

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

**Nachweis von Östrogen- und Insulinrezeptoren in humanen Gelenkknorpelzellen
- Basisuntersuchungen zur Hormonabhängigkeit des
Gelenkknorpelstoffwechsels**

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

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

von Katharina Reuse
geboren am 08.07.1983 in Kassel

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Horst Claassen
Gutachter: Prof. Dr. med. Karl-Stefan Delank
PD Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Horst Claassen

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 17.07.2012
Verteidigung der Promotion: 04.02.2013

Gewidmet

in Erinnerung und Dankbarkeit an

Adolf Reuse

*11.01.1933 †16.01.2002

Margarete Platner

*29.10.1943 †02.04.2010

Herbert Zaun

*16.06.1931 †30.03.2012

Referat

In der Literatur wird ein möglicher Einfluss von Sexualhormonen und Insulin auf die Entstehung von Arthrose vermutet. In der vorliegenden Arbeit sollen die Östrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β) sowie der Insulinrezeptor (IR) an humanen Gelenkknorpelzellen auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden. Durch verschiedene hormonelle Stimulationen soll ein Zusammenhang der Wirkung zwischen 17 β -Östradiol und Insulin aufgezeigt werden.

Zur Untersuchung werden die immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 sowie primäre humane Gelenkknorpelzellen in Zellkulturen herangezogen. Die Zellen werden mit beiden Hormonen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Anschließend findet mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden Polymerase-Kettenreaktion (PCR), real time PCR, Western Blot und Immunzytochemie die Bestimmung der Hormonrezeptoren statt. Desweiteren wird der radioaktiv markierte Prolineinbau in einer Zellkultur untersucht und die Kollagensynthese mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt.

Der Nachweis der Östrogen- und Insulinrezeptoren gelingt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Eine unterschiedlich starke Expression kann in Abhängigkeit von Geschlecht und den variierenden Hormonstimulationen teilweise gezeigt werden. In der real time PCR führt eine zunehmende Insulinstimulation zum Abnehmen der Signalintensitäten von ER α und IR. Bei Zellen von einer Frau bewirkt eine wachsende 17 β -Östradiol-Stimulation eine Abnahme der IR-Intensität. Der Prolineinbau und der Kollagengehalt in der Zellkultur geben ebenfalls Anhaltspunkte für eine Beeinflussung durch die Inkubation mit 17 β -Östradiol und Insulin: Insulin erhöht den Prolineinbau und die kombinierte Präsenz beider Hormone erhöht die Kollagensynthese.

Diese in vitro nachgewiesenen Zusammenhänge können möglicherweise ein erster Hinweis für tatsächliche Interaktionen in vivo darstellen. Unter anderem wäre eine hormonelle Steuerung bei der Entstehung von Knorpelerkrankungen wie Arthrose denkbar.

Reuse, Katharina: Nachweis von Östrogen- und Insulinrezeptoren in humanen Gelenkknorpelzellen - Basisuntersuchungen zur Hormonabhängigkeit des Gelenkknorpelstoffwechsels, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 58 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Arthrose	1
1.2	Knorpelgewebe und Kollagen	3
1.3	Knorpelzellen	4
1.4	Insulin und Insulinrezeptor	4
1.5	17 β -Östradiol und Östrogenrezeptoren	5
2	Zielstellung	6
3	Material und Methoden	7
3.1	Material	7
3.1.1	Substanzen	7
3.1.2	Gebrauchslösungen	10
3.1.3	Geräte	10
3.1.4	Verbrauchsgegenstände	11
3.1.5	Primer	12
3.1.6	Primärantikörper	12
3.1.7	Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials	13
3.1.8	Patientenübersicht	13
3.2	Methoden	14
3.2.1	Gewebegewinnung und Zellkultur	14
3.2.2	Stimulation	15
3.2.3	RNA-Isolierung	15
3.2.4	Reverse Transkriptase - (RT) - PCR	16
3.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	16
3.2.6	Proteinisolierung	17
3.2.7	Westernblot	18
3.2.8	Immunzytochemie an Deckglaskulturen	18
3.2.9	Prolineinbau	19
3.2.10	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	19
4	Ergebnisse	21
4.1	Morphologie und Wachstumsrate	21
4.1.1	Immortalisierte Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2	21

4.1.2	Primäre humane Gelenkknorpelzellen	21
4.2	Nachweise von Östrogen- und Insulinrezeptoren auf mRNA Ebene	24
4.2.1	Immortalisierte Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2	24
4.2.2	Primäre humane Gelenkknorpelzellen	26
4.3	Nachweise von Östrogen- und Insulinrezeptoren auf Protein Ebene	34
4.3.1	Immortalisierte Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2	34
4.3.2	Primäre humane Gelenkknorpelzellen	36
4.4	Immunzytochemische Untersuchung an Deckglaskulturen von primären humanen Gelenkknorpelzellen	38
4.5	Tritium markierter Prolineinbau und Kollagensynthese bei primären humanen Gelenkknorpelzellen	40
5	Diskussion	42
5.1	Rückblick	42
5.2	Östrogene und Chondrozyten	42
5.3	Insulin und Chondrozyten	43
5.4	Hormonelle Interaktionen	44
5.5	Prolineinbau und Kollagensynthese	45
5.6	Methodische Grenzen	46
5.7	Schlussfolgerung	47
5.8	Ausblick	47
6	Zusammenfassung	49
7	Literaturverzeichnis	50
8	Thesen	57

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
bFGF	basic fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C-28/I2 und T/C-28a2	humane immortalisierte Knorpelzelllinien
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlendioxid
COV	humane Granulosazelllinie
COX-2	Cyclooxygenase 2
CP = Ct	Crossing Point = Cycle threshold (Schwellenwertzyklus)
cpm	counts per minute
d	Dezi
Da	Dalton
dd	delta delta
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	Enhanced chemiluminescence (Luminol)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ETOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
³ H	Tritium

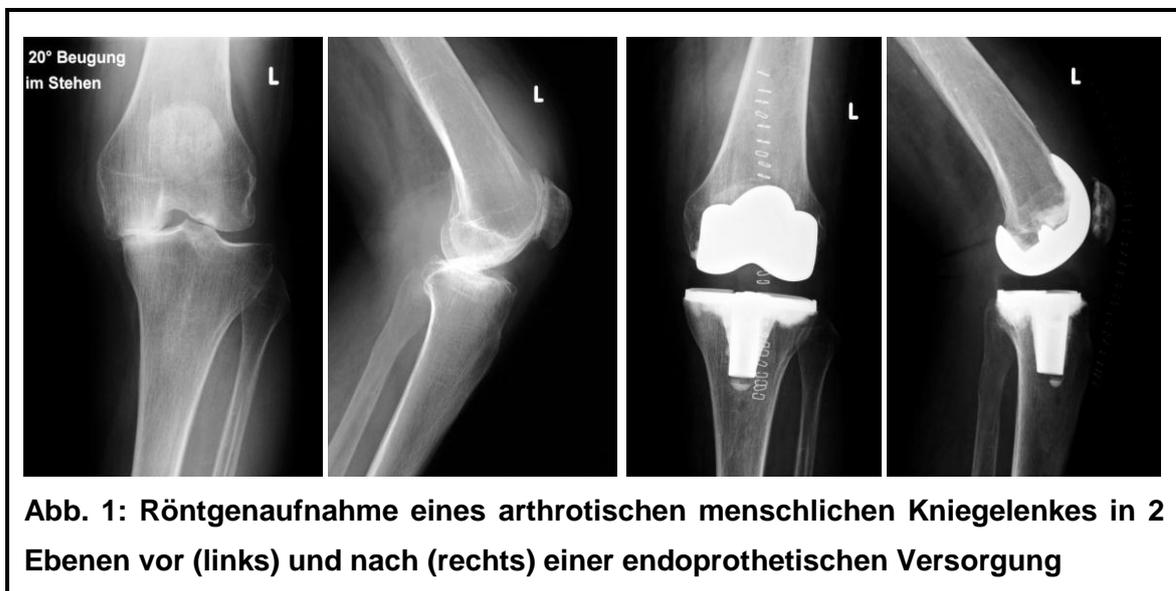
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HSR	Harnsäure
IC	Immunzytochemie
IGF	Insulin-like growth factor
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulinrezeptor Substrat 1
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MMP	Magermilchpulver
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Nano
N	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
O ₂	Sauerstoff
p	Pico
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RSB	reducing sample buffer (Probenpuffer)
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerase-Kettenreaktion
18S	Ribosomale Untereinheit 18S
SDS	sodium dodecyl sulfat
sec	Sekunde

Tab.	Tabelle
TAE	Trisaminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris-gepufferte Saline
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEP	Totalendoprothese
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Westernblot

1 Einleitung

1.1 Arthrose

Die Arthrose ist eine der häufigsten chronischen Gelenkerkrankungen des Menschen. Sie kann im Verlauf zu einer erheblichen Beeinträchtigung des betroffenen Patienten führen und eine endoprothetische Versorgung erforderlich machen (Abb. 1). Damit verbunden sind auch hohe sozioökonomische Belastungen. Die Krankheit geht mit einer allmählichen Reduzierung der Knorpelschicht einher (Abb. 2). Eine medikamentöse Prophylaxe existiert bisher nicht. Zur Entwicklung einer solchen Therapie ist ein genaues Verständnis des zu Grunde liegenden Metabolismus der Erkrankung erforderlich (Roman-Blas et al., 2009). Eine hohe mechanische Überbeanspruchung bei schwerer Arbeit, bei adipösen Personen oder bei einer Gelenkfehlstellung sind als Ursachen bekannt (Niethard und Pfeil, 2003); es erkranken jedoch auch Personen, die diese Eigenschaften nicht erfüllen. Es liegt daher nahe, dass noch weitere unabhängige Mechanismen eine Rolle bei der Entstehung von Arthrose spielen müssen.



Bei Osteoporose ist eine Abhängigkeit von Östrogenen bereits bekannt (Silbermann, 1983). Frauen in der Postmenopause haben ein erhöhtes Risiko an Osteoporose zu erkranken (Nilsson et al., 2001). Auch die Inzidenz für Arthrose nimmt nach der Menopause zu (Spector et al., 1989, 1991, 1997; Felson und Nevitt, 1998 und 1999; Wluka et al., 2000; Sowers et al., 2006). Bei Männern ist jedoch eine frühzeitigere

Erkrankung etwa ab dem 30. Lebensjahr bekannt. Eine Verbindung zum Serumöstradiolspiegel ist daher denkbar und erste Untersuchungen dazu existieren bereits (Claassen et al., 2002 und 2006c). Der Schaden an Knorpelgewebe durch Sauerstoffradikale kann durch Östrogen reduziert werden (Claassen et al., 2005).

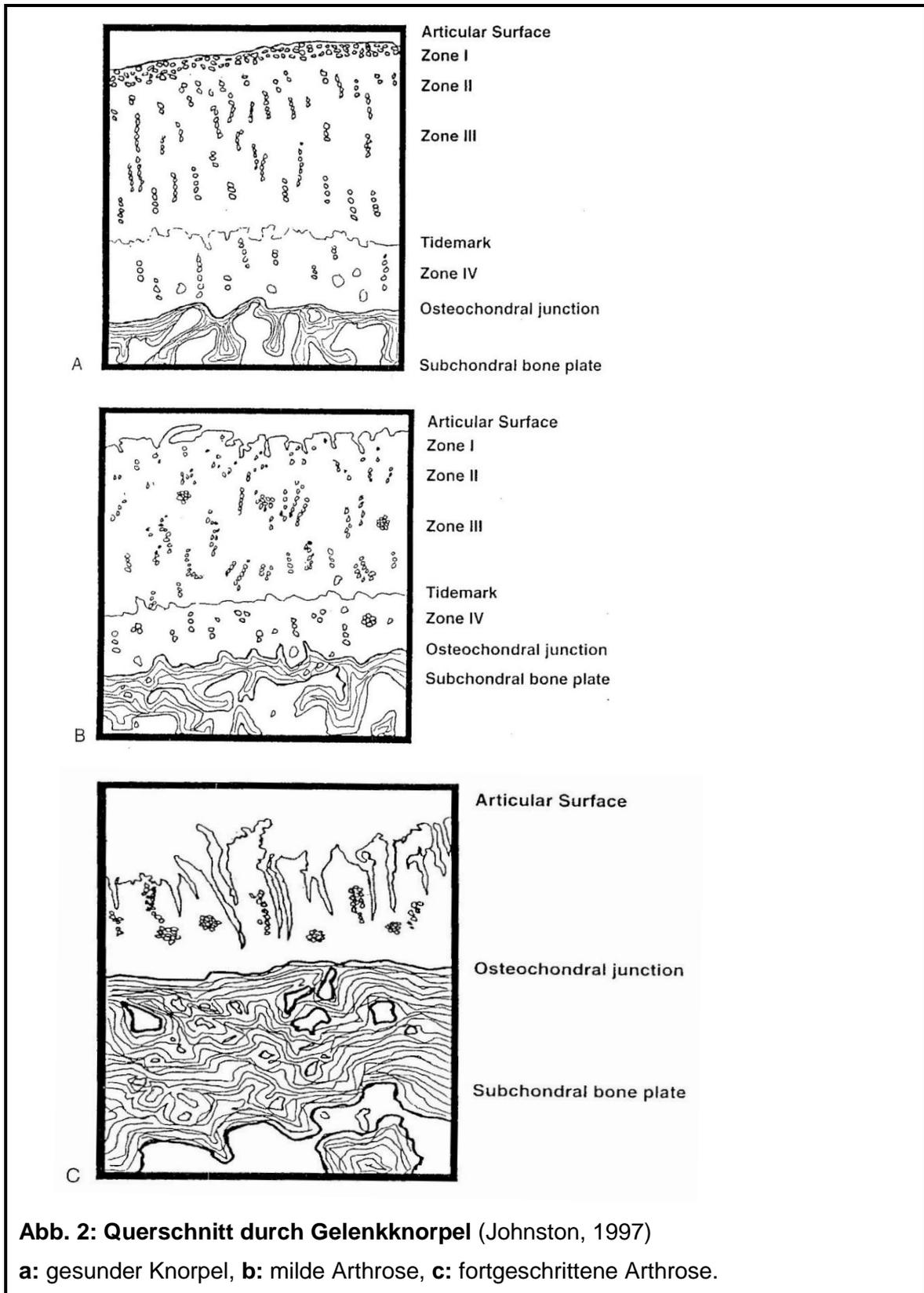


Abb. 2: Querschnitt durch Gelenkknorpel (Johnston, 1997)
a: gesunder Knorpel, **b:** milde Arthrose, **c:** fortgeschrittene Arthrose.

1.2 Knorpelgewebe und Kollagen

Knorpelgewebe ist ein geformtes Bindegewebe, das aufgrund seiner festen Konsistenz als Stützgewebe fungiert. Es besteht im Gegensatz zu Knochengewebe nur aus organischem Material und hat durch sein extrazelluläres Zusammenwirken aus Kollagenfibrillen und Proteoglykanen eine Druck- und Biegeelastizität. Von dieser Interzellularsubstanz sind die Knorpelzellen umgeben. Eine Gefäß- und Nervenversorgung existiert nicht. An der Knorpeloberfläche liegt das Perichondrium, das sehr zellreich ist und Knorpel neu bilden kann. Am Gelenkknorpel fehlt es jedoch, sodass dieser sich nicht regenerieren kann (Schmidt, 2002).

Es existieren drei unterschiedliche Knorpelarten: Faserknorpel, hyaliner Knorpel und elastischer Knorpel. Faserknorpel ist wenig elastisch und liegt in der Symphysis pubica, in den Disci intervertebrales und im Kiefergelenk (Articulatio temporomandibularis) vor. Hyaliner Knorpel ist die häufigste Form, ist besonders druckelastisch und befindet sich in den meisten Gelenkknorpeln, im Rippenknorpel und an großen Teilen des Kehlkopfes. Mit zunehmendem Alter verliert der hyaline Knorpel an Wasser und damit auch seine Druckelastizität. Zusätzlich kann es zu Verkalkungen kommen. Elastischer Knorpel ist selten und existiert vorwiegend in der Ohrmuschel und Epiglottis (Schmidt, 2002).

Kollagenfasern sind die häufigsten Bindegewebsfasern im menschlichen Körper. Sie bestehen aus Skleroprotein, Kollagen und Polysacchariden. Kollagen selbst macht ca. 30% des gesamten Körperproteins aus (Schmidt, 2002). Es gibt etwa 20 verschiedene Kollagentypen, wobei die Typen I-III am häufigsten sind und im Gegensatz zu den anderen als quergestreifte Fibrillen aufgebaut sind. Typ I kommt am häufigsten in Knochen, Sehnen und Faszien vor. Typ II charakterisiert die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels und des Glaskörpers im Auge. Typ III ist ein Hauptbestandteil retikulärer Fasern und kommt in Gefäßwänden vor (Schmidt, 2002). Das Protein Kollagen besteht aus drei Polypeptidketten, die identisch oder verschieden aufgebaut sein können. Diese Ketten enthalten monoton wiederholten Triplet-Sequenzen der Aminosäure Glycin und zwei weiterer, meist Prolin und Hydroxyprolin (Deutzmann et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit dient mit Tritium markiertes Prolin als Grundbaustein des Kollagens dem Nachweis der neu gebildeten Kollagenmenge nach unterschiedlichen Hormonstimulationen.

1.3 Knorpelzellen

Zur Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen Arthrose und den Hormonen 17 β -Östradiol und Insulin werden Zellkulturen von Chondrozyten herangezogen. In vivo sind Knorpelzellen einzeln oder als Paare (mit Kapsel: Chondrone) in ihre extrazelluläre Matrix (vorwiegend Kollagen Typ II, Proteoglykane und Wasser) eingebettet (Johnston, 1997). Eine unmittelbare Durchblutung des Knorpelgewebes existiert nicht. Die Nährstoffaufnahme der Zellen erfolgt über Diffusion (Johnston, 1997). Auch der Sauerstoffgehalt ist unmittelbar vor Ort im Vergleich zu gut durchblutetem Gewebe vermindert.

