

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer)

**Die Bedeutung von Trefoil factor family peptide 3 in der Pathophysiologie der Arthrose  
und der septischen Arthritis**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sophie Katharina Rösler  
geboren am 12.11.1982 in Scherzingen (Schweiz)

Betreuer: Prof. Dr. Friedrich Paulsen

Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Paulsen, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Prof. Dr. Werner Hoffmann, Institut für Molekularbiologie und medizinische Chemie, Otto von-Guericke-Universität Magdeburg

Prof. Dr. Thomas Pufe, Institut für Anatomie II, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen

Öffentliche Verteidigung am 01.03.2010

## Referat

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll das Vorkommen sowie die funktionelle Bedeutung des Peptids TFF3 in der Pathogenese der Arthrose und der septischen Arthritis untersucht werden.

Die protektiven und regenerativen Funktionen von TFF-Peptiden im Gastrointestinaltrakt sind schon lange bekannt. Um nähere Erkenntnisse über das Vorkommen und die Bedeutung dieser Proteine bei der Arthrose und der septischen Arthritis zu gewinnen, wurden Untersuchungen mittels RT-PCR und Immunhistochemie an Gelenkknorpel, kultivierten Chondrozyten, kultivierten Synoviozyten und Synovialgewebe durchgeführt. Zur Analyse der TFF3-Expression nach Stimulation mit Zytokinen sowie Bestandteilen gramnegativer Bakterien wurden Zellkulturexperimente mittels RT-PCR und Immunhistochemie durchgeführt. Außerdem wurde die Expression von TFF3 anhand zweier *in-vivo*-Mausmodelle untersucht. Mittels ELISA wurden Matrixmetalloproteinasen sowie deren Inhibitoren in kultivierten Chondrozyten und im Gelenkknorpel analysiert. Weiterhin wurden Caspase-3/7 Assays sowie Annexin-V Assays zur Untersuchung der Apoptose in Chondrozyten durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass TFF-Peptide im gesunden Gelenkknorpel nicht exprimiert werden, die Expression von TFF3 jedoch unter den pathologischen Bedingungen der Arthrose und der septischen Arthritis induziert wird. Die an der Pathogenese der Arthrose beteiligten Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  induzieren eine hohe Expression von TFF3 in kultivierten Chondrozyten. Die Stimulation kultivierter Chondrozyten mit rekombinantem TFF3 führt zu einer verstärkten Expression knorpeldegradierender Matrixmetalloproteinasen und zur Apoptoseinduktion kultivierter Chondrozyten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TFF3 einen zusätzlichen Faktor in der Pathogenese der Arthrose und der septischen Arthritis bildet.

Rösler, Sophie: Die Bedeutung von Trefoil factor family peptide 3 in der Pathophysiologie der Arthrose und der septischen Arthritis. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 76 Seiten, 2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Knorpel	1
1.2	Diarthrosen	2
1.3	Arthrose	3
1.4	Septische Arthritis	6
1.5	Rheumatoide Arthritis	6
1.6	Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren	7
1.7	Trefoil-Factor-Family (TFF)-Peptide	8
1.8	Ziele	10
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>11</b>
2.1	Eingesetzte Materialien und Chemikalien	11
2.1.1	Allgemeine Materialien	11
2.1.2	Verwendete Geräte	11
2.1.3	Chemikalien	12
2.1.4	Lösungen	13
2.2	Zellbiologische Methoden: Zellkultur	14
2.2.1	Chondrozytenzelllinie C28/I2	14
2.2.2	Primäre Chondrozyten	14
2.2.3	Knorpelgewebe	14
2.2.4	Synoviozytenzelllinien	15
2.2.5	Primäre Synoviozyten	15
2.2.6	Synovialgewebe	15
2.2.7	Gewebeschnitte aus Kniegelenken von STR/Ort-Mäusen	15
2.2.8	Gewebeschnitte aus Kniegelenken von Balb-c-Mäusen	16
2.2.9	Medien und Kultivierung	16
2.2.10	Stimulationsversuche	17
2.2.11	Herstellung von Bakterienüberständen	17
2.3	RNA-Isolation	17
2.3.1	aus Zellen (Chloroform-Phenol-Extraktion)	17
2.3.2	aus Gewebe nach dem RNeasy Mini Protokoll (Quiagen)	18
2.4	Reverse Transkription	19
2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.6	Real-time RT-PCR	21
2.7	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.8	Dot Blot	22

2.8.1	Dot Blot mit Hybond ECL-Membran	23
2.8.2	Dot Blot mit Milipore Immobilon-P Membran	23
2.9	Immunhistochemie an Gewebe	24
2.10	Immunhistochemie an Zellkulturen	25
2.11	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	25
2.12	Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)	26
2.13	Caspase-3/7 Assay	28
2.14	Annexin-V Assay	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	RT-PCR	30
3.1.1	Humaner Gelenkknorpel	30
3.1.2	Chondrozytenzelllinie C28/I2	30
3.1.3	Primäre Chondrozyten	31
3.1.4	Synoviozytenzelllinie HSE	31
3.1.5	Synoviozytenzelllinie K4IM	32
3.1.6	Primäre Synoviozyten	32
3.1.7	Humanes Synovialgewebe	32
3.2	Real-time RT-PCR	33
3.3	Dot Blot	33
3.4	Immunhistochemie	33
3.4.1	Primäre Chondrozyten	33
3.4.2	Membrana synovialis	35
3.5	TFF3-Expression im Kniegelenk von STR/Ort-Mäusen	36
3.5.1	HE-Färbung	36
3.5.2	Immunhistochemie	36
3.6	TFF3-Expression im Kniegelenk von Balb-c-Mäusen nach Behandlung mit <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.7	ELISA	39
3.7.1	Kultivierte Chondrozyten und MMP-1	40
3.7.2	Kultivierte Chondrozyten und MMP-3	40
3.7.3	Kultivierte Chondrozyten und MMP-9	41
3.7.4	Kultivierte Chondrozyten und MMP-13	42
3.7.5	Kultivierte Chondrozyten und TIMP-1	42
3.7.6	Kultivierte Chondrozyten und TIMP-2	43
3.7.7	Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse an kultivierten Chondrozyten	44
3.7.8	Knorpelstanzen und MMP-1	44

3.7.9	Knorpelstanzen und MMP-3	44
3.7.10	Knorpelstanzen und MMP-9	45
3.7.11	Knorpelstanzen und MMP-13	46
3.7.12	Knorpelstanzen und TIMP-1	46
3.7.13	Knorpelstanzen und TIMP-2	47
3.7.14	Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse an Knorpelstanzen	48
3.8	Annexin-V Assay	48
3.9	Caspase-3/7 Assay	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
4.1	Nachweis von TFF3 im Gelenkknorpel	51
4.1.1	Arthrose	51
4.1.2	septische Arthritis	53
4.2	Nachweis von TFF3 in der Membrana synovialis	54
4.2.1	Arthrose und rheumatoide Arthritis	54
4.2.2	septische Arthritis	55
4.3	Einfluss von rekombinatem TFF3 auf die Expression von Matrixmetalloproteinase und Inhibitoren von Matrixmetalloproteinase	56
4.4	Einfluss von rekombinatem TFF3 auf die Apoptose von Chondrozyten	58
4.5	Ausblick und Perspektiven	60
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Thesen</b>	<b>75</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Proteoglykan
PGN	Peptidoglykan
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
rpm	revolutions per minute
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
sec	Sekunde
sRNA	small nuclear-RNA
SV	Simian Virus
Tab.	Tabelle
TBS	trisgepufferte Saline
TFF	Trefoil factor family
TFF3	Trefoil factor family peptide 3
TIMPs	Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

## **1 Einleitung**

Das Skelettsystem ermöglicht dem Menschen den aufrechten Gang. Durch das Zusammenspiel von Muskeln, Knochen, Bändern und Gelenken ist ein Höchstmaß an Bewegungsfreiheit möglich. Übermäßige Belastung der Skelettelemente führt zu Erkrankungen des Bewegungsapparates. Die häufigsten Erkrankungen sind hierbei außer Knochenbrüchen und Bandverletzungen degenerative Gelenkerkrankungen, in erster Linie die Arthrose.

Degenerative Gelenkerkrankungen sind von großer sozialmedizinischer Bedeutung. Aufgrund ihrer Häufigkeit nehmen Arthrosen und ihre Behandlung eine zentrale Stellung ein. Die Inzidenz der Arthrose liegt in den USA bei 15% (Simmons et al., 1999). In Deutschland sieht man radiologische Zeichen einer Arthrose bei 25% der über 50-jährigen und bei mehr als 80% der über 75-jährigen (Puhl, 1996). Durch die aktuelle Entwicklung hin zu einer älteren Bevölkerung wird die Arthrose, für die hohes Alter ein wichtiger Risikofaktor ist, zu einem weiter zunehmenden Problem für das Gesundheitssystem. Weitere Risikofaktoren sind weibliches Geschlecht, übermäßige Belastung und ausgeprägte Adipositas. Zu 39-65% spielen erbliche Faktoren eine Rolle (Spector et al., 1996).

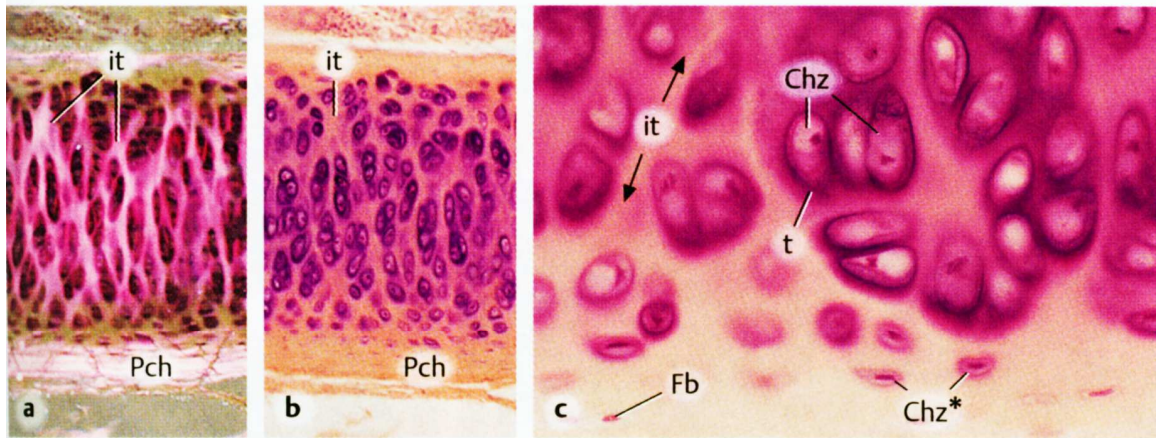
### **1.1 Knorpel**

Knorpel gehört zu den Binde- und Stützgeweben und besteht aus Knorpelzellen (Chondrozyten) und Extrazellulärmatrix (EZM). Die EZM setzt sich im Wesentlichen aus Proteoglykanen (PG) und Kollagen zusammen und wird von den Chondrozyten produziert. Knorpel ist druck- und biegungselastisch; das bedeutet, dass er bis zu einem gewissen Grad komprimierbar, biegsam und torquierbar ist. Beim Nachlassen der Druck-, Zug- und Biegungskräfte gewinnt der Knorpel seine Ausgangsform zurück. In Gelenken begünstigt Knorpel das Gleiten der Skelettelemente (Leonhardt, 1990; Lüllmann-Rauch, 2003).

Knorpel ist gefäß- und nervenfrei. Die Ernährung erfolgt durch Konvektion von der Knorpeloberfläche her (beim Gelenkknorpel über die Synovialflüssigkeit). Knorpel hat nur eine geringe Stoffwechselaktivität (Leonhardt, 1990; Lüllmann-Rauch, 2003). Entsprechend der Zusammensetzung seiner EZM lassen sich drei Knorpelarten unterscheiden: Faserknorpel, elastischer Knorpel und hyaliner Knorpel. Der Gelenkknorpel gehört zu den hyalinen Knorpeln (Abb. 1). Hyaliner Knorpel weist eine hohe Druckelastizität auf. Die Kollagenfasern bestehen hauptsächlich aus Typ-II-Kollagen; in geringen Mengen kommen auch die Kollagentypen VI, IX, XI, XII und XIV vor (Goldring, 2000). Typ-II-Kollagen bildet im Gelenkknorpel bis zu 100 nm dicke Fibrillen. Die PG des hyalinen Knorpels (hauptsächlich Aggrecan) enthalten Chondroitin- und Keratansulfat und bilden lange Aggregate, die wiederum mit Kollagen interagieren. Durch die polyanionische Struktur der PG lagern sich Wasser und Ionen an. Durch diese starke Hydratisierung kommt es zu einer immensen Volumenvergrößerung und zum



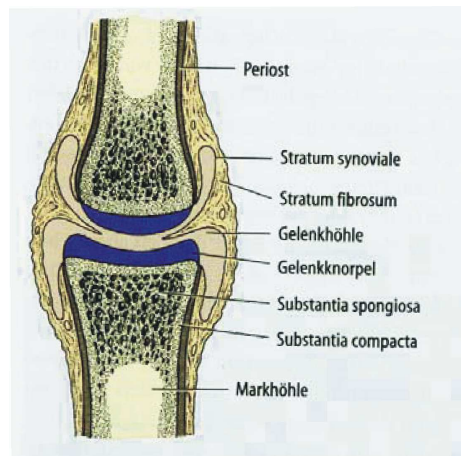
biomechanischen Effekt der Stoßdämpferfunktion des Gelenkknorpels (Leonhardt, 1990; Lüllmann-Rauch, 2003).



**Abb.1** Hyaliner Knorpel. Chondrozyten, oft in Gruppen liegend, umgeben von einer stark basophilen (hohe Konzentration von Proteoglykanen) Matrix (Knorpelhof, Territorium). Ein Chondrozyt bzw. eine isogene Chondrozytengruppe samt umgebendem Knorpelhof wird als Chondron bezeichnet, die Straßen dazwischen als Interterritorien. Die Kollagenfibrillen hyalinen Knorpels sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen (aus Lüllmann-Rauch R. Histologie 2003, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart).

## 1.2 Diarthrosen

Diarthrosen sind echte Gelenke, deren Charakteristikum ein Gelenkspalt ist. Sie bestehen aus Gelenkkörpern, deren Gelenkflächen von hyalinem Knorpel überzogen sind, sowie aus einer Gelenkkapsel, die das Gelenk umschließt (Abb. 2). Die Kapsel besteht aus einer äußeren bindegewebigen Schicht aus festem Kollagen (Membrana fibrosa) und einer inneren Schicht aus lockerem Bindegewebe (Membrana synovialis). Die Membrana synovialis besitzt zwei Zelltypen: Typ A Synoviozyten haben Makrophagencharakter und sind positiv für das Oberflächenmolekül CD68; Typ B Synoviozyten haben Fibroblastencharakter und sind für die Produktion von Proteinasen, Kollagenasen, Hyaluronsäure und Prostaglandinen verantwortlich. Die subsynoviale Schicht enthält zahlreiche Mechano- und Nozizeptoren und ist im Wesentlichen verantwortlich für die bei Entzündung und Gelenkergüssen auftretenden Gelenkschmerzen. Die Synovialflüssigkeit (Synovia) besteht aus einem Ultrafiltrat des Blutserums, dem die Produkte der Synoviozyten beigemischt sind. Sie erfüllt zwei wichtige Funktionen: sie ernährt den Gelenkknorpel und sorgt außerdem durch ihre hohe Viskosität für die Lubrikation der Gelenkflächen und somit für das reibungsfreie Gleiten der Gelenkkörper (Leonhardt, 1990; Lüllmann-Rauch, 2003).



**Abb.2** Schema einer Diarthrose. Die Gelenkkapsel besteht aus zwei Schichten: dem äußeren Stratum fibrosum und dem inneren Stratum synoviale. Die beiden interagierenden Knochen sind mit hyalinem Gelenknorpel bedeckt (aus Junqueira C. Histologie 2001, Springer-Verlag, Heidelberg).

### 1.3 Arthrose

Als Arthrose bezeichnet man eine degenerative Gelenkerkrankung, bei der es zu einer Zerstörung des Knorpelgewebes mit sekundärer Knochenläsion und entzündlich bedingter Schrumpfung der Gelenkkapsel kommt. Arthrosen gehen meist mit Schmerzen, Schwellung, Bewegungseinschränkung und Deformierung der Gelenke einher. Bei der aktivierten Arthrose kommt es sekundär durch einen vermehrten Anfall von Knorpelabbauprodukten zu einer reaktiven Entzündung der Membrana synovialis. Der Verlauf degenerativer Gelenkerkrankungen ist langsam progredient (Krämer et al., 2005; Niethard et al., 2005).

Die Arthrose entwickelt sich aus einem Missverhältnis zwischen Belastung und Belastungsfähigkeit des Gelenks. Nach ihrer Ätiologie unterscheidet man primäre und sekundäre Arthrosen. Bei der primären Arthrose tritt die Knorpeldegeneration ohne erkennbare Ursache auf. Sie kommt meist im höheren Lebensalter vor (Durchschnittsalter 60 Jahre) und ist polyartikulär. Sekundäre Arthrosen sind die Folge bestimmter Grundkrankheiten wie angeborener Gelenkdeformitäten und funktioneller Störungen. Sie können postentzündlich (z.B. bei rheumatoider Arthritis) oder posttraumatisch auftreten und sind in der Regel oligoartikulär (Krämer et al., 2005; Niethard et al., 2005).

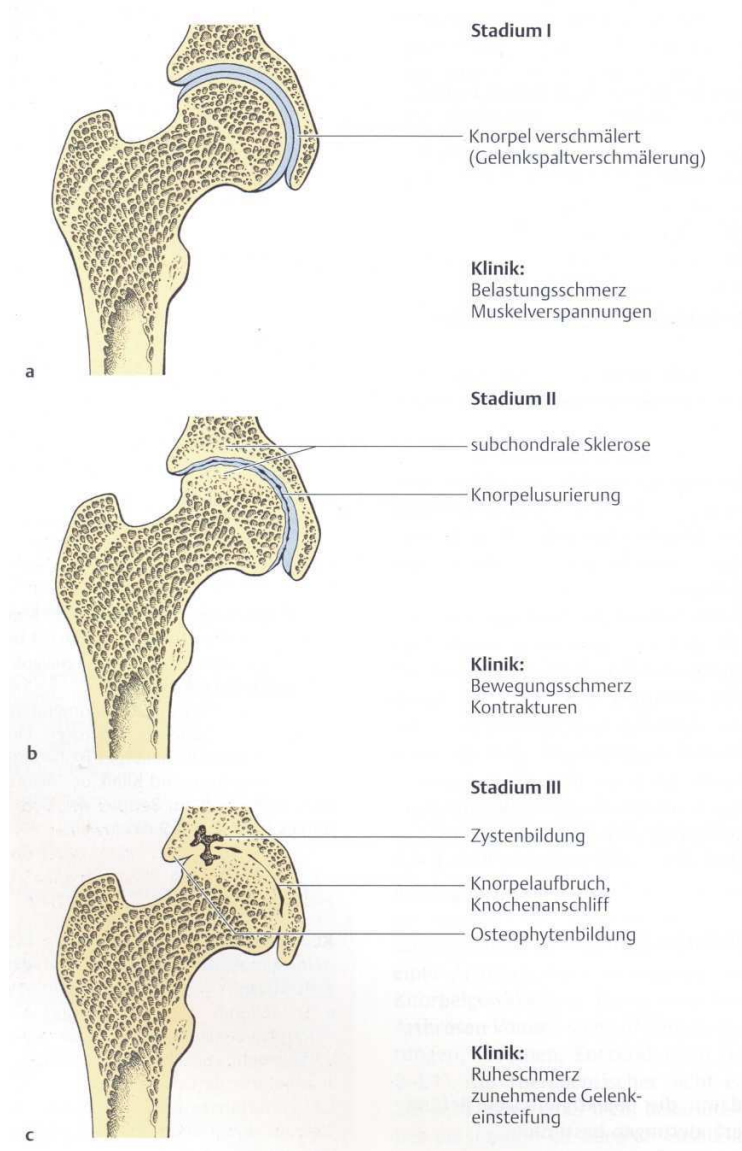
Ausgangspunkt degenerativer Gelenkveränderungen ist der Gelenknorpel. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der EZM des Gelenknorpels. Bei der Arthrose ist dieses Gleichgewicht gestört; es kommt zum verstärkten Abbau der EZM und somit zur Knorpeldestruktion. Diese Veränderungen können primär von mechanischen Noxen, die zu Fissuren und Rissen an der Knorpeloberfläche führen, oder durch reduzierte PG-Synthese sowie Stimulierung der EZM-abbauenden Enzyme von den Chondrozyten sel-

ber ausgehen. Unabhängig vom primären Geschehen entwickelt sich ein Wechselspiel zwischen mechanischer und enzymatischer Zerstörung des Gelenkknorpels (Zilch et al., 1989). Morphologisch verläuft die Arthrose in vier Stadien: Im Stadium I führen proteolytische Veränderungen zu multiplen Fissuren, wodurch es zu einer oberflächlichen Auffaserung (Fibrillation) des Gelenkknorpels kommt. Durch die Veränderung der Knorpelgrundsubstanz kommt es zu einer Höhenabnahme des Knorpelgewebes und somit zu einer Verschmälerung des Gelenkspalts (Abb. 3a).

Im Stadium II führen die Scherkräfte, die auf die Fissuren einwirken, zu Einrissen bis in den Bereich des subchondralen Knochens (Knorpelususurierung). Dabei kommt es zum Abriss von PG-Bruchstücken, die für die Entstehung der sekundären Synovitis von Bedeutung sind. An den Rissrändern proliferieren die restlichen Chondrozyten zu kleinen Zellhaufen (Brutkapseln oder Chondrozytenclustern). Da sich die Diffusionsstrecke durch die Einrisse stark verkürzt hat, teilen sich die Chondrozyten rasch. Der Versuch der Knorpelregeneration ist jedoch vergeblich, da die Chondrozyten in den Clustern nicht in der Lage sind, EZM zu produzieren und die Arthrose somit fortschreitet. Durch die beschriebenen Vorgänge kann der zerstörte Gelenkknorpel seine Funktion als Druckauffanglager nicht mehr erfüllen. Dadurch kommt es zu knöchernen Umbauvorgängen: auf die subchondrale Knochenschicht wird nun ungedämpft der auf das Gelenk einwirkende Druck übertragen, wodurch es zur Neubildung von Knochengewebe und somit zu einer Verbreiterung und Verdickung des subchondralen Knochens kommt (röntgenologisch sichtbare subchondrale Sklerose, Abb. 3b).

Im Stadium III ist der Gelenkknorpel völlig zerstört und bis auf eine subchondrale Knochenschicht abgerieben, die auch als „Knochenglatze“ bezeichnet wird. In der Knochenglatze befinden sich regelmäßig kleinere Nekrosen, die von aus dem darunterliegenden Markraum eindringenden Makrophagen resorbiert werden. Übrig bleiben mit Blut- und Nekroseresten gefüllte Zysten (Geröllzysten). Das randständige Knochengewebe des Gelenks versucht, der Überlastung der Gelenkkörper mit der Bildung von Randwülsten (Osteophyten) zur Vergrößerung der Gelenkoberfläche entgegenzuwirken (Abb. 3c).

Im Stadium IV ist ein Ulkus in der subchondralen Knochenplatte mit direkter Eröffnung des spongiosen Markraumes entstanden (Niethard et al., 2005; Riede et al., 1993; Zilch et al., 1989).



**Abb.3** Arthrosestadien. Im Stadium I kommt es durch eine Höhenabnahme des Knorpelgewebes zu einer Verschmälerung des Gelenkspalts (a). Das Stadium II ist durch Einrisse bis in den subchondralen Knochen (Knorpelusrerung) und eine Verbreiterung und Verdickung des subchondralen Knochens (subchondrale Sklerose) gekennzeichnet (b). Im Stadium III ist der Gelenkknorpel vollständig zerstört und bis auf eine subchondrale Knochenschicht abgerieben. Es kommt zur Bildung von mit Blut und Nekroseresten gefüllten Zysten. Das randständige Knochengewebe bildet Randwülste (Osteophyten) zur Vergrößerung der Gelenkoberfläche (c), (aus Niethard FP. MLP Duale Reihe Orthopädie 2005, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart).

Als zentrale Agitatoren der pathologischen Veränderungen werden die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), der Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappa B (NF-kB) sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) angesehen, die zu einem Überwiegen kataboler Vorgänge mit Veränderungen der Knorpelmatrix führen (Berenbaum, 2004; Haringman et al., 2004).

Die Prävention degenerativer Gelenkerkrankungen spielt eine zunehmende Rolle. Bewegungsarmut und Adipositas sind zwei wesentliche Förderer degenerativer Gelenkerkrankungen und müssen bei den vorbeugenden Maßnahmen berücksichtigt werden. Eine kausale Therapie der primären Arthrose gibt es nicht. Bei der sekundären Arthrose richtet sich die Therapie nach der zugrunde liegenden Ursache. Somit ist die Behandlung der Arthrose symptomatisch ausgerichtet und orientiert sich an den Hauptsymptomen Schmerz, Schwellung und Bewegungseinschränkung. Zur Schmerzbehandlung und Entzündungshemmung werden hauptsächlich nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAR) eingesetzt. Zusätzlich kommen physikalische, krankengymnastische und orthopädische Verfahren zum Einsatz. Als ultima ratio besteht nach Ausschöpfen aller konservativen Ansätze die Möglichkeit eines Gelenkersatzes (Krämer et al., 2005; Niethard et al., 2005).

