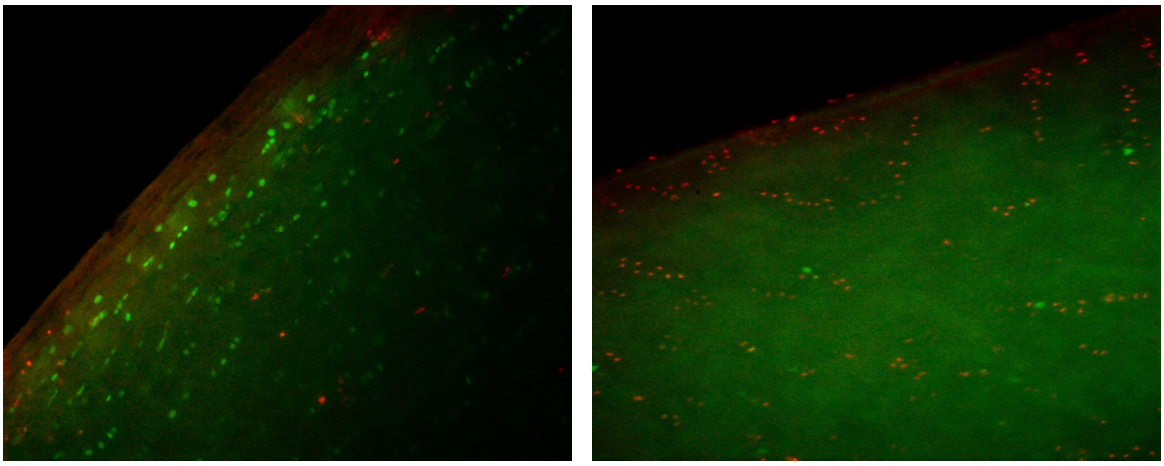


Abb. 12: Lebend-Totzellfärbung. Knorpelstanzen nach 24 h Inkubation. Links, unbehandelte Kontrolle, Knorpeloberfläche; rechts, Knorpelstanze nach Traumatisierung (0,59 J) tiefe Knorpelschicht.

Nach Traumatisierung waren mehr tote Zellen zu erkennen als bei der unbehandelten Stanze. Die Auswertung aller untersuchten Spender ergab die folgende Verteilung.

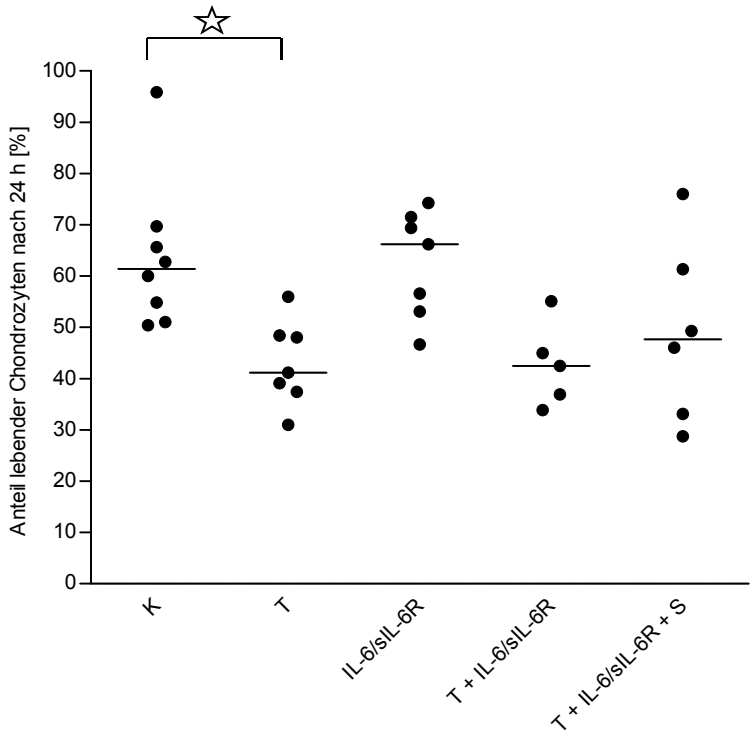


Abb. 13: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf das Überleben von Chondrozyten. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und mit oder ohne IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) inkubiert. SB203580 (1 µM) wurde für die p38MAPK Inhibition verwendet. Die Einzelergebnisse wurden aufgetragen und der Median als Balken dargestellt. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; *, $p < 0,05$.

Wie in Abb. 13 zu sehen, waren im Mittel 61,4 % der Chondrozyten bei der unbehandelten Kontrolle vital. Bei den traumatisierten Stanzen überlebten signifikant (p = 0,0156) weniger Zellen (41,2 %). Die Stanzen, die mit IL-6/sIL-6R alleine stimuliert wurden, lagen im Bereich der Kontrolle (66,2 %). Die Kombination von Traumatisierung und IL-6/sIL-6R Stimulation wies eine Zellüberlebensrate von 42,5 % auf (p = 0,0625). Bei der Zugabe des p38MAPK Inhibitors schwankten die Werte stark. Im Median überlebten 47,7% der Chondrozyten.

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, welchen Einfluss TNFα und die Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R +/- Traumatisierung auf die Zellvitalität hatte. Es wurden vier Spender untersucht und in Abb. 14 graphisch dargestellt.

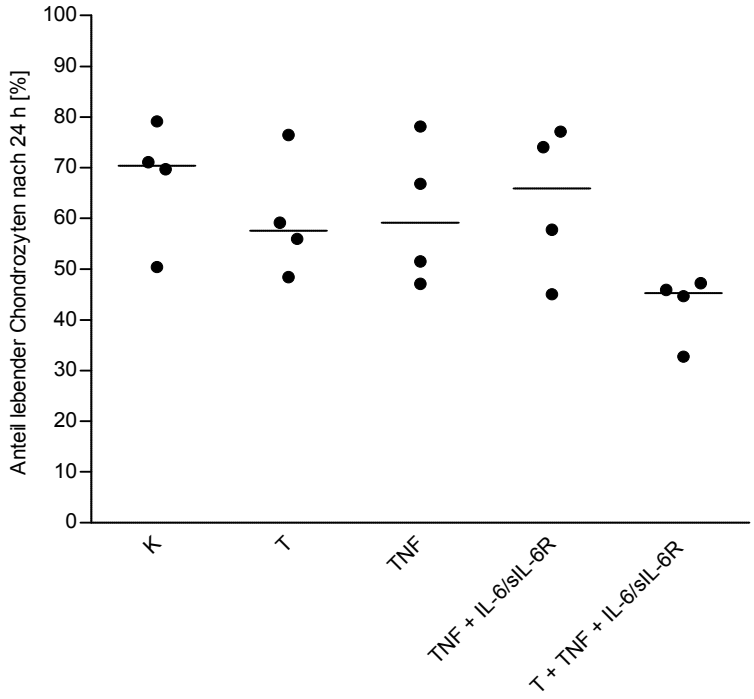


Abb. 14: Effekte von Trauma, TNFα und IL-6/sIL-6R Stimulation nach 24 h auf das Überleben von Chondrozyten. Knorpelstanzen wurden Traumatisiert (0,59 J) und mit oder ohne TNFα (100 ng/ml) und IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) stimuliert. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; TNF, TNFα, IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor.

Wie in Abb. 14 zu sehen ist, zeigten Knorpelstanzen, die mit TNFα alleine stimuliert wurden, im Median 59,2 % vitale Chondrozyten. Durch die Kombination aus TNFα und IL-6/sIL-6R, konnten im Mittel mehr lebende Zellen detektiert

werden. Der Median lag bei 65,9 % lebender Zellen. Die Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R und zusätzlicher Traumatisierung überlebten nur 45,3 % der Chondrozyten.

3.1.2 Auswertung der Apoptose-Assays

Da der apoptotische Zelluntergang im Knorpel durch Trauma verstärkt wird und die Entstehung von Knorpeldegeneration und Arthrose fördert wurden zwei verschiedene Apoptose-Assays durchgeführt.

3.1.2.1 TUNEL-Assay

Mit dem TUNEL-Assay konnten apoptotische Zellen durch Markierung der DNA-Strangbrüche von nicht-apoptotischen Zellen unterschieden werden. Die zuvor gefärbten Schnitte wurden mikroskopiert und ausgezählt. Dabei wurde die Gesamtzellzahl durch eine Propidiumiodid-Färbung (orangerot gefärbte Zellen) ermittelt und die Strangbrüche der apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Enzym leuchtend grün angefärbt. Im Folgenden sind Abbildungen exemplarisch dargestellt.

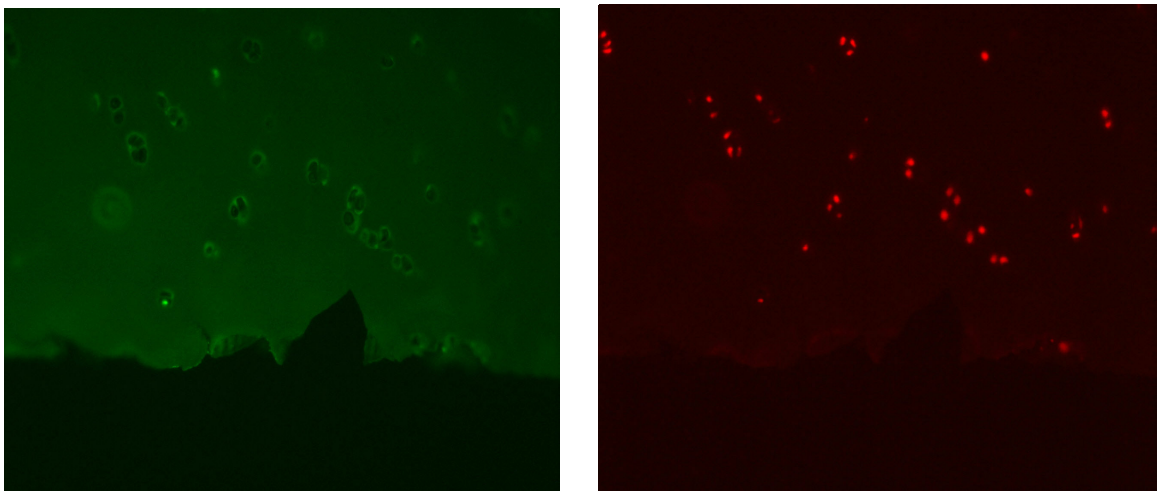


Abb. 15: TUNEL-Assay: Fluoreszenz-Mikroskopie einer unbehandelten Knorpelstanze nach 24 h Inkubation. Links. In der Grün-Fluoreszenz zeigte sich eine TUNEL-positive (leuchtend grüne) Zelle unten links. Rechts. In der Rot-Fluoreszenz sind alle Zellen dargestellt.

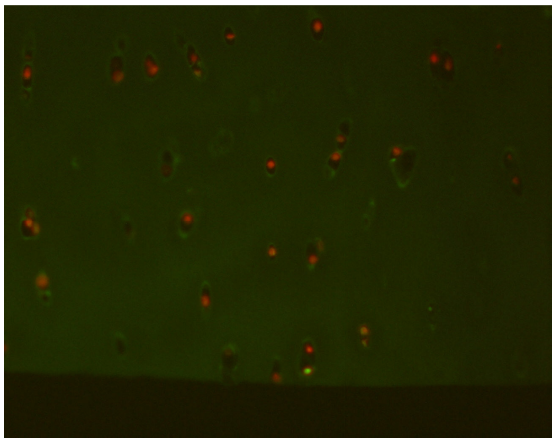


Abb. 16: TUNEL-Assay, Fluoreszenz-Mikroskopie einer IL-6/sIL-6R stimulierten Knorpelstanze nach 24 h Inkubation. In der Überlagerung des roten und grünen Fluoreszenzkanals zeigte sich eine TUNEL-positive Zelle im Bild mittig unten. Die Zellkerne sind rot gefärbt.

Die folgende Darstellung zeigt den prozentualen Anteil TUNEL-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl.

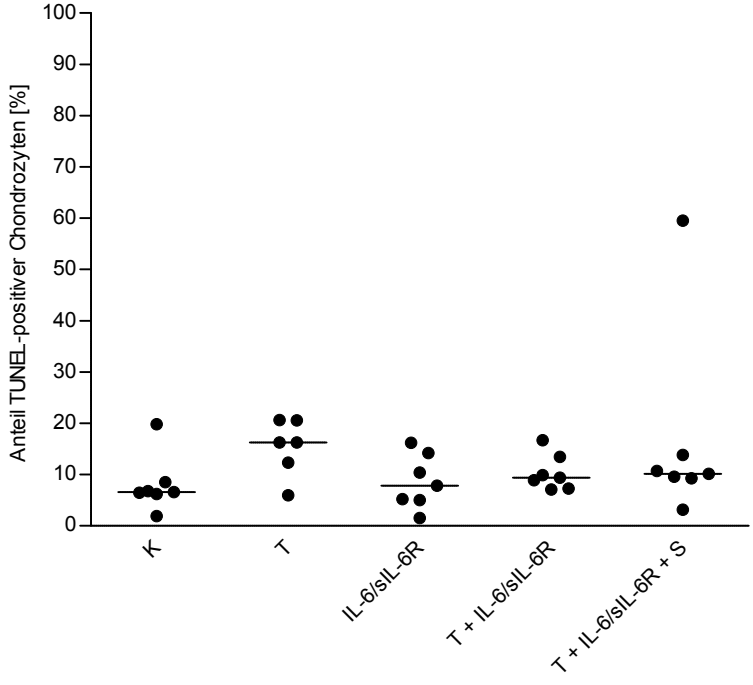


Abb. 17: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h im TUNEL-Assay. Die Knorpelstanzen wurden mit 0,59 J traumatisiert, mit je 50 ng/ml IL-6 und sIL-6R stimuliert bzw. mit 1 µM SB203580 (SB) behandelt. Unbehandelte Stanzen dienten als Kontrolle. Es ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen zur Gesamtzahl aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580.

Im Kontrollansatz waren 6,6 % der Chondrozyten apoptotisch, während nach Traumatisierung die Anzahl apoptotischer Chondrozyten um 59,3 % (Faktor 2,5) auf 16,2 % anstieg. Nach Stimulierung mit IL-6/sIL-6R schwankten die Werte um die Kontrolle (7,8 %). Bei Knorpelstanzen, die zusätzlich zur Traumatisierung mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, kam es zu einer Reduktion TUNEL-positiver Zellen gegenüber Trauma um 51,9 % (Faktor 2,1) und die Anzahl TUNEL-positiver Zellen lag auch im Bereich der Kontrolle (9,4%). Dabei zeigte die Behandlung mit Inhibitor keinen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Inhibitor (10,1%).

3.1.2.2 Aktiver Caspase-3-Assay

Um eine höhere Aussagekraft über den Zelltod der Chondrozyten treffen zu können, wurde noch ein weiterer Assay durchgeführt. Für den Verlauf der Apoptose ist die Aktivierung von Caspasen typisch. Besonders die aktive Caspase-3 spielt als End-Caspase eine Schlüsselrolle im Signalweg, weshalb Caspase-3-aktive Zellen in Knorpelstanzen angefärbt wurden. Nachstehend eine Darstellung der immunhistochemischen Färbung.

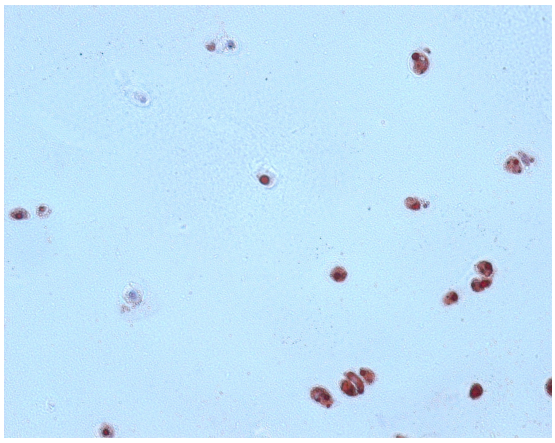


Abb. 18: Immunhistochemische Färbung der aktiven Caspase-3, Knorpelstanze nach 24 h Inkubation. Dunkelrote Chondroyzten sind aktive Caspase-3 positiv, hellblaue Zellen negativ.

Die Auswertung des aktiven-Caspase-3 Assays ergab die folgende Verteilung. Wie in Abb. 19 auf Seite 49 zu sehen, zeigten bei der unbehandelten Kontrolle im Mittel 37,8 % der Chondrozyten eine Caspase-3 Aktivität. Bei den traumatisierten Stanzen war der Anteil geringer und lag bei 21 % Caspase-3 aktiver Zellen. Die

Stanzen, die mit IL-6/sIL-6R alleine stimuliert wurden, lagen bei 11,3 %. Die Kombination von Traumatisierung und IL-6/sIL-6R Stimulation zeigten Werte im Bereich der Kontrolle (35,1 %), wobei die Werte stark schwankten. Bei der Zugabe des p38MAPK Inhibitors zeigten drei Spender im Mittel nur 0,3 % Caspase-3 aktive Zellen, während ein einziger Spender eine erhöhte Caspase-3-Aktivität (49,5 %) in diesem Ansatz aufwies.

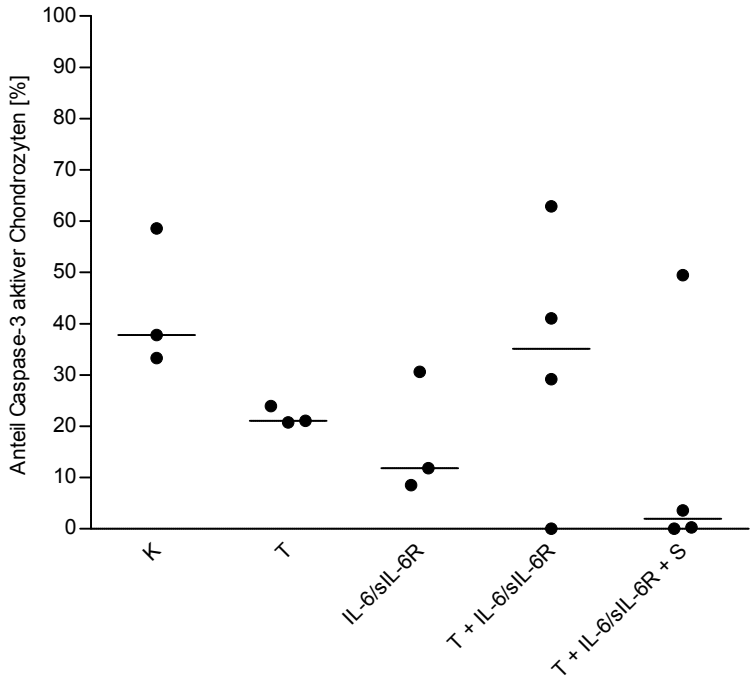


Abb. 19: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die Aktivierung von Caspase-3. Die Knorpelstanzen wurden mit 0,59 J traumatisiert, mit je 50 ng/ml IL-6 und sIL-6R stimuliert bzw. mit 1 µM SB203580 (SB) behandelt. Unbehandelte Stanzen dienten als Kontrolle. Es ist der prozentuale Anteil Caspase-3 aktiver Zellen zur Gesamtzellzahl aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580.

3.2 Einfluss auf die Genexpression und Metaboliten-Freisetzung

Es wurde der Einfluss der Traumatisierung und Zytokin-Stimulation nach 24 h auf die Genexpression und die Freisetzung von Metaboliten der Chondrozyten untersucht.

3.2.1 Einfluss auf degradierende Prozesse der Zellmatrix

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen eine besondere Rolle bei degradierenden Prozessen der Zellmatrix. Um zu überprüfen in wie weit posttraumatische Entzündungsprozesse (Traumatisierung und Stimulation der Stanzen) diese Gene auf- oder abregulieren, wurde die Expression von MMP1 und MMP13, denen eine besondere Rolle in der Entstehung von Kniegelenksarthrose zugeschrieben wird, untersucht.

3.2.1.1 Genexpression von MMP1

Es wurde die Genexpression von MMP1 bei 13 Spendern mittels qPCR untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 20 dargestellt.

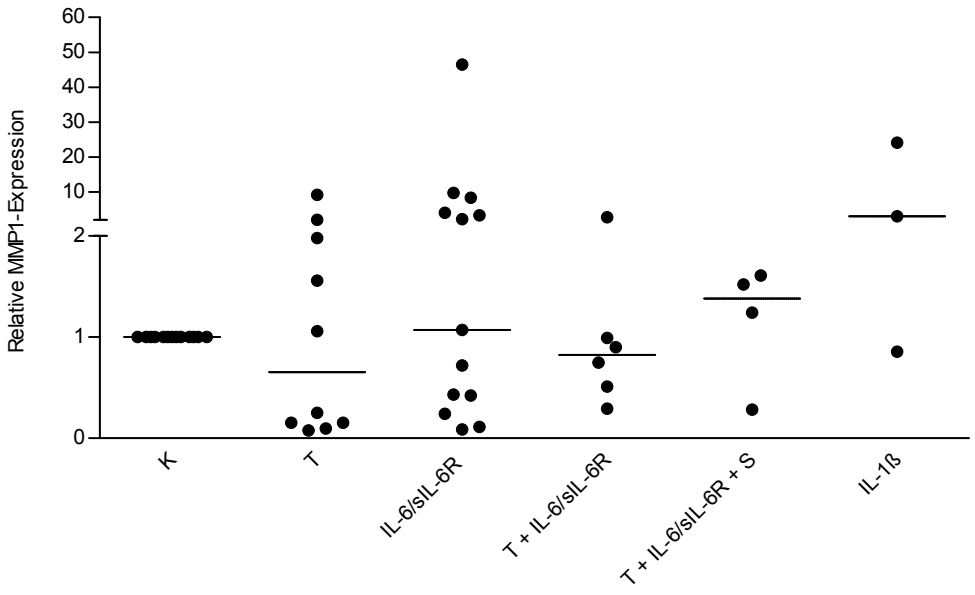


Abb. 20: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die MMP1-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) oder IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, verringerte die Traumatisierung die MMP1-Expression im Mittel um das 1,5-Fache. Weder die Stimulation mit IL-6/sIL-6R

noch die Kombination aus IL-6/sIL-6R und Trauma zeigten einen signifikanten Einfluss auf die MMP1-Expression. Allerdings zeigten die verschiedenen Spender unterschiedliche Reaktionen auf die alleinige Stimulation mit IL-6/sIL-6R. Sechs Spender zeigten eine deutlich verstärkte MMP1-Genexpression um den Faktor 6,2, während andere Spender (n=6) eine Abnahme der MMP1-Genexpression aufwiesen. Die Zugabe des p38MAPK Inhibitors ließ keinen hemmenden Effekt erkennen, während 10 ng/ml IL-1ß die Expression von MMP1 im Mittel um den Faktor 3 erhöhte.

3.2.1.2 Genexpression von MMP13

Die Effekte der Traumatisierung und Stimulation der Knorpelexplantate auf die MMP13-Expression zeigt die Abb. 21.