Die immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 werden als ein reproduzierbares Modell für humane Chondrozyten in vitro herangezogen (Finger et al., 2003; Goldring, 2004). Zusätzlich werden primäre humane Knorpelzellen, die von Kniegelenksoperationen stammen, untersucht.

1.4 Insulin und Insulinrezeptor

Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas synthetisiert. Es hat auf viele Gewebe und Organe eine anabole Wirkung. Dieser Effekt wird auch bei Knorpelgewebe vermutet. Arthrose könnte im Zusammenhang mit Diabetes mellitus stehen oder sogar ein Teil des Metabolischen Syndroms sein (Athanasίου et al., 1999; Rojas-Rodríguez et al., 2007; Velasquez und Katz, 2010). Der Insulinspiegel im Serum unterliegt einer physiologischen Schwankung in Abhängigkeit vom Glucose-Angebot und erreicht in den frühen Morgenstunden seinen Tiefpunkt (Löffler et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit werden dementsprechend verschieden hohe Konzentrationen an Insulin für die Stimulationsansätze verwendet.

Der Insulinrezeptor (IR) ist ein Membranprotein, das in Zellen vieler Gewebe und Organe vorkommt, vor allem aber in Fettgewebe, in der Leber und Muskulatur. Ein verwandtes Protein ist der IGF-1-Rezeptor (Insulin-like growth factor Rezeptor 1). Dieser Rezeptor ist in seiner Struktur dem Insulinrezeptor sehr ähnlich. Teilweise bilden Zellen Hybride dieser beiden Rezeptoren aus (Löffler et al., 2003). Die Grundstruktur dieser Rezeptoren sind zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen, die als Heterotetramer verbunden sind. Die Signaltransduktion erfolgt über die Phosphorylierung der OH-Gruppen der Tyrosylreste. Da IR und IGF-1-Rezeptor aus jeweils zwei Tyrosinkinasen bestehen, können sich die zytosolischen Domänen beider gegenseitig phosphorylieren (Autophosphorylierung). Anschließend wird IRS-1

(Insulinrezeptor Substrat 1) phosphoryliert und darüber intrazelluläre Zielproteine, die eine SH₂-Domäne besitzen, aktiviert (Silbernagel und Despopoulos, 2007).

1.5 17β-Östradiol und Östrogenrezeptoren

In den Granulosazellen der Follikel der Ovarien werden Androgene durch Aromatisierung zu Östrogenen umgewandelt. Dabei entsteht neben dem Speicheröstrogen Östron hauptsächlich 17β-Östradiol. Dieses kann zu dem biologisch weniger wirksamen Östriol umgewandelt werden (Leichtweiß und Schröder, 2003). Die Serumkonzentration von 17β-Östradiol schwankt während des Menstruationszyklus. Sie nimmt während der Schwangerschaft erheblich und kontinuierlich zu. Nach der Menopause fällt der Spiegel deutlich ab. In den vorgesehenen Stimulationen dieser Arbeit entspricht 10⁻⁹M (300pg/ml) 17β-Östradiol der Situation bei einer nicht schwangeren Frau vor der Menopause. 10⁻⁷M (30ng/ml) 17β-Östradiol stellt den Vergleich zu einer schwangeren Frau dar. Die Inkubation mit 10⁻⁵M (2,77μg/ml) 17β-Östradiol ist ein supraphysiologisches Modell (Claassen et al., 2011a).

Referenzbereiche für den Serumöstradiolspiegel (1pg/ml ≈ 3,671 pmol/l):

Frauen:	Follikelphase	12,5 – 165,4 pg/ml
	Ovulation	85,8 – 498 pg/ml
	Lutealphase	43,9 – 210,9 pg/ml
	Schwangerschaft, 40. Woche	>40 ng/ml
	Postmenopausal	<3 – 55 pg/ml
Männer:		7,6 – 42,5 pg/ml
Kinder:	Mädchen	6 – 7,9 pg/ml
	Jungen	5 – 19,9 pg/ml

Es gibt zwei Östrogenrezeptoren ERα und ERβ, die unterschiedlich auf Gewebe und Organe verteilt sind (Petrides, 2003). Sie gehören zur Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren. Beide Rezeptoren wurden bereits an Knorpelzellen anderer Säugetiere und am menschlichen Schildknorpel nachgewiesen. Bei bestimmten genetischen Variationen von ERβ wird die Entstehung von Arthrose vermutlich begünstigt (Ushiyama et al., 1998; Chen et al., 2004; González-Canga et al., 2010; Kerkhof et al., 2010; Riancho et al., 2010).

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Östrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β) sowie den Insulinrezeptor (IR) an humanen Gelenkknorpelzellen auf mRNA- und Proteinebene nachzuweisen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen Arthrose und den Hormonen 17 β -Östradiol und Insulin soll damit aufgezeigt werden. Hierfür werden die immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 sowie primäre humane Chondrozyten aus Kniegelenk-Operationen wie folgt untersucht:

- Die Östrogenrezeptoren ER α und ER β sowie der Insulinrezeptor IR werden auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR und real time RT-PCR detektiert. Ein unterschiedlich starker mRNA-Nachweis wird in der real time RT-PCR bei den verschiedenen hormonellen Stimulationen erwartet.
- ER α , ER β und IR werden auf Proteinebene im Westernblot und in der Immunzytochemie bestimmt. Das Vorliegen der Rezeptoren soll die Möglichkeit der Beeinflussung durch die Hormone 17 β -Östradiol und Insulin beweisen.
- Die Wachstumsrate und Morphologie der immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 sowie der primären humanen Chondrozyten werden während der unterschiedlichen Kulturbedingungen dokumentiert.
- Als Grundlage aller Versuchsansätze werden die Chondrozyten in Zellkulturen mit 17 β -Östradiol und Insulin in physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen inkubiert.
- Der radioaktiv markierte Prolineinbau wird in einer Kultur primärer humaner Chondrozyten gemessen.
- Der Kollagengehalt wird mittels ELISA in einer Kultur primärer humaner Chondrozyten gemessen und in Beziehung zu den unterschiedlichen Stimulationsansätzen mit den Hormonen 17 β -Östradiol und Insulin gesetzt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

17 β -Östradiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
AEC-Substratlösung	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Antikörper GAR-HRP	IBEX Pharmaceuticals, St. Mont Royal, Kanada
APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Aquatex Eindeckmittel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Avidin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bakteriophagen- λ -DNA	Invitrogen, Carlsbad, USA
Biotin	Invitrogen, Carlsbad, USA
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Collagenase	IBEX Pharmaceuticals, St. Mont Royal, Kanada
Coomassie-R250	Fluka Chemie A, Buchs, Schweiz
CyQuant	Invitrogen, Carlsbad, USA
Cystein	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
DEPC-Wasser	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
DMEM/HAM's F-12 1:1 Sebomed Basalmedium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DNA-Leiter	Fermentas, Glen Burnie, USA
DNase I	Promega, Madison, USA
DNase Puffer 10-fach	Promega, Madison, USA
DNase Stop Solution	Promega, Madison, USA
dNTP-Mix	Invitrogen, Carlsbad, USA
ECL	Thermo Scientific, Rockford, USA

EDTA	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Entwickler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (99,8%)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
FKS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formalin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HBSS	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
HCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Insulin	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Glücksklee Nestlé, Frankfurt, Deutschland
Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
MgCl ₂ (50mM)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Na-Acetat [3M]	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Oligo (dT)18 Primer	Invitroge, Carlsbad, USA
Papain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin (5000 U/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphataseinhibitor	Promega, Madison, USA
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG	Bio Rad, München, Deutschland

Ponceau-S-Lösung	Fluka Chemie A, Buchs, Schweiz
Prolin, Tritium-markiert	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Pronase	IBEX Pharmaceuticals, St. Mont Royal, Kanada
Proteaseinhibitor	Promega, Madison, USA
Protein-Leiter	Fermentas, Glen Burnie, USA
Pyruvat	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega, Madison, USA
RT-Superscript/Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Sekundärantikörper goat anti mouse	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Sekundärantikörper goat anti rabbit	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Strept-AB-Komplex / HRP	DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland
Streptomycin (5000µg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Szintillationsflüssigkeit	Baker Chemicals, Houston, USA
Taq-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Temed	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
TMB	IBEX Pharmaceuticals, St. Mont Royal, Kanada
TMB-Stop-Solution	IBEX Pharmaceuticals, St. Mont Royal, Kanada
Transcriptionspuffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-Acetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris/Cl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween 20	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Vitamin C	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Vitamin E	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland

3.1.2 Gebrauchslösungen

10x Lämmli-Puffer	3% Tris, 14,4% Glycin, 1% SDS
PBS	0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na ₂ HPO ₄ , 0,02% KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
RSB	10% Glycin, 20% SDS, 0,6% Tris, 2,5% Isopropanol, 1% Essigsäure, 0,005% Coomassie-R250, 5% Mercaptoethanol
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 8
TBS-Stammlösung (10x)	50,4 mM Tris, 37 mM HCl, pH 7,4
TBS-T	1ml Tween auf 1000ml 1x TBS
12,5x Transferpuffer	1,82% Tris, 9% Glycin, pH 8,3

3.1.3 Geräte

Aluminiumheizblock QBT	Grant Instruments, Cambridge, Großbritannien
Beta-Counter: Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	Pegasus Scientific Inc., Rockville, USA
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Feinwaage TE 3135	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fotomikroskop Axioplan + Camera AxioCam color	Zeiss, Jena, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode, Deutschland
Mikroskop Axioskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop IX 70 mit Fotoapparat	Olympus, Hamburg, Deutschland
PCR-Gel-Kammer Agagel Mini + Maxi + Power Pack P25 (Stromgeräte)	Biometra, Göttingen, Deutschland
PCR-Maschine MJ Mini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
PCR-Maschine Termocycler 3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Pipettensatz 2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl, 5000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus standard	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

real time PCR-Gerät Cyclor	Bio-Rad, München, Deutschland
Spectrophotometer Ultrospec 3300pro + DPU-414 Thermal Printer	Amersham Biosciences, München, Deutschland
Sterilbank Holten Lamin Air	Jouan Nordic A/S, Allerød, Dänemark
Ultraschall-Bad Sonorex RK52H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultra-Turrax T25	RCT basics, Wilmington, NC, USA
UV-Schrank mit Kamera und Printer	LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Vakuumentrifuge GeneVac SF 50 + Vakuumpumpe CVP 100	Biometra, Göttingen, Deutschland
Westernblot-Kammer X Cell Sure Lock + Electrophoresis Power Supply EPS301	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Galaxy mini	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Typ 2-5	Sigma, Osterode, Deutschland

3.1.4 Verbrauchsgegenstände

Einweg-Filter	Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland
Falkon-Tubes 15ml, 50ml	gbo (Greiner + bio-one), Solingen, Deutschland
Glaspipetten Cellstar 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	gbo (Greiner + bio-one), Solingen, Deutschland
Injekt-Spritzen	Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kulturflaschen Cellstar 50ml	gbo (Greiner + bio-one), Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,6µl, 1,5µl, 2,0µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wells 6er, 12er	gbo (Greiner + bio-one), Solingen, Deutschland
Westernblot Membran PVDF Transfer Membrane	Amersham Biosciences, München, Deutschland

3.1.5 Primer

Primer	forward (sense)	reverse (antisense)	Produkt- größe	Annealing- temp.	Literatur
ER α für normale PCR	5'-CAG GGG TGA AGT GGG GTC TGC TG-3'	5'-ATG CGG AAC CGA GAT GAT GTA GC-3'	483bp	63°C	Hombach-Klonisch et al. 2005
ER α für real time PCR	5'-CAA TGA CTA TGC TTC AGG CTA C-3'	5'-CCA CCT TTC ATC ATT CCC AC-3'	198bp	61°C	
ER β für Zelllinien	5'-CGA TGC TTT GGT TTG GGT GAT-3'	5'-CTT TAG GCC ACC GAG TTG ATT-3'	214bp	58°C	Hombach-Klonisch et al. 2005
ER β für Primärzellen	5'-AAG AAG ATT CCC GGC TTT GT-3'	5'-TCT ACG CAT TTC CCC TCA TC-3'	173bp	62°C	
IR für Zelllinien	5'-CTG GGA CTG GAG CAA ACA CAA C-3'	5'-TGG TCT TCA GGG CAA TGT CG-3'	152bp	58°C	
IR für Primärzellen	5'-ACG CTC TGG TGT CAC TTT CCT TCT-3'	5'-AGA GCT GCC TTA GGT TCT GGT TGT-3'	114bp	58°C	

3.1.6 Primärantikörper

Antikörper	Name	Firma	Molekular- gewicht	Methode	Konzentration
Rabbit polyclonal anti-ER α	HC-20 (sc-543)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	66 kDa	IC	1:75 in 1% PBS
Mouse monoclonal anti-ER α	MAB461	Chemicon, Temecula, USA	66 kDa	WB	1:500 in 1% BSA
Rabbit polyclonal anti-ER β	AB1410	Chemicon, Temecula, USA	57 kDa	IC	1:75 in 1% PBS
Rabbit polyclonal anti-ER β	AB1410	Chemicon, Temecula, USA	57 kDa	WB	1:500 in 1% BSA
Mouse monoclonal anti-IR	IR - G36	Calbiochem, San Diego, USA	95 kDa	IC	1:50 in 1% PBS
Mouse monoclonal anti-IR	IR - G36	Calbiochem, San Diego, USA	95 kDa	WB	1:200 in 5% MMP
Rabbit polyclonal anti-Kollagen I+II	C1,2C, Teil des ELISA-Kit	IBEX, Mont Royal, Kanada	ca. 350 kDa	ELISA	fertige Lösung in BSA

3.1.7 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials

Das Gelenkknorpelmaterial stammt von Patientinnen und Patienten, die sich in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität einer Kniegelenkersatz-Operation unterziehen mussten. Die Patientinnen und Patienten wurden über den Verwendungszweck des entfernten Materials informiert und haben ihr Einverständnis gegeben. Das Vorgehen wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät mit Wirkung vom 13.09.2005 genehmigt.

3.1.8 Patientenübersicht

Frauen (kodierte)	Alter (Jahre)	BZ (mmol/l)	HSR (μ mol/l)	Östrogen (pmol/l)	Männer (kodierte)	Alter (Jahre)	BZ (mmol/l)	HSR (μ mol/l)	Östrogen (pmol/l)
Referenzwerte		3,9-5,9	140-340	siehe 1.5	Referenzwerte		3,9-5,9	140-340	siehe 1.5
2007/09	67	5,1	300	72,5	2007/08	47	4,6	303	61,3
2007/18	68	5,6	290		2007/10	70	7,0	406	89,9
2007/20	72	9,0	239	85,0	2007/11	61	5,9	338	
2007/23	71	7,0	307	102,0	2007/15	71	5,6	364	
2007/24	62	5,0	168	47,5	2007/16	74	6,1	329	
2007/25	65	5,4	219	96,2	2007/17	73	5,4	187	
2007/27	75	6,9	192	77,6	2007/19	46	5,0	318	24,6
2007/30	55	5,0	266	134,0	2007/21	75	5,3	351	52,5
2007/34	65	4,9	355	61,8	2007/22	47	5,5	233	58,0
2007/35	66	9,8	394	41,2	2007/26	64	7,3	326	76,6
2007/36	60	5,3	375	55,6	2007/28	54	5,4	378	82,9
2007/39	69	8,4	161	85,9	2007/29	47	5,9	318	78,2
2007/43	64	5,8	176	33,2	2007/31	66	5,2	275	
2007/45	68	6,0	240	70,2	2007/32	60	5,0	282	
2007/46	64	10,2	216		2007/38	69	4,6	439	
2007/50	76	5,8	324	136,0	2007/44	69	7,4	421	93,0
2007/51	69				2007/47	63	5,4	327	
2007/53	74				2007/56	45	5,9	359	168,0
2007/54	64				Mittelwert	61,2	5,7	331	78,5
2007/55	58	7,0	246	91,1	Minimalwert	45	4,6	187	24,6
Mittelwert	66,6	6,6	263	79,3	Maximalwert	75	7,4	439	168,0
Minimalwert	55	4,9	161	33,2	Anzahl	18	18	18	10
Maximalwert	76	10,2	394	136,0					
Anzahl	20	17	17	15					

3.2 Methoden

3.2.1 Gewebegewinnung und Zellkultur

Für die vorgesehenen Versuche sind zum Vergleich Positivkontrollen erforderlich. Für ER α und ER β wird das Gewebe eines humanen Uterus gewonnen. Er stammt von einer 40-jährigen Patientin, die aufgrund eines Uterus myomatosus operiert wurde. Das verwendete Gewebe ist frei von Myomen und erfüllt keine Malignitätskriterien. Für IR wird das Gewebe einer humanen Leber verwendet. Es entstammt einer explorativen Laparotomie aufgrund von Lebermetastasen bei einem Patienten mit Kolonkarzinom. Das entnommene Gewebe zeigt ebenfalls kein Hinweis für Malignität.

Die untersuchten Knorpelzellen sind zum einen die immortalisierten humanen Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2, die durch die Arbeitsgruppe von Frau Professor Mary B. Goldring aus dem Rippenknorpel einer 15-jährigen Frau entwickelt wurden (Goldring, 2004). Zum anderen wurde der Gelenkknorpel der Resektate bei Knie-TEP-Anlagen verwendet. Dieser wird unmittelbar nach steriler Präparation vom Gelenk in einen antibiotikaversetzten Puffer (PBS) gegeben. Zur Lösung der Zellen werden die Knorpelstücke bei 37°C in ein Medium aus 30ml DMEM/HAM's F12, 1,5ml FKS und 123mg Pronase gegeben. Nach 60 min findet ein Mediumwechsel statt: 30ml DMEM/HAM's F12, 1,5ml FKS und 15mg Kollagenase werden zu den Knorpelstücken gegeben. Unter ständigem Rühren verbleiben sie über Nacht bei 37°C in diesem Medium. Das Material ist nach diesem Schritt vollständig verdaut und kann durch Zellsiebe filtriert werden (1,7 μ m und 2,4 μ m). Die Zellsuspension wird dreimalig mit PBS gewaschen und anschließend für 6 min bei 1100U zentrifugiert. Die Zellen können nun mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt und ausgesät werden.