#### **1.4 Septische Arthritis**

Ursache der septischen Arthritis ist der direkte Befall des Gelenks durch pathogene Mikroorganismen. Zu 90% sind die Erreger Bakterien, v. a. Staphylo- und Streptokokken (Ryan et al., 1997), seltener Viren, Pilze und Protozoen. Der häufigste Erreger der septischen Arthritis ist *Staphylococcus aureus* (Josefsson et al., 1999; Varoga et al., 2004; Xu et al., 2004). Die Erreger können entweder durch eine offene Gelenkverletzung oder von einem Infektionsherd in den angrenzenden Weichteilen, im Knochen oder hämatogen im Rahmen einer Septikopyämie in das Gelenk gelangen (Thomas et al., 2001).

Die Entzündung betrifft zunächst die Membrana synovialis (Krämer et al., 2005). Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und proteolytischer Enzyme, die durch die Mikroorganismen und ihre Produkte induziert wird, kommt es dann auch zu einer Degeneration des Gelenkknorpels (Carreño Pérez, 1999). Wie bei der Arthrose sind hierbei hauptsächlich die inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  von Bedeutung (Saez Llorens et al., 1991). Sie induzieren die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen und anderen kollagendegradierenden Enzymen in Chondro- und Synoviozyten (Carreño Pérez, 1999).

#### **1.5 Rheumatoide Arthritis**

Unter rheumatoider Arthritis versteht man eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes mit bevorzugtem Befall der Membrana synovialis von Gelenken. Die Entzündung manifestiert sich fast immer an mehreren Gelenken und verläuft chronisch-

progredient oder in Schüben (Thomas et al., 2001). Eine Sonderform der rheumatoiden Arthritis ist die juvenile rheumatoide Arthritis mit einem Krankheitsbeginn zwischen 0 und 15 Jahren (Imhoff et al., 2006). Am Anfang und im Mittelpunkt der Erkrankung steht eine Entzündung der Membrana synovialis, die erst im weiteren Krankheitsverlauf auf die Gelenkflächen übergreift und so zu einer allmählichen Zerstörung des Gelenkknorpels, der Gelenkkapsel und des subchondralen Knochens führt (Krämer et al., 2005). Bei der Gelenkdestruktion im Rahmen der rheumatoiden Arthritis spielen Matrixmetalloproteinasen eine Schlüsselrolle (Firestein et al., 1996; Nagase et al., 1996; Nagase et al., 1993).

### **1.6 Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren**

Als Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bezeichnet man eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, denen ein ionisiertes Zinkatom im aktiven Zentrum gemeinsam ist. Durch Spaltung von Peptidbindungen sind sie zur Proteindegeneration und somit zum Abbau von EZM fähig. Bislang sind 25 verschiedene Matrixmetalloproteinasen bekannt, die nach ihrer Substratspezifität, primären Struktur und Lokalisation in der Zelle in mindestens fünf Untergruppen unterteilt werden können. Man unterscheidet Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und Membran-Typ-Matrixmetalloproteinasen, wobei es auch Überschneidungen zwischen den einzelnen Unterklassen gibt (Murphy et al., 2002). Endogene Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen sind die Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases (TIMPs). Man unterscheidet vier verschiedene TIMPs, die die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen kontrollieren.

Matrixmetalloproteinasen spielen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Arthrose (Monfort et al., 2006) und anderer Arthritiden (Firestein et al., 1996; Nagase et al., 1996; Nagase et al., 1993). Das Gleichgewicht zwischen Matrixmetalloproteinasen und TIMPs ist von zentraler Bedeutung bei der Erhaltung des Knorpels; überwiegen die Matrixmetalloproteinasen gegenüber ihren Inhibitoren, kommt es zur Knorpeldestruktion (Yoshihara et al., 2000). Mit ihrer Fähigkeit zum Abbau unterschiedlicher extrazellulärer Faserstrukturen nehmen Matrixmetalloproteinasen an den verschiedensten Umbauprozessen des Gewebes teil, so dass ihnen auch bei physiologischen Prozessen wie dem Wachstum, der Differenzierung und dem physiologischen Abbau von Gewebe eine wichtige Bedeutung zukommt (Hoheisel et al., 2004). Ihre Hyperaktivität bei Krankheiten wie der Arthrose ist auf eine gestörte Regulation zurückzuführen (Murphy et al., 2002). Am Beispiel der Arthrose zeigt sich diese gestörte Regulation durch eine Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (Berenbaum et al., 2004; Goldring et al., 2000; Haringman et al., 2004), die eine gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteinasen in Chondrozyten induzieren (Fernandes et al., 2002; Vincenti et al., 2002).

Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13) sind in der Lage, die Tripelhelix von Kollagenfibrillen der Typen I, II und III zu spalten. MMP-1, die von Chondrozyten und Synoviozyten produziert wird, gilt als entscheidender Faktor in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (Konttinen et al., 1999; Tetlow et al., 2001), spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Arthroseentstehung (Lohmander et al., 1994; Shlopov et al., 1997; Stanton et al., 2005; Woessner et al., 1991). Die von Chondrozyten produzierte und bevorzugt Kollagen-Typ-II spaltende MMP-13 gilt als wichtigste Matrixmetalloproteinase bei der Arthroseentstehung (Konttinen et al., 1999; Tetlow et al., 2001).

Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) haben eine breite Substratspezifität und sind zusammen mit den Kollagenasen für den Abbau von Kollagenfibrillen und anderen Bestandteilen der EZM zuständig. MMP-2 wird von vielen mesenchymalen Zellen produziert, MMP-9 ist im Gegensatz mit Makrophagen und mononukleären Blutzellen assoziiert (Murphy et al., 2002), wird aber auch von Chondrozyten produziert (Cole et al., 1996; Mohtai et al., 1993; Okada et al., 1992; Stephenson et al., 1987) und spielt in der Pathogenese der Arthrose eine Rolle (Aigner et al., 2001; Flannelly et al., 2002; Tetlow et al., 2001).

Stromelysine (MMP-3, MMP-10) haben eine sehr breite Substratspezifität und können die meisten Bestandteile der EZM einschließlich PG, Kollagenen und Prokollagenen degradieren. MMP-3 wird von Chondrozyten produziert (Cole et al., 1996; Mohtai et al., 1993; Okada et al., 1992; Stephenson et al., 1987) und kann sich selbst und andere Matrixmetalloproteinasen wie MMP-1 aktivieren (Nagase et al., 1991). Sie spielt eine wichtige Rolle im Frühstadium der Arthrose (Thibault et al., 2002).

### **1.7 Trefoil factor family (TFF)-Peptide**

Das Trefoil factor family-Peptid 3 (TFF3) ist Mitglied der TFF-Peptid-Familie (Kleeblatt-Peptide), die drei Vertreter umfasst: TFF1, TFF2 und TFF3. Allen TFF-Peptiden gemeinsam ist, dass sie gewebespezifisch von Becher- und Epithelzellen der Schleimhäute sezerniert werden können (Graness et al., 2002; Hoffmann et al., 2005; Hoffmann et al., 2002; Sands et al., 1996) und durch Interaktion von Muzinen für die Viskosität muköser Sekrete verantwortlich sind (Thim et al., 2002).

Eine Trefoil-domäne ist durch eine Sequenz von 38 oder 39 Aminosäuren definiert, in der sechs Cysteine in einer 1-5-, 2-4- und 3-6-Konfiguration verknüpft sind (Thim et al., 2005). Dadurch entsteht eine charakteristische dreiblättrige Struktur (Kleeblatt). TFF1 und TFF3 enthalten eine Trefoil-domäne (Monomer), TFF2 besitzt zwei Domänen. Die Gene für die TFF-Peptide liegen in einer 55 kb großen Region auf Chromosom 21q22.3 (Seib et al., 1997).

TFF-Peptide haben vielfältige physiologische Funktionen. Sie können direkt mit Muzinen interagieren (Tomasetto et al., 2001) und sind somit für die viskoelastischen Eigenschaften





### 1.8 Ziele

Steven et al. (2004) beschreiben, dass TFF3 in der gesunden avaskulären Kornea auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene nicht nachweisbar ist, jedoch unter pathologischen Bedingungen bei verschiedenen kornealen Erkrankungen induziert wird. Aufgrund der bekannten antiapoptotischen und motogenen Wirkungen von TFF3 wird die TFF3-Bildung hierbei als Protektionsmechanismus gegen die progressive Gewebeerstörung bei den untersuchten Hornhauterkrankungen (Keratokonus, Fuchs'sche Epitheldystrophie, herpetische Keratitis) angesehen (Steven et al., 2004).

Paulsen et al. (2008) zeigen *in vitro* und *in vivo* die Bedeutung von TFF3 für die korneale Wundheilung an der Augenoberfläche von Mäusen. Die TFF3-Bildung wird in der intakten Kornea nach Verletzung des Epithels induziert. Die Applikation von rekombinantem TFF3 beschleunigt signifikant die korneale Wundheilung *in vitro* und *in vivo*. TFF3 hat demnach einen fördernden Einfluss auf Wundheilungsprozesse in der avaskulären Kornea (Paulsen et al., 2008).

Die von Paulsen et al. (2008) erhobenen Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass TFF3 möglicherweise auch in anderen avaskulären Geweben wie dem Gelenkknorpel eine protektive Wirkung haben könnte und somit in rekombinanter Form als potentiell Therapeutikum bei degenerativen Erkrankungen des Gelenkknorpels zum Einsatz kommen könnte. Ziel dieser Arbeit ist daher der potentielle Nachweis von TFF3 im Gelenkknorpel und der Membrana synovialis beim Gesunden sowie die Untersuchung einer potentiell protektiven Funktion von TFF3 in der Pathophysiologie der Arthrose und der septischen Arthritis.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Eingesetzte Materialien und Chemikalien

#### 2.1.1 Allgemeine Materialien

BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Filterpapierscheibchen	Whatman Filterpapier Nr. 1450 070
Gelkassetten	Invitrogen, Karlsruhe
Hybond-ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, NJ, USA
Immobilon P-Membran	Milipore, MA, USA
Milchpulver (Sucofin)	TSI Trade Service Int., Zeven
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Nitrocellulose Membran	Kodak BioMax MS-1 Film
PCR Softtubes	Biozym, Oldendorf
Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen
Pipette 5, 10, 50 ml	Greiner bio-one, Solingen
Pipettenspitzen, blau 100-1000 µl	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Pipettenspitzen, gelb 5-100 µl	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Pipettenspitzen, kristall 0,5-10 µl	Biozym, Oldendorf
6-Well-Platten	TPP, Schweiz
24-Well-Platten	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Solingen
Zellkulturschalen	Greiner bio-one, Solingen
Zellschaber	Greiner bio-one, Solingen
Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one, Solingen
2.1.2 Verwendete Geräte	
Brutschrank	Forma Series II Water Jacketed CO <sub>2</sub> - Incubatio Hepa Class 100
Dot Blot	ChemiDoc-It Imaging System, UPV
PCR	PTC-200 Peltier Thermal Cycler Mastercycler gradient Eppendorf
Real Time PCR	PTC-200 DNA Engine Cycler CDF-3200 Opticon 2 Detector MJ

## Materialien und Methoden

Real Time PCR-Software

Speed Vac

Spektrometer

Sterilbank

Opticon Monitor 2 MJ Research

Genevac SF50, Biometra

Ultrospec 3300pro Amersham

Bioscience, NJ, USA

Thermo electron corporation Holton

Lamin Air

### 2.1.3 Chemikalien

Agarose

Amphotericin B

Annexin-V Assay

Aquatex

Avidin/Biotin Blocking Kit

biotinylierter Zweitantikörper

Biotrak ELISA System

Caspase-Glo 3/7 Assay

Chlorophorm

DEPC (Diethylpyrocarbonat)

DNA Ladder (100 bp)

10nM dNTPs

0,1 M DTT (1,4 Dithiothreitol)

EDTA

Ethanol (99,8%)

Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Entwickler-6 Fixierlösung

(GBX Developer&Fixer Twin Pack)

Fetales Kälberserum (FCS)

5x First Strand Buffer

Gentamycin

Isopropanol

Medium: DMEM/HAM's F12

$\beta$ -Mercaptoethanol

Methanol (100%)

50mM MgCl<sub>2</sub>

Biozym, Oldendorf

Biochrom, Berlin

Biovision, CA, USA

Merck KGaA, Darmstadt

DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

Amersham Biosciences, NJ, USA

Promega, Mannheim

Merck KGaA, Darmstadt

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Taufkirchen

Promega, WI, USA

Fermentas, St. Leon-Rot

Invitrogen, Karlsruhe

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe

Gibco Life Technologies GmbH,

Eggenstein

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Taufkirchen

Biochrom, Berlin

Invitrogen, Karlsruhe

Biochrom, Berlin

Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe

Biochrom, Berlin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,

Taufkirchen

Merck KGaA, Darmstadt

Invitrogen, Karlsruhe

## Materialien und Methoden

0,9% NaCl	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
10xPCR Rxn Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Platinum SYBR-Green qPCR SuperMix	Invitrogen, Karlsruhe
RevertAidReverseTranscriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-Free Water	Promega, Mannheim
RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
RQ1 DNase 10xReaktion-Buffer	Promega, Mannheim
RQ1 DNase Stop-Solution	Promega, Mannheim
RQ1 RNase-Free DNase (1 Unit/ $\mu$ l)	Promega, Mannheim
Sekundärantikörper	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Strept ABCComplex/HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
Taq DNA Polymerase (5 Units/ $\mu$ l) Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Xylol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe

### 2.1.4 Lösungen

TBS-Stammlösung	6,1 g TRIS (Trishydroxymethylamino- methan) in 50 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen, 37 ml einer 1N HCl-Lösung hinzu- fügen, auf 1 L mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen, pH- Wert auf 7,6 (+/-0,2) einstellen
TBS-Gebrauchslösung	100 ml TBS-Stammlösung und 900 ml 0,85%ige NaCl-Lösung gut mischen, pH- Wert auf 7,3 einstellen
TBS/TBS-T für 10000 ml	8 g NaCl+0,2 g KCl+3 g TRIS mischen, pH-Wert auf 7,4 mit HCl-Lösung einstel- len, mit Reinstwasser auf 1000 ml auffül- len, für TBS-T 1 ml Tween dazugeben

PBS	0,4 g KCl, 8 g NaCl, 0,3 g NaHCO <sub>3</sub> , 1g Glucose, 0,2 g EDTA in 1 L H <sub>2</sub> O dest. lösen, steril filtrieren und autoklavieren
-----	---

## 2.2 Zellbiologische Methoden: Zellkultur

### 2.2.1 Chondrozytenzelllinie C28/I2

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Chondrozytenzelllinie C28/I2 verwendet. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte humane Rippenknorpelzelllinie, die aus dem Rippenbogen eines 15jährigen Mädchens stammt und zwecks einer Immortalisierung mit dem Simian Virus 40 (SV40) transfiziert wurde (Goldring et al., 1994). Rippenknorpel gehört wie Gelenkknorpel zu den hyalinen Knorpeln. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau Prof. Mary Goldring, Hospital for Special Surgery, New York, NY, USA zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2 Primäre Chondrozyten

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wird Gelenkknorpel, der Patienten mit fortgeschrittener Arthrose im Rahmen eines Gelenkersatzes oder –teilersatzes entnommen wird, zur Verfügung gestellt. Der Knorpel stammt aus makroskopisch gesund erscheinenden Arealen des Tibiaplateaus oder der Femurkondylen und wird für die Zellkultur umgehend postoperativ aufbereitet. Die Untersuchungen erfolgen nach Zustimmung der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

### 2.2.3 Knorpelgewebe

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg werden drei Patienten (weiblich, 57 Jahre; weiblich, 80 Jahre; männlich, 67 Jahre) mit fortgeschrittener Arthrose Knorpelstanzen aus dem Tibiaplateau oder den Femurkondylen im Rahmen eines Gelenkersatzes oder –teilersatzes entnommen und umgehend postoperativ mit Stimulantien behandelt.

Aus dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wird „gesunder“ Gelenkknorpel verwendet. Mit einer Knorpelstanze werden Knorpelstanzen von drei verschiedenen Personen (männlich, 40 Jahre; männlich, 34 Jahre; männlich, 37 Jahre) entnommen, die zum Zeitpunkt des Todes nicht älter als 40 Jahre waren. Der Gelenkknorpel zeigt makroskopisch keine degenerativen Veränderungen.

#### 2.2.4 Synoviozytenzelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden zwei immortalisierte humane Synoviozytenzelllinien verwendet. Die Synoviozytenzelllinie K4IM stammt aus der Membrana synovialis eines gesunden Spenders und wurde mit dem SV40 T-Antigen (TAg) immortalisiert (Haas et al., 1997), die Synoviozytenzelllinie HSE wurde aus der Membrana synovialis einer 24jährigen Patientin mit rheumatoider Arthritis gewonnen und ebenso mit dem SV40 T-Antigen (TAg) immortalisiert (Aicher et al., 1999). Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Thomas Pufe, Institut für Anatomie II, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.5 Primäre Synoviozyten

Außerdem werden primäre Synoviozyten untersucht, die aus der im Rahmen einer Synovektomie entnommenen Membrana synovialis eines Patienten (männlich, 15 Jahre) mit juveniler rheumatoider Arthritis gewonnen wurden. Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Dagmar Riemann, Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.6 Synovialgewebe

Ebenfalls von Frau PD Dr. Riemann, Institut für Medizinische Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wurde Membrana synovialis sechs verschiedener Patienten mit rheumatoider Arthritis (weiblich, 73 Jahre; weiblich, 72 Jahre) und deren juveniler Form (männlich, 15 Jahre; weiblich, 27 Jahre; weiblich, 11 Jahre; weiblich, 9 Jahre) zur Verfügung gestellt, die den Patienten im Rahmen einer Synovektomie entnommen wurde.

Außerdem stehen Gewebeproben gesunder Membrana synovialis zur Verfügung, die im Rahmen der von Paulsen et al. 2002 publizierten Ergebnisse während klinisch indizierter Arthroskopien entnommen wurden.

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg wird Membrana synovialis von drei Patienten (männlich, 69 Jahre; weiblich, 59 Jahre; weiblich, 67 Jahre) mit fortgeschrittener Arthrose zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.7 Gewebeschnitte aus Kniegelenken von STR/Ort-Mäusen

STR/Ort-Mäuse sind genetisch prädisponiert, frühzeitig (in weniger als 6 Monaten) arthroseähnliche Läsionen am Gelenkknorpel auszubilden und dienen so als Modell zur Untersuchung von Arthrose (Mason et. al, 2001).

Für immunhistochemische Untersuchungen stehen Gewebeschnitte von Kniegelenken von STR/Ort-Mäusen verschiedener Altersstufen zur Verfügung, die sich in verschiedenen Arth-

rosestadien befinden (Tab. 1). Die Schnitte wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Müller-Hilke, Institut für Immunologie, Universität Rostock zur Verfügung gestellt.

**Tab.1** Arthrosegrade von STR/Ort-Mäusen

Arthrosegrad	Alter, Geschlecht	Merkmale
0	4 Monate, weiblich	keine morphologischen Veränderungen
1	9 Monate, weiblich	Knorpel verschmälert (Gelenkspaltverbreiterung)
2	10 Monate, männlich	subchondrale Sklerose, Knorpelusura
3	12 Monate, männlich	Zystenbildung, Knorpelaufbrauch, Knochenabschliff, Osteophytenbildung

#### 2.2.8 Gewebeschnitte aus Kniegelenken von Balb-c-Mäusen

Als Modell zur Untersuchung einer septischen Arthritis stehen im Rahmen der vorliegenden Arbeit Gewebeschnitte aus Kniegelenken von Balb-c-Mäusen zur Verfügung.

Anästhesierten Balb-c-Mäusen wurden 10 µl einer 10<sup>7</sup> colony-forming units *Staphylococcus aureus*/ml enthaltenden Suspension in das Kniegelenk injiziert. Nach 6 h erfolgte die Entnahme der Kniegelenke und die Aufbereitung für immunhistochemische Untersuchungen. Hierzu wurden die Kniegelenke von anhaftender Haut befreit und für eine Woche in 4% Formaldehyd fixiert. Es folgt die schonende Knochenentkalkung in 10% EDTA. Nach vollständiger Entkalkung (röntgenologische Kontrolle) werden die Gelenke in Paraffin eingebettet. Die Herstellung der Präparate erfolgte im Rahmen der von Varoga et al. 2005 publizierten Untersuchungen.

Die Gewebeschnitte werden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Deike Varoga, Klinik für Unfallchirurgie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.9 Medien und Kultivierung

- Medium: DMEM/HAM's F12 (PAA, Pasching, Austria)
- Zusatz: fetales Kälberserum (FCS)
- phosphatgepufferte Saline (PBS)
- 0,25%ige Trypsin/EDTA-Lösung

Die Zelllinien und Primärzellen werden in Zellkulturflaschen oder -schalen als Monolayer kultiviert. Dem Medium werden 10% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Das Medium für

die primären Chondrozyten enthält zusätzlich noch jeweils 1% Gentamicin und Amphotericin und das Medium für die Synoviozytenzelllinien 1% Penicillin.

### 2.2.10 Stimulationsversuche

Um den Einfluss bestimmter biochemischer Reize zu untersuchen, werden die verschiedenen Zellen mit unterschiedlichen Substanzen stimuliert. Dazu werden sie zunächst 3 h in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit dem jeweiligen Stimulans, gelöst in serumfreiem Medium, inkubiert. Eine unstimulierte Kontrolle wird stets mitgeführt.

### 2.2.11 Herstellung von Bakterienüberständen

Der *Pseudomonas aeruginosa* - Stamm PA01 (ATCC 15692) und der *Staphylococcus aureus* - Stamm SA 113 (ATCC 35556) werden über Nacht bei 37°C in mit Tripton angereicherter Sojabrühre kultiviert (Oxoid, Basingstoke, England). Danach werden die Bakterienlösungen zusammen mit 10% Schafsblut (Heipha, Eppelheim) auf Columbia-Agar bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Bakterien werden ausgezählt, auf  $5 \times 10^7$  CFU/ml angeglichen und zweimal bei 6000 rpm für 30 min zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände zweimal mit bakterienundurchlässigen Filtern (0,22 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) filtriert. Durch Inkubation auf Agar wird die Sterilität von Aliquots der Überstände überprüft (Paulsen et al., 2008).

## 2.3 RNA-Isolation

### 2.3.1 aus Zellen (Chloroform-Phenol-Extraktion)

Um RNA aus den Knorpel- und Synovialiszellen zu gewinnen, wird 1 ml Trizol (Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat) pro Zellkulturflasche direkt auf die Zellen gegeben, nachdem das Medium abgenommen wurde. Trizol löst die Zellen von der Flaschenoberfläche und nimmt sie in sich auf. Das Gemisch wird bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen werden 200 µl Chloroform hinzugeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Dabei kommt es zu einer Phasentrennung. Die obere, klare Phase wird abgenommen, in ein gekühltes Eppendorftube überführt und mit der gleichen Menge Isopropanol (-20°C) versetzt. Nach gründlichem Mischen erfolgt 10 min lang die Fällung der RNA bei Raumtemperatur. Anschließend wird 10 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die in der Probe enthaltene DNA wird nun durch DNase-Verdau eliminiert. Das Kit mit dem Enzym und den anderen benötigten Lösungen stammt von der Firma Promega. Pro 1 µg eingesetzter RNA-Lösung wird 1 µl (entspricht 1 U) DNase zugegeben. Außerdem wer-



den jeder Probe 6 µl einer 10 fachen DNase-Pufferlösung und 2 µl RNase-Inhibitorlösung beigemischt. Anschließend wird die Probe zuerst 30 min bei 37°C und dann nach Zugabe von 6 µl einer Lösung zur Inaktivierung der DNase 10 min bei 65°C inkubiert. Zur Fällung der DNA werden 6 µl Na-Acetat [3 M] und 200 µl Isopropanol zugegeben und die Probe anschließend 30 min bei -20°C inkubiert und dann 30 min bei 10.000 U/min zentrifugiert.

Das Pellet wird zweimal mit kaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Anschließend wird es in einer Vakuumpumpe bei Raumtemperatur getrocknet und dann in 30 µl DEPC-Wasser bei 70°C gelöst.

Die Konzentrationsmessung erfolgt photometrisch. Dazu wird 1 µl der RNA-Lösung mit 99 µl DEPC-Wasser gemischt und die Lösung am Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm vermessen. Ein Verhältnis von über 1,7 der beiden Zahlenwerte deutet auf eine gute Präparation hin.

### 2.3.2 aus Gewebe nach dem RNeasy Mini Protokoll (Quiagen)

Zur RNA-Isolierung aus Gewebe wird das RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit der Firma Quiagen eingesetzt. Das Knorpel- und Synovialgewebe wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Proben bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Da sich Gewebe nur schwach oder gar nicht in herkömmlichen Geräten homogenisieren lässt, muss es zuerst unter Stickstoffkühlung in einem Archatmörser pulverisiert werden. Die zu verarbeitenden Proben werden aus -80°C in flüssigen Stickstoff überführt. Auch Mörser und Stößel werden kurz im Stickstoff vorgekühlt. Die Gewebeprobe wird im Mörser zerstoßen und dann mit einem kleinen Spatel in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt.