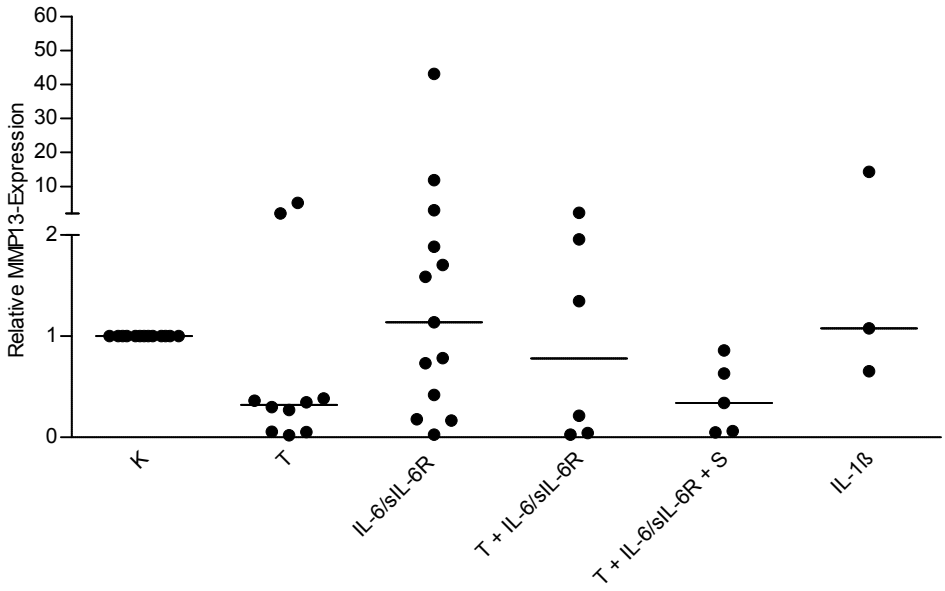


Abb. 21: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die MMP13-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) oder IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß.

Es zeigte sich eine Verringerung der Genexpression von MMP13 nach Traumatisierung (Faktor 3,1), die stärker ausfiel als bei MMP1. Die Zugabe von IL-

6/sIL-6R mit (Faktor 0,8) und ohne (Faktor 1,1) Traumatisierung zeigten keine Effekte, die Ergebnisse waren im Bereich der Kontrolle. Allerdings zeigten die verschiedenen Spender ebenfalls wie bei MMP1 unterschiedliche Reaktionen auf IL-6/sIL-6R. Sechs Spender zeigten eine deutlich verstärkte MMP13-Genexpression um den Faktor 2,4, während andere Spender (n=6) mit einer Abnahme der MMP13-Genexpression reagierten. Interessanterweise waren diese „High"-Responder auf IL-6/sIL-6R bis auf einen Spender identisch mit denen, die ebenfalls nach IL-6/sIL-6R Stimulation mit einer erhöhten MMP1-Expression reagierten. Durch Traumatisierung und IL-6/sIL-6R Stimulation kam es im Vergleich zu Trauma alleine zu einer leicht erhöhten MMP13-Expression. Durch Zugabe des p38MAPK-Inhibitor SB203580 zur traumatisierten und mit IL-6/sIL-6R stimulierten Stanze, zeigte sich eine Verringerung der MMP13-Expression im Vergleich zum Ansatz ohne Inhibitor. Und die Expressionswerte von MMP13 zeigten im Median Werte wie bei Trauma alleine, Verringerung der Expression um den Faktor 2,9. Bei den mit IL-1ß stimulierten Knorpelstanzen zeigte sich nur bei einem von drei Spendern eine Tendenz zur Expressionserhöhung von MMP13.

3.2.2 Einfluss auf den PGE2-Syntheseweg

Das Enzym COX2, auch Prostaglandin-Synthase-2 (PTGS2) genannt, synthetisiert aus Arachidonsäure Prostaglandin H2 (PGH2). Aus PGH2 wird durch die Prostaglandin-E-Synthase (PTGES) das Produkt PGE2 hergestellt. Da COX2 und PTGES in entzündlichen Prozessen im Knorpelgewebe eine Rolle spielen, wurde die Expression dieser Gene bestimmt. Gleichzeit wurde die Produktion von PGE2 im Zellüberstand gemessen.

3.2.2.1 Genexpression von COX2

In Abb. 22 auf Seite 53 ist die Änderung der COX2-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

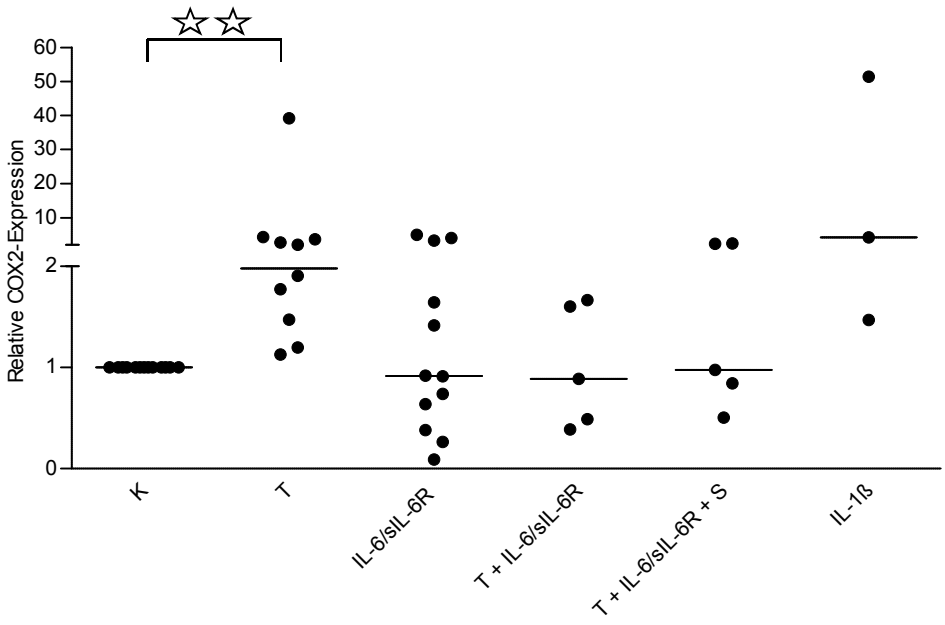


Abb. 22: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die COX2-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß. **, $p < 0,01$.

Es zeigte sich, dass Trauma einen signifikanten Anstieg ($p = 0,002$) um zwei und die Stimulation mit IL-1ß eine Erhöhung der COX2-Expression um den Faktor 4,2 bewirkten. Bei den Behandlungen mit IL-6R/sIL-6R ohne Trauma war im Mittel eine relative Genexpression im Bereich der Kontrolle zu erkennen. Allerdings zeigten vier Spender im Fall der IL-6 Stimulation ohne Trauma eine verstärkte COX2-Genexpression um den Faktor 3,7. Bei Knorpelstanzen, die zusätzlich zur Traumatisierung mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, kam es zu einer Reduktion der COX2-Expression gegenüber Trauma um 48,6 % und die COX2-Expression lag im Bereich der Kontrolle. Die Zugabe des Inhibitors zeigte keinen Einfluss auf die COX2-Expression.

Der Einfluss von TNFα auf traumatisierte und IL-6/sIL-6R-stimulierte Stanzen wurde exemplarisch bei drei Spendern untersucht und ist in Abb. 23 dargestellt. Die Stimulation der Knorpelexplantate mit TNFα erhöhte die COX2-Genexpression und der mittlere Wert zeigte eine relative COX2-Expression von 7,1 im Vergleich zur Kontrollstanze. Durch die Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R kam es ebenfalls zu einer 4,6-fachen Erhöhung der COX2-Genexpression. Nach Traumatisierung und Behandlung mit TNFα und IL-6/sIL-6R stellte sich im Mittel eine relative COX2-Expression von 8,3 im Vergleich zur Kontrolle ein.

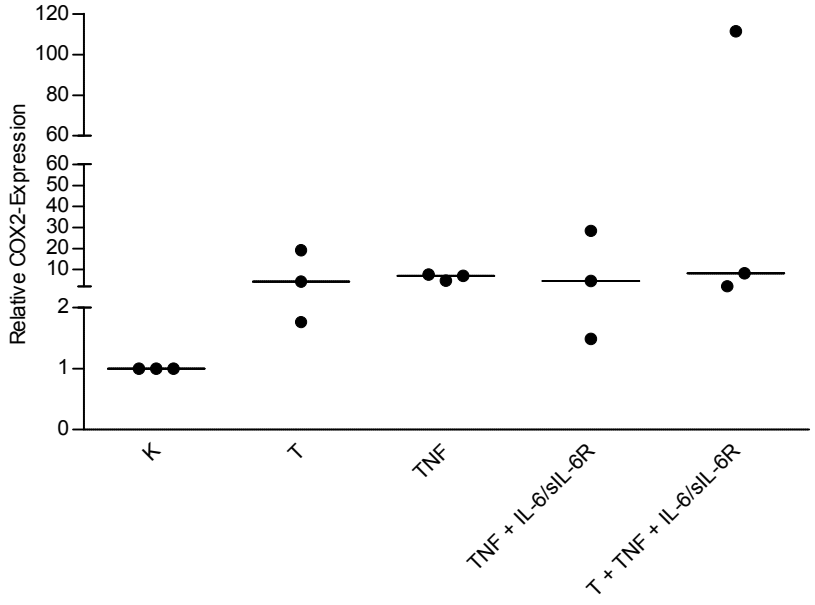


Abb. 23: Effekte von Trauma, TNFα und IL-6/sIL-6R Stimulation nach 24 h auf die COX2-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit TNFα (100 ng/ml) und IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) stimuliert. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; TNF, TNFα, IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor.

3.2.2.2 Genexpression von PTGES

Wie in Abb. 24 zu sehen, wurde die Genexpression von PTGES untersucht.

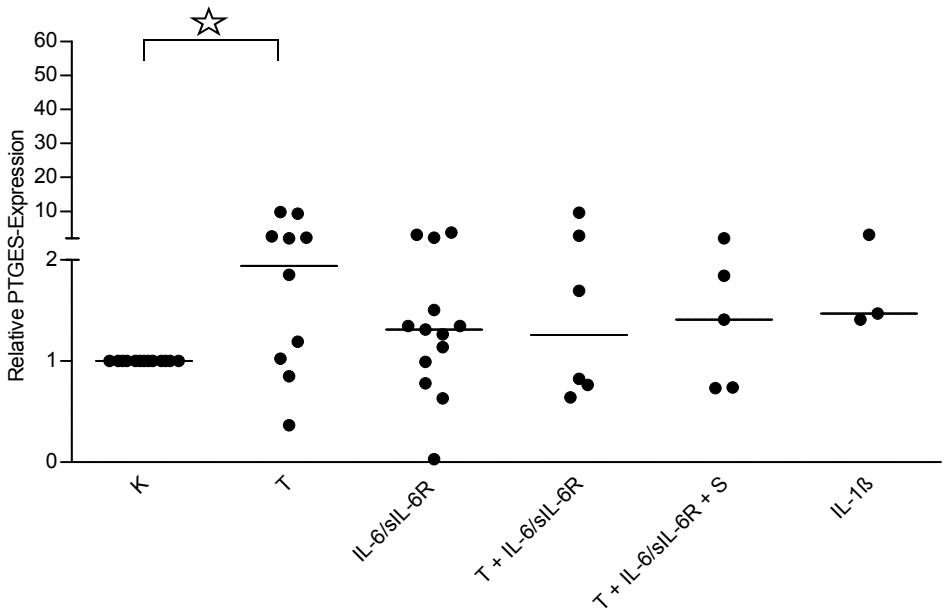


Abb. 24: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die PTGES-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß; *, $p < 0,05$.

Nach Traumatisierung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der PTGES-Expression um 1,9 ($p = 0,0273$). Bei Knorpelstanzen, die zusätzlich zur Traumatisierung mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, kam es zu einer Reduktion der PTGES-Expression gegenüber Trauma um 35,1 % und die PTGES-Expression lag im Bereich der Kontrolle. Dabei zeigte die Behandlung mit Inhibitor keinen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Inhibitor. Die IL-1ß Stimulation zeigte eine 1,5-fache Erhöhung der PTGES-Expression.

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, welchen Einfluss TNFα und die Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R +/- Traumatisierung auf die PTGES-Expression hatte. Die Daten wurden in Abb. 25 graphisch dargestellt.

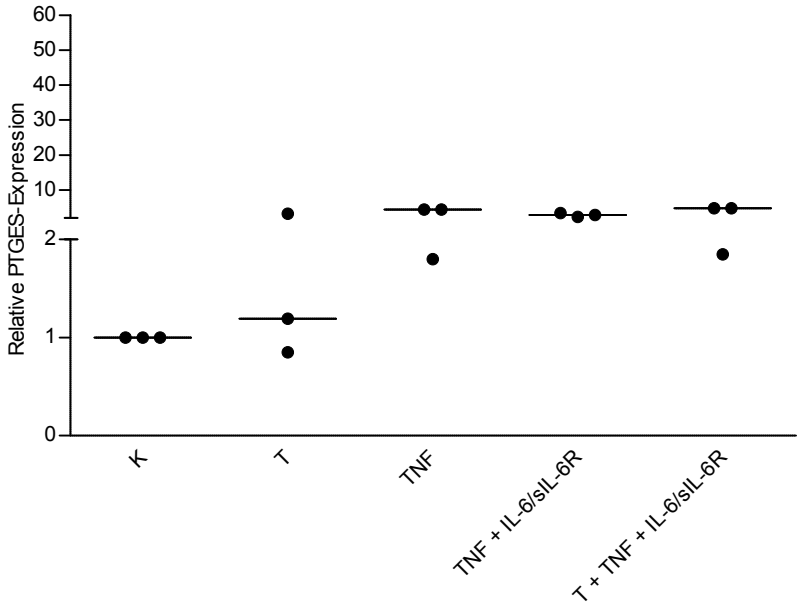


Abb. 25: **Effekte von Trauma, TNFα und IL-6/sIL-6R Stimulation nach 24 h auf die PTGES-Expression.** Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit TNFα (100 ng/ml) und IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) stimuliert. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; TNF, TNFα, IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor.

Die Stimulation der Knorpelexplantate mit TNFα führte zu einer Genexpressionserhöhung von PTGES und der mittlere Wert zeigte eine relative PTGES-Expression von 4,4 im Vergleich zur Kontrollstanze. Durch die Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R kam es auch zu einer 2,9-fachen Erhöhung der PTGES-Expression. Nach Traumatisierung und Behandlung mit TNFα und IL-6/sIL-6R zeigte sich im Mittel eine relative PTGES-Expression von 4,8 im Vergleich zur Kontrolle. Wie bei der Geneexpressionsanalyse über COX2 zeigte sich keine Summation der Effekte ein.

3.2.2.3 Bestimmung von Prostaglandin-E2 (PGE2) im Überstand

Die Menge von PGE2 im Gewebekulturüberstand wurde mittels ELISA-Technik bestimmt und in Abb. 26 auf Seite 57 graphisch dargestellt.

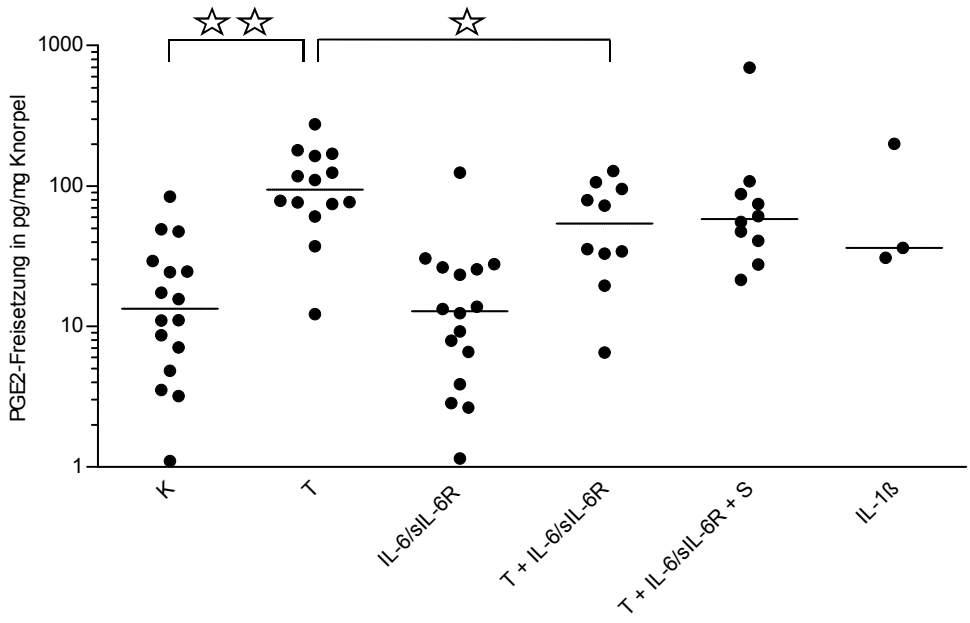


Abb. 26: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die PGE2-Freisetzung im Zellüberstand. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. Ein Wert wurde zur besseren Darstellung von 0 auf 1,1 editiert. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Nach Traumatisierung sah man eine 7,1-fache signifikante Steigerung der PGE2-Konzentration von 13,4 auf 94,3 pg/mg Knorpel ($p = 0,0039$). Die Stanzen, die mit IL-6/sIL-6R alleine stimuliert wurden, zeigten keine Änderung der PGE2–Konzentration. Exemplarisch wurden höhere Konzentrationen von IL-6/sIL-6R zu je 100 µl, sowie 500 µl eingesetzt (Daten nicht dargestellt). Die PGE2–Werte lagen jedoch im Bereich der Kontrolle, unabhängig davon, in welcher Konzentrationen IL-6/sIL-6R zugegeben wurde. Im Gegensatz hierzu kam es bei der Zugabe von IL-1ß zu einer Zunahme um das 2,7-Fache auf 36,4 pg/mg Knorpel. Bei Knorpelstanzen, die zusätzlich zur Traumatisierung mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, kam es zu einer signifikanten Reduktion der PGE2-Konzentration gegenüber Trauma um 42,7 %, auf 54 pg/ml Knorpel und damit nur noch zu einer Vervierfachung der PGE2-Menge im Überstand ($p = 0,0391$). Dabei zeigte die Behandlung mit Inhibitor keinen signifikanten Unterschied zu dem Ansatz ohne Inhibitor.

Der Einfluss von TNFα und die Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R +/-

Traumatisierung auf die PGE2-Freisetzung im Überstand wurde in Abb. 27 graphisch dargestellt.

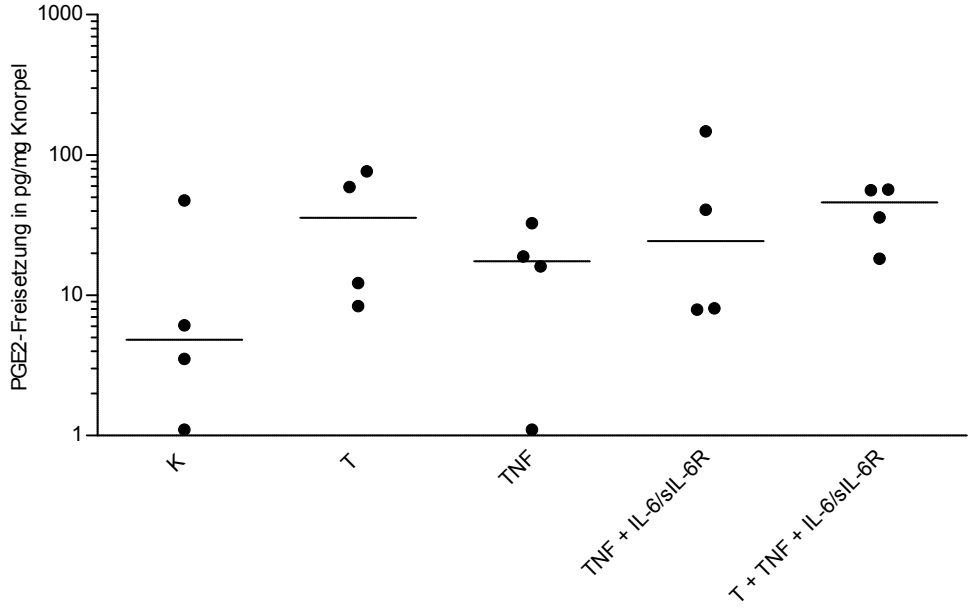


Abb. 27: Effekte von Trauma, TNFα und IL-6/sIL-6R Stimulation nach 24 h auf die PGE2-Freisetzung im Zellüberstand. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit TNFα (100 ng/ml) und IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) stimuliert. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. Zwei Werte wurden zur besseren Darstellung von K, 0,1 und TNFα, 0,2 auf 1,1 editiert. K, Kontrolle; T, Trauma; TNF, TNFα, IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor.

Die Behandlung der Stanzen mit TNFα erhöhte die PGE2-Konzentration um den Faktor 3,6 im Vergleich zur Kontrolle von 4,8 auf 17,5 pg/mg Knorpel. Bei Knorpelstanzen, die mit TNFα und IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, kam es auch zu einer Erhöhung der PGE2-Konzentration, um den Faktor 5,1 im Mittel auf 24,4 pg/mg Knorpel. Nach Traumatisierung und Behandlung mit TNFα und IL-6/sIL-6R zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine 9,6-Fache Erhöhung der PGE2-Menge im Überstand von 4,8 auf 46 ng/mg Knorpel. Hier stellte sich im Mittel ein additiver Effekt ein.

Mit Hilfe von GraphPad Prism wurde durch Lineare Regression die Korrelation zwischen der PTGES-Expression und der PGE2-Freisetzung im Überstand ermittelt. Der Korrelationskoeffizient (r) bei n = 65 betrug r = 0,1928 und zeigte keinen signifikanten Zusammenhang.

3.2.2.4 Promotor Variante des COX2-Gen (-765 G → C) Polymorphismus

In der Studie von Schneider et al. 2011 wurde gezeigt, dass der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) 765 G → C (rs20417) des COX2-Gen-Promotors mit einem geringeren Risiko einer Arthroseerkrankung einhergeht. Andererseits wurde festgestellt, dass Chondrozytenkulturen von Spendern mit dem Genotyp G/G bei einer Stimulation mit IL-1ß teilweise eine sehr hohe COX2-Genexpression aufwiesen, was bei Spendern des Genotyps G/C nicht in diesem Ausmaß zu beobachten war (n=6) [112]. Parallel zu den übrigen Analysen wurden daher deskriptiv bei zehn Spendern der vorliegenden Arbeit auf den SNP 765 G → C (rs20417) des COX2-Gen-Promotors mittels Restriktionsverdau untersucht und die Frage geprüft, ob nach Traumatisierung Unterschiede in der Genexpression von COX2 und PTGES, sowie in der Freisetzung von PGE2, IL-1ß und IL-6 nachweisbar sind. Wie die Aufstellung der Einzelwerte in Tabelle 4 zeigt, fand sich bei traumatisierten Stanzen mit dem Genotyp G/G im Median eine minimal höhere IL-1ß Freisetzung als bei traumatisierten Stanzen mit dem Genotyp C/C.