Sowohl aus den immortalisierten Zelllinien als auch aus den primären Knorpelzellen werden Zellkulturen angelegt. Hierzu werden in Kulturflaschen jeweils ca. 500 000 Zellen in 5ml Nährmedium ausgesät. Für die Immunhistochemie werden die Zellen auf Deckgläschen in 6er-Well-Platten gegeben. Für den Prolineinbau-Versuch und den ELISA-Test werden auf 12er-Well-Platten jeweils ca. 270 000 Zellen pro Well mit 1ml Nährmedium ausgesät. Das Nährmedium basiert auf DMEM/HAM's F12 und beinhaltet zusätzlich inaktiviertes FKS (10% des Mediums), Vitamin C und E sowie Penicillin und Streptomycin zum Schutz vor Bakterien- und Pilzbefall der Kulturen. Die Knorpelzellen werden für 5 – 7 Tage bei 37°C in einem Brutschrank mit 5% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid und 90% Stickstoff in der Luft kultiviert. Ein Mediumwechsel findet alle 2

Tage statt. Das erfolgreiche Wachstum der Knorpelzellen wird dabei unter dem Mikroskop kontrolliert.

3.2.2 Stimulation

Nach gelungener Anzucht der Knorpelzellen findet eine hormonelle Stimulation für 48 Stunden statt. Hierfür wird ein FKS reduziertes Medium (0,5%) hergestellt und zusätzlich Pyruvat und Cystein hinzugegeben. Dieses Medium enthält nur eine minimale Konzentration an Hormonen. Es wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur einfacheren Unterscheidung als „serumfreies Medium“ bezeichnet. Die Stimulationen und Negativkontrollen verteilen sich auf die Flaschen / Proben wie folgt:

1	ohne Zusatz	
2	mit Ethanol 1:1000	
3	mit PBS NaOH 1:1000	
4	mit 10^{-9} M 17β -Östradiol	
5	mit 10^{-7} M 17β -Östradiol	
6	mit 10^{-5} M 17β -Östradiol	
7	mit 0,1 μ g/ml Insulin	
8	mit 1,0 μ g/ml Insulin	
9	mit 5,0 μ g/ml Insulin	
Extrakontrolle bei Prolineinbau	Tag 1 mit PBS NaOH 1:1000	Tag 2 mit Ethanol 1:1000
Extrastimulation bei Prolineinbau	Tag 1 mit 5,0 μ g/ml Insulin	Tag 2 mit 10^{-5} M 17β -Östradiol

Das 17β -Östradiol ist in Ethanol gelöst, das Insulin in PBS NaOH. Bei Kulturende wird das Stimulationsmedium entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die jeweilige gewünschte Weiterverarbeitung zur RNA- oder Proteinisolierung.

3.2.3 RNA-Isolierung

Das zerkleinerte Gewebe bzw. die Zellen werden mit 1ml Trizol bei 4°C aufgenommen, gelöst und in Reaktionsgefäße überführt, desweiteren erfolgt die Zugabe von 0,2ml

Chloroform. Die Lösung wird solange gemischt bis eine milchig trübe Suspension entsteht. Nach einer Inkubationszeit von 3 – 5 min werden die Tubes 15 min bei 10.000U und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird dann in vorgekühlte 1,5ml Tubes überführt. Man gibt die gleiche Menge an Isopropanol hinzu und vermischt beides zu einer Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 40 min bei –20°C wird nochmals gemischt und dann für 10 min bei 4°C und 10.000U zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird verworfen und das Pellet in 50µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Für den DNase-Verdau werden nun 2µl RNase – Inhibitor, 8µl 10-fach DNase Puffer und 1µl DNase I hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation im 37°C Wasserbad kommen 8µl Stop Solution dazu und die Inaktivierung der DNase findet für 10 min bei 65°C statt. Danach werden zur Fällung der RNA 6µl 3M Na-Acetat und 200µl Isopropanol dazugegeben. Nach 30 min Inkubationszeit bei -20°C werden die Proben für 30 min bei 4°C und 10.000U zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird verworfen und 1ml 75% ETOH/DEPC werden hinzugegeben. Die Proben werden erneut für 5 min bei 4°C und 10.000U zentrifugiert und der flüssige Überstand wird verworfen. Zum Pellet werden 1ml 75% ETOH/DEPC dazugegeben, die Proben werden für 5 min bei 4°C und 10.000U zentrifugiert und nach Verwerfen des flüssigen Überstandes für ca. 4 min im SpeedVac getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 50µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 5 min bei 70°C gelöst. Die RNA-Konzentration kann nun gemessen werden.

3.2.4 Reverse Transkriptase - (RT) - PCR

Zu 10µl RNA-Probe wird 1µl Oligo-T-Primer dazugegeben und für 10 min bei 70°C inkubiert. Das Gemisch wird dann für ca. 1 min in Eiswasser abgekühlt. Anschließend werden 4µl 5-fach Transkriptionspuffer, 2µl 10mM dNTP, 1µl RNase Inhibitor und 19µl DEPC-Wasser hinzugegeben und für 5 min im 37°C Wasserbad inkubiert. Danach kommt 1µl Reverse Transkriptase dazu um die Probe für eine weitere Stunde im 37°C Wasserbad zu inkubieren. Die cDNA-Konzentration kann nun gemessen werden.

3.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Durchführung der PCR werden 1-2µl cDNA der Proben (Menge je nach Konzentration) mit 12-13µl PCR-H₂O, 2µl 10-fach Puffer, 1µl dNTP (10mM), 1µl MgCl₂

(50mM), 1µl Primer forward (10pM), 1µl Primer reverse (10pM) und 0,2µl Taq-Polymerase zu einem Reaktionsansatz vermischt.

Für die real time PCR wird 1µl cDNA der Proben zu einem Ansatz aus 10µl SYBR Green, 1µl Primer forward (10pM), 1µl Primer reverse (10pM) und 7µl PCR-Wasser gegeben. Der Ansatz des Referenzgens 18S besteht aus 10µl SYBR Green, 0,5µl Primer forward (10pM), 0,5µl Primer reverse (10pM), 8µl PCR-Wasser und 1µl cDNA der Proben.

Nach einer Startphase von 5 min bei 95°C finden 30 – 45 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 95°C, 30 – 45 sec Annealing bei Primer spezifischer Temperatur und 20 – 30 sec Elongation bei 72°C statt. Nach weiteren 5 min bei 72°C können die Proben gekühlt und auf ein Ethidiumbromid haltiges Agarosegel in einer Elektrophoresekammer aufgetragen werden. Nach 45 – 60 min Laufzeit bei 80 – 90 Volt kann das Ergebnis mit Hilfe einer ebenfalls aufgetragenen DNA – Leiter bei ultraviolettem Licht abgelesen werden.

Für die relative Quantifizierung in der Auswertung der real time PCR ist ein nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ (Referenzgen) erforderlich (Pfaffl, 2004). Hierfür wird die ribosomale Untereinheit 18S bestimmt. Bei allen Proben werden die Ct-Werte (oder CP = Crossing Point) der bestimmten Gene gemessen. Sie geben die Anzahl der PCR-Zyklen an, die für ein konstantes Fluoreszenzniveau erforderlich sind (Pfaffl, 2004). Aus der Differenz des Zielgens und des Referenzgens 18S ergibt sich „delta Ct“. Nach Abzug der jeweiligen Kontrollprobe ergibt sich „dd Ct“. Der relative Expressionsunterschied zwischen den Proben wird durch die Ratio berechnet: 2^{-ddCt} (Pfaffl, 2004).

3.2.6 Proteinisolierung

Das bei -80°C in Stickstoff gelagerte Gewebe wird mit einem Mörser zerkleinert und zusammen mit Triton-Puffer mit dem Ultraschall-Stab Ultra-Turrax homogenisiert. Danach werden Phosphataseinhibitor und Proteaseinhibitor hinzugegeben und die Probe für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 20 – 30 min zentrifugieren bei 4°C kann der proteinhaltige Überstand abpipettiert und die Proteinkonzentration am Photometer mittels Bradford-Methode gemessen werden.

Die Zellen aus den Zellkulturen werden mit 300µl RSB und 0,6µl Proteaseinhibitor bei 4°C aufgenommen, gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Eine Lagerung bei -80°C ist hiernach möglich.

3.2.7 Westernblot

Zur Vorbereitung des Westernblots werden zunächst das Trenngel und das Sammelgel hergestellt und in eine Gelkassette gegossen. Die Gele basieren auf Acrylamid und enthalten 2 M Tris/Cl (pH 8,8 für Trenngel und pH 6,8 für Sammelgel), destilliertes Wasser, Temed und APS. Die genauen Konzentrationen der Gele hängen von der Größe des zu bestimmenden Proteins ab. Nach Erkalten der Gele wird die Kassette in die Blotkammer eingesetzt und diese mit 1x Lämmli-Puffer befüllt.

Die Proteinproben werden mit zusätzlichem RSB für 5 min bei 90°C aufgekocht und anschließend einzeln in die Geltaschen gegeben. Zusätzlich wird ein Proteinmarker in eine Geltasche aufgetragen. Bei 10 – 30mA werden die Proteine innerhalb von etwa 90 min aufgetrennt. Anschließend wird das Gel aus der Kassette herausgelöst und zusammen mit einer Membran zwischen Filterpapieren und Schwämmen erneut in die Blotkammer eingespannt. Die Kammer wird innen mit 1x Transferpuffer befüllt und außen mit deionisiertem Reinstwasser. Bei 0,8mA pro cm² Gel findet für 120 min der eigentliche Blot statt. Zur Überprüfung, ob der Blot gelungen ist, wird die Membran mit Ponceau-Rot gefärbt und anschließend zur weiteren Verarbeitung mit Reinstwasser wieder entfärbt. Zunächst erfolgt für 60 min eine Blockierung mit BSA oder MMP. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wird die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 120 min bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift wird das Blotergebnis auf einem Film entwickelt. Hierfür inkubiert man die Membran für 5 min mit einem ECL-Mix und legt die Membran anschließend in der Dunkelkammer zusammen mit dem Film in eine lichtdichte Kassette. Nach 1 – 5 min Entwicklungszeit ist das Ergebnis auf dem Film sichtbar.

3.2.8 Immunzytochemie an Deckglaskulturen

Für die Immunzytochemie wird jeweils nur eine Stimulationskonzentration der Hormone gewählt: 10⁻⁵M 17β-Östradiol und 5,0µg/ml Insulin. Die kultivierten und stimulierten Deckglaskulturen werden zunächst mit 3%igem Formalin bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS folgt eine Inkubation mit Normalserum in einer feuchten Kammer für 20 min. Das Serum wird nun abgeklopft und die Deckgläschen werden zunächst für 10 min mit Avidin und dann (nach einmaligem Spülen mit PBS) für weitere 10 min mit Biotin geblockt. Nach wiederholtem dreimaligem Spülen mit PBS erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C

über Nacht. Es folgen ein weiterer Waschschrift und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 120 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS werden die Deckglaskulturen für 30 min mit dem Strept-AB-Komplex inkubiert. Darauf erfolgt nach zwischengeschaltetem Spülen das Einfärben mit AEC-Substratlösung für 1 – 5 min. Anschließend wird mit destilliertem Wasser gespült und mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt. Danach können die Deckgläschen auf Objektträger mit Aquatex eingedeckt werden.

3.2.9 Prolin einbau

Die Zellkulturen werden wie oben beschrieben in 12er-Well-Platten angezüchtet und stimuliert. Am Tag 2 der Stimulation wird ^3H -markiertes Prolin hinzugefügt. Nach der Stimulation wird das Medium entfernt und die Zellen mit HBSS gespült. Anschließend erfolgt eine Lösung des Zellrasens in Papainlösung über Nacht. Am nächsten Tag kann die Radioaktivität (cpm) nach Zugabe einer Szintillationsflüssigkeit im Beta-Counter gemessen werden.

Zur Objektivierung der Messwerte werden sie in das Verhältnis zur Zellzahl (indirekt gemessen über den DNA-Gehalt) und in das Verhältnis zur Kollagenkonzentration (via ELISA bestimmt, s.u.) gesetzt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird zu den gelösten Zellen je Probe 200 μl CyQUANT Zellysepuffer gegeben. Nach 2 – 5 min Inkubation kann die Fluoreszenz bei 480nm und 520nm gemessen werden. Eine Standardkurve zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird mit Hilfe eines Bakteriophagen- λ -DNA-Ansatzes erstellt.

3.2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung des Kollagengehaltes von Kollagen Typ I und II im Knorpelzellrasen werden die Wells mit den Zellkulturen mit jeweils 100 μl eines Kollagenase-BSA-Puffer-Gemisches (2mg Kollagenase auf 10ml Puffer) für 120 min im Brutschrank weiter inkubiert und gelöst. Danach werden die Proben in eine 96er-Well-Platte überführt. Zur Erstellung einer Standardkurve für die Konzentrationsbestimmung wird eine Verdünnungsreihe einer repräsentativen Probe aufgetragen. Die Proben in den Wells werden für 30 min mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur gemischt und inkubiert. Anschließend werden sie auf die ELISA-Platte übertragen und diese wird für 60 min inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen erfolgt die Inkubation mit dem

Sekundärantikörper GAR-HRP für 30 min. Nach einem weiteren Waschschrift wird 100µl TMB in jedes Well gegeben. Die Reaktion wird dann nach 30 min mit der vorgesehenen Stop-Solution beendet. Bei 450nm kann nun die optische Dichte gemessen und anhand einer Standardkurve die Kollagenkonzentration ermittelt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie und Wachstumsrate

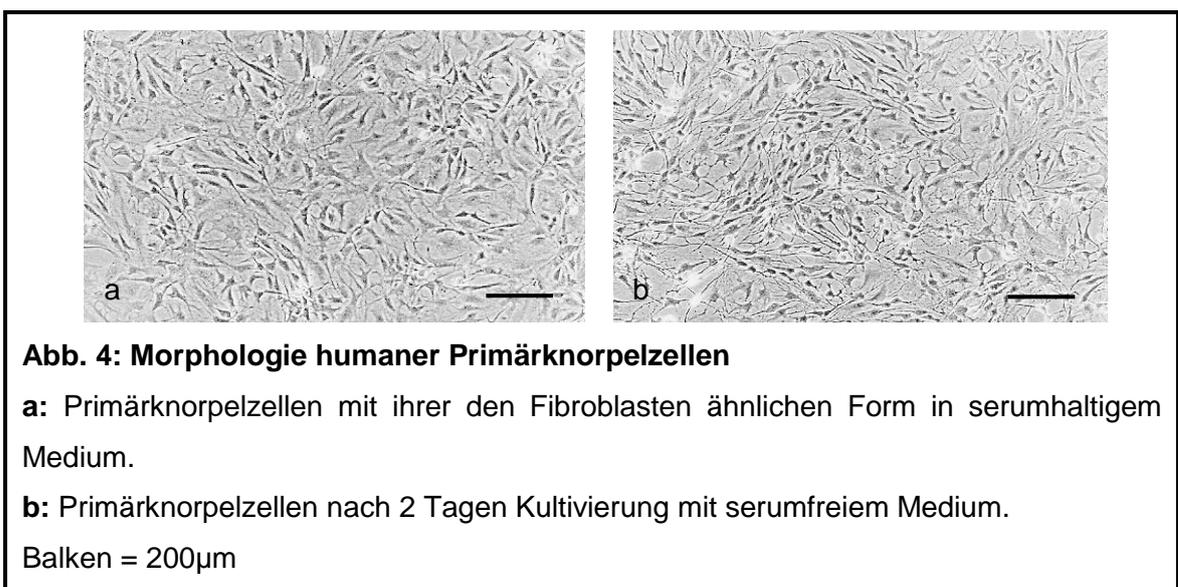
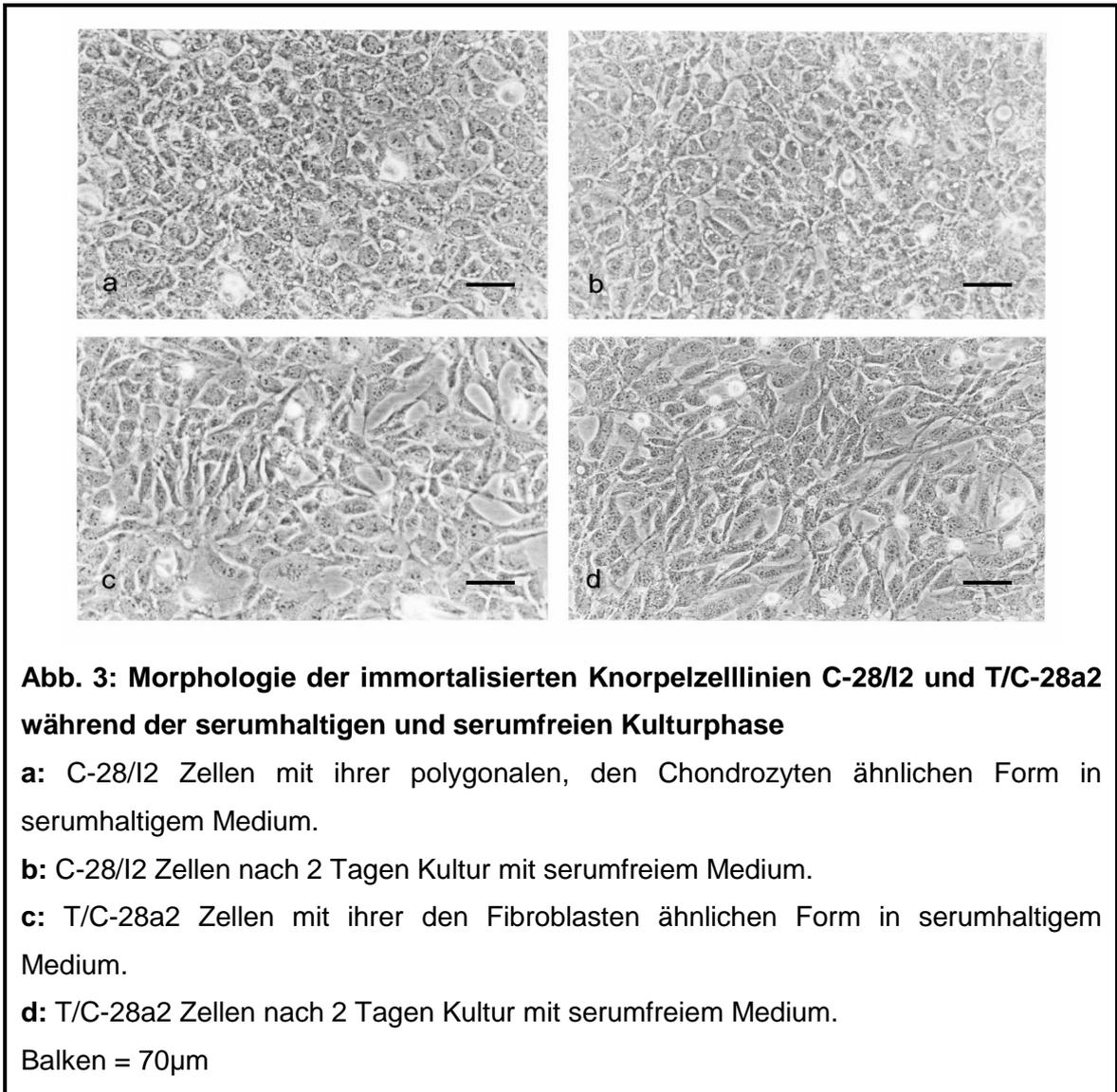
4.1.1 Immortalisierte Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2

Die Morphologie und Wachstumsrate werden analysiert, um zu überprüfen, ob die immortalisierten Knorpelzellen die serumfreie Kulturphase überstehen. Weiterhin soll hierdurch der beste Zeitpunkt für die Hormonstimulation gefunden werden.