Dem Pulver wird nun RLT-Puffer (10 µl Mercaptoethanol/1 ml RLT) beigemischt, wobei für eine Menge von ca. 30 mg Gewebe 350 µl RLT benötigt werden. Anschließend wird das Gemisch im Ultrathurax zerkleinert und 3 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und mit 350 µl Ethanol vermischt. Die Probe wird nun auf eine RNeasy-Minisäule gegeben und 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und anschließend werden 10 µl DNase in 70 µl RDD-Puffer auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 350 µl RW1-Puffer zugefügt und die Probe 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die RNeasy-Minisäule wird in ein neues Sammel-Gefäß gegeben und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nachdem die Säule wiederum in ein neues Sammel-Tube gegeben wurde, werden 30 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt und anschließend 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Zuletzt erfolgt die photometrische Konzentrationsbestimmung wie bereits bei der Chloroform-Phenol-Extraktion beschrieben (2.3.1).

## 2.4 Reverse Transkription

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wird das RevertAidReverseTranscriptase-Kit von Fermentas eingesetzt.

Der Reaktionsansatz sieht dabei folgendermaßen aus (Tab. 2):

**Tab.2** Standardprotokoll Reverse Transkription

	Volumen
2 µg RNA	X µl
Primer OligoT	1 µl
DEPC- H <sub>2</sub> O	11 µl-x µl
Gesamtvolumen	12 µl

Dieser Ansatz wird 5 min bei 70°C denaturiert und zum Abkühlen auf Eis gestellt. Anschließend werden je 8 µl des Mastermixes (Tab. 3) zu jedem Ansatz hinzugegeben.

**Tab.3** Zusammensetzung Mastermix

	Volumen
5 x Puffer	4 µl
0,1M DTT	2 µl
10mM dNTPs	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8 µl</b>

Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit 20 µl DEPC-Wasser aufgefüllt. Mit der eingesetzten Menge an RNA und der Geschwindigkeit des Enzyms lässt sich eine Endkonzentration von 1 µg/ml cDNA angeben.

## 2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction=PCR) ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann. Durch eine hitzestabile Polymerase können mehrere Zyklen aus Aufschmelzen (Denaturierung) des DNA-Doppelstrangs, Anlagerung (Annealing) sequenzspezifischer Oligonukleotide mit einem freien 3' OH-Ende (Primer) an die Ausgangs-DNA (Template) und Synthese des komplementären Strangs (Elongation) nacheinander ablaufen. Am Ende jedes Zyklus ist die DNA-Menge (nahezu) verdoppelt worden. Das PCR-Produkt kann durch Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit werden je 1 µg cDNA mit folgendem Reaktionsansatz inkubiert (Tab. 4):

**Tab.4** Reaktionsansatz PCR

	Volumen
cDNA	2 µl
Primer Mix	0,6 µl
10mM dNDPs	0,6 µl
10 x Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	3 µl
50mM MgCl <sub>2</sub>	0,9 µl
RNAse-freies H <sub>2</sub> O	22,72 µl
Taq-Polymerase	0,18 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30 µl</b>

Das Kit für die PCR stammt von der Firma Invitrogen.

Es wird ein PCR-Programm mit 40 Reaktionszyklen angewendet, die einzelnen Reaktionsschritte sind wie folgt festgelegt (Tab. 5):

**Tab.5** Reaktionsschritte PCR

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 °C	40 sec
2	Annealing	56 °C	40 sec
3	Elongation	72 °C	40 sec
	40 Zyklen Schritt 1-3		

Für die PCR werden folgende Primer verwendet (Tab. 6):

**Tab.6** Primer PCR

Primer		Sequenz	Produktgröße
Aktin	sense	5' -- CAA CAG ATG GCC ACG GCT GCT – 3'	275 bp
	antisense	5' – TCC TTC TGC ATC CTG TGC GCA – 3'	
TFF3	sense	5' – CTG CCA GCC AAG GAC AG – 3'	303 bp
	antisense	5' – CGT TAA GAC ATC AGG CTC CAG – 3'	

## 2.6 Real-time RT-PCR

Die real-time-PCR ermöglicht es, während der PCR-Reaktion kontinuierlich die gebildete Produktmenge zu verfolgen. Der dem Ansatz beigefügte Farbstoff SYBR®-Green interkaliert spezifisch in doppelsträngige DNA und hat so gebunden eine höhere Fluoreszenzintensität als im freien Zustand. Die Fluoreszenzintensität wird zum Ende jedes Elongationsschritts gemessen. Interessant ist der CT-Wert (Threshold-Cycle), an dem das Fluoreszenzsignal signifikant höher liegt als der Fluoreszenzhintergrund. Er befindet sich im exponentiellen Teil der Amplifikation und wird umso schneller erreicht, je mehr template-DNA sich im Ansatz befindet. Nach Beendigung der Reaktion wird durch schrittweises Erhöhen der Temperatur und der gleichzeitigen Messung der Fluoreszenzintensität eine Schmelzkurve angelegt, in deren ersten Ableitung ein reines Produkt als Peak detektiert wird. Primer-Dimere ergeben flache Peaks bei niedrigen Temperaturen.

Die erhaltenen Werte müssen für die Quantifizierung mit den Werten eines mitgeführten internen Standards, z. B. den Werten von Referenzgenen (Housekeeping-Gene wie  $\beta$ -Aktin oder 18s rRNA) in Relation gesetzt werden.

Für die Real-time PCR werden nachfolgende Mengen eingesetzt (Tab. 7) und amplifiziert (Tab. 8). Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 gezeigt.

**Tab.7** Reaktionsansatz Real-time PCR

	Volumen
SYBR-Green qPCR Supermix	12,5 $\mu$ l
PCR- H <sub>2</sub> O	6,5 $\mu$ l
Primermix	1 $\mu$ l
cDNA (Verdünnung 1:200)	5 $\mu$ l
Gesamtvolumen	25 $\mu$ l

**Tab.8** Amplifikationsschritte

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	30 sec
2	Annealing	primerspezifisch	45 sec
3	Elongation	72°C	15 sec
		40 Zyklen, Schritt 1-3	
	Schmelzkurve	55°C-95°C	1 sec jeweils 0,5°C

**Tab.9** Primer Real-time PCR

Primer		Sequenz	Produktgröße
18S-rRNA	sense	5'-ACTCAACACGGGAAACCTCACC-3'	111 bp
	antisense	5'-CAAGAGATGGCCACGGCTGCT-3'	
TFF3	sense	5' – AAT GCA CCT TCT GAG GCA CCT – 3'	172 bp
	antisense	5' – CGT TAA GAC ATC AGG CTC CAG AT – 3'	
TFF3	sense	5' – AAT GCA CCT TCT GAG GCA CCT – 3'	172 bp
	antisense	5' – CGT TAA GAC ATC AGG CTC CAG AT – 3'	
TFF3	sense	5' – CTG CAG TGC CTT CGT GTT TC – 3'	230 bp
	antisense	3' – GGA GCA TGG GAC CTT TAT TC – 3'	
TFF3	sense	5' – AGA GAA CAG CAG CCA CAG C – 3'	232 bp
	antisense	5' – TTT GCA GAC AGG CCC ACG TAC – 3'	
TFF3	sense	5' – CTT GCT GTC CAG CTC T – 3'	123 bp
	antisense	5' – CCG GTT GTT GCA CTC CTT – 3'	
TFF3	sense	5' – TGC TGC TTT GAC TCC AGG ATC – 3'	236 bp
	antisense	5' – ATT CGT TAA GAC ATC AGG CTC CAG – 3'	
TFF3	sense	5' – CCT TGC CCG GCT GTG A – 3'	64 bp
	antisense	5' – CGG GAG CAA AGG GAC AGA A – 3'	

## 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Proben werden im Anschluss an die Reaktion in einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Gel wird 1 µl pro 100 ml Gel an Ethidiumbromid zur Detektion zugesetzt. Der Gellauf erfolgt in TAE-Puffer bei einer Spannung von ca. 1,5 V/cm<sup>2</sup>. Die Banden werden dann durch Fluoreszenz bei 366 nm auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit Hilfe der Herolab. E.A.S.Y. 429K Photo-Dokumentationsanlage digital abgespeichert und ausgedruckt.

## 2.8 Dot Blot

Bei dieser Methode werden für einen spezifischen Nachweis Proteinproben punktförmig auf eine Membran gesaugt. Dazu wird ein Dot-Blotter mit kleinen Löchern eingesetzt, der mit einer Saugpumpe in Verbindung steht.

### 2.8.1 Dot Blot mit Hybond ECL-Membran

Die Nitrocellulosemembran wird zuerst 15 min in TBS-T äquilibriert und dann in die Vakuum-Apparatur (Biometra, Deutschland) eingelegt; die Titerplatte darüber wird mit Schrauben fixiert. Nachdem ein schwaches Vakuum von ca. -50 mbar angelegt wurde, wird die Membran zweimal mit TBS-T gewaschen. Nun werden unter ausgeschaltetem Vakuum jeweils 250 µl der Proben in die einzelnen Slots pipettiert.

Für den Dot Blot werden Mediumüberstände der Zellkulturen benutzt. Sie werden nach dem jeweiligen Stimulationsexperiment abgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die benötigte Menge wird nach dem Auftauen abgenommen, zur Abtrennung von Zellen und Zellbestandteilen 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und erst dann in die Slots aufgetragen.

Nachdem die Proteine der Proben in die Membran gesaugt wurden, wird die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und für 1 h in Blockierungslösung (5% Milchpulver/TBS-T) bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wird die Membran bei 4°C über Nacht in 2 ml Antikörperlösung (rabbit anti-r-TFF3, Verdünnung 1:200 in Blockierungslösung) inkubiert. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Werner Hoffmann, Institut für Molekularbiologie und medizinische Chemie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Verfügung gestellt.

Danach wird die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und 2 h mit dem Sekundärantikörper (goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Verdünnung 1:8000 in Blockierungslösung) inkubiert. Anschließend wird die Membran wiederum dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS gewaschen und für 5 min in 2 ml Chemilumineszenzlösung (je 1 ml Lösung A und B) inkubiert.

Die Detektion der Dots auf der Membran erfolgt durch Chemilumineszenz (Chemilumineszenz-Kit der Firma Santa Cruz Biotechnology). Der Sekundärantikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) konjugiert, die eine Reaktion katalysiert, in der Luminol aus der Chemilumineszenzlösung umgesetzt wird und dabei Licht abstrahlt. Dieses Licht schwärzt einen Fotofilm an denjenigen Stellen, an denen der Sekundärantikörper gebunden hat.

Die Auswertung erfolgt an einem Geldokumentationsgerät der Firma UVP, mit dem es möglich ist, die Intensität der Spots untereinander zu vergleichen. Die Ergebnisse werden grafisch aufgetragen.

### 2.8.2 Dot Blot mit Milipore Immobilon-P Membran

Die PVDF-Membran wird erst 15 sec mit 100%igem Methanol benetzt, 2 min in destilliertes Wasser getaucht und dann 10 min in TBS-T äquilibriert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-T werden jeweils 200 µl der Proben in die Slots aufgetragen.

Nachdem die Proteine der Proben in die Membran gesaugt wurden, wird die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen, 10 sec in Methanol getaucht und anschließend 15 min auf Filterpapier getrocknet.

Die getrocknete Membran wird nun 1 h bei Raumtemperatur in 4 ml Antikörperlösung (rabbit anti-r-TTF3, Verdünnung 1:500 in 5% Milchpulver/TBS-T) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wird 30 min bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Verdünnung 1:8000 in Blockierungslösung) inkubiert.

Der weitere Ablauf entspricht dem des Dot Blots mit Nitrocellulosemembran (2.8.1).

### **2.9 Immunhistochemie an Gewebe**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden Gewebeschnitte aus Kniegelenken von STR/Ort-Mäusen und Balb-c-Mäusen für immunhistochemische Untersuchungen verwendet. Weiterhin werden humane Gewebeproben gesunder und arthrotischer Membrana synovialis immunhistochemisch analysiert.

Nach Entparaffinierung der Gewebeschnitte mittels Xylol und anschließender Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte zum Inaktivieren der endogenen Peroxidasen für 30 min in 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert und anschließend zur Effizienzsteigerung der späteren Immunreaktion für 5 min bei 37°C mit 0,1%iger Trypsinlösung angedaut. Nach dreimaligem Spülen mit TBS werden die Schnitte für 20 min in Normalserum (Schweineserum, Verdünnung 1:5 mit TBS, DAKO Diagnostika GmbH) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzublocken. Anschließend werden die Schnitte für jeweils 10 min mit einer Avidin- und Biotinblockierungslösung inkubiert, um endogene Avidin- und Biotin-ähnliche Strukturen zu blockieren.

Nach dreimaligem Spülen in TBS wird der Primärantikörper (rabbit anti-r-TTF3, Verdünnung 1:50 – 1:100 in TBS) aufgetragen und über Nacht im Kühlschrank bei ca. 4°C inkubiert. Auf einem Objektträger sind jeweils zwei Schnitte aufgebracht. Ein Schnitt dient als Negativkontrolle; der andere wird mit dem Primärantikörper inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Schnitte dreimal mit TBS gewaschen und anschließend eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (swine anti-rabbit, DAKO Diagnostika GmbH, Verdünnung 1:300 in TBS) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit TBS werden die Schnitte 30 min mit einer Lösung inkubiert, die einen mit dem Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelten Streptavidinkomplex (AB-HRP-Komplex) enthält. Streptavidin bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers und die Peroxidase katalysiert eine Reaktion, bei der ein Substrat oxidativ in einen sichtbaren roten Farbstoff umgewandelt wird. Die Substratlösung (AEC Chromogen, DAKO Diagnostika GmbH) wird dann auf die Schnitte aufgetragen, bis ein roter Farbumschlag sichtbar wird. Die Schnitte werden

anschließend dreimal mit Aqua dest. gespült und für 3 min in Hämalaun nach Meyer gegengefärbt. Dabei werden die Zellkerne blau angefärbt.

Nach wiederholtem Spülen in Wasser werden die Schnitte mit Aquatex, einem alkoholfreien Medium, eingedeckt.

## **2.10 Immunhistochemie an Zellkulturen**

Für die immunhistochemische Untersuchung werden die primären Chondrozyten in 6-well-Platten auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Nachdem sie zu 80% konfluent sind, wird das serumhaltige durch serumfreies Medium ersetzt. Nach 3 h werden die Zellen stimuliert.

Nach Ablauf der Stimulationszeit werden die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in TBS auf den Deckgläschen fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit TBS werden die Zellen für 30 min in einer Glycinlösung (1g/100ml) inkubiert.

Im Anschluss werden die Deckgläschen für 30 min mit Normalserum (Schweineserum, DAKO Diagnostika GmbH) überschichtet. Nach Auftragen der Avidin- und Biotinblockierungslösung wird der Primärantikörper (rabbit anti-r-TFF3, Verdünnung 1:100 in TBS) auf die Deckgläschen aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden der Sekundärantikörper (swine anti-rabbit, DAKO Diagnostika GmbH, Verdünnung 1:300 in TBS), der AB-HPR-Komplex und das Substrat aufgetragen. Anschließend wird mit Hämalaun nach P. Meyer gegengefärbt und die Deckgläschen mit Aquatex auf einen Objektträger gebracht.

## **2.11 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

An den Gewebeschnitten der STR/Ort-Mäuse wird eine HE-Färbung durchgeführt. Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, die eine morphologische Beurteilung des Präparats ermöglicht. Der Ablauf der HE-Färbung ähnelt zunächst dem der Immunhistochemie. Auch hier werden die Gewebeschnitte mittels Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Danach werden die Objektträger für 3 min in Hämalaun nach P. Meyer getaucht und anschließend für 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Der basische Farbstoff im Hämalaun lagert sich an die sauren Phosphatgruppen der DNA an und färbt somit Zellkerne blau. Anschließend werden die Gewebeschnitte für 3 min in Eosin getaucht und dann der ungebundene Farbstoff mit Aqua dest. ausgespült. Der saure Farbstoff Eosin reagiert mit basischen Bestandteilen im Zytoplasma und färbt diese orange bis rot. Um die Gewebeschnitte zu konservieren, werden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60-98%ige Ethanol, Propanol, Xylol) dehydriert und anschließend mit Deckgläschen eingedeckt.



## 2.12 Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

Der ELISA ist eine immunologische Methode, die auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Durch spezifische Antikörper, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden, können Proteine und andere Verbindungen nachgewiesen werden. Die Antikörper sind mit einem Enzym markiert; die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

Als Proben werden Zellüberstände von Knorpelstanzen und Zellen benutzt, die mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem TFF3 stimuliert wurden. Eine unbehandelte Kontrolle wird mitgeführt. Außerdem werden definierte Standards mitgeführt, mit deren Hilfe man die Antigen-Konzentration in den Proben bestimmen kann.

Die verwendeten ELISAs werden von der Firma Amersham Biosciences hergestellt und basieren auf der „Sandwich“-Technik, bei der zwei Antikörper zum Einsatz kommen, die beide spezifisch an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden. Der erste Antikörper (coating-Antikörper) ist an eine feste Phase, genauer an eine 96-Well-Mikrotiterplatte, gebunden. Jeweils 100 µl der Proben und Standards werden in den Wells inkubiert, wobei der an die Platte gebundene Antikörper an das in der Probe vorhandene Antigen bindet. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen, wodurch die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt werden und nur das am (coating)-Antikörper gebundene Antigen zurückbleibt. Im nächsten Schritt werden 100 µl eines Detektions-Antikörpers zugegeben, an dessen Ende das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) gebunden ist. Der zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper entfernt. Zur Bestimmung der Menge an Peroxidase, die an die Platte gebunden hat, werden die Proben mit 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) -Substrat auf dem Mikroplattenschüttler inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 450 nm an einem Mikroplatten-Spectrophotometer bestimmt, wobei die Intensität der Farbe proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Antigens ist. Die Konzentration des Antigens in den Proben wird durch die mitgeführten Standards und eine spezielle Auswertungssoftware bestimmt.

Die Inkubationszeiten und -temperaturen und die Verdünnungen der Proben variieren in den verschiedenen ELISAs.

MMP-1: Verdünnung der Proben 1:5 mit Assay-Puffer

Standards: 6,25-100 ng/ml MMP-1

1. 2 h Inkubation mit mouse anti-MMP-1 bei Raumtemperatur
2. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
3. 2 h Inkubation mit rabbit anti-MMP-1 bei Raumtemperatur

## Materialien und Methoden

4. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
5. 1 h Inkubation mit donkey anti-rabbit Horseradish Peroxidase bei Raumtemperatur
6. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
7. 30 Minuten Inkubation mit TMB-Substrat bei Raumtemperatur

MMP-3: Verdünnung der Proben 1:5 mit Assay-Puffer

Standards: 3,75-120 ng/ml MMP-3

1. 1 h Inkubation mit anti-MMP-3 bei 4 °C
2. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
3. 2 h Inkubation mit anti-MMP-3 Horseradish Peroxidase bei 4 °C
4. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
5. 30 Minuten Inkubation mit TMB-Substrat bei Raumtemperatur

MMP-9: Verdünnung der Proben 1:10 mit Assay-Puffer

Standards: 4-128 ng/ml MMP-9

1. 1 h Inkubation mit anti-MMP-9 bei Raumtemperatur
2. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
3. 2 h Inkubation mit anti-MMP-9 Horseradish Peroxidase bei Raumtemperatur
4. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
5. 20 min Inkubation mit TMB-Substrat bei Raumtemperatur

MMP-13: Verdünnung der Proben 1:10 mit Assay-Puffer

Standards: 0,094-3 ng/ml MMP-13

1. 2 h Inkubation mit anti-MMP bei Raumtemperatur
2. 1 h Inkubation mit anti-MMP-13 Horseradish Peroxidase bei Raumtemperatur
3. 30 min Inkubation mit TMB-Substrat bei Raumtemperatur

TIMP-1: Verdünnung der Proben 1:10 mit Assay-Puffer

Standards: 3,13-50 ng/ml TIMP-1

1. 2 h Inkubation mit anti-TIMP-1 bei Raumtemperatur
2. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
3. 2 h Inkubation mit anti-TIMP-1 Horseradish Peroxidase bei Raumtemperatur
4. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer

5. 30 min Inkubation mit TMB-Substrat bei Raumtemperatur

TIMP-2: Verdünnung der Proben 1:5 mit Assay-Puffer

Standards: 8-128 ng/ml TIMP-2

1. 2 h Inkubation mit anti-TIMP-2 und anti-TIMP-2 Horseradish Peroxidase bei Raumtemperatur
2. viermaliges Waschen mit Wasch-Puffer
3. 30 min Inkubation mit TMB-Substrat bei Raumtemperatur

Die statistische Auswertung der ELISAs erfolgte mit einem ELISA Reader mittels SPSS-Version 8.0 for Windows, Illinois (USA).

### **2.13 Caspase-3/7 Assay**

Die für den Assay benötigten Substanzen sind im Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay-Kit der Firma Promega enthalten, mit dem man die Aktivitäten der Caspasen 3 und 7 messen kann, die eine Schlüsselrolle in der Apoptoseinduktion einer Zelle spielen. Der Assay dient also der Detektion des apoptotischen Zelltods.

Der Assay enthält das nicht-fluoreszierende Caspase-Substrat Z-DEVD-R110, das durch die Aktivität der Caspase-3/7 zum fluoreszierenden Rhodamin 110 gespalten wird. Die entstandene Fluoreszenz kann im Fluorometer quantifiziert werden und ist der Menge der Caspase-3/7-Spaltungsaktivität in der Probe proportional.

Dazu werden die Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nachdem sie zu 60% konfluent sind, wird das serumhaltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach 3 h im serumfreien Medium werden die Zellen für 24 h stimuliert. Zu einem Teil der Zellen wird außerdem 4h nach Stimulationsbeginn rekombinantes TFF3 hinzugefügt.

Nach Ablauf der Stimulationszeit wird dem Medium die gleiche Menge an Caspase-3/7 Reagenz, bestehend aus Caspase-Substrat und –Puffer, hinzugefügt. Die Platte wird zuerst 15 min auf dem Mikroplattenschüttler und dann bei 37°C inkubiert. Innerhalb der nächsten 18 h wird die Fluoreszenz der einzelnen Wells mehrmals im Fluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen, um die maximale Caspase-Aktivität zu bestimmen.

### **2.14 Annexin-V Assay**

Die für diesen Assay benötigten Substanzen sind im Kit für den Annexin-V Assay der Firma Biovision enthalten.

Mit Hilfe von FITC-konjugiertem Annexin-V kann der apoptotische Zelltod detektiert werden. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, das auf der Außenseite der Plasmamembran apop-

totischer Zellen exprimiert wird. Durch Kopplung von Annexin-V an den Fluoreszenzfarbstoff FITC können die apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Nekrotische Zellen, deren Zellmembran ihre Integrität verloren hat, werden mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid detektiert.

Die Zellen werden in 12-well-Platten ausgesät. Nachdem sie zu 80% konfluent sind, wird das serumhaltige Medium durch serumfreies Medium ersetzt. Nach 3 h im serumfreien Medium werden die Zellen für 24 h stimuliert. Zu einem Teil der Zellen wird außerdem 4 h nach Stimulationsbeginn rekombinantes TFF3 hinzugefügt.

Nach Beendigung der Stimulationszeit werden die Zellen mit Trypsinlösung abgelöst, in 500 µl Bindungspuffer resuspendiert und anschließend 5 min mit jeweils einem µl Annexin-V-FITC und Propidiumiodid bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellen werden anschließend in einem Durchflusszytometer (FACS) analysiert.

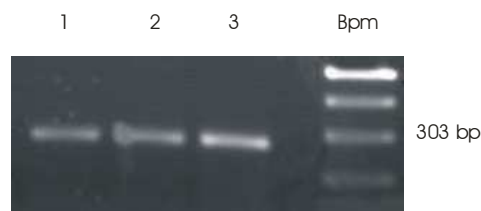
Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften, die die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Suspension auf Einzellebene erlaubt. Durch die Färbung der Zellen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen und durch das Setzen eines „Filters“ werden nur solche Zellen erfasst, die in ihren Streulichteigenschaften einer bestimmten Zellart zugeordnet sind (Gating). Somit können sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen erfasst werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 RT-PCR

##### 3.1.1 Humaner Gelenkknorpel

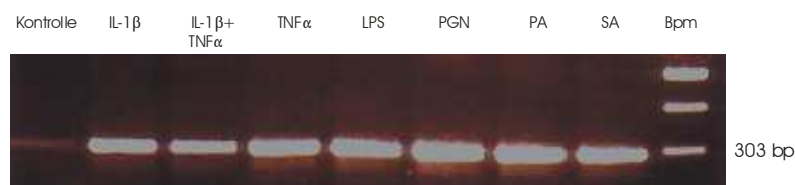
Aus gesundem und arthrotischem Gelenkknorpelgewebe wird mRNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Die mRNA für TFF3 ist nur in den untersuchten arthrotischen, nicht jedoch in den gesunden Gewebeproben nachweisbar (Abb. 5).