Tabelle 4: SNP 765 G → C (rs20417) des COX2-Gen-Promotors

Genotyp	Genexpression		Freisetzung im Überstand		
	COX2 (RQ)	PTGES (RQ)	PGE2 (pg/mg Knorpel)	IL-1ß (pg/g Knorpel)	IL-6 (pg/g Knorpel)
C/C	39,1	9,3	275,1	35,8	211,3
	1,2	0,4	37,2	36,2	678,4
Median	***20,2***	***4,9***	***156,2***	***36,0***	***444,9***
C/G	n.d.	n.d.	n.d.	0	2019,2
	3,6	1,2	117,6	n.d.	n.d.
	4,3	0,9	76,4	n.d.	n.d.
Median	***4,0***	***1,0***	***97,0***	***0,0***	***2019,2***
G/G	2,1	2,3	124,3	48,1	102,1
	n.d.	n.d.	110,2	41,1	124,7
	n.d.	n.d.	76,6	40,6	2168,4
	n.d.	n.d.	74,5	0	n.d.
Mittelwerte	***2,1***	***2,3***	***93,4***	***40,8***	***124,7***

SNP; Einzelnukleotid-Polymorphismus; COX2, Cyclooxygenase-2; PTGES, Prostaglandin-E-Synthase; PGE2, Prostaglandin-E2; IL-1ß, Interleukin-1ß; IL-6, Interleukin-6; n.d., nicht durchgeführt, RQ, relative Quantifizierung.

Aufgrund großer Schwankung der Einzelwerte und der kleinen Fallzahl, zeigte die vorliegende Untersuchung offensichtlich keinen großen Einfluss der verschiedenen Genotypen auf die Inflammation nach Trauma.

3.2.3 Einfluss auf den NO-Syntheseweg

Bei der Entstehung von Arthrose fungiert NO als Entzündungsmediator. Um zu überprüfen welchen Einfluss die Traumatisierung und Zytokin-Stimulierung auf den NO-Metabolismus des Knorpelgewebes hat, wurde die Genexpression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) untersucht und die NO-Produktion im Überstand ermittelt.

3.2.3.1 Genexpression von iNOS

Die Ergebnisse über die iNOS-Expression wurden in Abb. 28 dargestellt.

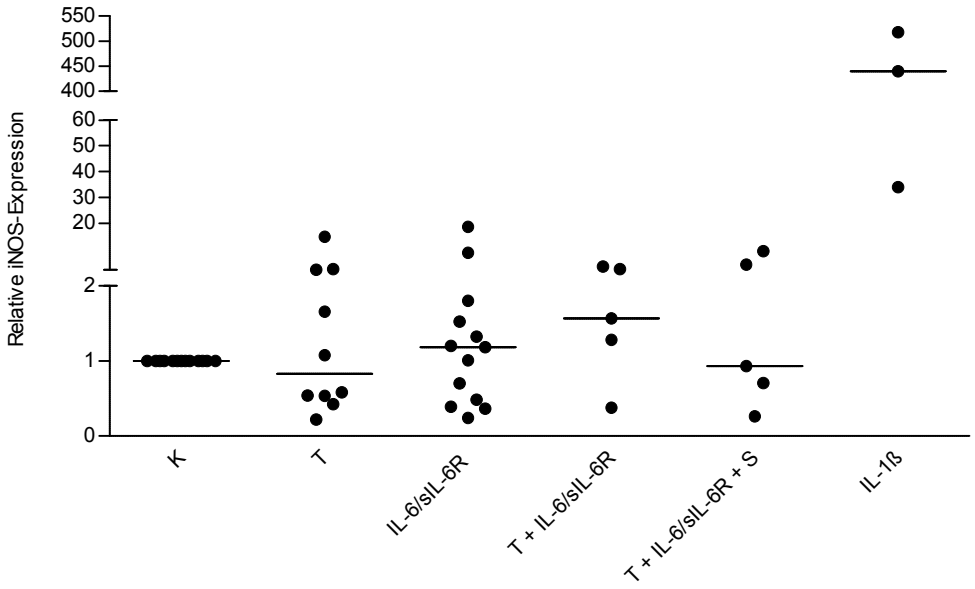


Abb. 28: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die iNOS-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) oder IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß.

Es zeigt sich eine sehr starke Aufregulation der iNOS-Genexpression nach IL-1ß Stimulation über 24 h (Faktor 440). Dagegen bewirkte Trauma und/oder Stimulation mit IL-6/sIL-6R keine nennenswerte Erhöhung der iNOS-Expression. Die Werte schwankten um die Kontrolle. Die Inhibition zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression der iNOS.

In weiteren Analysen wurde geprüft, welchen Einfluss TNFα und die Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R +/- Traumatisierung auf die iNOS-Expression hatte (siehe Abb. 29).

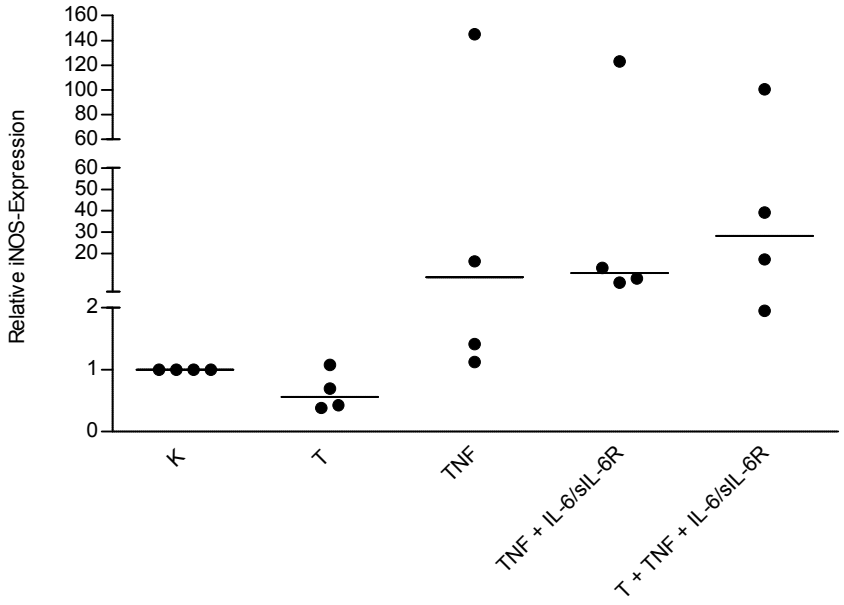


Abb. 29: Effekte von Trauma, TNFα und IL-6/sIL-6R Stimulation nach 24 h auf die iNOS-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit TNFα (100 ng/ml) und IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) stimuliert. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Expressionslevel wurden auf 18S rRNA normalisiert und relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; TNF, TNFα, IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor.

Die Stimulation der Knorpelexplantate mit TNFα erhöhte die iNOS-Genexpression 8,9 Fach im Vergleich zur Kontrollstanze. Durch die Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R kam es auch zu einer 10,8-fachen Erhöhung von iNOS. Nach Traumatisierung und Behandlung mit TNFα und IL-6/sIL-6R stellte sich im Mittel eine relative iNOS-Expression von 28,1 im Vergleich zur Kontrolle ein.

3.2.3.2 Bestimmung von NO im Überstand

Um die Daten der iNOS-Genepression explorativ zu überprüfen, wurde der Gehalt an Nitrit im Überstand gemessen. Dieser liegt proportional zur NO-Konzentration. Die folgenden Darstellungen zeigen den Nitritgehalt in µM pro g Knorpel.

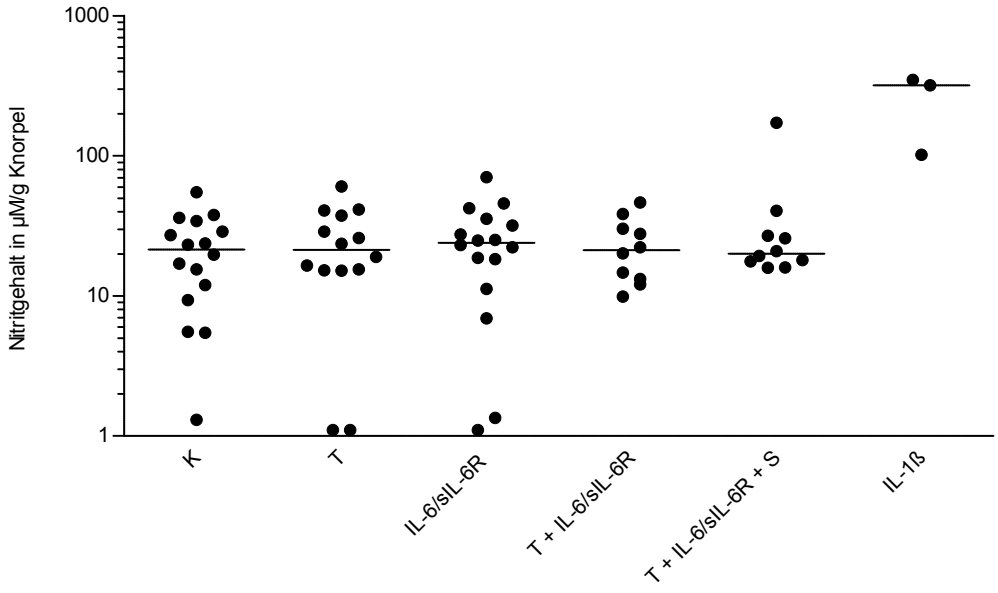


Abb. 30: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die Nitrit-Freisetzung. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) oder IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. Drei negative Werte wurden zur besseren Darstellung auf den Wert 1,1 editiert. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß.

Die NO-Freisetzung nach Traumatisierung und/oder Behandlung mit IL-6/sIL-6R (24 h) zeigte keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz hierzu kam es bei der Zugabe von IL-1ß zu einer Zunahme der NO-Freisetzung um das 14,8-Fache von 21,5 auf 317,6 µM/g Knorpel. Dies korreliert mit den Daten über die iNOS-Expression. Exemplarisch wurden höhere Konzentrationen von IL-6/sIL-6R zu je 100µl, sowie 500µl eingesetzt. Die Behandlung zeigte mit steigender IL-6/sIL-6R-Konzentration dosisabhängig eine Erniedrigung der Nitritfreisetzung (Daten im Anhang).

In weiteren Untersuchungen wurde geprüft, welchen Einfluss TNFα und die

Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R +/- Traumatisierung auf die Freisetzung von NO hatte. Die Daten wurden in Abb. 31 graphisch dargestellt.

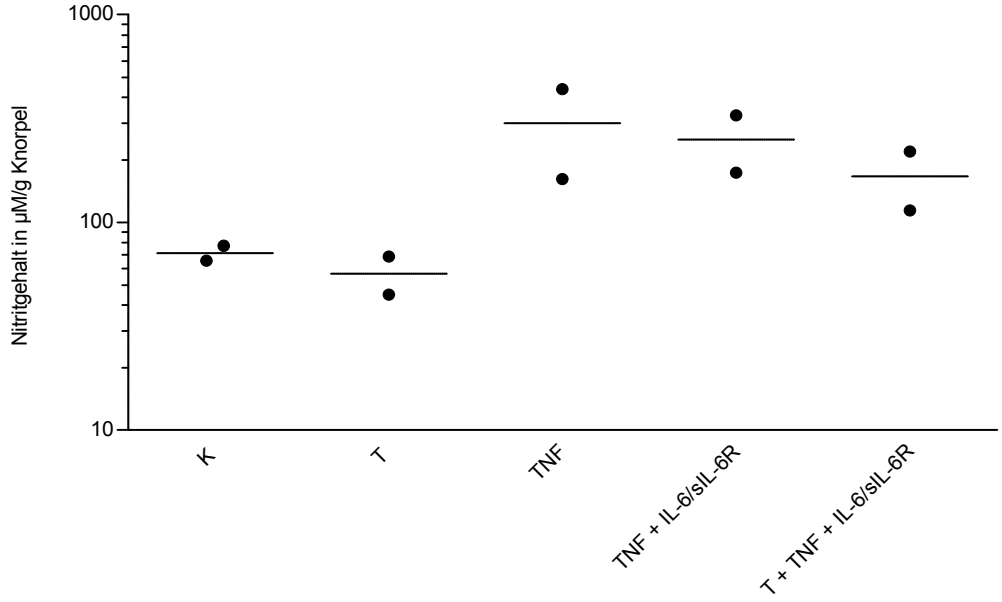


Abb. 31: Effekte von Trauma, TNFα und IL-6/sIL-6R Stimulation nach 24 h auf die NO-Freisetzung. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit TNFα (100 ng/ml) und IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) stimuliert. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; TNF, TNFα, IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor.

Nach 24 h Behandlung der Knorpelstanzen mit TNFα zeigte sich eine Erhöhung der Nitritfreisetzung um den Faktor 4,2. Die Kombination von TNFα und IL-6/sIL-6R zeigte keinen wesentlichen Unterschied im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit TNFα (Faktor 3,5). Jedoch ließ sich dieser Effekt durch Traumatisierung und Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R abschwächen. Der Nitritgehalt sank nach Traumatisierung und Behandlung mit TNFα und IL-6/sIL-6-R im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit TNFα im Mittel um 44,3 % und es ergab sich nur eine Erhöhung des Nitritgehalts um den Faktor 2,3.

Mit Hilfe von GraphPad Prism wurde durch Lineare Regression die Korrelation zwischen der iNOS-Expression und NO-Freisetzung im Überstand ermittelt. Der Korrelationskoeffizient (r) bei n = 58 betrug r = 0,9081 und zeigte einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,0001$).

3.2.4 Genexpression von Superperoxid-Dismutase-2 (SOD2)

Die bisherigen Genexpressions-Analysen zeigten, dass die Stimulation mit IL-6/sIL-6R in der Entstehung der posttraumatischen Arthrose (PTA) keine entscheidende proinflammatorische Rolle spielt. Inwieweit IL-6/sIL-6R an der Induktion von Reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist, sollte durch die Untersuchung der SOD2-Genexpression geklärt werden.

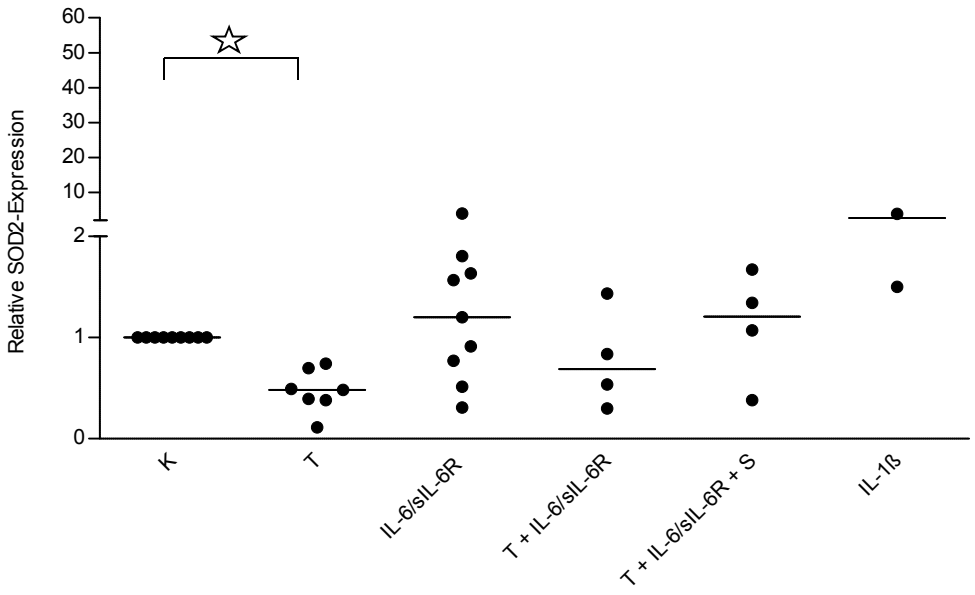


Abb. 32: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf SOD2-Expression. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde für die p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß; *, $p < 0,05$.

Abbildung 32 zeigt den Einfluss der Behandlungen auf die SOD2-Genexpression. Die Stimulation mit IL-6/sIL-6R hat keinen Einfluss auf die SOD2-Genexpression, während sie durch Trauma im Vergleich zur Kontrolle signifikant ($p = 0,0156$) abreguliert wird (Faktor 2,3). IL-1ß erhöht die relative SOD2-Genexpression um den Faktor 2,7.

3.2.5 Proinflammatorische Zytokine im Überstand

Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine, IL-1ß, IL-6, IL-8 und TNFα, wurde im Gewebekulturüberstand mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Technologie bestimmt. In den nachstehenden Abbildungen sind die Ergebnisse dargestellt.

3.2.5.1 Freisetzung von IL-1ß

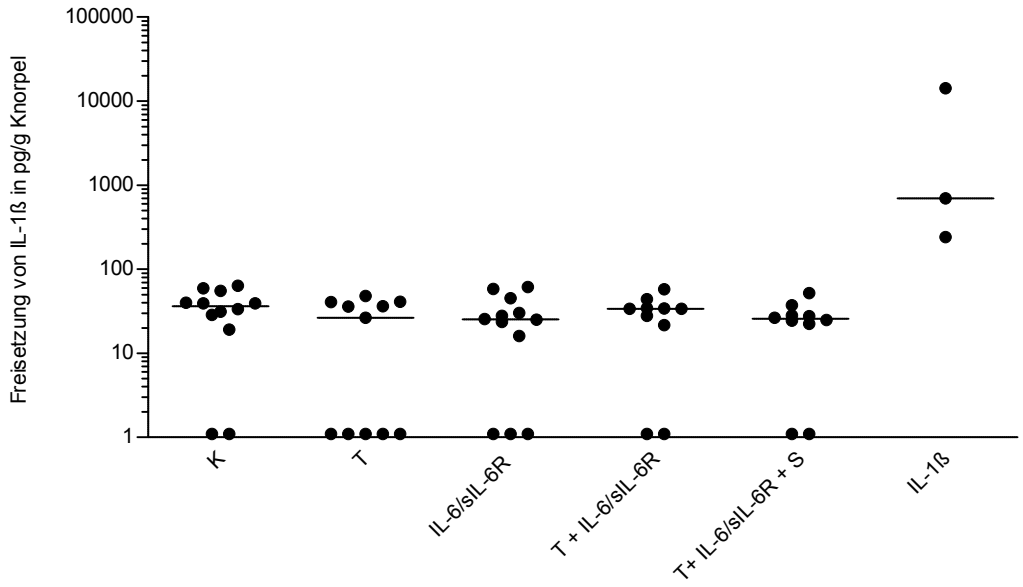


Abb. 33: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die Freisetzung von IL-1ß. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. Vierzehn Werte wurden zur besseren Darstellung von 0 auf den Wert 1,1 editiert. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß.

Nach Traumatisierung +/- IL-6/sIL-6R Stimulation +/- Inhibitor sah man keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Die Freisetzung von IL-1ß im Gewebekulturüberstand wurde bei drei Spendern auch mittels ELISA-Technologie gemessen. (Daten im Anhang).

3.2.5.2 Freisetzung von IL-6

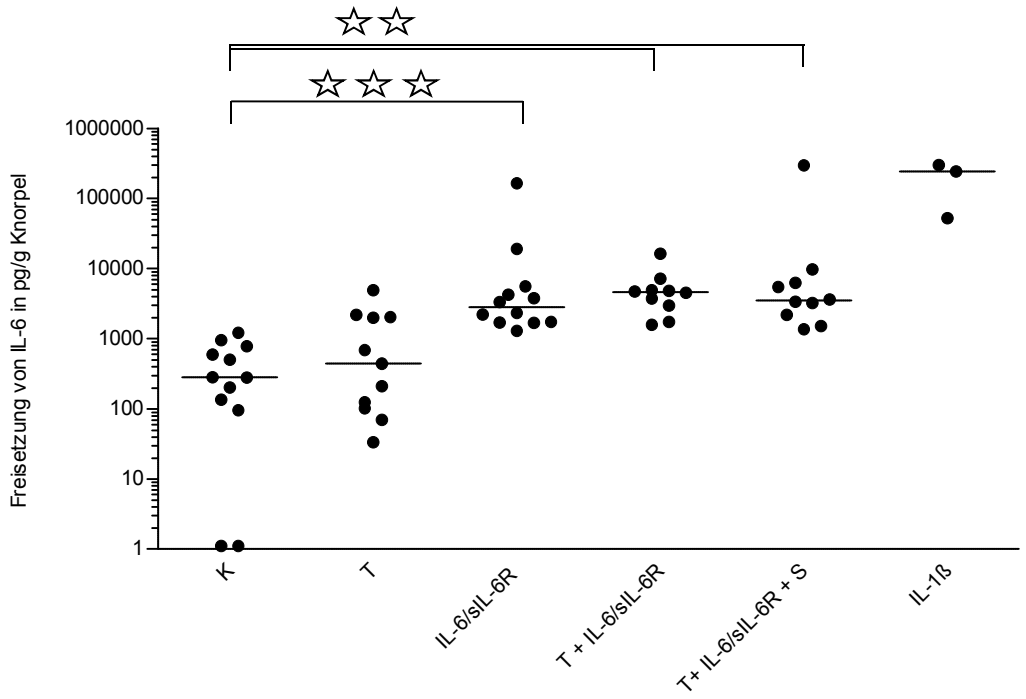


Abb. 34: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die Freisetzung von IL-6. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. Zwei Werte wurden zur besseren Darstellung von 0 auf den Wert 1,1 editiert. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Nach Traumatisierung sah man eine 1,6-fache Steigerung der IL-6 Konzentration von 282,2 auf 441,1 pg/g Knorpel. Bei Knorpelstanzen, die zusätzlich zur Traumatisierung mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, ergab sich die gleiche Konzentrationserhöhung in Bezug auf Knorpelstanzen mit IL-6/sIL-6R ohne Trauma um den Faktor 1,6 von 2.812,9 auf 4.592,4 pg/g Knorpel. Die Behandlung mit Inhibitor ergab eine IL-6 Konzentration von 3.481,6 pg/g Knorpel und damit eine 24 % Verringerung der IL-6 Konzentration im Vergleich zu dem Ansatz ohne Inhibitor. Bei den mit IL-1ß stimulierten Knorpelstanzen zeigte sich eine 861-fache Erhöhung der IL-6 Konzentration im Vergleich zur unbehandelten Stanze und eine 86,3–fache Erhöhung der IL-6 Konzentration im Vergleich zur externen IL-6 Zugabe. Der mittlere Wert nach IL-1ß Zugabe betrug eine IL-6 Konzentration von 242.881,5 pg/g Knorpel. Der CBA erkennt humanes, sowie humanes rekombinantes IL-6. Der lösliche IL-6 Rezeptor (sIL-6R) beeinflusst die Messung nicht. Die extern zugegebene Menge an rekombinanten humanen IL-6 (50 ng/ml)

ergab im CBA wie erwartet einen signifikanten Anstieg (p = 0,0008) von IL-6 in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen. Die extern zugegebene Menge an rekombinanten humanen IL-6 (50 ng/ml) war auch in den anderen Ansätzen (siehe Abb. 34) signifikant nachweisbar (p = 0,0039).