Immortalisierte Knorpelzellen der Linie C-28/I2 sind während der serumhaltigen Kulturphase in Monolayern klein und rund (Abb. 3a). Die Zellen verändern ihr Aussehen in dem serumfreien Medium nicht (Abb. 3b). Im Vergleich zu T/C-28a2 wachsen C-28/I2 Zellen etwas schneller und sind um den 5. Tag konfluent (Abb. 5a). T/C-28a2 Zellen entwickeln während der serumhaltigen Kulturphase eine den Fibroblasten ähnliche Form (Abb. 3c); die Zellen verändern sich in serumfreiem Medium nicht weiter (Abb. 3d). Darüberhinaus wachsen T/C-28a2 Zellen etwas langsamer als C-28/I2 Zellen, aber kontinuierlicher (Abb. 5b).

4.1.2 Primäre humane Gelenkknorpelzellen

Primäre humane Chondrozyten ähneln in ihrem Aussehen Chondrozyten der Zelllinien T/C-28a2 (Abb. 4a); in serumfreiem Medium tritt keine Veränderung ihres Aussehens ein (Abb. 4b). In Abhängigkeit vom Alter der Patienten wachsen die Zellen etwas langsamer als die Chondrozyten der immortalisierten Zelllinien. Zwischen Zellen männlicher und weiblicher Patienten können keine Unterschiede in Morphologie und Wachstumsrate festgestellt werden.



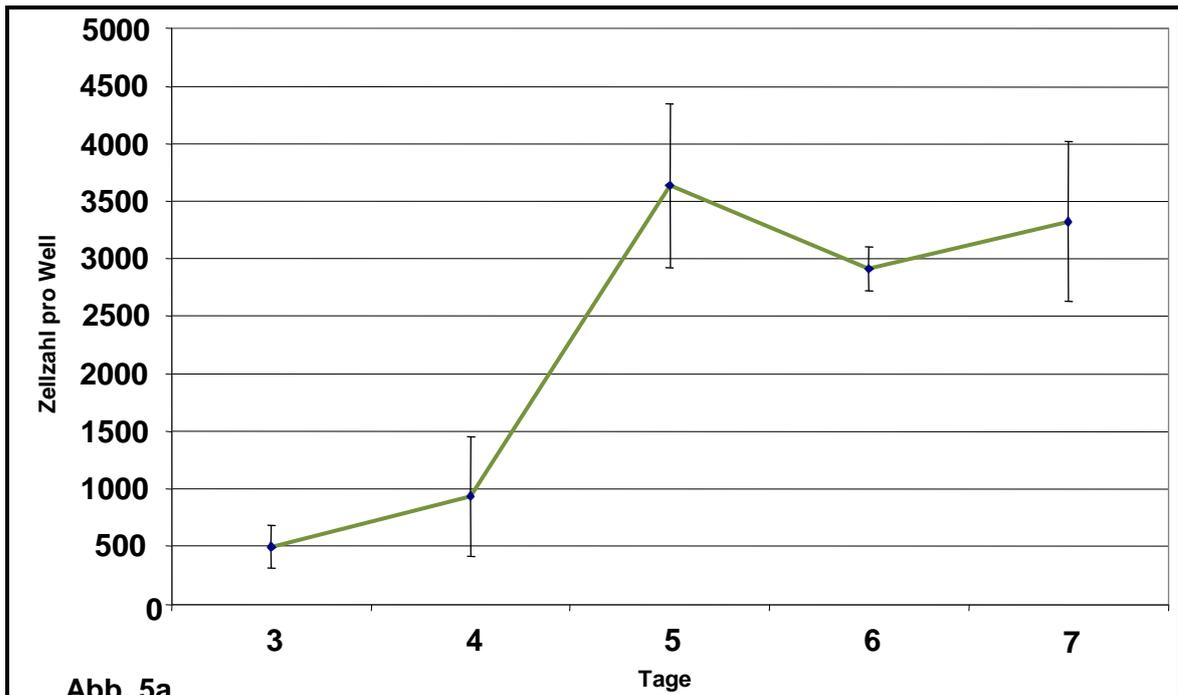


Abb. 5a

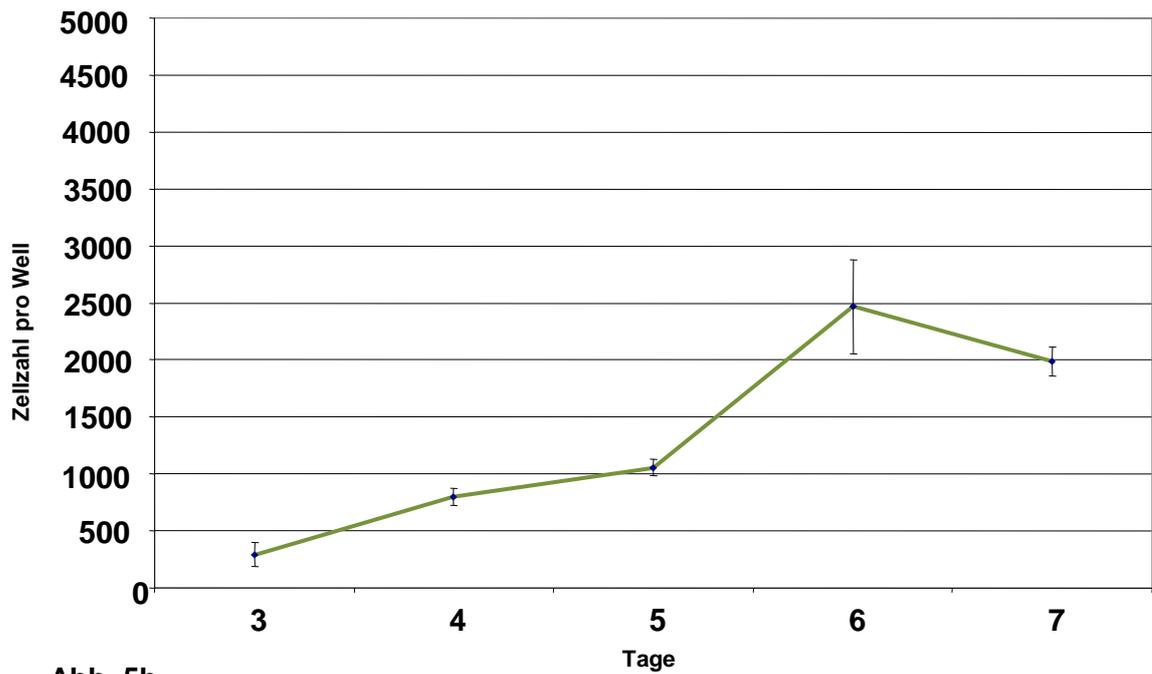


Abb. 5b

Abb. 5: Wachstumsrate der immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 während der serumhaltigen (Tag 0-5) und serumfreien (Tag 5-7) Kulturphase

a: Immortalisierte Knorpelzelllinie C-28/I2

b: Immortalisierte Knorpelzelllinie T/C-28a2

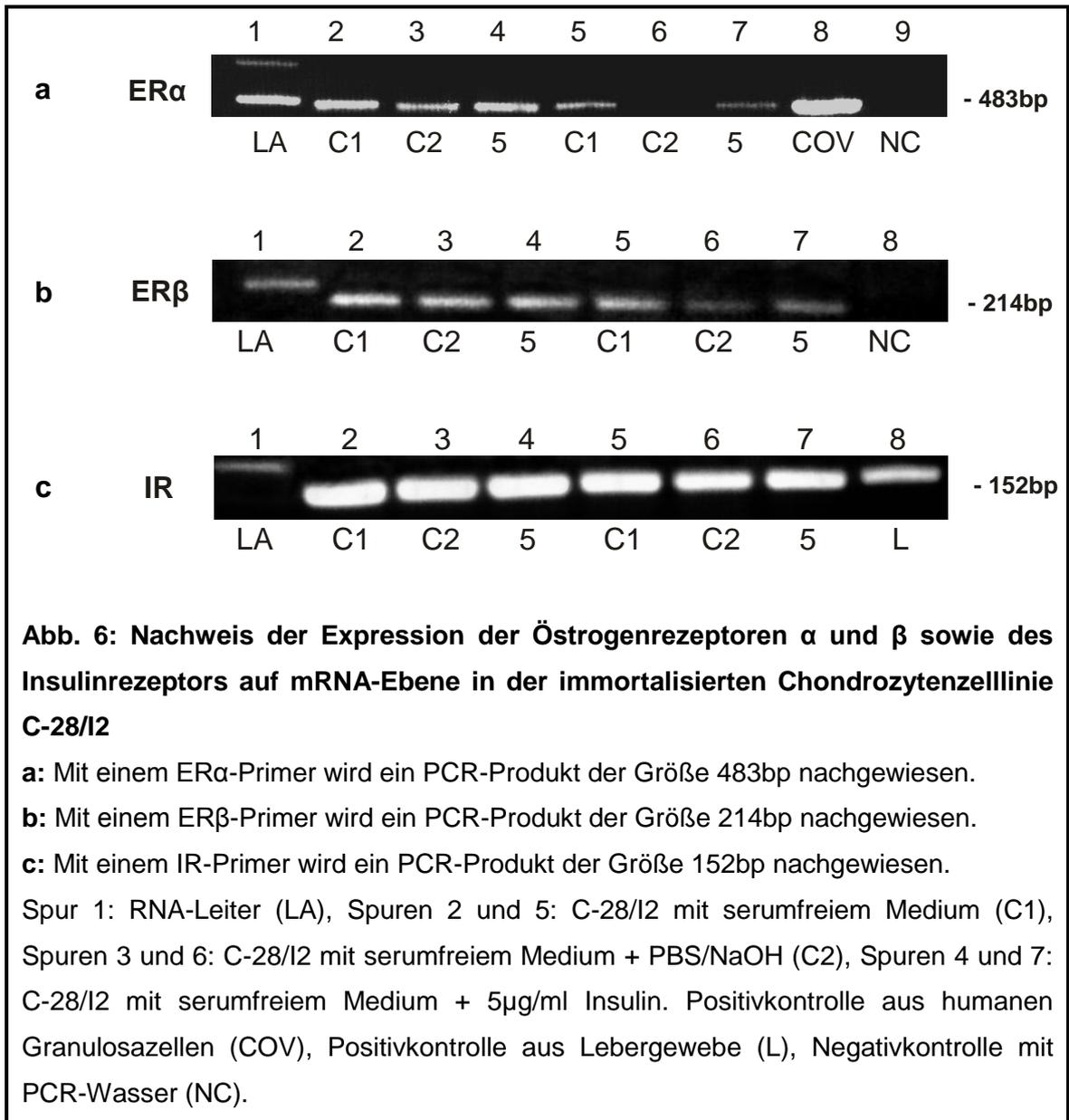
4.2 Nachweise von Östrogen- und Insulinrezeptoren auf mRNA Ebene

4.2.1 Immortalisierte Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2

Die mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren α und β (ER α / β) und des Insulinrezeptors (IR) in Chondrozyten der Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 wird mit Hilfe von spezifischen Primern, die Sequenzen von Regionen dieser Rezeptoren enthalten, untersucht.

Das Produkt für ER α wird bei 483bp erwartet, das Produkt für ER β bei 214bp. Die als Positivkontrolle verwandte humane Granulosazelllinie (COV) gibt ein starkes Signal bei 483bp (Abb. 6a). ER α kann in Chondrozyten der Zelllinie C-28/I2 und T/C-28a2 nachgewiesen werden (Abb. 6a). ER β wird nur in C-28/I2 nachgewiesen (Abb. 6b), nicht jedoch in T/C-28a2. Im Vergleich zu Kontrollzellen, die mit serumfreien Medium ohne Hormone (C1) kultiviert werden, kann man bei einer Inkubation mit 5 μ g/ml Insulin eine Abschwächung der Signale von ER α und ER β in Chondrozyten der Zelllinie C-28/I2 beobachten.

Der Insulinrezeptor (IR) wird in erwarteter Höhe von 152bp in Chondrozyten der Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 nachgewiesen (Abb. 6c). Das als Positivkontrolle verwandte humane Lebergewebe zeigt ein deutliches Signal bei 152bp (Abb. 6c). Nach Inkubation der Zellen mit Insulin in den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen ist das Signal in seiner Intensität im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert.