**Abb.5** RT-PCR. Analyse humanen arthrotischen Knorpelgewebes (Reihen 1 und 2) und einer Positivkontrolle aus dem Tränennasengang (Reihe 3). Bpm – Basenpaarmarker. Das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar. In gesundem Gelenkknorpel ist das TFF3-Produkt nicht nachweisbar (nicht dargestellt).

##### 3.1.2 Chondrozytenzelllinie C28/I2

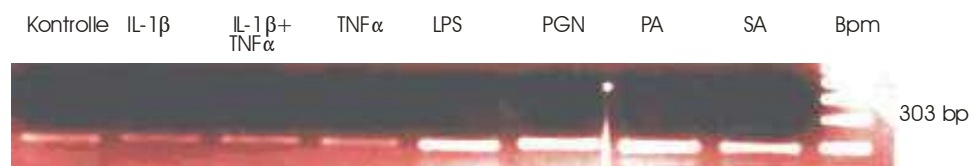
Die Chondrozytenzelllinie C28/I2 wird 24 h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (je 10 ng/ml), Lipopolysacchariden (LPS, 500 ng/ml), Peptidoglykanen (PGN, 10 ng/ml) sowie Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, 1:100) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, 1:15) stimuliert und nach RNA-Isolation mittels RT-PCR analysiert. In der unstimulierten Kontrolle ist eine schwache TFF3-Bande erkennbar; die TFF3-Banden der stimulierten Zellen zeigen deutlich sichtbare TFF3-Banden bei 303 bp (Abb. 6).



**Abb.6** RT-PCR. Analyse der Chondrozytenzelllinie C28/I2 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ , Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglykanen (PGN) und Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (PA) und *Staphylococcus aureus* (SA). Bpm - Basenpaarmarker. Das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar. Nach Stimulation mit den verschiedenen Substanzen zeigen sich deutlichere TFF3-Banden als in der unstimulierten Kontrolle.

### 3.1.3 Primäre Chondrozyten

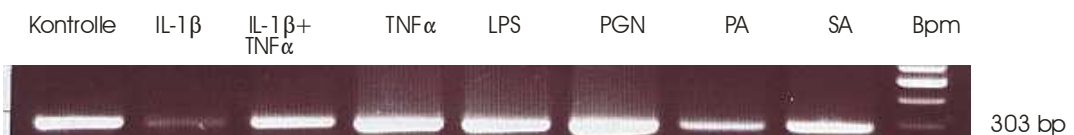
Primäre Chondrozyten, die von an Arthrose erkrankten Patienten stammen, werden 24 h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (je 10 ng/ml), Lipopolysacchariden (500 ng/ml), Peptidoglykanen (10 ng/ml), Überständen von *P. aeruginosa* (1:100) und *S. aureus* (1:15) stimuliert und nach RNA-Isolation mittels RT-PCR analysiert. In der unstimulierten Kontrolle sowie den über 24 h mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$  behandelten Zellen sind schwache TFF3-Banden erkennbar, 24h-Stimulation der Zellen mit LPS, PGN und Überständen von *P. aeruginosa* und *S. aureus* führen zu stärkeren TFF3-Banden (Abb. 7).



**Abb.7** RT-PCR. Analyse primärer Chondrozyten, die von an Arthrose erkrankten Patienten stammen, nach 24h-Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ , Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglykanen (PGN) und Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (PA) und *Staphylococcus aureus* (SA). Bpm – Basenpaarmarker. Das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar. Nach Stimulation mit LPS, PGN, PA und SA zeigen sich deutlichere TFF3-Banden als in den anderen Proben.

### 3.1.4 Synoviozytenzelllinie HSE

Die aus der Synovialmembran einer an rheumatoider Arthritis erkrankten Patientin generierte Synoviozytenzelllinie HSE wird 24 h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (je 10 ng/ml), LPS (500 ng/ml), PGN (10 ng/ml), Überständen von *P. aeruginosa* (1:100) und *S. aureus* (1:15) stimuliert und nach RNA-Isolation mittels RT-PCR analysiert. Sowohl in der unstimulierten Kontrolle als auch in allen stimulierten Zellen sind deutliche TFF3-Banden sichtbar (Abb. 8).



**Abb.8** RT-PCR. Analyse der Synoviozytenzelllinie HSE, die von einer an rheumatoider Arthritis erkrankten Patientin stammt, nach 24h-Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  +TNF $\alpha$ , Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglykanen (PGN) und Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (PA) und *Staphylococcus aureus* (SA). Bpm – Basenpaarmarker. Das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar. Sowohl in der unstimulierten Kontrolle als auch nach Stimulation mit den verschiedenen Substanzen sind deutliche TFF3-Banden sichtbar.

### 3.1.5 Synoviozytenzelllinie K4IM

Die aus der Synovialmembran gesunder Spender generierte Synoviozytenzelllinie K4IM wird 24 h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml), TNF $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (je 10 ng/ml), LPS (500 ng/ml), PGN (10 ng/ml), Überständen von *P. aeruginosa* (1:100) und *S. aureus* (1:15) stimuliert und nach RNA-Isolation mittels RT-PCR analysiert. Sowohl in der unstimulierten Kontrolle als auch in allen stimulierten Zellen sind deutliche TFF3-Banden sichtbar (Abb. 9).



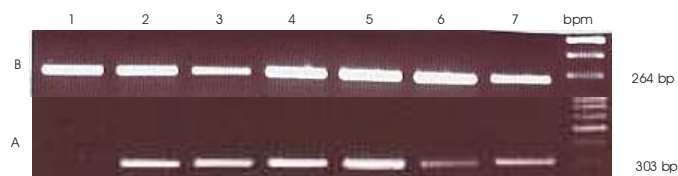
**Abb.9** RT-PCR. Analyse der Synoviozytenzelllinie K4IM, die von einem gesunden Spender stammt, nach 24h-Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ , Lipopolysacchariden (LPS), Peptidoglykanen (PGN) und Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (PA) und *Staphylococcus aureus* (SA). Bpm – Basenpaarmarker. Das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar. Sowohl in der unstimulierten Kontrolle als auch nach Stimulation mit den verschiedenen Substanzen sind deutliche TFF3-Banden sichtbar.

### 3.1.6 Primäre Synoviozyten

Primäre Synoviozyten, die von einem an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten stammen, werden nach RNA-Isolation mittels RT-PCR analysiert. Die PCR-Analyse ergibt keinen Nachweis für TFF3 in primären Synoviozyten (Abb. 10).

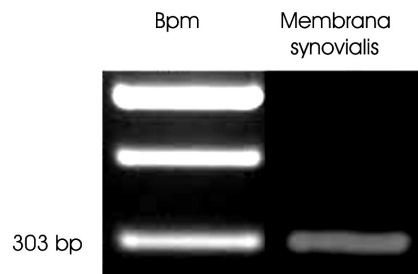
### 3.1.7 Humanes Synovialgewebe

Membrana synovialis von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten wurde nach RNA-Isolation mittels RT-PCR analysiert. In allen untersuchten Gewebeproben sind deutliche TFF3-Banden sichtbar (Abb. 10).



**Abb.10** RT-PCR. Analyse primärer Synoviozyten (Reihe 1) und von Membrana synovialis (Reihen 2 bis 7) unterschiedlicher Patienten mit rheumatoider Arthritis. Bpm – Basenpaarmarker. Das Aktin-Produkt, das der Kontrolle der Integrität der mRNA dient, ist als weiße Bande bei 264 bp sichtbar (Zeile B), das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar (Zeile A). In primären Synoviozyten zeigt sich keine TFF3-Bande, wohingegen alle Proben von Membrana synovialis deutliche TFF3-Banden aufweisen.

Die TFF3-Expression in gesunder und arthrotischer Membrana synovialis wird mittels RT-PCR untersucht. In der Membrana synovialis an Arthrose erkrankter Patienten sind in der RT-PCR deutliche TFF3-Banden sichtbar, wohingegen sich in gesunder Membrana synovialis kein TFF3 nachweisen lässt (Abb. 11).



**Abb.11** RT-PCR. Analyse humaner Membrana synovialis eines an Arthrose erkrankten Patienten. Bpm – Basenpaarmarker. Das TFF3-Produkt ist als weiße Bande bei 303 bp sichtbar. In gesunder Membrana synovialis ist das TFF3-Produkt nicht nachweisbar (nicht dargestellt).

### 3.2 Real-time RT-PCR

Trotz der Vielzahl an eingesetzten Primern lassen sich keine Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese detektieren. Die Gründe hierfür sind unbekannt und konnten trotz genauer und umfangreicher Untersuchungen bislang nicht ermittelt werden. Der Befund ist insbesondere erstaunlich, da mitgeführte Kontrollen aus den ableitenden Tränenwegen durchaus quantifizierbar waren.

### 3.3 Dot Blot

Trotz der Testung verschiedener Verfahren und verschiedener anti-TFF3-Antikörper und der Durchführung zahlreicher Versuche konnten mittels Dot Blot keine verwertbaren Ergebnisse an kultivierten Chondrozyten und Synoviozyten erhoben werden, obwohl andere Antikörper, die zur Kontrolle eingesetzt wurden, klare Ergebnisse erbrachten.

### 3.4 Immunhistochemie

#### 3.4.1 Primäre Chondrozyten

Primäre Chondrozyten werden 48 h mit TNF $\alpha$  (20ng/ml, IL-1 $\beta$  (20ng/ml) und IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (je 20ng/ml) stimuliert und anschließend immunhistochemisch auf ihre Reaktivität mit dem anti-r-TFF3-Antikörper untersucht (Abb. 12).

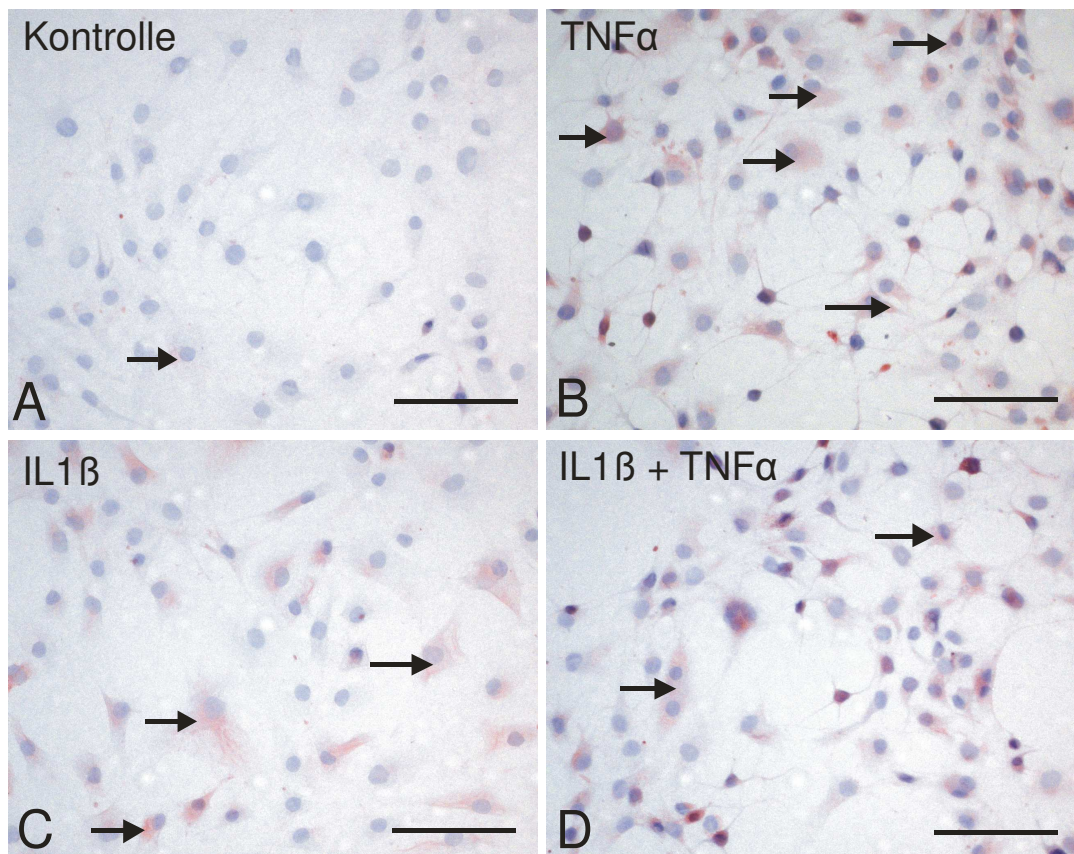


Die immunhistochemische Analyse der unstimulierten Kontrolle primärer Chondrozyten zeigt eine schwache zytoplasmatische Reaktion mit dem anti-TFF3-Antikörper in einzelnen Chondrozyten (Abb. 12A).

Nach 48h-Stimulation mit TNF $\alpha$  kommt es zu einer starken Zunahme der Reaktivität mit dem Antikörper. Fast alle Zellen zeigen eine zytoplasmatische Reaktion und ein Teil der Zellen weist morphologische Zeichen einer Apoptose (Abflachung der Zellen, Kernpyknose, Zytoplasmaverlust) auf (Abb. 12B).

Nach 48h-Stimulation mit IL-1 $\beta$  zeigt sich in den meisten Zellen eine zytoplasmatische Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper; Hinweise auf eine Apoptose sind allerdings nicht erkennbar (Abb. 12C).

Die kombinierte Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  führt zu einer der alleinigen Stimulation mit TNF $\alpha$  vergleichbaren Reaktion (Abb. 12D).

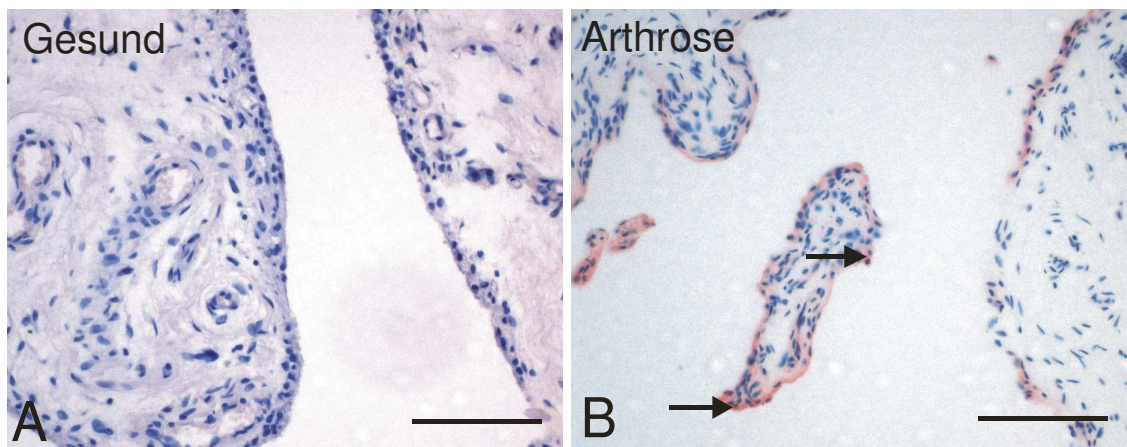


**Abb.12** Immunhistochemie. Analyse primärer Chondrozyten nach 48h-Stimulation mit TNF $\alpha$  (20ng/ml), IL-1 $\beta$  (20ng/ml) und TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  (je 20ng/ml). Bei Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper ist ein roter Farbumschlag sichtbar ( $\rightarrow$ ). In der unstimulierten Kontrolle erkennt man nur eine schwache TFF3-Reaktivität (A), die nach Stimulation mit TNF $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) sowie TNF $\alpha$ +IL-1 $\beta$  (D) deutlich zunimmt. Die deutlichste TFF3-Reaktivität ist nach 48h-Stimulation mit TNF $\alpha$  erkennbar: fast alle Zellen zeigen eine zytoplasmatische Reaktion mit dem anti-TFF3-Antikörper.

### 3.4.2 Membrana synovialis

Gewebeproben der Membrana synovialis gesunder Spender sowie an Arthrose erkrankter Patienten werden immunhistochemisch auf ihre Reaktivität mit dem anti- TFF3-Antikörper untersucht (Abb. 13).

TFF3 ist nur in arthrotischer, jedoch nicht in gesunder Membrana synovialis nachweisbar. In Gewebeproben von Patienten mit Arthrose reagieren die Synoviozyten positiv mit dem Antikörper, das subsynoviale Bindegewebe zeigt keine Reaktivität.



**Abb.13** Immunhistochemie. Analyse gesunder Membrana synovialis (A) sowie eines an Arthrose erkrankten Patienten (B). Bei Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper zeigt sich ein roter Farbumschlag (→). Eine TFF3-Reaktivität der Synoviozyten ist nur in arthrotischer Membrana synovialis nachweisbar (B), nicht jedoch in der gesunden Membrana synovialis(A).

### **3.5 TFF3-Expression im Kniegelenk von STR/Ort-Mäusen**

Gewebeschnitte durch Kniegelenke von STR/Ort-Mäusen in verschiedenen Arthrosestadien (Grad 0-3) werden mittels HE-Färbung und Immunhistochemie analysiert.

#### **3.5.1 HE-Färbung**

Zur Übersicht der Gewebeschnitte wird zunächst eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt (Abb.14). Zellkerne und saure Substanzen (beispielsweise Hyaluronsäure) werden durch Hämatoxylin blau angefärbt, Zytoplasma und Kollagen färben sich rosa bis rot.

Im gesunden Gelenkknorpel (Grad 0) stellt sich der hyaline Knorpel blass-blau dar, die Zellkerne sind kräftig blau angefärbt. In der homogenen Grundsubstanz sind Chondrozyten als blaue Punkte sichtbar, die in kleinen Höhlen (Knorpellakunen) liegen. Mehrere Chondrozyten sind von einem stark basophilen Knorpelhof, der sich weniger anfärbt, umgeben. Die Kollagenfibrillen der EZM werden durch die Grundsubstanz maskiert und sind somit unter dem Lichtmikroskop nicht sichtbar. Die Grenze zwischen Gelenkknorpel und mineralisiertem Knorpel (tibia mark) ist deutlich erkennbar (Abb. 14A).

Im Frühstadium der Arthrose (Grad 1) sind erste degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels erkennbar. Der Gelenkknorpel des Femur hat an Höhe abgenommen und einige Zellkerne der Chondrozyten sind kondensiert (Abb. 14B).

Im fortgeschrittenen Arthrosestadium (Grad 2) ist die Zone unmineralisierten Knorpels an der Tibia verschmälert und fehlt am Femur bereits vollständig, die Chondrozytenzahl ist reduziert und der Gelenkspalt ist deutlich verbreitert. Durch die veränderte Struktur und Anordnung der Chondrozyten haben sich Fissuren gebildet (Abb. 14C, D).

Im Endstadium der Arthrose (Grad 3) kommt es zu einem vollständigen Verlust des Gelenkknorpels. Nur der subchondrale Knochen ist noch sichtbar, der Gelenkspalt ist stark vergrößert (Abb. 14E, F).

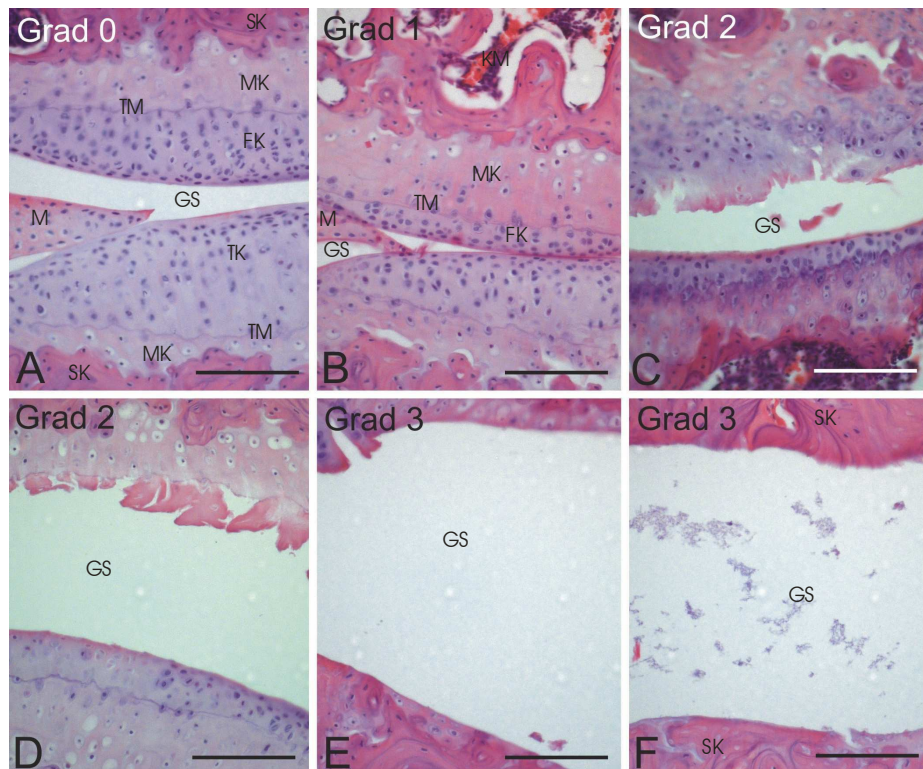
#### **3.5.2 Immunhistochemie**

Die Gewebeschnitte der STR/Ort-Mäuse in verschiedenen Arthrosestadien (Grad 0-3) werden immunhistochemisch mit einem anti-TFF3-Antikörper untersucht (Abb.15).

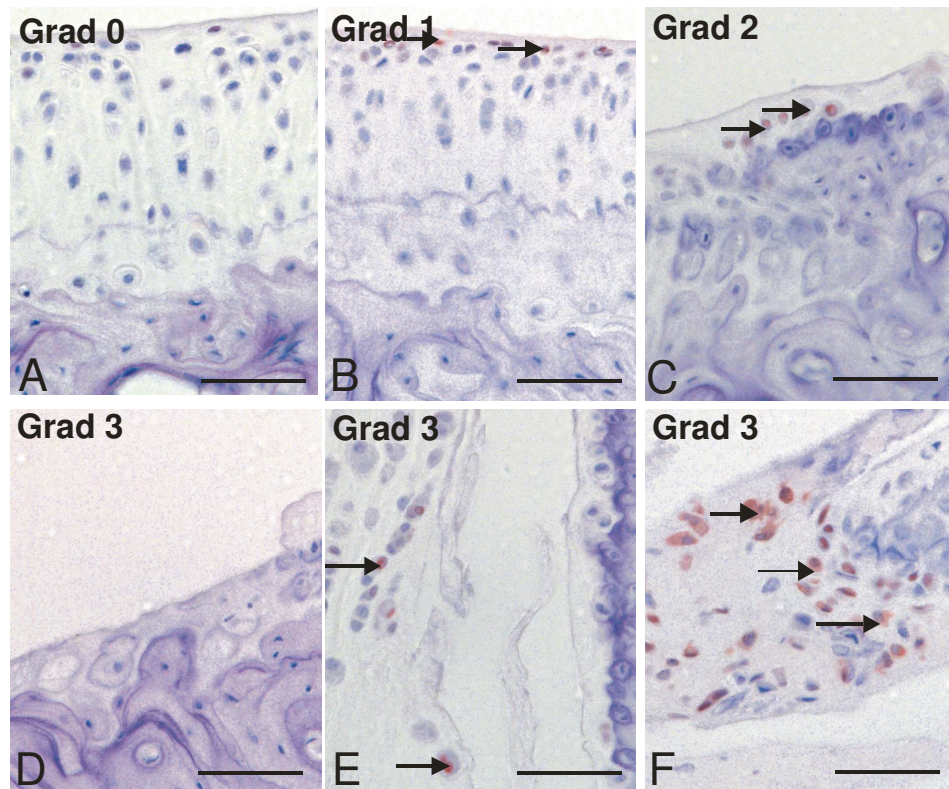
Im gesunden Gelenkknorpel (Grad 0) ist der Gelenkknorpel gut ausgebildet und weist keine degenerativen Veränderungen auf. Es ist keine Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper nachweisbar (Abb. 15A).

In den Arthrosegraden 1 und 2 hat der Gelenkknorpel an Höhe abgenommen und weist degenerative Veränderungen auf. Man erkennt eine zytoplasmatische TFF3-Reaktivität einiger, v. a. gelenkspaltnaher Chondrozyten (Abb. 15B, C).

Im Endstadium der Arthrose (Grad 3) ist der Knorpel bis auf den subchondralen Knochen abgerieben. Die Zellen des subchondralen Knochens zeigen keine positive Reaktion mit dem anti-TFF3-Antikörper (Abb. 15D); im Gegensatz dazu reagieren die Zellen in benachbarten Arealen, in denen noch Gelenkknorpel existiert sowie Chondrozyten in den Menisken stark positiv (Abb. 15E, F).