3.2.5.3 Freisetzung von IL-8

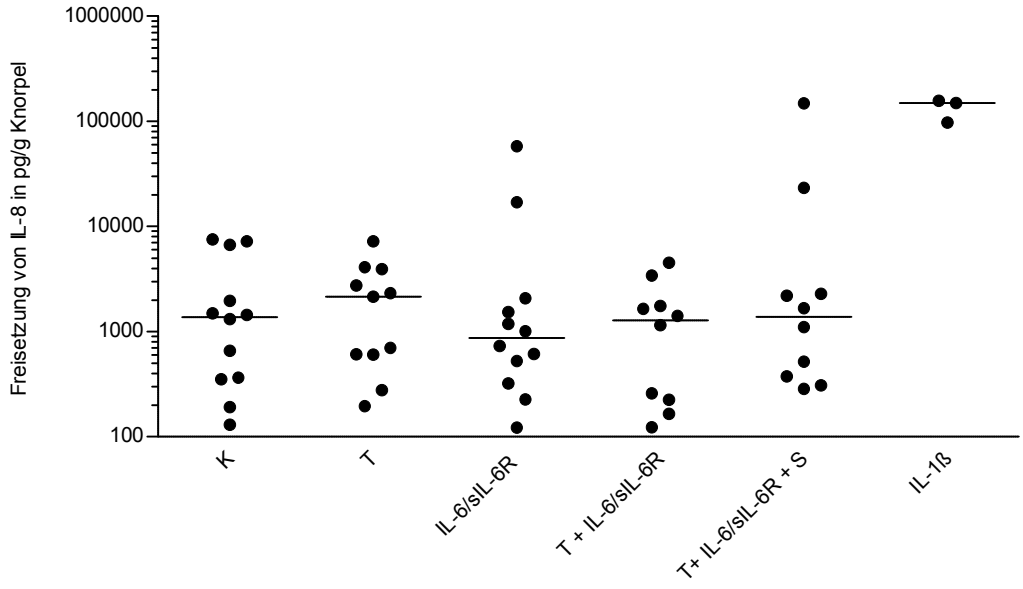


Abb. 35: Effekte von Trauma, IL-6/sIL-6R, IL-1β Stimulation und p38MAPK Inhibition nach 24 h auf die Freisetzung von IL-8. Knorpelstanzen wurden traumatisiert (0,59 J) und/oder mit IL-6/sIL-6R (50 ng/ml) und IL-1β (10 ng/ml) stimuliert. SB203580 (1 µM) wurde zur p38MAPK Inhibition verwendet. Knorpelstanzen ohne Behandlung dienten als Kontrolle. Die Einzelergebnisse wurden als Punkte und der Median als Balken aufgetragen. K, Kontrolle; T, Trauma; IL-6/sIL-6R, Interleukin-6/löslicher Interleukin-6 Rezeptor; S, SB203580; IL-1ß, Interleukin-1ß.

Nach Traumatisierung sah man eine 1,6-fache Steigerung der IL-8 Konzentration von 1.376,9 auf 2.153 pg/g Knorpel. Bei Knorpelstanzen, die mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, ergab sich eine Verringerung der IL-8 Konzentration um den gleichen Faktor auf 868,2 pg/g Knorpel. Die Zugabe von IL-6/sIL-6R mit Traumatisierung +/- Inhibitor zeigten keine Effekte, die Ergebnisse waren im Bereich der Kontrolle. Bei den mit IL-1ß stimulierten Knorpelstanzen zeigte sich eine 108,2-fache Erhöhung der IL-8 Konzentration. Der mittlere Wert ergab eine IL-8 Konzentration von 148.944,2 pg/ml Knorpel.

3.2.5.4 Freisetzung von TNFα

Im Gewebekulturüberstand konnten mittels CBA bei keinem experimentellen Ansatz nennenswerte TNFα Konzentrationen gemessen werden. (Daten im Anhang). Mit einem zusätzlich durchgeführten TNFα spezifischen ELISA konnte eben so wenig eine Freisetzung von TNFα gemessen werden, die Ergebnisse befinden sich ebenfalls im Anhang.

3.2.6 Weitere Faktoren im Überstand

Die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, von CCL5 (RANTES) („Regulated upon Activation, Normal T-Zell Expressed, and Secreted“), CD178 (Fas-Ligand) (FasL) und IL-17 wurde im Gewebekulturüberstand mittels CBA bestimmt.

IL-10 im Überstand

Die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde im Gewebekulturüberstand mittels CBA bestimmt. Nach Traumatisierung +/- IL-6/sIL-6R Stimulation +/- Inhibitor sah man keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Bei den mit IL-1ß stimulierten Knorpelstanzen zeigte sich eine 1,9-fache Erhöhung der IL-10 Konzentration von 43,9 auf 85,1 pg/g Knorpel. (Daten im Anhang).

RANTES im Überstand

Nach Traumatisierung +/- IL-6/sIL-6R Stimulation +/- Inhibitor sah man keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Bei den mit IL-1ß stimulierten Knorpelstanzen zeigten zwei Spender eine Erhöhung der RANTES-Konzentration von 44,4 auf 176 pg/g Knorpel. (Daten im Anhang).

FASL und IL-17 im Überstand

Im Gewebekulturüberstand konnten bei keinem experimentellen Ansatz nennenswerte FASL, sowie IL-17 Konzentrationen gemessen werden. (Daten im Anhang).

4 Diskussion

Die posttraumatische Arthrose (PTA) verursacht ungefähr 12 % der Arthrosen, die u.a. durch Verkehrs- oder Sportunfälle ausgelöst werden. Betroffen sind vor allem junge Erwachsene [18,35]. Die Verletzungen nach einem Trauma lösen im Gelenk eine Reihe komplexer biochemischer Vorgänge aus. Durch einen Überschuss an proinflammatorischen Faktoren gehen die entstandenen Gelenksverletzungen mit einer Destruktion von Knorpelgewebe einher. Die zugrunde liegenden Mechanismen der PTA sind sehr komplex und nur teilweise verstanden. Insbesondere die Rolle von Interleukin-6 (IL-6) und dem löslichem IL-6 Rezeptor (sIL-6R) bei der Induktion von proinflammatorischen Genen und Zytokinen, Apoptose und katabolen Prozessen ist unklar. Um diese Frage zu klären wurde in einem etablierten Knorpel-Trauma-Modell der Einfluss von Traumatisierung und Stimulation mit IL-6/sIL-6R auf Zellvitalität, Freisetzung von Metaboliten und die Genexpression in humanem Knorpelgewebe untersucht. Da die Aktivierung von p38MAPK (Mitogen Aktivierte Proteinkinase) eine zentrale Rolle bei PTA darstellt, wurde zusätzlich die Wirkungsweise des p38MAPK-Inhibitors SB203580 auf die Genexpression und Proteininduktion geprüft. Zusätzlich wurde exemplarisch der Einfluss einer Kostimulation mit TNFα und IL-6/sIL-6 sowie eine Stimulation mit dem Zytokin IL-1ß im Knorpel-Trauma-Modell untersucht. Mit der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die Genexpression bekannter Entzündungs- und Destruktionsmarker wie Matrixmetalloproteinase-1 (MMP1) und Matrixmetalloproteinase-13 (MMP13), Cyclooxygenase 2 (COX2), Prostaglandin-E-Synthase (PTGES), induzierbare Stickstoffsynthase (iNOS) und Superoxid-Dismutase-2 (SOD2) analysiert. Außerdem wurde die Zellvitalität und Apoptoserate mittels Lebend-Totzellfärbung, sowie TUNEL- und Aktivem-3-Caspase-Assay untersucht und die Gewebekulturüberstände auf PGE2, NO und entsprechende Zytokine mittels ELISA, Griess-Assay und colorimetrischem Assay bestimmt.

Für die Stimulationsstudien wurden Zytokin- und Inhibitorkonzentrationen gewählt, die bereits in ähnlichen Studien verwendet wurden und dort einen Einfluss zeigten. IL-6 und sIL-6R wurden in einer Konzentration von 50 ng/ml [3,43,96]; Tumornekrose-Faktor α (TNFα) mit 100 ng/ml [30,46,120,121] Interleukin-1ß (IL-1ß) mit 10 ng/ml [30,43,57,120] und SB203580 mit 10 µM eingesetzt [9,55,57]. IL-

6 wurde in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor eingesetzt, da ein kombinierter Einsatz von IL-6 und sIL-6R die Aggrekandegradation und Proteoglykansynthese im Vergleich zu dem Einsatz von IL-6 ohne seinen löslichen Rezeptor am stärksten vermittelt [43,54,96]. Es ist bekannt, dass überwiegend Makrophagen, Neutrophile, Hepatozyten und einige T-Zellen einen membranständigen IL-6 Rezeptor (mIL-6R) an der äußeren Zellmembran tragen und somit IL-6 Signale über den klassischen Signalweg induzieren [118]. Zellen, die keinen mIL-6R aufweisen, werden durch einen Komplex von IL-6 und sIL-6R aktiviert und vermitteln IL-6 Signale über den Trans-Signalweg [108,118]. Das in der vorliegenden Arbeit verwandte in vitro Knorpel-Trauma-Modell ist ein etabliertes Werkzeug zur Analyse der pathologischen Vorgänge in der initialen Phase nach einer Knorpelverletzung [29,49,57,91]. Die Traumatisierungsenergie von 0,59 J verursacht in diesem Modell ein Absterben von etwa 50% der Knorpelzellen und induziert inflammatorische Reaktionen [46,57].

4.1. Zellvitalität und Apoptoserate

Um den Einfluss von Trauma, IL-6/sIL-6R und TNFα auf die Vitalität der Knorpelzellen zu bestimmen, wurde eine Lebend-Totzellfärbung durchgeführt. Die Lebend-Totzellfärbung ergab, dass nach Traumatisierung signifikant weniger Zellen vital waren, als bei unbehandelten Kontrollen ($p = 0,0156$). Es waren 41,2 % Chondrozyten im Median nach Trauma vital und somit 1,5-fach weniger lebende Zellen als bei unbehandelten Kontrollen (61,4 % vitale Zellen) vorhanden. Dies steht in guter Übereinstimmung mit anderen Autoren, die ebenfalls nachweisen konnten, dass nach Traumatisierung die Anzahl der toten Zellen ansteigt [46,57,67]. Joos et al. 2011 fanden in der Lebend-Totzellfärbung 24 Stunden nach stumpfer Traumatisierung der Knorpelstanzen mit 0,59 J im Drop-Tower eine quantitative Reduktion der vitalen Zellen von 65 auf 35% [57]. Auch Hogrefe et al. 2012 konnten 24 Stunden nach Trauma im Vergleich zu unbehandelten Stanzen eine signifikante Reduktion lebender Zellen um ca. 50 % beobachten [46].

Die Zugabe von IL-6/sIL-6R alleine sowie in Kombination mit Trauma zeigte keinen Effekt auf die Zellvitalität. Auch durch Zugabe des p38MAPK-Inhibitors konnte keine Modulation der Zellüberlebensrate festgestellt werden. Somit zeigte

sich, dass die Zugabe von IL-6/sIL-6R auf traumatisiertes Knorpelgewebe das Absterben von Chondrozyten nicht verhindern kann, selbst aber keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat. In der Literatur fanden sich keine Informationen über den Einfluss von IL-6 auf Zellvitalität in Knorpelgewebe, jedoch konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in neuronalem Gewebe gezeigt werden, das IL-6 die neuronale Vitalität deutlich verbessert [93,105]. Die pleiotrope Wirkung von IL-6/sIL-6R ist also sehr von der untersuchten Zielzelle und dem experimentellem Modell abhängig.
Exemplarisch wurde die Zellvitalität nach Zugabe von TNFα +/- IL-6/sIL-6R +/- Trauma bestimmt. Es zeigte sich, dass nach Traumatisierung und Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R weniger Zellen vital waren als bei Trauma allein. Möglicherweise handelt es sich hier um einen kombinierten Effekt der Behandlungen, obwohl die Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R alleine im Mittel kaum einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hatte. Ein synergistischer Effekt von Trauma und den Zytokinen TNFα und IL-6/sIL-6R wurde auch von Sui et al. 2009 beschrieben, die zeigen konnten, dass Trauma auf Knorpelzellen die katabolen Effekte von TNF-alpha und IL-6/sIL-6R potenziert [121].

Um das Zellsterben und die Apoptoserate näher zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit der TUNEL-, sowie der Aktive-3-Caspase-Assay durchgeführt. Es zeigte sich, dass nach Traumatisierung in der vorliegenden Arbeit im TUNEL-Assay 16,2 % apoptotische Zellen nachgewiesen werden konnten und damit 2,45-fach mehr als bei unbehandelten Kontrollen, die nur 6,6 % apoptotische Zellen aufwiesen. Das deckt sich mit publizierten Daten [29,45,53,64,86]. Besonders D'Lima et al. 2001, konnten in einer ähnlichen Versuchsanordnung durch den TUNEL-Assay zeigen, dass mechanische Energie auf humane, femurale Knorpelexplantate die Apoptoserate von ca. 12 % auf ca. 34 % um damit 2,8-fach erhöht [29]. Jeffrey et al. 2007 konnten an humanem femoralem Gelenkknorpel-Explantaten nach stumpfer Traumatisierung mit 0,13 J im Drop-Tower und sechs Tagen Kultur eine Vervierfachung der Apoptoserate von ungefähr 10 % auf ungefähr 40 % apoptotische Chondrozyten durch den TUNEL-Assay nachweisen [53].
Die Behandlung von Knorpelstanzen mit IL-6/sIL-6R alleine zeigten im TUNEL-

Assay wie bei der Lebend-Totzellfärbung Werte um die unbehandelten Kontrollen. Der Zytokin-Rezeptor-Komplex scheint in diesem Modell nicht proapoptotisch zu wirken. Auch lassen sich keine Studien finden in denen IL-6 als proapoptotisch beschrieben wird. Für das proinflammatorisch wirkende Zytokin IL-1ß konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mit IL-1ß stimulierte Chondroyzten die gleiche Apoptoserate im TUNEL-Assay aufzeigten, wie unbehandelte Chondrozyten-Kontrollen [63,64].

In eigenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass traumatisierte Knorpelstanzen nach Zugabe von IL-6/sIL-6R im TUNEL-Assay weniger apoptotische Zellen aufwiesen. Im Mittel konnten gegenüber Trauma um die Hälfte weniger apoptotische Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine protektive Wirkung von IL-6 in der Apoptose hin. Ein antiapoptotische Effekt von IL-6/sIL-6R konnte auch bei der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden. Kim et al. 2011 konnten an synovialen Fibroblasten bei der rheumatoiden Arthritis zeigen, dass IL-6/sIL-6R die Aktivierung antiapoptotischer Proteine wie die Transkriptionsfaktoren, STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription), NF-κB p65 (Nuklear Faktor kappa B) und Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) erhöht und dieser Effekt erst durch die Zugabe der proapoptotischen Subatanz Mellitin blockiert wurde [60]. Ein protektiver Einfluss von IL-6 wurde auch im kardiotropen Entzündungsmodell beschrieben. Hier konnten Matsushita et al. 2005 feststellen, dass der IL-6/sIL-6R-Komplex die Apoptose von Kardiomyozyten inhibiert und akute myokardiale Infarkte reperfusiert [79]. Auch in der Retina reduzierte IL-6/sIL-6R die Apoptoserate [50].

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Behandlung von traumatisierten und IL-6/sIL-6R stimulierten Knorpelstanzen mit dem MAPK-Inhibitor SB203580 keinen wesentlichen Unterschied zu dem Ansatz ohne Inhibitor. Andere Studien beschrieben sowohl protektive als auch proarthrotische Eigenschaften des MAPK-Inhibitors [10,28,57,97]. Joos et al. 2011 konnten zeigen, dass der MAPK-Inhibitor SB203580 einen möglichen positiven Einfluss auf das Zellüberleben hat [57]. Diese Wirkung wurde auch von zwei anderen Arbeitsgruppen beschrieben [10,28]. Im Gegensatz dazu beschrieben Prasadam et al. 2012 proarthrotische Effekte bei längerfristiger Gabe von SB203580 im Rattenmodel [97]. Die Hemmung des p38-Wegs durch SB203580 führte dort zu schwererer Schädigung der Knorpelstruktur, außerdem stieg die Apoptoserate in normalem Rattenknorpel nach Behandlung

mit SB203580 an, was vermuten lässt, dass ein erheblicher Anteil der Chondrozyten bei Blockade der basalen p38 Phosphorylierung durch Apoptose sterben [97]. Die Autoren postulieren in ihrer Arbeit sogar den Einsatz von Aktivatoren des p38-Wegs um einen alternativen Ansatz für die Behandlung von Arthrose zu liefern [97]. Der fehlende Effekt des MAPK-Inhibitors in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass der protektive Weg von IL-6/sIL-6R nicht ausschließlich über den p38MAPK-Weg vermittelt wird, da sonst der Inhibitor zumindest Teile hiervon hätte aufheben müssen und/ oder sogar möglicherweise die Apoptoserate nach Trauma und IL-6/sIL-6R Zugabe erhöhen können. Dies war nicht der Fall. Denn einerseits vermittelt IL-6 Signale in der Zelle nicht nur über den MAPK-Weg, sondern auch und hauptsächlich über den JAK/STAT-Weg. Und zweitens existieren drei unterschiedliche MAPK-Familien, ERK (Extrazellular Signal-regulierte Kinase), p38MAPK und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) [109,122]. In der Arthrose ist besonders der p38MAPK-Weg hervorzuheben [122]. Dieser scheint jedoch bei IL-6 weniger Bedeutung zu haben, weshalb folglich der p38MAPK-Inhibitor SB203580 in den vorliegenden Versuchen über IL-6/sIL-6R nicht supprimierend wirken konnte.

Zusätzlich zu dem TUNEL-Assay wurde in der vorliegenden Arbeit die Anzahl an Caspase-3-aktiven Chondrozyten bestimmt. Der Aktive-Caspase-3 Assay zeigte bei unbehandelten Kontrollen im Mittel 37,8 % Caspase-3 aktive Zellen. Dieser Anteil fiel nach Traumatisierung um 44,4 % geringer aus und lag bei 21 % Caspase-3 aktiver Zellen. Der Abfall der Caspase-3 positiven Zellen nach Trauma ist schwierig zu erklären. Einige Erklärungen sind denkbar. Möglicherweise sind die Ergebnisse der Färbung unzuverlässig, da der Caspase-Assay technisch schwierig und sehr störanfällig ist. Zweitens könnte man spekulativ annehmen, dass es zunächst zu einem Abfall der aktiven Caspase-3 kommt. Dies ist jedoch sehr wenig wahrscheinlich, denn die Procaspase-3 wird durch Procaspase-8 im extrinsischen und durch Procaspase-9 im intrinsischen Weg der Apoptose zur aktiven Caspase-2 aktiviert [101]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass die Anzahl der Caspase-3-aktiven Zellen in arthrotisch vorgeschädigtem Gewebe generell hoch ist und das Ergebnis des Caspase-3-Aktiven Assay der vorliegenden Arbeit, wie es scheint, gewebeabhängige Schwankungen widergespiegelt und nicht den Trauma-Effekt aufzeigt. Auf jeden Fall korrelieren beide Apoptosefärbungen in der Arbeit nicht mit einander. Insgesamt komme ich

zu der Einschätzung, dass der TUNEL-Assay aufgrund der höheren Fallzahl bei den vorliegenden Ergebnissen in seiner Wertigkeit höher anzusiedeln ist, als die der Caspasefärbung.

4.2 Degradierende Prozesse der Zellmatrix

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind am Abbau von Knorpelmatrixkomponenten beteiligt [83]. Hervorzuheben sind im arthrotischen Gewebe MMP1 [3] und MMP13 [31,68]. Die MMPs werden sehr fein reguliert. Diese komplexe, teilweise unverstandene Regulation scheint u.a. von mechanischer Belastung und Vitalität des Knorpels abhängig zu sein. So konnte Monfort et al. 2006 zeigen, dass die MMP1-Synthese in gesundem Hüftgelenksknorpel unter Druck reduziert ist, nicht aber in arthrotischen Hüftgelenksknorpel der Druck ausgesetzt ist [83]. Druck und Traumatisierung scheinen MMPs zu beeinflussen. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde nach Traumatisierung die Expression des in Knorpeldegradation vorherrschenden MMP1 und MMP13 im Mittel tendenziell herunterreguliert. Bei der primären Arthrose, ein Zustand der sich allerdings nur eingeschränkt mit dem initialen Prozess nach Trauma vergleichen lässt, beschreibt Rübenhagen et al. 2012 folgende Veränderungen. Die Autoren konnten nachweisen, dass die Konzentration von MMP1 in synovialer Flüssigkeit von Patienten mit schwerer Arthrose im Vergleich zu Patienten ohne oder mit moderater Arthrose stark reduziert vorliegt [106]. Dies führt er darauf zurück, dass MMP1 hauptsächlich in den oberflächlichen Knorpelzonen von Chondrozyten gebildet wird, die bei Arthrose geschädigt sind [33]. Diese Chondrozyten wurden vermutlich auch im vorliegenden Drop-Tower Model geschädigt. Zu einem anderen Ergebnis kamen Jing et al. 2011, die in humanen in-vitro Chondrozytenkulturen mit zunehmenden Knorpeldegenrationsgrad eine erhöhte Expression von MMP13 nachweisen konnten [129]. Auch Stevens et al. 2009 konnten nach mechanischer Verletzung auf bovine Knorpelexplantate eine erhöhte Expression von MMP1 und MMP13 im Vergleich zu unverletzten Knorpel nachweisen [120]. Allerdings wurden hier die Knorpelexplantate fünf Tage in Kultur gehalten, und nicht nur 24 Stunden, wie in der vorliegenden Arbeit, so dass eventuell die Zeitkinetik bei der Regulation der MMPs eine Rolle spielen könnte. Denn Patwari et al. 2003 konnten nach Verletzung an bovine Knorpelexplantaten

und drei Tagen in Kultur keine Veränderung an der MMP 13 mRNA feststellen (n=15) [91]. Diese Hypothese über die Zeitkinetik könnte in weiteren Versuchen geklärt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass nach Zugabe von IL-6/sIL-6R die Expressionswerte von MMP1 und MMP13 im Mittel unverändert blieben. Ein Nachteil der vorliegenden Doktorarbeit war es, dass ausschließlich die Expression der MMPs analysiert wurde und somit keine Aussage über die Proteinsynthese der MMPs und ihre Funktion getroffen werden konnte. In einem ähnlichen Modell an bovinem Knorpelexplantaten konnte Flannery et al. 2000 zeigen, dass sIL-6R oder IL-6 und sIL-6R zusammen auf bovine Knorpelexplantate keinen signifikant höhere Freisetzung an Glykosaminoglykanen (GAG) bewirkten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen [30]. So kann man schlussfolgern, dass die Zugabe von IL-6 und sIL-6R auf Knorpelexplantate keine wesentliche Aktivierung von MMPs, sowie auf die GAG-Freisetzung im untersuchten Zeitraum aufweist. Allerdings zeigten verschiedene Spender stark unterschiedliche Reaktionen. So war bei sechs Spendern die MMP1- und MMP13-Genexpression um den Faktor 6,2 bzw. 2,4 deutlich verstärkt, während andere Spender (n=6) mit einer Abnahme der MMP1- und MMP13-Genexpression reagierten. Interessanterweise waren diese „High“-Responder auf IL-6/sIL-6R in Bezug auf die Expression von MMP1 und MMP13 bis auf einen Spender identisch. Diese biologische Varianz der Reaktion von IL-6/sIL-6R auf die Expression von MMPs in Chondrozyten wurde bisher nicht beschrieben. Möglicherweise reagieren Knorpelzellen von unterschiedlichen Individuen nicht gleich stark auf eine Stimulation mit IL-6/sIL-6R. Dies könnte zum Beispiel durch eine genetische Variabilität des IL-6/IL-6R Trans-Signalwegs bedingt sein [42,98]. Aida et al. 2012 konnten zeigen, dass die Behandlung von IL-6/sIL-6R auf gesunde Chondrozytenkulturen mit einer erhöhten Expression von MMP1 und MMP13 einhergeht (n=4) [3]. Stimuliert man primäre bovine Chondrozyten mit IL-6/sIL-6R zeigt sich ebenfalls eine Expressionserhöhung von MMP1 und MMP13 [66]. Auch Irwin et al. 2002 beschreiben eine signifikante Induktion der MMP1-Expression bei gingivalen Fibroblasten nach Behandlung mit IL-6/sIL-6R [52].

