Chirurgische Klinik und Poliklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg – Eppendorf aus der Abteilung für Unfall-und Wiederherstellungschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med.J.M. Rueger

Dissertation

Untersuchungen zur Rolle des Plasminogens beim Abbau der Knorpelmatrix durch latente Matrixmetalloproteinasen

zur Erlangung des Grades eines doktor medicinae (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von Dietrich v. Stechow aus Berlin

Hamburg 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg: 10.12.1999

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg: 18.12.1999

Sprecher: Prof. Dr. J. M. Rueger

Referent: PD Dr. N.M. Meenen

Korreferent: Prof. Dr. G. Wening

<u>Inhaltsverzeichnis</u>

1.	Einleitung	8
1.1	Die Matrixmetalloproteinasen (MMP)	9
1.1.2	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP)	11
1.1.3 1.1.3.1 1.1.3.2 1.1.3.3	Der Mechanismus der schrittweisen Aktivierung Die Cysteinswitch-Hypothese Die Zelloberflächenaktivierung von Progelatinase A (Pro MMP-2) Intrazelluläre Aktivierungsmechanismen	11 12 12 12
1.2 1.2.1 1.2.2 1.2.3 1.2.4 1.2.5	Das Plasminogenaktivierungsystem Das Plasminogen - Struktur und Funktion Die Plasminogenaktivatoren Der uPA-Rezeptor Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren Die Komponenten des Plasminogenaktivierungs- sytems im Knorpel	13 14 14 15 16
1.3	Ziele der Arbeit	17
2	Material und Methode	20
2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4	Material Chemikalien und Enzyme Medien Plastikmaterial Tiere	20 20 20 20 20
2.2	Geräte	21
2.3	Methoden I: Chondrozytenzellkulturen	22
2.3.1 2.3.1.1 2.3.1.2	lsolierung und Kultivierung von Chondrozyten High-Density-Kulturen Herstellung des plasminogen-freien fötalen Kälberserums	22 23 23
2.3.2	Nachweis von Plasminogen und plasminogen-ähnlichen Zymogenen Radialdiffusion	23 23

Seite

2.3.2.1Radialdiffusion232.3.2.2Zymographie23

2.3.2.3	Westernblotting	24 Soito
2.3.3	Nachweis von Plasminogen und plasminogen-ähnlichen Zymogenen in Kulturmedien durch:	24
2.3.3.1 2.3.3.2 2.3.3.3	Radialdiffusion Zymographie Westernblotting	24 24 24
2.3.4	Bestimmung des pl des Plasminogens in der Gelenkflüssigkeit	25
2.4	Methode II: Untersuchungen zu Diffusibilität des Plasminogens im Knorpel	25
2.4.1	¹²⁵ J-Markierung von Plasminogen	25
2.4.1.1 2.4.1.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität Proteinbestimmung nach Breadford	26 27
2.4.2	Präparation der Patellae	27
2.4.3	Histologische Untersuchung der Patella	28
2.4.4	Autoradiographie	28
2.5	Methode III: Molekularbiologische Untersuchungen der Chondrozyten	29
2.5.1 2.5.1.1	Isolierung von Chondrozyten aus Rinderknorpel Stimulierung der Chondrozyten mit PMA und	29
2.5.1.2 2.5.1.3	Vitamin-A-Säure Herstellung von Knorpelpulver Chondrozytenisolierung aus humanem	30 30
2.5.1.3.1	Arthroseknorpel Stimulierung der Chondrozyten mit PMA und Vitamin-A-Säure	30 31
2.5.2	Zellinien und Gewebe für die molekularbio- logischen Untersuchungen	31
2.5.3 2.5.3.1 2.5.3.2 2.5.3.3 2.5.3.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Theoretische Grundlagen Qualitätsicherung der PCR RNA-Isolierung nach Eurogentec RNA-Isolierung aus Zellkulturen	32 32 33 34 34

		Seite
2.5.3.3.2	RNA-Isolierung aus Geweben und Knorpelpulver	34
2.5.3.4	Insta Pure Plus Behhandlung zur Reinigung	2.4
2.5.3.5 2.5.3.6	der RNA Quantitative Bestimmung des RNA-Gehaltes RT-PCR nach Stratagene	34 35 35
2.5.4	PCR-Analyse	36
2.5.4.1	Amplifikations und Hybridisierungsprimer des RT-PCR Assays	37
3.	Ergebnisse	38
3 1	Chondrozytenzellkulturen	38
3.1.1	Radialdiffusion	38
3.1.2	Zymographie	40
3.1.3	Western Blotting	41
3.2	Isoelektrische Fokussierung	41
3.3	¹²⁵ J-Markierung von Plasminogen	42
3.3.1	Ergebnis der spezifischen Aktivitäts- bestimmung	43
3.4	Autoradiographie	45
3.5	Histologische Untersuchungen	46
3.6	Molekularbiologische Untersuchungen	52
3.6.1	Definition der Proben	52
3.0.2	mRNA	53
3.6.3	Zusatzbehandlung von negativen Proben	53
3.6.4	Untersuchung der Chondrozyten auf die Expression von Plasminogen	54
3.6.5	Überprüfung der Methoden	54
3.6.6	Neuauftragung ausgewählter Plasminogen PCR Proben	54
3.6.7	Plasminogen Shooting PCR	54
3.6.8	Untersuchung der Expression des u-PA und des u-PA-Rezeptors	55
4.	Diskussion	56

Seite

4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5	Diskussion der Methode Radialdiffusion Zymographie zum Nachweis von Plasminogen Western-Blotting Isoelektrische Fokussierung des Plasminogens Diffusion von ¹²⁵ J-Plasminogen in intaktem	56 56 56 56 57
4.2	Gelenkknorpel Molekularbiologische Untersuchungen	57 58
4.3 4.3.1	Diskussion der Ergebnisse Alternative Abbaumechanismen	59
	der Extrazellulärenmatrix	67
5.	Zusammenfassung	69
6.	Literaturverzeichnis	71

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>

Aqua dest.	Destiliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP, CTP, GTP, TTP	Adenosintriphosphat, Cytosintri-
	phosphat, Guanidintriphosphat,
	Thymidintriphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
cDNA	copy DNA
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq
CI	Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
DMEM	Dulbecco's Modifikation von
	Eagle´s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent
	assay
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GLB	Gel loading buffer
_	(Auftragspuffer)
h	Stunde
IFN	Interferon
IL	Interleukin
	Liter
M	Mol
m	Milli
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	Matrixmetalloproteinase
μα	10° Ci, 1μ Ci = 37000 Bq
h ⁻	Mikro
min	Minuten
n	nano Ostisska Diskta
UD DD	Optische Dichte
PB2	phosphatgepufferte Salziosung
DOD	(phosphate buffered saline)
	Polymerase-Kellen-Reaklion
	Photoilour 12-Wynsial-13-Aceial
	Resultionshagment
	RIDUNUKIERSE
KNA, MKNA, CKNA, IKNA	RIDONUKIEINSAULE
202	Natriumdodecyisultat

TGF TIMP	Transforming Growth Factor Tissue Inhibitor of Metallo-
	proteinases
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
Tris	Tri-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Einheit (unit)
Vol	Volumen

Aminosäuren und ihre Abkürzungen

Ala	Α
Arg	R
Asn	Ν
Asp	D
Cys	С
Gİn	Q
Glu	E
Gly	G
His	Н
lle	I
Lys	L
Met	Μ
Phe	F
Pro	Р
Ser	S
Thr	Т
Trp	W
Tyr	Y
Val	V
	Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Lys Met Phe Pro Ser Thr Tyr Val

<u>1. Einleitung:</u>

Alle Zellen in einem Gewebeverband stehen in Kontakt mit einem komplexen Gerüst von sezernierten Makromolekülen, das man die extrazelluläre Matrix nennt. Diese Matrix (ECM) hält die Zellen und das Gewebe zusammen und ermöglicht durch ein gut strukturiertes Netzwerk die Interaktion der Zellen untereinander (1). Dadurch spielt sie eine wesentliche Rolle bei der Form, Funktion, Entwicklung, Migration und Proliferation der einzelnen Gewebe (2,3).

Die extrazelluläre Matrix unterliegt einem konstanten Auf- und Abbau. Die exakte Regulation dieses Umbaus ist die Voraussetzung für den physiologischen Ablauf der verschiedenen Funktionen der ECM (4,5).

Kommt es zu einer Schädigung des Gewebes, verfügt die ECM über verschiedene Möglichkeiten der Regeneration (6). Die Fähigkeit der ECM einmal entstandene Schäden zu reparieren ist in den einzelnen Geweben sehr unterschiedlich (7,8,9). Ein Gewebe mit einer ausgesprochen geringen Regenerationsfähigkeit ist das Knorpelgewebe (10,11). Diese Arbeit konzentriert sich auf die Abbauvorgänge der ECM und die sie beeinflussenden Prozesse im Knorpelgewebe.

Gegenwärtig sind fünf verschiedene Stoffwechselwege bekannt, die zum Abbau der ECM führen(12):

- 1. der durch Matrixmetalloproteinasen (MMP),
- 2. der durch Plasmin (PLN),
- der durch polymorphkernige (PMN) Leukozyten (Serinproteinasen),
- 4. der durch Phagozytose (lysosomales Kathepsin)
- 5. der durch Cysteinproteinasen

Die Abbau der ECM durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) im Knorpelgewebe und die diesem Abbau vorausgehenden Aktivierungsvorgänge sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

1.1 Die Matrixmetalloproteinasen

Es herrscht Übereinstimmung, daß chondrozytäre Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine Hauptrolle im Mechanismus des Knorpelabbaus bei chronisch inflammatorischen und degenerativen Gelenkerkrankungen spielen (13,14). Die MMPs, die auch Matrixine genannt werden, sind dabei wesentlich am Umsatz der ECM-Komponenten Kollagen, Proteoglykan,Elastin, Laminin und Fibronektin beteiligt (15,16,17).

Die bisher charakterisierten MMP zeichnen sich durch eine große Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer biochemischen Eigenschaften aus(12): alle MMP mit Ausnahme von Matrilysin (MMP-7) bestehen aus mindestens drei charakteristischen Hauptbestandteilen: einer Propeptidgruppe aus 77-87 Aminosäuren, einer katalytischen Gruppe aus 162-173 Aminosäuren und einer C-terminalen Gruppe aus 202-213 Aminosäuren. Letztere hat strukturelle Ähnlichkeiten mit Hämopexin und Vitronektin (18). MMP-7 verfügt nur über die ersten beiden der genannten Komponenten.

Gegenwärtig sind 17 verschiedene MMPs in Wirbeltieren beschrieben(15):

Enzym	MMP Nr.	Matrixsubstrat oder	
1. Kollagenasen			
Interstitielle	MMP-1	Kollagen-I, -II, -III, -VII und -X	
Kollagenase		Aggrecan, Gelatine	
Neutrophilen-	MMP-8	Kollagen-I, -II und -III,	
kollagenase		Aggrecan, link protein	
Kollagenase 3	MMP-13	Kollagen-I, -II, -III	
Kollagenase 4	MMP-18	Kollagen-I	
2. Gelatinasen			
Gelatinase A	MMP-2	Gelatine, Kollagen-I, -IV, -V, -VII, -X und -XI, Fibronektin, Aggrecan, Elastin	
Gelatinase B	MMP-9	Gelatine, Aggrecan, Elastin	
Stromelysine			
Stromelysin 1	MMP-3	Aggrecan, Gelatine, Fibronektin, Laminin	
Stromelysin 2	MMP-10	Aggrecan, Fibronektin, Kollagen-IV	
Membrantyp MMPs			
MT1-MMP	MMP-14	Kollagen-I, -II, -III,	

		Fibronektin,		
MT2-MMP	MMP-15	unbekannt		
MT3-MMP	MMP-16	aktiviert proMMP-2		
MT4-MMP	MMP-17	unbekannt		
Andere				
Matrilysin	MMP-7	Aggrecan, Fibronektin, Laminin, Elastin		
Stromelysin 3	MMP-11	insgesamt nur schwach:		
		Fibronektin, Aggrecan		
Metalloelastase	MMP-12	Elastin		
ohne Namen	MMP-19	unbekannt		
Enamelysin	MMP-20	unbekannt		

Die MMP unterscheiden sich von anderen Metalloproteinasen durch ganz bestimmte Eigenschaften (12,19):

1. MMP werden von den Zellen als latente Vorstufen sezerniert;

2. die inaktiven Vorstufen werden durch Proteinasen und quecksilberhaltige Verbindungen aktiviert;

3. MMP beinhalten eine Cysteingruppe innerhalb der gemeinsamen Sequenz PRCG(V/N)PD(V/L)(A/G), die genau vor dem Abschnitt liegt, der bei der Aktivierung abgetrennt wird;

4. Ein weiteres Charakteristikum ist die zinkbindende Sequenz $\underline{H}EXG\underline{H}X(L/M)G(L/M)X\underline{H}$ in der katalytischen Region;

5. aktive MMP werden von "tissue-inhibitors of metalloproteinases" (TIMP) inhibiert, mit denen sie einen Enzym-Inhibitoren-Komplex im Verhältnis 1:1 eingehen.

In Gewebe, das sich in einem physiologischen steady-state Zustand befindet lassen sich nur sehr geringe MMP-Aktivitäten nachweisen. Dies trifft auch für Chondrozyten zu (20).

Erst durch verschiedene Faktoren, wie Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren werden von den Chondrozyten proMMPs (und aus diesen MMPs) und Serinproteinasen gebildet (15).

Die Aktivierung und die Funktionen der MMPs unterliegen durch einen Rückkopplungsmechanismus einer engmaschigen Kontrolle durch proMMPs sowie verschiedener Bestandteilen der extrazellulären Matrix (15).

Neben den MMPs gibt es die Gruppe der ADAM ("<u>a</u> <u>disintegrin and</u> <u>metalloproteinases"), die unabhängig von den MMPs das Knorpelprotein</u> Aggrecan zerlegen können (21). Im Gegensatz zu den MMPs lassen sich die Mitglieder der ADAM-Familie nicht durch TIMP inhibieren (22).

Nur aktivierte MMPs greifen die Bestandteile der Knorpelzellmatrix (Kollagen, Proteoglykan) an (23). Damit kommt dem Aktivierungsprozeß der MMPs eine entscheidende Bedeutung zu. Der Aktivierungsprozeß umfaßt drei verschieden Mechanismen(12):

- 1. schrittweise Aktivierung
- 2. Aktivierung auf der Zelloberfläche und
- 3. intrazelluläre Aktivierung.

1.1.2 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP)

Gegenwärtig sind vier verschiedene Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP 1-4) beschrieben, die von Bindegewebszellen sezerniert werden (13,19). Allen gemeinsam sind:

- 1.) ein MG von ca. 21 kDa,
- 2.) zwölf Cysteingruppen mit jeweils sechs Disulfidbrücken,
- 3.) jeweils zwei verschiedene Domänen innerhalb des Moleküls.

Eine dieser Domänen dient ausschließlich der Inhibierung, die andere kann an Progelatinasen binden und wird in ihrer Expression von TGF- β 1 und Vitamin-A-Säure stimuliert.

Während TIMP-1 und TIMP-2 in der Lage sind alle aktiven MMPs zu inhibieren, bzw. die Aktivierung von proMMPs zu blockieren (19), liegt TIMP-3 ausschließlich extrazellulär vor und spielt eine Rolle bei der terminalen Differenzierung der Zellen(24). TIMP-4 wird eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der intrazellulären Hämostase zugeschrieben. TIMP-1 ist im Gegensatz zu TIMP-2 durch verschiedene Zytokine in seiner Funktion zu beeinflußen. Für TIMP-2 konnte dies bisher nicht nachgewiesen werden(24,25).

1.1.3 Der Mechanismus der schrittweisen Aktivierung

Die Vorstufen der meisten MMPs können durch Proteinasen und durch nicht-proteolytische Komponenten, wie z. B. SH- aktive Verbindungen (APMA), denaturierende Verbindungen (Harnstoff, SDS) und durch Hitzebehandlung aktiviert werden. Die schrittweise Aktivierung von proMMP-3 durch APMA wurde erstmals von Nagase und Cameron beschrieben (26,27).

Die Aktivierung durch Proteinasen vollzieht sich in einer schrittweisen Abfolge: im ersten Schritt greifen die Aktivatorproteinasen die ihnen zugängliche "bait"-Region in der Mitte des Propeptids an. Dies bewirkt eine Konformationsänderung des Propeptids, was wiederum die endgültige Aktivierung durch eine zweite Proteolyse ermöglicht. Die letzte Reaktion wird üblicherweise nicht von einer Aktivatorproteinase katalysiert, sondern von einer MMP (28). Einige MMPs weisen geringfügige Unterschiede im Aktivierungsvorgang auf, grundsätzlich ist der Ablauf jedoch der Gleiche (27,28,29).

1.1.3.1 Die Cystein-Switch- Hypothese

Die PRCG/V/N)PD-Gruppe, eine der typischen Sequenzen der Matrixmetalloproteinasen , beinhaltet eine SH-Gruppe, die erst in der Lage ist mit einem SH-Reagenz zu reagieren, nachdem Zn^{2+} durch einen Chelator entfernt worden ist. Springman (30) und van Wart (31) vermuteten 1990 unabhängig voneinander, daß die SH-Gruppe des Cysteins der PRCG(V/N)PD-Gruppe mit dem Zn^{2+} des aktiven Zentrums des Enzyms reagiert, wodurch die Anlagerung von Wassermolekülen verhindert wird. In diesem Zustand bleibt das inaktive Zymogen erhalten.

Der entscheidende Schritt dieser Hypothese ist die Dissoziation der Zn^{2+} -Cys Verbindung, welche dem Zn^{2+} erlaubt mit H₂O zu reagieren. Dies ist die wesentliche Voraussetzung der Katalyse. Diese "Cysteinswitch" Hypothese erklärt die Aktivierung der proMMPs durch Proteinasen und nicht-proteolytische Reagenzien , einer mehrstufigen Reaktion, die schließlich zur Aktivierung der proMMPs führt(30).

<u>1.1.3.2 Die Zelloberflächenaktivierung von Progelatinase A</u> (ProMMP-2)

(proMMP-2) Progelatinase А wird vorallem durch Quecksilberbestandteile aktiviert und erweist sich als resistent gegenüber der Aktivierung durch Endopeptidasen (32). MMP-1 und MMP-7 sind in der Lage proMMP-2 zu aktivieren, jedoch nur mit einer sehr geringen Umsatzrate (33). Eine verstärkte Aktivierung von proMMP-2 erfolgt durch MMP-1 in Gegenwart von Heparin oder nach Behandlung mit Concanavalin A, bzw. TGF- β (34). Unter Zusatz von TIMP-2, welches an das C-terminale Ende bindet, wird die proMMP-2 Aktivierung inhibiert. Sato et al. (35) klonten eine "membrane-type" MMP (MT1-MMP) und identifizierten sie als einen Aktivator von proMMP-2 an der Plasmamembran. Gegenwärtig sind vier MT-MMPs bekannt, von denen auch MT3-MMP proMMP-2 aktiviert (36,37). Im Zuge der Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der MT-MMPs konnte Strongin et al. (38) zeigen, daß geringe Mengen von TIMP-2 zu einer verstärkten proMMP-2 Aktivierung führen, wohingegen größere Mengen zu einer Inhibition führen.

1.1.3.3 Intrazelluläre Aktivierungsmechanismen

Für Stromelysin 3 (MMP-11), das zehn zusätzliche Aminosäuren in seiner Propeptidform besitzt (39), konnte lange Zeit kein Aktivator identifiziert werden. Pei et al. zeigten 1995, daß proMMP-11(65kDa) durch eine Golgi-assoziierte Proteinase, Furin, in eine aktive 45 kDa Form überführt wird und als aktives Enzym sezerniert wird (17). Dabei wurde zum ersten Mal gezeigt, das eine Matrixmetalloproteinase intrazellulär aktiviert werden kann. Nach Untersuchungen von Sato et al. dürfte diese intrazelluläre Aktivierung auch für einige MT-MMP zutreffen (35).

Während die proMMP-Aktivierung in vitro vornehmlich durch Quecksilberverbindungen von statten geht, sind in vivo in erster Linie Proteinasen für die Aktivierung verantwortlich. Auch wenn einzelne MMP (Stromelysin -3 und MT1-MMP) intrazellulär aktiviert werden, unterliegen die meisten MMPs einer extrazellulären, schrittweisen Aktivierung (40).

Aktivierungsablauf proMMPs Obwohl der exakte der unter physiologischen und pathologischen Bedingungen noch unklar ist, schreibt man Plasmin eine essentielle Rolle in diesem Prozeß zu. Saksela und Rifkin beschrieben, daß Bindegewebszellen, die man zur Steigerung der MMP-Produktion anregen wollte, nach Stimulation mit IL-1, TNF- α oder TGF- β auch vermehrt die Vorstufe des urokinase-type plasminogen activators (pro-uPA) bilden (41,42). Das sezernierte prouPA bindet an spezifische uPA-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Fibroblasten, Makrophagen und Tumorzellen. Das Rezeptor-gebundene pro-uPA wird schnell in das aktive uPA umgewandelt, welches seinerseits zellgebundenes Plasminogen in Plasmin verwandelt.

Von auf Kollagengelen kultivierten Chondrozyten ist bekannt, das sie nach Stimulation mit IL-1 uPA, tPA und proMMPs sezernieren (43,44). Das Kollagengel wird jedoch nicht angegriffen. Zu dessen Abbau kommt es erst nach Zugabe von Plasminogen in das Kulturmedium. Demnach sollte das Plasminogen -Aktivierungssytem auch in vivo von Bedeutung für die Aktivierung der chondrozytären proMMP sein, wenn die Chondrozyten mit den Komponenten des Aktivierungssystems ausgestattet sind (Plasminogen, Plasminogenrezeptor, uPA, uPA-Rezeptor, PAI-1).

1.2 Das Plasminogenaktivierungsystem

Das fibrinolytische System ist der physiologische Kontrollmechanismus der Fibrinpolymerisation. Das zentrale Protein der fibrinolytischen Kaskade ist Plasminogen, die Konversion von Plasminogen zu Plasmin der entscheidende Schritt in diesem Kontrollmechanismus (45,46). Plasminogen wird dabei von seinen Aktivatoren tPA ("tissue-type plasmingen activator", Gewebsplasminogenaktivator) und uPA (" urokinase-type plasminogen activator", Urokinase) in seine aktive Form Plasmin überführt. Während eine Inhibition der Plasminogenaktivatoren (PA) durch die spezifischen Plasminogenaktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 erfolgt, wird überschüssiges Plasmin häuptsächlich durch α_2 -Antiplasmin inhibiert. Im Gegensatz zu tPA (47) kann uPA von einem spezifischen Rezeptor (uPA-Rezeptor) gebunden und positioniert werden (48,49).

1.2.1 Das Plasminogen - Struktur und Funktion

Die Konzentration des Plasminogen im menschlichen Plasma liegt bei etwa 2µM und erreicht damit die doppelte Konzentration des wichtigsten physiologischen Plasmin- Inhibitors, dem α_2 -Antiplasmin (50) . Das native Molekül wird als Glu-Plasminogen bezeichnet aufgrund seines NH₂-terminalen Glutamats. Es ist ein 92 kDa schweres, einkettiges Aminosäuren Glykoprotein, daß aus 791 besteht (51, 52, 53).Plasminogen ist in sieben strukturelle Regionen aufgeteilt. Vom Aminoende beginnend, findet man als erstes das sogenannte "Präaktivations-Peptid" (AS 1-77), es folgen fünf Sequenzen homologer, ringförmig angeordneter Regionen ("kringle- domain") mit jeweils etwa 90 AS, gefolgt von der Protease-Region (AS 562-791) mit der katalytischen Region aus His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ und Ser⁷⁴¹. Die "kringle"enthält Lysin- und Aminohexyl-Bindungsstellen, die eine Region entscheidende Rolle, bei der Erkennung des Fibrins, der Zelloberfläche und des α_2 -Antiplasmins einnehmen (54,55). Durch Spaltung einer einzigen Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² Peptid-Brücke, die zwischen dem "kringle" Nr. 5 und der Protease-Region liegt, wird Plasminogen in die Serinprotease Plasmin überführt. Während der Aktivierung des Plasminogens ist Plasmin in der Lage die Freisetzung des Präaktivationspeptids aus Glu-Plasminogen zu katalysieren, wodurch ein degradiertes Plasminogen mit Amino-ständigem Lysin, Valin oder Methionin entsteht (56). Es wird daher allgemein auch als Lys-Plasminogen bezeichnet, aufgrund des erwähnten Amino-ständigen Lysins. Lys-Plasminogen wiederum läßt sich einfacher zu Plasmin aktivieren als Glu-Plasminogen (57,58,59). Das Plasminogenaktivierungssytem nimmt im Knorpelstoffwechsel verschiedene Funktionen wahr. Dazu gehören unter anderem die proteolytische Aktivierung von Prokollagenase und latenter Wachstumsfaktoren, wie z. B. TGF β und IGF (60,61).

Alpha-2-Antiplasmin liegt im Plasma in einer Konzentration von 1µM vor. Das Glykoprotein (MG: 70 kD) besteht aus 435 Aminosäuren mit zwei Disulfidbrücken und blockiert die Proteaseaktivität des Plasmins durch Bildung eines stöchiometrischen 1:1- Komplexes (62).

1.2.2 Die Plasminogenaktivatoren

Der tissue-type Plasminogenaktivator (t-PA) ist ein 72 kDa schwere Serin-Proteinase, die in ihrer ursprünglichen Form aus einer einzelnen Polypeptidkette besteht (63). t-PA wird von Plasmin durch Hydrolyse der Arg²⁷⁵-Ile²⁷⁶ Peptidbrücke in eine zweikettige Form konvertiert, wobei beide Ketten über eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Beide Formen können Plasminogen mit gleicher Effizienz aktivieren. Das t-PA -Molekül gliedert sich in fünf verschiedene Regionen, die sich auch in der Genstruktur widerspiegeln (63,64):

a. eine Finger-förmige Region (AS 4-50)

b. eine Wachstumsfaktoregion (AS 50-87), und c. zwei Kringle-Regionen (AS 87-176 und AS 176-262).