**Abb.14** HE-Färbung. Kniegelenkknorpel von STR/Ort-Mäusen (genetisch prädisponiert zur Entwicklung von Arthrose). Alle Abbildungen zeigen Schnitte durch das Kniegelenk. Oben kann man den Gelenkknorpel des Femur, unten den des Tibiaplateaus erkennen. In der Mitte ist der Gelenkspalt zu sehen; in den Abb.A und B sieht man zusätzlich einen Meniskus. Abb.A zeigt gesunden Gelenkknorpel, Abb.B-F verschiedene Arthrosestadien. Im Arthrosegrad 3 (Abb.E,F) besteht ein kompletter Verlust des Gelenkknorpels. Bar 86,8µm. SK - subchondraler Knochen, MK - mineralisierter Knorpel, TM - tide mark, FK - Femurknorpel, M – Meniskus



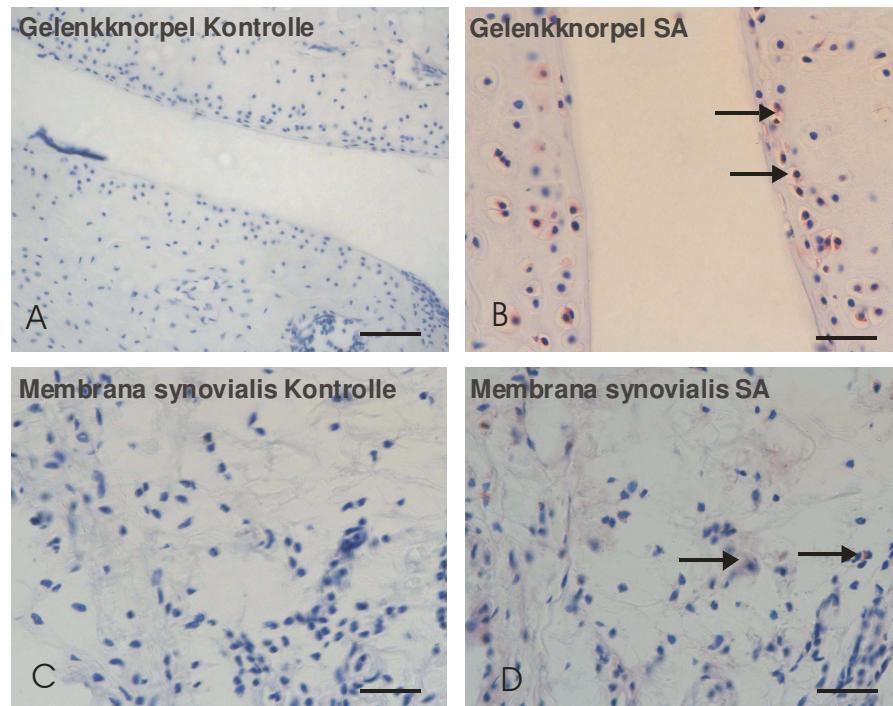
**Abb.15** Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen TFF3. Kniegelenkknorpel von STR/Ort-Mäusen (genetisch prädisponiert zur Entwicklung von Arthrose). Alle Abbildungen zeigen Schnitte durch das Kniegelenk. Oben kann man den Gelenkknorpel des Femur, unten den des Tibiaplateaus erkennen. Abb.A zeigt gesunden Gelenkknorpel, Abb.B-F zeigen verschiedene Arthrostadien. Bei Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper ergibt sich ein roter Farbumschlag (→). In gesundem Gelenkknorpel sind keine TFF3-positiven Chondrozyten nachweisbar (A); in arthrotischem Gelenkknorpel Grad 1 (B) und 2 (C) zeigen einige, hauptsächlich gelenkspaltnahe „oberflächliche“ Chondrozyten eine positive Reaktion. In subchondralem Knochen von arthrotischem Gelenkknorpel Grad 3 sind keine TFF3-positiven Zellen nachweisbar (D). Jedoch zeigt sich in Bereichen verbliebenen Gelenkknorpels nahe des freigelegten Knochens eine starke Reaktion mit dem anti-TFF3-Antikörper (E,F). Bar 86.8µm.

### 3.6 TFF3-Expression im Kniegelenk von Balb-c Mäusen nach Behandlung mit *Staphylococcus aureus*

Gewebeschnitte durch Kniegelenke von Balb-c-Mäusen werden mit Überständen von *S. aureus* inkubiert und anschließend immunhistochemisch auf ihre Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper untersucht (Abb. 16).

Die immunhistochemische Analyse der unstimulierten Kontrolle des Gelenkknorpels zeigt keine Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper (Abb. 16A). Nach 24h-Stimulation mit *S. aureus* reagieren jedoch zahlreiche Chondrozyten des Gelenkknorpels positiv mit anti-TFF3 (Abb. 16B).

Auch in der unstimulierten Kontrolle der Membrana synovialis ist kein TFF3 nachweisbar (Abb. 16C). Nach Stimulation mit *S. aureus* kommt es zu einer positiven Reaktion mit dem anti-TFF3-Antikörper (Abb. 16D). Dabei reagieren nicht nur Synoviozyten, sondern auch subsynoviale Zellen positiv.



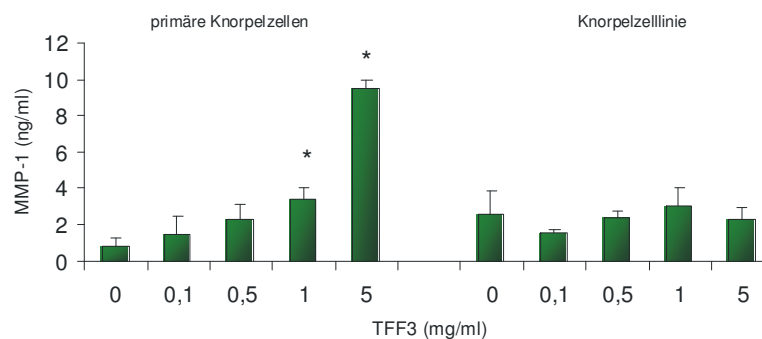
**Abb.16** Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen TFF3. Gelenkknorpel und Membrana synovialis aus Kniegelenken von Balb-c-Mäusen nach 24h-Stimulation mit Überständen von *Staphylococcus aureus* (SA). Bei Reaktivität mit dem anti-TFF3-Antikörper zeigt sich ein roter Farbumschlag (→). Sowohl in der unstimulierten Kontrolle des Gelenkknorpels (A) als auch in der unstimulierten Kontrolle der Membrana synovialis (C) ist keine TFF3-Reaktivität vorhanden, wohingegen man nach Stimulation mit SA eine deutliche TFF3-Reaktivität in Gelenkknorpel (B) und in der Membrana synovialis (D) sehen kann.

### 3.7 ELISA

Mittels spezifischer ELISAs werden Überstände kultivierter primärer Chondrozyten, der Chondrozytenzelllinie C28/I2 sowie gesunder und arthrotischer Knorpelstanzen auf ihren Gehalt an Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13) und deren Inhibitoren (TIMP-1, TIMP-2) untersucht. Zellen und Knorpelstanzen werden 24 h mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0 und 5,0 mg/ml TFF3) stimuliert.

### 3.7.1 Kultivierte Chondrozyten und MMP-1

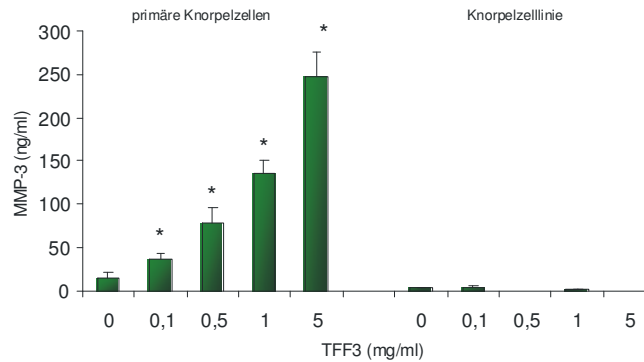
In den unstimulierten Kontrollen ist die Konzentration von MMP-1 in Primärzellen (0,78 ng/ml MMP-1) im Vergleich zur Zelllinie (2,61 ng/ml MMP-1) statistisch signifikant niedriger (Abb. 17). In Primärzellen führt die Stimulation mit TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-1, die ab einer Konzentration von 1,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant ist (Abb. 17). In der Zelllinie hat TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-1-Konzentration (Abb. 17).



**Abb.17** ELISA. Analyse der MMP-1-Konzentration (ng/ml) primärer Chondrozyten sowie der Chondrozytenzelllinie C28/12 nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit TFF3 führt in primären Chondrozyten zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-1, zeigt in der Chondrozytenzelllinie jedoch keinen Einfluss auf die MMP-1-Konzentration. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.2 Kultivierte Chondrozyten und MMP-3

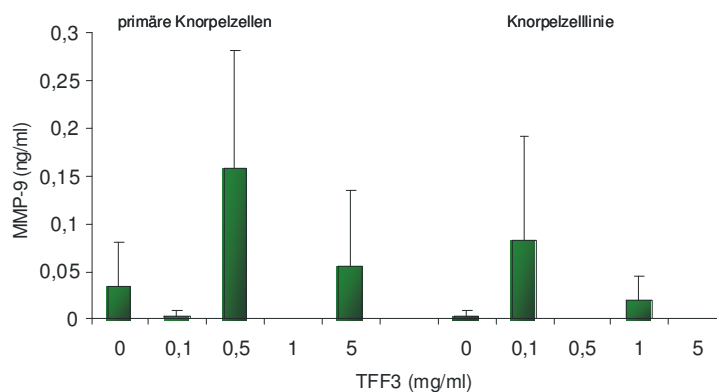
In den unstimulierten Kontrollen ist die Konzentration von MMP-3 in den Primärzellen (14,79 ng/ml MMP-3) im Vergleich zur Zelllinie (2,95 ng/ml MMP-3) statistisch signifikant erhöht (Abb. 18). In Primärzellen führt die Stimulation mit TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-3, die bei allen Konzentrationen statistisch signifikant ist (Abb. 18). In der Zelllinie hat TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-3-Konzentration (Abb. 18).



**Abb.18** ELISA. Analyse der MMP-3-Konzentration (ng/ml) primärer Chondrozyten sowie der Chondrozytenzelllinie C28/12 nach 24h-Stimulation mit rekombinatem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit TFF3 führt in primären Chondrozyten zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-3, zeigt in der Chondrozytenzelllinie jedoch keinen Einfluss auf die MMP-3-Konzentration. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.3 Kultivierte Chondrozyten und MMP-9

In den unstimulierten Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der MMP-9-Konzentration in Primärzellen (0,03 ng/ml MMP-9) und der Zelllinie (0,00 ng/ml MMP-9, Abb. 19). TFF3 hat weder in Primärzellen noch in der Zelllinie Einfluss auf die Konzentration von MMP-9 (Abb. 19).

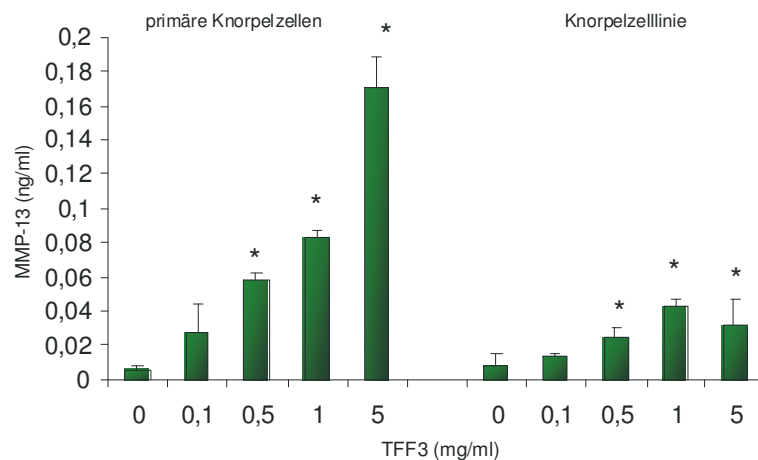


**Abb.19** ELISA. Analyse der MMP-9-Konzentration (ng/ml) primärer Chondrozyten sowie der Chondrozytenzelllinie C28/12 nach 24h-Stimulation mit rekombinatem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit TFF3 zeigt weder in primären Chondrozyten noch in der Chondrozytenzelllinie einen Einfluss auf die MMP-9-Konzentration.



### 3.7.4 Kultivierte Chondrozyten und MMP-13

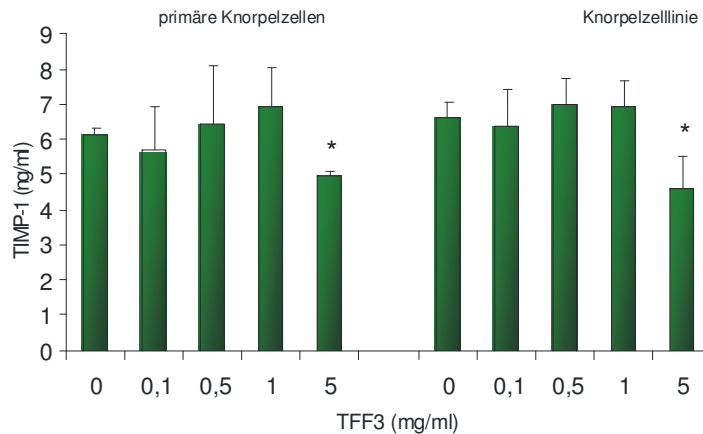
In den unstimulierten Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der MMP-13-Konzentration in Primärzellen (0,01 ng/ml MMP-13) und der Zelllinie (0,01 ng/ml MMP-13, Abb. 20). In Primärzellen führt die Stimulation mit TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-13, die ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml TFF3 statistisch signifikant ist (Abb. 20). Auch in der Zelllinie führt die Stimulation mit TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-13, die ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml TFF3 statistisch signifikant ist (Abb. 20).



**Abb.20** ELISA. Analyse der MMP-13-Konzentration (ng/ml) primärer Chondrozyten sowie der Chondrozytenzelllinie C28/I2 nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit TFF3 führt sowohl in primären Chondrozyten als auch in der Chondrozytenzelllinie zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-13. \* - signifikantes Ereignis ( $p < 0,05$ )

### 3.7.5 Kultivierte Chondrozyten und TIMP-1

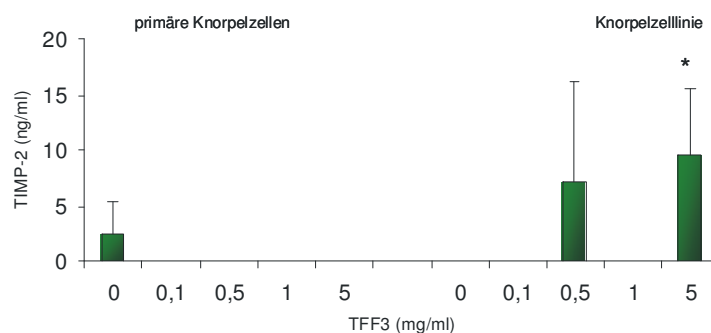
In den unstimulierten Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der TIMP-1-Konzentration in Primärzellen (6,10 ng/ml TIMP-1) und der Zelllinie (6,60 ng/ml TIMP-1, Abb. 21). Sowohl in Primärzellen (4,98 ng/ml TIMP-1) als auch in der Zelllinie C28/I2 (4,60 ng/ml TIMP-1) ist die TIMP-1-Konzentration nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 21).



**Abb.21** ELISA. Analyse der TIMP-1-Konzentration (ng/ml) primärer Chondrozyten sowie der Chondrozytenzelllinie C28/I2 nach 24h-Stimulation mit rekombinatem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 ist die TIMP-1-Konzentration sowohl in primären Chondrozyten als auch in der Chondrozytenzelllinie erniedrigt. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.6 Kultivierte Chondrozyten und TIMP-2

In den unstimulierten Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der TIMP-2-Konzentration in Primärzellen (2,43 ng/ml TIMP-2) und der Zelllinie (0,00 ng/ml TIMP-2, Abb. 22). In Primärzellen hat TFF3 keinen Einfluss auf die TIMP-2-Konzentration (Abb. 22). In der Zelllinie wird TIMP-2 durch 5,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant aktiviert (Abb. 22).



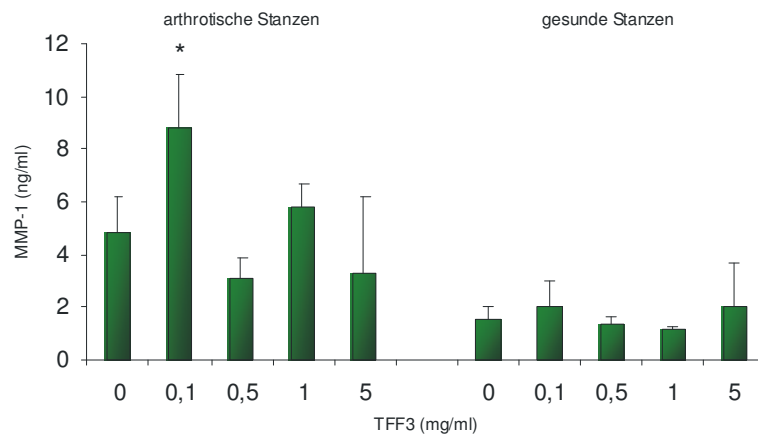
**Abb.22** ELISA. Analyse der TIMP-2-Konzentration (ng/ml) primärer Chondrozyten sowie der Chondrozytenzelllinie C28/I2 nach 24h-Stimulation mit rekombinatem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 führt in der Chondrozytenzelllinie zu einer Aktivierung von TIMP-2, in primären Chondrozyten zeigt die Stimulation mit TFF3 jedoch keinen Einfluss auf die TIMP-2-Konzentration. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.7 Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse an kultivierten Chondrozyten

Primäre Chondrozyten zeigen eine konzentrationsabhängige Aktivierung von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 nach 24h-Stimulation mit TFF3. Nach Stimulation mit TFF3 in hoher Konzentration (5,0 mg/ml TFF3) kommt es zur Inaktivierung von TIMP-1.

### 3.7.8 Knorpelstanzen und MMP-1

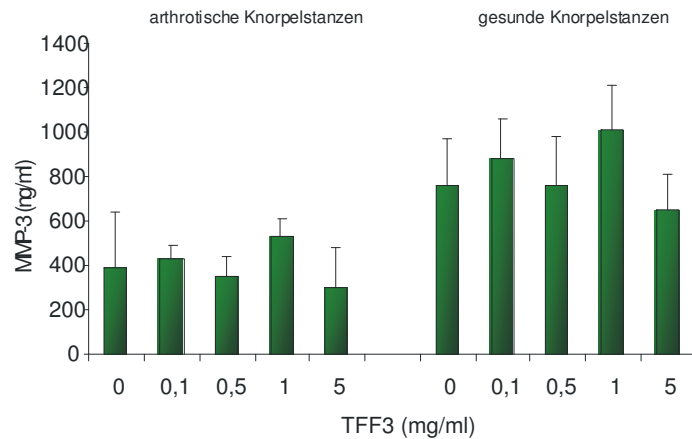
In den unstimulierten Kontrollen ist die Konzentration von MMP-1 in arthrotischen Knorpelstanzen (4,82 ng/ml MMP-1) im Vergleich zu gesunden Knorpelstanzen (1,51 ng/ml MMP-1) statistisch signifikant erhöht (Abb. 23). In arthrotischen Knorpelstanzen wird MMP-1 durch 0,1 mg/ml TFF3 statistisch signifikant aktiviert (Abb. 23). In gesunden Knorpelstanzen hat TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-1-Konzentration (Abb. 23).



**Abb.23** ELISA. Analyse der MMP-1-Konzentration (ng/ml) in arthrotischen und gesunden Knorpelstanzen nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit TFF3 führt in arthrotischen Knorpelstanzen zu einer Aktivierung von MMP-1; in gesunden Knorpelstanzen hat die Stimulation mit TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-1-Konzentration. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.9 Knorpelstanzen und MMP-3

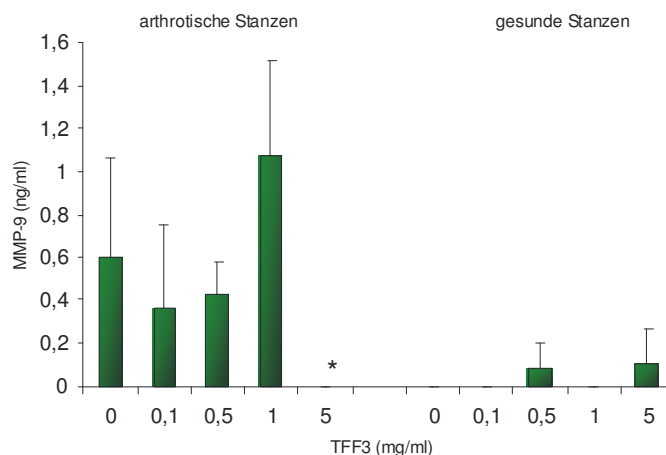
In den unstimulierten Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der MMP-3-Konzentration in arthrotischen (393,84 ng/ml MMP-3) und gesunden Knorpelstanzen (764,07 ng/ml MMP-3, Abb. 24). TFF3 hat weder in gesunden noch in arthrotischen Knorpelstanzen Einfluss auf die Konzentration von MMP-3 (Abb. 24).



**Abb.24** ELISA. Analyse der MMP-3-Konzentration (ng/ml) in arthrotischen und gesunden Knorpelstanzen nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Die Stimulation mit TFF3 hat weder in arthrotischen noch in gesunden Knorpelstanzen Einfluss auf die MMP-3-Konzentration.

### 3.7.10 Knorpelstanzen und MMP-9

In den unstimulierten Kontrollen ist die Konzentration von MMP-9 in arthrotischen Knorpelstanzen (0,60 ng/ml MMP-9) im Vergleich zu gesunden Knorpelstanzen (0,00 ng/ml MMP-9) statistisch signifikant erhöht (Abb. 25). In arthrotischen Knorpelstanzen ist die MMP-9-Konzentration nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 25). In gesunden Knorpelstanzen hat TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-9-Konzentration (Abb. 25).



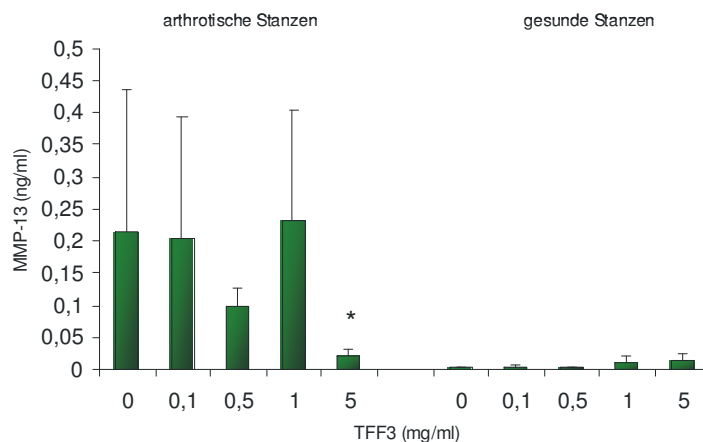
**Abb.25** ELISA. Analyse der MMP-9-Konzentration (ng/ml) in arthrotischen und gesunden Knorpelstanzen nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Nach Stimulation mit TFF3 ist die MMP-9-Konzentration in arthrotischen Knorpelstanzen erniedrigt; in gesunden Knorpelstanzen hat die Stimulation mit TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-9-Konzentration. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.11 Knorpelstanzen und MMP-13

In den unstimulierten Kontrollen ist die Konzentration von MMP-13 in arthrotischen Knorpelstanzen (0,21 ng/ml MMP-13) im Vergleich zu gesunden Knorpelstanzen (0,00 ng/ml MMP-13) statistisch signifikant erhöht (Abb. 26).

In arthrotischen Knorpelstanzen ist die MMP-13-Konzentration nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 26).

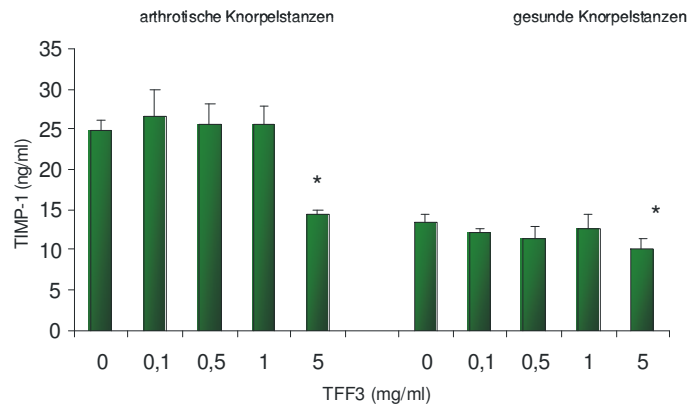
In gesunden Knorpelstanzen hat TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-13-Konzentration (Abb. 26).



**Abb.26** ELISA. Analyse der MMP-13-Konzentration (ng/ml) in arthrotischen und gesunden Knorpelstanzen nach 24h-Stimulation mit rekombinatem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Nach Stimulation mit TFF3 ist die MMP-13-Konzentration in arthrotischen Knorpelstanzen erniedrigt; in gesunden Knorpelstanzen hat die Stimulation mit TFF3 keinen Einfluss auf die MMP-13-Konzentration.