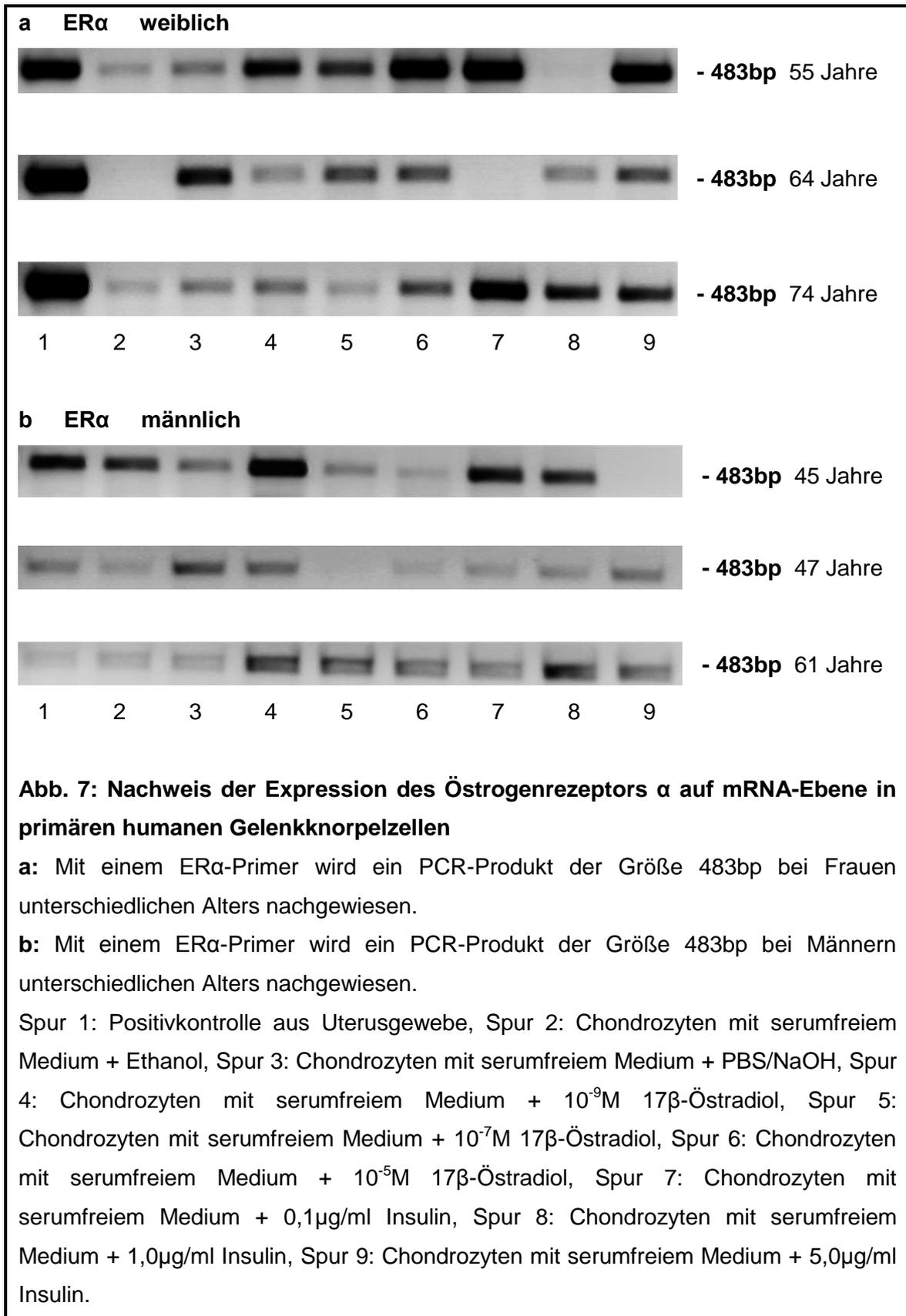


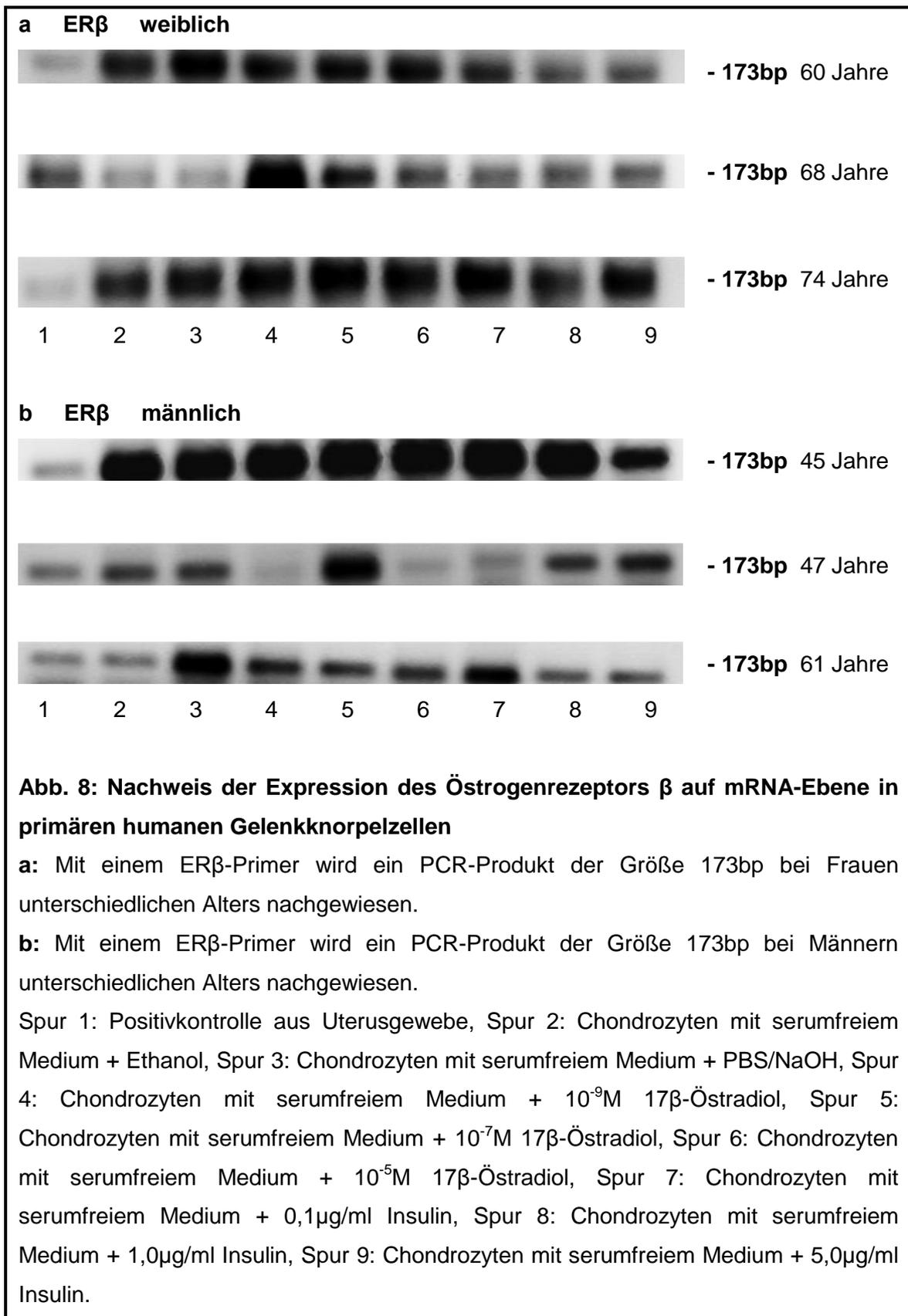
4.2.2 Primäre humane Gelenkknorpelzellen

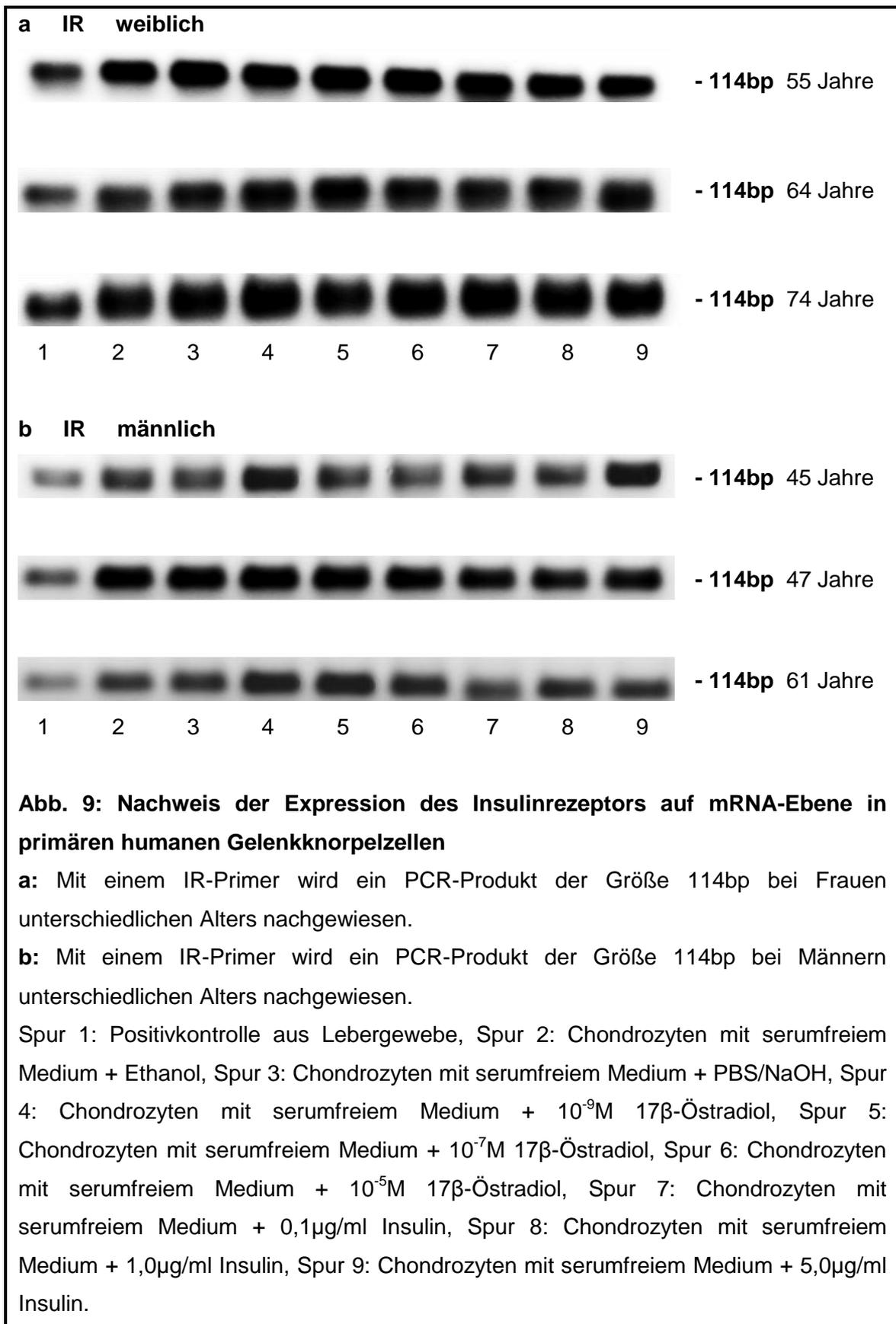
Analog zu den immortalisierten Knorpelzelllinien wird die mRNA-Expression der Östrogenrezeptoren α und β (ER α / β) und des Insulinrezeptors (IR) in primären humanen Gelenkknorpelzellen mit Hilfe der gleichen spezifischen Primer, die Sequenzen von Regionen dieser Rezeptoren enthalten, untersucht.

Das Produkt für ER α wird bei 483bp erwartet, das Produkt für ER β bei 173bp. Das als Positivkontrolle verwendete Uterusgewebe zeigt ein starkes Signal für ER α (Abb. 7); ER β wird schwächer exprimiert (Abb. 8). Beide Östrogenrezeptoren können in Chondrozyten primärer humaner Gelenkknorpelzellen nachgewiesen werden (Abb. 7 und 8). Bei Chondrozyten von Frauen zeigt sich ein vom Alter unabhängiges Signal. Bei Chondrozyten von Männern weist ER β ein deutlicheres Signal als ER α (Abb. 7b und 8b) und darüberhinaus ein stärkeres Signal bei Zellen jüngerer Patienten auf (Abb. 8b). Die mit verschiedenen Konzentrationen vorgenommenen Stimulationen mit 17 β -Östradiol und Insulin ergeben bei jedem Patienten ein unterschiedlich starkes Signalmuster.

Der Insulinrezeptor (IR) wird in erwarteter Höhe von 114bp in Chondrozyten des primären humanen Gelenkknorpels nachgewiesen (Abb. 9). In den Chondrozyten von Frauen zeigt sich auch hier ein gleich starkes Signal bei unterschiedlichem Alter der Patientinnen (Abb. 9a). In Chondrozyten jüngerer Männer zeigt sich tendenziell ein etwas stärkeres Signal als in Chondrozyten älterer Männer (Abb. 9b). Bei beiden Geschlechtern weisen Chondrozyten nach einer Stimulation mit 10⁻⁹M 17 β -Östradiol ein geringfügig stärkeres Signal als die Kontrollgruppen auf. Mit steigender 17 β -Östradiol-Konzentration nimmt die Signalintensität wieder ab (Abb. 9). Nach Inkubation der Zellen mit Insulin in den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen ist das Signal in seiner Intensität im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert.







Die mRNA-Expression des Östrogenrezeptors α (ER α) und des Insulinrezeptors (IR) in Chondrozyten primären humanen Gelenkknorpels wird ergänzend mit der real time PCR untersucht. Hierbei kann neben einer qualitativen Detektierung eines Primerproduktes auch eine quantitative Analyse erfolgen. Das Produkt für ER α wird bei 198bp erwartet, das Produkt für IR bei 114bp.

ER α zeigt bei Chondrozyten weiblicher Patienten ein stärkeres Signal als bei Chondrozyten männlicher Patienten. Eine Stimulation mit 10^{-7} M 17β -Östradiol ergibt bei beiden Geschlechtern das schwächste Signal im Vergleich zu den beiden anderen Konzentrationen. Bei einer Stimulation mit Insulin nimmt die Signalintensität für ER α mit steigender Insulinkonzentration ab und sinkt bei 5 μ g/ml Insulin unter die Signalstärke der unstimulierten Kontrolle. (Abb. 10 und Tab. 1).

IR weist nach einer Stimulation mit 10^{-9} M 17β -Östradiol bei Chondrozyten weiblicher Patienten ein sehr deutliches Signal auf. Bei steigender Insulinkonzentration nimmt die Signalintensität für IR ab (Abb. 11 und Tab. 2).

Tab. 1: Nachweis der Expression des Östrogenrezeptors α in variabler Intensität auf mRNA-Ebene in primären humanen Gelenkknorpelzellen

	Ct 18S	Ct ER α	delta Ct	dd Ct	Ratio
74 Jahre, weiblich					
Kontrolle (1)	2,71	26,32	23,61	0	1,000
+ 10 ⁻⁹ M 17 β -Östradiol (2)	4,24	25,88	21,64	-1,97	3,918
+ 10 ⁻⁷ M 17 β -Östradiol (3)	3,69	26,29	22,60	-1,01	2,014
+ 10 ⁻⁵ M 17 β -Östradiol (4)	3,82	25,96	22,14	-1,47	2,770
45 Jahre, männlich					
Kontrolle (5)	3,18	25,83	22,65	0	1,000
+ 10 ⁻⁹ M 17 β -Östradiol (6)	4,20	25,89	21,69	-0,96	1,945
+ 10 ⁻⁷ M 17 β -Östradiol (7)	3,60	26,47	22,87	0,22	0,859
+ 10 ⁻⁵ M 17 β -Östradiol (8)	4,33	25,56	21,23	-1,42	2,676
74 Jahre, weiblich					
Kontrolle (9)	4,07	26,92	22,85	0	1,000
+ 0,1 μ g/ml Insulin (10)	4,21	25,73	21,52	-1,33	2,514
+ 1,0 μ g/ml Insulin (11)	4,06	25,97	21,91	-0,94	1,919
+ 5,0 μ g/ml Insulin (12)	3,12	26,42	23,30	0,45	0,732
45 Jahre, männlich					
Kontrolle (13)	4,15	25,94	21,79	0	1,000
+ 0,1 μ g/ml Insulin (14)	4,47	25,67	21,20	-0,59	1,505
+ 1,0 μ g/ml Insulin (15)	4,92	26,52	21,60	-0,19	1,141
+ 5,0 μ g/ml Insulin (16)	4,50	27,84	23,34	1,55	0,342

Tab. 2: Nachweis der Expression des Insulinrezeptors in variabler Intensität auf mRNA-Ebene in primären humanen Gelenkknorpelzellen

	Ct 18S	Ct IR	delta Ct	dd Ct	Ratio
74 Jahre, weiblich					
Kontrolle (1)	11,83	25,21	13,38	0	1,000
+ 10 ⁻⁹ M 17β-Östradiol (2)	14,97	24,83	9,86	-3,52	11,472
+ 10 ⁻⁷ M 17β-Östradiol (3)	11,81	25,13	13,32	-0,06	1,042
+ 10 ⁻⁵ M 17β-Östradiol (4)	12,06	26,25	14,19	0,81	0,570
45 Jahre, männlich					
Kontrolle (5)	11,87	23,84	11,97	0	1,000
+ 10 ⁻⁹ M 17β-Östradiol (6)	12,17	24,43	12,26	0,29	0,818
+ 10 ⁻⁷ M 17β-Östradiol (7)	11,96	24,18	12,22	0,25	0,841
+ 10 ⁻⁵ M 17β-Östradiol (8)	11,97	23,95	11,98	0,01	0,993
74 Jahre, weiblich					
Kontrolle (9)	11,48	25,13	13,65	0	1,000
+ 0,1µg/ml Insulin (10)	10,78	24,66	13,88	0,23	0,853
+ 1,0µg/ml Insulin (11)	11,80	25,12	13,32	-0,33	1,257
+ 5,0µg/ml Insulin (12)	11,23	25,56	14,33	0,68	0,624
45 Jahre, männlich					
Kontrolle (13)	11,79	24,36	12,57	0	1,000
+ 0,1µg/ml Insulin (14)	11,88	24,21	12,33	-0,24	1,181
+ 1,0µg/ml Insulin (15)	12,37	25,54	13,17	0,60	0,660
+ 5,0µg/ml Insulin (16)	13,18	27,65	14,47	1,90	0,268

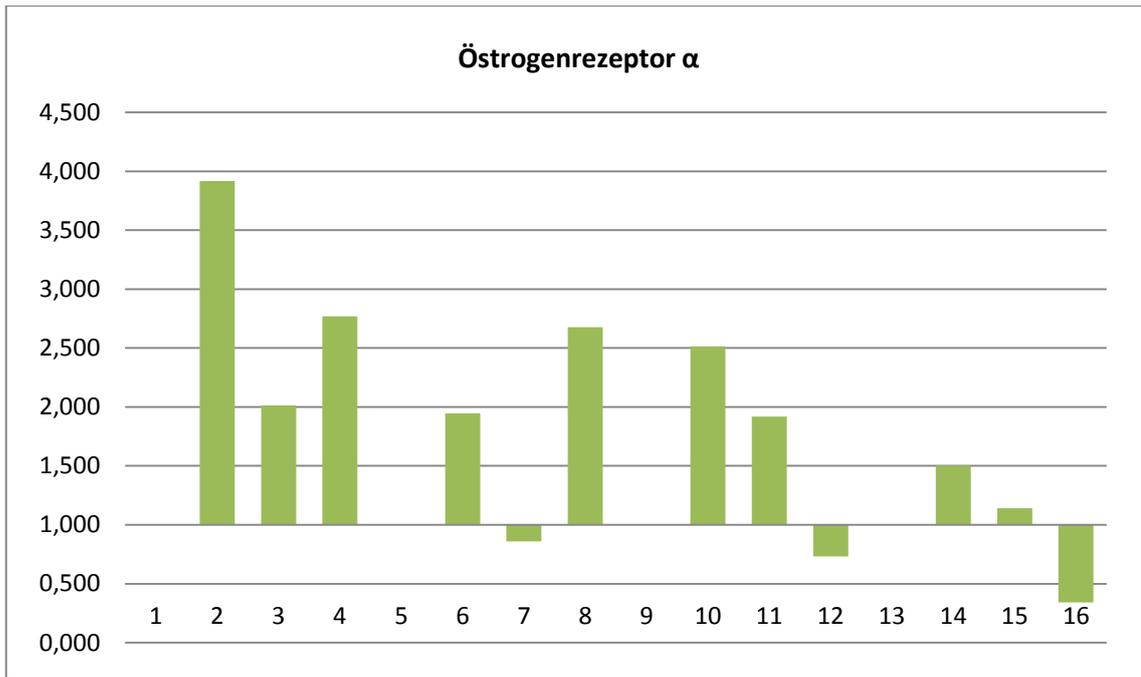


Abb. 10: Nachweis der Expression des Östrogenrezeptors α in variabler Intensität auf mRNA-Ebene in primären humanen Gelenkknorpelzellen (siehe Tab. 1)