Die Kombination aus IL-6/sIL-6R und Trauma zeigte ähnliche Werte wie Trauma alleine in Bezug auf die MMP1-Expression. Bei dem Gen MMP13 lagen die Werte im Bereich der Kontrolle. Die Zugabe des p38MAPK-Inhibitors erhöhte die MMP1-

Expression im Median nicht signifikant um das 1,7-Fache im Vergleich mit dem Ansatz ohne Inhibitor. Zusätzlich konnten die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der p38MAPK-Inhibitor SB203580 die Wirkung von IL-6/sIL-6R auf die Expression von MMP-13 tendenziell im Mittel supprimiert. Dies spricht dafür, dass die Signalwege der Induktion von MMP1 und MMP13 unterschiedlich reguliert werden. So konnten Studien zeigen, dass p38, JNK und NF-κB für die IL-1 Induktion von MMP13 sind erforderlich sind [81]. Wo hingegen MMP-1 vor allem durch MMP-3 aktiviert wird [81]. MMP1 wird in erster Linie im Gelenkspalt durch Synovialzellen, sowie durch Chondrozyten in den obersten Knorpelschichten und MMP13 im Knorpel durch Chondrozyten freigesetzt [20,33]. Beide beschriebenen MMPs sind Kollagenasen. MMP1 degradiert bevorzugt Kollagen Typ III und MMP13 Kollagen Typ II [20]. Zusätzlich ist bekannt, dass MMP13 für Knorpelerosionen verantwortlich ist [37], was die Wichtigkeit dieser Matrixmetalloproteinase in Bezug auf die Entstehung von Knorpeldestruktion wie bei der PTA unterstreicht.

Mit IL-1ß stimulierte Knorpelstanzen wiesen im Mittel eine erhöhte MMP1-Expression auf. Dies ist bekannt [39,120]. So wird die Homöostase zwischen katabolen und anabolen Vorgängen zerstört und es kann zu irreversiblen Knorpelschäden kommen [59]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach IL-1ß Zugabe nur bei einem von drei Spendern eine Expressionserhöhung von MMP13. Dieser Spender deckt sich mit den Daten aus der Literatur [20,92,120].

4.3 PGE2-Syntheseweg

Die Zytokin-induzierte Produktion von PGE2 ist bei Gelenkserkrankungen häufig erhöht und kann Entzündungsreaktionen wie Schmerzen, Schwellung und Knorpeldegradation verursachen [38]. Um den Einfluss von Traumatisierung und Zytokinstimulation auf den PGE2-Syntheseweg zu untersuchen, wurde die Genexpression von COX2 und PTGES, sowie die Freisetzung von PGE2 im Gewebekulturüberstand analysiert. Es zeigte sich, dass die Traumatisierung einen großen Einfluss auf den PGE2-Syntheseweg hat. Nach Trauma fand sich eine signifikante Zunahme der Expression von COX2 ($p=0,002$) und PTGES ($p=0,0273$), sowie eine signifikante Steigerung der PGE2-Konzentration im Überstand ($p=0,0039$). Dies ist bekannt [46,53,57]. Auch arthrotischer Knorpel

weist eine erhöhte COX2-Expression und damit erhöhte PGE2-Konzentration auf [1,7,44,74].

Nach Zugabe von IL-6R/sIL-6R lag die relative COX2-Genexpression im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Allerdings war die Variabilität der Ergebnisse sehr groß. Vier Spender zeigten nach IL-6 Zugabe ohne Trauma eine verstärkte COX2-Genexpression um den Faktor 3,7. Man könnte also in Übereinstimmung mit Honda et al. 2011 vermuten, dass IL-6 COX2 induziert [48]. Nach IL-6/sIL-6R Zugabe lagen die Resultate über die PTGES-Genexpression und des PGE2-Freisetzung im Überstand im Median um die Kontrolle. Es ist somit möglich, dass hauptsächlich bei normalen Chondroyzten in Zellkultur, die mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, eine erhöhte COX2-Expression und vermehrter Umsatz von PGE2 nachweisbar sind [48] und die Knorpelzellen im Gewebeverband möglicherweise nicht weiter durch IL-6/sIL-6R stimuliert werden konnten.

Bei Knorpelstanzen, die zusätzlich zur Traumatisierung mit IL-6/sIL-6R stimuliert wurden, kam es zu einer Reduktion der COX2 und PTGES-Expression gegenüber Trauma. Diese Ergebnisse bestätigten sich interessanterweise auch in den Überstandsanalysen. Hier zeigte sich sogar eine signifikante Verringerung der PGE2-Konzentration im Zellkulturüberstand gegenüber Trauma ($p = 0,0391$). Es stellt sich die Frage, ob der IL-6/sIL-6R-Komplex möglicherweise protektiv wirken könnte und so die Effekte der Traumatisierung abschwächt. Ähnliche inhibitorische Effekte von IL-6/sIL-6R auf die Apoptose konnten bereits in der vorliegenden Arbeit in den TUNEL-Analysen (4.1) nachgewiesen werden. In diesen Zusammenhang ist die Untersuchung von Namba et al. 2007 bemerkenswert [87]. Namba et al. 2007 berichten, dass IL-6 und sIL-6R regenerative Prozesse in arthrotischem Knorpel durch eine gesteigerte Expression von Knorpelmatrixproteinen, dem Knochen-Protein (BMP) -7 und dem BMP-7-Rezeptoren in Chondrozyten induzieren kann [87]. Außerdem schützt IL-6 das Gewebe durch eine Erhöhung von Metalloproteinasen-Inhibitoren (TIMP) in Chondrozyten und der Synovia [117]. Diese Erkenntnisse und die von Honda et al. 2011 zeigen, dass IL-6 und sIL-6R bei der PTA nicht nur proinflammatorische Effekte sondern auch protektive Effekte besitzen könnte. Honda et al. 2011 vermuten, dass IL-6 und sein löslicher Rezeptor den Knorpel schützen und sich das Verhalten von IL-6 und sIL-6R in osteoathrotischen Knorpel und Knochen möglicherweise unterscheidet [48]. In der Literatur fanden sich leider keine

Studien, die die Wirkung von IL6 und sIL-6R bei Trauma auf die Prostaglandinfreisetzung im Knorpel oder anderen Geweben auch untersucht haben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Zytokin TNFα in Kombination mit Trauma, die Effekte der Traumatisierung im gleichen Traumamodel wie in der vorliegenden Arbeit nicht zusätzlich verbessern konnte [46]. Die Stimulation von Knorpelstanzen mit IL-1ß zeigte einen anderen Effekt. Es zeigte sich, dass die Effekte der Traumatisierung durch IL-1ß Zugabe in Bezug auf die PGE2-Synthese höher ausfielen als bei Trauma alleine [57].

Die Behandlung von traumatisierten und IL-6/sIL-6R stimulierten Knorpelstanzen mit MAPK-Inhibitor zeigte bei den Genexpressionsanalysen über COX2 und PTGES und der PGE2-Freisetzung im Überstand keinen Unterschied zu dem Ansatz ohne Inhibitor. Diese Beobachtung zeigten, dass der MAPK-Inhibitor SB203580 nicht den protektiven Effekt von IL6 aufhebt und könnte darauf hindeuten, dass eventuelle protektive Effekte von IL6 nicht ausschließlich über p38 vermittelt werden. Es wird vermutet, dass SB203580 selbst eventuell auch einen inhibitorischen Effekt auf den PGE-Syntheseweg in Chondrozyten hat, da gezeigt werden konnte, dass die Hemmung der p38MAPK durch den Inhibitor SB203580 die Freisetzung von PGE2 und NO in Chondrozyten in einem in-vitro Entzündungsmodell verringerte [56] und dass SB203580 eine Tendenz zeigt den Zelltod in traumatisierten und IL-1ß stimulierten Knorpelexplantaten zu reduzieren [57]. Joos et al. 2011 konnten zeigen, dass dieser protektive Trend von SB203580 durch eine weitere Erhöhung von IL-6 und NO-Spiegeln begleitet wurde, während die PGD2 Freisetzung unverändert blieb [57]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Behandlung von traumatisierten und IL-6/sIL-6R stimulierten Knorpelstanzen mit MAPK-Inhibitor zeigten insgesamt bei der Untersuchung des PGE2-Synthesewegses ähnliche Ergebnisse wie bei dem TUNEL-Assays.

Exemplarisch wurde der Einfluss von TNFα, IL-6/sIL-6R und Traumatisierung auf den PGE2-Syntheseweg untersucht. Es zeigte sich, dass nach Zugabe von TNFα die Genexpression von COX2 und PTGES, sowie die PGE2-Konzentration im Überstand erhöht waren. Dies ist bekannt [38,46,57]. Auch die Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R aktivierte den PGE2-Weg in gleicher Weise. Durch die geringe Fallzahl lässt sich nicht diskutieren, ob IL-6/sIL-6R hemmende oder aktivierende Funktion in dem durch TNFα induzierten PGE2-Syntheseweg einnimmt. Nach Traumatisierung und Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R zeigten sich die stärksten

Effekte. Bezüglich der PGE2-Freisetzung konnte unter diesen Bedingungen, wie auch bei der Zellvitalitätsanalyse, der größte Effekt beobachtet werden Ein additiver Effekt von Trauma und den Zytokinen TNFα und IL-6/sIL-6R wurde bereits in der Literatur beschrieben. Sui et al. 2009 fanden heraus, das der schwerste Verlust an GAGs im Knorpelgewebe nach mechanischer Verletzung in Kombination mit TNFα und IL-6/sIL-6R detektiert werden konnte [121]. Somit potenziert eine mechanische Verletzung auf Knorpelgewebe die katabolischen Effekte von TNFα und IL-6/sIL-6R in Bezug auf den Proteoglykanzerstörung in humanen Knorpel [121]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass sich nach Behandlung der Knorpelstanzen mit TNFα alleine eine höhere Genexpressionsrate von PTGES, sowie von COX2 nachweisen lies als bei Trauma alleine. Dieser Effekt war bei PGE2 Freisetzung im Überstand nicht zu beobachten. Hier fiel die PGE2 Freisetzung nach Trauma höher aus als nach TNFα Zugabe. Möglicherweise haben Zytokine einen stärken Einfluss auf die Heraufregulation der Genexpression als die Traumatisierung. Auch Sui et al.2009, konnten nachweisen, dass der Verlust an GAGs in bovinen Knorpelexplantaten nach mechanischer Verletzung geringer ausfiel als nach alleiniger Zugabe von TNFα [121].
IL-1ß stimulierte Knorpelstanzen wiesen im Mittel eine erhöhte Genexpression von COX2 und PTGES auf. Auch die Freisetzung von PGE2 im Zellkulturüberstand erhöhte sich nach IL-1ß Stimulation um das 2,7-Fache. Das steht in guter Übereinstimmung mit publizierten Daten [25,38,57,76,77,92]. Joos et al. 2011 konnte zeigen, dass die IL-1ß Stimulation ohne Trauma eine starke Aufregulation von COX2 und PTGES bewirkte, sowie dass die Kombination aus IL-1ß Stimulation und Traumatisierung signifikant höhere Genexpressionen zeigte [57].

Parallel zu den übrigen Analysen wurden zehn Spender der vorliegenden Arbeit auf die Promotor Variante des COX2-Gen Polymorphismus untersucht und die Frage geprüft, ob nach Trauma Unterschiede in der Genexpression von COX2 und PTGES, sowie in der Freisetzung von PGE2, IL-1ß und IL-6 nachweisbar waren. In einer Studie von Schneider et al. 2011 konnte gezeigt werden, dass der Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) 765 G → C (rs20417) des COX2-Gen-Promotors mit einem geringeren Risiko einer Arthroseerkrankung einhergeht [112]. Andererseits wurde festgestellt, dass Chondrozytenkulturen von Spendern

mit dem Genotyp G/G nach IL-1ß Zugabe zum Teil eine sehr hohe COX2-Genexpression aufwiesen, was bei Spendern des Genotyps G/C nicht in diesem Ausmaß zu detektieren war (n=6) [112]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein klarer Hinweis dafür, dass eine bestimmte Genotyp-Variante nach Trauma eine höhere COX-2 Expression oder eine höhere PGE2-Produktion aufwies. Hier war die Fallzahl zu niedrig um Schlussfolgerungen ziehen zu können. Auch die Auswirkungen auf die PTGES-Expression, sowie die Freisetzung von IL-1ß und IL-6 erbrachten keinen nennenswerten Hinweis und sind zusätzlich auch kritisch zu bewerten, da die Mutation im COX-Promoter direkt nur die COX2-Expression, sowie auch die PGE2-Produktion beeinflusst.

4.4 NO-Syntheseweg

Im Knorpelgewebe vermittelt NO inflammatorische Signale, die die Knorpelzerstörung induzieren [2,14]. Die Effekte der Zytokinstimulation und Traumatisierung wurden auf den NO-Syntheseweg durch die Genexpression von iNOS und der Konzentration an Nitrit im Gewebekulturüberstand als Vergleichswert für die NO-Freisetzung analysiert. In den vorliegenden Ergebnissen bewirkte Trauma und/oder Zugabe von IL-6/sIL-6R keine nennenswerte Erhöhung der iNOS-Expression, sowie der NO-Produktion. Die Werte schwankten um die Kontrolle. Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass eine stumpfe Traumatisierung mit 0,59 J im gleichen Drop-Tower Model wie in der vorliegenden Arbeit keine Induktion der iNOS und der NO-Freisetzung bewirkte [46]. Auch Lu et al. 2011 konnten im bovinen Modell zeigen, dass mechanische Verletzung auf Knorpel-Knochen Zylinder alleine im Gegensatz zur Behandlung mit TNFα keine Induktion von iNOS mRNA bewirkte [72]. In der Literatur fanden sich keine Veröffentlichungen, die die Wirkung von IL6 und sIL-6R bei Trauma auf den NO-Syntheseweg untersuchten.

Die Inhibition mit dem MAPK-Inhibitor SB203580 zeigte ebenfalls keinen Einfluss. Von SB203580 ist bekannt, dass es den NO-Syntheseweg von IL-1ß stimulierten Chondrozyten hemmt [9].

Bei weiteren exemplarischen Analysen über TNFα zeigte sich, dass nach Zugabe von TNFα die iNOS-Expression und NO-Freisetzung im Vergleich zu unbehandelten Stanzen stark anstiegen. Dies wurde bereits in ähnlichen Knorpel-

Traumamodellen beschrieben [72]. Das freigesetzte NO beeinflusst durch Aktivierung von MMPs [1] die Zerstörung der Knorpelmatrix [61] und erhöht proapoptotische Faktoren wie p53, die über den intrinsichen Signalweg Apoptose auslösen [1]. Auch die Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R aktivierte in der vorliegenden Arbeit den NO-Weg in gleicher Weise. Da die alleinige Stimulation von IL-6/sIL-6R keinen Einfluss auf den NO-Syntheseweg zeigte, könnte vermutet werden, dass die Aktivierung des NO-Synthesewegs hauptsächlich durch TNFα ausgelöst wurde. In den vorliegenden Ergebnissen stellte sich nach Traumatisierung und Behandlung mit TNFα und IL-6/sIL-6 im Mittel die höchste relative iNOS-Expression ein. Korrelierend zu Genexpressionsdaten ließ sich auch eine Erhöhung von NO im Gewebekulturüberstand feststellen. Jedoch fiel die NO-Freisetzung tendenziell bei der Dreifachkombination von Traumatisierung und Zugabe von IL-6/sIL-6R und TNFα geringer aus, obwohl die Genexpression am stärksten induziert war. Hier könnte eine größere Fallzahl an Experimenten zur Aufklärung beitragen.

Nach IL-1ß Stimulation zeigte sich eine sehr starke Induktion der iNOS-Genexpression. Dies korrelierte mit den Daten der NO-Freisetzung im Knorpelüberstand. Auch hier kam es zu einer starken Zunahme der NO-Freisetzung. Der Einfluss von IL-1ß auf den NO-Syntheseweg wurde in der Literatur schon häufig beschrieben [25,38,57,76,77]. Dies zeigt, dass der bekannte Induktor IL-1ß im Modell der vorliegenden Arbeit die erwarteten Effekte zeigte und somit die Chondrozyten im Gewebsverband im Prinzip stimulierbar sind.

4.5 SOD2

Da die bisherigen Analysen zeigten, dass die Stimulation mit IL-6/sIL-6R in der Entstehung der posttraumatischen Arthrose (PTA) keine entscheidende proinflammatorische Rolle spielt, wurde die SOD2-Genexpression untersucht um zu entschlüsseln inwieweit die Zugabe von IL-6/sIL-6R und Trauma an der Induktion von Reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt ist. Die vorliegenden Ergebnissen zeigen, dass nach Trauma die SOD2-Expression signifikant zur Kontrolle herunterreguliert wurde ($p=0,0156$). Auch nach umfangreicher Literatursuche fanden sich keine vergleichbaren Untersuchungen. Jedoch stellen einige Studien, die Rolle der humanen Superperoxiddismutasen bei der

chronischen Arthrose da [4,102,107,115]. Scott et al. 2010 konnten zeigen, dass die SOD2-Expression auch in arthrotischen Chondrozyten in vivo signifikant herunterreguliert wird [115]. Das Enzym SOD2 eliminiert reaktive Sauerstoffspezies im Knorpel. Eine Reduktion von SOD2 erhöht den oxidativen Stress in den Zellen, wie auch im arthrotischen Knorpel [115,131]. Somit könnte SOD2 eine chondroprotektive Rolle zugeschrieben werden [2,115]. Da die SOD2 im arthrotischen Gewebe und wie die eigenen Untersuchungen zeigen nach einem akuten Trauma erniedrigt ist, können oxidative Sauerstoffspezies durch SOD2 nicht reduziert werden. Es lässt sich spekulieren, ob die externe Gabe von Antioxidantien nach einem akuten Knorpeltrauma dem Zelltod entgegenwirken könnte. So zeigten Goodwin et al. 2010, dass im in vitro Traumamodell an bovinen Chondrozyten ein Großteil der Zellen durch die erhöhte Freisetzung von Superoxiden aus Mitochondrien sterben und dass eine kurze Behandlung mit dem Radikalfänger Rotenon die Lebensfähigkeit von Chondrozyten nach Gelenkverletzungen signifikant verbessern könnte [41].

Die Stimulation mit IL-6/sIL-6R auf Knorpelstanzen zeigte keinen Einfluss auf die SOD2-Genexpression. Im Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit wird IL-6 in der Literatur als potenter SOD2-Aktivator beschrieben [2]. Auch Mathy-Hartert et al. 2008 konnte bei normalen, bovinen Chondrozyten in Kultur eine signifikante Erhöhung der SOD2-Expression nach IL-6 Stimulation feststellen [78]. Diese fiel wesentlich geringer als nach Stimulation mit IL-1ß [78]. Warum die IL-6/sIL-6R Stimulation keine Erhöhung der SOD2 induzierte ist unklar. Vermutlich spricht in den Versuchen der vorliegenden Arbeit das bradytrophe Knorpelgewebe im Verband nicht ausreichend auf die IL-6/sIL-6R Stimulation, sondern nur auf die Zugabe des potenten Zytokins IL-1ß an.

Wie in 3.2.4 beschrieben erhöhte die Zugabe von IL-1ß zu Knorpelstanzen die relative SOD2-Genexpression. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht [2,78]. Da sich in der vorliegenden Arbeit die Expression von SOD2 nach IL-1ß Stimulation nur geringfügig erhöhte, könnte es möglich sein, dass IL-6 im Zellverband keine stärken Effekt erzielen konnte.

4.6 Proinflammatorische Zytokine und weitere Faktoren im Überstand

Im Gewebekulturüberstand wurde die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine, IL-1ß, IL-6, IL-8 und TNFα, sowie explorativ IL-10, RANTES, FASL und IL-17 mittels CBA Technologie nach Trauma und IL-6/sIL-6R, sowie IL-1ß Zugabe bestimmt.

Die Analysen ergaben nach Traumatisierung eine geringe Erhöhung von IL-6 und IL-8 im Überstand. Die anderen Zytokine und Faktoren wurden nach Trauma nicht freigesetzt.

Nach Traumatisierung sah man eine leichte Konzentrationssteigerung von IL-6 um das 1,6-Fache im Gewebekulturüberstand. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Joos et al. 2011 und Bajaj et al. 2010 [10,57]. Bajaj et al. 2010 beschrieben eine durch Trauma induzierte Hochregulation von IL-6 in gesundem humanen Sprungelenksknorpel [10]. Außerdem ist bekannt, dass die lokalen und systemischen Konzentrationen von IL-6 nach Trauma ansteigen [47]. Im Gegensatz hierzu konnte Sui et al. 2009 im Zellkulturüberstand von traumatisierten, humanen Knorpelexplantaten keine Veränderung der IL-6 Freisetzung nachweisen [121].Es stellt sich die Frage, ob IL-6 direkt ausschließlich durch das Trauma hochreguliert wird und/oder zusätzliche stimulierende Signale durch andere traumainduzierte Botenstoffe vorhanden sind. Wang et al konnte nachweisen, dass PGE2 die IL-6 Freisetzung direkt stimuliert [125]. Die Traumatisierung mit dem Drop-Tower Modell der vorliegenden Arbeit induzierte ebenfalls hoch signifikant PGE2. Deshalb ist es möglich, dass die Traumatisierung über die Freisetzung von PGE2 indirekt IL-6 freisetzt [125]. Dies könnte man durch Einsatz einer Anti-PGE2-Blockade oder durch eine PNI Ribunuklease gegen PGE2, die die IL-6 Expression stark hemmt, in weiteren Versuchen überprüfen. Die Behandlung mit dem MAPK-Inhibitor SB203580 ergab eine Verringerung der IL-6 Konzentration um 24 % im Vergleich zu dem Ansatz ohne Inhibitor. Trotzdem waren die Unterschiede sehr gering und nicht signifikant. Deshalb ist davon auszugehen, dass kein Effekt vorlag.