### 3.7.12 Knorpelstanzen und TIMP-1

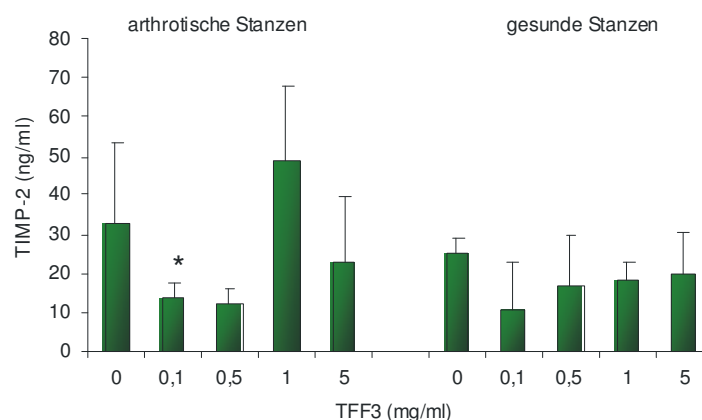
In den unstimulierten Kontrollen ist die Konzentration von TIMP-1 in arthrotischen Knorpelstanzen (24,82 ng/ml TIMP-1) im Vergleich zu gesunden Knorpelstanzen (13,43 ng/ml TIMP-1) statistisch signifikant erhöht (Abb. 27). In arthrotischen Knorpelstanzen ist die TIMP-1-Konzentration nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 27). In gesunden Knorpelstanzen führt die Stimulation mit TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Inaktivierung von TIMP-1, die bei einer Konzentration von 5,0 mg/ml TFF3 statistisch signifikant ist (Abb. 27).



**Abb.27** ELISA. Analyse der TIMP-1-Konzentration (ng/ml) in arthrotischen und gesunden Knorpelstanzen nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 ist die TIMP-1-Konzentration in arthrotischen Knorpelstanzen erniedrigt; in gesunden Knorpelstanzen führt die Stimulation mit TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Inaktivierung von TIMP-1.  
\* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

### 3.7.13 Knorpelstanzen und TIMP-2

In den unstimulierten Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der TIMP-2-Konzentration in arthrotischen (32,88 ng/ml TIMP-2) und gesunden Knorpelstanzen (25,46 ng/ml TIMP-2, Abb. 28). In arthrotischen Knorpelstanzen ist die TIMP-2-Konzentration nach Stimulation mit 0,1 mg/ml TFF3 statistisch signifikant erniedrigt (Abb. 28). In gesunden Knorpelstanzen hat TFF3 keinen Einfluss auf die TIMP-2-Konzentration (Abb. 28).



**Abb.28** ELISA. Analyse der TIMP-2-Konzentration (ng/ml) in arthrotischen und gesunden Knorpelstanzen nach 24h-Stimulation mit rekombinantem TFF3 in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 mg/ml). Nach Stimulation mit 0,1 mg/ml TFF3 ist die TIMP-2-Konzentration in arthrotischen Knorpelstanzen erniedrigt; in gesunden Knorpelstanzen hat die Stimulation mit TFF3 keinen Einfluss auf die TIMP-2-Konzentration. \* - signifikantes Ereignis ( $p \leq 0,05$ )

#### 3.7.14 Zusammenfassung der ELISA-Ergebnisse an Knorpelstanzen

Die Konzentrationen von MMP-1, MMP-9, MMP-13 und TIMP-1 sind in arthrotischen Knorpelstanzen gegenüber gesunden Stanzen signifikant erhöht. Nach 24h-Stimulation mit 0,1 mg/ml TFF3 kommt es in arthrotischen Knorpelstanzen zur Aktivierung von MMP-1 und Inaktivierung von TIMP-2. Nach Stimulation mit 0,5 und 1,0 mg/ml TFF3 kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen in arthrotischen Knorpelstanzen. Nach Stimulation mit 5,0 mg/ml TFF3 werden in arthrotischen Knorpelstanzen MMP-9 und MMP-13 aktiviert sowie TIMP-1 inaktiviert.

In gesunden Knorpelstanzen hat die Stimulation mit TFF3 keinen Einfluss auf die Konzentrationen von MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und TIMP-2. Lediglich TIMP-1 wird nach Stimulation mit TFF3 in hoher Konzentration (5,0 mg/ml TFF3) inaktiviert.

### 3.8 Caspase-3/7 Assay

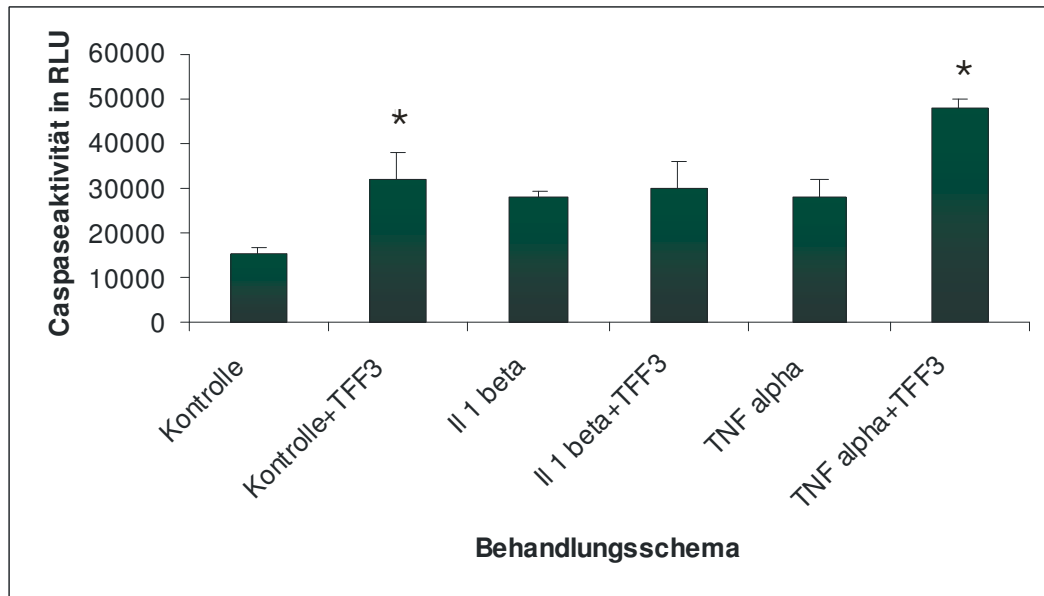
Primäre Chondrozyten werden 24 h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) und TNF $\alpha$  (10 ng/ml) stimuliert. 4 h nach Stimulationsbeginn wird ein Teil der Zellen zusätzlich mit rekombinantem TFF3 (0,3 mg/ml) behandelt. Um den Einfluss von TFF3 auf die Apoptose in primären Chondrozyten zu bestimmen, wird nach Stimulationsende ein Caspase-3/7 Assay durchgeführt. Dieser dient der Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität (gemessen in relative light units = RLU) als ein Hinweis auf Apoptose.

Die Caspase-3/7-Aktivität der unstimulierten Kontrolle (15456 RLU) ist nach Zugabe von TFF3 (31695 RLU) statistisch signifikant erhöht (Abb. 29).

Die Caspase-3/7-Aktivität der mit IL-1 $\beta$  behandelten Zellen (28049 RLU) ist nach Zugabe von TFF3 (29702 RLU) statistisch nicht signifikant erhöht (Abb. 29).

Die Caspase-3/7-Aktivität der mit TNF $\alpha$  behandelten Zellen (27750 RLU) ist nach Zugabe von TFF3 (47656 RLU) statistisch signifikant erhöht (Abb. 29).

Nach Stimulation der Chondrozyten mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  kommt es zu einer erhöhten Apoptoserate gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Außerdem sieht man sowohl in der unstimulierten Kontrolle als auch in den mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  behandelten Chondrozyten eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität und somit verstärkte Apoptose nach zusätzlicher Stimulation mit TFF3.



**Abb.29** Caspase-3/7 Assay zur Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität in relative light units (RLU) als Zeichen für Apoptose. Primäre Chondrozyten werden 24h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) und TNF $\alpha$  (10ng/ml) behandelt. Nach zusätzlicher Stimulation mit rekombinatem TFF3 ist die Caspase-3/7-Aktivität in allen untersuchten Chondrozyten im Vergleich zur nicht-TFF3-stimulierten Kontrolle erhöht.

\* - signifikantes Ereignis ( $p < 0,05$ )

### 3.9 Annexin-V Assay

Die Stimulation der Chondrozyten erfolgt analog der Beschreibung des Caspase-3/7 Assays. Nach Durchführung des Annexin-V Assays erfolgt die Analyse der apoptotischen Chondrozyten mittels Durchflusszytometrie.

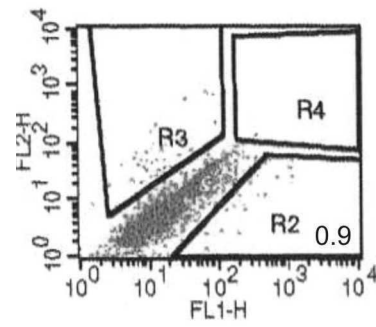
In unstimulierten Chondrozyten zeigt sich eine Apoptoserate von 9,37%, nach Stimulation mit rekombinatem TFF3 (0,3 mg/ml) beträgt sie 6,62%.

Die Apoptoserate der Chondrozyten beträgt nach 24h-Stimulation mit IL-1 $\beta$  2,56%, nach zusätzlicher Stimulation mit TFF3 erhöht sie sich auf 4,10% (Abb. 30).

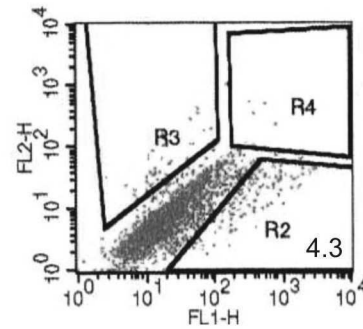
Nach 24h-Stimulation mit TNF $\alpha$  beträgt die Apoptoserate der Chondrozyten 8,23%, nach zusätzlicher Stimulation mit TFF3 beträgt sie 1,79%.

Nach 24h-Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  beträgt die Apoptoserate der Chondrozyten 6,49% und erhöht sich nach Stimulation mit TFF3 auf 9,10% (Abb. 30).

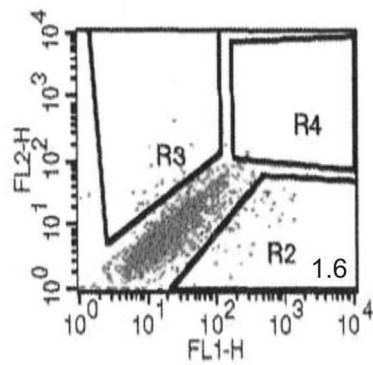




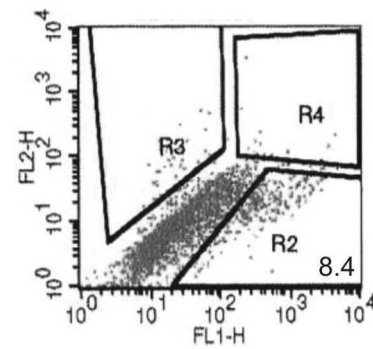
IL-1 $\beta$



IL-1 $\beta$ +TFF3



IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$



IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$ +TFF3

**Abb.30** Annexin-V Assay. Detektion apoptotischer Chondrozyten mittels Durchflusszytometrie. Primäre Chondrozyten werden 24h mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) und TNF $\alpha$  (10ng/ml) behandelt. Nach Stimulation mit rekombinantem TFF3 ist die Apoptoserate in den mit IL-1 $\beta$  sowie in den mit IL-1 $\beta$ +TNF $\alpha$  stimulierten Chondrozyten im Vergleich zur nicht-TFF3-stimulierten Kontrolle erhöht. R2 – apoptotische Chondrozyten, R3 – nekrotische Chondrozyten, R4 – apoptotische und nekrotische Chondrozyten.

## **4 Diskussion**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass TFF3 im gesunden Gelenkknorpel und der gesunden Membrana synovialis auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene nicht nachweisbar ist. Unter pathologischen Bedingungen wie der Arthrose oder der septischen Arthritis wird es in Chondrozyten und Synoviozyten induziert. Ganz entgegen den Erwartungen hat TFF3 im Gelenkknorpel keine protektiven und antiapoptischen Eigenschaften, sondern destruktive und proapoptische Funktionen. Dabei reguliert TFF3 die Produktion von Matrixmetalloproteinasen und hemmt die Produktion von TIMPs.

### **4.1 Nachweis von TFF3 im Gelenkknorpel**

#### **4.1.1 Arthrose**

Ausgangspunkt der degenerativen Gelenkveränderungen bei der Arthrose ist der Gelenkknorpel. Bei der Arthrose ist das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der EZM gestört, es kommt zur Knorpeldestruktion (Krämer et al., 2005; Niethard et al., 2005). Als zentrale Agitatoren der katabolen Vorgänge bei der Arthrose werden u. a. besonders die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) angesehen (Berenbaum, 2004; Haringman et al., 2004).

Im Gelenkknorpel konnte die mRNA für TFF3 nur in arthrotischem Gelenkknorpel nachgewiesen werden, nicht jedoch in gesundem. TFF3 ist also ein induzierbares Gen im Gelenkknorpel, das unter den pathologischen Bedingungen der Arthrose induziert und dann transkribiert werden kann. Das Ergebnis bestätigt Untersuchungen an der Augenoberfläche, die zeigen, dass in der gesunden avaskulären Kornea keine TFF3-Produktion stattfindet, diese aber unter pathologischen Bedingungen induziert wird (Paulsen et al., 2008; Steven et al., 2004).

Um die pathologischen Bedingungen bei der Arthrose zu simulieren, wurden kultivierte Knorpelzellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert. Diese Zytokine sind im Rahmen der Arthrose hochreguliert (Berenbaum et al., 2004; Goldring et al., 2000; Haringman et al., 2004) und spielen bei der Regulation von TFF-Peptiden ebenfalls eine Rolle (Emami et al., 2004).

Die Stimulationsversuche wurden mit der Chondrozytenzelllinie C28/I2, einer immortalisierten humanen Zelllinie aus Rippenknorpel und mit primären Chondrozyten aus arthrotisch verändertem Gelenkknorpel durchgeführt.

Primärkulturen von ausdifferenzierten Geweben lassen sich nicht über einen längeren Zeitraum subkultivieren, da sie ihre Eigenschaften verändern (Dedifferenzierung) und somit den Nutzen für wissenschaftliche Untersuchungen verlieren. Für kontinuierliche Versuche mit

gleichen Ausgangsbedingungen wird deshalb auf etablierte Zelllinien zurückgegriffen. Bei der verwandten Knorpelzelllinie C28/I2 handelt es sich um eine immortalisierte humane Zelllinie, die aus Rippenknorpel gewonnen wurde. In der vorliegenden Arbeit diente sie als Grundlage für Stimulationsversuche und als Vertreter gesunder Knorpelzellen.

Die immunhistochemische Analyse zeigt eine stärkere Reaktivität kultivierter primärer Chondrozyten mit dem anti-r-TFF3-Antikörper nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  als in der unstimulierten Kontrolle. Die Expression von TFF3 in Chondrozyten wird durch diese Zytokine also deutlich gesteigert. Die Ergebnisse bestätigen somit die Hypothese, dass die TFF3-Sekretion im Gelenkknorpel unter den pathologischen Bedingungen der Arthrose induziert wird.

Der Nachweis von TFF3 in der unstimulierten Kontrolle der Chondrozytenzelllinie deckt sich nicht mit dem negativen Befund in gesundem Knorpelgewebe. Eine mögliche Erklärung der TFF3-Expression könnte das häufige Passagieren der Zelllinie bei der Subkultivierung sein, das als Reiz zu der TFF3-Induktion geführt haben könnte. Ein anderer Grund könnte die Transfektion mit dem Simian Virus 40 sein. Das Virusgenom verändert im Rahmen der Immortalisierung zahlreiche Parameter der Zellphysiologie. Aus Untersuchungen an der Kornea ist bereits bekannt, dass TFF3 sensitiv auf Virusinfektionen reagiert (Steven et al., 2004).

Untersuchungen mit Zelllinien müssen kritisch betrachtet werden. Durch die Immortalisierung und die somit veränderten physiologischen Eigenschaften sind Zelllinien nicht mit den Zellen eines lebenden menschlichen Organismus vergleichbar. Darüber hinaus handelt es sich bei der eingesetzten Zelllinie C28/I2 um Chondrozyten, die aus Rippenknorpel und nicht aus Gelenkknorpel generiert wurden. Auch dies kann möglicherweise einen Einfluss auf die durchgeführten Untersuchungen und damit die Ergebnisse haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb zusätzlich Untersuchungen an primären humanen Chondrozyten und an *in-vivo*-Mausmodellen in Form von STR/Ort- und Balb-c-Mäusen durchgeführt, die die Situation im menschlichen Organismus besser wiedergeben als immortalisierte Zelllinien.

STR/Ort-Mäuse sind genetisch prädisponiert, frühzeitig arthroseähnliche Läsionen im Kniegelenk zu entwickeln (Mason et al., 2001). Wie im humanen Organismus geht die Arthroseentwicklung mit einer Heraufregulation der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  einher (Chambers et al., 1997), weswegen STR/Ort-Mäuse als Modellorganismen zur Untersuchung von Arthrose dienen.

Im gesunden Kniegelenk der STR/Ort-Maus (Alter der Mäuse 4 Monate und jünger) ist analog den Ergebnissen aus gesundem humanem Knorpel kein TFF3 nachweisbar. Im Verlauf der Arthrose, v. a. in den Stadien 1 und 2, kommt es in Chondrozyten des Kniegelenkknorpels zur Aktivierung der TFF3-Produktion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TFF3 im gesunden avaskulären Gelenkknorpel keine Bedeutung zukommt. Unter den pathologischen Bedingungen der Arthro-

se, die mit einer Heraufregulation von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  einhergeht (Berenbaum et al., 2004; Goldring et al., 2000; Haringman et al., 2004) kommt es allerdings vergleichbar zu den Vorgängen an der Augenoberfläche (Steven et al., 2004) und in der Hornhaut (Paulsen et al., 2008) zur Induktion von TFF3.

#### 4.1.2 Septische Arthritis

Außer dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine auf die Expression von TFF3 im Gelenkknorpel wird der mögliche Einfluss von Bakterienzellwandbestandteilen auf die TFF3-Expression untersucht. Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile gramnegativer Bakterien, Peptidoglykane (PGN) sind Bestandteile von *Staphylococcus aureus*. Durch die Stimulation mit LPS, PGN sowie Überständen von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wird der Zustand einer septischen Arthritis simuliert, die in Extremitätengelenken am häufigsten durch *S. aureus* verursacht wird (Hultgren et al., 2001; Josefsson et al., 1999; Ryan et al., 1997; Xu et al., 2004).

Die Stimulationsversuche werden mit der Chondrozytenzelllinie C28/I2 und mit primären Chondrozyten aus arthrotisch verändertem Gelenkknorpel durchgeführt.

Sowohl in der Chondrozytenzelllinie als auch in primären Chondrozyten lässt sich nach Stimulation mit Bakterienzellwandbestandteilen eine stärkere TFF3-Expression als in der unstimulierten Kontrolle nachweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass die TFF3-Produktion im Gelenkknorpel auch unter den pathologischen Bedingungen einer bakteriellen Infektion induziert wird. Dies lässt sich auch auf Proteinebene zeigen: im Gelenkknorpel gesunder Balb-c-Mäuse ist keine TFF3-Produktion nachweisbar; nach Stimulation mit Überständen von *S. aureus* wird die TFF3-Produktion induziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TFF3-Produktion im Knorpel auch im Rahmen einer septischen Arthritis induziert werden kann. Der Einfluss von bakteriellen Infektionen auf die Expression von TFF-Peptiden wird auch im Gastrointestinaltrakt beschrieben. Clyne et al. (2004) zeigen eine Interaktion zwischen *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) und TFF1 in der Magenschleimhaut. Diese Interaktion ermöglicht die Bindung an Muzine der Magenschleimhaut, so dass TFF1 in der Magenschleimhaut möglicherweise als Rezeptor für das Bakterium dient (Clyne et al., 2004). Reeves et al. (2008) weisen weiterhin eine Interaktion zwischen *H. pylori* und TFF3 nach. Xia et al. (2004) beschreiben eine verstärkte TFF2-Produktion in *H. pylori*-besiedelter Magenschleimhaut im Vergleich zu gesunder Magenschleimhaut. In humanen Magenkarzinomzellen induziert eine Infektion mit *H. pylori* die Expression von TFF1, TFF2 und TFF3 (Matsuda et al., 2008). Es wäre interessant, in weiteren Versuchen die Interaktion zwischen TFF3 und den an der Pathogenese der septischen Arthritis beteiligten Erregern genauer zu untersuchen. Möglicherweise ermöglicht TFF3 vergleichbar zu den Ergebnissen an der Magenschleimhaut (Clyne et al., 2004) die Bindung bestimmter Bakterienbestandteile

an die Chondrozyten und ist so ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der septischen Arthritis.

## **4.2 Nachweis von TFF3 in der Membrana synovialis**

### **4.2.1 Arthrose und rheumatoide Arthritis**

Im Krankheitsverlauf der Arthrose kommt es nicht nur im Gelenkknorpel selbst zu degenerativen Veränderungen, sondern die gesamte Gelenkstruktur einschließlich der Membrana synovialis, des subchondralen Knochens, des Kapsel- und Bandapparates und der periartikulären Muskulatur ist betroffen (Pelletier et al., 2001). Zu den Veränderungen an der Membrana synovialis gehören synoviale Hypertrophie und Hyperplasie sowie eine Infiltration des Gewebes mit verschiedenen Entzündungszellen (Pelletier et al., 2001). Bei schweren Krankheitsverläufen kann das Ausmaß der Entzündung der Membrana synovialis ebenso so hoch sein wie bei der rheumatoiden Arthritis (Pelletier et al., 2001). Einen niedrigen Grad einer Synovitis findet man bereits in frühen Krankheitsstadien (Farahat et al., 1993; Haraoui et al., 1991). Im Gegensatz zur Arthrose, bei der degenerative Veränderungen des Gelenkknorpels die Hauptrolle spielen, steht bei der rheumatoiden Arthritis eine Entzündung der Membrana synovialis im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens. Diese greift erst im Verlauf der Erkrankung auf die Gelenkflächen über, so dass schließlich eine Panarthrititis entsteht. Es kommt zu einer allmählichen Zerstörung des Gelenkknorpels, der Gelenkkapsel und des subchondralen Knochens (Krämer et al. 2005).

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass in gesunder Membrana synovialis kein TFF3 exprimiert wird, in Membrana synovialis von an Arthrose und an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten hingegen ist TFF3 nachweisbar. TFF3 ist also auch in der Membrana synovialis ein unter pathologischen Bedingungen induzierbares Gen. Lediglich in der Synoviozytenzelllinie K4IM, die aus der Membrana synovialis eines gesunden Spenders generiert wurde, wird auch ohne die Simulation pathologischer Bedingungen auf mRNA-Ebene bereits TFF3 exprimiert. In den Gewebeproben gesunder Membrana synovialis wird weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene TFF3 exprimiert. Analog den Ergebnissen im Gelenkknorpel deckt sich auch in der Membrana synovialis der negative Befund im Gewebe nicht mit dem Nachweis von TFF3 in der Zelllinie. Wie auch in der Chondrozytenzelllinie könnte eine Erklärung hierfür das häufige Passagieren der Zelllinie bei der Subkultivierung oder die Transfektion mit dem Simian Virus 40 sein.

In primären Synoviozyten, die aus der Membrana synovialis eines an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten kultiviert wurden, konnte keine TFF3-Expression nachgewiesen werden. Dies könnte damit erklärbar sein, dass die Primärzellen in der Zellkultur nicht mehr den „schädlichen Einflüssen und Substanzen“ ausgesetzt sind, denen sie im Rahmen der rheu-

matoiden Arthritis unterliegen und wieder die Charakteristika von „gesunden“ Synoviozyten annehmen, die kein TFF3 exprimieren. Eine mögliche andere Erklärung wäre, dass die Synoviozyten zum Zeitpunkt der Untersuchung möglicherweise bereits zu Fibroblasten oder anderen Zellen dedifferenziert waren, die kein TFF3 exprimieren.

Die Synoviozytenzelllinien K4IM aus der Membrana synovialis gesunder Spender und HSE aus der Membrana synovialis einer an rheumatoider Arthritis erkrankten Patientin wurden wie die Chondrozyten mit den Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert. TFF3 war sowohl in den stimulierten Zellen als auch in der unstimulierten Kontrolle nachweisbar. Eine Quantifizierung der TFF3-Konzentration mittels Real-time-PCR erbrachte trotz zahlreicher frustraner Versuche keine Ergebnisse, so dass im Rahmen dieser Arbeit keine quantitative Aussage über die TFF3-Produktion in kultivierten Synoviozyten nach Stimulation mit Zytokinen getroffen werden kann. Warum dieses Verfahren bei den Chondrozyten und Synoviozyten nicht funktioniert hat, bleibt unklar. In Zelllinien des Gastrointestinaltraktes ist der TFF3-Nachweis mittels Real-time-PCR ein etabliertes Verfahren (Babyatsky et al., 2009; Dossinger et al., 2008; Matsuda et al., 2008; Shimada et al., 2004). In weiteren Versuchen könnte eine Quantifizierung der TFF3-Produktion mittels ELISAs versucht werden. Vestergaard et al. (2002) entwickelten einen ELISA zur Detektion von TFF3 in humanem Serum. Möglicherweise würde mittels dieser Methode die Quantifizierung der TFF3-Produktion in Chondrozyten und Synoviozyten gelingen.