Der Abschnitt, der aus den AS 276-527 besteht, repräsentiert den Serinproteinasen-Anteil mit dem katalytischen Zentrum aus ³²²His, ³⁷¹Asp und ⁴⁷⁸Ser (65). Die erwähnten Abschnitte ermöglichen dem t-PA verschiedene Funktionen zu erfüllen, wie z. B. die Bindung an Fibrin, die Fibrin-spezifische Plasminogenaktivierung, seine schnelle Clearance *in vivo* und die Bindung an Chondrozyten, wobei letzteres bis jetzt nur in vitro gezeigt werden konnte(50,66).

Der zweite Plasminogenaktivator ist der einkettige (single-chain) urokinase-type Plasminogenaktivator (scu-PA), ein 54 kDa schweres Glykoprotein, bestehend aus 411 Aminosäuren (67,68,69). Die Plasmakonzentration beträgt ca. 2 ng ml^{-1} . Durch proteolytische Spaltung der Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ Peptidbindung wird das Molekül in die zweikettige Form (two-chain, tcu-PA) überführt. uPA zeigt im Gegensatz zu tPA keine ausgesprochene Fibrinspezifität und aktiviert sowohl fibringebundenes als auch zirkulierendes Plasminogen. Die einkettige Form scu-PA (single-chain uPA,) besteht aus 411 Aminosäuren mit einem MG von 54 kDa (70). Im Gegensatz zu tPA zeigt es eine ausgeprägte proteolytische Aktivität erst nachdem es in die zweikettige Form überführt wird. Dies kann u. a. durch Plasmin oder Kallikrein geschehen (71). Die Domänenstruktur des Moleküls zeigt nach dem Signalpeptid eine Region (AS 9-45), die der des epidermalen Wachstumsfaktor homolog ist. Die epidermale Wachstumsfaktorregion ist verantwortlich für die Bindung der einkettigen u-PA an die Rezeptoren einer Vielzahl von Zellen (72,73), insbesondere auch an die Rezeptoren der Chondrozyten (74).

Im Unterschied zu t-PA fehlt die Fingerregion und es ist nur eine Proteinasedomäne (AS 45-134) vorhanden. Das katalytische Zentrum liegt in der Proteinasendomäne (AS 159-411) und besteht aus den Aminosäuren His²⁰⁴, Asp²⁵⁵ und Ser³⁵⁶ (75,76).

1.2.3 Der uPA-Rezeptor (uPAR)

Der einkettige u-PA-Rezeptor(68,77,78) ist ein Glykoprotein (M_r:ca.60 kD) aus 313 Aminosäuren und wird mit einem aminoterminalen Glykolipid-Anker in der Zellmembran verankert. Mit hoher Affinität werden scu-PA und tcu-PA vom u-PAR gebunden. Die gleichzeitige Bindung bis jetzt nicht identifizierter Regionen von Plasminogen und scu-PA an den Rezeptor beschleunigen die Bildung von Plasmin (79,80). Sowohl PAI-1 als auch PAI-2 können an rezeptorgebundenen tcu-PA binden, wobei der Komplex nach der Bindung internalisiert wird. Der u-PAR ist nicht gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt, sondern an bestimmten Stellen, besonders bei Zellkontakten , konzentriert(55). Damit kommt dem u-PAR eine wichtige Rolle bei der Lokalisierung und Modulation der Plasminogenaktivierung auf der Zelloberfläche zu(68).

1.2.4 Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren

PAI-1 (50,81,82) ist ein einkettiges Glykoprotein (M_r :52 kD) aus 379 Aminosäuren und gehört zur Familie der Serinproteinasen-Inhibitoren (Serpine), wobei die reaktive Stelle aus den Aminosäuren Arg³⁴⁶-Met³⁴⁷ besteht. Im Plasma inhibiert PAI-1 beide t-PA-Formen und tcu-PA äußerst effizient, nicht aber scuPA. Die PAI-1 Aktivität wird durch Bindung an Fibrin und Vitronektin stabilisiert, durch TGF-β stimuliert und durch TNF-α inhibiert (83,84,85).

PAI-2 besteht aus 415 Aminosäuren und stellt ein Glykoprotein (M_r:ca. 60 kD) aus der Familie der Serpine, mit reaktivem Zentrum bei ³⁸⁰Arg-³⁸¹Thr dar (86). PAI-2 wird in Monozyten- und Makrophagenlinien, aber auch in der Plazenta produziert. Es reagiert nur langsam mit der einkettigen, bereits deutlich schneller mit der zweikettigen t-PA-Form und um eine Zehnerpotenz effizienter mit scu-PA.

Das Plasminogen-Aktivierungssystem ist inzwischen bei verschiedenen Zellarten weitgehend untersucht worden: Melanomzellen (76,87,88), Thrombozyten (56,89), menschlichen Endothelzellen (80,90,91,92), Rattenhepatozyten (79,93), Osteosarkomzellen (59) und menschlichen Synovialisfibroblasten (94,95). Der Mechanismus der Plasminogen-Aktivierung der bisher untersuchten Zellarten ist nahezu gleich (42,45). Unklar ist bis heute, ob die beschriebene Plasminogenaktivierung so auch für die Chondrozyten zutrifft.

<u>1.2.5 Die Komponenten des Plasminogen-Aktivierungssystems im Knorpel</u>

Unstimulierte Chondrozyten bilden nur wenig Plasminogenaktivatoren (96) und Kollagenase (97). Nach Stimulierung mit IL-1 können dagegen sowohl u-PA als auch tPA nachgewiesen werden. Der chondrozytäre u-PA ist größtenteils zellgebunden, während der t-PA nicht zellgebunden, sondern an Fibrin gebunden vorliegt (98). Del Rosso et al. konnten mit Hilfe von Chondrozyten-Suspensionskulturen einen Zelloberflächenrezeptor für u-PA (u-PAR, Mr 55000) nachweisen, wobei das u-PA über seine A-Kette an den u-PAR gebunden wird, so daß die B-Kette mit dem aktiven Zentrum in den perizellulären Raum gerichtet ist (74). Aus Arthroseknorpel isolierte Chondrozyten besitzen eine wesentlich höhere Zahl an u-PAR als normaler Gelenkknorpel (74). Mit Hilfe von Piroxicam oder auch Diacethylrhein kann die Zahl der u-PAR des Arthroseknorpels vermindert werden (19).Durch die Piroxicam-behandlung wird gleichzeitig die PAI-1-Synthese erhöht, während die zellassoziierte u-PA-Aktivität des u-PAR durch Internalisierung verringert wird (100). Treadwell et al. haben gezeigt, daß Chondrozyten auch zur Synthese von PAI-1 befähigt sind (83). IL-1 und TNF- α vermindern, TGF-ß und bFGF erhöhen die PAI-1-Bildung von Chondrozyten (84).

Das Plasminogen der Synovialflüssigkeit könnte auch als Quelle für den Gelenkknorpel dienen. Es wird jedoch angenommen, daß Plasminogen wegen seines hohen M_r von 92000 (pl 7,2 - 8,5) nicht in den wie ein Molekularsieb wirkenden Gelenkknorpel eindringen kann (10).

 α_1 -Antitrypsin mit einem M_r von 54000 (pl 4,6) kann z.B. nicht in Gelenkknorpel eindringen. Andererseits konnte v.Lent zeigen, daß die Diffusibilität eines Proteins in die Knorpelmatrix stark von seiner Ladung abhängig ist (101). Nach v.Lent können kationische Proteine mit einem pl > 8,5 bis zu einem M_r von 240000 in den Knorpel eindringen.

Treadwell hat elektrophoretisch Plasminogen in Knorpelextrakten nachgewiesen (83). Da hierzu 1,5 mm dicke Knorpelscheiben aus das Gelenkknorpel verwendet wurden. kann nachgewiesene Plasminogen auch von Gelenkoberfläche haftenden der an der Synovialflüssigkeit herstammen. An Knorpelstanzzylindern aus menschlichem Gelenkknorpel konnten wir trotz mehrmaligen Waschens durch Eintauchen in isotone NaCI-Lösung immunologisch noch eindeutig α_1 -Antitrypsin nachweisen. das ebenfalls in der Synovialflüssigkeit vorhanden ist, in den Gelenkknorpel aber nicht eindringen kann. Die Frage der Diffusibilität von Plasminogen in Gelenkknorpel kann nur mit Hilfe von markiertem Plasminogen geklärt werden.

Es ist anzunehmen, daß auch die latenten MMP zwecks Aktivierung durch das rezeptorgebundene Plasmin an die Zelloberfläche gebunden werden müssen. An menschlichen Adenokarzinomzellen sind beispielsweise Rezeptoren mit einer hohen Affinität ($K_d = 2nM$) für Typ-IV-Kollagenase gefunden worden (7). Derartige Rezeptoren wurden bisher an Chondrozyten nicht beschrieben.

1.3 Ziele der Arbeit

Ein Hauptmerkmal der Osteoarthrose und der rheumatoiden Arthritis ist die Zerstörung des Knorpelgewebes. Knorpelgewebe besteht aus einer kleinen Anzahl von Chondrozyten (2x10⁵/mm³), die in einer extrazellulären Matrix aus Kollagen und Proteoglykanen eingebettet sind. Im gesunden Knorpelgewebe eines Erwachsenen sorgen die Chondrozyten für ein Gleichgewicht zwischen der Synthese der Extrazellulären Matrix Komponenten und deren Degradation. Jede Störung dieses Gleichgewichts beeinflußt das Knorpelgewebe in der Wahrnehmung seiner Funktionen erheblich.

Die dabei zunächst eintretende Zerstörung der Proteoglykane ist noch reversibel. Kommt es jedoch zu einer Schädigung des Kollagengerüstes ist diese insoweit irreversibel, daß eine suffiziente Regeneration des Kollagengerüstes nicht mehr möglich ist. Die beiden genannten Prozesse verlaufen jedoch nicht zeitlich getrennt voneinander, sondern sind vielmehr miteinander gekoppelt. Die Mechanismen die zu diesem extrazelluären Matrixabbau im Knorpel führen, weisen jedoch entscheidende Unterschiede auf. Während die in vitro Aktivierung latenter MMP gut untersucht ist, ist über die in vivo stattfindende Aktivierung nur wenig bekannt. Auf Kollagengelen kultivierte Chondrozyten sezernieren nach Stimulation mit IL-1 sowohl uPA als auch latente MMP in das Kulturmedium. Das Kollagengel wird jedoch nicht angegriffen. Zu dessen Abbau kommt es erst nach Zugabe von Plasminogen zum Kulturmedium. Hieraus kann gefolgert werden, daß das Plasminogenaktivierungssystem auch in vivo von Bedeutung für die Aktivierung der latenten chondrozytären MMP wenn die Chondrozyten mit den Komponenten des sein kann, Aktivierungsystems ausgestattet sind. Es ist bekannt, das Chondrozvten in der Lage sind uPA, tPA, uPAR, PAI-1und latente MMP zu bilden. Damit stehen dem Chondrozyten nahezu alle Komponenten des Aktivierungsystems zur Verfügung. Unklar ist jedoch weiterhin, ob sie auch in der Lage sind Plasminogen zu synthetisieren.

Ziel der Untersuchung war es zunächst, in Medien und Zellkulturen von unter serumfreien Bedingungen kultivierten Chondrozyten Plasminogen nachzuweisen. Um eine endgültige Aussage treffen zu können mußte jedoch in molekulargenetischen Untersuchungen das Vorhandensein der Plasminogen mRNA in Chondrozyten nachgewiesen werden.

Das Plasminogen im Gelenkknorpel könnte auch aus der Synovialflüssigkeit stammen. Plasminogen scheint aufgrund seiner Größe nicht in der Lage zu sein in den Knorpel zu diffundieren, für einzelne Plasminogenfraktionen mit einem höheren pl bestünde jedoch theoretisch die Möglichkeit in den Knorpel einzudringen.

In weiteren Versuchen sollte daher die Diffusibilität von Plasminogen in den Gelenknorpel anhand einer radioaktiven Markierung des Plasminogens dargestellt werde.



IN VIVO AKTIVIERUNG LATENTER MATRIXMETALLOPROTEINASEN

Abbildung 1:

19

2. Material und Methode

2.1 Material

Im folgenden werden die Hersteller der verwendeten Materialien aufgeführt, soweit sie nicht bei der beschriebenen Methode angegeben sind. Wurde aus Qualitätsgründen das Material eines bestimmten Herstellers bevorzugt, so ist dies bei der entsprechenden Methode erwähnt.

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Enzyme wurden in p.A. Qualtität oder dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: Agfa Gevaert (Berlin), Amersham/Buchler (Braunschweig), Baker (Deventer, Niederlande), Biolabs (Schwalbach), BioRad (München), Biozym Diagnostic (Hameln), Boehringer (Mannheim), Diagen GmbH (Düsseldorf), Difco Lab. (Michigan, USA). FMC Bioproducts (Rockland, USA), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), Perkin Elmer Cetus (Vaterstetten), Pharmacia LKB (Freiburg), Polaroid GmbH (Offenbach), Promega (Madison, USA), Renner GmbH (Darmstadt), Riedel de Haen AG (Seelze, Niederlande), Schleicher und Schüll (Dassel), Serono Pharma GmbH (Unterschleißheim), Serva Feinchemie (Darmstadt), Sigma Chemie (Taufkirchen), Stratagene (La Jolla, USA), United States Biochemical (Cleveland, USA)

<u>2.1.2 Medien</u>

Die Firmen Boehringer, GibcoBRL und Serva Feinchemie lieferten die Medien.

2.1.3 Plastikmaterial

Zellkulturflaschen, Mikrotiterplatten, Petrischalen und Vorratsbehälter wurden von den Firmen Costar, Eppendorf, Falcon und Nunc bezogen.

2.1.4 Tiere

Die Ratten (Wistar-Stamm) wurden uns freundlicherweise von Herrn Rosenkranz aus dem Forschungslabor der Neurologischen Klinik der Charité zur Verfügung gestellt. In Äthernarkose war der noch lebenden Ratte zuvor eine Duraprobe entnommen worden. Wir erhielten sie 20 Minuten nach ihrer Tötung durch eine kardioplege Lösung (hochprozentige KCI-Lösung).

2.2 Geräte

Computer: DNA-Sequenzierung (autom): Entwicklungsmaschine: Gelelektrophoresekammern: Geltrockner: Homogenisator: Hybridisierungsschränke: Kühltruhe: Mikroplate Reader:

Mikroskop:

Netzgeräte:

Partikelzählgerät:

PCR-Gerät: Phosphorimager: Photoausrüstung:

Photometer: Thermocycler: Transilluminator:

Sterilbank: Spannungsgeber: Szintillationszähler: Ultraschallgerät: Waagen:

Wasserbäder: Videodensitometer:

Zentrifugen:

Speka 486/66 373 A DNA Sequenzer, **Applied Biosytems** Gevamatic 60, Agfa Gevaert Gibco. BioRad Drygel Model SE, Hoefer Polytron PCU, Kinematica UM 400 B Hyb. Bachhofer Cryostar -140, Queue Model 3550 mit Software, BioRad Leitz Labovert, Leitz Stereolupe 308701, Wild Heergrugg Power Supply PS 500x DC, Hoefer Makrodrive 5, LKB Pharmacia Coulter Counter, Coulter **Electronics** Perkin Elmer Cetus **Molecular Dynamics** Leica Wild MPS 52 Contax 167 MT, Kyocera Lambda 2, Perkin Elmer P 9600, Perkin Elmer UVT 2020 (255 und 302nm), Hereolab Lamin Air HB 2448, Heraeus ST 504, Gibco, BRL 1209 Rackbeta, LKB Labsonic 200, Braun PM 3000, AT 250, Mettler MC 1, Sartorius Julabo, Köttermann Modell 620 mit Software 1D-Analysis, BioRad Varifuge 3.2 RS, Heraeus 2K15 Laborzentrifuge, Sigma L7-55 Ultrazentrifuge, Beckmann SpeedVacConcentrator, Bachhofer

2.3 Methoden I:Chondrozytenzellkulturen

2.3.1 Isolierung und Kultivierung von Chondrozyten

Chondrozyten aus frisch gewonnenem Schweinepatellarknorpel wurden mit einer Lösung aus 1g/l Trypsin(1:250) in Ham's F-12 bei 37°C für 60 min. angedaut. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht mit einer Lösung aus 1g/l Kollagenase (Serva 17449) in Ham's F-12 mit 10% fötalen Kälberserum (FCS). Der CO₂-Druck betrug 3,25%, der pH des Mediums 7.3. Die Zellen wurden anschließend viermal mit einer Lösung aus 3g/l Gelatine (welche aus Schweinerippenknorpel gewonnen wurde) in PBS und Ham's F-12 mit 1% plasminogen-freiem FCS gewaschen, um alle Reste des Plasminogens zu entfernen. Nach Suspendierung mit 10% plasminogen-freiem FCS wurden die Zellen in Kulturplatten (24-Vertiefungen) gegeben. Dort wuchsen sie für drei Wochen unter den folgenden Kulturbedingungen:

- a) in Monolayer-Kultur mit 4.4×10⁵ Zellen /cm² (anchoragedependent growth)
- b.) in Suspensionskultur auf Agarosegelen mit 1.4×10^5 Zellen/ml (anchorage-independent growth)
- c) als Suspensionskultur in 0.5% Agarose eingegossen mit 2.1×10^{6} Zellen/cm³
- d.) als Suspensionskultur in 0.3% Kollagengel (aus Hühnerhaut) mit 1.5×10^{6} Zellen/cm³ eingegossen
- e) in Kultur in Gegenwart von 5% Dextran T-40 und 95 μ g/ml A Ascorbinsäure mit 7× 10⁴ Zellen/cm³
- f) als serumfreie High-Density-Kultur unter Stimulierung mit PMA bzw. Vitamin-A-Säure mit 1.78×10⁷ Zellen/cm³

2.3.1.1 High-Density Kulturen

Zur Herstellung der High-Density-Kulturen wurden Chondrozyten aus Schweinefüßen durch Andauung des Gelenkknorpels mit einer Lösung aus 0.3g/l Trypsin (Serva 37273) in Ham`s F-12 für 60 min inkubiert und anschließend über Nacht mit einer Lösung aus 0.5 g/l Kollagenase (Serva 17450) in DMEM mit 10% FCS inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gründlich mit PBS gewaschen, in DMEM (Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium) suspendiert und dann mit DMEM, welches 10 g/l geschmolzene Agarose (Serva 11408) im Verhältniss 1:1 enthielt gemischt. Nun wurden Portionen von 70 µl in die Löcher der Kulturplatten (24 Vertiefungen) gegeben. Nach dem Erkalten der Agarose wurden 500 μ I DMEM in jedes Loch dazugegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach sechstägiger Kultivierung mit 8% CO₂ in der Luft wurde ein Teil der Chondrozyten mit Vitamin-A-Säure (endgültige Konzentration 10⁻⁶ mol/l) oder mit 12-0-Tetradecanoylphorbol-Myristat-13-azetat (Endkonzentration: 1.6 x 10⁻⁸ mol/l) für acht Tage stimuliert.

2.3.1.2 Herstellung des plasminogen-freien fötalen Kälber-serums

7 ml FCS wurden auf eine Säule mit Lysyl-Sepharose(19 ml) gegeben. Das Serum wurde mit PBS gereinigt und durch Ultrafiltration konzentriert auf 7 ml (Auschlußgrenze 10000).

2.3.2 Nachweis von Plasminogen und plasminogenähnlichen Zymogenen durch:

2.3.2.1 Radialdiffusion

Die Zellschichten wurden mit einer Lösung aus 4,5 g/l Triton X-100 in einem 0,01 mol/l Tris-HCI-Puffer bei pH 7,5 lysiert. Der Nachweis wurde in einer 2 mm dicken Agarosegelschicht durchgeführt, die 10 g/l Agarose in 0,1 mol/l 1% Tris-HCI-Puffer bei pH 8,0, sowie 1 g/l NaN₃ und 6 g/l fettfreie Trockenmilch enthielt. Die Temperatur betrug 37 °C. Nun wurden 10 μ l einer Lösung aus 7,5×10⁴ IU/I Urokinase (aus menschlichem Urin, Serono) und 2 g/l humanes Serumalbumin in das zentrale Stanzloch mit 4mm Durchmesser gegeben und die zu testenden Lösungen in die benachbarten Löcher. Die Diffusionsdistanz zwischen den einzelnen Löcher betrug 10 mm. Die Platten wurden in einer feuchten Kammer für 48 Std. bei 37°C inkubiert. Die Anwesenheit von Plasminogen in den Testlösungen wird durch deutliche Lysiszonen zwischen dem zentralen und den benachbarten Löchern in dem trüben Kaseingel angezeigt (s. Abb. 1). Der Nachweis wird nicht durch Triton X-100 beeinträchtigt. Die untere Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 4 ng/20µl in das Stanzloch eingebrachter Testlösung.

2.3.2.2 Zymographie

Nach SDS-PAGE (T=10%, C=3.2%) wurden die Gele von SDS befreit und vorsichtig in einer Lösung aus 25 g/l Triton X-100 mit 0.1 Mol/l Tris-HCl Puffer (pH 8.0) für zwei- mal 20 min geschüttelt. Anschließend wurde der Puffer auf der Geloberfläche vorsichtig mit Chromatographiepapier abgestreift und ein Polyacrylamid-Indikator-Gel (T=9.6%, C=5%) aufgelegt. Das Gel enthielt 50000 IE/l Urokinase (Serono), 2.4 g/l fettfreies Trockenmilchpulver und 0.1 Mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8.0. Diese Sandwichkonstruktion wurde bei 37°C für 48 Std. inkubiert und zum Schluß mit Coomassie Brilliant Blau G 250 gefärbt. Die untere Nachweisgrenze liegt hier bei 25 ng/5µl der aufgebrachten Testlösung.

2.3.2.3 Westernblotting

Die einzelnen Proben wurden durch SDS-PAGE (T=10%, C=3.2%) aufgetrennt und anschließend gemäß den Anweisungen des Herstellers (NovaBlot, Pharmacia) auf Nitrozellulosepapier "elektrogeblottet": Die Membran wurde mit Hilfe einer Lösung aus 10 g/l BSA in PBS/Tween 80 bedeckt und dann für 90 min mit Plasminogen-Antiserum (0.5 a/l) (Schering AG) in einer Verdünnung von 1:500 mit 0,1% BSA in PBS/Tween 80 inkubiert. Nach Waschen mit PBS/Tween 80 erfolgte die Behandlung der Membran mit alkalischer Phosphatase-konjugierten-IgG1 und anschließend die Inkubation mit anti-Kanninchen-IgG-Antikörpern (Sigma, A 9919), in einer Verdünnung von 1:1000 mit 0,1% BSA in PBS/Tween 80. Danach wurde die Membran fünf mal mit PBS/Tween 80 gewaschen. Die Färbung erfolgte mit einer Lösung aus 0,1 g/l 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat (Sigma, B-8503) und 0,05 g/l Nitro Blau Tetrazolium (Sigma, N-6876) in 0,9 Mol/l Diäthanolamin Puffer pH 9.8, welches 4.4 mmol/l MgCl₂ und 0.2 g/l NaN₃ enthielt. Die untere Nachweisgrenze liegt hier bei 10 ng/5µl der aufgebrachten Testlösung.

2.3.3 Nachweis von Plasminogen in den Kulturmedien:

Zu diesem Nachweis wurden drei verschiedene Methoden verwendet:

2.3.3.1 Radialdiffusion

ein Nachweis für Plasminogen bzw. ein plasminogen-ähnliches Zymogen durch Radialdiffusion in einem Casein enthaltenden Agarosegel.

Untere Nachweisgrenze 4 ng.

2.3.3.2 Zymographie

durch Zymographie mit Hilfe eines Casein enthaltenden Polyacrylamid-Detektorgeles nach SDS-PAGE. Untere Nachweisgrenze 25 ng.

2.3.3.3 Westernblotting

Durch Westernblotting nach SDS-PAGE. Untere Nachweisgrenze 10 ng.

2.3.4 Bestimmung des pl des Plasminogens in der Gelenkflüssigkeit

Nach vanLent ist der pl eines Proteins für dessen Diffusibilität in den Gelenkknorpel von entscheidender Bedeutung (24). Wir bestimmten daher den pl des in der Gelenkflüssigkeit vorhandenen Plasminogens durch IEF (isoelektrische Fokussierung) nach LKB Biotechnology. Dafür wurden Gelenkpunktate aus Kniegelenken mit Gonarthrosen sowie aus aktivierten Gonarthrosen gewonnen.

Der Nachweis des Plasminogens in der Gelenkflüssigkeit erfolgte mit einer Casein-Urokinase-Indikatorplatte. Dazu wurde eine SDS-PAGE durchgeführt, das SDS anschließend mit Triton X-100 entfernt und das Casein-Urokinase-Indikator-Gel aufgelegt. Die Porengröße betrug T=10,6%, die Dichte des Gels C=3,6%.

2.4 Methode II: Untersuchungen zur Diffusibilität des Plasminogens im Knorpel

2.4.1 ¹²⁵J-Markierung von Plasminogen

Die Jodierung des Plasminogens erfolgte durch eine von uns entwickelte Methode.