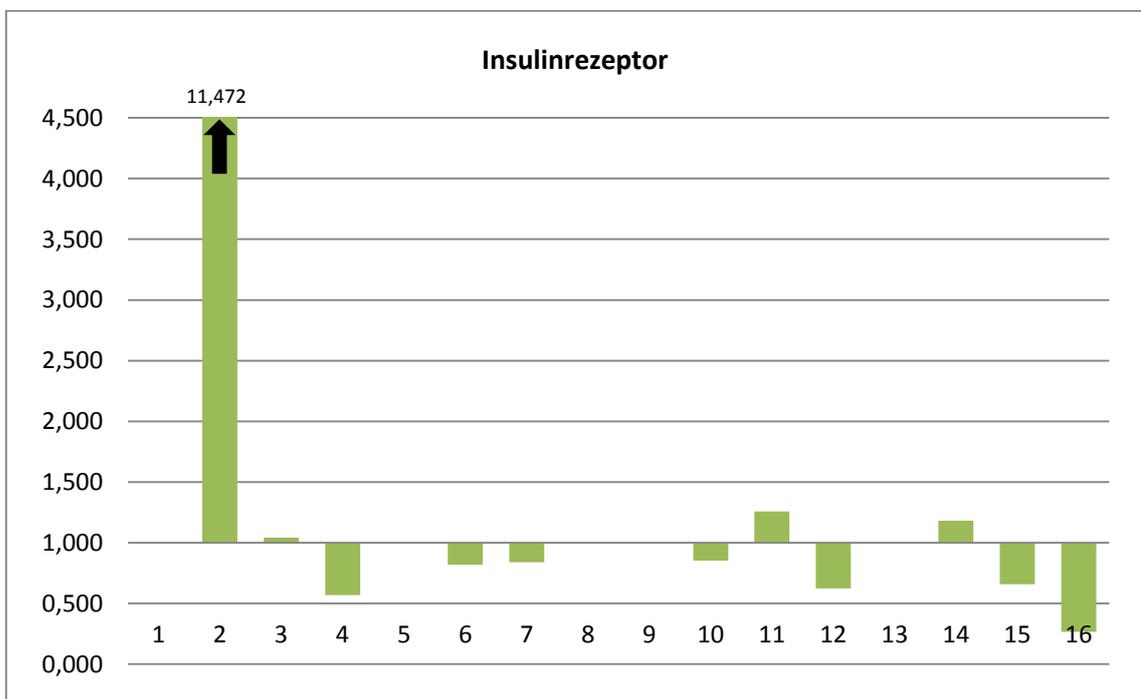


Abb. 11: Nachweis der Expression des Insulinrezeptors in variabler Intensität auf mRNA-Ebene in primären humanen Gelenkknorpelzellen (siehe Tab. 2)

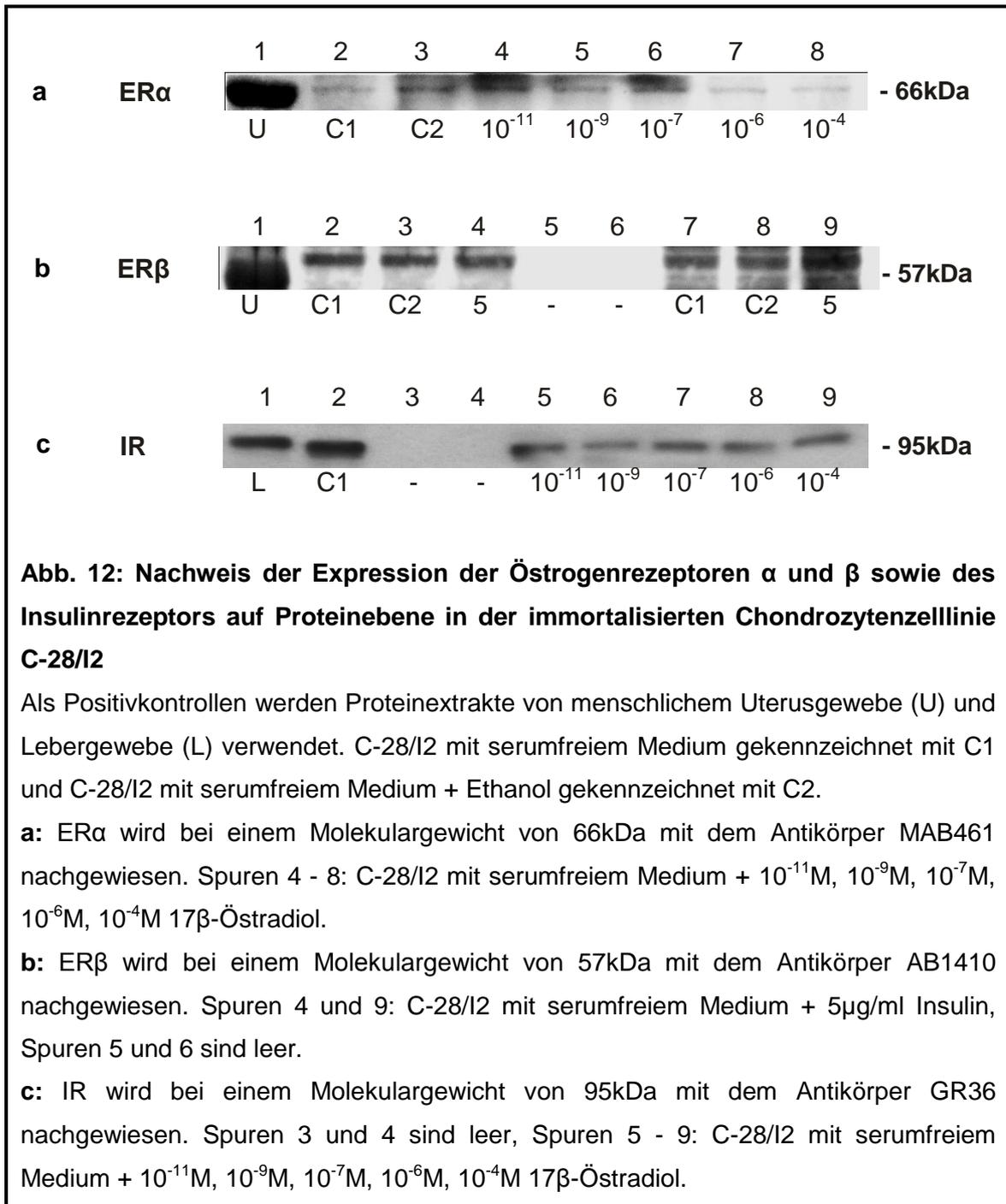
(Säule 2 ist höher als abgebildet. Dies wird durch den Pfeil und die Datenbeschriftung gekennzeichnet.)

4.3 Nachweise von Östrogen- und Insulinrezeptoren auf Protein Ebene

4.3.1 Immortalisierte Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2

Im Western Blot für ER α kann in beiden Zelllinien das Protein beim erwarteten molekularen Gewicht von 66kDa nachgewiesen werden (Abb. 12a). Zu diesem Zweck wird der Antikörper MAB461 verwendet. Im Vergleich zum Uterusgewebe, das als Positivkontrolle dient, sind die Banden der Knorpelzellen schwächer ausgeprägt (Abb. 12a). Im Vergleich zu den Kontrollen treten bei Inkubationen mit 10^{-11} M und 10^{-7} M 17 β -Östradiol nahezu gleich starke Banden auf (Abb. 12a); bei Inkubationen mit höheren Dosen von 10^{-6} M und 10^{-4} M 17 β -Östradiol wird eine Abschwächung der Banden beobachtet. ER β wird mit Hilfe des Antikörpers AB1410 mit einem Produkt von 57kDa in C-28/I2 Zellen detektiert (Abb. 12b). Im Vergleich zu den Kontrollen ist die Intensität der Bande bei Inkubation mit 5 μ g/ml Insulin nicht verändert (Abb. 12b).

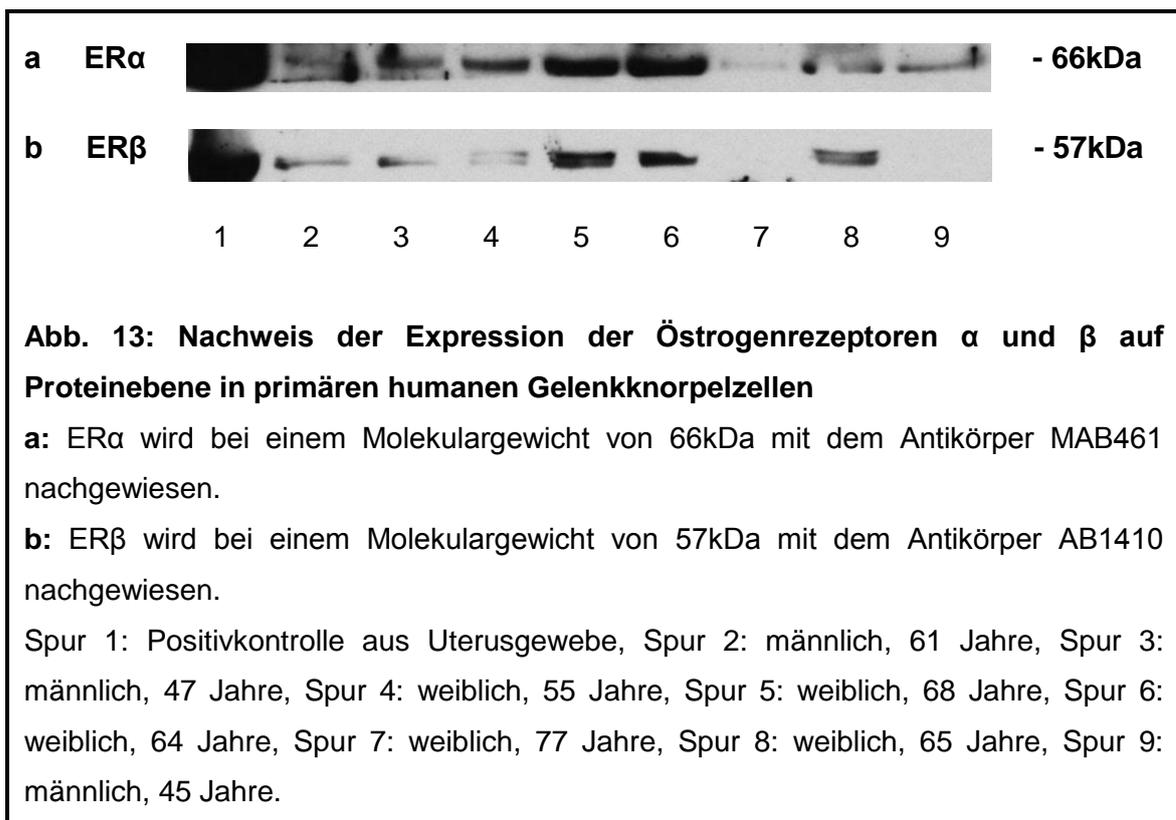
Zum Nachweis von IR im Western Blot wird der Antikörper GR36 eingesetzt. In Chondrozyten der Zelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 kann der Insulinrezeptor bei der erwarteten molekularen Größe von 95kDa aufgezeigt werden (Abb. 12c). Als Positivkontrolle wird humanes Lebergewebe verwendet (Abb. 12c). Bei C-28/I2 Zellen fällt auf, dass nach Inkubationen mit physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen von 17 β -Östradiol die Intensität der Banden für IR abnehmen (Abb. 12c).



4.3.2 Primäre humane Gelenkknorpelzellen

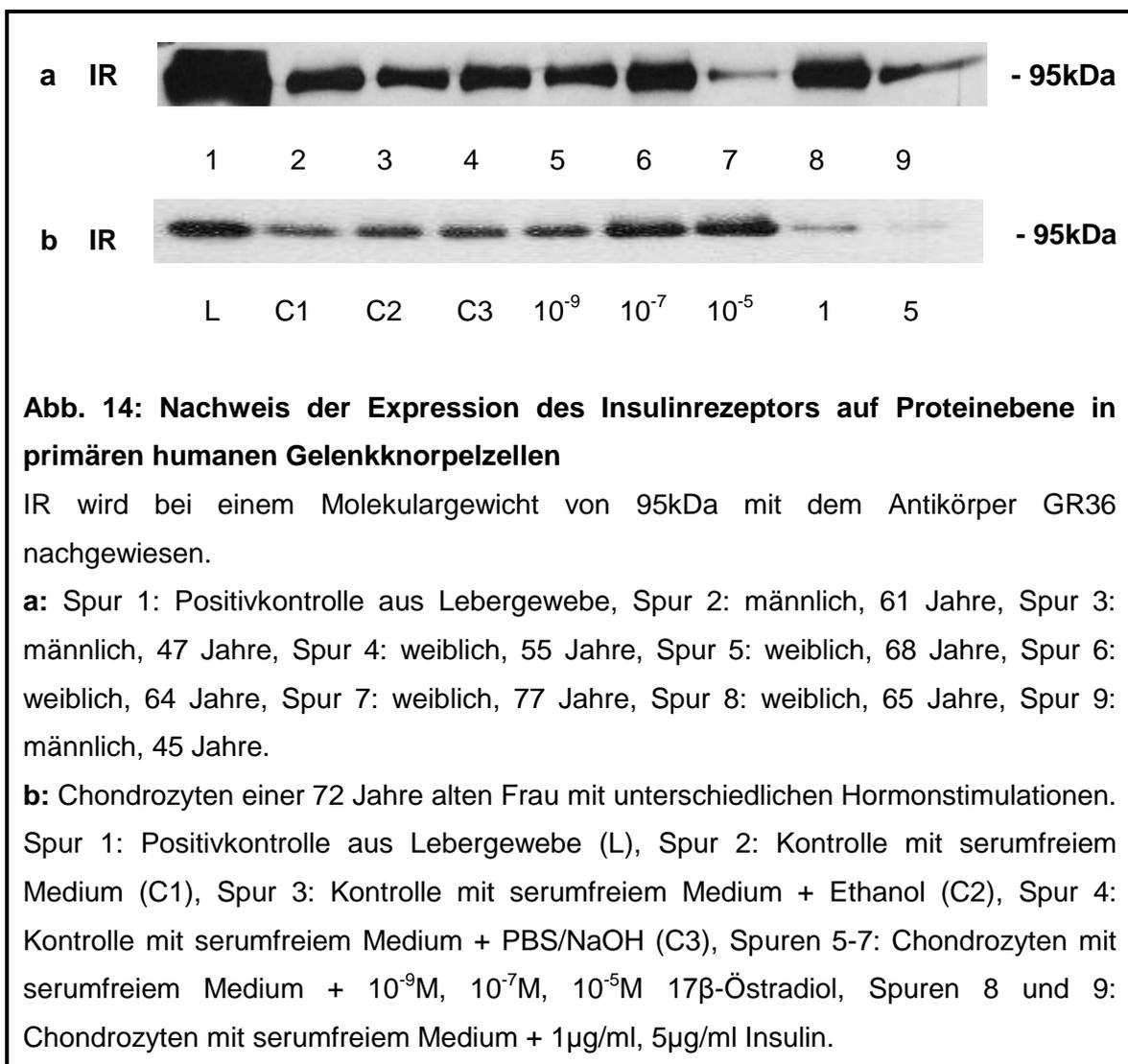
Im Western Blot für ER α kann in primären humanen Gelenkknorpelzellen beider Geschlechter das Protein beim erwarteten molekularen Gewicht von 66kDa nachgewiesen werden (Abb. 13a). Zu diesem Zweck wird analog der Versuche mit immortalisierten Zelllinien der Antikörper MAB461 verwendet. Im Vergleich zum Uterusgewebe, das als Positivkontrolle dient, sind auch bei Chondrozyten primären humanen Gelenkknorpels die Banden schwächer ausgeprägt (Abb. 13a). Dabei zeigen Chondrozyten von männlichen Patienten und von älteren Frauen eine weniger deutliche Bande als Chondrozyten jüngerer Frauen (Abb. 13a).

ER β wird mit Hilfe des Antikörpers AB1410 mit einem Produkt von 57kDa bestimmt. Auch hier kann ein Signal sowohl bei Chondrozyten von Frauen als auch von Männern gezeigt werden. Ähnlich wie bei ER α sind auch hier die Banden von Chondrozyten jüngerer Frauen stärker im Signal (Abb. 13b).



Zum Nachweis von IR in primären humanen Chondrozyten im Western Blot wird der Antikörper GR36 eingesetzt. Das Protein wird bei einer Größe von 95kDa detektiert. Chondrozyten beider Geschlechter zeigen ein deutliches Signal für den Insulinrezeptor, jedoch schwächer als die Positivkontrolle aus Lebergewebe. Zellen einer älteren Patientin zeigen eine etwas schwächere Bande (Abb.14a).