### 4.2.2 Septische Arthritis

Die Synoviozytenzelllinien K4IM aus der Membrana synovialis gesunder Spender und HSE aus der Membrana synovialis von an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten wurden wie die Knorpelzellen zur Simulation einer bakteriellen Infektion mit Bakterienzellwandbestandteilen (LPS, PGN, Überständen von *P. aeruginosa* und *S. aureus*) stimuliert. TFF3 war sowohl in den stimulierten Zellen als auch in der unstimulierten Kontrolle nachweisbar. Eine Quantifizierung dieser Ergebnisse ist wie bereits oben dargelegt nicht gelungen.

In der Membrana synovialis aus Kniegelenken gesunder Balb-c-Mäuse ist analog der Ergebnisse aus humaner Membrana synovialis keine TFF3-Produktion nachweisbar. Nach Stimulation mit *S. aureus* wird diese jedoch induziert.

Analog den Ergebnissen im Gelenkknorpel zeigen auch die Untersuchungen an der Membrana synovialis, dass TFF3 in gesunder Membrana synovialis nicht exprimiert wird, dass seine Produktion jedoch unter pathologischen Bedingungen wie bei der Arthrose, der rheumatoiden Arthritis oder bei bakteriellen Infektionen induziert wird.

### **4.3 Einfluss von rekombinantem TFF3 auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen**

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen bei der Zerstörung des Gelenkknorpels im Rahmen der Arthrose (Monfort et al., 2006) und anderer Arthritiden (Firestein et al., 1996; Nagase et al., 1996; Nagase et al., 1993) eine Schlüsselrolle. Ihre Expression wird in Chondrozyten durch Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  aktiviert (Fernandes et al., 2002; Vincenti et al., 2002) und durch ihre endogenen Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen, TIMPs) inaktiviert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Konzentration von MMP-3 in der unstimulierten Kontrolle primärer Chondrozyten gegenüber der Zelllinie erhöht ist. MMP-3 wird in Chondrozyten produziert und spielt v. a. im Frühstadium der Arthrose eine Rolle (Thibault et al., 2002). Die erhöhte Konzentration von MMP-3 in primären Chondrozyten könnte dadurch erklärbar sein, dass diese aus Knorpel, der makroskopisch gesund erscheint – sich also noch im Frühstadium der Arthrose befindet – generiert werden.

In Primärzellen führt die Stimulation mit rekombinantem TFF3 zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-1. MMP-1 wird in Chondrozyten und Synoviozyten produziert und gilt als die entscheidende Matrixmetalloproteinase in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (Kevorkian et al., 2004). Außerdem spielt MMP-1 durch den Abbau der Tripelhelix von Kollagenen einschließlich des Kollagentyps II eine wichtige Rolle bei der Knorpeldestruktion im Rahmen der Arthrose (Mitchell et al., 1996).

Auch MMP-3 wird in primären Chondrozyten nach Stimulation mit TFF3 konzentrationsabhängig aktiviert. MMP-3 sorgt durch Spaltung der Telopeptidregionen der Kollagentypen IX und XI für einen Zusammenbruch des Kollagennetzes und ist damit eine sehr frühe Erscheinung der Arthrose (Thibault et al., 2002).

Nach Stimulation mit TFF3 kommt es ferner zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MMP-13 in primären Chondrozyten. MMP-13 wird in Chondrozyten produziert und gilt als die entscheidende Matrixmetalloproteinase in der Pathogenese der Arthrose (Kevorkian et al., 2004). Durch ihre Fähigkeit zum Abbau der Tertiärstruktur von Proteinen mit Präferenz für Kollagen II (Knäuper et al., 1997), der Hauptkomponente der EZM in hyalinem Knorpel, spielt sie ebenfalls eine wichtige Rolle für die Knorpeldestruktion im Rahmen der Arthrose.

Die vorliegenden Befunde zeigen darüber hinaus, dass es durch Stimulation mit TFF3 in hoher Konzentration zur Inaktivierung von TIMP-1 in primären Chondrozyten kommt. Das dadurch vermittelte Überwiegen der knorpelabbauenden MMPs fördert die degenerativen Veränderungen im Rahmen der Arthrose.

Stimulationsversuche mit TFF3 zur Analyse des Einflusses von TFF3 auf die korneale Wundheilung haben ergeben, dass *in vivo* eine TFF3-Konzentration von 5,0 mg/ml TFF3 zur schnellsten Reepitheliasierung der Hornhautwunde führt, *in vitro* jedoch nur eine Konzentrati-

on von 0,1 mg/ml nötig ist, um einen vergleichbaren Effekt zu erzielen (Paulsen et al., 2008). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen in primären Chondrozyten, die als Monolayer kultiviert werden, durch TFF3: je höher die TFF3-Konzentration, desto höher die Aktivierung und damit Konzentration von Matrixmetalloproteinasen. Zur Interpretation dieser Ergebnisse wäre in weiteren Versuchen eine Bestimmung der TFF3-Konzentration im Gelenkknorpel von beispielsweise STR/Ort-Mäusen in verschiedenen Arthrostadien interessant, um eine mögliche Korrelation zwischen der TFF3-Konzentration und dem Schweregrad der Arthrose festzustellen.

Alle untersuchten Matrixmetalloproteinasen spielen im Rahmen der Pathogenese der Arthrose eine wichtige Rolle und sind an der Destruktion des Gelenkknorpels beteiligt. Stimulation primärer Chondrozyten mit TFF3 führt zu einer gesteigerten Expression aller untersuchten Matrixmetalloproteinasen mit Ausnahme von MMP-9 und somit zur Zerstörung des Gelenkknorpels.

Stimulationsexperimente der Chondrozytenzelllinie C28/I2 mit TFF3 zeigen keine eindeutigen Ergebnisse. Die Zelllinie scheint im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die Untersuchungen ungeeignet und ist nicht so repräsentativ für die Verhältnisse *in vivo* wie die kultivierten primären Chondrozyten, auch wenn sie in anderen Publikationen eingesetzt wurde (Fay et al., 2006; Lago et al., 2008; Parker et al., 2007).

In den unstimulierten Kontrollen arthrotischer Knorpelstanzen sind die Konzentrationen von MMP-1, MMP-9, MMP-13 und TIMP-1 gegenüber gesunden Knorpelstanzen deutlich erhöht. Somit werden alle untersuchten Matrixmetalloproteinasen mit Ausnahme von MMP-3 in arthrotischen Knorpelstanzen verstärkt exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit der Literatur und sind einleuchtend, da die Matrixmetalloproteinasen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arthrose spielen (Monfort et al., 2006). Sie werden somit verstärkt durch arthrotischen Gelenkknorpel produziert. Lediglich MMP-3 wird in arthrotischen Knorpelstanzen nicht stärker exprimiert als in gesunden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass sich die Knorpelstanzen in einem fortgeschrittenen Stadium der Arthrose befinden und MMP-3 als Enzym der frühen Arthrose (Thibault et al., 2002) deswegen nicht mehr verstärkt exprimiert wird.

In den Knorpelstanzen war kein Einfluss von TFF3 auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren nachweisbar. Möglicherweise konnte TFF3 unter den experimentellen Bedingungen nicht komplett in die Knorpelstanzen eindringen. *In vivo* wird der Knorpel durch die Belastung des Gelenks mechanisch beansprucht und durchgewalkt (Konvektion von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten), so dass Substanzen aus der Synovia besser zu den Chondrozyten gelangen können. In dieser Form scheinen die Knorpelstanzen ungeeignet für die Untersuchung zu sein. In weiteren Untersuchungen könnte der Versuch



unter anderen experimentellen Bedingungen, z.B. unter Druckbelastung, wiederholt werden, wie sie experimentell bereits durchgeführt wurden (Pufe et al., 2004; Scheerk et al., 2004). Die Degradierung von Gelenkknorpel ist ein wichtiges Merkmal der Arthrose (Hayami et al., 2004). Die Knorpelzerstörung wird hierbei durch Synthese und Freisetzung kataboler Substanzen wie proinflammatorischer Zytokine und Matrixmetalloproteinasen gefördert (Iannone et al., 2003). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass TFF3 durch die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen und die Inaktivierung deren Inhibitoren einen fördernden Einfluss auf die Pathogenese der Arthrose hat. Auch rheumatoide und septische Arthritiden gehen mit einer erhöhten Expression von Matrixmetalloproteinasen einher (Firestein et al., 1996; Nagase et al., 1996; Nagase et al., 1993). Es ist daher anzunehmen, dass TFF3 auch einen fördernden Einfluss auf die Pathogenese dieser Krankheitsbilder hat. Zur Untermauerung dieser Hypothese müsste in weiteren Untersuchungen zusätzlich der Einfluss von TFF3 auf die Produktion von Matrixmetalloproteinasen in Synoviozyten analysiert werden, die in der Pathogenese der beiden Krankheitsbilder von entscheidender Bedeutung sind. Im Fall der rheumatoiden Arthritis wäre dabei die Untersuchung der Expression von MMP-1, die als entscheidende Matrixmetalloproteinase bei der rheumatoiden Arthritis gilt (Kevorkian et al., 2004), von besonderem Interesse. In der Pathogenese der septischen Arthritis spielen MMP-2 und -9 (Chu et al., 2004), MMP-7 (Gjertsson et al., 2005), MMP-1, -3 und -13 (Kyburz et al., 2003) und außerdem MMP-10 und -11 (Kanangat et al., 2006) eine Rolle. Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von TFF3 auf die Pathogenese der septischen Arthritis wäre die Untersuchung der Expression der genannten Matrixmetalloproteinasen nach Stimulation mit TFF3 interessant.

#### **4.4 Einfluss von rekombinantem TFF3 auf die Apoptose von Chondrozyten**

Die Apoptose von Chondrozyten ist ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Arthrose (Blanco et al. 1989; Kouri et al., 2000; Lotz et al., 1999). Zwischen dem Schweregrad der Arthrose und dem Ausmaß chondrozytärer Apoptose besteht ein direkter positiver Zusammenhang (Kim et al., 2000; Thomas et al., 2007).

Um den Einfluss von TFF3 auf die Apoptose in Chondrozyten zu untersuchen, wurden primäre Chondrozyten 24 h mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  stimuliert. Diese Zytokine sind bei der Arthrose hochreguliert (Berenbaum et al., 2004; Goldring et al., 2000; Haringman et al., 2004) und haben eine proapoptotische Wirkung (Henrich et al., 2007; Kuzushima et al., 2006).

Nach zusätzlicher Stimulation der Chondrozyten mit TFF3 zeigte sich eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität und somit eine erhöhte Apoptoserate. TFF3 scheint also eine proapoptotische Wirkung auf Chondrozyten zu haben.

Um die vorliegenden Ergebnisse zu untermauern wurde eine zusätzliche Methode angewandt, bei der apoptotische Chondrozyten mittels Durchflusszytometrie detektiert werden.

Die Ergebnisse bei dieser Methode waren jedoch weniger eindrucksvoll und zeigten eine große Streuung der einzelnen Werte. Möglicherweise kam es bei der Ablösung der Zellen zur Zerstörung bereits apoptotischer Zellen, so dass diese bei der Messung nicht mehr mit erfasst werden konnten. Für adhärent wachsende Zellen scheint also das Caspase-3/7 Assay ein genaueres Verfahren zur Erfassung der Apoptose als das Annexin-V Assay zu sein. Die antiapoptotische und protektive Wirkung von TFF3 an Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes ist schon seit längerem bekannt (Kinoshita et al., 2000; Taupin et al., 2000). Für die Wundheilung an der Kolonschleimhaut ist TFF3 essentiell (Taupin et al., 2000). Nach Verletzungen an der Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt beschleunigen die sofort hochregulierten TFF-Peptide durch Förderung der Zellmigration die Wundheilung (Dignass et al., 1994; Sands et al., 1996). Möglicherweise hat TFF3 auch einen Einfluss auf die Zellmigration im Gelenkknorpel. Im Rahmen der Arthrose lagern sich die Chondrozyten zu „Clustern“ zusammen. Diese Zellbewegungen könnten durch TFF3 vermittelt sein. Paulsen et al. (2008) zeigen, dass auch in der avaskulären Kornea, die im gesunden Zustand kein TFF3 produziert, nach Epithelverletzungen eine ausgeprägte TFF3-Expression induziert wird. Auch hier hat TFF3 durch Verbesserung der Reepitheliasierung einen fördernden Einfluss auf die Wundheilung (Paulsen et al., 2008). Weiterhin fördert TFF3 die Migration bronchialer Epithelzellen und beschleunigt so die Wundheilung im Respirationstrakt (Oertel et al., 2001). Taupin et al. (2002) beschreiben die antiapoptotischen Eigenschaften von TFF3, die in verschiedenen gastrointestinalen Zelllinien und im normalen Darmepithel nachgewiesen wurden.

Die dargelegten Befunde zeigen – ganz im Gegensatz zu den Erwartungen – dass die beschriebene protektive Funktion von TFF3 im Gelenkknorpel und in der Membrana synovialis nicht bestätigt werden kann. Sie zeigen vielmehr, dass TFF3 durch eine proapoptotische Wirkung und einen beschleunigten Abbau extrazellulärer Matrix durch gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteinasen sowie verminderte Expression derer Inhibitoren ein negativer Faktor in der Pathogenese der Arthrose ist. Die Befunde lassen ferner vermuten, dass TFF3 auch an der Pathogenese der septischen und der rheumatoiden Arthritis beteiligt ist. Im Hinblick auf diese Hypothese wäre in weiteren Untersuchungen die Analyse des Einflusses von TFF3 auf die Apoptose in Synoviozyten interessant.

Die antiapoptotischen Eigenschaften von TFF-Peptiden im Gastrointestinaltrakt sind bereits seit längerem bekannt (Chen et al., 2000; Hoffmann et al., 2002; Kinoshita et al., 2000; Taupin et al., 2000). Kürzlich konnte jedoch eine proapoptotische Wirkung von TFF2 in der Retina nachgewiesen werden (Dünker et al., 2009). Ebenso zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine proapoptotische Wirkung von TFF3 auf humane Knorpelzellen. Diese unterschiedlichen TFF3-Effekte könnten durch unterschiedliche Rezeptortypen in den ver-

schiedenen Geweben erklärbar sein. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass TFF-Peptide ihre Wirkung im Gastrointestinaltrakt über Rezeptoren an der Zelloberfläche vermitteln (Frandsen et al., 1998; Poulsen et al., 2005; Poulsen et al., 2003; Poulsen et al., 1998). Weiterhin konnten potentielle Bindungsstellen für Rezeptoren in allen TFF-Peptiden nachgewiesen werden (Carr et al., 1994; De et al., 1994). Obwohl bekannt ist, dass TFF-Peptide ihre Wirkung über die Aktivierung von Signalwegen vermitteln (Emami et al., 2004; Hoffmann, 2005) und auch verschiedene Bindeproteine für TFF-Peptide identifiziert wurden (Chinery et al., 1995; Otto et al., 2006; Tan et al., 1997; Thim et al., 2000), konnte lange kein Rezeptor mit der Signaltransduktion von TFF-Peptiden in direkte Verbindung gebracht werden. Erst kürzlich wiesen Dubeykovskaya et al. (2008) zum ersten Mal einen TFF-Rezeptor nach, indem sie zeigen, dass TFF2 seine Wirkung in epithelialen und lymphozytischen Zelllinien über den CXCR4-Rezeptor vermittelt und so Signalwege induziert, die eine wichtige Rolle bei der Migration und Proliferation der Zellen spielen. Für TFF3 konnte bislang kein Rezeptor nachgewiesen werden. Taupin et al. (2000) zeigen, dass TFF3 in Zelllinien des Kolons über eine Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase den Zelltod verhindert. Weiterhin zeigen Rivat et al. (2005), dass TFF3 in kolorektalen Zelllinien über eine Aktivierung des STAT3-Signalwegs invasives Wachstum der Zellen unterstützt. Möglicherweise wirkt TFF3 in Zellen des Gastrointestinaltraktes über Rezeptoren, die das Überleben der Zellen fördern und im Gegensatz dazu im Knorpelgewebe über Rezeptoren, die die Induktion von Apoptose begünstigen. Es wäre daher von großer Bedeutung, in weiteren Untersuchungen Rezeptoren für TFF3 zu identifizieren.

#### **4.5 Ausblick und Perspektiven**

Im Gegensatz zu den Erwartungen scheint TFF3 im Extremitätengelenk keine protektiven und antiapoptotischen Eigenschaften zu haben, wie sie in Schleimhäuten beschrieben werden. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass TFF3 durch eine verstärkte Expression knorpeldegradierender Matrixmetalloproteinasen sowie eine proapoptotische Wirkung auf Chondrozyten einen zusätzlichen Faktor in der Pathogenese der Arthrose und der septischen Arthritis bildet und dass somit TFF3-Antagonisten wie anti-TFF3-Antikörper als potentiell Therapeutikum bei degenerativen Erkrankungen des Gelenkknorpels zum Einsatz kommen könnten.

Die vorliegenden Ergebnisse stellen einen von Steven et al. (2004) und Paulsen et al. (2008) an der Augenoberfläche erhobenen therapeutischen Nutzen von TFF3 in Frage. Steven et al. (2004) werten die Induktion der TFF3-Expression bei Erkrankungen der Kornea als Protektionsmechanismus gegen progressive Gewebeerstörung und stellen die Hypothese auf, dass TFF3 aufgrund seiner antiapoptotischen und motogenen Funktionen den Selbstheilungsprozess bei kornealen Erkrankungen fördert. Paulsen et al. (2008) beschreiben eine Förderung

der Wundheilung an der Kornea durch TFF3 und untermauern einen therapeutischen Nutzen von TFF3 bei kornealen Verletzungen durch topische Applikation. Aufgrund der gezeigten proapoptischen Wirkung von TFF3 auf primäre Chondrozyten sollte dieses Therapiekonzept in neuen Untersuchungen genau überprüft werden. Möglicherweise sind die verschiedenen Effekte von TFF3 in der Kornea und im Gelenkknorpel aber auch dadurch erklärbar, dass es sich bei der Arthrose um eine chronisch-degenerative Erkrankung und bei der Wundheilung um ein akutes Geschehen handelt. Dies muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Arthrose handelt es sich um eine Degeneration des Knorpelgewebes mit sekundärer Knochenläsion und entzündlich bedingter Schrumpfung der Gelenkkapsel. Ursächlich für die pathologischen Veränderungen werden u. a. die proinflammatorischen Zytokine  $IL-1\beta$  und  $TNF\alpha$  sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) angesehen, die zu einem Abbau von Gelenknorpel führen.

Den in mukösen Sekreten vorkommenden Trefoil-Factor-Family-Peptiden werden protektive und regenerative Funktionen an Schleimhäuten zugeschrieben. Gut untersucht ist ihre Bedeutung v. a. im Gastrointestinaltrakt; sie werden aber auch in vielen anderen Schleimhäuten gebildet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte TFF3 im Gelenknorpel sowie in der Membrana synovialis nachgewiesen werden. Dabei kommt TFF3 in gesundem Gelenknorpel und in gesunder Membrana synovialis nicht vor; seine Expression wird jedoch unter den pathologischen Bedingungen der Arthrose oder der septischen Arthritis in den beiden Geweben induziert.

Matrixmetalloproteinasen spielen bei der Zerstörung des Gelenknorpels im Rahmen der Arthrose und anderer Gelenkerkrankungen eine Schlüsselrolle. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass rekombinantes TFF3 die Expression von Matrixmetalloproteinasen in primären Chondrozyten fördert und somit die Pathogenese der Arthrose unterhält.

Interessanterweise zeigen die vorliegenden Ergebnisse zum ersten Mal eine proapoptotische Wirkung von TFF3 auf Chondrozyten.

Somit kommen TFF3 im Gelenknorpel und in der Membrana synovialis nicht die protektiven und wundheilungsfördernden Funktionen zu, die in Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes lange bekannt sind. Vielmehr zeigt sich, dass TFF3 durch eine verstärkte Expression knorpeldegradierender Matrixmetalloproteinasen sowie eine proapoptotische Wirkung auf Knorpelzellen ein zusätzlicher Faktor in der Pathogenese der Arthrose ist. Die Befunde lassen weiterhin vermuten, dass TFF3 auch an der Pathogenese der septischen Arthritis beteiligt ist.

## **6**     **Literaturverzeichnis**

**Aicher** WK, Dinkel A, Grimbacher B, Haas C, v. Seydlitz-Kurzbach E, Peter HH, Eibel H. Serum response elements activate and cAMP responsive elements inhibit expression of transcription factor Egr-1 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients. *Int Imm.* 1999;11(1):47-61.

**Aigner** T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DANN-array technology. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2777-89.

**Babyatsky** M, Lin J, Yio X, Chen A, Zhang JY, Zheng Y, Twyman C, Bao X, Schwartz M, Thung S, Lawrence Werther J, Itzkowitz S. Trefoil factor-3 expression in human colon cancer liver metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26:143-51.

**Baus-Loncar** M, Giraud AS. Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:2921-31.

**Berenbaum** F. Signaling transduction. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:616-22.

**Blanco** FJ, Guitian R, Vázquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum.* 1998;41: 284-9.

**Carr** MD, Bauer CJ, Gradwell MJ, Feeney J. Solution structure of a trefoil-motif-containing cell growth factor, porcine spasmodic protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:2206-10.

**Carreño Pérez** L. Septic arthritis. *Baillière`s Clinical Rheumatol.* 1999;13(1):37-58.

**Chambers** MG, Bayliss MT, Mason RM. Chondrocyte cytokine and growth factor expression in murine osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage.* 1997;5(5):301-8.

**Chen** YH, Lu Y, De Plaen IG, Wang LY, Tan XD. Transcription factor NF-kappaB signals antianoinic function of trefoil factor 3 on intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;274(3):576-82.

**Chinery** R, Cox HM. Immunoprecipitation and characterization of a binding protein specific for the peptide, intestinal trefoil factor. *Peptides* 1995;16:749-55.

**Chu** SC, Yang SF, Lue KH, Hsieh YS, Lin ZI, Lu KH. Clinical significance of gelatinases in septic arthritis of native and replaced knees. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427:179-83.

**Chwieralski** CE, Schnurra I, Thim L, Hoffmann W. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31:528-37.

**Clyne M**, Dillon P, Daly S, O'Kennedy R, May FE, Westley BR, Drumm B. Helicobacter pylori interacts with the human single-domain trefoil protein TFF1. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:7409-14.

**Cole AA**, Chubinskaya S, Schumacher B, Huch K, Cs-Szabo G, Yao J. Chondrocyte matrix metalloproteinase-8. Human articular chondrocytes express neutrophil collagenase. J Biol Chem. 1996;271:11023-6.

**Cook GA**, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. FEBS Lett. 1999;456:155-9.

**De A**, Brown DG, Gorman MA, Carr M, Sanderson MR, Freemont PS. Crystal structure of a disulfide-linked "trefoil" motif found in a large family of putative growth factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:1084-8.

**Devine DA**, High AS, Owen PJ, Poulsom R, Bonass WA. Trefoil factor expression in normal and diseased human salivary glands. Hum Pathol. 2000;31:509-15.

**Dignass A**, Lynch-Devaney K, Kindon H, Thim L, Podolsky DK. Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor  $\beta$ -independent pathway. J Clin Invest. 1994;94:376-83.

**Dossinger V**, Kayademir T, Blin N, Gött P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. Cell Physiol Biochem. 2002;12:197-206.

**Dubeykovskaya Z**, Dubeykovskiy A, Solal-Cohen J, Wang TC. Secreted Trefoil Factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. J Biol Chem. 2009;6:3650-62.

**Dünker N**, Paunke-Görgülü AN, Franke AG, Paulsen F. Expression and pro-apoptotic effect of TFF2 (trefoil family factor2) in the murine retina (eingereicht).

**Emami S**, Le Floch N, Bruyneel E. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. FASEB J. 2001;15:351-61.

**Emami S**, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. Peptides 2004;25:885-98.

**Farahat MN**, Yanni G, Poston R, Panayi GS. Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Ann Rheum Dis. 1993;52:870-5.

**Fay J**, Varoga D, Wruck CJ, Kurz B, Goldring MB, Pufe T. Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants. Arthritis Res Ther. 2006;8(6):189.

**Fernandes** JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39(1-2):237-46.

**Firestein** GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Kelly WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB. *The text book of rheumatology*, 5<sup>th</sup> ed. 1996; Saunders, Philadelphia:851-97.

**Flannelly** J, Chambers MG, Dudhia J, Hembry RM, Murphy G, Mason RM. Metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in the murine STR/Ort model of osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage* 2002;10:722-3.

**Frandsen** EK. Receptor binding of pancreatic spasmolytic polypeptide in intestinal mucosal cells and membranes. *Regul Pept.* 1988;20:45-52.

**Gjertsso** I, Innocenti M, Matrisian LM, Tarkowski A. Metalloproteinase-7 contributes to joint destruction in *Staphylococcus aureus* induced arthritis. *Microb Pathog.* 2005;38(2-3):97-105.

**Göke** MN, Cool JR, Kunert KS, Fini ME, Gipson IK, Podolsky DK. Trefoil peptides promote restitution of wounded corneal epithelial cells. *Exp Cell Res.* 2001;264:337-44.