Das Plasminogen von CHROMOGENIX (1,5 mg) enthielt neben dem Plasminogen noch 0,9 mg Glucose, 20 mg Mannitol, 1,8 mg Lysin u. 2,3 mg NaCl. Da Glucose, Mannitol u. Lysin ebenfalls mit J₂ reagieren, müssen diese Bestandteile vorher durch Ultrafiltration (Ultrasart Cell 10) unter Verwendung von 0,05M Phosphatpuffer entfernt werden . 4,5 mg Plasminogen wurden in 6 ml Wasser gelöst, zum Sterilisieren durch einen Vorsatzfilter gedrückt und direkt in das Ultrafiltrationsgerät gegeben (das Gerät wurde über Nacht mit 0,05M Phosphatpuffer mit 0,02% NaN₃ vorbehandelt). Jetzt wurde solange mit dem 0,05M Phosphatpuffer gewaschen, bis mit AqN03 keine Cl-Ionen mehr nachweisbar waren. Danach wurde das Volumen auf 3,6 ml eingestellt und der Inhalt mit einer sterilen Plastikpipette in das kleine Reaktionsgefäß übergeführt. Der Magnetrührkern wurde hinzugegeben, die Plastikschale mit Eis gefüllt, auf den Magnetrührer gestellt. Anschließend läßt man die Plasminogenlösung abkühlen. Das Gefäß mit dem ¹²⁵J-NaJ (in NaOH-Lösung vom pH 7-11, ca. 20 µl, Aktivität am 11.9.1996, 13°° Uhr, 81,79 MBq) geöffnet, 50 µl 0,5M Phos-phatpuffer pH 7 hinzugegeben und in die Plasminogenlösung übergeführt.

Die im Gefäß nach der ersten Entnahme verbliebene Aktivität betrug: 18,52 MBq.

Es wurden erneut 50 μ l des 0,5M Phosphatpuffers zugeben, die Gefäßwand abgespült und ebenfalls in die Plasminogenlösung überführt.

Die im Gefäß nach der zweiten Waschung verbliebene Aktivität betrug: 2,245 MBq.

Das verwandte trägerfreie ¹²⁵J⁻ kommt von Amersham,(74 MBq, IMS 30-2mCi, spezif. Aktivität 580,9 MBq/µg Jod; Volumen ca. 20 µl).

Anschließend wurden tropfenweise 450 μ l Chloramin-T, welches zuvor aus 12 mg + 6 ml Wasser angesetzt und welches anschließend mit sterilem Wasser 1:10 verdünnt wurde, (nicht sterilfiltrieren) unter Rühren hinzugegeben.

Nach 5 minütiger Reaktion wurden 450 μ l Na₂S₂O₅ zum Reaktionsstopp zugeben. Dafür wurden zu 12 mg Na₂S₂O₅ 6 ml Wasser gegeben und anschließend sterilfiltriert. Erst unmittelbar vor der Verwendung erfolgt die Verdünnung 1:10 mit sterilem Wasser.

Abschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ l einer 1%igen KJ-Lösung, die aus 50 mg KJ und 5 ml Wasser hergestellt und dann sterilfiltriert wurde.

Die Länge und der Durchmesser der verwendeten Sephadex G-25-Säule wurde in mehreren Vorversuchen ermittelt, um eine sichere Auftrennung des Reaktionsgemisches in die zuerst durchlaufende Plasminogen- und die nachfolgende 125 J-Fraktion zu erreichen. Dazu wurden 4,5 mg BSA (Bovines Serum Albumin), 3,6 ml 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0), 450 μ l Chloramin T, 100 μ l KJ und 450 μ l Na₂S₂O₅ auf die Säulen aufgetragen. Durch Zugabe von Breadford-Reagenz und AgNO₃ kam es zu einer Blaufärbung des BSA-Anteils und dem Ausfall von gelben Niederschlag durch anschließende Reaktion des Jodid mit dem Silbernitrat.

Das Reaktionsgemisch (ca. 4,7 ml) wurde nun mit einer sterilen Plastik-Pasteurpipette auf die Sephadex G-25-Säule (1,2 cm Durchmesser, 13 cm lang) auftragen und das Plasminogen mit dem 0,05%igen Phosphatpuffer (pH 7,0) eluiert. Die Fraktionen wurden in Eppendorfröhrchen aufgefangen (ca. 1 - 1,2 ml pro Röhrchen) und deren Aktivität gemessen.

Danach wurde das PBS, in dem das Plasminogen gelöst ist, gegen den Inkubationspuffer (Ham's-HEPES, 1x AB) ausgetauscht. Hierzu wurde der Inhalt der Röhrchen 7 bis 10 in das Ultrafiltrationsgerät überführt und mit obigem Puffer gewaschen. Das Volumen wurde auf ca. 1,6 ml eingestellt. Der Verlust an Plasminogen, der durch das Filter durchgegangen ist betrug: 2,875 MBq.

2.4.1.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Von 10 µl Plasminogenlösung wurde ebenfalls die Aktivität gemessen, um die spezifische Aktivität des synthetisierten Plasminogens berechnen zu können: 10 μl - 0,273 MBq. Die spezifische Aktivität der Plasminogenlösung ergibt sich dann

zu:

0,03289 MBq/µg Protein.

Dieser Wert entspricht 0,86 µCi/µg.

2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Breadford

Von der Plasminogenlösung wurden 10 μ l entnommen, mit 40 μ l 0,05M Phosphatpuffer pH 7.0 (250 ml: 660 mg KH₂PO₄ + 1362,88 mg Na₂HPO₄x2H₂0) und 2,5 ml Breadford-Reagenz versetzt. Zur Herstellung dieses Reagenz wurden 25 mg CBB G-250 in 0,626 ml Wasser und 11,875 ml abs. Alkohol gelöst. Danach wurden 25 ml 85%ige H₃PO₄ zugeben und mit Wasser auf 250 ml augefüllt. Zu 50 μ l der Probe werden 2,5 ml Reagenz zugesetzt, gut gemischt und bei 595 nm nach 2 min gegen Wasser abgelesen. Der Leerwert (Elutionspuffer) wird von jedem Wert abgezogen.

Die Proteinbestimmung ergibt 8,3 µg Protein/10 µl Plasminogenlösung, welches einer 0,083%igen Lösung entsprach.

2.4.2 Präparation der Patellae

Von vier Ratten, die Herr Rosenkranz aus dem Forschungslabor der Neurologie, Charité jeweils 20 min nach Tötung der Tiere durch eine Äthernarkose zur Verfügung stellte, wurden jeweils beide Patellae entnommen. Die Ratten 1-3 waren 8 Wochen alt und 265-300 g schwer, Ratte 4 war 12 Wochen alt und 390 g schwer. Die Patellae wurden so entnommen, daß die Knorpelschicht nicht verletzt wurde. Anschließend erfolgte die Entfernung des noch verbliebenen Weichteilgewebes. Die Patellae wurden in Ham`s-F12-HEPES mit Penicillin 100U/ml und Streptomycin 100 μ g/ml gesammelt und so zum Isotopenlabor transportiert.

Dort wurden die Patellae in eine 96-Multiwellplatte gelegt, dazu 5 μ l Trasylol (500 KIE Aprotinin) sowie 200 μ l Medium (Ham`s F-12, HEPES, pH 7,3 und 100 U/ml Penicillin sowie 100 μ g/ml Streptomycin) hinzugegeben und anschließend inkubiert. Nach 8 bzw. 24 h wurde das radioaktive Medium entnommen, die Patellae dreimal mit je 200 μ l 0,1% BSA/PBS und dreimal mit je 200 μ l PBS gewaschen.

Als Positivkontrolle wurden 2 Patellae für fünf Stunden in 0,05% Papain, Ham`s F-12, 2mM CySH, und 2mM EDTA inkubiert. Die Patellae wurden mit dem Medium gewaschen und eine Stunde in Ham`s F-12HEPES unter Zusatz von 4 mM N-Ethylmaleimid zur Inhibierung des Papains geben. Danach erfolgte die Inkubation mit ¹²⁵J-Plasminogen unter Zusatz von 5 µl Trasylol über 21 Stunden.

Weiterhin wurden zwei kleine Patellae für 21 Stdn. mit 5 µl Trasylol und 100 µl Plasminogen inkubiert.

Am zweiten Tag wurde eine Inkubation über 4,15 Stunden durchgeführt. Für diese Inkubation wurden 200 µl Plasminogen und 5 µl Trasylol verwendet.

Da die Patellae der Ratte Nr. 4 deutlich größer waren wurden 300 µl Plasminogen und 5 µl Trasylol zugegeben und für 22,5 Stunden inkubiert..

Die Aktivitäten der Patellae nach dem Inkubieren und dem Waschen mit BSA/PBS wurden gemessen.

Nun erfolgte die Fixierung der Patellae in 2% Formaldehyd in PBS in 1,8 ml Cryoröhrchen über 48 Stunden. Abschließend erfolgte die Entkalkung mit 5%iger Ameisensäure (in Cryoröhrchen).

Die Aktivitäten der Kniescheiben nach Behandlung in 5%iger Ameisensäure wurden erneut gemessen.

Die verbleibenden Gewebsreste lassen sich nun leicht abtrennen. Anschließend erneute externe Gammastrahlenmessung.

2.4.3 Histologischen Untersuchung der Patella

Entwässerung der Patellae in aufsteigender Alkoholreihe (70%-80%-96%-100% Äthanol). Zum Abschluß der Entwässerung erfolgte die Behandlung mit Chloroform. Die Patellae wurden nun in Parafin eingebettet und mit dem Mikrotom in 5µ dicke Schnitte geschnitten. Die Objektträger, auf die die Schnitte aufgetragen werden, sind zuvor mit Glyceringelatine überzogen worden.

2.4.4 Autoradiographie

Die Schnitte wurden durch eine erneute Behandlung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Äthanol) vollständig getrocknet. In der Dunkelkammer wurde die Flasche mit der Emulsion (RPN40, Amersham) für 15 Minuten im Wasserbad bei 43° erhitzt. Die erwärmte Emulsion wird dann in das Eintauchgefäß (Amersham RPN 39) gegossen. Die Objektträger werden nun für jeweils 5 Sekunden vertikal in das Gefäß eingetaucht, in vertikaler Position wieder entfernt und so gehalten, das sie abtropfen konnten. Anschließend trockneten die Schnitte in vertikal stehender Position bei Zimmertemperatur für eine Stunde. Es folgte die Exposition der Schnitte für zwei unterschiedliche Zeiträume (zwei und vier Wochen) in einer lichtundurchlässigen Photokassette im Kühlschrank bei +5°C.

Nach abgeschlossener Trocknung wurden die Schnitte für die gewünschte Dauer (30 Sekunden, eine Minute, eineinhalb Minuten, zwei Minuten, drei Minuten und fünf Minuten) in den vorbereiteten Entwickler (D-19, Kodak) getaucht. Es folgte für 30 Sekunden das Bad in der Stop-Lösung (0,5% Essigsäure in entionisiertem Wasser) und zum Schluß für 10 Minuten im Fixierbad (30% Natriumthiosulfat in entionisiertem Wasser). In den jeweiligen Lösungen wurden die Schnitte vorsichtig bewegt, ohne dabei ihre Oberfläche zu berühren. Zum Abschluß wurden die Präparate für 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült und anschließend vorsichtig getrocknet.

Die Schnitte wurden nun teilweise mit der Methode nach Masson-Goldner gefärbt, der Rest der Präparate wurde nicht gefärbt.

2.5 Methode III: Molekularbiologische Untersuchungen der Chondrozyten

2.5.1 Isolierung von Chondrozyten aus Rinderknorpel

Zwei aus dem Schlachthof besorgte Rindervorderfüße wurden unter fließendem Wasser mit einer Bürste gereinigt, anschließend mit Zellstoff abgetrocknet und mit Barrycidal eingesprüht. Das Fell wurde anschließend mit einem scharfen Skalpell längs eingeschnitten und vom gesamten Fuß abgelöst. Anschließend erneutes Einsprühen mit Barrycidal zur Desinfektion und trocknen lassen. Mit neuen sterilen Instrumenten wurde nun das Gelenk eröffnet, wobei der Knorpel mit PBS gespült wurde, damit er nicht antrocknet. Der Knorpel wird knochenfrei entnommen und zunächst in Leibovitz-L15-Medium unter Zusatz von 200 U/ml Penicillin und 200 µl/ml Streptomycin gesammelt. Mit einer Pasteurpipette wird der Knorpel nun mehrfach mit dem Leibovitz-Medium bzw. PBS gespült. Nach Zugabe von 0,25 prozentiger Pronase in Ham's F-12 und eines Magnetrührkerns erfolgt das 30 min. Rühren im Begasungsbrutschrank. Die Pronaselösung wurde dann mit der Pasteurpipette abgenommen, der Knorpel mit 1 ml Medium gewaschen. Im weiteren Zugabe von 0,1 prozentiger Kollagenaselösung in Ham`s F-12 und erneutes Rühren für 4 Stunden im Begasungsbrutschrank. Danach wurde die Aufschlußlösung durch ein Gazefilter gepreßt und die verbleibenden Zellen bei 1300 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, PBS zugegeben und die Zellen mit einer Pasteurpipette suspendiert und abzentrifugiert. Das Waschen wurde dreimal wiederholt. Der Überstand wurde wieder abgenommen und so viel PBS hinzugegeben, daß die Zellen nicht zu dicht in der Zählkammer lagen. Dies wurde bei einer Menge von 4-5 ml erreicht. Es erfolgte die Zählung der vitalen (leuchtenden) Zellen im Phasenkontrastmikroskop.

Zur Vitalitätsprüfung wurden 20 μ l Chondrozytensuspension auf einem Objektträger mit 10 μ l 1,36prozentiger Trypanblaulösung gemischt. Die Suspension wurde dann in eine große Petrischale, die mit feuchtem Filterpapier ausgelegt war für 10 min. in Raumluft stehen gelassen (keine CO₂ Begasung!) und dann in die Zählkammer geben, um die lebenden und die toten Zellen zu zählen.

Zur Berechnung wurde die Anzahl der Zellen pro Gruppenquadrat geteilt durch 0,004 μ l und mit dem Gesamtvolumen der Suspension, in der sich die Chondrozyten zum Schluß befanden, multipliziert. Abschließend wurde je 1 ml in ein Cryoröhrchen gegeben (5,3x10⁶), die Zellen abzentrifugiert, der Überstand mit der Pasteurpipette abgenommen und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.5.1.1 Stimulierung der Chondrozyten mit PMA und Vitamin-A-Säure

Der Knorpel wurde zunächst für 60 min. mit 0,1% Trypsin im Verhältnis 1:250 behandelt. Es folgte eine Inkubation mit 0,13% Kollagenase unter Zusatz von 0,06% Steptokokken-Hyaluronidase und 6,7% FCS. Diese Proben wurden für drei Tage kultiviert und dann für zwei Tage mit PMA bzw. RA stimuliert. Die Endkonzentration betrug für die mit PMA stimulierten Zellen: 1,62 x 10⁻⁸ M, für RA 1 x 10⁻⁶.

2.5.1.2 Herstellung von Knorpelpulver

Das Vorgehen ist identisch zu dem oben geschilderten bis zum Zeitpunkt nach der Knorpelentnahme. Der Knorpel wird in diesem Fall direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben und eingefroren. Danach wurde Trockeneis in einem Handtuch mit einem Hammer zerschlagen, in eine Kaffemühle gegeben und gemahlen. Dazu wurde nun der tiefgefrorene Knorpel gegeben und erneut gemahlen. Das Knorpelpulver wurde über Nacht in die Tiefkühltruhe bei -20°C gestellt, wobei das CO_2 verdampfte.

2. 5.1.3 Chondrozytenisolierung aus humanem Arthroseknorpel

Probe 1 aus dem Knorpel einer 68 jährigen Patientin, die eine Knie-TEP erhalten hatte. Die Zellgewinnung erfolgte durch 60 minütige Behandlung mit 0,1% Trypsin im Verhältnis 1:250. Es folgte eine 8stündige Inkubation mit 0,1% iger Kollagenase in Gegenwart von 10% fötalem Kälberserum.

Probe 2 aus dem Knorpel einer 70-jährigen Patientin, die eine Hüft-TEP erhalten hatte. Der Gewebsaufschluß erfolgte durch 7-stündige Inkubation mit einem Gemisch aus 0,16% Kollagenase und 0,016% Hyaluronidase ohne Zusatz von FCS.

2.5.1.3.1 Stimulierung von humanem Arthroseknorpel mit PMA und Vitamin-A.Säure

Der Knorpel der Probe 2 wurden mit 30 ml einer 0,25%igen Pronaselösung in Ham`s F-12 unter Zusatz von 5% FCS behandelt. Danach erfolgte eine Inkubation mit 0,04%iger Kollagenase unter Zusatz von 4% FCS über Nacht. Anschließend wurde die Zellsuspension durch Gaze (Porengröße 52 μ m) gedrückt und die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun in 7 ml PBS aufgenommen und gezählt: 2,3 x 10⁷.

Zum Eingießen in Alginat wurden die Chondrozyten mit 8,4ml PBS und 2,8 ml 4,8%igem Alginat in einem kleinen Glasfläschen gemischt. Die Zellkonzentration betrugt 2 x 10^6 / ml.

In eine Zellkulturschale wurden 200 ml einer 102mM CaCl₂-Lösung gegeben und die Zellsuspension mit einer 100µl-Eppendorfpipette in die Lösung eingetropft. Da die Kugeln nicht untersanken, mußten sie danach erneut mit CaCl₂-Lösung beträufelt werden. Die Anzahl der Kugeln betrugt ca. 440-460, ihr Volumen demnach ca. 25 µl.

Nach 15 minütiger Pause wurden die Kugeln dreimal mit 0,15M NaCl-Lösung und einmal mit Ham`s Medium gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 75 ml Ham`s F-12-Medium und 8,2 ml FCS. Abschließend wurde die Zellkulturschale für 3 Tage im Brutschrank belassen.

Nach drei Tagen erfolgte die Entnahme von 110 Kugeln, die in ein 3,6 ml Cryoröhrchen unter Zusatz von 1 ml 55mM NaCi, 30 mM EDTA und 0,15M NaCl bei pH 6,9 gegeben wurden. Die Röhrchen blieben 30 min stehen, wurden zentrifugiert, erneut mit 500 μ l NaCi und EDTA versehen und nach einer weiteren Pause von 30 min wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen bei - 140°C eingefroren.

Der abschließende Stimulierung wurde durch die Zugabe von 75 ml Ham`s F-12-Medium unter Zusatz von 10% FCS und 1,62 x 10^{-8} M PMA, bzw. 1 x 10^{-6} M RA erreicht. Jeweils 110 Kugeln werden nach 3,5 h, 7 h und 24 h entnommen.

2.5.2 Zellinien und Gewebe für die molekularbiologischen Untersuchungen:

- Chondrozyten aus Rindergelenkknorpel: 4 Proben a 5,32 x 10⁶ Zellen
- 2.) Knorpelpulver aus normalem Rinderknorpel.
- 3.) Humane Arthroseknorpel-Proben 1 und 2
- 4.) Kultivierte Chondrozyten aus Rindergelenkknorpel unter verschiedenen Kulturbedingungen mit und ohne Stimulierung. Endkonzentration: PMA 1,62 x 10⁻⁸ M, RA 1 x 10⁻⁶ M.

a) Monolayer ohne Zusä "	kultur: tze (10% FCS) Kontrolle : Stimulierung mit PMA : "mit RA :	10 ⁶ Zellen 10 ⁶ Zellen 10 ⁶ Zellen
b) Suspensionsk "	ultur über Agarose Kontrolle: """Stimulierung mit PMA: """""mit RA :	7 x 10 ⁵ Zellen 7 x 10 ⁵ Zellen 7 x 10 ⁵ Zellen
c) Chondrozyten " " "	in Agarose Kontrolle: "Stimulierung mit PMA: """mit RA:	3,8 x 10 ⁶ Zellen 3,8 x 10 ⁶ Zellen 3,8 x 10 ⁶ Zellen
- U 937 - THP 1 - Mec 01 - Hep G2 - Rinderleber	Monocytäre Zellinie Monocytäre Zellinie Megakarioblastische Zellinie Leberkarzinom Zellinie 2 Stunden nach dem Schlachter Stickstoff eingefroren	n in flüssigem
- Primer für	a) Actin b) Gap dh c) Plasminogen Primerkombination 2/4 und Primer 2: Vorwärtsprimer Lage: 787-805 GTGTTTCACCACCGACCC Primer 3: Rückwärtsprime Lage: 954-935 GAGGTCACGACTGTCCAC Primer 4: Rückwärtsprime GACAACCAACATACCGTC e) u PA f) u PA-Rezeptor	d 2/3 CC r CAG r GTA

2.5.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

2.5.3.1 Theoretische Grundlagen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die in vitro Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnittes. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis sequenzspezifischer Amplifizierungsprimer. Ein Primer besteht aus zwei Oligonukleotiden, von denen der eine zum Sense-, der andere zum Antisense-Strang der zu erkennenden DNA-Sequenz komplementär ist. Im Versuchsansatz, der "Probe", befinden sich die isolierten Nukleinsäuren, in denen die gesuchte DNA-Sequenz, das "Template", vermutet wird. Zu diesem Ansatz werden die vier Desoxynukleotidtriphosphate im Überschuß sowie eine DNA-abhängige DNA-Polymerase hinzugefügt. Der immer wiederholte Versuchsablauf besteht aus drei Schritten bei jeweils unterschiedlicher Temperatur: im ersten Schritt wird die Probe auf 90°C erhitzt, wodurch sich die beiden Doppelstränge der DNA voneinander lösen. Die DNA denaturiert. Der nächste Schritt, eine Abkühlung des Versuchsansatzes auf 55- 72°C, führt zu einer Anlagerung der Primer exakt an die komplementären Sequenzen der DNA-Stränge. Diesen Vorgang bezeichnet man als "Annealing". Eine erneute Erwärmung auf 72°C ermöglicht der DNA-Polymerase das 3`-terminale Ende der Primer zu verlängern und so einen komplementären Strang zum Template zu synthetisieren. Mit dieser "Extension" ist ein Zyklus beendet, wobei nun die doppelte Menge der DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vorliegt.

Jede Wiederholung eines solchen Zyklus verdoppelt die von den Primern vorgegebene DNA-Sequenz, nach zehn Zyklen liegt also eine um den Faktor 2¹⁰ gesteigerte Menge der Ausgangsmenge vor.

Ein Reaktionsansatz enthielt eine geringe Menge DNA (5,0 µl Template), je 1,5 µl 5'- und 3'-Primer und wurde mit Reagenzien eines kommerziellen Kits (GenAmpTM Amplification Reagent Kit, Perkin-Elmer-Cetus) nach Herstellerangaben komplementiert. Die Ansatzgröße betrug 20-40 µl. Die Amplifikation der DNA erfolgte in einem Thermocycler (P 9600, Perkin-Elmer-Cetus) nach einer 5 minütigen Denaturierungspause bei 96°C. Die Zyklenzahl variierte je nach Ansatz zwischen 15-40.

Denaturierung:	45 sec.	bei	94°C
Annealing:	60 sec.	bei	50-60°C
Extension:	150 sec.	bei	72°C

Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von dem Primer gewählt. Nach Ablauf der Amplifikation wurden die Proben bei 8°C gekühlt.

Als reverse Transkriptase (RT) wurde Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)-RT gewählt, welches sowohl die Synthese von cDNA, als auch den Abbau der vorhandenen mRNA katalysiert.

2.5.3.2 Qualitätssicherung der PCR:

Gemäß den Protokollen von Thunnissen (149) befolgten wir folgende Richtlinien:

1. Räumliche Trennung aller Arbeitsschritte **vor** und **nach** der Amplifikation.

2. Strikte Trennung der verwendeten Materialien (Verbrauchsmaterial und Reagenzien) für die Arbeitsschrtitte **vor** und **nach** der Amplifikation.

3. Sämtliche Verbrauchsmaterialien müssen autoklaviert sein oder sterile Einwegartikel.

4. Aliquotierung aller Reagenzien, die für die PCR verwendet werden.

5. Konsequentes Tragen von Einmalhandschuhen und Wechseln derselben vor jedem neuen Arbeitsgang.

6. Verwendung einer Kontrollgruppe in jedem Versuchsansatz

2.5.3.3 RNA-Isolierung

2.5.3.3.1 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Zu den Zellen in der Petrischale wurde RNA-Insta Pure (0,2 ml pro Mio. Zellen) gegeben, zwecks Zellyse. Dieser Zellextrakt wurde in Eppendorfgefäße abgefüllt und gevortext.

2.5.3.3.2 RNA-Isolierung aus Geweben und Knorpelpulver

Das Gewebe bzw. das Pulver wurde in gefrorenem Zustand im Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Das feine Pulver wurde dann in gekühltes, vorher abgewogenes Insta Pure (1 ml für 100mg Gewebe) gegeben, 1 min gevortext und dann mit Ultraschall behandelt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte unter Eiskühlung mit 15 Strokes bei folgender Einstellung: Output Control 3.0, Duty Cycle 30%. Die Proben wurden nun gewogen und die Gewichtsdifferenz bestimmt.

Zu jeweils 1 ml des Homogenats wurde 0,1 ml Chloroform zugegeben und für 15 sec. gevortext, die Suspension blieb dann für 15 min auf Eis stehen und wurde anschließend 15 min bei 4°C bei 13000 U/min zentrifugiert. Es entstanden drei unterschiedliche Phasen, wobei die obere, wässrige RNA enthielt, die darunterliegende Interphase und die Phenolphase enthielten DNA und Proteine. Dann wurde der wässrige Überstand von der unteren gelblichen Phenol/Chloroformschicht abgenommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt.

Anschließend wurde die RNA durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol ausgefällt. Zur Fällung standen die Proben mindestens für 15 min bei 4°C im Kühlschrank. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 13000 U/min für 15 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Entfernung des Alkohols und Trocknung des Pellets bei 37°C wurde es in 25 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

2.5.3.4 Insta Pure Plus Behandlung zur Reinigung der RNA

Diese Behandlung wurde bei zwei Knorpelpulverproben durchgeführt (K3,K4). Dazu wurden die RNA-Lösungen wieder mit 25µl Isopropanol und 3 µl Natriumacetat gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen.

Zu den Pellets wurden 400 µl RNA Insta-Pure Plus gegeben und stark gevortext. Die Überstände über den gelösten Pellets wurden abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden in je 0,2 ml SDS gelöst, dann wurde je 0,2 ml Chloroform zugegeben und gevortext. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13000 U/min wurden die wäßrigen Überstände abgenommen und die RNA durch Zugabe von 0,2 ml Isopropanol und 20 µl 3M Natriumacetat gefällt.