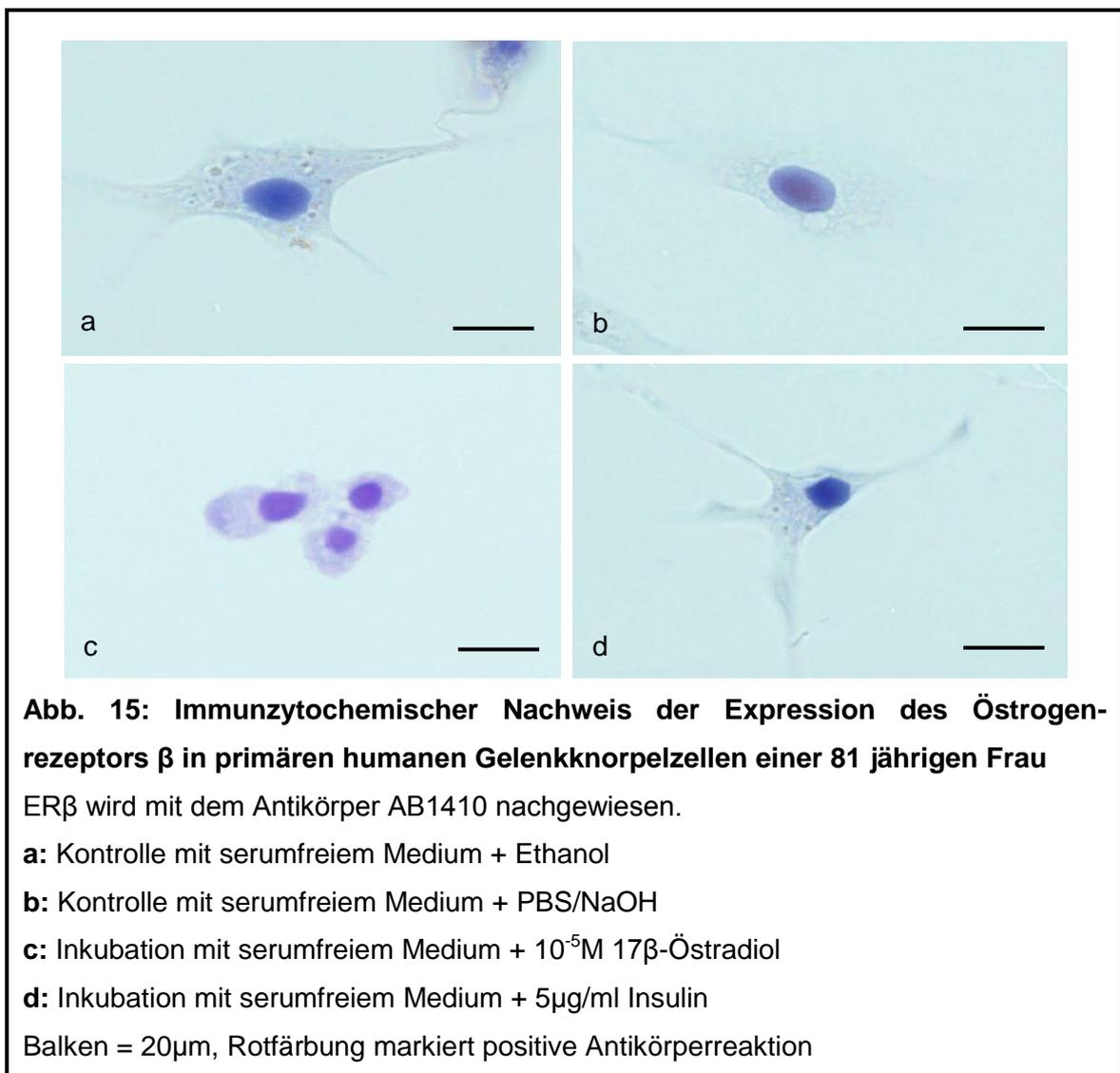
Stimuliert man die Chondrozyten einer 72 jährigen Frau mit unterschiedlichen Konzentrationen 17β -Östradiol oder Insulin, ergibt sich eine zunehmende Signalintensität für IR bei steigender 17β -Östradiol-Konzentration und eine abnehmende Intensität bei steigender Insulinkonzentration (Abb. 14b).



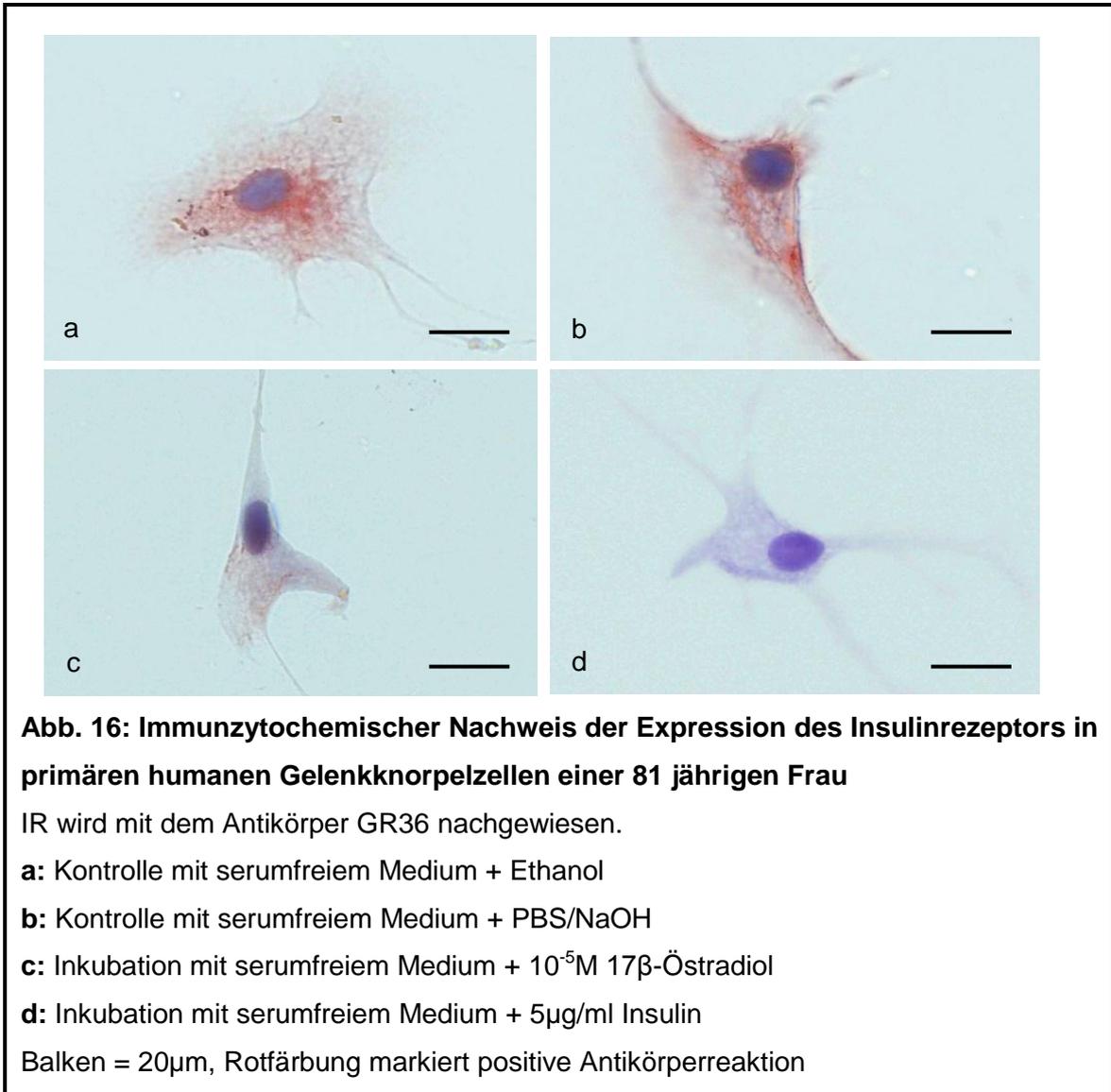
4.4 Immunzytochemische Untersuchung an Deckglaskulturen von primären humanen Gelenkknorpelzellen

Zum direkten Nachweis von ER β und IR in Chondrozyten primären humanen Gelenkknorpels wird eine immunzytochemische Untersuchung an Deckglaskulturen durchgeführt. ER β wird mit dem Antikörper AB1410 sowohl im Kern- als auch Zytoplasma durch eine rötliche Färbung nachgewiesen. Bei IR wird der Antikörper GR36 verwendet und es färbt sich nur das Zytoplasma rötlich. Die Immunreaktion von ER β (Abb. 15) fällt hierbei schwächer als die Reaktion von IR aus (Abb. 16).

Bei einer 10^{-5} M 17 β -Östradiol Stimulation an Chondrozyten tritt eine stärkere Immunreaktion von ER β als in der Kontrolle auf (Abb. 15a und c). Nach Stimulation mit 5 μ g/ml Insulin nimmt die Reaktion für ER β gegenüber der Kontrolle geringfügig ab (Abb. 15b und d).



Die Immunreaktion für IR fällt in den Kontrollgruppen stärker aus als in den Stimulationen mit 10^{-5} M 17β -Östradiol (Abb. 16a und c) und $5\mu\text{g/ml}$ Insulin (Abb. 16b und d) aus. Nach Stimulation mit Insulin ist die Reaktion für IR weniger intensiv als nach der Stimulation mit 17β -Östradiol (Abb. 16c und d).



4.5 Tritium markierter Prolineinbau und Kollagensynthese bei primären humanen Gelenkknorpelzellen

Zur indirekten Messung der Kollagensynthese primärer humaner Gelenkknorpelzellen wird der Prolineinbau mit dem radioaktiven Wasserstoff Tritium ^3H gemessen. Die Messwerte werden zunächst an die Hintergrundaktivität angepasst und dann ins Verhältnis zum DNA-Gehalt der Chondrozyten und zum Kollagengehalt der Zellkultur gesetzt. Der Kollagengehalt wurde zuvor mittels ELISA bestimmt.

Nach Stimulation mit 17β -Östradiol nimmt der Gehalt an Tritium mit steigender Östradiolkonzentration ab und ist geringer als in der dazu gehörigen Kontrolle. Nach Stimulation mit Insulin kann eine deutliche Steigerung des Tritiumgehaltes gemessen werden. Stimuliert man die Zellen erst mit 17β -Östradiol und anschließend mit Insulin, kann man den höchsten Messwert für Tritium verzeichnen. Auch die Kollagenmenge, die im ELISA gemessen wurde, ist deutlich höher im Vergleich zu den anderen Stimulationsansätzen (Tab. 3, Abb. 17 und 18).

Tab. 3: Tritium-Aktivität und Kollagensynthese von primären humanen Gelenkknorpelzellen eines 44 jährigen Mannes

	1	2	3	4	5	6	7	8
Messwert a (cpm)	51754,0	55871,2	37057,8	25267,5	73643,8	56036,2	28407,6	80903,0
Messwert b (cpm)	43902,1	37938,4	24782,8	20715,0	33662,2	50391,1	22931,2	35009,2
Messwert c (cpm)	25750,8	18323,2	16265,7	11247,4	14673,4	23352,0	17211,0	13584,9
Mittelwert (cpm)	40469,0	37377,6	26035,4	19076,6	40659,8	43259,8	22849,9	43165,7
Standardabweichung	13337,2	18780,3	10452,5	7152,2	30101,5	17470,2	5598,74	34392,3
Standardfehler	7700,3	10842,8	6034,75	4129,33	17379,1	10086,4	3232,44	19856,4
Hintergrundaktivität zur Korrektur des Mittelwertes: 31.233cpm								
korrigierter MW	40437,7	37346,4	26004,2	19045,4	40628,6	43228,5	22818,7	43134,5
DNA in ng/ml	1221,59	1242,75	1189,27	1194,50	1015,18	1039,80	1009,76	976,32
cpm / DNA-Gehalt	33,1024	30,0513	21,8658	15,9443	40,0209	41,5739	22,5980	44,1806
Kollagen in $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,02994	0,02783	0,02519	0,02586	0,02203	0,02218	0,02093	0,04220
cpm / Kollagen-Konzentration	1105,77	1079,68	868,18	616,63	1816,81	1874,05	1079,58	1046,97

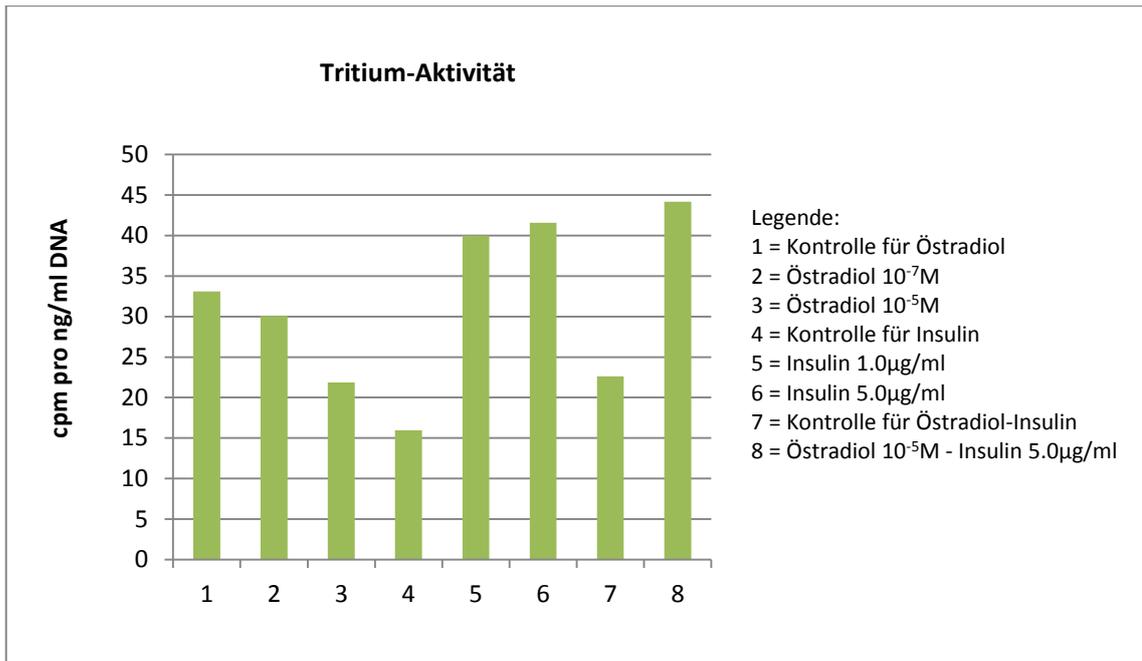


Abb. 17: Tritium-Aktivität in Chondrozyten eines 44 jährigen Mannes

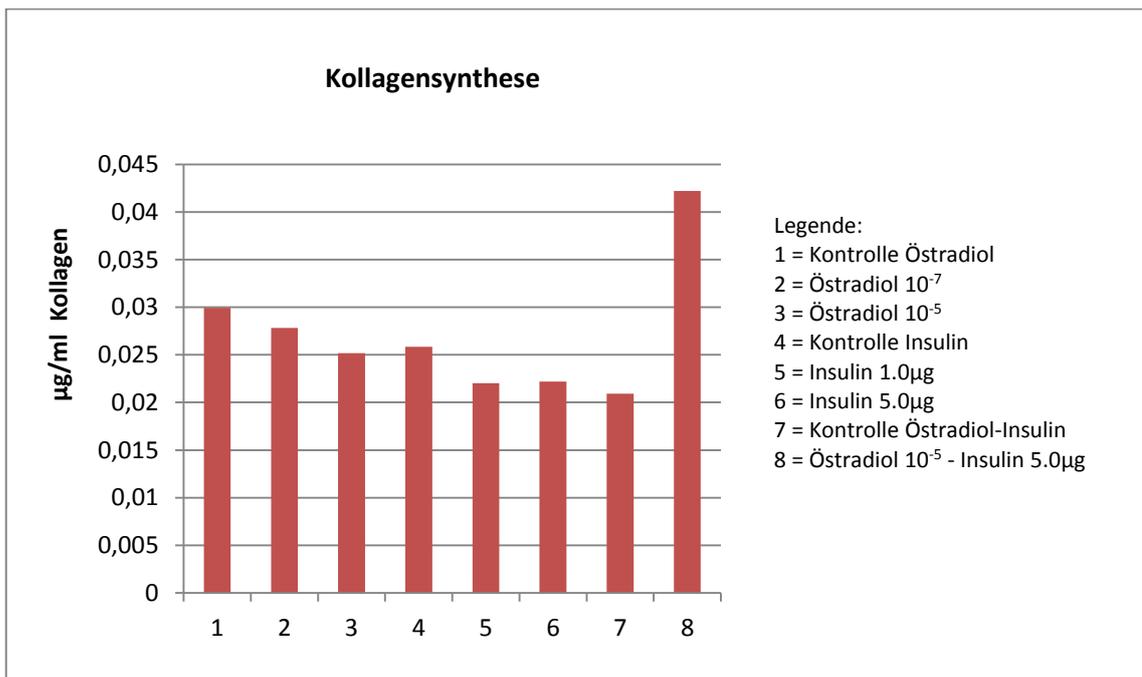


Abb. 18: Kollagensynthese in Chondrozyten eines 44 jährigen Mannes

5 Diskussion

5.1 Rückblick

Einige Arbeitsgruppen haben bereits in früheren Studien einen Zusammenhang zwischen Hormonen wie Insulin, 17β -Östradiol und Dihydrotestosteron sowie der Pathogenese von Arthrose vermutet (Collison et al., 2000; Ng et al., 2001; Spector et al., 1989, 1991; Wluka et al., 2000). In immunhistochemischen Untersuchungen konnte bereits die Expression von ER α nachgewiesen werden (Ben-Hur et al., 1997; Claassen et al., 2001). Die Kultivierung und Untersuchung gesunder primärer humaner Chondrozyten in repräsentativen Mengen ist jedoch aufwendig und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig durchgeführt. Die Zellen wurden aus dem Biopsiematerial gewonnen, das bei der endoprothetischen Versorgung von menschlichen Kniegelenken angefallen ist. Da der Knorpel dieser Gelenke schon stark in Mitleidenschaft gezogen wurde, ist das übrige Knorpelgewebe deutlich reduziert. Somit können nur kleine Zellmengen aufbereitet werden. Die immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 stellen hier eine Alternative dar und wurden bereits in früheren Arbeiten als reproduzierbares Modell für menschliche Knorpelzellen herangezogen (Goldring MB, 2004). Bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse muss jedoch insofern eine Einschränkung vorgenommen werden, als dass die Zellen nicht aus Gelenkknorpel sondern Rippenknorpel stammen und aufgrund ihrer Immortalisierung eventuell einen veränderten Rezeptorstatus exprimieren. Rippenknorpel selbst ist aber, wie die meisten Gelenkknorpel, ebenfalls hyaliner Knorpel und somit doch repräsentativ.