Nach Traumatisierung kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der IL-8 Freisetzung im Zellkulturüberstand der Chondrozyten. Das Chemokin IL-8 ist als proinflammatorisches Zytokin im arthrotischem Gewebe nachzuweisen [37,58]. IL-

8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, aktiviert die Genexpression von Adhäsionsmolekülen und vermittelt über Chemokinrezeptoren die Freisetzung von Sauerstoffradikalen [85].

In keiner Stimulation der Knorpelstanzen mit IL-6/sIL-6R konnte eine zusätzliche Inflammation und Freisetzung der oben genannten Zytokine und Chemokine detektiert werden. Eine Ausnahme gab es bei IL-8, denn hier bewirkte die Zugabe von IL-6/sIL-6R mit und ohne Trauma tendenziell eine leichte Verringerung der IL-8-Produktion. Wie in den Resultaten dargestellt (Abb. 34, Seite 66), führte auch die extern zugegebene Menge von 50 ng/ml IL-6 im CBA wie erwartet zu einem signifikanten Anstieg ($p = 0,0008$) von IL-6 in Bezug auf die Kontrolle. Der gemessene Wert stimmte nicht gut mit der zugegeben Menge an IL-6 überein. Mehrere Erklärungen sind denkbar. Möglicherweise ist ein Teil des IL-6 zerfallen oder es wurde von den Zellen internalisiert. Auch könnte die zugegebene Menge an Hand des CBA Standards niedriger gewesen sein. Leider wurde in der vorliegenden Arbeit kein rekombinantes humanes IL-6 ohne Knorpel als Leerwert gemessen. Für weitere Versuche wäre es daher sinnvoll einen Leerwert von dem Medium mit IL-6/sIL-6R ohne Knorpel zu ermitteln.

In den vorliegenden Analysen wurde IL-1ß extern zugegeben, um das prinzipielle ansprechen des Knorpelverbands auf die Freisetzung von Zytokinen überprüfen. Die Zugabe von IL-1ß auf Knorpelexplantate zeigte sowohl eine Konzentrationserhöhung von IL-6 und IL-8, sowie IL-10 und RANTES im Überstand. Die anderen Metabolite konnten durch IL-1ß nicht induziert werden.

Wie erwartet führte die Zugabe von IL-1ß zu einer massiven Induktion von IL-6. Interessanterweise fiel die durch IL-1ß induzierte IL-6-Freisetzung wesentlich höher aus als die des extern zugebenen humanen rekombinanten IL-6. Die Wirkung von IL-1ß auf IL-6 wurde in anderen Arbeiten schon mehrfach beschrieben [43,54,58,124].

Die IL-1ß Stimulation führte zu einer massiven Zunahme der IL-8 Freisetzung. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben [22,71].

IL-10 ist ein bekanntes antiinflammatorisches, chondroprotektives und immunregulatorischen Zytokin [114]. Es wird hauptsächlich durch Zellen des Immunsystems freigesetzt und wirkt auch auf diese [114]. Außerdem wird IL-10 u.a. durch Chondrozyten hergestellt, ist an Prozessen des extrazellulären Matrix-Remodelling beteiligt und liegt im arthrotischen Gewebe erhöht vor [114]. Die

Induktion von IL-10 durch IL-1ß in der vorliegenden Arbeit kann als Gegenregulation auf den starken Entzündungsreiz, der durch IL-1ß im Knorpelgewebe aktiviert wird, interpretiert werden. Denn jede Inflammation geht mit einer Resolution der Entzündung und einer Aktivierung inhibitorischer Zytokine wie IL-10 und TGFß und antiinflammatorischer Mediatoren einher [23,116].
RANTES spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Aktivierung katabolischer Signalwege und der Chondrozytenhypertrophie [37]. Außerdem ist bekannt, dass RANTES durch Zytokin-aktivierte Chondrozyten oder arthrotischen Knorpel produziert wird [6]. Wie in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, beschrieben auch Alaaeddine et al. 2001 bei normalen Chondrozytenkulturen eine Erhöhung von RANTES nach Stimulation der Zellen mit IL-1ß [6]. IL-1ß induzierte in der vorliegenden Arbeit eine Reihe verschiedenster Zytokine und Metabolite, was IL-1ß als proinflammatorisches Molekül unterstreicht.

4.7 Grenzen des Modells und Schlussfolgerung

Der Einsatz von humanen Gewebemodellen erlaubt es, Schlussfolgerungen auf die pathologischen Prozesse nach Trauma am Menschen zu machen, jedoch ist es schwierig, gesundes Gewebe im Verband zu erhalten und daran zu forschen. Das in der vorliegenden Doktorarbeit benutzte Drop-Tower Modell ermöglicht es, die molekularen Mechanismen einer definierten stumpfen Traumatisierung von isolierten humanen Knorpelpellets zu analysieren. Das verwandte Modell hat sehr viele Vorteile sowie auch einige Nachteile. Ein großer Vorteil liegt in der standardisierten Traumaeinwirkung mit einer konstanten Energie von 0,59 J. Anhand des Modells können außerdem durch definierte Zugabe von Zytokinen wie IL-ß, IL-6 und TNFα deren unterschiedliche Effekte sowie ihre Blockade durch Inhibitoren selektiv untersucht werden. Gleichzeitig ist es möglich im Detail Aktivierungen von Zielgenen z.B. der Metallproteinasen und anderer Mediatoren zu analysieren ohne, dass andere Zellen wie Mesenchym- und Blutzellen interagieren. Andererseits macht das fehlende Synovial- und Knochengewebe im vorliegenden Modell eine Interaktion mit andern Immun- und Effektorzellen unmöglich und stellt so möglicherweise einen Nachteil gegenüber in vivo-Untersuchungen an Tiermodellen da.
Beim Einsatz des Drop-Tower Modells stellt sich die entscheidende Frage,

inwieweit gesunder Knorpel bei den vorliegenden Experimenten benutzt wurde. Um diese berechtigte Kritik soweit wie möglich zu minimieren, wurde in den verwandten Knorpel-Traumamodell das Material makroskopisch sehr sorgfältig auf arthrotische Vorschädigungen untersucht. Nur Knorpelmaterial aus makroskopisch intakten Bereichen wurde entnommen. Die Vitalität des Gewebes wurde durch die Lebend-Totzellfärbung kontrolliert. Der Ausschluss von makroskopisch sichtbaren Veränderungen schließt bereits vorliegende entzündliche Prozesse in der untersuchten Knorpelstanze nicht aus. Dies könnte dazu führen, dass die basale Messung der Zytokinexpression und Produktion bereits in Kontrollansätzen erhöhte Werte im Vergleich zu gesundem Gewebe aufweist. Dieses Problem wurde für die Bestimmung der Genexpression gelöst, indem die Expression der unbehandelten Kontrollstanze auf 1 gesetzt wurde. Die genau Durchsicht der Zytokinsynthese im Überstand, zeigte ebenfalls, dass nur in vereinzelten Proben die Zytokinproduktion im Bereich der Traumawerte lag. So konnte beispielhaft an der PGE2-Produktion nachgewiesen werden, dass der Median vor Trauma von 13,4 pg/ml Knorpel sich versieben fachte und auf 94,5 pg/ml Knorpel nach Trauma anstieg. Nur in einem von 16 Überständen lag die PGE2 Konzentration schon vor Traumatisierung im Bereich von 84 pg/ml Knorpel. Dies belegt eindeutig wie gut die benutzten Knorpelstanzen bzw. das vorliegende Drop-Tower Modell zur Analyse distinkter Mediatoren und Zytokine geeignet ist.

Natürlich ist die Probenakquirierung von humanem Gewebe in ihrer Fallzahl begrenzt und die biologische Varianz der Spender erschwert es möglicherweise ein komplettes Fazit über die molekularen Mechanismen nach stumpfem Trauma des Knorpels zu ziehen.

In der vorliegenden Arbeit führte die Traumatisierung von Knorpelpellets zu einer signifikant erhöhten Anzahl toter Chondrozyten, sowie einer vermehrten Apoptoserate, gleichzeitig wurde der PGE2-Syntheseweg durch eine signifikante Erhöhung von COX2, PTGES und der signifikanten Freisetzung von PGE2 stark beeinflusst und die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 nach Trauma im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vermehrt freigesetzt. Interessanterweise führte die Zugabe von IL-6/sIL-6R nach Traumatisierung im Mittel zu einer Reduktion apoptotischer Zellen, sowie zu einer Verringerung der PGE2-Freisetzung nach Trauma. Der Einfluss von Traumatisierung und IL-6/sIL-6R auf die Matrixmetalloproteinasen und den NO-Syntheseweg fiel gering aus. Auch die

Behandlung mit dem MAPK-Inhibitor SB203580 zeigte keine wesentliche Modulation an den von IL-6/sIL-6R und Trauma induzierten Entzündungswegen im vorliegenden Modell. Das proinflammatorische Zytokin IL-1ß zeigt eine sehr hohe Potenz in der Induktion kataboler Prozesse auf alle untersuchten Entzündungswege im vorliegenden Knorpel-Trauma-Modell was sich gut mit einer Reihe publizierter Daten ergänzt. Die exemplarischen Untersuchungen zu TNFα zeigten, dass die Dreifachkombination aus Trauma und Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R durch ihren additiven Effekt Einfluss auf Entzündungswege im Knorpel einnehmen. Die Resultate dieser Arbeit lassen hoffen, dass in zukünftigen Arbeiten, das Drop-Tower-Modell weitere Beiträge zur Entschlüsselung der molekularen Vorgänge bei der PTA liefern kann.

5 Zusammenfassung

Die Verletzung des Gelenkknorpels und der umliegenden Gewebe können zu einer Posttraumatischen Arthrose (PTA) führen. Derzeit gibt es keine effizienten medizinischen Maßnahmen um im Akutstadium die Ausdehnung der späteren Erkrankung zu unterbinden. Um die Pathogenese der PTA besser entschlüsseln und neue Therapiekonzepte entwickeln zu können, werden verschiedenste in vivo und in vitro Modelle eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden humane Knorpelexplantate durch ein etabliertes Drop-Tower Modell stumpf traumatisiert und mit extern zugesetzten Zytokinen stimuliert um die initialien Effekte des Traumas zu untersuchen. Schwerpunkt der Arbeit war es den Einfluss von Interleukin-(IL)-6 und dem löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) auf Zellvitalität und Metabolismus im Knorpelgewebe, sowie eine mögliche Kostimulation von IL-6/sIL-6R mit Tumor-Nekrose-α (TNFα) +/- Trauma zu analysieren. Da die Aktivierung von p38MAPK (Mitogen Aktivierte Proteinkinase) eine zentrale Rolle bei der PTA darstellt wurde zusätzlich die Wirkung des p38MAPK-Inhibitors (SB 203580) untersucht. Die Auswirkung auf die Zellvitalität und die Apoptoseratewurde durch zwei Fluoreszenzassays und durch eine immunhistochemische Färbung bestimmt. Mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion konnte die Induktion der Genexpression von Matrixmetalloproteinase-1 (MMP1) und MMP13, Cyclooxygenase-2 (COX2), Prostaglandin-E-Synthase (PTGES), induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und Superoxid-Dismutase-2 (SOD2) eruiert werden. Im Gewebekulturüberstand wurde mittels ELISA-Technik, Gries-Assay und Cytometric Bread Array die Freisetzung von PGE2, NO und die Konzentration proinflammatorischer Zytokine, IL-1ß, IL-6, IL-8 und TNFα, sowie IL-10 und RANTES („regulated and normal T cell expressed and secreted“), bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nach Traumatisierung der Knorpelstanzen weniger Chondrozyten vital waren und die Apoptoserate im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen erhöht vorlag. Der Prostaglandin-E2-Synthese (PGE2)-Weg wurde nach Traumatisierung durch eine signifikant erhöhte Expression von COX2 und PTGES, sowie einer signifikanten PGE2-Freisetzung im Zellgewebekulturüberstand positiv beeinflusst. Auch die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 lagen nach Trauma im Überstand erhöht vor. Im Gegensatz wurden die Expressionsraten des in Knorpeldegradation vorherrschenden MMP1

und MMP13, sowie SOD2 nach Traumatisierung im Mittel herunterreguliert und der NO-Synthaseweg nicht beeinflusst.

Die Behandlung mit p38MAPK-Inhibitor zu traumatisierten und mit IL-6/sIL-6R behandelten Knorpelstanzen zeigte keinen Unterschied zu dem Ansatz ohne Inhibitor in Bezug auf die untersuchten Entzündungsmarker. Dies lässt darauf schließen, dass der IL-6/sIL-6R Trans-Signalweg nicht nur über die p38MAPK erfolgt. Allerdings wurde durch Zugabe des p38MAPK-Inhibitors SB203580 die MMP1-Expression im Median im Vergleich mit dem Ansatz ohne Inhibitor leicht erhöht und es konnte gezeigt werden, dass der p38MAPK-Inhibitor die Wirkung von IL-6/sIL-6R auf die Expression von MMP-13 im Mittel supprimiert.

Die Behandlung der Knorpelstanzen mit TNFα zeigte in Gegensatz zur alleiniger Stimulation mit IL-6/sIL-6R oder Trauma eine starke iNOS-Expression und erhöhte NO-Freisetzung im Überstand. Auch zeigte TNFα einen großen Einfluss auf den PGE2-Syntheseweg, so erhöhte TNFα die Expression von COX2 und PTGES und die PGE2-Freisetzung im Überstand. Die Dreifachkombination aus Traumatisierung und gleichzeitiger Zugabe von IL-6/sIL-6R mit TNFα zu Knorpelzellen zeigte synergistische Effekte. Nach Traumatisierung und Zugabe von TNFα und IL-6/sIL-6R waren weniger Zellen vital als bei Trauma alleine. Auch der Einfluss auf den PGE2- sowie NO-Synthaseweg viel in Dreifachkombination am Größten aus.

Schlussfolgerung: Im vorliegenden Knorpel-Trauma-Modell scheinen IL-6 und sein löslicher Rezeptor eher eine untergeordnete Rolle einzunehmen, da die Expressionswerte der untersuchten Entzündungs- und Zellvitalitätsmarker nach IL-6/sIL-6R Zugabe im Mittel unverändert blieben. Jedoch zeigte sich, dass traumatisierte Knorpelstanzen nach Zugabe von IL-6/sIL-6R im TUNEL-Assay weniger apoptotische Zellen aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten auf eine protektive Wirkung in der Apoptose von IL-6 hin. Die Versuche zum PGE2-Weg lieferten ähnliche Ergebnisse, denn nach Trauma und IL-6/sIL-6R Zugabe wurden im Mittel weniger PGE2 im Zellkulturüberstand freigesetzt wurde, als nach Trauma alleine.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass IL-6/sIL-6R im Gegensatz zu TNFα und IL-1ß keine wesentlichen proinflammatorische Effekte bei der initialen Phase nach einem Knorpeltrauma ausübt.

6 Literaturverzeichnis

[1] Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. Curr Rheumatol Rep 2001;3:535–41.

[2] Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. Joint Bone Spine 2007;74:324–9.

[3] Aida Y, Honda K, Tanigawa S, Nakayama G, Matsumura H, Suzuki N, Shimizu O, Takeichi O, Makimura M, Maeno M. IL-6 and soluble IL-6 receptor stimulate the production of MMPs and their inhibitors via JAK-STAT and ERK-MAPK signalling in human chondrocytes. Cell Biol Int 2012;36:367–76.

[4] Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. Arthritis Rheum 2006;54:3533–44.

[5] Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, 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;24:1985–94.

[6] Alaaeddine N, Olee T, Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Lotz M. Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. Arthritis Rheum 2001;44:1633–43.

[7] Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, Stuchin SA, Patel IR, Abramson SB. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. J Clin Invest 1997;99:1231–7.

[8] Attur M, Al-Mussawir HE, Patel J, Kitay A, Dave M, Palmer G, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 exerts catabolic effects in osteoarthritis

cartilage: evidence for signaling via the EP4 receptor. J Immunol 2008;181:5082–8.

[9] Badger AM, Cook MN, Lark MW, Newman-Tarr TM, Swift BA, Nelson AH, Barone FC, Kumar S. SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. J Immunol 1998;161:467–73.

[10] Bajaj S, Shoemaker T, Hakimiyan AA, Rappoport L, Pascual-Garrido C, Oegema TR, Wimmer MA, Chubinskaya S. Protective effect of P188 in the model of acute trauma to human ankle cartilage: the mechanism of action. J Orthop Trauma 2010;24:571–6.

[11] BD Biosciences. Cytometric Bead Array. (Accessed November 13, 2012, at http://www.bdbiosciences.com/research/cytometricbeadarray/formats/index.jsp) .

[12] Bear PC, Schubert R. Durchflusszytometrie, Intrazelluläre Signaltransduktion bei mesenchymalen Stammzellen. BIOspektrum 2009;15:649–51.

[13] Benninghoff A, Drenckhahn D, Hunziker EB: Knorpelgewebe, Kniegelenk. In: Drenckhahn, D Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, 17th ed, München: Urban & Schwarzenberg 2008; S.128-133, S.365.

[14] Bentz M, Zaouter C, Shi Q, Fahmi H, Moldovan F, Fernandes JC, Benderdour M. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. J Cell Biochem 2012;113:2256–67.

[15] Berenbaum F. Signaling transduction: target in osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol 2004;16:616–22.

[16] Berenbaum F. Diabetes-induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. Postgrad Med J 2012;88:240–2.

[17] Borrelli J. Chondrocyte apoptosis and posttraumatic arthrosis. J Orthop Trauma 2006;2006:726–31.

[18] Brown TD, Johnston RC, Saltzman CL, Marsh JL, Buckwalter JA. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. J Orthop Trauma 2006;20:739–44.

[19] Burrage PS, Brinckerhoff CE. Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors. Curr Drug Targets 2007;8:293–303.

[20] Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. Front. Biosci 2006;11:529–43.

[21] Caramés B, López-Armada MJ, Cillero-Pastor B, Lires-Dean M, Vaamonde C, Galdo F, Blanco FJ. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. Osteoarthr Cartil 2008;16:715–22.

[22] Chauffier K, Laiguillon M, Bougault C, Gosset M, Priam S, Salvat C, Mladenovic Z, Nourissat G, Jacques C, Houard X, Berenbaum F, Sellam J. Induction of the chemokine IL-8/Kc by the articular cartilage: Possible influence on osteoarthritis. Joint Bone Spine 2012;79:604–9.

[23] Chen Y, Hsieh S, Chen W, Li K, Wu C, Wu P, Tsai C, Yu C. Spontaneous resolution of acute gouty arthritis is associated with rapid induction of the anti-inflammatory factors TGFβ1, IL-10 and soluble TNF receptors and the intracellular cytokine negative regulators CIS and SOCS3. Ann Rheum Dis (Annals of the rheumatic diseases) 2011;70:1655–63.

[24] Corporation P. Griess Reagent System Technical Bulletin, TB229, 2009. (Accessed September 23, 2012, at http://www.promega.com/~/media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/griess%20reagent%20system%20protocol.pdf?la=en).

[25] Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2003;42 Suppl 2:ii3-ii10.

[26] DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP. Modulation of glucocorticoid receptor expression in human articular chondrocytes by cAMP and prostaglandins. J Rheumatol Suppl 1991;27:102–5.

[27] Dinarello CA. Biology of interleukin 1. FASEB J 1988;2:108–15.

[28] Ding L, Heying E, Nicholson N, Stroud NJ, Homandberg GA, Buckwalter JA, Guo D, Martin JA. Mechanical impact induces cartilage degradation via mitogen activated protein kinases. Osteoarthr Cartil 2010;18:1509–17.

[29] D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Lotz MK. Impact of mechanical trauma on matrix and cells. Clin Orthop Relat Res 2001;(391 Suppl):90–9.

[30] Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. Matrix Biol 2000;19:549–53.

[31] Forsyth CB, Cole A, Murphy G, Bienias JL, Im H, Loeser RF. Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci 2005;60:1118–24.

[32] Fredman G, Serhan CN. Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. Biochem J 2011;437:185–97.

[33] Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. Ann Rheum Dis 1997;56:542–9.

[34] Frotscher M, Kahle W, Platzer W: Kniegelenk. In: Platzer, W Taschenatlas der Anatomie, in 3 Bänden, 9th ed,. Stuttgart: Thieme 2005; S. 206-215.

[35] Furman BD, Olson SA, Guilak F. The development of posttraumatic arthritis after articular fracture. J Orthop Trauma 2006;20:719–25.

[36] Geng Y, Valbracht J, Lotz M. Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes. J Clin Invest 1996;98:2425–30.

[37] Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Ther Adv Musculoskelet Dis 2012;4:269–85.

[38] Goldring MB, Berenbaum F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. Clin Orthop Relat Res 2004;(427 Suppl):S37-46.

[39] Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. J Cell Physiol 2007;213:626–34.

[40] Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther 2009;11:224.

[41] Goodwin W, McCabe D, Sauter E, Reese E, Walter M, Buckwalter JA, Martin JA. Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. J. Orthop. Res 2010;28:1057–63.

[42] Gottardo L, Cosmo S de, Zhang Y, Powers C, Prudente S, Marescotti MC, Trischitta V, Avogaro A, Doria A. A polymorphism at the IL6ST (gp130) locus is associated with traits of the metabolic syndrome. Obesity 2008;16:205–10.

[43] Guerne PA, Desgeorges A, Jaspar JM, Relic B, Peter R, Hoffmeyer P, Dayer JM. Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. Matrix Biol 1999;18:253–60.

[44] Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB. The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. Clin Orthop Relat Res 2004;(423):17–26.

[45] Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. Arthritis Rheum 1998;41:1266–74.

[46] Hogrefe C, Joos H, Maheswaran V, Dürselen L, Ignatius A, Brenner RE. Single impact cartilage trauma and TNF-α: Interactive effects do not increase early cell death and indicate the need for bi-/multidirectional therapeutic approaches. Int J Mol Med 2012;30:1225–32.

[47] Holzheimer RG, Steinmetz W. Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds. Eur J Med Res 2000;5:347–55.

[48] Honda K. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor suppress osteoclastic differentiation by inducing PGE(2) production in chondrocytes. J Oral Sci 2011;53:87–96.