Nachdem die Pellets in 70% Ethanol gewaschen worden waren, wurden sie in 25 µl DEPC-Wasser gelöst.

2.5.3.4 Quantitative Bestimmung des RNA-Gehaltes

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde nach unten stehender Gleichung durch Absorption bei 260nm bestimmt. Hierzu wurde eine 1:50 Verdünnung der entsprechenden Probe in einer Quarzküvette gemessen und die Konzentration berechnet :

c=OD₂₆₀ * f * n [µg/ml]

- c: Konzentration
- OD: Optische Dichte
- f: Verdünnungsfaktor
- n: 40µg/ml für RNA, 50 µl/ml für DNA bei einer Schichtdicke von 1 cm

Außerdem wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt, um eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäuren machen zu können. Für DNA liegt der Quotient im Idealfall bei 1,8, für RNA bei 2,0.

2.5.3.6 RT-PCR nach Stratagene

Anhand des OD-Wertes wurde jeweils das Volumen des Aliquots bestimmt, welches 2 μ g RNA enthielt. Dieses wurde abgenommen und mit DEPC-Wasser auf 10 μ l aufgefüllt. Zu der RNA-Lösung wurde nun folgendes zugeben:

Mix I: 10,5 μl DEPC-Wasser <u>1,5 μl</u> oligo dT (100ng/μl) 11,5 μl
Nach Zugabe von Mix I wurde 5 Minuten bei 56°C und anschließend 2 Minuten bei 0°C inkubiert.

- Mix II: 5,5 µl DEPC-Wasser 1,5 µl 10x Puffer <u>0,5 µl</u> Rnase Block (0,5U/µl) 7,5 µl
- Mix III: 3,5µl DEPC-Wasser 1,0µl 10x Puffer 1,5µl dNTPs (25 mM) <u>0,5 µl</u> MMLV (20 U/µl) 6,5 µl

Nach Zugabe von Mix II und III wurde abzentrifugiert und für 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 175 µl dd H₂O zugegeben.

2.5.4 PCR-Analyse

Für die nun folgende PCR-Analyse wurde jeweils nur 5 µl der durch die RT-PCR herstellen cDNA verwendet.

PCR-Mix je Probe: 10,0 μ I dd H₂O 2,0 μ I 10x Puffer 1,5 μ I dNTPs 1,5 μ I Primer 0,05 μ I Goldstar Polymerase <u>5,0 μ I</u> Template (cDNA) 20,0 μ I

PCR-Kondition: 96°C/ 1 min 96°C/ 30 sec 58°C/ 30 sec für Primer: Actin, Gap dh, Plasminogen, uPA oder 60°C/ 30sec uPAR Primer 72°C/ 60 sec

Anschließend wurde auf 4°C abgekühlt.

Von den Proben wurden jeweils 6 μ l mit 1,5 μ l Auftragspuffer versetzt und auf ein Agarosegel (1-3%) aufgetragen.

Das Gel wurde anschließend bei ca. 80-100 Volt (und größtmöglicher Amperezahl) laufen gelassen. Die Färbung erfolgte 10 min lang in einer Ethidiumbromid-Lösung und wurde von einer 10 minütigen Entfärbung in normalem Wasser gefolgt. Photografiert wurde das Gel im UV-Licht durch eine Videokamera.

2.5.4.1 Amplifikations- und Hybridisierungsprimer des RT-PCR Assays

GAPDH (412 bp) (Tokunaga et al., 1987, 77)

5' Primer	(324-342)	CGATGCTGGCGCTGAGTAC
3' Primer	(736-717)	CGTTCAGCTCAGGGATGACC
H-Primer	(365-384)	TTCACCACCATGGAGAAGGC

uPAR (613 bp) (Roldan et al., 1990, 68)

5' Primer	(164-183)	GCTCTGGGACAGGACCTCTG
3' Primer	(756-777)	CATTGATTCATTGGGCCTCGGC
H-Primer	(580-605)	CAACATTCTCAGTGACTGGAAGTTC

uPA (747 bp) (Nagai et al., 1985, 146)

5' Primer	(401-423)	CAGATCTGATGCTCTTCAGCT
3' Primer	(1128-1148)	GTGACTTCAGAGCCGTAGTAG
H-Primer	(510-530)	CAAGAGTGCATGGTGCATGAC

tPA (811 bp) (Harris et al., 1986, 147)

5' Primer	(256-274)	GCTCAGAAGCAACCGGGTG
3' Primer	(1067-1048)	GGCAAAGATGGCAGCCTGCC
H-Primer	(464-483)	GACCAGGGCATCAGCTACAG

PAI-1 (915 bp) (Wun and Kretzmer, 1987, 81)

5' Primer	(409-430)	GAGAGAGCCAGATTCATACTC
3' Primer	(1302-1324)	CAAGGTCTTGGAGACAGATCT
H-Primer	(506-524)	GGCTGGTGCTGGTGAATGC

PAI-2 (1061 bp) (Schleuning et al., 1987, 86)

5' Primer	(272-293)	GTTCATGCAGCAGATCCAGAAG
3' Primer	(1313-1332)	GAGGCACACAGCTCATCTAC
H-Primer	(364-384)	CTCTGCAATCAATGCATCCAC

H-Primer= Hybridisierungsprimer

<u>3. Ergebnisse</u>

3.1 Chondrozytenkulturen

Aus Schweinepatellaknorpel wurden Chondrozyten isoliert und unter folgenden Bedingungen kultiviert:

- 1.) In Monolayer-Kultur mit 4.4 x 10⁵ Zellen/cm² (anchorage-d dependent growth)
- 2.) In Suspensionskultur auf Agarosegelen mit 1,4 x 10⁵ Zellen/ml (anchorage-independent growth)
- 3.) Als Suspensionskultur in 0.5% Ágarose eingegossen mit 2.1×10^6 Zellen/cm³
- 4.) Als Suspensionskultur in 0.3% Kollagengel (aus Hühnerhaut) mit 1.5×10^{6} Zellen/cm³ eingegossen
- 5.) In Kultur in Gegenwart von 5 % Dextran T-40 und 95 μ g/ml A Ascorbinsäure mit 7× 10⁴ Zellen/cm³
- 6.) Als serumfreie High-Density-Kultur unter Stimulierung mit PMA bzw. Vitamin-A-Säure mit 1.78×10⁷ Zellen/cm³
- 7.) High-Density-Kulturen, stimuliert mit Vitamin-A-Säure, Endkonzentration 1 x 10⁻⁶ Mol/I
- 8.) High-Density-Kulturen, stimuliert mit PMA, endgültige Konzentration 1,6 x 10⁻⁸ Mol/I

Der Nachweis von Plasminogen in den Kulturmedien und den Zellysaten wurde mit drei unterschiedlichen Methoden durchgeführt:

3.1.1 Radialdiffusion:

Der Nachweis von Plasminogen und plasminogenähnlichen Zymogenen durch Radialdiffusion zeigte für die Proben 1-8 (s. o.) keinerlei Lysishöfe im Gel zwischen den Stanzlöchern(siehe Abb. Nr. 1). Die Positivkontrolle erfolgte mit einer Lösung von Plasminogen in humanem Serumalbumin. Zwischen diesen Stanzlöchern waren deutliche Lysishöfe sichtbar. Die Lysishöfe entstehen durch die Aktivierung von Plasminogen durch uPA zu Plasmin, welches das umgebende Agarose-Casein-Gel abbaut(Abb. 1). Die untere Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei 4 ng/20µl in die Stanzlöcher eingebrachter Testlösung.

Abbildung 2:



Untersuchungsflüssigkeit

Urokinase Gel Lysishöfe



Casein-Agarose-

der Plasminogen von Abbildung Nr. 1: Inkubationsbedingungen 48 Std. bei 37°C Das Auftreten von Lysishöfen zeigt das Vorhandensein Untersuchungslösung an

<u>з</u>6

<u>3.1.2. Zymographie:</u>

Mit Hilfe eines Casein enthaltenden Polyacrylamid-Detektorgels, daß nach durchgeführter SDS-PAGE auf das Trenngel aufgelegt wurde, sollten Plasminogen bzw. plasminogen-ähnliche Zymogene nachgewiesen werden. Während in der Positivkontrolle deutliche Lysishöfe im Detektorgel sichtbar waren (Abb.4), konnte in keiner der oben beschriebenen Proben der Nachweis von Plasminogen erbracht werden (Abb.3). Die untere Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode bei 25 ng/5µl aufgebrachter Testlösung.





Abb.4: Positivkontrolle: deutlicher Lysishof sichtbar



3.1.3. Western-Blotting:

Auch durch Anwendung von Kanninchen-IgG-Antikörpern gegen Plasminogen ließ sich in den beschriebenen Proben kein Plasminogen nachweisen. Die untere Nachweisgrenze liegt bei dieser Mehthode bei 10 ng/5µg aufgebrachter Testlösung.

In keiner der verwendeten Untersuchungsmethoden konnte in den Chondrozytenkulturmedien und Zellysaten Plasminogen bzw. ein plasminogenähnliches Zymogen nachgewiesen werden.

3.2 Isoelektrische Fokussierung:

Die Fähigkeit eines Proteins in den Gelenkknorpel zu diffundieren hängt wesentlich von seiner Ladung ab. So sind anionische Proteine (z. B. α_1 -Antitrypsin mit einem M_r von 55.000 und einem pl von 4,6) nicht in der Lage in die Knorpelmatrix einzudringen. Kationische Proteine mit einem pl von > 8,5 und ein M_r bis 240.000 können dagegen tief in den Knorpel eindringen.

Es folgte daher die Bestimmung des pl des Plasminogens in der Gelenkflüssigkeit durch IEF (<u>i</u>so<u>e</u>lektrische <u>F</u>okussierung). Verwendet wurden jeweils sechs verschiedene Synoviaproben aus den unten aufgeführten Gruppen:

Proben	pl	Mr
1. Gonarthrose	7,45 -8,49	89.100
2. aktivierte Gonarthrose	7,17 -8,47	89.600
 3. isoliertes Plasminogen: mit Mercaptoethanol reduziert 	7,25 -9,26	90.500
isoliertes Plasminogen: -nicht reduziert	6,7 -8,5	88.700

Die IEF ergab sowohl für Plasminogen in den Gelenkpunktaten als auch für isoliertes, kommerziell erworbenes Plasminogen keine einheitlichen pl-Werte, sondern einen pl-Bereich, in dem sich Plasminogen nachweisen ließ.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse besteht die Möglichkeit, daß zumindest die Plasminogenfraktionen mit höherem pl in den Gelenkknorpel eindringen könnten.

3.3 ¹²⁵J-Markierung von Plasminogen

Zur abschließenden Klärung dieser Frage bzw. um die Diffusibilität sichtbar zu machen, erfolgte die radioaktive Markierung von Plasminogen mit ¹²⁵J. Nach Durchführung der Jodmarkierung wurde das nicht umgesetzte ¹²⁵Jodid von dem ¹²⁵J-markierten Plasminogen mit Hilfe einer Sephadex G-25 Säule abgetrennt.

In zahlreichen Vorversuchen hatten wir die Auftrennung des oben beschriebenen Reaktionsgemisches an Säulen unterschiedlicher Größe untersucht. Der Nachweis des als Protein eingesetzten Albumin (Mr) wurde mit Hilfe der Breadford-Reaktion (Blaufärbung) durchgeführt, der Nachweis des Jodides (Ausfall eines gelben Niederschlag) mit AgNO₃. Hierbei ergab sich eine optimale Länge der Säule von 13 cm bei einem Durchmesser von 1,2 cm. Erst bei dieser Länge der Säule war gewährleistet. daß eine sichere Abtrennung des markierten Plasminogens von dem Rest des radioaktiven Jodides gewährleistet werden konnte.

<u>Abbildung 5:</u>



Vorversuch zur Säulenlänge

3.3.1 Ergebnis der spezifischen Aktivitätsbestimmung

Reaktionsgemisch wurde auf die Säule aufgetragen, Fraktionen von je 1,1 ml in Eppendorfröhrchen aufgefangen und anschließend deren Aktivität gemessen. Es ergab sich folgende Verteilung:

Rö 1	0,00	MBq	Rö	17	9,66	MBq
Rö 2	0,001	"	Rö	18	10.92	"
Rö 3	0,000	"	Rö	19	8.282	"
Rö 4	0,000	"	Rö	20	2,600	"
Rö 5	0,000	"	Rö	21	0,274	"
Rö 6	0,001	"	Rö	22	0,205	"
Rö 7	7,885	"	Rö	23	0,172	"
Rö 8	14,35	"	Rö	24	0,163	"
Rö 9	15,63	"	Rö	25	0,141	"
Rö 10	15,90	"	Rö	26	0,163	"
Rö 11	2,846	"	Rö	27	0,141	"
Rö 12	0,648	"	Rö	28	0,097	"
Rö 13	0,524	"	Rö	29	0,113	"
Rö 14	0,663	"	Rö	30	0,108	"
Rö 15	1,402	"	Rö	31	0,127	"
Rö 16	6,273	"	Rö	32	0,176	"

Eine graphische Darstellung ist aus Abb. 6 ersichtlich:



Die anschließend durchgeführte Proteinbestimmung ergab eine spezifische Aktivität der Plasminogenlösung von 0,03289 MBq/µg Protein, was 0,86µCi/µg entspricht.

Miles and Plow, nach deren Vorschrift wir uns richteten, setzen 369 μ g Plasminogen und 74 MBq ¹²⁵J ein und fanden eine spez. Aktivität von 1,6 ±0,9 μ Ci/ μ g. Da wir mehr als das 10-fache an Plasminogen eingesetzt hatten, konnte unsere spezifische Aktivität als sehr gut bezeichnet werden.

Die Aktivitätsmessung der Patellae nach dem Inkubieren und Waschen mit BSA/PBS ergab folgende Werte:

1.)inkubiert für 21 h, dann in Formalin 0,321	MBq
2.)inkubiert für 21 h, dann in Formalin 0,295	"
3.)inkubiert für 21 h, dann in Formalin 0,405	"
4.)inkubiert für 21 h, dann in Formalin 0,309	"
5.)inkubiert für 4,15 h, dann in Formalin 0,449	"
6.)inkubiert für 4,15 h, dann in Formalin 0,326	"
7.)inkubiert für 22,5 h, dann in Formalin 0,298	"
8.)inkubiert für 22,5 h, dann in Formalin 0,323	"

Zum Entkalken wurden die Patellae in 5% Ameisensäure inkubiert und die verbleibende Aktivität notiert:

1.)	0,278	MBq	5.)	0,373	MBq
2.)	0,257	"	6.)	0,255	"
3.)	0,332	"	7.)	0,248	"
4.)	0,267	"	8.)	0,246	,,

Die unterschiedliche Aktivität, die theoretisch bei den Papain behandelten, bzw. den über 22,5 Stunden inkubierten Patellae am größten sein müßte, ist durch das teilweise noch anhaftende Bindegewebe zu erklären. Da große Vorsicht bei der Präparation aufgewandt wurde, um die Unversehrtheit der Patella zu gewährleisten, wurden schlecht abzulösende Gewebsreste belassen. Da diese Gewebsmenge bei den Patellae unterschiedlich war, trug die in diesem Gewebe befindliche Radioaktivität zu den unregelmäßigen Meßwerten bei den einzelnen Patellae bei.

Insgesamt ließ sich das Bindegewebe der Patellae 7 und 8 der größeren Ratte leichter entfernen als bei den anderen Ratten.

Einen Einfluß auf die von uns untersuchte Diffusibilität des markierten Plasminogens hatte diese Tatsache nicht.

Die anschließende Messung der Kniescheiben nach Entfernung von anhaftendem Bindegewebe zeigte folgende Aktivitäten:

1.)	0,230MBq	5.)	0,026MBq
2.)	0,246 "	6.)	0,100 "
3.)	0,323 "	7.)	0,098 "
4.)	0,256 "	8.)	0,069 "

3.4 Autoradiographie

Nach der Inkubation mit dem radioaktiven ¹²⁵J-Plasminogen ergaben sich die acht folgenden unterschiedlich behandelten Proben:

1.)	Papain behar	ndelt, 100µl PIsg.	21h	inkubiert	in Formalin
2.)	Papain behar	ndelt, 100µl PIsg.	21h	inkubiert	in Formalin
3.)	100µl Plg.,	5µl Tras.	4,5 h	inkubiert	in Formalin
4.)	100µl Plg.,	5µl Tras.	4,5 h	inkubiert	in Formalin
5.)	200µl Plg.,	5µl Tras.	21 h	inkubiert	in Formalin
6.)	200µl Plg.,	5µl Tras.	21 h	inkubiert	in Formalin
7.)	300µl Plg.,	5µl Tras.	22,5 h	inkubiert	in Formalin
8.)	300µl Plg.,	5µl Tras.	22,5 h	inkubiert	in Formalin

(Plg. = Plasminogen, Tras. = Trasylol)

Zur Durchführung der Autoradiographie wurden die Proben nach erfolgter Exposition unterschiedlich lange entwickelt:

Probe in	anschließende Entwicklungszeit							
Emulsion	x = durchgeführt							
	0,5 min	1 min	1,5 min	2 min	3 min	5 min		
Patella 1								
- 2 Wochen	Х	х	Х	Х	х	Х		
- 4 Wochen		x	х		х			
Patella 2	Х	х	Х	Х		Х		
- 2 Wochen	Х	х	Х	Х	х	Х		
- 4 Wochen	х	x			х			
Patella 3								
- 2 Wochen	х	x	х	Х	х	х		
- 4 Wochen	х		х		х			
Patella 4								
- 2 Wochen	х	x	х		х	х		
- 4 Wochen	x	x	x		x	x		

Patella 5						
- 2 Wochen	Х	Х	х	Х	X	Х
- 4 Wochen	Х	Х	х		Х	
Patella 6						
- 2 Wochen	Х	Х	Х		X	Х
- 4 Wochen		X	X		X	
Patella 7						
- 2 Wochen	Х	Х	X		X	Х
- 4 Wochen	Х	Х		Х		
Patella 8						
- 2 Wochen	Х	X	X	х	х	X
- 4 Wochen	х		X		X	

3.5 Histologische Untersuchungen

Die Bilder der Positivkontrollen zeigen erwartungsgemäß nach 21 stündiger Papaininkubation ein deutliches Eindringen des radioaktiv markierten Plasminogens in den Knorpel. Deutlich sichtbar ist bei 200x Vergrößerung der Aufnahmen, daß das Plasminogen nicht nur im EZM, söndern auch im Intrazellularraum der Chondrozyten angereichert wird. Es zeigen sich keine Unterschiede bei den Patellae 1 und 2, auch hat die unterschiedliche Entwicklungszeit keinen sichtbaren Einfluß auf das Präparat.



Präparat 1, 21 stündige Papaininkubation, 200 x Vergrößerung, ungefärbt



Präparat 2, 21stündige Papaininkubation, 100 x Vergrößerung, ungefärbt.

In den Abbildungen der Patellae 3 und 4 nach 4,5 stündiger Inkubation ist nur ein oberflächliches Eindringen des markierten Plasminogens in den Knorpel sichtbar. Im Vergleich zu den zuvor mit Papain behandelten Proben, ist jedoch nur die Markierung eines Randsaumes zu beobachten. Entsprechend der Länge der Inkubationszeit ist nur ein Eindringen in die oberflächlichen Knorpelschichten zu beobachten. Auch auf diesen Aufnahmen ist die intrazelluläre Lage des Plasminogens gut sichtbar.



Patella 3, 4,5 stündige Inkubation, 200 x Vergrößerung, ungefärbt



Patella 4, 4,5 stündige Inkubation, 200 x Vergrößerung, ungefärbt

Die Patellae 5 und 6 zeigen entsprechend der langen Inkubationszeit von 21 Stunden ein deutliches Fortschreiten des radioaktiv markierten Plasminogens im Knorpel. Gut sichtbar ist die beginnende Infiltration des enchondralen Knochen.



Patella 5, 21 stündige Inkubation, 100 x Vergrößerung, ungefärbt



Schnitt des gleichen Präparats (Patella 5, 21stündige Inkubation), 200 x Vergrößerung, gefärbt nach Masson Goldner



Patella 6, 21 stündige Inkubation, 100 x Vergrößerung, ungefärbt



Schnitt des gleichen Präparats (Patella 6, 21 stündige Inkubation, 100 x Vergrößerung) gefärbt nach Masson Goldner

Die Patellae 7 und 8 zeigen nach 22,5 stündiger Inkubation ebenfalls nur eine oberflächliche Infiltration des Knorpels mit radioaktivmarkiertem Plasminogen. Von der Distanz der Eindringtiefe sind diese Aufnahmen mit denen der Patellae 3 und 4 zu vergleichen.



Patella 7, 22,5 stündige Inkubation, 100 x Vergrößerung, ungefärbt



Patella 8, 22,5 stündige Inkubation, 100 x Vergrößerung, ungefärbt.

Gut sichtbar auf allen abgebildeten Fotographien ist das Eindringen des radioaktivmarkierten Plasminogens in den Gelenkknorpel. Dabei zeigt sich eine besonders starke Penetration der oberflächennahen Knorpelschichten.

3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

3.6.1 Definition der Proben

<u>Beze</u>	<u>ichnung</u>		Inhalt der Proben
K1	Bov. Ch	ı	Normale Chondrozyten aus Rinderknorpel
K2	Bov. CF	4	Normale Chondrozyten aus Rinderknorpel
K3	Bov. Kp)	Knorpelpulver 260 mg
K3	Bov. Kp	Α	Knorpelpulver 260 mg RNA Insta Pure nachbehandelt
K3	Bov. Kp	в	Knorpelpulver 260 mg RNA Insta Pure nachbehandelt
K4	Bov. Kp)	Knorpelpulver 240 mg
K4	Bov. Kp	Α	Knorpelpulver 240 mg RNA Insta Pure nachbehandelt
K4	Bov. Kp	B	Knorpelpulver 240 mg RNA Insta Pure nachbehandelt
K5	Bov. MI	. K	Chondrozyten Monolayer Kontrolle
K6	Bov. MI	. PMA	Chondrozyten Monolayer PMA stimuliert
K7	Bov. MI	. RA	Chondrozyten Monolayer RA stimuliert
K8	Bov. Su	isp. K	Chondrozyten Suspensionskultur Kontrolle
K9	Bov. Su	isp. RA	Chondrozyten Suspensionskultur RA
			stimuliert
L1	Hum. Al	K	Humaner Arthroseknorpel Knie-TEP
			$2,85 \times 10^6$
L2	Hum. Al	K	Humaner Arthroseknorpel Hüft-TEP 5.77 x 10 ⁶
L3	Bov. Ch	n.A. K	Chondrozytenkultur in Agarose Kontrolle
L4	Bov. Ch	n.A. PMA	Chondrozytenkultur in Agarose RA
			stimuliert
L5	Bov. Ch	n.A.RA	Chondrozytenkultur in Agarose PMA
16	Boy Kn	h	Knorpelpulver 310 mg
17	Bov Kn)	Knorpelpulver 250 mg
18	Boy. Ch	, 1	Chondrozyten aus Rindergelenkknorpel
19	Boy. Ch	1	Chondrozyten aus Rindergelenkknorpel
110	Boy. I	•	Rinderleber 116 mg
111	Boy I		Rinderleber 100 mg
112	Boy. Su	ISD. PMA	Chondrozyten Suspensionskultur PMA
	201.04		stimuliert
D2	Uo		U 937
D11			THP 1 PMA stimuliert t=0
D12	T₁		THP 1 PMA stimuliert t=0
D16	Mo		Mec 01 PMA stimuliert $t=0$
D17	M₁		Mec 01 PMA stimuliert $t=0$

H3	Hep G2	Hep G2
J8	Hep G2	Hep G2
J9	A549	A549

Die Einteilung der Proben in die Gruppen K, L etc. richtete sich nach dem zeitlichen Eingang der Chondrozytenkulturen im Labor. Es stellte somit keine Kennzeichnung unterschiedlicher Verfahrens-weisen dar.

3.6.2 Ergebnis des Nachweis von essentiellen mRNAs

Um die Aufbereitung der Proben zu überprüfen, wurde zuerst die Expression von essentiellen Enzymen durch die PCR untersucht. Benutzt wurden dazu die Primer von Actin und Cyclophilin. BILD 1+2

In den Proben der ersten Aufarbeitung ließen sich Actin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) in den Chondrozyten, Monolayer- und Suspensionskulturen nachweisen, nicht jedoch im Knorpelpulver. Eine Ausnahme bildete die Kontrollprobe der Monolayerkultur, in der sich GAPDH (aber nicht Actin) nachweisen ließ. Die Aufarbeitung der Monolaverkultur schien wegen des positiven GAPDH-Nachweises jedoch trotzdem in Ordnung gewesen zu sein. In einer zweiten Aufarbeitungsserie wurde eine neue Methode zur Aufarbeitung der in Agarose eingebetteten Chondrozytenkulturen entwickelt, da eine solche bis jetzt in der Literatur nicht beschrieben ist. Anschließend ließen sich sowohl Actin als auch GAPDH nachweisen.