**Goldring** MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;1(5):817-29

**Goldring** MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbiser JL, Apperley JF. Interleukin-1beta, modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest.* 1994;99:2307-16.

**Granness** A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. Protein Kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Interleukin-6 (IL-6) and IL-8 Secretion. *J Biol Chem.* 2002;277(21):18440-6.

**Haas** C, Aicher WK, Dinkel A, Peter HH, Eibel H. Characterization of SV40 T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol Int.* 1997;16:241-7.

**Harahoui** B, Pelletier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: in vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum.* 1991;34:153-63.

**Haringman** JJ, Ludikhuizen J, Tak PP. Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum.* 2004;63:1186-94.



**Hauser F**, Poulsom R, Chinery R, Rogers LA, Hanby AM, Wright NA, Hoffmann W. hP1.B, a human P-domain peptide homologous with rat intestinal trefoil factor, is expressed also in the ulcer-associated cell lineage and the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6961-5.

**Hayami T**, Pickarski M, Wesolowski GA, MClane J, Bone A, Destefano J. The role of subchondral bone remodelling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transaction model. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1193-206.

**Henrich D**, Seebach C, Wilhelm K, Marzi I. High dosage of simvastatin reduces TNF-alpha-induced apoptosis of endothelial progenitor cells but fails to prevent apoptosis induced by Il-1beta in vitro. *J Surg Res*. 2007;142(1):13-9.

**Hinz M**, Schwegler H, Chwieralski CE, Laube G, Linke R, Pohle W, Hoffmann W. Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides* 2004;25(5):827-32.

**Hoffmann W**. TFF (trefoil factor family peptides). *Handbook of biologically active peptides 2006*; Elsevier/Acad. Press, Amsterdam:1147-54.

**Hoffmann W**. TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:2932-8.

**Hoffmann W**, Jagla W. Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol*. 2002;213:147-81.

**Hoffmann W**, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol*. 2001;16:319-34.

**Hultgren OH**, Stenson M, Tarkowski A. Role of Il-12 in Staphylococcus aureus-triggered arthritis and sepsis. *Arthritis Res*. 2001;3:41-7.

**Iannone F**, Lapadula G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res*. 2003;15:364-72.

**Imhoff AB**, Baumgartner R, Linke RD. *Checkliste Orthopädie*. 2006; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart:128.

**Jagla W**, Wiede A, Dietzmann K, Rutkowski K, Hoffmann W. Co-localization of TFF3 peptide and oxytocin in the human hypothalamus. *FASEB J*. 2000;14:1126-31.

**Jagla W**, Wiede A, Hinz M, Dietzmann K, Gülicher D, Gerlach KL, Hoffmann W. Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. *Cell Tissue Res.* 1999;298: 161-6.

**Josefson E**, Tarkowski A. Staphylococcus aureus-induced inflammation and bone destruction in experimental models of septic arthritis. *J Periodontal Res.* 1999; 34:387-92.

**Junqueira C.** Histologie, 3. Auflage. 2001; Springer-Verlag, Heidelberg.

**Kanangat S**, Postlethwaite A, Hasty K, Kang A, Smeltzer M, Appling W, Schaberg D. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by Staphylococcus aureus: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(6):176.

**Kevekian L**, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SMV, Edwards DR, Parker AE, Clark IM. Expression Profiling of Metalloproteinases and their Inhibitors in Cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):4074-5.

**Kim HA**, Lee YJ, Seong SC, Choe KW, Song YW. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2000;27:455-62.

**Kinoshita T**, Taupin DR, Itoh H, Podolsky DK. Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithel injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol Cell Biol.* 2000;20:4680-90.

**Knäuper V**, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996;271:1544-50.

**Kontinen YT**, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, et al. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:691–7.

**Kouri JB**, Aguilera JM, Reyes J, Lozoya KA, Gonzalez S. Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2000;27:455-62.

**Kouznetsova I**, Peitz U, Vieth M, Meyer F, Vestergaard EM, Malferteiner P, Roessner A, Lippert H, Hoffmann W. A gradient of TFF3 (trefoil factor family 3) peptide synthesis within the normal human gastric mucosa. *Cell Tissue Res.* 2004; 316:155–65.

**Krämer J**, Grifka J, Rubenthaler F, Wiese M, Willburger R, Perlick L, Kalteis T, Tingart M, Rößler A. Orthopädie, 7. Auflage. 2005; Springer-Verlag, Heidelberg:110-20.

**Kuzushima M**, Mogi M, Togari A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: involvement of p38MAP kinase. *Arch Oral Biol.* 2006;51(11):1048-53.

**Kyburz D**, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Gay RE, Carson DA, Gay S. Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum.* 2003;48:642-50.

**Lago R**, Gomez R, Otero M, Lago F, Gallego R, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. A new player in cartilage homeostasis: adiponectin induces nitric oxide synthase type II and pro-inflammatory cytokines in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16(9):1101-9.

**Lalani EN**, Williams R, Jayaram Y, Gilbert C, Chaudhary KS, Sku LS, Koumarianou A, Playford R, Stamp GWH. *Lab Invest.* 1999;79:537-49.

**Langer G**, Walter S, Behrens-Baumann W, Hoffmann W. TFF-Peptide: neue Mukus-assoziierte Sekretionsprodukte der Konjunktiva. *Ophthalmologie* 2001;98:976-9.

**Langer G**, Jagla W, Behrens-Baumann W, Walter S, Hoffmann W. Secretory peptides TFF1 and TFF3 synthesized in human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2220-4.

**Leonhard H**. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, 8. Auflage. 1990; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart:133-7.

**Lohmander LS**, Roos H, Dahlberg L, Hoerrner LA, Lark MW. Temporal patterns of stromelysin-1, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury to the cruciate ligament or meniscus. *J Orthop Res.* 1994;12:21-8.

**Lotz M**, Hashimoto S, Kühn K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(4):389-91.

**Lüllmann-Rauch R**. Histologie. 2003;Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart:115-21.

**Mason RM**, Chambers MG, Flanelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage* 2001;9(2):85-91.

**Matsuda K**, Yamauchi K, Matsumoto T, Sano K, Yamaoka Y, Ota H. Quantitative analysis of the effect of *Helicobacter pylori* on the expression of SOX2, CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(1):25-33.

**Mitchell PJ**, Magna HA, Reeves LM, Lopresti-Morrow LL, Yocum SA, Rosner PJ. Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1996;97:761-8.

**Modlin** IM, Poulsom R. Trefoil peptides: mitogens, motogens or mirages? *J Clin Gastroenterol.* 1997;25:94-100.

**Monfort** J, Garcia-Giralt N, López-Armada M, Monllau JC, Bonilla A, Benito P, Blanco FJ. Decreased metalloproteinase production as a response to mechanical pressure in human cartilage: a mechanism for homeostatic regulation. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:149.

**Mohtai** M, Smith RL, Schurman DJ, Tsuji Y, Torti FT, Hutchinson NI. Expression of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *J Clin Invest.* 1993; 92:79-85.

**Murphy** G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* 2002;4:39-49.

**Nagase** H, Okada Y. Proteinases and matrix degeneration. In: Kelly WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB. *The text book of rheumatology*, 5<sup>th</sup> ed. 1996;Saunders, Philadelphia:851-97.

**Nagase** H, Woessner JF jr. Role of endogenous proteinases in the degradation of cartilage matrix. In:Woessner JF jr, Howell DS. *Joint cartilage degradation.* 1993; Marcel Dekker, New York:159-85.

**Nagase** H, Ogata Y, Suzuki K, Engchild JJ, Salvesen G. Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biochem Soc Trans.* 1991;19: 715-8.

**Niethard** FU, Pfeil J. *MLP Duale Reihe Orthopädie*, 5. Auflage. 2005; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart:184-9.

**Oertel** M, Graness A, Thim L, Bühling F, Kalbacher H, Hoffmann W. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25:418-24.

**Okada** Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, et al. Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. *Lab Invest.* 1992;66:680-90.

**Otto** WR, Patel K, McKinnell I, Evans MD, Lee CY, Frith D, Hanrahan S, Blight K, Blin N, Kayademir T, Poulsom R, Jeffery R, Hunt T, Wright NA, McGregor F, Oien KA. Identification of blottin: a novel gastric trefoil factor family-2 binding protein. *Proteomics* 2006;6:4235-45.

**Parker** WL, Finson KW, Soe-Lin H, Knaus P, Philip A. Expression and function of TbetaRII-B, a variant of the type II TGF-beta receptor, in human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(4):442-53.

**Paulsen F**, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jäger K, Amm M, Podolsky DK, Steven P, Barker NP, Sel S. Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13418-27.

**Paulsen F**, Jäger K, Worlitzsch D, Bräuer L, Schulze U, Schäfer G, Sel S. Regulation of MUC16 by inflammatory mediators in ocular surface epithelial cell lines. *Ann Anat.* 2008;190:59-70.

**Paulsen F**, Hinz M, Schaudig U, Thale A, Hoffmann W. TFF peptides in the human efferent tear ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(11):3359-64.

**Paulsen F**, Pufe T, Conradi L, Varoga D, Tsokos M, Papendieck J, Petersen W. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *J Pathol.* 2002;198:369-77.

**Pelletier JP**, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease. *Arthritis Rheum.* 2001;44(6):1237-47.

**Podolsky DK**, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, DeBeaumont M, Sands BE, Mahida YR. Identification of human intestinal trefoil factor: goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem.* 1993; 268:6694-702.

**Poulsen SS**, Thulesen J, Nexø E, Thim L. Distribution and metabolism of intravenously administered trefoil factor 2/porcine spasmolytic polypeptide in the rat. *Gut* 1998; 43:240-7.

**Poulsen SS**, Thulesen J, Hartmann B, Kissow HL, Nexø E, Thim L. Injected TFF1 and TFF3 bind to TFF2-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract in rats. *Regul Pept.* 2003;115:91-9.

**Poulsen SS**, Kissow H, Hare K, Hartmann B, Thim L. Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat. *Regul Pept.* 2005; 126:163-71.

**Poulsom R**, Hanby AM, Lalani E-N, Hauser F, Hoffmann W, Stamp GWH. Intestinal trefoil factor (TFF3) and pS2 but not spasmolytic polypeptide are coexpressed in normal, hyperplastic and neoplastic human breast epithelium. *J Pathol.* 1997;183:30-8.

**Puhl W**. Volkskrankheit Arthrose. *Future Special Sci.* 1996;1:12-9.

**Reeves EP**, Ali T, Leonard P, Hearty S, O`Kennedy R, May FE, Westley BR, Josenhans C, Rust M, Suerbaum S, Smith A, Drumm B, Clyne M. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide interacts with TFF1 in a pH-dependent manner. *Gastroenter.* 2008;135:2043-54.

**Riede** UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie, 3. Auflage. 1993; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart:1146.

**Rivat** C, Rodrigues S, Bruyneel E, Pietu G, Robert A, Reduilh G, Bracke M, Gespach C, Attoub S. Implication of STAT3 Signaling in human colonic cancer cells during intestinal trefoil factor 3 (TFF3) – and vascular endothelial growth factor–mediated cellular invasion and tumor growth. *Cancer Res.* 2005;65:195-202.

**Ryan** MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL. Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. *Br J Rheumatol.* 1997;36:370-3.

**Sáez-Llorens** X, Jafari HS, Olsen KD, Nariuchi H, Hansen EJ, McCracken GH Jr. Induction of suppurative arthritis in rabbits by *Haemophilus* endotoxin, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *J Infect Dis.* 1991;163(6):1267-72.

**Sands** BE, Podolsky DK. The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol.* 1996;58:253-73.

**Schwarz** H, Jagla W, Wiede A, Hoffmann W. Ultrastructural co-localization of TFF3-peptide and oxytocin in the neural lobe of the porcine pituitary. *Cell Tissue Res.* 2001;305:411-6.

**Seib** T, Blin N, Hilgert K, Seifert M, Theisinger B, Engel M, Dooley S, Zang KD, Welter C. The three human trefoil genes TFF1, TFF2 and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 21q22.3. *Genomics* 1997;40:200-2.

**Shimada** T, Koitabashi A, Fujii Y, Hashimoto T, Hosaka K, Tabei K, Namatame T, Yoneda M, Hiraishi H, Terano A. PPARgamma mediates NSAIDs-induced upregulation of TFF2 expression in gastric epithelial cells. *FEBS Lett.* 2004;558:33-8.

**Shlopov** BV, Lie WR, Mainardi CL, Cole AA, Chubinskaya S, Hasty KA. Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum.* 1997;40:2065-74.

**Simmons** EJ, Bertone AL, Weisbrode SE. Instability-induced osteoarthritis in the metacarpophalangeal joint of horses. *Am J Vet Res.* 1999;60:7-13.

**Spector** TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D. Genetic influences of osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996;312:940-3.

**Stanton** H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005;434:648-52.

**Stephenson** ML, Goldring MB, Birkhead JR, Krane SM, Rahmsdorf HJ, Angel P. Stimulation of procollagenase synthesis parallels increases in cellular procollagenase mRNA in human articular chondrocytes exposed to recombinant interleukin-1 $\beta$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;144:583-90.

**Steven** P, Schäfer G, Nolle B, Hinz M, Hoffmann W, Paulsen F. Distribution of TFF peptides in corneal disease and pterygium. *Peptides* 2004;25(5):819-25.

**Tan** XD, Hsueh W, Chang H, Wei KR, Gonzalez-Crussi F. Characterization of a putative receptor for intestinal trefoil factor in rat small intestine: identification by in situ binding and ligand blotting. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:673-7.

**Taupin** DR, Podolsky DK. Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenter.* 1999;116:1072-80.

**Taupin** DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(2):799-804.

**Tetlow** LC, Adlam DJ, Woolley DE. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 2001;44:585-94.

**Thibault** M, Poole AR, Buschmann MD. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res.* 2002;20:1265-73.

**Thim** L, Wöldike HF, Nielsen PF, Christensen M, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Characterization of human and rat intestinal trefoil factor produced in yeast. *Biochem.* 1995;34:4757-64.

**Thim** L. Trefoil peptides: from structure to function. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53:888-903.

**Thim** L, Mortz E. Isolation and characterization of putative trefoil peptide receptors. *Regul Pept.* 2000;90:61-8.

**Thim** L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:519-27.

**Thim** L, May FEB. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:2956-73.

**Thomas C.** Histopathologie. Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie, 13. Auflage. 2001; Schattauer-Verlag, Stuttgart:393-5.

**Thomas CM, Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M.** Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(1):27-34.

**Varoga D, Pufe T, Harder J, Meyer-Hoffert U, Mentlein R, Schröder JM, Petersen WJ, Tillmann B, Proksch E, Goldring MB, Paulsen F.** Production of Endogenous Antibiotics in Articular Cartilage. *Arthritis Rheum.* 2004;50(11):3526-34.

**Varoga D, Pufe T, Harder J, Schröder JM, Mentlein R, Meyer-Hoffert U, Goldring MB, Tillmann B, Hassenpflug J, Paulsen F.** Human  $\beta$ -defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis Rheum.* 2005;52(6):1736-45.

**Vestergaard EM, Poulsen SS, Gronbek H, Larsen R, Mertz Nielsen A, Ejksjer K, Clausen JT, Thim L, Nexø E.** Development and Evaluation of an ELISA for Human trefoil factor 3. *Clin Chem.* 2002;48:1689-95.

**Vincenti MP, Brinckerhoff CE.** Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis : integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002;4:157-64.

**Wiede A, Jagla W, Welte T, Köhnlein T, Busk H, Hoffmann W.** *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:1330-5.

**Williams GR, Wright NA.** Trefoil family domain peptides. *Virchows Arch.* 1997;431(5):299-304.

**Wright NA.** Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1998;353(1370):925-33.

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

**Xia HH, Yang Y, Lam SK, Wong WM, Leung SY, Yuen ST, Elia G, Wright NA, Wong BC.** Aberrant epithelial expression of trefoil family factor 2 and mucin 6 in *Helicobacter pylori* infected gastric antrum, incisura, and body and its association with antralisation. *J Clin Pathol.* 2004;57:861-6.

**Xu Y, Rivas JM, Brown EL, Liang X, Höök M.** Virulence potential of the staphylococcal adhesion CAN in experimental arthritis is determined by its affinity for pcollagen. *J Infect Dis.* 2004;189:2323-33.



## Literaturverzeichnis

**Yoshihara**, Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:455-61.

**Zilch** H, Weber U. Lehrbuch Orthopädie mit Repetitorium. 1989; Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York.

## 7 Thesen

1. Das Trefoil-Factor-Family-Peptid 3 (TFF3) hat vielfältige physiologische Funktionen und kommt in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers vor. Bekannt sind v. a. seine protektiven, regenerativen und antiapoptotischen Eigenschaften im Gastrointestinaltrakt.
2. Als Arthrose bezeichnet man eine degenerative Gelenkerkrankung, bei der es zu einer Zerstörung des Gelenkknorpels mit sekundärer Knochenläsion und entzündlich bedingter Schrumpfung der Gelenkkapsel kommt.
3. TFF3 ist in gesundem Gelenkknorpel und in gesunder Membrana synovialis nicht nachweisbar.
4. In arthrotischem Gelenkknorpel sowie arthrotischer Membrana synovialis ist TFF3 nachweisbar. TFF3 ist ein induzierbares Gen im Gelenkknorpel und der Membrana synovialis, das unter den pathologischen Bedingungen der Arthrose exprimiert wird.
5. Im Rahmen der Arthrose sind die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  hochreguliert. Diese Zytokine induzieren in kultivierten Chondrozyten eine hohe Expression von TFF3.
6. Der Zustand einer septischen Arthritis wird durch Stimulation mit Bestandteilen von Bakterienzellwänden sowie Überständen von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* simuliert. Unter diesen Bedingungen ist TFF3 im Gelenkknorpel und der Membrana synovialis nachweisbar. Die TFF3-Expression wird also auch unter den pathologischen Bedingungen der septischen Arthritis induziert.
7. Möglicherweise ermöglicht TFF3 die Bindung bestimmter Bakterienbestandteile an die Chondrozyten und ist so ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der septischen Arthritis.
8. Bei der rheumatoiden Arthritis steht eine Entzündung der Membrana synovialis im Mittelpunkt des Krankheitsgeschehens. In der Membrana synovialis von Patienten mit rheumatoider Arthritis wird TFF3 ebenfalls exprimiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass TFF3 einen Faktor in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis bildet.
9. In Chondrozyten- und Synoviozytenzelllinien kann TFF3 auch unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Möglicherweise wird die TFF3-Produktion durch das häufige Passagieren der Zelllinie bei der Subkultivierung oder durch die Transfektion der Zelllinien mit dem Simian Virus 40 induziert.
10. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arthrose. Ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihren Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases=TIMPs) führt zur Knorpeldestruktion. TFF3 reguliert die Produktion von MMPs und TIMPs im Gelenkknorpel.

11. In kultivierten Chondrozyten zeigt sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung der in die Pathogenese der Arthrose involvierten Matrixmetalloproteinasen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 nach Stimulation mit rekombinantem TFF3 sowie eine Inaktivierung von TIMP-1 durch hohe TFF3-Konzentrationen. Durch die Aktivierung von MMPs und die Inaktivierung deren Inhibitoren hat TFF3 einen fördernden Einfluss auf die Pathogenese der Arthrose.
12. Auch die septische und die rheumatoide Arthritis gehen mit einer erhöhten Expression von MMPs einher. Es ist daher anzunehmen, dass TFF3 auch einen fördernden Einfluss auf die Pathogenese dieser Krankheitsbilder hat.
13. Die Aktivierung von MMPs in kultivierten Chondrozyten durch rekombinantes TFF3 ist konzentrationsabhängig. Möglicherweise besteht *in vivo* ein Zusammenhang zwischen der TFF3-Konzentration im Gelenk und dem Schweregrad der Arthrose
14. Die unterschiedliche Wirkung auf Apoptose in Chondrozyten und Zellen des Gastrointestinaltraktes von TFF3 könnte durch unterschiedliche Rezeptortypen in den verschiedenen Geweben erklärbar sein. Bislang ist noch kein Rezeptor für TFF3 bekannt.
15. TFF3 scheint durch eine verstärkte Expression knorpelzerstörender MMPs sowie eine proapoptotische Wirkung auf Chondrozyten einen zusätzlichen Faktor in der Pathogenese der Arthrose zu bilden.
16. TFF3-Antagonisten wie anti-TFF3-Antikörper könnten als potentiell Therapeutikum bei degenerativen Erkrankungen des Gelenkknorpels zum Einsatz kommen.

## Lebenslauf

### **Sophie Rösler**

Geburtsdatum: 12.11.1982  
Geburtsort: Scherzingen (Schweiz)  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung**

08/1989-06/2002 nach Schulzeit in Konstanz und Berlin Abitur an der Shadow-Oberschule Berlin  
08/1999-07/2000 Auslandsschuljahr an der Homestead High School in Mequon, Wisconsin (USA) im Rahmen eines Austauschprogramms des American Field Service

### **Studium**

10/2002- 06/2009 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
09/2004 Ärztliche Vorprüfung  
06/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### **Famulaturen**

03/2005	Kardiologie	Universitätsklinikum Greifswald
07/2005	Innere Medizin	Praxisfamulatur Berlin
08/2005	Pädiatrie	Praxisfamulatur Berlin
08-09/2006	Innere Medizin/ Gyn. und Geburtshilfe	Ndolage-Hospital Kamachumu (Tansania)
02/2007	Gyn. und Geburtshilfe	Waldfriede-Krankenhaus Berlin

### **Praktisches Jahr**

08-12/2007	Innere Medizin	BG Kliniken Bergmannstrost Halle
12/2007-03/2008	Chirurgie	Hospital Virgen de la Vega Salamanca (Spanien)
04-07/2008	Gyn. und Geburtshilfe	Kantonsspital Winterthur (Schweiz)

## **Sonstige fachspezifische Aktivitäten**

- |            |   |
|------------|---|
| 11/2004    | Beginn der vorliegenden Dissertation  |
| 03-11/2006 | Mitarbeit an der deutschen Übersetzung des Lehrbuches <i>Gray's Anatomie für Medizinstudenten</i> |

## **Hinweise auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit**

### **Zitierfähige Abstracts**

1. Claassen H, Haase T, Rösler S, Varoga D, Brandt J, Müller-Hilke B, Goldring M, Paulsen FP. Production of trefoil factor peptide 3 (TFF3) in osteoarthritic cartilage. World Congress on Osteoarthritis, Prag 2006. Osteoarthritis and Cartilage 14 (Suppl. B), S93.
2. Rösler S, Haase T, Claassen H, Riemann D, Sel S, Varoga D, Worlitzsch D, Müller-Hilke B, Goldring MB, Wohlrab D, Paulsen FP. Detection of trefoil factor family peptide 3 (TFF3) in osteoarthritic cartilage. 102. Treffen der Anatomischen Gesellschaft, Gießen 2007. DOI 10.3337/anatges.2007.0001.

### **Originalarbeiten**

3. Rösler S, Haase T, Claassen H, Schulze U, Schicht M, Riemann D, Barker NP, Brandt J, Wohlrab D, Müller-Hilke B, Goldring MB, Sel S, Varoga D, Garreis F, Paulsen FP. Trefoil factor 3 is induced during degenerative and inflammatory joint disease, activates MMPs and enhances apoptosis of articular cartilage chondrocytes. Arthritis Rheum (angenommen).
4. Rösler S, Haase T, Classen H, Riemann D, Barker NP, Müller-Hilke B, Sel S, Garreis F, Paulsen FP. Trefoil factor 3 enhances osteoarthrosis and septic arthritis by activation of matrixmetalloproteinases and induction of apoptosis in articular cartilage chondrocytes (in Vorbereitung).

### **Selbständigkeitserklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

### **Erklärung über Promotionsversuche**

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

## Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen für die Vergabe des Themas und seine stetige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Frau Ute Beyer, Frau Susann Möschter und Frau Michaela Risch möchte ich für die Anleitung und Betreuung während der Durchführung meiner Untersuchungen danken.

Herrn Diplombiologen Fabian Garreis danke ich für seine stetige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Horst Claassen möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Frau PD Dr. med. Dagmar Riemann, Institut für Immunologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Annexin-V Assays sowie die Bereitstellung humaner Synoviozyten und humaner Membrana synovialis.

Herrn Dr. rer. nat. Matthias Kappler, Universitätsklinik für Strahlentherapie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung der Caspase-3/7 Assays.

Herrn Dr. med. Saadettin Sel, Universitätsklinik für Augenheilkunde, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg möchte ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung der erhobenen Ergebnisse danken.

Frau Andrea Rosemeier, Herrn Oberarzt Dr. med. Jörg Brandt und Herrn Oberarzt PD Dr. med. David Wohlrab, Universitätsklinik für Orthopädie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Bereitstellung humaner Chondrozyten, humanen Knorpelgewebes und humaner Membrana synovialis.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Tsokos, Institut für Rechtsmedizin, Universitätscampus Charité, Berlin möchte ich für seine Unterstützung bei der Gewinnung humaner Knorpelstanzen danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Pufe, Institut für Anatomie, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen danke ich für die Bereitstellung von Synoviozytenzelllinien.

Auch bei den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Paulsen möchte ich mich für die entgegengebrachte Unterstützung bedanken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, die sie mir stets entgegengebracht haben.