[49] Huser CAM, Davies ME. Validation of an in vitro single-impact load model of the initiation of osteoarthritis-like changes in articular cartilage. J. Orthop. Res 2006;24:725–32.

[50] Inomata Y, Hirata A, Yonemura N, Koga T, Kido N, Tanihara H. Neuroprotective effects of interleukin-6 on NMDA-induced rat retinal damage. Biochem Biophys Res Commun 2003;302:226–32.

[51] Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. Knee 2003;10:93–6.

[52] Irwin CR, Myrillas TT, Traynor P, Leadbetter N, Cawston TE. The role of soluble interleukin (IL)-6 receptor in mediating the effects of IL-6 on matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression by gingival fibroblasts. J Periodontol 2002;73:741–7.

[53] Jeffrey JE, Aspden RM. Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro. Arthritis Res Ther 2007;9:R129.

[54] Jikko A, Wakisaka T, Iwamoto M, Hiranuma H, Kato Y, Maeda T, Fujishita M, Fuchihata H. Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. Cell Biol Int 1998;22:615–21.

[55] Joos H, Albrecht W, Laufer S, Brenner RE. Influence of p38MAPK inhibition on IL-1beta-stimulated human chondrocytes: a microarray approach. Int J Mol Med 2009;23:685–93.

[56] Joos H, Albrecht W, Laufer S, Brenner RE. Differential effects of p38MAP kinase inhibitors on the expression of inflammation-associated genes in primary, interleukin-1beta-stimulated human chondrocytes. Br J Pharmacol 2010;160:1252–62.

[57] Joos H, Hogrefe C, Rieger L, Dürselen L, Ignatius A, Brenner RE. Single impact trauma in human early-stage osteoarthritic cartilage: Implication of prostaglandin D2 but no additive effect of IL-1β on cell survival. Int J Mol Med 2011;28:271–7.

[58] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol 2011;7:33–42.

[59] Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, Henriksen K, Fosang AJ, Sondergaard BC. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity. Arthritis Res Ther 2008;10:R63.

[60] Kim S, Park K, Yoon W, Park S, Park K, Yoo D, Choe J. Melittin enhances apoptosis through suppression of IL-6/sIL-6R complex-induced NF-κB and STAT3 activation and Bcl-2 expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine 2011;78:471–7.

[61] Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. Bull NYU Hosp Jt Dis 2007;65:222–8.

[62] Kugisaki H, Sonohata M, Komine M, Tsunoda K, Someya S, Honke H, Mawatari M, Hotokebuchi T. Serum concentrations of interleukin-6 in patients following unilateral versus bilateral total knee arthroplasty. J Orthop Sci 2009;14:437–42.

[63] Kühn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz M. Cell death in cartilage. Osteoarthr Cartil (Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society) 2004;12:1–16.

[64] Kühn K, Hashimoto S, Lotz M. IL-1 beta protects human chondrocytes from CD95-induced apoptosis. J Immunol 2000;164:2233–9.

[65] Kumar S, Votta BJ, Rieman DJ, Badger AM, Gowen M, Lee JC. IL-1- and TNF-induced bone resorption is mediated by p38 mitogen activated protein kinase. J Cell Physiol 2001;187:294–303.

[66] Legendre F, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol J. Role of interleukin 6 (IL-6)/IL-6R-induced signal tranducers and activators of transcription and mitogen-activated protein kinase/extracellular. J Rheumatol 2005;32:1307–16.

[67] Leucht F, Dürselen L, Hogrefe C, Joos H, Reichel H, Schmitt H, Ignatius A, Brenner RE. Development of a New Biomechanically Defined Single Impact Rabbit Cartilage Trauma Model for In Vivo-Studies. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research 2012;25:235–41.

[68] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. Exp Cell Res 2003;288:208–17.

[69] Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. Br J Pharmacol 2011;164:278–93.

[70] Livshits G, Zhai G, Hart DJ, Kato BS, Wang H, Williams FMK, Spector TD. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. Arthritis Rheum 2009;60:2037–45.

[71] Lotz M, Terkeltaub R, Villiger PM. Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. J Immunol 1992;148:466–73.

[72] Lu YCS, Evans CH, Grodzinsky AJ. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. Arthritis Res Ther 2011;13:R142.

[73] Marks PH, Donaldson MLC. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. Arthroscopy 2005;21:1342–7.

[74] Martel-Pelletier J, Pelletier J, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. Semin Arthritis Rheum 2003;33:155–67.

[75] Martinek V. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels: Abteilung für Sportorthopädie der TU München, 2003. (Accessed September 23, 2012, at http://www.zeitschrift-sportmedizin.de/fileadmin/externe_websites/ext.dzsm/content/archiv2003/heft06/Martinek.pdf).

[76] Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB, Thirion S. Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase 1 in osteoarthritic human cartilage: critical roles of the ERK-1/2 and p38 signaling pathways. Arthritis Rheum 2004;50:2829–38.

[77] Mathy-Hartert M, Burton S, Deby-Dupont G, Devel P, Reginster J, Henrotin Y. Influence of oxygen tension on nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis by bovine chondrocytes. Osteoarthr Cartil 2005;13:74–9.

[78] Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, Deby-Dupont G, Crielaard JM, Henrotin Y. Interleukin-1beta and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. Osteoarthr Cartil 2008;16:756–63.

[79] Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. Lab. Invest. 2005;85:1210–23.

[80] McKinley TO, Borrelli J, D'Lima DD, Furman BD, Giannoudis PV. Basic science of intra-articular fractures and posttraumatic osteoarthritis. J Orthop Trauma 2010;24:567–70.

[81] Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, Barchowsky A, Brinckerhoff CE. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. Arthritis Rheum 2000;43:801–11.

[82] Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, Nucci G de, Cillari E. Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. Prostaglandins 1995;49:105–15.

[83] Monfort J, Garcia-Giralt N, López-Armada MJ, Monllau JC, Bonilla A, Benito P, Blanco FJ. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. Arthritis Res Ther 2006;8:R149.

[84] Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. Clin Immunol 2004;110:252–66.

[85] Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. Int J Hematol 2000;72:391–8.

[86] Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Martinez G. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2011;19:307–13.

[87] Namba A, Aida Y, Suzuki N, Watanabe Y, Kawato T, Motohashi M, Maeno M, Matsumura H, Matsumoto M. Effects of IL-6 and soluble IL-6 receptor on the expression of cartilage matrix proteins in human chondrocytes. Connect. Tissue Res 2007;48:263–70.

[88] NCBI . Genbank, 2012. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome NCBI).

[89] Palmer G, Guerne P, Mezin F, Maret M, Guicheux J, Goldring MB, Gabay C. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. Arthritis Res 2002;4:226–31.

[90] Pathologie online. Immunhistologie. (Accessed November 13, 2012, at http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php).

[91] Patwari P, Cook MN, DiMicco MA, Blake SM, James IE, Kumar S, Cole AA, Lark MW, Grodzinsky AJ. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. Arthritis Rheum 2003;48:1292–301.

[92] Pecchi E, Priam S, Mladenovic Z, Gosset M, Saurel A, Aguilar L, Berenbaum F, Jacques C. A potential role of chondroitin sulfate on bone in osteoarthritis: inhibition of prostaglandin E_2 and matrix metalloproteinases synthesis in interleukin-1β-stimulated osteoblasts. Osteoarthr Cartil 2012;20:127–35.

[93] Peng Y, Qiu Y, Lu J, Wang J. Interleukin-6 protects cultured cerebellar granule neurons against glutamate-induced neurotoxicity. Neurosci Lett (Neuroscience letters) 2005;374:192–6.

[94] Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Auantifizierung. BIOspektrum 2004;10:92–5. (Accessed September 23, 2012, at http://biospektrum.de/blatt/d_bs_pdf&_id=934133).

[95] Poole AR, Kobayashi M, Yasuda T, Laverty S, Mwale F, Kojima T, Sakai T, Wahl C, El-Maadawy S, Webb G, Tchetina E, Wu W. Type II collagen

degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2002;61 Suppl 2:ii78-81.

[96] Porée B, Kypriotou M, Chadjichristos C, Beauchef G, Renard E, Legendre F, Melin M, Gueret S, Hartmann D, Malléin-Gerin F, Pujol J, Boumediene K, Galéra P. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. J Biol Chem 2008;283:4850–65.

[97] Prasadam I, Mao X, Wang Y, Shi W, Crawford R, Xiao Y. Inhibition of p38 pathway leads to OA-like changes in a rat animal model. Rheumatology (Oxford) 2012;51:813–23.

[98] Qi L, Rifai N, Hu FB. Interleukin-6 receptor gene variations, plasma interleukin-6 levels, and type 2 diabetes in U.S. Women. Diabetes 2007;56:3075–81.

[99] Qi S, Xin Y, Guo Y, Diao Y, Kou X, Luo L, Yin Z. Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF-κB signaling pathways. Int Immunopharmacol 2012;12:278–87.

[100] R&D Systems. ELISA Prinzip. (Accessed November 13, 2012, at http://www.rndsystems.com//product_detail_objectname_quantikineelisaassayprinciple.aspx).

[101] Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Apoptose, Mediatoren. In: Duale Reihe Biochemie, 660 Abbildungen, 50 Tabellen, 2nd ed, Stuttgart: Thieme 2008; S. 517-534; S. 627-650.

[102] Regan E, Flannelly J, Bowler R, Tran K, Nicks M, Carbone BD, Glueck D, Heijnen H, Mason R, Crapo J. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. Arthritis Rheum 2005;52:3479–91.

[103] Rengel Y, Ospelt C, Gay S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. Arthritis Res Ther 2007;9:221.

[104] Rosenwasser LJ. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. J Allergy Clin Immunol 1998;102:344–50.

[105] Rozen N, Lewinson D, Bick T, Jacob ZC, Stein H, Soudry M. Fracture repair: modulation of fracture-callus and mechanical properties by sequential application of IL-6 following PTH 1-34 or PTH 28-48. Bone 2007;41:437–45.

[106] Rübenhagen R, Schüttrumpf JP, Stürmer KM, Frosch K. Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis. Acta Orthop 2012;83:59–64.

[107] Ruiz-Romero C, Calamia V, Mateos J, Carreira V, Martínez-Gomariz M, Fernández M, Blanco FJ. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. Mol Cell Proteomics 2009;8:172–89.

[108] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta 2011;1813:878–88.

[109] Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000;43:2501–12.

[110] Schieven GL. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. Curr Top Med Chem 2005;5:921–8.

[111] Schieven GL. The p38alpha kinase plays a central role in inflammation. Curr Top Med Chem 2009;9:1038–48.

[112] Schneider EM, Du W, Fiedler J, Högel J, Günther KP, Brenner H, Brenner RE. The (-765 G→C) promoter variant of the COX-2/PTGS2 gene is associated

with a lower risk for end-stage hip and knee osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2011;70:1458–60.

[113] Schulze-Tanzil G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. Ann. Anat 2009;191:325–38.

[114] Schulze-Tanzil G, Zreiqat H, Sabat R, Kohl B, Halder A, Müller RD, John T. Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders. Curr Gene Ther 2009;9:306–15.

[115] Scott JL, Gabrielides C, Davidson RK, Swingler TE, Clark IM, Wallis GA, Boot-Handford RP, Kirkwood TBL, Taylor RW, Talyor RW, Young DA. Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. Ann Rheum Dis 2010;69:1502–10.

[116] Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nat Immunol 2005;6:1191–7.

[117] Shingu M, Miyauchi S, Nagai Y, Yasutake C, Horie K. The role of IL-4 and IL-6 in IL-1-dependent cartilage matrix degradation. Br J Rheumatol 1995;34:101–6.

[118] Sodenkamp J, Waetzig GH, Scheller J, Seegert D, Grötzinger J, Rose-John S, Ehlers S, Hölscher C. Therapeutic targeting of interleukin-6 trans-signaling does not affect the outcome of experimental tuberculosis. Immunobiology 2012.

[119] Spooren A, Kolmus K, Laureys G, Clinckers R, Keyser J de, Haegeman G, Gerlo S. Interleukin-6, a mental cytokine. Brain Res Rev 2011;67:157–83.

[120] Stevens AL, Wishnok JS, White FM, Grodzinsky AJ, Tannenbaum SR. Mechanical injury and cytokines cause loss of cartilage integrity and upregulate proteins associated with catabolism, immunity, inflammation, and repair. Mol Cell Proteomics 2009;8:1475–89.

[121] Sui Y, Lee JH, DiMicco MA, Vanderploeg EJ, Blake SM, Hung H, Plaas AHK, James IE, Song X, Lark MW, Grodzinsky AJ. Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble

interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage. Arthritis Rheum 2009;60:2985–96.

[122] Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. Rheumatology (Oxford) 2008;47:409–14.

[123] van den Berg WB, Joosten LA, van de Loo FA. TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis. Clin Exp Rheumatol 1999;17:S105-14.

[124] Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappaB activation. Am J Physiol, Cell Physiol 2010;298:C1445-56.

[125] Wang P, Zhu F, Konstantopoulos K. Interleukin-6 synthesis in human chondrocytes is regulated via the antagonistic actions of prostaglandin (PG)E2 and 15-deoxy-Δ(12,14)-PGJ2. PLoS ONE 2011;6:e27630.

[126] Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis - an untreatable disease? Nat Rev Drug Discov 2005;4:331–44.

[127] Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. Bull. World Health Organ. 2003;81:646–56.

[128] Yasuda T. Cartilage destruction by matrix degradation products. Mod Rheumatol 2006;16:197–205.

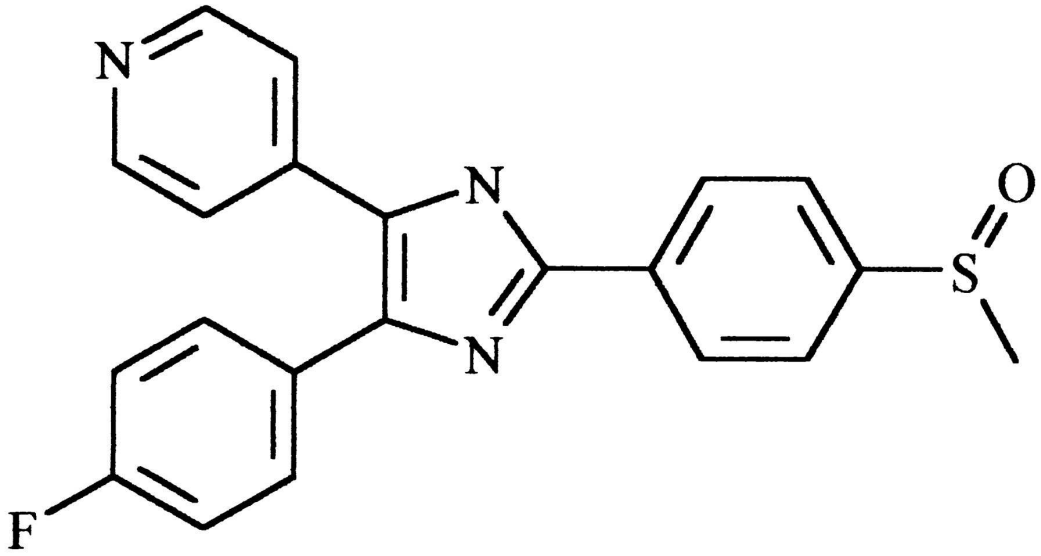
[129] Yin J, Yang Z, Cao Y, Ge Z. Characterization of human primary chondrocytes of osteoarthritic cartilage at varying severity. Chin Med J 2011;124:4245–53.

[130] Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. J Biol Chem 1997;272:12116–21.

[131] Yudoh K, van Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. Arthritis Res Ther 2005;7:R380-91.

Anhang

MAPK-Inhibitor SB203580



4-[4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-Methylsulfinylphenyl)-5-(4-Pyridyl)Imidazol [9]

Rohdaten

Versuchs-Nr.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Geschlecht	m	w	w	m	m	w	m	m	m
Alter bei Knie-TEP (in Jahren)	63	68	75	77	72	53	68	83	73
Pathologie	Gon. re	V.g. li	Gon. li	V.g. re	m.b.G. re	Gon. li	Gon. li	Gon. li	Hs. re
Knie-TEP	re	li	li	re	re	li	li	li	re
COX2-Gen Polymorphismus	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	G/G	C/C	G/G	C/G	G/G
Knorplstanzen/ Ansätze (insg.)	10	10	5	15	10	13	5	10	5
Lebend-Totzellfärbung									
(Anteil lebender Chondrozyten in %)									
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65,62	51,00	62,74	54,86	60,03
T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	39,11	48,06	31,00	n.d.	41,18
IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	53,10	71,50	66,21	69,38
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,92	42,50	45,00	55,10
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28,72	49,30	33,14	76,00	46,03
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TUNEL-Assay									
(Anteil TUNEL-positiver Zellen in %)									
K	6,78	1,93	n.d.	6,21	6,44	19,80	8,51	n.d.	n.d.
T	5,95	20,57	n.d.	16,24	12,32	n.d.	20,66	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	10,40	14,22	n.d.	16,18	1,52	5,02	5,22	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	7,11	9,92	n.d.	8,88	7,26	16,67	13,44	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	9,57	59,55	n.d.	13,81	9,29	3,14	10,71	n.d.	n.d.
Aktiver Caspase-3-Assay									
(Anteil Caspase-3-Aktiver Zellen in %)									
K	37,82	33,33	n.d.	58,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	n.d.	20,75	n.d.	23,95	21,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	8,55	n.d.	n.d.	30,59	11,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	41,02	62,92	n.d.	29,21	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	0,00	3,62	n.d.	49,47	0,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Relative MMP1-Expression									
K	n.d.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.
T	n.d.	1,56	1,98	2,07	0,15	0,08	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	0,09	0,11	3,32	0,72	1,07	n.d.	0,24	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	0,90	0,75	0,99	0,29	0,51	n.d.	2,74	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	0,28	1,52	n.d.	1,24	n.d.	1,61	n.d.
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	24,14	n.d.	0,86	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	4,16	n.d.	0,18	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	13,27	n.d.	0,27	n.d.	n.d.	n.d.
Relative MMP13-Expression									
K	n.d.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.
T	n.d.	5,12	0,30	0,38	0,02	0,27	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	0,17	0,03	0,73	1,71	0,18	n.d.	0,78	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	1,96	0,04	1,35	0,21	0,03	n.d.	2,22	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	0,06	0,86	0,05	0,63	n.d.	0,34	n.d.
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	14,25	n.d.	0,65	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	3,91	n.d.	0,06	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1,57	n.d.	0,02	n.d.	n.d.	n.d.

Abkürzungen: Knie-TEP, Knie-Totalendoprothese, m, männlich; w, weiblich; Gon., Gonarthrose; V.g.; Vagusgonarthrose; Hs.; Hemischlitten; f.V.g., fortgeschrittene Vagusgonarthrose; li, links; re, rechts; n.d., nicht dürchgeführt.

Versuchs-Nr.	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
Geschlecht	w	m	w	m	w	m	w	m	m
Alter bei Knie-TEP (in Jahren)	80	68	70	52	61	67	59	79	65
Pathologie	Gon. re	Gon. li	Gon. li	Gon. re	Gon. re	f. V.g. re	n.d.	Gon. li	n.d.
Knie-TEP	re	li	li	re	re	re	n.d.	li	re
COX2-Gen Polymorphismus	G/G	C/C	G/G	C/G	C/G	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Knorplstanzen/ Ansätze (insg.)	8	9	4	7	6	7	5	6	6
Lebend-Totzellfärbung									
(Anteil lebender Chondrozyten in %)									
K	95,85	n.d.	n.d.	n.d.	50,42	69,71	n.d.	79,14	71,10
T	37,44	n.d.	n.d.	n.d.	48,41	55,98	n.d.	76,42	59,17
IL-6/sIL-6R	46,67	n.d.	n.d.	n.d.	74,27	56,61	n.d.	69,63	75,00
T + IL-6/sIL-6R	33,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	61,34	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	78,09	51,53	n.d.	66,79	47,07
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	74,04	45,04	n.d.	57,76	77,13
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47,25	45,90	n.d.	44,65	32,73
TUNEL-Assay									
(Anteil TUNEL-positiver Zellen in %)									
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aktiver Caspase-3-Assay									
(Anteil Caspase-3-Aktiver Zellen in %)									
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Relative MMP1-Expression									
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	n.d.
T	n.d.	0,10	n.d.	0,15	0,25	1,06	9,22	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	46,53	0,42	9,78	4,02	0,43	2,20	8,34	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	3,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	0,94	6,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	0,14	7,93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Relative MMP13-Expression									
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	n.d.
T	n.d.	0,05	n.d.	0,36	0,05	0,35	2,03	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	43,11	1,89	3,00	11,82	1,59	0,42	1,14	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	1,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	0,08	0,58	1,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	0,09	1,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Abkürzungen: Knie-TEP, Knie-Totalendoprothese, m, männlich; w, weiblich; Gon., Gonarthrose; V.g.; Vagusgonarthrose; Hs.; Hemischlitten; f.V.g., fortgeschrittene Vagusgonarthrose; li, links; re, rechts; n.d., nicht dürchgeführt.