3.6.3 Zusatzbehandlung von negativen Proben

Die in der ersten Serie negativen Knorpelpulverproben enthielten vermutlich zu viele gelöste Polysaccharide, die bei der OD-Bestimmung mitgemessen wurden und so den RNA-Wert höher erscheinen ließen als er in Wirklichkeit war. Als Folge wurde deshalb zu wenig RNA in die RT-PCR Reaktion eingesetzt. Um die negativen Knorpelpulverproben aufzureinigen, der ersten Aufarbeitung wurden sie einer Nachbehandlung unterzogen. Die Hälfte der Probe wurde noch einmal mit RNA Insta-Pure und die andere Hälfte mit Insta-Pure Plus behandelt. Die Nachbehandlung führte bei beiden Methoden zum Erfolg. Allerdings scheint bei den Knorpelpulverproben die Ausbeute an RNA nur sehr gering zu sein, da sich vorallem das leichter nachweisbare GAPDH amplifizieren ließ. Auch aufgrund der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die die gleichen Beobachtungen machten, scheint GAPDH in Chondrozyten stärker exprimiert zu werden. Insgesamt muß das Knorpelpulver als nur bedingt tauglich für den RNA-Nachweis betrachtet werden. Die so zubereiteten Proben wurden daher von uns im Verlauf der Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

3.6.4 Untersuchung der Chondrozyten auf die Expression von Plasminogen

Die Proben wurden im weiteren auf die Expression von Plasminogen untersucht. Dazu wurden die Primer 2/4 benutzt. Durch diese Primerkombination wurde eine 3 Exons umfassende cDNA von 289 bp Länge amplifiziert. Die Ergebnisse ergaben ein uneinheitliches Bild.

3.6.5 Überprüfung der Methoden

In dem Bestreben die Spezifität der PCR zu erhöhen, erhitzen wir den Reaktionsansatz auf 65°C, bevor wir die Taq-Polymerase hinzugaben. Diese modifizierte "hot-start"- Technik, erbrachte eine deutliche Verbesserung der Effizienz.

Unter der klassischen "hot-start"-Technik versteht man das Erhitzen der zu verarbeitenden Probe auf Temperaturen von über 90°C, bevor eine weitere Komponente (in den meisten Fällen die Taq-Polymerase) hinzugegeben wird. Durch dieses Erhitzen erreicht man eine höhere Temperatur als die spezifische Annealing-Temperatur, wodurch die Bildung unspezifischer PCR-Produkte vermieden werden soll. Insgesamt ist es möglich, auf diese Art und Weise eine Verbesserung der Effizienz, der Menge sowie der Spezifität zu erreichen. Da die Spezifität unserer Proben nach der Vorbehandlung gut war, war eine Erhöhung der Ausgangstemperatur auf 65°C ausreichend.

3.6.6 Neuauftragung ausgewählter Plasminogen-PCR-Proben

Auch bei dieser Probenauftrennung waren wieder die Leberprobe und das Plasminogenplasmid positiv.

In den Proben K8, L12 und K9 fanden sich Banden, die der des Plasminogens sehr nahe kamen, aber trotzdem aufgrund ihrer uneinheitlichen Lage nicht als positiv bewertet werden dürfen. In den Chondrozyten scheint aufgrund der bisherigen Befunde kein oder nur sehr wenig Plasminogen exprimiert zu werden.

Zu Überprüfung der Ergebnisse und um auszuschließen, daß eine der erwähnten Banden doch Plasminogen-bedingt ist, wurde eine Shooting-PCR durchgeführt.

3.6.7 Plasminogen Shooting-PCR

Bei dieser Shooting-PCR wurden die mit dem Plasminogen-Primern 2/4 amplifizierten Proben im gleichen Versuchsansatz nochmals amplifiziert. Dazu wurde eine andere Primerkombination gewählt. Verwendet wurden die Primer 2/3, wobei Primer 3 ein Rückprimer war. Er ist komplementär zu einer Sequenz innerhalb der amplifizierten DNA, so daß die amplifizierte DNA nochmals amplifiziert ("Shooting") wird. Die zu erwartende Länge des Fragments besteht aus 167b und nur noch zwei Exons. Zur Erinnerung sei erwähnt, daß der Primer 2/4 289 b und drei Exons hatte.

Mit der Shooting-PCR ließ sich eine schwache Plasminogenbande bei einer der Patientenproben mit einer aktivierten Coxarthrose nachweisen. Der Unterschied zu den anderen Patientendaten ist jedoch, daß von dieser Probe deutlich mehr Zellen zur Verfügung standen.

Alle anderen Proben zeigten auch in diesem Versuchsansatz keine Plasminogenbanden.

<u>3.6.8 Untersuchung der Expression des u-PA und des u-PA-</u> <u>Rezeptors</u>

Zur weiteren Absicherung, daß die Chondrozytenkulturen einwandfrei verarbeitet wurden, untersuchten wir die Expression von u-PA und seines Rezeptors u-PAR, die in der Literatur beschrieben sind. Dies gelang in allen Proben. Entscheidend war, daß die Patientenproben deutliche Banden, sowohl bei u-PA als auch bei u-PAR zeigten.

In den Zellinien U937, Thp 1, Hep G2, A549 und Mec1 konnte uPAR nachgewiesen werden. In Mec1 scheint durch Zugabe von PMA die uPAR Expression sogar noch gesteigert zu werden. In der Leber scheint uPAR kaum exprimiert zu werden. Da es sich bei der Leber aber um besonderes Gewebe handelt, ist es auch denkbar, daß uPAR nicht in den Leberzellen direkt, sondern in anderen Zellen, wie z. B. in den Endothelzellen der Lebergefäße exprimiert wird.

<u>Abbildung 7:</u>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
				6238	ano		-			-	-	-	
- hill				-	-	-	-		-	-	4	#	
111								1111		-712.0		-	1 1 1 11
	-	-	-	-	-	•	•	-	-	-	-	-	<u>.</u>
								-					_
1 2	.) .)	K1 K2	Ch Ch	on on	dro dro	. F	Rino Rino	der der	ge ge	len len	ke ke		

3.)K5 Chondro. Monolayer K

- 4.) K6 Chondro. Monolayer PMA 5.)K7 Chondro. Monolayer RA
- 6.)K8 Chondro. Susp. Kultur K

uPA uPAR PIsg 1-4 Actin

- 7.) K9 Chondro. Susp. Kultur RA
- 8.) Längenmaßstab (Standard)
- 9.) L8 Chondro. Rindergelenk
- 10.) L2 hum. Arthroseknorpel
- 11.) L1 hum. Arthroseknorpel
- 12.) K+

<u>4. Diskussion</u>

4.1 Diskussion der Methode:

4.1.1 Radialdiffusion

Die Radialdiffusion nach Saksela (102) ist eine einfach zu handhabende und zugleich sehr sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung von Enzymen. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, daß der Durchmesser der durch die Proteolyse entstandenen Lysiszonen der Menge der eingesetzten Urokinase proportional ist.

Die Lyse der zu untersuchenden Zellen wurde durch Zusatz von Triton X-100 erzielt, welches seinerseits nachweislich keinen Einfluß auf das Diffusionsverhalten der Substanz zeigte und auch die Reaktion nicht störte(103).

Da es sich bei der Caseinolyse um eine katalytische Reaktion handelt, ist es notwendig in regelmäßigen Abständen die Ergebnisse der Reaktion zu beobachten, um optimale Werte für die Proben und die eingesetzten Standards zu erhalten. Die Verwendung von standardisierter Urokinase, (in unserem Fall Ukidan, Serono), parallel zu den Proben ergab ausgesprochen exakte Referenzwerte.

<u>4.1.2 Zymographie zum Nachweis von Plasminogen</u>

Diese Technik ermöglicht den Nachweis von Plasminogen in einem SDS-Polyacrylamidgel (PAG). Zur Herstellung des Indikatorgels werden Urokinase und Casein in das PAG eingegossen. Während einer anschließenden Elektrophorese hält die Gelmatrix die zu untersuchenden Substanzen "fest", und ermöglicht so nach Färbung die Darstellung spezifischer Banden. Durch eine relativ kompakte Struktur und eine kleine Porengröße (in unserem Fall T= 10%, C=3,2%) des Polyacrylamidgels wird die Diffusion der Substanz nach lateral verhindert.

Das anionische Detergenz Triton X-100 wird zur Entfernung von SDS eingesetzt und führt zur Wiederherstellung der Enzymaktivität. Triton behindert den Nachweis der Untersuchungssubstanz nicht.

Da die Technik von der Enzymaktivität der Proben abhängt, dürfen diese vor der Elektrophorese nicht erhitzt werden.

4.1.3 Western-Blotting

Das Protein- oder Western-Blotting verbindet die Möglichkeiten der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese zum immunologischen Nachweis einzelner Proteine mit den von Southern für DNA entwickelten Blotting-Techniken. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine nicht in eine Gelmatrix eingebettet, sondern auf einen Träger, in unserem Fall Nitrozellulosepapier, aufgetragen.

Von Bedeutung ist die Höhe des pH Wertes, da ein pH in gleicher Höhe des pl der zu untersuchenden Proteinprobe das korrekte Wandern der Probe im elektrischen Feld verhindert. Mit einem pH von 9,8 lagen wir deutlich über dem für Plasminogen ermittelten pl von 7,2-8,5.

Ein häufiges Problem beim Western-Blotting stellt die schlechte Bindung der Untersuchungssubstanz an die Membran dar. Plasminogen jedoch hätte wenn es in den Proben vorgelegen hätte aufgrund seines hohen kD gut an die Membran gebunden. Dies wurde in der Kontrollprobe bestätigt.

Da Nitrozellulosepapier nicht geeignet für eine Färbung mit Coomassie Blau ist, verwendeten wir stattdessen Nitro Blau Tetrazolium, welches eine gute Färbbarkeit bei den Kontrollproben aufwies. Wie erwähnt ließ sich jedoch auch mit dieser Methode in unseren Untersuchungsproben kein Plasminogen nachweisen.

4.1.4 Isoelektrische Fokussierung des Plasminogens

Die IEF ist eine besondere Form der PAGE. Dabei werden die zu untersuchenden Proteinproben auf ein Gel, welchem Ampholyte zugesetzt wurden, aufgetragen und unter denaturierenden oder nichtdenaturierenden Bedingungen entlang eines pH-Gradienten aufgetrennt. Die geladenen Moleküle wandern in dem elektrischen Feld solange bis sie die pH-Region erreicht haben, die ihrem isoelektrischen Punkt (pl) entspricht und verharren dort. Die so entstehenden Banden können durch Färbung sichtbar gemacht und mit Hilfe der Densitometrie ausgewertet werden.

Die Stromzufuhr erfolgte in unserem Fall über zwei waagerechte Graphitplatten mit hoher Leitfähigkeit. Dadurch konnte mit geringer elektrischer Leistung eine hohe Transfereffektivität erzielt und auf eine Kühlung verzichtet werden.

4.1.5 Diffusion von ¹²⁵J-Plasminogen in intaktem Gelenkknorpel

Bei der Präparation der Patella beschritten wir einen anderen Weg als ihn die meisten Autoren bisher beschrieben haben: Wir verwendeten ganze Patellae und keine Knorpelstanzzylinder oder Knorpelscheiben. Dadurch konnten wir die Unversehrheit der Knorpeloberfläche gewährleisten.

Guerra et al. (104) fanden in immuncytochemischen Versuchen, daß der Gelenkknorpel von einer "Pseudo-membran" bedeckt wird, die aus Phospholipiden, Glykosaminoglykanen und Proteinen besteht. In dieser Membran lassen sich drei diskontinuierliche Schichten voneinander unterscheiden, die Hyaluronsäure, Lipide und Proteoglykane an sich binden. Guerra geht davon aus, daß diese "Pseudomembran" zum Schutz des Gelenkknorpels vor toxischen Bestandteilen der Synovialflüssigkeit und/oder das Gleiten der Gelenkflächen gegeneinander verbessert (104). Bei der Entnahme eines Knorpelstanzzylinders kommt es unweigerlich zu einer Verletzung dieser "Pseudomembran" und dadurch bedingt zum Herauslösen verschiedener Bestandteile der Membran und ihrer Anlagerung in der Knorpelmatrix. Durch besonders vorsichtige Präparation vermieden wir die Verletzung der Knorpeloberfläche und damit die "Kontamination" des Knorpelgewebes durch Substanzen aus benachbarten Strukturen oder der Synovialflüssigkeit.

Als Positivproben wurden zwei Patellae mit Papain inkubiert. Papain verfügt unter den handelsüblichen Proteinasen über die ausgeprägtesten proteindegradierenden Kapazitäten. Papain ist in der Lage die Proteine zwischen jeder einzelnen Glykosaminoglykankette zu spalten (105). Durch die Papainbehandlung erzeugten wir größere Hohlräume in der ganzen Knorpelschicht womit wir einen sicheren Zugang des Plasminogens in den Gelenkknorpel gewährleisteten.

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Um zu einer endgültigen Aussage zu gelangen, war wie bereits erwähnt der Nachweis der Plasminogen-mRNA in den Chondrozyten erforderlich. Grundvoraussetzung für diesen Nachweis war die Isolierung von reiner RNA, da Beimengungen genomischer DNA zu einer Verfälschung der Ergebnissen führen können. Da nur für einige der von uns hergestellten Chondrozytenkulturen Methoden zur Vorbereitung für molekularbiologische Untersuchungen etabliert waren, wandten wir verschiedene Möglichkeiten zur RNA Isolation an.

Die von Chirgwin beschriebene Methode (106) basiert auf dem Aufbrechen der Zellen durch die Guanidiumthiocyanat-Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Methode. Eine hohe GTC-Konzentration führt zu der gewünschten Lyse, eine anschließende Zentrifugation zur Auftrennung der Zellbestandteile. Chomczynski modifizierte diese Methode durch Zugabe von Phenol/Chloroform und verzichtete dafür auf die Zentrifugation (107). Im Verlauf unserer Untersuchungen stellte sich heraus, daß eine Kombination aus Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Zentrifugation die besten Ergebnisse lieferte.

Im Zuge der RNA-Isolation ergab sich, daß sich der zu Pulver verarbeitete Knorpel nur sehr bedingt für molekularbiologische Untersuchungen eignete. Dies liegt wahrscheinlich daran, daß die Herstellung des Knorpelpulvers zur Freisetzung vieler Polysacharide führt, die weder durch Reinigung mit RNA Insta-Pure noch mit Insta-Pure Plus zu beseitigen waren. Da die aus diesen Proben gewonnen Ergebnisse nur sehr eingeschränkt aussagekräftig sind, wurden diese Proben im weiteren Verlauf der Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

Wie in den meisten gegenwärtig publizierten Arbeiten, verwendeten auch wir für die reverse Transkriptase MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase). MMLV-RT zeigt im Gegensatz zu anderen Enzymen keine Inhibierung durch rRNA (108). Aus der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Primer, verwendeten wir sequenzspezifische Primer, da sich die von uns gesuchten mRNA-Sequenzen exakt abgrenzen ließen.

Ein großes Problem stellte über längere Zeit dar, daß die cDNA Sequenz von menschlichem Apolipoprotein a zu Plasminogen eine weitgehende Homologie auf wies (109). Erst nach zahlreichen Versuchen fanden wir eine Primersequenz die spezifisch für Plasminogen war.

Als "houesekeeping genes" wurden GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und Actin verwendet. Beide Gene sind ubiquitär vorhanden, werden gleichmäßig exprimiert und sind nur schwach induzierbar. Für Actin werden diese Forderungen an ein housekeeping gene etwas eingeschränkt, da es Pseudogene gibt, so etwa von β -Actin. Trotzdem gelten beide als zuverlässige Standards bei Untersuchungen der Genexpression (110,111).

Das Ergebnis der PCR ist essentiel abhängig von der vorausgehenden Verarbeitung der Zellkulturen, der RNA-Isolation, der reversen Transkriptase der Wahl der Primer sowie der korrekten Durchführung der PCR an sich. Als Kontrolle setzten wir daher kommerzielle Längenstandards ein, die eine zuverlässige Aussage über die Reinheit der RNA und mögliche Effizienzunterschiede in der reversen Transkriptase erlauben.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, muß man den Abbau der extrazellulären Knorpelmatrix in zwei grungsätzlich verschiedene Abschnitte einteilen:

1. die weitgehend reversible Zerstörung des Proteoglykangerüstes und 2. die irreversible Aufspaltung des Kollagennetzwerkes.

Das dominierende Proteoglykan im Knorpel bzw. in der extrazellulären Matrix ist Aggrecan. Der Name Aggrecan basiert auf den Eigenschaften der Proteoglykane sich vereinigen (aggregating) zu können. Diese Aneinanderkettung von Proteoglykanen sowie die Bindung von Hyaluronsäure befähigen den Knorpel eine elastische Schutzschicht über dem subchondralen Knochen zu bilden und ihn damit vor Schäden zu schützen. Zwei strukturelle Eigenschaften prädestinieren das Aggrecan für diese Rolle (22,112):

1. seine ausgeprägte anionische Natur, aufgrund vieler sulfatierter Glykosaminoglykane und

2. seine Fähigkeit große Aggregate durch Verbindung mit Hyaluronsäure zu bilden.

Diese Eigenschaften des Aggrecans korrelieren mit der Aufteilung des Aggrecankernproteins in verschiedene strukturelle Abschnitte. Das Kernprotein besteht aus drei großen Komplexen: zweien am Amino-Ende, die G1 und G2 genannt werden und einem am Carboxy-Ende, das als G3 bezeichnet wird. Die G1-Region ist verantwortlich für die

Verbindung des Aggrecans mit der Hyaluronsäure. Diese ist unter physiologischen Bedingungen reversibel und wird zusätzlich stabilisiert durch ein kleines Glykoprotein, das sogenannte "link-protein". Jedes Link-protein. das sich durch eine auffallende strukturelle Übereinstimmung mit der G1-Region auszeichnet, geht sowohl mit der G1-Region als auch mit der Hyaluronsäure eine ausgesprochen stabile Verbindung ein. Zwischen der G2- und der G3-Region liegt ein Zwischenraum, den sich ausgedehnter an zahlreiche Glykosaminoglykanketten anlagern.

Der Glykosamingehalt verleiht dem Aggrecan ausgeprägte osmotische Eigenschaften, die dazu führen, daß das Molekül den Wassereinstrom in das Knorpelgewebe und damit seine Ausdehnung fördert. Unter normalen Umständen wird dieser Expansionsdrang durch die umliegenden Kollagenfibrillen begrenzt. Dabei erreicht das Aggrecan, limitiert durch die Kollagenfibrillen, im Knorpel unter physiologischen Bedingungen den Zustand seiner maximalen Ausdehnung nicht. sondern verharrt in einem unterhydrierten Zustand und verleiht dem Gewebe so einen positiven Ausbreitungsdruck (113,114). Unter Belastung kann der Knorpel durch Wasserverlust bis zu einem gewissen Grad komprimiert werden. Durch die Aggregationstendenz wird die freie Diffusion des Aggrecans begrenzt; durch die Kompression wiederum wird die lokale Konzentration der Proteoglykane erhöht, wodurch der lokale Ausbreitungsdruck erhöht und damit einer weiteren Deformation entgegen gewirkt wird. Sobald die Belastung abnimmt, bildet sich der angestiegene Ausbreitungsdruck zurück, indem das Aggrecan das verlorene Wasser wieder einlagert. Diese Eigenschaften des Aggrecan unterstützen den Gelenkknorpel auf vielfältige Art und Weise, z. B. wird auf diesem Wege der Ernährungsfluß gefördert und der bereits erwähnte Schutz des subchondralen Knochen ermöglicht (112,115).

Kommt es zu übermäßiger Druckbelastung reagiert die ECM darauf mit dem Versuch durch Umbauprozesse einen Schutz der Chondrozyten zu ereichen. So konnte in Versuchen demonstriert werden, daß es bei übermäßiger statischer Belastung des Knorpels zu einer Freisetzung von proteolytischen Faktoren kommt, die wiederum den Abbau der ECM fördern(115). Wird der Punkt ereicht, an dem die Proteinase vermittelte Degradation des Aggrecans nicht mehr kontrolliert werden kann, kommt es in Folge zu einer Zerstörung des Gewebes bzw. des betroffenen Gelenkes.

In diesem Fall ist entscheidend, daß der Aggrecangehalt hoch und die freie Diffusion dieser Moleküle limitiert ist. Das zuerst erwähnte Kriterium wird durch die ECM-Degeneration und den damit verbundenen Proteoglykanverlust beeinträchtigt. Das zweite Kriterium wird durch die Wirkung der proteolytischen Faktoren auf das Aggrecan oder das Kollagennetzwerk negativ beeinflußt. Jede dabei entstehende Abspaltung aus dem Aggrecanmolekül erzeugt ein Fragment, was nicht mehr in der Lage ist, eine Verbindung mit Hyaluronsäure einzugehen und damit seiner Funktion in der ECM nicht mehr gerecht werden kann(16). Kommt es zu einer Knorpelzerstörung im Rahmen der Osteoarthrose oder einer rheumatoiden Arthritis, ist Aggrecan eines der ersten Komponenten der Knorpelmatrix die zerstört werden. Die Verminderung des Aggrecansgehalts der Knorpelmatrix kann histologisch durch eine verminderte metachromatische Anfärbbarkeit nachgewiesen werden. Die aus dem Gewebe freigesetzten Aggrecanfragmente lassen sich durch verschiedene Tests wie z. B. Immunoassays der spezifischen Protein- oder der Kohlenhydrat-Epitope auf dem Aggrecanmolekül, chemische Assays auf der Basis sulfatierter Glykosaminoglykane oder durch Isolierung und Aufschlüsselung der gereinigten Fragmente darstellen (117).

Dieser meßbare Verlust führt letzlich dazu , daß der Knorpel seine ursprüngliche Funktion nicht mehr wahrnehmen kann. Für die Zerstörung des Aggrecans im Knorpel wird eine proteolytische Zerlegung innerhalb der interglobulären Domäne des Aggrecans verantwortlich gemacht. Das dafür verantwortliche Enzym konnte jedoch bis heute nicht identifiziert werden, wurde jedoch aufgrund seiner spezifischen Eigenschaft das Aggrecanmolekül an seiner zentralen Stelle zu spalten "Aggrecanase" genannt.

Zwei Hauptstellen der proteolytischen Spaltung konnten innerhalb der interglobulären Domäne dargestellt werden, eine zwischen den Aminosäuren Asn³⁴¹ und Phe³⁴² und die andere zwischen Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴. Mehrere Matrixmetalloproteinasen, so z. B. MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9 und -13 spalten Aggrecan zwischen Asn³⁴¹ und Phe³⁴². Auch Plasmin (46), Urokinase (78) und Elastase (22) spalten Aggrecan, jedoch an unterschiedlichen Stellen(s. Abb.).



Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aggrecans:

Hughes et al. konnten erstmals zeigen, daß das Aggrecanmolekül entweder von MMP oder Aggrecanase gespalten wird, aber nicht durch beide. Dieser Nachweis gelang durch die Entwicklung von neoepitopen Antikörpern (AF-28), die in der Lage, sind neu entstandene NH2- oder COOH-terminale Sequenzen, die das Produkt aus den spezifischen proteolytischen Vorgängen sind, zu erkennen. Ein weiterer Grund, warum es bisher nicht gelang, die durch MMP abgespaltenen nachzuweisen, ist, daß in früheren Studien die Fragmente Aggrecanfragmente mit hoher Dichte vom Boden des Cäsiumchlorid-Dichtegradienten isoliert wurden, während die von MMP abgespaltenen Fragmente in der erwähnten Studie ausschließlich an der Spitze des Dichtegradienten gefunden wurden(118).

Der Prozentsatz der Aggrecanmoleküle, die das AF-28 Epitop enthalten, kann durch Berechnung von pmol AF-28 Epitop/ pmol Aggrecan bestimmt werden. In der erwähnten Untersuchung(118) konnten bei mehr als der Hälfte der Patienten AF-28 nachgewiesen werden, wobei sich der Anteil der AF-28 enthaltenden Aggrecanmoleküle zwischen 20 und 100% bewegte. Diese extremen Unterschiede sind ein Zeichen für die Komplexität des Aggrecanstoffwechsels und legen nahe, daß unter bertimmten Umständen ausschließlich MMP für die Spaltung des Aggrecans verantwortlich sind, während sie in anderen Fällen überhaupt keine Rolle spielen.

MMP-8 besitzt *in vitro* Aggrecanase-ähnliche Aktivität. Es wurde daher vermutet, daß MMP-8 und Aggrecanase identisch seien, da es einige Gemeinsamkeiten gibt (22). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch auffallend große Unterschiede zwischen MMP-8 und Aggrecanase in vivo (118). Selbst bei in vitro Studien konnte inzwischen gezeigt werden, daß MMP-8 in erster Linie an MMP-"Plätzen" aktiv ist und nur nachgeordnet an Aggrecanase-typischen Stellen proteolytisch aktiv ist.

Diverse Versuche durch die genannten MMP und anderen Proteinasen auch eine Spaltung zwischen Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴ herbeizuführen, waren nicht erfolgreich. Von den genannten MMPs war lediglich MMP-8 in der Lage Aggrecan an besagter Stelle zuspalten(120), - aber nur nach vorheriger Spaltung an der "MMP-Stelle" zwischen Ala³⁴¹-Phe³⁴². Die ausschließliche Spaltung zwischen Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴ ist daher der bis jetzt unbekannten Aggrecanase vorbehalten.

Entgegen der lange Zeit vertretenden Ansicht ist Aggrecanase nicht permanent anwesend bzw. in der Lage Aggrecan zu spalten(119). Einmal von MMP zwischen Asn³⁴¹ -Phe³⁴² gespaltenes Aggrecan wird im weiteren Verlauf nicht mehr von Aggrecanase proteolysiert. Da jedoch in einigen Synoviaproben neben den eindeutig MMP bedingten auch durch Aggrecanase abgespaltene Fragmente Fragmenten gefunden wurden, ist davon auszugehen, daß beide Proteasen nebeneinander aktiv im Knorpel vorliegen. Man geht davon aus, daß MMP Fragmente nicht durch Aggrecanase gespalten werden können und umgekehrt. Bezugnehmend auf die geringe Größe von AF-28 scheint es, daß MMP kürzere Aggrecanmoleküle bevorzugt, während Aggrecanase meist längere Abschnitte spaltet.

Ein weiteres bedeutendes Charakteristikum der Aggrecanase ist, daß sie sich nicht von den bekannten Inhibitoren der MMPs inhibieren läßt. Bottomley et al konnten zwar eine signifikante Korrelation zwischen der Inhibierung von MMP-2 und der Verminderung des Aggrecanstoffwechsels zeigen, die Wirkung auf die Aggrecanase betrug aber nur etwa 1/1000 im Vergleich zu der Inhibierung der MMP-2(11).

von Metalloproteinasen die über ähnliche Eine weitere Gruppe 1995 erstmals Eigenschaften verfügt, wurde von Wolfsberg Gruppe, diese die sowohl beschrieben. Er nannte über eine Metalloproteinase als auch über ein Disintegrin verfügt daher ADAM(A Disintearin And Metalloproteinase). Diese Proteine zeiaen eine strukturelle Ähnlichkeit (ca. 30% der Sequenz sind identisch) mit den Schlangengift-Metalloproteinasen (SVMP), die bei Bißopfern eine Hämorrhagie hervorrufen. ADAMs und SVMPs gehören beide zur Gruppe der Reprolysine, einer Unterfamilie der Metalloproteinasen(121). Gegenwärtig sind 18 Mitglieder dieser Familie in der Literatur beschrieben(122). Sie bestehen alle aus mindestens einer Metalloproteinasen-Domäne, ohne jedoch - entgegen dem Namen - alle über eine Disintegrin-Domäne zu verfügen. Einige ADAMs besitzen darüber hinaus noch zusätzliche Domänenstrukturen, wie z. B. NH2terminale Propeptid-Domänen oder Cysteinhaltige-Domänen. McKie wies vor kurzem die mRNA von ADAM-10, -12 und -15 in menschlichen Chondrozyten nach(123). Wie bei den MMPs ließ sich auch für die ADAMs eine gesteigerte mRNA-Expression durch Interleukin-1 nachweisen. Andere Mitglieder der Reprolysin-Familie sind in der Lage, die Basalmembran zu zerstören und die extrazellulären Matrixmoleküle Kollagen Typ -IV, Laminin und Fibronektin zu spalten (124). Darüber hinaus zeigte Tortorella vor kurzem, daß das Reprolysin Atrolysin C in der Lage ist, sowohl die MMP-Schnittstelle als auch die Aggrecanase-Schnittstelle zu spalten, wodurch es sich deutlich von

MMP-8 unterscheidet. Atrolysin C ist damit gegenwärtig das einzige Enzym, was die Aggrecanase-Stelle spalten kann (16). Betrachtet man diese Ergebnisse, ist es wahrscheinlich, daß die ADAMs eine wesentliche Rolle bei der Zerstörung der extrazellulären Matrix spielen. Darüber hinaus ist sogar anzunehmen, daß die gesuchte Aggrecanase zu der ADAM Familie gehört.

Trotz der Fülle neuer Erkenntnisse bleibt das genaue Verhältnis zwischen MMP und Aggrecanase weiter unklar. Fragen nach dem biologischen Sinn wirft vorallem die Existenz zweier unterschiedlicher katalytischer Plätze in so unmittelbarer Nähe voneinander auf. Weiterhin ungeklärt bleibt die Identität der vermeintlichen Aggrecanase. Auch wenn dem Abbauvorgang des Aggrecans zweifelsfrei große Bedeutung zukommt, ist der Organismus in der Lage, die verlorenen Proteoglykane zügig zu ersetzten. Anders verhält sich dies, wie bereits angedeutet, nach Zerstörung des Kollagennetzwerkes. Bis heute gibt es keine Möglichkeit einmal zerstörten Knorpel wieder in seiner ursprünglichen Zusammensetzung wiederherzustellen.

Durch eine große Zahl von Arbeiten ist zweifelsfrei belegt, daß die MMPs sowohl an der Proteoglykandegradation als auch an der Zerstörung des Kollagennetzwerkes der ECM beteiligt sind. Der Schwerpunkt ihrer Aktivität liegt zweifelsfrei auf dem Kollagenabbau(124).

Die zunächst inaktiv vorliegenden MMPs müssen, wie eingangs ausgeführt, aktiviert werden, bevor sie einen Abbau der ECM-Bestandteile bewirken können. Den Aktivierungsprozessen der MMPs kommt damit eine entscheidende Bedeutung zu, obwohl die Erforschung dieser Vorgänge laut Cawston (13) "unverständlicherweise bisher vernachlässigt worden ist."

Die große Bedeutung des Plasminogens in der Degradation der Knorpelmatrix ist in vielen Arbeiten nachgewiesen worden(4,10,22,44,50). Unklar war bisher die Genese des Plasminogens in den Chondrozyten.

In den ersten Versuchen mit Chondrozytenkulturen konnten wir zeigen, daß weder normale noch stimulierte Knorpelzellen Plasminogen oder Vorstufen von Plasminogen produzieren. Mehrere Autoren (43,44) gehen nach ihren Versuchen davon aus, daß Chondrozyten nicht in der Lage sind Plasminogen zu synthetisieren; auch in unseren Versuchen zeigte sich bei den auf Kollagengelen in Anwesenheit von IL-1, Prokollagenase und Plasminogenaktivatoren kultivierten Chondrozyten nur eine geringe Degradation des Kollagens. Nach Zugabe von Plasminogen kam es jedoch zu einer fast vollständigen Zerstörung des Kollagens.

Daß Plasminogen im Gelenkknorpel vorliegt konnte Treadwell(83) 1991 nachweisen. Da Plasminogen nicht von den Chondrozyten synthetisiert wird, liegt die Vermutung nahe, daß es aus der Synovialflüssigkeit stammt und in den Knorpel hineindiffundiert. Die Diffusibilität eines Proteins in die Knorpelmatrix hängt wesentlich von seiner Ladung ab. Große anionische Proteine sind weitgehend von der Diffusion in die Knorpelmatrix ausgeschlossen(125). Alpha1-Antitrypsin zum Beispiel, mit einem Mr von 55000 und einem isoelektrischen Punkt von 4,6 ist nicht in der Lage in den Knorpel einzudringen.

Im Gegensatz dazu dringen kationische Proteine mit einem pl von mehr als 8,5 tief in den Gelenkknorpel ein, sogar bis zu einer Größe von Mr 240000(125). Der pl des Plasminogens scheint daher von großer Bedeutung für sein Verhalten im Knorpel zu sein.

In unseren Messungen ergab sich für das menschliche Plasminogen in der Synovialflüssigkeit ein pl von 7,2-8,5. Wir gehen daher davon aus, das zumindest die Plasminogenfraktionen mit dem höheren pl in der Lage sind, in den Knorpel zu diffundieren und somit für den Aktivierungsprozeß zur Verfügung stehen.

Die Diffusionsversuche mit radioaktiv markiertem Plasminogen bestätigen diese Vermutung. So konnte mit Hilfe der Autoradiographie in allen angefertigten Schnitten der Patellae der Nachweis von

markiertem Plasminogen in den oberflächlichen Knorpelschichten erbracht werden. Daß wir Plasminogen nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär nachweisen konnten, unterstreicht seine Rolle beim Abbau der Knorpelmatrix. Während bei den Ratten gleichen Alters eine entsprechende der Inkubationszeit Infiltrationstiefe des Knorpelgewebes gefunden werden konnte, war dies bei den Patellae der älteren Ratte nicht der Fall. Trotz Inkubation für 22.5 Stunden entsprach die Eindringtiefe des markierten Plasminogens eher der der für 4,15 Stunden inkubierten Patellae der jüngeren Tiere. Ursache hierfür dürfte das höhere Alter der Ratte sein, die im Vergleich zu den anderen Ratten gut sechs Wochen älter war. Dadurch bedingt ist eine dichtere Struktur des Knorpels bei diesen Tieren, die die Diffusion gegenüber der bei den jüngeren Tieren offensichtlich erschwert. Diese Beobachtung von unterschiedlichen Knorpelzusammensetzungen bei aleichen Spezies unterschiedlichen Alters deckt sich mit denen von Maroudas (126). Zweifelsfrei kommt es aber auch bei diesen Proben zu einem deutlich sichtbaren Eindringen des Plasminogens in die oberflächen-nahen Knorpelschichten.

Im Verlauf unsere Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß Chondrozyten, ob stimuliert oder unstimuliert, nicht in der Lage sind, Plasminogen zu synthetisieren. Lediglich Chondrozyten in stark arthrotisch verändertem Knorpelgewebe zeigen eine gering ausgeprägte Expression von Plasminogen. Eine definitive Aussage bei humanem Arthroseknorpel ist aufgrund der geringen uns zur Verfügung stehenden Fallzahlen derzeit noch nicht möglich. Es laufen daher weitere Untersuchungen, um auch hier eine verläßliche Aussage machen zu können. Die Ergebnisse lagen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht vor.

Die Aktivierung der latenten Metalloproteinasen im Gelenkknorpel könnte daher wie folgt ablaufen: Zytokine induzieren die Produktion von u-PA und t-PA und latenter MMP durch die Chondrozyten(127,128). u-PA, das anders als t-PA immer als Proenzym sezerniert wird (singlechain uPA, scuPA), bindet an spezifische Rezeptoren an der Oberfläche der Chondrozyten(67,69).

Auch Plasminogen, welches aus der Synovialflüssigkeit in den Knorpel diffundiert, wird an der Zelloberfläche gebunden(60).

Freies Plasminogen soll auch durch rezeptorgebundenes Plasmin aktiviert werden, wenn auch mit einer geringeren Effizienz. Die Aktivität des u-PA im Knorpel ist abhängig von Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1), der von den Chondrozyten synthetisiert wird(84). PAI-1 inhibiert sowohl freies u-PA als auch rezeptorgebundenes u-PA. Da die Aktivität von zellgebundenem u-PA durch endogene PAI-1 reguliert wird, ist es denkbar, daß die Chondrozyten selber die Aktivität des Plasminogenaktivierungssystems an der Zelloberflächen regulieren. Auf der anderen Seite wird rezeptorgebundenes Plasmin nur von Inhibitoren mit einer geringen Molekülmasse inhibiert, wie z. B. Aprotinin. Plasminogen wird auch spezifisch von Thrombospondin, einem adhäsiven Glykoprotein der Knorpelmatrix gebunden(129). Das in der Matrix immobilisierte Plasminogen ist ein wesentlich besseres Substrat für PA als in Flüssigkeit "mobiles" Plasminogen. Da Thrombospondin auch mit t-PA und Urokinase reagiert, scheint es das die extrazelluläre Matrixdegeneration nicht nur perizellulär möglich ist (129).

Durch u-PA könnte das gebundene Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden, wodurch auch gebundener scu-PA in aktiven u-PA umgewandelt wird. Plasmin wiederum aktiviert die latenten MMP, so z. B. Kollagenase und Stromelysin. Diese binden an ihre bevorzugten Substrate und bewirken auf diesem Wege die Degeneration der extrazellulären Matrix. Die meisten von ihnen binden an Aggrecan.

Obwohl der Aktivierungsprozeß bei allen bekannten MMPs nahezu gleich ist, ist zu erwähnen, daß der Aktivierungsprozeß von MMP-11 (Stromelysin 3) eine Besonderheit im Vergleich zu den anderen MMPs aufweist.

Pei et al. konnten zeigen, daß MMP-11 in Gegenwart der pro-Protein Convertase Furin unmittelbar in seiner aktiven Form vorliegt, also nicht aktiviert werden muß(17). Furin ist ein transmembrane erst Serinproteinase, die vorallem im *trans*-Golgi Netzwerk vorkommt. Furin verarbeitet die verschiedensten Serumproteine, Wachstumsfaktoren und Membranrezeptoren. Pei vermutet weiterhin, daß die MT1-MMP (MMP-14), die die Gelatinase Aktivierung kontrolliert, in Verbindung mit Furin eine effiziente Aktivierung von MMP-11 bewirken könnte. MT1-MMP ließ sich jedoch in den geschilderten Untersuchungen nicht zweifelsfrei darstellen.

Die Regulation der MMP Aktivität unterliegt dem Einfluß zahlreicher Faktoren. Phorbolester und IL-1 β stimulieren sowohl die MMP- als auch die TIMP-1 Expression(131). TGF- β 1 und Vitamin-A-Säure stimulieren TIMP-1. vermindern jedoch die MMP-Exprimierung(132). Diese Beobachtungen decken sich mit unseren Untersuchungsergebnissen. TGF β 1 ist in der Lage, die Synthese der EZM-Komponenten wie z. B. Kollagen, Fibronektin und Proteoglykane zu kontrollieren. Außerdem ist TGFB1 in die Regulation der Degeneration der EZM-Proteine involviert. z.B. durch Reduktion der Synthese und Sekretion von MMP, bzw. Stimulation der TIMP-Produktion. Dieser Effekt konnte auch an Chondrozytenkulturen gezeigt werden(20). TGF β 1 bewirkt somit das genaue Gegenteil der Reaktionen, die durch IL-1 induziert werden. τνγα und ΤΝFβ bewirken genau wie IL-1 einen Abbau der Knorpelmatrix, sind jedoch nicht in dem Ausmaß wie IL-1 in der Lage, die Chondrozyten zu zerstören. Die beiden TNF führen zu einem deutlichen Anstieg der u-PA(133). TNF besitzt eine ambivalente Funktion: in geringen Konzentrationen führt er zu einer Stimulation, in höheren dagegen zu einer Inhibierung der TIMP-1 Produktion (134). Zu einer reinen Suppression von TIMP-1 führen Concanavalin (131) und

Dexamethason (135).

Eine gezielte Stimulation der TIMP-1-Expression bewirken EGF (136), IL-6, oncostatin und LIF(leukemia inhibitory factor, 137). Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß IL-6 und TGF- β als Regulatoren der TIMP-Synthese in Fibroblasten, Fibrosarkom- und Leberzellen fungieren. Weiterhin ist IL-1 in der Lage die Synthese und Sekretion von IL-6 in menschlichen Chondrozyten erheblich zu steigern.

IL-6 ist ein multifunktionelles Zytokin, das via Oberflächenrezeptoren eine Vielzahl von Zellen erreicht, wie z. B. B- und T-Lymphozyten sowie Leberzellen. Die mRNA für IL-6 in Chondrozyten konnte nachgewiesen werden(138).

Interleukin-4 (IL-4) ist ein 20kDa Glykoprotein das von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert wird. Abgesehen von einer Vielzahl verschiedener biologischer Aktivitäten konnten für IL-4 suppressive Wirkung auf die Synthese katabolischer Faktoren wie IL-1,TNF- α und PGE₂, sowie Kollagenase und 92 kDa Gelatinase nachgewiesen werden(51,139).

Lo et al. vermuten, daß die "reaktive oxygen species" (ROS) als Signalstoffe für die Zytokine eine wesentliche Rolle im EZM-Katabolismus spielen. Sie konnten die ROS-vermittelte c-fos Expression im Chondrozyten demonstrieren, die zu einer Aktivierung von verschiedenen Genen führt, wie zum Beispiel Kollagenase (MMP-1) und Stromelysin (MMP-3). Zusätzlich sorgt ROS für die Aktivierung des Nuklearfaktors κ B, welcher unter anderem eine große Anzahl von Genen aktiviert, die Signal- und Inhibitorproteine kodieren(140).

Verschiedene Autoren konnten den zerstörerischen Effekt von freien Sauerstoffradikalen auf Proteoglykane, Hyaluronsäure und Kollagen zeigen, so daß vermutet werden kann, daß die ROS auch direkt eine Zerstörung der Chondrozyten bewirken können. Die daher nahe liegende Vermutung,daß Antioxidantien diese Aktivierungsvorgänge inhibieren und so als Schutzmechanismus der Chondrozyten unter patholo-gischen Bedingungen fungieren können, wurde von Oleksyszn et al. bestätigt, die eine protektive Wirkung von Dithiocarbamat auf IL-1-induzierte Knorpelzelldegradation *in vitro* nachweisen konnten(141). Widersprüchliche Untersuchungsergebnisse liegen zu den Rollen von Stickoxyd (NO), Superoxydanion und Peroxynitrit vor. So konnten für die genannten Faktoren in *in vitro* Untersuchungen der extrazellulären Knorpelmatrix sowohl katabole als auch anabole Stoffwechselprozeße nachgewiesen werden(142)

4.3.1 Alternative Abbaumechanismen der ECM

Eine weitere Enzymgruppe, die wesentlich zum Abbau der EZM beiträgt, sind die Cysteinproteinasen, unter ihnen vorallem Cathepsin B, K und L (143,144). Alle werden überwiegend in Fibroblasten synthetisiert und spalten spezifisch die ECM-Bestandteile Kollagen, Laminin, Elastin, Fibronektin und auch Aggrecan (s. Abbild.). Anders als die meisten

MMPs werden die Cysteinproteinasen sowohl als latente Vorstufen als auch als bereits aktive Enzyme sezerniert (143,144,145). In den Fällen, in denen eine Aktivierung erforderlich ist, werden die Cathepsine durch Autokatalyse bei saurem pH oder von Enzymen wie Elastase, Pepsin und Cathepsin D durch Proteolyse aktiviert (144). Die meisten Cysteinproteinasen sind auf ein saures Milieu angewiesen, da eine Verschiebung des pH in den basischen Bereich zu einer weitgehend irreversiben Inaktivierung der Cysteinproteinasen führt. Diese pHabhängige Regulierung ihrer Aktivität ist jedoch nicht, wie lange vermutet, der entscheidende inhibitorische Kontrollmechanismus. Turk et al. konnten zeigen, daß die Cystatine die wesentlichen Inhibitoren der Cysteinproteinasen darstellen, vorallem Cystatin C (144). Cystatine gehen mit den Cysteinproteinasen eine reversible Bindung ein, die unter bestimmten Voraussetzungen gelöst und dann eine erneut voll funktionsfähige Cysteinproteinase freisetzt. Diese Inhibitonsmechanismus unterscheidet die Cysteinproteinasen deutlich von dem der MMP.

In die Familie der Cystatine gehören weiterhin die Kininogene und die Stefine. Mit ersterem sowie mit α_2 -Makroglobulin zusammen bildet Cystatin C die Hauptgruppe der Cysteinproteinasen-Inhibitoren(144). Die Cystatine ihrerseits werden von den erwähnten Cathepsin-Aktivierungsenzymen Elastase, Pepsin und Cathepsin D inhibiert (143). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern eine weitere Facette im komplexen Bild der extrazellulären Matrixdegradation im Knorpelgewebe. Wir konnten zeigen, daß einer der wichtigsten Aktivatoren der MMP nicht von den Chondrozyten synthetisiert wird, sondern erst durch Diffusion in das Knorpelgewebe gelangt. Diese Erkenntnis wirft viele neue Fragen auf: ist es möglich die Diffusion des Plaminogens in den Knorpel gezielt zu inhibieren? Und weiter, welchen Einfluß hätte eine solche Inhibierung letztlich auf die Matrixdegradation des Knorpelgewebes?

Zweifelsfrei stellt die in unseren Untersuchungen gewonnene Erkenntnis nur einen kleinen Baustein im komplexen Gebäude der extrazellulären Matrixdegeneration dar. Trotzdem sind wir überzeugt, daß uns die Fortsetzung des eingeschlagenen Weges langfristig in die Lage versetzen wird, dem Patienten therapeutische Möglichkeiten bei der Bekämpfung der Knorpelzelldegradation zur Verfügung zu stellen.

5. Zusammenfassung

Ein Hauptmerkmal der Osteoarthrose und der rheumatoiden Arthritis ist die Zerstörung des Knorpelgewebes. Knorpelgewebe besteht aus einer kleinen Anzahl von Chondrozyten (2x10⁵/mm³), die in einer extrazellulären Matrix aus Kollagen und Proteoglykanen eingebettet sind. Im gesunden Knorpelgewebe eines Erwachsenen sorgen die Chondrozyten für ein Gleichgewicht zwischen der Synthese der Komponenten der Extrazellulären Matrix und deren Degradation. Jede Störung dieses Gleichgewichts beeinflußt das Knorpelgewebe in der Wahrnehmung seiner Funktionen erheblich.

Die Hauptrolle im Mechanismus des Knorpelabbaus spielen die chondrozytären Matrixmetalloproteinasen (MMP). Die MMP liegen im Knorpelgewebe in latenter Form vor und müssen aktiviert werden bevor sie in der Lage sind die Knorpelmatrix anzugreifen. Während die in vitro Aktivierung latenter MMP gut untersucht ist, ist über die in vivo stattfindende Aktivierung nur wenig bekannt.

Daß für die Aktivierung der latenten chondrozytären MMP das Plasminogenaktivierungssystem von Bedeutung ist, konnten wir in unseren ersten Versuchen zeigen. Diese Ergebnisse sind inzwischen in vielen anderen Arbeiten bestätigt worden (4,10,22,44,50). Es ist bekannt, das Chondrozyten in der Lage sind uPA, tPA, uPAR, PAI-1und latente MMP zu bilden. Damit stehen dem Chondrozyten nahezu alle Komponenten des Aktivierungsystems zur Verfügung. Unklar war jedoch weiterhin, ob sie auch in der Lage sind Plasminogen zu synthetisieren.

Daß Plasminogen im Gelenkknorpel vorliegt konnte Treadwell(83) bereits 1991 nachweisen. In unseren ersten Versuchen mit Chondrozytenkulturen konnten wir zeigen, daß es erst nach Zugabe von Plasminogen zu einer fast vollständigen Zerstörung des Kollagens kam. Davon ausgehend, das Plasminogen nicht von den Chondrozyten synthetisiert wird, lag die Vermutung nahe, daß es aus der Synovialflüssigkeit stammt und in den Knorpel hineindiffundiert. Die Diffusibilität eines Proteins in die Knorpelmatrix hängt wesentlich von Der pl des Plasminogens den wir in unserer seiner Ladung ab. nächsten Versuchsreihe bestimmten ergab Werte von 7,2-8,5. Wir gehen daher davon aus, das zumindest die Plasminogenfraktionen mit dem höheren pl in der Lage sind, in den Knorpel zu diffundieren und somit für den Aktivierungsprozeß zur Verfügung stehen.

Die anschließend durchgeführten Diffusionsversuche mit radioaktiv markiertem Plasminogen bestätigen diese Vermutung. So konnte mit Hilfe der Autoradiographie in allen angefertigten Schnitten der Patellae der Nachweis von markiertem Plasminogen in den oberflächlichen Knorpelschichten erbracht werden. Daß wir Plasminogen nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär nachweisen konnten, unterstreicht seine Rolle beim Abbau der Knorpelmatrix. Um zu einer abschließenden Aussage zukommen erfolgte der Versuch die Plasminogen-mRNA in den Chondrozyten mit molekularbiologische Methoden nachzuweisen. Dabei konnten wir in unseren Untersuchungen zeigen, daß Chondrozyten, ob stimuliert oder unstimuliert, nicht in der Lage sind, Plasminogen zu synthetisieren. Lediglich Chondrozyten in einzelnen Proben mit stark arthrotisch verändertem Knorpelgewebe zeigen eine gering ausgeprägte Expression von Plasminogen.

Die Aktivierung der latenten Metalloproteinasen im Gelenkknorpel könnte daher wie folgt ablaufen: Zytokine induzieren die Produktion von u-PA und t-PA und latenter MMP durch die Chondrozyten(127,128). u-PA bindet an spezifische Rezeptoren an der Oberfläche der Chondrozyten(67,69). Auch Plasminogen, welches aus der Synovialflüssigkeit in den Knorpel diffundiert, wird an der Zelloberfläche gebunden(60).

Freies Plasminogen wird auch durch rezeptorgebundenes Plasmin aktiviert, wenn auch mit einer geringeren Effizienz. Durch u-PA könnte der wesentliche Anteil des gebundenen Plasminogen zu Plasmin aktiviert werden. Plasmin wiederum aktiviert die latenten MMP, so z. B. Kollagenase und Stromelysin. Diese binden an ihre bevorzugten Substrate und bewirken auf diesem Wege die Degeneration der extrazellulären Matrix.