Versuchs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Relative COX2-Expression									
K	n.d.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.
T	n.d.	2,73	1,77	1,47	2,05	39,12	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	0,26	n.d.	0,38	1,42	1,64	n.d.	0,92	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	0,89	1,60	0,49	1,67	n.d.	0,39	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	0,84	2,37	0,98	2,43	n.d.	0,50	n.d.
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	1,47	n.d.	4,19	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	0,58	n.d.	1,40	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	0,58	n.d.	0,33	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Relative PTGES-Expression									
K	n.d.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.
T	n.d.	9,78	1,02	2,03	2,25	9,34	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	0,99	0,03	1,31	1,27	1,14	n.d.	1,35	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	9,54	0,64	2,83	0,82	0,76	n.d.	1,69	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	0,73	2,08	1,41	0,74	n.d.	1,84	n.d.
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	3,06	n.d.	1,41	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	0,74	n.d.	0,78	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1,16	n.d.	0,22	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PGE2-Freisetzung (in pg/mg Knorpel)									
K	7,06	84,22	3,19	49,16	29,22	11,08	17,38	24,31	10,97
T	60,54	179,78	164,04	78,31	124,34	275,11	110,23	n.d.	76,64
IL-6/sIL-6R	25,53	26,28	2,64	124,69	27,67	13,27	3,87	30,46	2,84
T + IL-6/sIL-6R	19,52	79,14	72,53	33,02	35,50	95,37	106,30	6,52	34,21
T + IL-6/sIL-6R + S	47,28	108,15	87,61	40,61	74,29	692,35	55,45	21,38	27,52
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	36,34	n.d.	30,85	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	23,73	n.d.	79,76	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	15,03	n.d.	11,14	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Relative iNOS-Expression									
K	n.d.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.
T	n.d.	14,83	2,03	0,58	0,22	0,53	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	0,49	0,24	0,70	1,01	1,33	n.d.	0,39	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	1,28	1,57	0,38	2,33	n.d.	3,26	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	0,71	9,21	0,26	4,04	n.d.	0,93	n.d.
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	439,59	n.d.	33,98	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1,51	n.d.	0,24	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	12,07	n.d.	2,08	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Versuchs-Nr.	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Relative COX2-Expression									
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
T	n.d.	1,20	n.d.	3,63	4,32	1,13	1,91	1,77	19,28
IL-6/sIL-6R	4,01	0,91	0,64	3,30	4,98	0,09	0,74	1,21	2,85
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,43	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	51,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,77	n.d.	n.d.	7,05	7,72
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,49	n.d.	n.d.	4,65	28,40
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,03	n.d.	n.d.	8,30	111,55
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	0,02	1,17	1,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	1,53	0,86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,95	n.d.	2,02	n.d.
Relative PTGES-Expression									
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.
T	n.d.	0,37	n.d.	1,19	0,85	2,63	1,85	3,24	n.d.
IL-6/sIL-6R	2,22	1,35	3,77	3,05	0,78	0,63	1,51	1,71	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,99	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	1,47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,80	4,40	n.d.	4,41	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,88	2,36	n.d.	3,46	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,79	1,85	n.d.	4,80	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	0,22	0,88	1,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	0,79	2,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,96	n.d.	1,61	n.d.
PGE2-Freisetzung (in pg/mg Knorpel)									
K	0,00	8,65	4,81	24,55	3,53	47,32	15,62	6,10	0,12
T	74,50	37,17	n.d.	117,57	76,35	12,22	170,20	59,17	8,36
IL-6/sIL-6R	7,90	6,57	1,15	9,20	12,39	23,31	13,80	6,74	0,10
T + IL-6/sIL-6R	127,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	87,73	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	60,97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	200,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,04	32,62	n.d.	18,94	0,23
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,92	147,55	n.d.	8,09	40,65
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,18	35,82	n.d.	56,67	56,16
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	11,72	10,33	2,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	22,37	2,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	428,55	n.d.	108,70	n.d.
Relative iNOS-Expression									
K	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
T	n.d.	2,34	n.d.	0,54	0,43	1,08	1,66	0,38	0,69
IL-6/sIL-6R	8,65	1,20	18,59	1,80	1,52	0,37	1,19	1,93	2,09
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,57	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	517,95	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,41	1,13	n.d.	144,93	16,35
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,35	8,38	n.d.	122,93	13,16
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,15	1,95	n.d.	100,59	39,11
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	0,09	0,99	4,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	1,99	3,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	25,74	n.d.

Versuchs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NO-Freisetzung (Nitritgehalt in µM/g Knorpel)									
K	54,91	35,99	23,73	16,97	19,73	15,47	5,44	23,21	11,95
T	25,94	16,48	41,29	37,46	60,38	28,78	15,23	n.d.	23,54
IL-6/sIL-6R	27,48	25,14	45,81	35,50	31,82	23,09	6,90	11,20	24,82
T + IL-6/sIL-6R	12,08	46,37	38,37	30,14	27,79	22,23	9,88	13,20	14,67
T + IL-6/sIL-6R + S	17,99	20,83	40,43	15,90	26,88	172,42	17,67	15,93	19,27
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	348,36	n.d.	101,55	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	36,35	n.d.	17,49	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	18,27	n.d.	9,88	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Relative SOD2-Expression									
K	n.d.	n.d.	n.d.	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.
T	n.d.	n.d.	n.d.	0,74	0,38	0,39	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	1,20	0,77	0,91	n.d.	0,31	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	1,43	0,54	0,30	n.d.	0,84	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	1,67	0,38	1,07	n.d.	1,34	n.d.
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,50	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1,75	n.d.	0,22	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1,65	n.d.	0,39	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-1ß, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	63,68	31,17	39,05	59,38	28,69	40,12	19,09	55,28	n.d.
T	0,00	0,00	0,00	26,55	48,10	35,80	41,05	n.d.	40,62
IL-6/sIL-6R	61,21	58,01	24,98	0,00	23,45	16,08	0,00	45,21	27,93
T + IL-6/sIL-6R	43,98	57,94	21,75	33,87	0,00	33,99	33,71	0,00	27,94
T + IL-6/sIL-6R + S	22,42	26,44	24,90	28,24	27,56	37,07	52,03	0,00	24,39
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	696,55	n.d.	240,71	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	121,76	n.d.	29,70	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	38,28	n.d.	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-1ß, ELISA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	98,25	140,41	n.d.	85,71	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	113,21	90,15	n.d.	68,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	111,55	1001,70	n.d.	90,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	122,27	165,03	n.d.	59,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	312,02	364,86	n.d.	53,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Versuchs-Nr.	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
NO-Freisetzung (Nitritgehalt in µM/g Knorpel)									
K	27,12	34,18	37,83	5,53	9,35	28,73	1,31	65,46	77,08
T	19,01	15,44	n.d.	40,74	15,15	-0,62	-1,27	68,45	45,01
IL-6/sIL-6R	18,71	18,30	70,36	1,35	22,26	42,29	-7,77	55,09	64,75
T + IL-6/sIL-6R	20,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	56,46	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	25,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	317,64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	161,96	437,81
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	173,58	326,87
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	114,41	219,48
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	18,47	9,91	31,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	5,18	11,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,81	n.d.	138,94	n.d.
Relative SOD2-Expression									
K	n.d.	1,00	1,00	1,00	1,00	n.d.	1,00	n.d.	n.d.
T	n.d.	0,70	n.d.	0,48	0,11	n.d.	0,49	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	1,80	3,94	1,57	0,52	n.d.	1,64	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	3,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,84	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + TNFα + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	1,49	4,98	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	0,66	8,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-1ß, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	39,40; 33,60	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	0,00	36,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	0,00	25,64	30,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	34,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	14204	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	27,71	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	32,28	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-1ß, ELISA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Versuchs-Nr.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Freisetzung von IL-6, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	0	202	135	498	591	775	280	954	n.d.
T	69	4899	441	1973	102	211	125	2019	2168
IL-6/sIL-6R	19116	3769	2201	164215	3315	5564	1670	4244	1737
T + IL-6/sIL-6R	16307	4807	2943	3743	4703	7137	1722	4914	4482
T + IL-6/sIL-6R + S	9659	6236	1360	3212	1513	297061	3369	5418	3594
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	242882	n.d.	52010	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	129823	n.d.	205438	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	217992	n.d.	36997	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-8, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	191	352	1440	1314	1958	1493	656	6641	364
T	609	7192	700	4100	278	603	2325	3934	2153
IL-6/sIL-6R	1538	227	525	57880	1007	16936	729	2074	321; 1183
T + IL-6/sIL-6R	1761	225	1154	259	165	4536	3424	1644	1413
T + IL-6/sIL-6R + S	2297	23270	374	307	286	148322	1105	2199	1666
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	156107	n.d.	96846	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1233	n.d.	1668	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	1536	n.d.	346	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von TNFα, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	42,58	42,76	55,79	43,35	27,18	0,00	0,00	0,00	0,00
T	0,00	0,00	0,00	28,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL-6/sIL-6R	0,00	0,00	37,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T + IL-6/sIL-6R	50,87	0,00	0,00	52,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
T + IL-6/sIL-6R + S	39,00	0,00	58,72	0,00	35,74	0,00	50,89	0,00	0,00
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	31,78	n.d.	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	n.d.	68,56	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	22,16	n.d.	0,00	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von TNFα, ELISA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	3,82	-8,83	n.d.	0,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	1,26	3,49	n.d.	1,23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	1,54	10,05	n.d.	1,91	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	1,60	-95,37	n.d.	1,85	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	6,06	-177,58	n.d.	1,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-10, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	0,00	0,00	73,74	62,66	55,18	25,87	36,73	64,77	n.d.
T	31,01	56,09	0,00	0,00	0,00	39,42	47,04	41,87	29,05
IL-6/sIL-6R	54,93	0,00	0,00	44,00	41,72	25,64	29,69	40,45	33,51
T + IL-6/sIL-6R	35,44	53,00	31,74	27,84	0,00	0,00	0,00	0,00	23,76
T + IL-6/sIL-6R + S	0,00	28,73	0,00	23,55	27,21	101,63	51,40	0,00	32,04
IL1ß	n.d.	n.d.	n.d.	85,12	n.d.	60,37	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	n.d.	39,49	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	n.d.	n.d.	0,00	n.d.	25,44	n.d.	n.d.	n.d.

Versuchs-Nr.	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
Freisetzung von IL-6, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	95,69 ; 0	1213	284	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	33	687	n.d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	1685	1291	2311	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	1579	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	2176	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	298308	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	6983	3119	3766	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	33372	41519	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-8, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	364 ; 130	7511	7178	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	196	2758	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	1183	614	122	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	123	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	518	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	148944	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	213	6004	166	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	838	105	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von TNFα, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	0,00 ; 0,00	0,00	63,30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	66,73	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	0,00	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	41,66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	593,80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	48,36	17,27	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von TNFα, ELISA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Freisetzung von IL-10, CBA (in pg/ml pro g Knorpel)									
K	36,06; 50,84	52,09	37,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T	62,60	59,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL-6/sIL-6R	0,00	34,65	35,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R	37,78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL-6/sIL-6R + S	25,61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1ß	n.d.	1086,63	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 100 ng/ml)	49,05	20,68	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (je 500 ng/ml)	n.d.	0,00	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Versuchs-Nr.	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Freisetzung von RANTES, CBA									
(in pg/ml pro g Knorpel)									
Kontrolle	59,87	43,67	49,51	43,35	37,25	17,61	25,91	50,95	n.d.
Trauma	30,15	35,60	25,78	28,74	37,56	49,86	51,63	31,47	31,61
IL6/sIL6R (50)	49,04	37,44	36,99	28,47	47,72	20,42	34,78	36,35	17,47
T + IL6/sIL6R (50)	39,05	29,05	28,51	37,70	26,94	21,39	42,93	27,18	20,68
T+ IL6/sIL6R (50) + S	35,24	34,32	23,39	32,14	23,75	41,65	71,05	43,04	26,32
IL1 (10)	n.d.	n.d.	n.d.	183,57	n.d.	33,13	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (100)	n.d.	n.d.	n.d.	36,20	n.d.	40,11	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (500)	n.d.	n.d.	n.d.	21,56	n.d.	11,52	n.d.	n.d.	n.d.

Versuchs-Nr.	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**
Freisetzung von RANTES, CBA									
(in pg/ml pro g Knorpel)									
Kontrolle	48,37; 27,26	88,47	45,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Trauma	53,33	56,69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (50)	23,02	30,84	24,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T + IL6/sIL6R (50)	70,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
T+ IL6/sIL6R (50) + S	56,44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL1 (10)	n.d.	168,38	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (100)	26,47	41,02	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IL6/sIL6R (500)	n.d.	63,76	0,00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Patientenbefragungsbögen

Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Orthopädie,
Oberer Eselsberg 45, 89081Ulm

Klinik für Orthopädie

Prof. Dr. Heiko Reichel
Ärztlicher Direktor

RKU – Universitäts- und
Rehabilitationskliniken Ulm gGmbH
Oberer Eselsberg 45
89081 Ulm
Telefon: 0731 / 177-0
Telefax: 0731 / 177-1169

Ulm, den

Patienteninformation

Forschungsprojekt:
Knorpeltrauma und posttraumatische Inflammationsreaktion

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Knorpelverletzungen stellen einen erheblichen Risikofaktor für die Entwicklung einer Arthrose dar. Wie das mechanische Trauma zur Schädigung des Knorpels führt ist bisher jedoch nicht im Detail bekannt. Es gibt Hinweise, dass neben direkten mechanischen Einflüssen auch eine nachfolgende Entzündungsreaktion und die Auslösung eines „Selbstmordprogramms" der Knorpelzellen das Ausmaß der resultierenden Schädigung bestimmen. Hierdurch könnten sich neue Behandlungsmöglichkeiten ergeben, den resultierenden Knorpelschaden zu begrenzen. Im Rahmen des oben genannten Forschungsprojekts sollen deshalb das Zusammenwirken mechanischer Verletzung und Entzündungsreaktion näher untersucht, beteiligte Signalwege identifiziert und neue Möglichkeiten der phamakologischen Behandlung getestet werden.

Im Rahmen des bei Ihnen notwendigen orthopädisch-chirurgischen Eingriffs (Implantation einer Endoprothese) müssen Gewebeanteile des Gelenkes (Anteile des gelenknahen Knochens, Knorpel und Gelenkschleimhaut) entfernt werden, die normalerweise zu verwerfen sind. Wir möchten Sie um Ihr Einverständnis bitten, diese Gewebeanteile sowie Restblut der Blutentnahme vor der Operation für wissenschaftliche Untersuchungen weiter zu verwenden. Die Untersuchungen werden in den Laboratorien der Universitätsklinik Ulm durchgeführt.

Mit geeigneten Methoden können wir an dem entfernten Gewebe bzw. daraus isolierten Zellen die Konsequenzen mechanischer Verletzung bzw. die Einflüsse von Entzündungsfaktoren in der Gewebe- bzw. Zellkultur untersuchen. Hierzu werden mikroskopische und biochemische Analysen zur Stoffwechselaktivität sowie zum Überleben der Zellen durchgeführt. Darüber hinaus wird der Einfluss pharmakologischer Substanzen getestet mit dem Ziel, Schädigungsmechanismen zu hemmen. Schließlich sollen auch Untersuchungen zur Bedeutung bestimmter Variationen der Erbsubstanz entzündungsrelevanter Gene im Hinblick auf das Risiko für die Entwicklung von Arthrose durchgeführt werden.

Da für die Untersuchungen nur überschüssiges Restgewebe verwendet wird, das beim operativen Eingriff nicht mehr verwendet werden kann und normalerweise verworfen würde, sind die Untersuchungen völlig unabhängig von der bei Ihnen vorliegenden Erkrankung und beeinflussen deshalb auch nicht Ihre persönliche Behandlung.

Mit Ihrem Einverständnis werden wir für das Forschungsvorhaben nur Alter, Geschlecht und erkrankungsrelevante Daten erfassen. Die Speicherung dieser Daten erfolgt grundsätzlich in anonymisierter Form, die Möglichkeit der Rückverschlüsselung wird ausgeschlossen.

Da sämtliche Untersuchungen an irreversibel anonymisierten Proben durchgeführt werden ist eine Auskunft über Ergebnisse die speziell an Zellen aus von Ihnen entnommenem Gewebe erhalten werden nicht möglich.

Freiwilligkeit

An diesem Forschungsprojekt nehmen Sie freiwillig teil. Ihre Bereitschaft oder Nicht-Bereitschaft zur Teilnahme hat keinerlei Auswirkungen auf Ihre medizinische Betreuung. Ein späterer Widerruf Ihres Einverständnisses ist jedoch nicht möglich, da aufgrund der irreversiblen Anonymisierung der Proben eine Vernichtung zu einem späteren Zeitpunkt nicht möglich ist.

Erreichbarkeit des Projektleiters

Sollten Sie später Fragen zu den geplanten Untersuchungen, die angewendeten Verfahren und ihre Bedeutung haben so können Sie sich jederzeit an Herrn Prof. Dr. R. Brenner (0731/500-63280) wenden.

Schweigepflicht/Datenschutz

Alle Personen, welche Sie im Rahmen dieses Projekts betreuen, unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und sind auf das Datengeheimnis verpflichtet.

Die studienbezogenen Untersuchungsergebnisse sollen in anonymisierter Form in wissenschaftlichen Veröffentlichungen verwendet werden. Soweit es zur Kontrolle der korrekten Datenerhebung erforderlich ist, dürfen autorisierte Personen (z.B.: des Auftraggebers, der Universität) Einsicht in die studienrelevanten Teile der Krankenakte nehmen. Sofern zur Einsichtnahme autorisierte Personen nicht der oben genannten ärztlichen Schweigepflicht unterliegen, stellen personenbezogenen Daten, von denen sie bei der Kontrolle Kenntnis erlangen, Betriebsgeheimnisse dar, die Geheim zu halten sind.

Ulm, ...

(Datum) Name des/der aufklärenden Arztes/Ärztin

Universitätsklinikum Ulm

Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Orthopädie,
Oberer Eselsberg 45, 89081Ulm

Klinik für Orthopädie

Prof. Dr. Heiko Reichel
Ärztlicher Direktor

RKU –Universitäts- und
Rehabilitationskliniken Ulm gGmbH
Oberer Eselsberg 45
89081 Ulm
Telefon: 0731 / 177-0
Telefax: 0731 / 177-1169

Ulm, den

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

Forschungsprojekt:
Knorpeltrauma und posttraumatische Inflammationsreaktion

Inhalt, Vorgehensweise, Risiken und Ziel des obengenannten Forschungsprojektes hat mir Dr. ..... ausreichend erklärt.

Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen und habe hierauf Antwort erhalten.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich für oder gegen die Teilnahme am Projekt zu entscheiden.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Ich willige in die Teilnahme am Forschungsprojekt ein.

.....
(Name des Patienten)

Ulm, ...
Datum (Unterschrift des Patienten)

Information und Einwilligungserklärung zum Datenschutz

Bei wissenschaftlichen Studien werden persönliche Daten und medizinische Befunde über Sie erhoben. Die Speicherung, Auswertung und Weitergabe dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor Teilnahme an der Studie folgende freiwillige Einwilligung voraus:

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten / Krankheitsdaten auf Fragebögen und elektronischen Datenträgern aufgezeichnet und ohne Namensnennung verarbeitet werden.

2. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass eine autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Person (z.B.: des Auftraggebers, der Universität) in die erhobenen personenbezogenen Daten Einsicht nimmt, soweit dies für die Überprüfung des Projektes notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Arzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

Ulm, ...
Datum (Unterschrift des Patienten)

Universitätsklinikum Ulm
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Ulm

Vorsitzender des Aufsichtsrates:
Dr. Hartmut Schrade

Vorstand: Prof. Dr. Reinhard Marre (Vors.),
Rainer Schoppik (Stellv.), Prof. Dr. Klaus-
Michael Debatin, Anna Maria Eisenschink,
Prof. Dr. Thomas With

Baden-Württembergische Bank Ulm
Kto.-Nr. 7439500404, BLZ 600 501 01
Sparkasse Ulm
Kto.-Nr. 106 478, BLZ 630 500 00

Universitätsklinikum Ulm

Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Orthopädie,
Oberer Eselsberg 45, 89081Ulm

Klinik für Orthopädie

Prof. Dr. Heiko Reichel
Ärztlicher Direktor

RKU –Universitäts- und
Rehabilitationskliniken Ulm gGmbH
Oberer Eselsberg 45
89081 Ulm
Telefon: 0731 / 177-0
Telefax: 0731 / 177-1169

Ulm, den

Übereignungsvertrag

Forschungsprojekt:
Knorpeltrauma und posttraumatische Inflammationsreaktion

Zwischen der **Universität Ulm**, handelnd für die Abteilung Orthopädie
vertreten durch Herrn Prof. Dr. Heiko Reichel (Ärztlicher Direktor)

und Frau/Herr .....

wird folgendes vereinbart:

1. Frau/Herr .....

   wird der Universität Ulm das Eigentum an folgendem Körpermaterial unentgeltlich übertragen:
   Restgewebe von Knochen, Knorpel und Gelenkschleimhaut, wenn dieses im Rahmen eines orthopädisch-chirurgischen Eingriffs notwendig entfernt werden muss sowie Restblut der Routineblutentnahme.

2. Die Universität wird das Körpermaterial zu wissenschaftlichen Untersuchungen verwenden, die ein besseres Verständnis von Verletzungsfolgen des Gelenkknorpels sowie eine Weiterentwicklung der Möglichkeiten zur Behandlung von Knorpelverletzungen zum Ziel haben. Hierzu sollen mittels mikroskopischer und biochemischer Untersuchungen in Gewebe-/Zellkultur die Einflüsse mechanischer Schädigung bzw. Entzündungsfaktoren sowie die Möglichkeiten einer gezielten pharmakologischen Beeinflussung analysiert werden. Untersuchungen zu Variationen der Erbsubstanz entzündungsrelevanter Gene sollen helfen, genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arthrose besser zu verstehen.

Eine kommerzielle Verwendung ist ausgeschlossen. Die Anonymität des Spenders bleibt gewahrt. Mit der EDV-mäßigen Verarbeitung der bei mir im Rahmen des obengenannten Vertrages erhobenen Daten bin ich einverstanden.

Ulm, den.....

....

Unterschrift: Arzt Unterschrift: Patient

Universitätsklinikum Ulm
Anstalt des öffentlichen Rechts
Sitz Ulm

Vorsitzender des Aufsichtsrates:
Dr. Hartmut Schnede

Vorstand: Prof. Dr. Reinhard Marre (Vors.),
Reiner Schoppik,
Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin, Anna Maria
Eisenschink, Prof. Dr. Thomas Wirth

Baden-Württembergische Bank Ulm
Kto.-Nr. 7439500404, BLZ 60050101
Sparkasse Ulm
Kto.-Nr. 106 478, BLZ 630 500 00

Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Rolf Brenner, Leiter der Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen, für die Überlassung des hochaktuellen und interessanten Themas der vorliegenden Promotion, seiner konstruktiven Ideen, sowie für die großzügige Bereitstellung seines Labors zur Durchführung der Experimente, bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. biol. hum. Helga Joos für ihre vorbildliche Betreuung während der gesamten Durchführung meiner Arbeit. Ich danke ihr sehr für die Bereitstellung weiterführender Literatur, ihrer wertvollen Ratschläge und der kritischen und ideenreichen Durchsicht des vorliegenden Manuskripts.

Bei Frau Brunnhilde Amann möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der ELISA und Gries-Assay Analysen und ihrer zahlreichen lehrreichen Ratschläge bedanken.

Auch bei Frau Dipl. Biol. Cathrin Hogrefe möchte ich mich für die tolle Einarbeitung in die Experimente und ihre stets freundliche Unterstützung bei allen meinen Fragen rund um die experimentelle Arbeit ganz herzlich bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herr PD Dr Ralf Schubert und seinem Laborteam von der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main für die Messung der CBA-Ergebnisse bedanken.

Der Rückhalt in der Abteilung, das freundschaftliche Miteinander und das positive Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe haben meine Motivation zusätzlich gestärkt, wofür ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeiter/innen der Sektion Biochemie der Gelenks-und Bindegewebserkrankung sehr herzlich bedanken möchte. Jeder einzelne Mitarbeiter/in stand mir bei Fragen mit Rat und Tat zur Seite.

Bei der Beantwortung statistischer Fragen und der Findung der optimalen Darstellungsform der Resultate möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Epidemiologie und Medizinische Biometrie der Universität Ulm bedanken.

Weiterer Dank gilt ausdrücklich meinen Eltern, Stefan und Karin Zielen, die für alle meine kleinen und großen Sorgen stets ein offenes Ohr hatten und meinem so manchmal verloren geglaubten Ehrgeiz wiedererwecken konnten.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Freunden und Bekannten bedanken, die mir Mut zugesprochen haben, die Doktorarbeit zeitnah fertig zu stellen und für mich da waren.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.