6. LITERATURVERZEICHNISS

- BARTLETT, S. E.; MENINO JR., A. R.: EVALUATION OF EXTRACELLULAR MATRICES AND THE PLASMINOGEN ACTIVATOR SYSTEM IN SHEEP INNER CELL MASS AND TROPHECTODERMAL OUTGROWTH IN VITRO. IN: *Biol Reprod* 52 (1995), Nr. 6, S. 1436-1445
- KRUK, P. A.; UITTO, V. J.; FIRTH, J. D.; DEDHAR, S.; AUERSPERG, N.: RECIPROCAL INTERACTIONS BETWEEN HUMAN OVARIAN SURFACE EPITHELIAL CELLS AND ADJACENT EXTRACELLULAR MATRIX. IN: *Exp Cell Res* 215 (1994), Nr. 1, S. 97-108
- 3. HEMBRY, R. M.; BAGGA, M. R.; DINGLE, J. T.; THOMAS, P. P.; REYNOLDS, J. J.: METALLOPROTEINASE PRODUCTION BY RABBIT ARTICULAR CARTILAGE: COMPARISON OF THE EFFECTS OF INTERLEUKIN-1 ALPHA IN VITRO AND IN VIVO. IN: VIRCHOWS Arch 425 (1994), Nr. 4, S. 413-424
- 4. Pelletier, J. P.; Mineau, F.; Faure, M. P.; Martel Pelletier, J.: Imbalance between the mechanisms of activation and inhibition of metalloproteases in the early lesions of experimental osteoarthritis. In: *Arthritis Rheum* 33 (1990), Nr. 10, S. 1466-1476
- NAGASE, H.; OGATA, Y.; SUZUKI, K.; ENGHILD, J. J.; SALVESEN, G.: SUBSTRATE SPECIFICITIES AND ACTIVATION MECHANISMS OF MATRIX METALLOPROTEINASES. IN: *BIOCHEM Soc Trans* 19 (1991), Nr. 3, S. 715-718
- DIBATTISTA, J. A.; PELLETIER, J. P.; ZAFARULLAH, M.; FUJIMOTO, N.; OBATA, K; MARTEL PELLETIER, J.: COORDINATE REGULATION OF MATRIX METALLOPROTEASES AND TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE EXPRESSION IN HUMAN SYNOVIAL FIBROBLASTS. IN: J RHEUMATOL SUPPL 43 (1995), S. 123-128
- EMONARD, H. P.; REMACLE, A. G.; NOEL, A. C.; GRIMAUD, J. A.;
 :STETLER STEVENSON, W. G.; FOIDART, J. M.: TUMOR CELL SURFACE-ASSOCIATED BINDING SITE FOR THE M(R) 72,000 TYPE IV COLLAGENASE. IN: CANCER Res 52 (1992), NR. 20, S. 5845-5848
- 8. MILES, L. A.; PLOW, E. F.: RECEPTOR MEDIATED BINDING OF THE FIBRINOLYTIC COMPONENTS, PLASMINOGEN AND UROKINASE, TO PERIPHERAL BLOOD CELLS. IN: *THROMB HAEMOST* 58 (1987), Nr. 3, S. 936-942
- 9. Felez, J.; Miles, L. A.; Plescia, J.; Plow, E. F.: Regulation of plasminogen receptor expression on human monocytes and monocytoid cell lines. In: *J Cell Biol* 111 (1990), Nr. 4, S. 1673-1683
- COLLIER, S.; GHOSH, P.: THE ROLE OF PLASMINOGEN IN INTERLEUKIN-1 MEDIATED CARTILAGE DEGRADATION. IN: J RHEUMATOL 15 (1988), NR. 7, S. 1129-1137
- 11. BOTTOMLEY, K.M., BORKAKOTTI, N., BRADSHAW, D., BROWN, P.A.: INHIBITION OF BOVINE NASAL CARTILAGE DEGRADATION BY SELECTIVE MATRIX METALLPROTEINASE INHIBITORS. IN: *BIOCHEM J* 323 (1997), S. 483-488
- BIRKEDAL-HANSEN, H.,W., MOORE, W.G.I., BODDEN, M.K., WINDSOR,
 L.J., BIRKEDAL-HANSEN, B.: MATRIX METALLOPROTEINASES: A REVIEW. IN: CRIT Rev Oral Bio Med 4 (1993), Nr. 2, S. 197-250
- CAWSTON, T.: MATRIX METALLOPROTEINASES AND TIMP: PROPERTIES AND IMPLIICATIONS FOR THE RHEUMATIC DISEASES. IN: MOLL MED TODAY (1998), S. 130-136
- 14. MURRELL, G., JANG, D., WILLIAMS, R.: NITIRIC OXIDE ACTIVATES METALLOPROTEINASE ENZYMES IN ARTICULAR CARTILAGE. IN: *BIOCHEM BIOPHYS Res Commun* 1 (11995), Nr. 206, S. 15-21
- 15. NAGASE, H.: ACTIVATION MECHANISMS OF MATRIX METALLOPROTEINASES. IN: *BIO CHEM* 378 (1997), S. 151-160
- 16. TORTORELLA, M.D., PRATTA, A., FOX, J.W., ARNER,E.C.: THE INTERGLOBULAR DOMAIN OF CARTILAGE IS CLEAVED BY HEMORRHAGIC METALLOPROTEINASE HT-D (ATROLYSIN C) AT THE MATRIX METALLOPROTEINASE AND THE AGGRECANASE SITES. IN: J BIO CHEM 273 (1998), NR. 10, S. 5846-5850
- PEI, D., WEISS, S. J.: FURIN-DEPENDENT INTRACELLULAR ACTIVATION OF THE HUMAN STROMELYSIN-3 ZYMOGEN. IN: NATURE 375 (1995), S. 244-247
- MURPHY, G, AND KNAUPER, V.: RELATING MATRIX METALLOPROTEINASE STRUCTURE TO FUNCTION: WHY THE "HEMOPEXIN" DOMAIN. IN: *MATRIX BIOL* 15 (1997), S. 511-518
- 19. GOMEZ, D., ALONSO, D.F., YOSHIJI, H., THORGEIRSON, U.: TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES: STRUCTURE, REGULATION AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. IN: *EUROP J CELL BIO* 74 (1997), S. 111-122
- 20. BOUMEDIENE, K., CONROZIER, T., MATHIEU, P., RICHARD,M.: DECREASE OF CARTILAGE TRANSFORMING GROWTH FACTOR RECEPTOR II EXPRESSION IN THE RABBIT EXPERIMENTAL OSTEOARTHRITIS- POTENTIAL ROLE IN CARTILAGE BREAKDOWN. IN: OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE 6 (1998), S. 146-149

- 21. GILPIN, B., LOECHEL, F., MATTEI, M.-G., EVA,E.: A NOVEL, SECRETED FORM OF HUMAN ADAM 12 PROVOKES MYOGENESIS IN VIVO. IN: *J BIO CHEM* 273 (1998), Nr. 1, S. 157-166
- 22. Lark, M.W., Bayne, E.K., Flanagan, J., Hoerrner, L.A., Hutchinson, N.I.: Aggrecan degradation in human cartilage. In: *J Clin Invest* 100 (1997), Nr. 1, S. 93-106
- 23. NGUYEN, Q., MORT, S.J., ROUGHLEY, P.J.: PREFERENTIAL MRNA EXPRESSION OF POSTSTROMELYSIN RELATIVE TO PROCOLLAGENASE AND IN SITU LOCALIZATION IN HUMAN ARTICULAR CARTILAGE. IN: J CLIN INVEST 89 (1992), S. 1189-1197
- 24. MURPHY, G., WILLENBROCK, F.: TISSUE INHIBITORS OF METALLOENDOPEPTIDASES. IN: *METHODS ENZYMOL* 248 (1995), S. 496-510
- 25. DENHARDT, D.T.: TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES (TIMP, AKA EPA):STRUCTURE, CONTROL OF EXPRESSION AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. IN: *PHARMACOL THER* 59 (1993), S. 329-341
- NAGASE, H., ENGHILG, J.J., SUZUKI, K., SALVESEN, G.:STEPWISE ACTIVATION MECHANISMS OF THE PRECURSOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE
 3 (STROMELYSIN) BY PROTEINASES AND (4-AMINOPHENYL) MERCURIC ACETATE. IN: *BIOCHEM* 29 (1996), S. 5783-5789
- 27. CAMERON, P.M., MARCY, A.I., ROKOSZ,L.L., HERMES, J.D.: USE OF AN ACTIVE.SITE INHIBITOR OF STROMELYSIN TO ELUCIDATE THE MECHANISM OF PROTSTROMELYSIN ACTIVATION. IN: *BIOORG CHEM* 23 (1995), S. 415-426
- 28. OKADA, Y., MORODOMI, T., ENGHILD, J.J., SUZUSKI, K. YASUI, A., NAGASE, N.: THE PRECURSOR OF A METALLOENDOPEPTIDASE FROM HUMAN RHEUMATOID SYNOVIAL FIBROBLASTS. PRURIFICATION AND MECHANISMS OF ACTIVATION BY ENDOPEPTIDASES AND 4-AMINOPHENYLMERCURIC ACETATE.. IN: BIOCHEM J 254 (1988), S. 731-741
- 29. Koklitis, P.A., Murphy, G., Sutton, C., Angal, S.: Purification of recombinant human prostromelysin. Studies on heat activation to give high- M_R and low- M_R active forms and a comparison of recombinant with natural stromelysin activities. In: *Biochem J* 276 (1991), S. 217-221
- 30. Springman, E.B., Angelton, E.L., Birkedal-Hansen, H., Van Wart, H.E.,: Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: Evidence for the role of Cys73 active-site zinc complex in latency and a cysteine "switch mechanism" for activation. In: Proc Natl Acad Sci 87 (1990), S. 364-368

- 31. VAN WART, H.E., BIRKEDAL-HANSEN, H.: THE CYSTEINE SWITCH: A PRINCIPLE OF REGULATION OF METALLOPROTEINASE ACTIVITY WITH POTENTIAL APPLICABILITY TO THE ENTIRE MATRIX METALLOPROTEINASE GENE FAMILY. IN: PROC NATL ACAD Sci 87 (1990), S. 5578-5582
- 32. Okada, Y., Morodomi, T., Enghild, J.J., Suzuki, K., Yasui, A., Nakanishi, I., Salvesen, G., Nagase, H.: Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. In: Eur J Biochem 194 (1990), S. 721-730
- 33. CRABBE, T., O'CONNELL, J., SMITH, B.J., DOCHERTY, A.J.P.: RECIPROCATED MATRIX METALLOPROTEINASES ACTIVATION: A PROCESS PERFORMED BY INTERSTITIAL COLLAGENASE AND PROGELATINASE A. IN: BIOCHEM 33 (1994), S: 14419-14425
- 34. Sang, Q.A., Bodden, M.K., Windsor, L.J.: Activation of human progelatinase A by collagenase and matrilysin: Activation of procollagenase by matrilysin. In: *J Pro Chem* 15 (1995), S.243-253
- 35. SATO, H., TAKINO, T., OKADA, Y., CAO, J., SHINAGAWA, A., YAMAMOTO, E., SEIKI, M.: A MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSED ON THE SURFACE OF INVASIVE TUMOR CELLS. IN: NATURE 370 (1994), 61-65
- 36. Strongin, A.Y., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.I.: Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa typeIV collagenase is prevented by the complex formation with TIMP-2. In: *J Biol Chem* 268 (1993), S. 14033-14039
- 37. TAKINO, T., SATO, H., SHINAGAWA, A., SEIKI, M.: IDENTIFICATION OF THE SECOND MEMBRANE-TYPE MATRIX METALLOPROTEINASE (MT-MMP-2) GENE FROM A HUMAN PLACENTA CDNA LIBRARY. MT-MMPS FORM A UNIQUE MEMBRANE -TYPE SUBCLASS IN THE MMP FAMILY. IN: J BIOL CHEM 270 (1995), S. 23013-23020
- 38. Strongin, A.Y., Collier, I., Bannikov, G., Marmer, B.L., Grant, G.A., Goldberg, G.: Mechansim of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloproteinase. In: J Biol Chem 270 (1995), S. 5331-5338
- 39. BASSET, P., BELLOCA, J.R., WOLF, C., STOLL, I., HATIN, P., LIMACHER, J.M., PODHAJCER, O.L., CHENARD, M.P., RIO, M.C., CHAMBON, P.: A NOVEL METALLOPROTEINASE GENE SPECIFICALLY EXPRESSED IN STROMAL CELLS OF BREAST CARCINOMAS. IN: NATURE 348 (1990), S. 699-704

- 40. Pei, D., Weiis, S.J.: Transmembrane-deletion mutants of the membrane-Type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 271 (1996), S. 9135-9140
- 41. SAKSELA, O., RIFKIN, D.B.: CELL-ASSOCIATED PLASMINOGEN ACTIVATION: REGULATION AND PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS. IN: ANN REV CELL BIOL 4 (1988), S. 93-126
- 42. Ellis, V.; Dano, K.: Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. In: Semin Thromb Hemost 17 (1991), Nr. 3, S. 194-200
- GAVRILOVIC, J.; MURPHY, G.: THE ROLE OF PLASMINOGEN IN CELL-MEDIATED COLLAGEN DEGRADATION. IN: Cell Biol Int Rep 13 (1989), NR. 4, S. 367-375
- 44. CRUWYS, S. C.; DAVIES, D. E.; PETTIPHER, E. R.: CO-OPERATION BETWEEN INTERLEUKIN-1 AND THE FIBRINOLYTIC SYSTEM IN THE DEGRADATION OF COLLAGEN BY ARTICULAR CHONDROCYTES. IN: *BR J PHARMACOL* 100 (1990), NR. 3, S. 631-635
- PLOW, E. F.; HERREN, T.; REDLITZ, A.; MILES, L. A.; HOOVER PLOW,
 J. L.: THE CELL BIOLOGY OF THE PLASMINOGEN SYSTEM. IN: FASEB J 9 (1995), NR. 10, S. 939-945
- 46. KUMMER, J. A.; ABBINK, J. J.; DE BOER, J. P.; ROEM, D.; NIEUWENHUYS, E. J.; KAMP A.M., SWAAK, T. J.; HACK, C. E.: ANALYSIS OF INTRAARTICULAR FIBRINOLYTIC PATHWAYS IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY AND NONINFLAMMATORY JOINT DISEASES. IN: Arthritis Rheum 35 (1992), NR. 8, S. 884-893
- 47. ORTH, K., MADISON, E.L., GETHING, M.J., SAMBROOK, J.F., HERZ, J.: COMPLEXES OF TISSUETYPS PLASMINOGEN ACTIVATOR AND IST SERPIN INHIBITOR PLASMINOGEN-ACTIVATOR INHIBITOR TYPE 1 ARE INTERNALIZED BY MEANS OF THE LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN/ALPHA 2-MACROGLOBULIN RECEPTOR. IN: PROC NATL. ACAD. SCI USA (1992), NR. 89, S. 7422-7426
- 48. Osada, H.; Yamada, C.; Miwa, K.; Kono, T.; :Oh hira, M.: An assay system for the modulators of plasminogen activation on the cell surface. In: *Thromb Res* 62 (1991), Nr. 5, S. 519-530
- 48. MARTINEZ, J.; SANTIBANEZ, J. F.: SURFACE-ASSOCIATED PLASMINOGEN ACTIVATION IN LEUKEMIC CELLS: INTERACTION WITH EXTRACELLULAR MATRIX. IN: *Eur J Cell Biol* 64 (1994), Nr. 2, S. 257-263

- 50. Allan, E. H.; Martin, T. J.: The plasminogen activator inhibitor system in Bone Cell Function. In: *Clin-Orthop.* 313 (1995), Nr. 4, S. 54-63
- 51. RAO, J. S., STECK, P. A., TOFILON, P., BOYD, D.; ALI OSMAN, F., STETLER- STEVENSON W.G., LIOTTA, L. A., SAWAYA, R.: ROLE OF PLASMINOGEN ACTIVATOR AND OF 92-KDA TYPE IV COLLAGENASE IN GLIOBLASTOMA INVASION USING AN IN VITRO MATRIGEL MODEL. IN: J NEUROONCOL 18 (1993), NR. 2, S. 129-138
- 52. MARTEL PELLETIER, J., ZAFARULLAH, M., KODAMA, S., PELLETIER, J. P.: IN VITRO EFFECTS OF INTERLEUKIN 1 ON THE SYNTHESIS OF METALLOPROTEASES, TIMP, PLASMINOGEN ACTIVATORS AND INHIBITORS IN HUMAN ARTICULAR CARTILAGE. IN: J RHEUMATOL SUPPL 27 (1991), S. 80-84
- 53. DESIMONE, D. P.; REDDI, A. H.: VASCULARIZATION AND ENDOCHONDRAL BONE DEVELOPMENT: CHANGES IN PLASMINOGEN ACTIVATOR ACTIVITY. IN: J ORTHOP Res 10 (1992), Nr. 3, S. 320-324
- 54. LIJNEN, H. R.; BACHMANN, F.; COLLEN, D.; ELLIS, V.; PANNEKOEK, H.; RIJKEN, D. C.; THORSEN, S.: MECHANISMS OF PLASMINOGEN ACTIVATION. IN: J INTERN MED 236 (1994), NR. 4, S. 415-424
- 55. DEL ROSSO, M.; DINI, G.; FIBBI, G.: RECEPTORS FOR PLASMINOGEN ACTIVATOR, UROKINASE, IN NORMAL AND ROUS SARCOMA VIRUS-TRANSFORMED MOUSE FIBROBLASTS. IN: *CANCER RES* 45 (1985), NR. 2, S. 630-636
- 56. MILES, L. A.; PLOW, E. F.: BINDING AND ACTIVATION OF PLASMINOGEN ON THE PLATELET SURFACE. IN: J BIOL CHEM 260 (1985), NR. 7, S. 4303-4311
- 57. LINDENHAYN, K.; HEILMANN, H. H.; REGLING, G.; HAUPT, R.: [PLASMINOGEN ACTIVATOR ACTIVITY OF THE SYNOVIAL FLUID AS AN INDICATOR OF ACTIVATION PHENOMENA IN DEGENERATIVE JOINT DISEASES]. IN: Z RHEUMATOL 48 (1989), Nr. 5, S. 246-253
- 58. KOUNNAS, M. Z.; MOIR, R. D.; REBECK, G. W.; BUSH, A. I.; ARGRAVES, W. S.; TANZI, R. E.; HYMAN, B. T.; STRICKLAND, D. K.: LDL RECEPTOR-RELATED PROTEIN, A MULTIFUNCTIONAL APOE RECEPTOR, BINDS SECRETED BETA-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND MEDIATES ITS DEGRADATION. IN: CELL 82 (1995), NR. 2, S. 331-340
- 59. CAMPBELL, P. G.; WINES, K.; YANOSICK, T. B.; NOVAK, J. F.: BINDING AND ACTIVATION OF PLASMINOGEN ON THE SURFACE OF OSTEOSARCOMA CELLS. IN: J CELL PHYSIOL 159 (1994), NR. 1, S. 1-10

- 60. MARTEL PELLETIER, J.; FAURE, M. P.; MCCOLLUM, R.; MINEAU, F.; CLOUTIER, J. M.; PELLETIER, J. P.: PLASMIN, PLASMINOGEN ACTIVATORS AND INHIBITOR IN HUMAN OSTEOARTHRITIC CARTILAGE. IN: J RHEUMATOL 18 (1991), NR. 12, S. 1863-1871
- 61. MEATS, J. E.; MCGUIRE, M. K.; EBSWORTH, N. M.; ENGLIS, D. J.; RUSSELL, R. G.: ENHANCED PRODUCTION OF PROSTAGLANDINS AND PLASMINOGEN ACTIVATOR DURING ACTIVATION OF HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES BY PRODUCTS OF MONONUCLEAR CELLS. IN: *RHEUMATOL INT* 4 (1984), NR. 4, S. 143-149
- 62. KNUDSEN, B. S.; SILVERSTEIN, R. L.; LEUNG, L. L.; HARPEL, P. C.; NACHMAN, R. L.: BINDING OF PLASMINOGEN TO EXTRACELLULAR MATRIX. IN: J BIOL CHEM 261 (1986), NR. 23, S. 10765-10771
- 63. HAJJAR, K. A.: THE ENDOTHELIAL CELL TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR RECEPTOR. SPECIFIC INTERACTION WITH PLASMINOGEN. IN: *J Biol Chem* 266 (1991), Nr. 32, S. 21962-21970
- 64 HOEKMAN, K.; LOWIK, C. W.; VAN DE RUIT, M.; BIJVOET, O. L.; VERHEIJEN, J. H.; PAPAPOULOS, S. E.: THE EFFECT OF TISSUE TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR (TPA) ON OSTEOCLASTIC RESORPTION IN EMBRYONIC MOUSE LONG BONE EXPLANTS: A POSSIBLE ROLE FOR THE GROWTH FACTOR DOMAIN OF TPA. IN: *BONE MINER* 17 (1992), NR. 1, S. 1-13
- 65. Ware, J. H.; DIBENEDETTO, A. J.; PITTMAN, R. N.: LOCALIZATION OF TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR MRNA IN ADULT RAT BRAIN. IN: *BRAIN RES BULL* 37 (1995), Nr. 3, S. 275-281
- 66. Ito, K.; Ryuto, M.; Ushiro, S.; Ono, M.; Sugenoya, A.; Kuraoka, A.; Shibata, Y.; Kuwano, M.: Expression of tissue-type plasminogen activator and its inhibitor couples with development of capillary network by human microvascular endothelial cells on Matrigel. In: J Cell Physiol 162 (1995), Nr. 2, S. 213-224
- 67. PLOW, E. F.; FREANEY, D. E.; PLESCIA, J.; MILES, L. A.: THE PLASMINOGEN SYSTEM AND CELL SURFACES: EVIDENCE FOR PLASMINOGEN AND UROKINASE RECEPTORS ON THE SAME CELL TYPE. IN: *J Cell Biol* 103 (1986), NR. 6 PT 1, S. 2411-2420
- 68. ROLDAN, A. L.; CUBELLIS, M. V.; MASUCCI, M. T.; BEHRENDT, N.; LUND, L. R.; DANO, K.; APPELLA E., BLASI, F.: CLONING AND EXPRESSION OF THE RECEPTOR FOR HUMAN UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR, A CENTRAL MOLECULE IN CELL SURFACE, PLASMIN DEPENDENT PROTEOLYSIS. IN: EMBO J 9 (1990), NR. 2, S. 467-474

- 69. LIJNEN, H. R.; DE COCK, F.; COLLEN, D.: CHARACTERIZATION OF THE BINDING OF UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR (U-PA) TO PLASMINOGEN, TO PLASMINOGEN-ACTIVATOR INHIBITOR-1 AND TO THE U-PA RECEPTOR. IN: *EUR J BIOCHEM* 224 (1994), NR. 2, S. 567-574
- 70. SALERNO, G.; VERDE, P.; NOLLI, M. L.; CORTI, A.; SZOTS, H.; MEO, T.; JOHNSON, J.; BULLOCK, S.; CASSANI, G.; BLASI, F.: MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN UROKINASE IDENTIFY THE SINGLE-CHAIN PRO-UROKINASE PRECURSOR. IN: PROC NATL ACAD Sci U S A 81 (1984), NR. 1, S. 110-114
- HADDOCK, R. C.; SPELL, M. L.; BAKER, C. D. . 3. D.; GRAMMER, J. R.;
 PARKS, J. M.; SPEIDEL M., BOOYSE, F. M.: UROKINASE BINDING AND RECEPTOR IDENTIFICATION IN CULTURED ENDOTHELIAL CELLS. IN: J BIOL CHEM 266 (1991), NR. 32, S. 21466-21473
- STEPHENS, R. W.; POLLANEN, J.; TAPIOVAARA, H.; LEUNG, K. C.; SIM,
 P. S.; SALONEN E.M., RONNE, E.; BEHRENDT, N.; DANO, K.; VAHERI, A.: ACTIVATION OF PRO-UROKINASE AND PLASMINOGEN ON HUMAN SARCOMA CELLS: A PROTEOLYTIC SYSTEM WITH SURFACE-BOUND REACTANTS. IN: J CELL BIOL 108 (1989), NR. 5, S. 1987-1995
- 73. TAN, K.; POWE, D. G.; GRAY, T.; TURNER, D. R.; HEWITT, R. E.: REGIONAL VARIATIONS OF UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR IN HUMAN COLORECTAL CANCER: A QUANTITATIVE STUDY BY IMAGE ANALYSIS. IN: *INT J CANCER* 60 (1995), NR. 3, S. 308-314
- 74. DEL ROSSO, M.; FIBBI, G.; MAGNELLI, L.; PUCCI, M.; DINI, G.; GRAPPONE, C.; CALDINI, R.; SERNI, U.; COLOMBO, F.; BORELLA, F.: MODULATION OF UROKINASE RECEPTORS ON HUMAN SYNOVIAL CELLS AND OSTEOARTHRITIC CHONDROCYTES BY DIACETYLRHEIN. IN: INT J TISSUE REACT 12 (1990), NR. 2, S. 91-100
- 75. DEL ROSSO, M.; PEDERSEN, N.; FIBBI, G.; PUCCI, M.; DINI, G.; ANICHINI, E.; BLASI, F.: SELECTIVE LOCALIZATION OF RECEPTORS FOR UROKINASE AMINO-TERMINAL FRAGMENT AT SUBSTRATUM CONTACT SITES OF AN IN VITRO-ESTABLISHED LINE OF HUMAN EPIDERMAL CELLS. IN: *Exp Cell Res* 203 (1992), Nr. 2, S. 427-434
- 76. MEISSAUER, A.; KRAMER, M. D.; SCHIRRMACHER, V.; BRUNNER, G.: GENERATION OF CELL SURFACE-BOUND PLASMIN BY CELL-ASSOCIATED UROKINASE-TYPE OR SECRETED TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR: A KEY EVENT IN MELANOMA CELL INVASIVENESS IN VITRO. IN: Exp Cell Res 199 (1992), NR. 2, S. 179-190

- 77. TOKUNAGA, W., NAKAMURA, Y., SAKATA, K., FUJIMORI, K., OHKUBO,
 M., SAWADA, K., SAKIYAMA, S: ENHANSEDEXPRESSION OF GLYCERALDEHYDE3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE GENE IN HUMAN LUNG CANCERS. IN: CANCER
 Res 47 (1987), S. 5616-5619
- 78. NONAKA, T.; OKADA, K.; FUKAO, H.; UESHIMA, S.; KIKUCHI, H.; TANAKA, S.; MATSUO, O.: REGULATION OF SCU-PA SECRETION AND U-PA RECEPTOR EXPRESSION IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS. IN: Cell Struct Funct 18 (1993), Nr. 5, S. 355-362
- 79. KANALAS, J. J.; MAKKER, S. P.: IDENTIFICATION OF THE RAT HEYMANN NEPHRITIS AUTOANTIGEN (GP330) AS A RECEPTOR SITE FOR PLASMINOGEN. IN: J BIOL CHEM 266 (1991), NR. 17, S. 10825-10829
- 80. DUDANI, A. K.; HASHEMI, S.; AYE, M. T.; GANZ, P. R.: IDENTIFICATION OF AN ENDOTHELIAL CELL SURFACE PROTEIN THAT BINDS PLASMINOGEN. IN: *MOL CELL BIOCHEM* 108 (1991), NR. 2, S. 133-139
- WUN, T.C. AND KRETZMER, K.K.: CDNA CLONING AND EXPRESSION IN
 E. COLI OF A PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR (PAI) RELATED TO A PAI
 PRODUCED BY HEP G2 HEPATOMA CELL. IN: FEBS 210 (1987), S. 11-16
- 82. LOSKUTOFF, D. J.; SAWDEY, M.; KEETON, M.; SCHNEIDERMAN, J.: REGULATION OF PAI-1 GENE EXPRESSION IN VIVO. IN: *THROMB HAEMOST* 70 (1993), Nr. 1, S. 135-137
- 83. TREADWELL, B. V.; PAVIA, M.; TOWLE, C. A.; COOLEY, V. J.; MANKIN,
 H. J.: CARTILAGE SYNTHESIZES THE SERINE PROTEASE INHIBITOR PAI-1: SUPPORT FOR THE INVOLVEMENT OF SERINE PROTEASES IN CARTILAGE REMODELING. IN: J ORTHOP Res 9 (1991), NR. 3, S. 309-316
- 84. CAMPBELL, I. K.; WOJTA, J.; NOVAK, U.; HAMILTON, J. A.: CYTOKINE MODULATION OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1) PRODUCTION BY HUMAN ARTICULAR CARTILAGE AND CHONDROCYTES. DOWN-REGULATION BY TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND UP-REGULATION BY TRANSFORMING GROWTH FACTOR-B BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR. IN: *BIOCHIM BIOPHYS ACTA* 1226 (1994), NR. 3, S. 277-285
- 85. CHANG, E.; GOLDBERG, H.: REQUIREMENTS FOR TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA REGULATION OF THE PRO-ALPHA 2(I) COLLAGEN AND PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 PROMOTERS. IN: J BIOL CHEM 270 (1995), NR. 9, S. 4473-4477
- 86. Schleuning W.D., Medcalf, R.L., Hession, C., Rothenbuehler, R., Shaw, A., Kruithof E.K.O.: Regulation of gene transcription during phorbol ester-mediated differentiation of U-937 human histiocytic lymphoma cells. In: *Mol Cell Biol* 7 (1987), S. 4564-4567

- HEARING, V. J.; LAW, L. W.; CORTI, A.; APPELLA, E.; BLASI, F.: MODULATION OF METASTATIC POTENTIAL BY CELL SURFACE UROKINASE OF MURINE MELANOMA CELLS. IN: CANCER Res 48 (1988), Nr. 5, S. 1270-1278
- 88. POLLANEN, J.; STEPHENS, R. W.; VAHERI, A.: DIRECTED PLASMINOGEN ACTIVATION AT THE SURFACE OF NORMAL AND MALIGNANT CELLS. IN: Adv Cancer Res 57 (1991), S. 273-328
- 89. MILES, L. A.; GINSBERG, M. H.; WHITE, J. G.; PLOW, E. F.: PLASMINOGEN INTERACTS WITH HUMAN PLATELETS THROUGH TWO DISTINCT MECHANISMS. IN: J CLIN INVEST 77 (1986), NR. 6, S. 2001-2009
- 90. CESARMAN, G. M.; GUEVARA, C. A.; HAJJAR, K. A.: AN ENDOTHELIAL CELL RECEPTOR FOR PLASMINOGEN/TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR (T-PA).
 II. ANNEXIN II-MEDIATED ENHANCEMENT OF T-PA-DEPENDENT PLASMINOGEN ACTIVATION. IN: J BIOL CHEM 269 (1994), Nr. 33, S. 21198-21203
- 91. HAJJAR, K. A.; JACOVINA, A. T.; CHACKO, J.: AN ENDOTHELIAL CELL RECEPTOR FOR PLASMINOGEN/TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR. I. IDENTITY WITH ANNEXIN II. IN: *J BIOL CHEM* 269 (1994), NR. 33, S. 21191-21197
- 92. HAJJAR, K. A.; HARPEL, P. C.; JAFFE, E. A.; NACHMAN, R. L.: BINDING OF PLASMINOGEN TO CULTURED HUMAN ENDOTHELIAL CELLS. IN: J BIOL CHEM 261 (1986), Nr. 25, S. 11656-11662
- 93. GONIAS, S. L.: BRAUD, L. L.; GEARY, W. A.; VANDENBERG, S. R.: PLASMINOGEN BINDING TO RAT HEPATOCYTES IN PRIMARY CULTURE AND TO THIN SLICES OF RAT LIVER. IN: *BLOOD* 74 (1989), NR. 2, S. 729-736
- 94. Aggeler, J.; Frisch, S. M.; Werb, Z.: Changes in cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblasts. In: *J Cell Biol* 98 (1984), Nr. 5, S. 1662-1671
- 95. GONZALEZ GRONOW, M.; GAWDI, G.; PIZZO, S. V.: CHARACTERIZATION OF THE PLASMINOGEN RECEPTORS OF NORMAL AND RHEUMATOID ARTHRITIS HUMAN SYNOVIAL FIBROBLASTS. IN: J BIOL CHEM 269 (1994), NR. 6, S. 4360-4366
- 96. CAMPBELL, I. K.; PICCOLI, D. S.; BUTLER, D. M.; SINGLETON, D. K.; HAMILTON, J. A.: RECOMBINANT HUMAN INTERLEUKIN-1 STIMULATES HUMAN ARTICULAR CARTILAGE TO UNDERGO RESORPTION AND HUMAN CHONDROCYTES TO PRODUCE BOTH TISSUE- AND UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR. IN: BIOCHIM BIOPHYS ACTA 967 (1988), Nr. 2, S. 183-194
- 97. LIN, C. W.; PHILLIPS, S. L.; BRINCKERHOFF, C. E.; GEORGESCU, H. I.; BANDARA, G.; EVANS, C. H.: INDUCTION OF COLLAGENASE MRNA IN LAPINE ARTICULAR CHONDROCYTES BY SYNOVIAL FACTORS AND INTERLEUKIN-1. IN: Arch Biochem Biophys 264 (1988), Nr. 1, S. 351-354

- 98. MOCHAN, E.; ROSS, B.; SPORER, R.; UHL, J.: INTERLEUKIN-1 MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION ASSOCIATED WITH SYNOVIAL CELL ACTIVATION. IN: AGENTS ACTIONS 27 (1989), NR. 3-4, S. 282-284
- 99. FIBBI, G.; SERNI, U.; MATUCCI, A.; MANNONI, A.; PUCCI, M.; ANICHINI,
 E.; DEL ROSSO, M.: CONTROL OF THE CHONDROCYTE FIBRINOLYTIC BALANCE
 BY THE DRUG PIROXICAM: RELEVANCE TO THE OSTEOARTHRITIC PROCESS. IN:
 J RHEUMATOL 21 (1994), NR. 12, S. 2322-2328
- 100. SERNI, U.; FIBBI, G.; ANICHINI, E.; ZAMPERINI, A.; PUCCI, M.; MANNONI, A.; MATUCCI, A.; BENUCCI, M.; DEL ROSSO, A.; DEL ROSSO, M.: PLASMINOGEN ACTIVATOR AND RECEPTOR IN OSTEOARTHRITIS. IN: J RHEUMATOL SUPPL 43 (1995), S. 120-122
- 101. VAN LENT, P. L.; VAN DEN BERG, W. B.; VAN DE PUTTE, L. B.; VAN DEN BERSSELAAR, L.: THE IMPACT OF PROTEIN SIZE AND CHARGE ON ITS RETENTION IN ARTICULAR CARTILAGE. IN: *Rheumatol Int* 8 (1988), Nr. 4, S. 145-152
- 102. SAKSELA, O.: RADIAL CASEINOLYSIS IN AGAROSE. IN: ANALYT. BIOCHEM(1981), NR. 3, S.: 26-282
- 103. KLAPPA, P., HAWKINS, H.C., FREEDMAN, R.B.: INTERACTIONS BETWEEN PROTEIN DISULPHIDE ISOMERASE AND PEPTIDES. IN: EUR J BIOCHEM (1997), NR. 248, S.: 37-42
- 104. GUERRA, D., FRIZZIERO, L., LOSI, M., BACHELLI, B., MEZZADRI, G., PASQUALI-RONCHETTI, I.: ULTRASTRUCTURAL IDENTIFICATION OF A MEMBRANE-LIKE STRUCTURE ON THE SURFACE OF THE NORMAL ARTICULAR CARTILAGE. IN: J SUBMICROSC CYTOL PATHOL 28 (1996), NR. 3, S. 385-393
- 105. SUCKLING, C., J.: MOLECULAR RECOGNITION IN APPLIED ENZYME CHEMISTRY. IN: *Experientia* 47 (1991), Nr.11-12, S. 1139-1148
- 106. BERGER, S., L., CHIRGWIN, J., M.: ISOLATION OF RNA. IN: METHODS ENZYMOL 180 (1989), S. 3-13
- 107. CHOMCZYNSKI, P., MACKEY,: SHORT TECHNICAL REPORTS. MODIFICATION OF THE TRI REAGENT PROCEDURE FOR ISOLATION OF RNA FROM POLYSACCHARIDE- AND PROTEOGLYKAN-RICH SOURCES. IN: BIOTECHNIQUES (1995), NR. 19, S.: 942-945
- 108. GERARD, G., F., FOX, D., K., NATHAN, M., D'ALESSIO, J., M.: REVERSE TRANSKRIPTASE. THE USE OF THE CLONED MOLONEY MURINE LEUKEMIA VIRUS REVERSE TRANSCRIPTASE TO SYNTHESIZE DNA FROM RNA. IN: MOL BIOTECHNOL 8 (1997), NR. 1, S. 61-77

- 109. LACKNER, C., COHEN, J., C., LEFFERT, C., C., HOBBS, H.,H.: MOLECULAR ANALYSIS OF THE SIZE POLYMORPHISM IN THE APOLIPOPROTEIN (A). IN: HUM MOL GENET 2 (1993), S. 933-940
- SIROVER, M.; A.: ROLE OF THE GLYCOLYTIC PROTEIN, GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE, IN NORMAL CELL FUNCTION AND IN CELL
 PATHOLOGY. IN: J CELL BIOCHEM 66 (1997), Nr. 2, S.133-140
- 111. HIRSCH, M.S., LUNSFORD, L.E., TRINKAUS-RANDALL, V., SVOBODA, K.K.: CHONDROCYTE SURVIVAL AND DIFFERENTIATION IN SITU ARE INTEGRIN MEDIATED. IN: DEV-DYN (1997), NR. 100, S.: 1789-1796
- 112. Hardingham, T., E., Fosang, A., J.: The structure of aggrecan and ist turnover in cartilage. In: J Rheumatol Suppl. 43 (1995) S. 86-90
- LARK, M.,W., BAYNE, E.,K., FLANAGAN, J., HARPER, C.,F., HOERRNER,
 L.,A., HUTCHINSON, N.,I., SINGER, I.,I.: AGGRECAN DEGRADATION IN HUMAN
 CARTILAGE. IN: J CLIN INVEST 100 (1997), Nr. 1, S. 93-106
- 114. Zheng, J., Luo, W., Tanzer, M.,L.: Aggrecan synthesis and secretion. A Paradigm for molecular and cellular coordination of multiglobular protein foldinmg and intracelluar trafficking. In: J Biol Chem 273 (1998) Nr. 21, S. 12999-13006
- 115. VALHMU, W., B., STAZZONE, E.,J., BACHRACH, N.,M.: LOAD-CONTROLLED COMPRESSION OF ARTICULAR CARTILAGE INDUCES A TRANSIENT STIMULATION OF AGGRECAN GENE EXPRESSION. IN: Arch Biochem Biophys 353 (1998), Nr. 1, S. 29-36
- 116. SZTROLOVICS, R., ALINI, M., ROUGHLEY, P.J., MORT, J., S.: AGGRECAN DEGRADATION IN HUMAN INTERVERTEBRAL DISC AND ARTICULAR CARTILAGE. IN: *BIOCHEM J* 326 (1997), PT 1, S. 235-241
- 117. FLANNERY, C., R., LITTLE, C.,B., CATERSON, B.: MOLECULAR CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF THE AGGRECAN INTERGLOBULAR DOMAIN FROM PORCINE, EQUINE, BOVINE AND OVINE CARTILAGE: A COMPARISON OF THE PROTEINASE- SUSCEPTIBLE REGIONS AND SITES OF KERATAN SULFATE SUBSTITUTION. IN: *MATRIX BIOL* 16 (1998), NR. 8, 507-511
- 118. HUGHES, C.,E., CATERSON, B., FOSANG, A., J., ROUGHLEY, P.J., MORT, J.,S.: MONOCLONAL ANTIBODIES THAT SPECIFICALLY RECOGNIZE NEOEPITOPE SEQUENCES GENERATED BY "AGGRECANASE" AND MATRIX METALLOPROTEINASE CLEAVAGE OF AGGRECAN: APPLICATION TO CATABOLISM IN SITU AND IN VITRO. IN: BIOCHEM J 305 (1995), NR. 3, S. 799-804

- 119. ARNER, E.C., DECICCO, C,P., CHERNEY, R., TORTORELLA, M.: CLEAVAGE OF NATIVE CARTILAGE AGGRECAN BY NEUTROPHIL COLLAGENASE(MMP-8) IS DISTINCT FROM ENDOGENOUS CLEAVAGE BY AGGRECANASE. IN: J BIO CHEM 272 (1997), NR. 14, S.: 9294-9299
- 120. GIAMBERNARDI, T.A., GRANT, G.M., TAYLOR, G.P., HAY, R.J., MAHER, V.M., MCCORMACK, J.J., KLEBE, R.J.: OVERVIEW OF MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSION IN CULTURED HUMAN CELLS. IN: *MATRIX BIOL* (1998), NR. 16, S.: 483-496
- 121. WOLFSBERG; T.G., PRIMAKOFF, P., MYLES, D.G., WHITE, J. M.: ADAM, A NOVEL FAMILY OF MEMBRANE PROTEINS CONTAINING <u>A</u> <u>D</u>ISINTEGRIN <u>AND</u> <u>M</u>ETALLOPROTEASE DOMAIN: MULTIPOTENTIAL FUNCTIONS IN CELL-CELL AND CELL-MATRIX INTERACTIONS. IN: J CELL BIOL. 131 (1995), NR. 2, S. 275-278
- 122. Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Ichimura, F., Fujiki, F., Matsushima, K.: Molecular cloning of a gene encoding for a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene In: J Biol Chem 272 (1997), Nr. 1, S. 556-562
- MCKIE, N., EDWARDS, T., DALLAS, D. J., HOUGHTON, A., STRINGER,
 B., GRAHAM, R.: EXPRESSION OF MEMBERS OF A NOVEL MEMBRANE LINKED METALLOPROTEINASE FAMILY (ADAM) IN HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES.
 IN: BIOCHEM BIOPHYS Res Commun 230, (1997), Nr. 2, S. 335-339
- 124. JIA, L. G., SHIMOKAWA, K., BJARNASON, J. B., FOX, J.W.: SNAKE VENOM METALLOPROTEINASES: STRUCTURE, FUNCTION AND RELATIONSHIP TO THE <u>ADAM</u>S FAMILY OF PROTEINS. IN: *TOXICON* 34 (19969, Nr. 12, S. 1269-1276
- 125. VAN LENT, P. L.; VAN DEN BERG, W. B.; SCHALKWIJK, J.; VAN DE PUTTE L.B.; VAN DEN BERSSELAAR, L.: THE IMPACT OF PROTEIN SIZE AND CHARGE ON ITS RETENTION IN ARTICULAR CARTILAGE. IN: J RHEUMATOL 14 (1987), NR. 4, S. 798-805.
- 126. MAROUDAS: PHYSIO-CHEMICAL PROPERTIES OF ARTICULAR CARTILAGE. IN: M. A. R. FREEMAN: ADULT ARTICULAR CARTILAGE. LONDON: PITMAN MEDICAL, 1979, S. 215-290
- 127. WESTACOTT, C. I.; ATKINS, R. M.; DIEPPE, P. A.; ELSON, C. J.: TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA RECEPTOR EXPRESSION ON CHONDROCYTES ISOLATED FROM HUMAN ARTICULAR CARTILAGE. IN: J RHEUMATOL 21 (1994), NR. 9, S. 1710-1715

- 128. ROUGHLEY, P. J.; MELCHING, L. I.; RECKLIES, A. D.: CHANGES IN THE EXPRESSION OF DECORIN AND BIGLYCAN IN HUMAN ARTICULAR CARTILAGE WITH AGE AND REGULATION BY TGF-BETA. IN: *MATRIX BIOL* 14 (1994), NR. 1, S. 51-59
- 129. HOGG, P. J.; STENFLO, J.; MOSHER, D. F.: THROMBOSPONDIN IS A SLOW TIGHT-BINDING INHIBITOR OF PLASMIN. IN: *BIOCHEMISTRY* 31 (1992), Nr. 1, S. 265-269
- 130. MIKHAILENKO, I.; KOUNNAS, M. Z.; STRICKLAND, D. K.: LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN/ALPHA 2-MACROGLOBULIN RECEPTOR MEDIATES THE CELLULAR INTERNALIZATION AND DEGRADATION OF THROMBOSPONDIN. A PROCESS FACILITATED BY CELL-SURFACE PROTEOGLYCANS. IN: J BIOL CHEM 270 (1995), NR. 16, S. 9543-9549
- 131. OVERALL, C.: REPRESSION OF TISSUE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPROTEINASE EXPRESSION BY ALL-TRANS-RETINOIC ACID IN RAT BONE CELL POPULATIONS: COMPARISON WITH TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA 1. IN: J CELL PHYSIOL 164 (1995), NR. 7, S. 17-25
- 132. WILLENBROCK, F., CRABBE, T., SLOCOMBE, P.M., SUTTON, C.W., DOHERTY, A.J., O'SHEA, M.: THE ACTIVITY OF THE TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES IS REGULATED BY C-TERMINAL DOMAIN INTERACTIONS: A KINETIC ANALYSIS OF THE INHIBITION OF GELATINASES A. IN: *BIOCHEMISTRY* 32 (1993), NR. 16, S. 4330-4337
- 133. CAMPBELL, I. K.; PICCOLI, D. S.; ROBERTS, M. J.; MUIRDEN, K. D.; HAMILTON, J. A.: EFFECTS OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA AND BETA ON RESORPTION OF HUMAN ARTICULAR CARTILAGE AND PRODUCTION OF PLASMINOGEN ACTIVATOR BY HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES. IN: ARTHRITIS RHEUM 33 (1990), NR. 4, S. 542-552
- 134. Ito, A., Sato, T., Iga, T., Mori,Y.: TNF bifunctionally regulates MMPs and TIMP production by human fibroblasts. In: *FEBS-Lett* Nr. 269 (1990), S 93-95
- 135. SHAPIRO, S.D., CAMBELL, E.J., KOBAYASHI, D.K., WELGUS, H.G.: DEXAMETHASONE SELECTIVELY MODULATES BASAL AND LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED METALLOPROTEINASE AND TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE PRODUCTION BY HUMAN ALVEOLAR MACROPHAGES. IN: J IMMUNOL 146 (1991), S. 2724-2729
- 136. GANSER, G.L., STRICKLIN, G.P., MATRISIAN, L.M.: EGF AND TGF ALPHA INFLUENCE IN VITRO LUNG DEVELOPMENT BY THE INDUCTION OF MATRIX-DEGRADING METALLOPROTEINASES. IN: INT J DEV BIO 35 (1991), NR. 4, S. 453-461

- 137. LOTZ, M., MOATS, T., VILIGER, P.M.: LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR IS EXPRESSED IN CARTILAGE AND IN SYNOVIUM AND CAN CONTRIBUTE TO THE PATHOGENESIS OF ARTHRITIS. IN: J CLIN INVEST 90 (1992), NR. 3, S. 888-896
- 138. PELLETIER, J. P.; McCollum, R.; Cloutier, J. M.; Martel Pelletier, J.: Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. In: J Rheumatol Suppl 43 (1995), S. 109-114
- 139. NOBLE, A., KEMENY, D.M.: INTERLEUKIN-4 ENHANCES INTERFERON-GAMMA SYNTHESIS BUT INHIBITS DEVELOPMENT OF INTERFERON-GAMMA-PRODUCING CELLS. IN: *IMMUNOLOGY* 85 (1995), S. 357-
- 140. LO, Y.Y., CRUY, T.F.: INVOLVEMENT OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CYTOKINE AND GROWTH FACTOR INDUCTION OF C-FOS EXPRESSION IN CHONDROCYTES. IN: J BIOL CHEM 270 (1995), Nr. 20, S. 11727-11230
- 141. OLEKSYSZYN, J., AUGUSTINE, A.: DITHIOCARBAMATES INHIBIT IL-1-INDUCED CARTILAGE DEGRADATION IN BOVINE ARTICULAR CARTILAGE EXPLANTS. IN: INFLAMM Res 45 (1996), S. 215-217
- 142. MURRELL, G. A.; JANG, D.; WILLIAMS, R. J.: NITRIC OXIDE ACTIVATES METALLOPROTEASE ENZYMES IN ARTICULAR CARTILAGE. IN: BIOCHEM BIOPHYS Res Commun 206 (1995), Nr. 1, S. 15-21
- 143. MORT, J.S., BUTTLE, D.J.: CATHEPSIN B. IN: *INT J BIOCHEM CELL BIOL* 29 (1997), NR., S. 715 720
- 144. TURK, B., TURK, V., TURK, D.: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASPECTS OF PAPAIN LIKE CYSTEINE PROTEINASES AND THEIR PROTEIN INHIBITORS. IN: *BIOL CHEM* 378 (1997), Nr. 3-4, S. 141-150
- 145. MCQUENEY, M. S. AMEDAGZIE, B. Y. D'ALESSIO, K., HANNING, C.R., JONES, C.S.: AUTOCATALYTIC ACTIVATION OF HUMAN CATHEPSIN K. IN: J BIOL CHEM 272 (1997), S. 13955-13960
- 146. Harvima, I.T., Horsmanheimo, L., Naukkarinen, A, Horsmanheimo,
 M.: Mast cell proteinases and cytokines in skin inflammation. In: *Arch Dermatol Res* 287 (1994), S. 61-67
- 147. NAGAI, M., HIRAMATSU, R., KANEDA, T., HAYASUKE, N., ARIMURA, H., NISHIDA, M., SUYAMA, T.: MOLECULAR CLONING OF CDNA CODING FOR HUMAN PREPROUROKINASE. IN: GENE 36 (1985), S. 183-188

- 148. HARRIS, T.J.R., PATEL, T., MARSTON, F.A.O., LITTLE, S., EMTAGE, J.S., OPDENAKKER, G., VOLCKAERT, G., ROMBAUTS, W., BILLIAU, A., DE SOMER, P.: CLONING OF CDNA CODING FOR HUMAN TISSUETYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR AND IST EXPRESSION IN E. COLI. IN: MOL BIOL MED, 3 (1986), S. 279-292
- 149. THUNNISSEN, F.B., ELLIS, I.O., JUTTING, U.: QUALITY ASSURANCE IN DNA IMAGE ANALYSIS. IN: CYTOMETRY 27 (1997), Nr. 1, S. 21-25

<u>ERKLÄRUNG:</u>

Ich versichere ausdücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benuzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Danksagungen

Zellkulturexperimente Die der vorliegenden Arbeit wurden von bis Juli 1997 im Labor der September 1995 Orthopädischen Universitätsklinik der Charitè, Humboldtuniversität Berlin, die molekluarbiologischen Untersuchungen von Mai 1996 bis April 1998 am Max-Planck-Institut in Bad Nauheim durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. B. Paul für die Überlassung des Themas und sein fortwährendes Interesse an dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Herrn Professor Dr. J.M. Rueger für seine Bereitschaft den Fortgang der Arbeit zu sichern und die dabei stets gewährte Unterstützung. Für seinen Rat und seine Hilfe schulde ich ihm bleibenden Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Lindenhayn der mich in die Materie eingearbeitet und mich mit nicht nachlassender, stets freundlicher und konstruktiver Unterstützung gefördert hat. Ohne seine unermüdliche Hilfsbereitschaft wäre die Durchführung der Experimente nicht in der vorliegenden Form möglich gewesen. Sein Rat war und ist mir von großem Wert.

Herrn Dr. C. Wohn gilt besonderer Dank, daß er mich mit den molekularbiologischen Techniken vertraut gemacht und während der Experimente anhaltend unterstützt hat. Vorallem die freundschaftliche Bereitschaft zu oft langen abendlichen Unterhaltungen haben mir sehr bei der Fortsetzung der Arbeit geholfen.

Ich danke Frau Mennecke für ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Arbeit im Labor.

Frau M. Tobler danke ich sehr für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Schnitte.

Meine Eltern haben mich mit nicht nachlassendem Interesse bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt. Ich schulde ihnen bleibenden Dank.

Ohne die Geduld und das Verständniss meiner Frau wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr danke ich von ganzem Herzen.

Lebenslauf

Name:	Dietrich Freiherr von Stechow		
Geburtsdatum:	09. März 1968		
Geburtsort:	Berlin		
Adresse:	Jungfrauenthal 14 20149 Hamburg Tel.: 040 – 46 07 23 89		
Familie:	Ehefrau: St Geboren an Journalistin Kinder:	efanie v. Stechow, geb. v. Plato n 15.01.1966 in Wiesbaden 1.Johann v. Stechow geboren am 02.06.1997 in Frankfurt 2. Heinrich v. Stechow geboren am 08.07.1999 in Hamburg	
	wohnhaft:	Jungfrauenthal 14 20149 Hamburg	
	Vater: Dr. jur. Alexander v. Stechow geboren am 06.12.1938 in Berlin Kaufmann Mutter: Dipl. Ing. Benita v. Stechow Geboren am 05.11.1940 in Wangritten Gartenarchitektin		
	wohnhaft:	Quellenweg 8 61348 Bad Homburg	
	2 Brüder		
Konfession:	Protestantisch		
Staatsangehörigkeit:	Deutsch		
Schulausbildung:	1974-1978 Bad Hombu	Friedrich-Ebert-Grundschule rg	

	1978-1987	Kaiserin-Friedrich-Schule Humanistisches Gymnasium Bad Homburg
	1984-1985	einjähriges Stipendium an der St. Andrew`s School, Middletown, Delaware,USA Abschluß mit Diploma
	1987	Abitur mit Großem Latinum und Graecum
Wehrdienst:	1987-1989	Panzeraufklärungsbataillon 3, Lüneburg
Studium:	1989-1993	Studium der Humanmedizin an der Rheinischen Friedrich Wilhelm Universität Bonn
	1993-1996	Fortsetzung des Studiums an der Charitè, Universitätsklinik der Humboldt- Universität Berlin
Beruflicher Werdegang:	12/1996- 6/1998	Arzt im Praktikum am Friedrichsheim, Orthopädische Universitätsklinik Frankfurt/Main
	seit 7/1998	Assistenzarzt an der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätskrankenhauses Hamburg- Eppendorf