5.2 Östrogene und Chondrozyten

Die Östrogenrezeptoren ER α und ER β werden in immortalisierten Chondrozyten und in humanen primären Gelenkknorpelzellen nachgewiesen.

Die mit Hilfe der PCR erhobenen Befunde weisen auf eine Altersabhängigkeit der Ausprägung der Östrogenrezeptoren bei Frauen hin: Mit zunehmenden Alter, insbesondere nach der Menopause, nimmt der Östrogenspiegel bei Frauen ab (Gokhale et al., 2004; Gao et al., 2010) und ebenso scheinen sich auch die Östrogenrezeptoren zu verhalten. Auf Proteinebene lässt sich im Westernblot ein

ähnlicher Zusammenhang vermuten: Stimuliert man bei einer älteren Frau die Knorpelzellen mit einer höheren Konzentration 17β -Östradiol, scheint eine gewisse Reaktivierung von $ER\alpha$ zu erfolgen. So ließe sich das Ergebnis der Immunzytochemie erklären: $ER\beta$ zeigt hier bei einer 81-jährigen Frau nach einer Stimulation mit 17β -Östradiol eine optisch stärkere Signalintensität als in der Kontrolle ohne Stimulation. Bei Männern gibt es keinen wesentlichen Alterszusammenhang: $ER\alpha$ und $ER\beta$ werden sowohl auf mRNA-Ebene als auch Proteinebene nachgewiesen; die unterschiedlichen Signalintensitäten scheinen jedoch eher zufällig verteilt zu sein und korrelieren nicht mit dem Alter der Männer. Auch der Östrogenspiegel ist bei Männern deutlich niedriger als bei Frauen und zeigt nur geringfügige altersabhängige Varianzen auf. Ein Geschlechtsdimorphismus bezüglich 17β -Östradiol konnte auch schon in früheren Studien zu menschlichen Gelenkknorpelzellen aufgezeigt werden (Silbermann, 1983; Schwartz et al., 1996; Nasatzky et al., 1994; Kinney et al., 2005). Verglichen mit dem restlichen Körperstoffwechsel könnte Testosteron in diesem Zusammenhang eine entscheidendere Rolle bei Männern spielen.

Vergleicht man $ER\alpha$ und $ER\beta$ in PCR und Westernblot, so wird $ER\beta$ im Uterusgewebe schwächer exprimiert. Auch die Expression in Knorpelzellen ist nicht identisch. Hier zeigt $ER\beta$ auf mRNA-Ebene ein intensiveres Signal als $ER\alpha$. Im Westernblot ist der Unterschied jedoch nicht so deutlich. Insgesamt wird vermutet, dass es eine gewebsspezifische Verteilung von $ER\alpha$ und $ER\beta$ gibt. Frühere Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen genetischen Varianten und Defekten von $ER\beta$ und Arthrose hin (Ushiyama et al., 1998; Chen et al., 2004; González-Canga et al., 2010; Kerkhof et al., 2010; Riancho et al., 2010). Dies würde die Annahme unterstützen, dass $ER\beta$ im Gelenkknorpelgewebe eine entscheidendere Rolle spielt als $ER\alpha$. Des Weiteren gibt es Indizien dafür, dass die beiden Östrogenrezeptoren unterschiedliche Signale in der gleichen Zelle vermitteln (Katzenellenbogen et al., 2000).

5.3 Insulin und Chondrozyten

Der Insulinrezeptor IR wird in immortalisierten Chondrozyten und in humanen primären Gelenkknorpelzellen nachgewiesen.

Eine Altersabhängigkeit oder Geschlechterspezifität der Rezeptorexprimierung lässt sich weder auf mRNA-Ebene noch auf Proteinebene belegen. Da Insulin nicht zu den Sexualhormonen zählt, wurde dies auch nicht erwartet. Stimuliert man die Chondrozyten mit Insulin, erfolgt eine von der Konzentration abhängige Abschwächung

der Signalintensität in PCR, real time PCR, Westernblot und Immunzytochemie. Dies entspricht einer negativen Rückkopplung, die auch aus anderen Geweben, wie Muskulatur und Fettgewebe, bekannt ist. Bei Typ-2-Diabetes ist dieser Mechanismus als sogenannte periphere Insulinresistenz neben der gestörten Insulinsekretion Bestandteil der Pathogenese (Löffler et al., 2003). Geht man beim Knorpelgewebe also von der gleichen anabolen Wirkung des Insulins wie in vielen anderen Bindegeweben (Muskulatur, Knochen etc.) aus, so müssten demnach Diabetiker ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Arthrose haben.

5.4 Hormonelle Interaktionen

Stimuliert man humane primäre Gelenkknorpelzellen mit 17β -Östradiol, dann lässt sich bei einer physiologischen Konzentration (10^{-9}M) in Chondrozyten einer Frau eine deutliche Steigerung der Expression des Insulinrezeptors in der real time PCR aufzeigen. Mit steigender Östradiolkonzentration (10^{-7}M und 10^{-5}M) nimmt die Signalintensität jedoch wieder ab. Eine Dosis abhängige Interaktion zwischen 17β -Östradiol und Insulin konnte bereits bei Ratten nachgewiesen werden (González et al., 2003). In Zellen eines Mannes lässt sich dieser Zusammenhang nicht so eindeutig beweisen. Bei schwangeren Frauen wurde beobachtet, dass im Laufe der Schwangerschaft (also mit zunehmender Östrogenkonzentration) Bindegewebe elastischer und „weicher“ wird. Hintergrund ist unter anderem, dass die aus Faserknorpel bestehende Symphysis pubica (Schambeinfuge) lockerer und damit dehnbarer wird, um den Geburtsvorgang zu erleichtern (Becker et al., 2010). Vermutlich unterliegt auch hyaliner Gelenkknorpel einem ähnlichen Mechanismus. Zum Beweis dieser These wurden die Gelenkknorpelzellen von Kaninchen untersucht: Sowohl bei Tieren in der ersten Schwangerschaft als auch Kaninchen, die zum wiederholten Male schwanger waren, wurde die mRNA vieler relevanter Proteine deutlich weniger exprimiert. Hierzu gehörten Kollagen Typ II, Kollagenase, Inhibitoren von Metalloproteinasen, Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Cyclooxygenase 2 (COX-2). Die mRNA des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF) und des Insulin-like growth factor Rezeptors 2 (IGF-2-Rezeptors) war bei erstmaliger Schwangerschaft ebenfalls signifikant weniger. Bei Kaninchen mit wiederholter Schwangerschaft nahm der mRNA-Anteil dieser Rezeptoren jedoch zu (Hellio Le Graverand et al., 1998).

Auf Proteinebene fällt auf, dass die Signalintensität von IR-Westernblotbanden mit steigender Östradiolkonzentration in Chondrozyten einer Frau zunimmt. Dies scheint

zunächst ein Widerspruch zu den Ergebnissen der Versuche auf mRNA-Ebene zu sein. Es ist jedoch denkbar, dass es noch weitere Faktoren in den Chondrozyten gibt, die die Transkription von mRNA zu den Rezeptoren selbst beeinflussen. Für den Androgenrezeptor und ER α konnten diese sogenannten posttranslationalen Modifikationen nachgewiesen werden (Anbalagan et al., 2012). Der Insulinrezeptor gehört im Gegensatz zu den Östrogenrezeptoren zu der Gruppe von Membranrezeptoren. 85% der intrazellulären Domäne stimmen mit derjenigen des IGF-1-Rezeptors überein. Zwischen den Signaltransduktionswegen der Östrogen- und IGF-1-Rezeptoren konnte in Mammakarzinomzellen eine Verbindung festgestellt werden (Hamelers und Steenbergh, 2003). Hierbei verstärkte der Verbindungskomplex aus 17 β -Östradiol und ER die Signaltransduktion von IGF-1. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen Insulin- und IGF-1-Rezeptor sind die gleichen Interaktionen zwischen Östrogen- und Insulinrezeptoren wahrscheinlich.

Stimuliert man humane primäre Gelenkknorpelzellen mit Insulin, so nimmt die Expression von ER α auf mRNA-Ebene mit steigender Hormonkonzentration ab. Hier könnte ebenfalls im Sinne einer negativen Rückkopplung eine direkte Interaktion zwischen den Signaltransduktionswegen beider Hormone vorliegen.

5.5 Prolineinbau und Kollagensynthese

Im Falle des Tritium markierten Prolineinbaus resultiert aus einer steigenden 17 β -Östradiolkonzentration ein abnehmender Prolineinbau im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol. Diese Kontrolle zeigt jedoch bereits einen höheren Einbau als die Kontrolle mit PBS NaOH, die für die Stimulationen mit Insulin herangezogen wird. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch das Lösungsmittel für Insulin ist somit nicht ausgeschlossen. Im Falle der Kollagensynthese, die im ELISA nachgewiesen wird, zeigen sich ähnliche Unterschiede wie im Tritium markierten Prolineinbau.

Bei steigender Insulinkonzentration kommt es zu einem wachsenden Prolineinbau. Beim Versuchsaufbau zur Kollagensynthese lässt sich dies nicht bestätigen. Möglicherweise drückt sich die anabole Wirkung von Insulin nicht zwingend in der Kollagenmenge aus. Die Qualität des Kollagens ist eventuell entscheidender für die Stabilität des Gelenkknorpels.

Stimuliert man die Zellen erst mit 17 β -Östradiol und anschließend mit Insulin ergibt sich offenbar der größte Effekt auf Prolineinbau und Kollagensynthese: Es wird am meisten Tritium markiertes Prolin eingebaut und Kollagen synthetisiert. Dies zeigt deutlich, dass

eine Interaktion zwischen beiden Hormonen existiert: Aus diesem Ergebnis könnte man ableiten, dass 17β -Östradiol die anabole Wirkung von Insulin synergistisch verstärkt. Einschränkend muss jedoch bemerkt werden: Es wurden die Zellen nur eines männlichen Patienten untersucht. Männer haben in vivo keine derart hohe Östrogenkonzentration und Zellen einer Frau könnten anders reagieren. Eine Diskrepanz zu diesem Ergebnis gibt es bei ähnlichen Versuchen mit Zellen von Rinderknorpel. Hier konnte eine wechselnden Stimulation mit 17β -Östradiol und Insulin keinen positiven Effekt auf den Prolineinbau zeigen (Claassen et al., 2006c). Zur vollständigen Klärung werden somit in Zukunft noch weitere Versuche erforderlich sein.

5.6 Methodische Grenzen

Die verwendeten humanen primären Chondrozyten in dieser Arbeit stammen aus Kniegelenksoperationen, in denen aufgrund einer Arthrose eine Totalendoprothese (TEP) eingesetzt werden musste. Sie haben somit den Vorteil, dass es sich um menschliche Gelenkknorpelzellen (und nicht Rippenknorpelzellen) handelt. Da die Operationen aber nur bei bereits an Arthrose erkrankten Patienten durchgeführt werden, handelt es sich folglich um keine gesunden Knorpelzellen mehr. Hormonelle Interaktionen im Gelenkknorpel gesunder Menschen lassen sich somit nur bedingt aus den Versuchsergebnissen ableiten. Da die Primärzellen nicht immortalisiert und unterschiedlichen Ursprungs sind, ist eine Reproduzierbarkeit der Untersuchungen ebenfalls schwierig. Betrachtet man die Morphologie dieser Zellen in Kulturansätzen, so erinnern sie eher an Fibroblasten als an Chondrozyten. Es ist also durchaus möglich, dass sie in vitro andere Eigenschaften und einen anderen Rezeptorstatus aufweisen als in vivo.

Die Östrogenrezeptoren $ER\alpha$ und $ER\beta$ und der Insulinrezeptor IR können in den immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/12 und T/C-28a2 und in humanen primären Gelenkknorpelzellen sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Quantitative Aussagen hinsichtlich Expressionsstärke in Westernblot und RT-PCR sind nur eingeschränkt möglich. In der Immunzytochemie sind Vergleiche zwischen Signalintensitäten möglich, jedoch eher subjektiv. Die real time PCR lässt am ehesten objektive quantitative Vergleiche zu.

Die drei unterschiedlichen Negativkontrollen in den Stimulationsansätzen (serumfrei ohne Zusatz, mit Ethanol oder mit PBS NaOH) zeigen nicht in allen Versuchen ein

identisches Verhalten. Ethanol und PBS NaOH als Lösungsmittel für 17 β -Östradiol bzw. Insulin haben möglicherweise an sich schon einen gewissen Einfluss auf die Rezeptorexpressionen und den Stoffwechsel der Knorpelzellen.

5.7 Schlussfolgerung

In Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse stellen Knorpelzellen ein Zielgewebe für die Hormone 17 β -Östradiol und Insulin dar. Auch eine Interaktion zwischen beiden Hormonen in Knorpelgewebe ist offensichtlich. Es gibt jedoch zum Teil widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf frühere Untersuchungen, z.B. an Rinderknorpel, sodass der genaue Zusammenhang zwischen den Signaltransduktionen beider Hormone zunächst ungeklärt bleiben muss.

Das spezifische Verhalten in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter bei Östrogenen erhärtet jedoch den Verdacht auf einen Zusammenhang zwischen Arthrose und Postmenopause.

Da der Insulinrezeptor an humanen primären Chondrozyten nachweisbar ist und Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 häufig eine periphere Insulinresistenz aufgrund eines herunter regulierten Rezeptorstatus haben (Löffler et al., 2003), ist es sehr wahrscheinlich, dass Diabetiker ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Arthrose haben (Athanasίου et al., 1999).

5.8 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragen, die es zu klären gilt. Der detaillierte Zusammenhang zwischen der Signaltransduktion von Östrogen und Insulin könnte durch die Analyse möglicher verbindender Proteine und anderer Wachstumshormone besser geklärt werden (Fernihough et al., 1999; Pufe et al., 2007; Claassen et al., 2011b). Auch Enzyme, deren Einfluss auf die Entstehung von Arthrose bekannt sind, wie z.B. Interleukin 1 β und Matrix Metalloproteinase (Laadhar et al., 2007; Claassen et al., 2010), könnten einer hormonellen Beeinflussung unterliegen. Die Wirkung von Knorpel und Knochen aufbauender Substanzen wie Vitamin D3 und Bisphosphonate wird möglicherweise auch hormonell gefördert (Claassen et al., 2006a).

Geht man davon aus, dass Östrogene einen Einfluss auf die Entstehung von Arthrose haben, so könnte die Aufnahme von Phytoöstrogenen über die Nahrung, z.B. über

Soja, ebenfalls relevant sein (Ham et al., 2002; Claassen et al., 2008). Eine Bindung der Phytoöstrogene Genistein und Irisolidon an beide Östrogenrezeptoren konnte bereits in vitro nachgewiesen werden (Morito et al., 2002). Auch bei der Einnahme von hormonellen oralen Verhütungsmitteln kann ebenso ein Effekt vermutet werden (Oliveria et al., 1996). Bei Versuchen mit Affen konnte eine orale Östrogensubstitution dies bereits bewirken (Richmond et al., 2000). Sie erzielte eine gesteigerte Produktion von Proteoglykanen und von IGF bindendem Protein 2.

Andere Sexualhormone zeigen möglicherweise ebenfalls eine Interaktion mit Insulin und Knorpelgewebe (Claassen et al., 2006b). Bei Frauen wäre es interessant, Progesteron zu untersuchen. Bei Männern könnte die Analyse von Testosteron weiterführend sein (Silbermann, 1983; Koelling und Miosge, 2010).

Da humane primäre Gelenkknorpelzellen von gesunden Menschen in der Regel nicht gewonnen werden können, wären epidemiologische und klinische Studien zur Entstehung und zum Zusammenhang zwischen Arthrose, Diabetes mellitus und Sexualhormonspiegel interessant.

6 Zusammenfassung

Die immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/I2 und T/C-28a2 und primäre humane Chondrozyten von Kniegelenk-Operationen werden kultiviert und mit den Hormonen 17 β -Östradiol und Insulin inkubiert. Primäre humane Chondrozyten zeigen – unabhängig von den hormonellen Stimulationen – eine Abweichung von der typischen Zellmorphologie in Knorpelgewebe.

Zum ersten Mal kann der Nachweis der Östrogenrezeptoren ER α und ER β und des Insulinrezeptors IR sowohl auf mRNA-Ebene mittels PCR und real time PCR als auch auf Proteinebene mit Western Blot und Immunzytochemie an humanen Chondrozyten gelingen. Dabei beeinflussen die hormonellen Stimulationen die Expression der Rezeptoren des jeweiligen anderen Hormons. Mit steigender Insulinkonzentration nimmt die Expression von ER α ab und mit wachsender 17 β -Östradiolkonzentration sinkt die Expression von IR bei Frauen.

Der radioaktiv markierte Prolineinbau und die Kollagensynthese werden ebenfalls in primären humanen Chondrozyten durchgeführt. Auch hier ergibt sich eine eindeutige Beeinflussung durch die unterschiedlich intensiven Stimulationen mit 17 β -Östradiol und Insulin. Hierbei führt die Versuchsstrategie „Inkubation mit 17 β -Östradiol, gefolgt von einer Inkubation mit Insulin“ zu Maximalwerten beim Prolineinbau und bei der Kollagensynthese.

Insgesamt beweist diese Arbeit, dass es eine Interaktion zwischen Sexualhormonen und Stoffwechselformonen gibt und somit auch eine gegenseitige Beeinflussung beider Hormonsysteme wahrscheinlich ist. Ebenso ergeben sich dadurch neue Ansatzpunkte für mögliche zukünftige medizinische Therapien: gezielte Hormonsubstitutionen lokal in das erkrankte Gelenk oder systemisch zur Prophylaxe wären denkbar. Letztendlich sind aber noch weitere Versuche und Studien erforderlich, die zur Klärung der genaueren Zusammenhänge von Arthrose, Sexualhormonen und Insulinstoffwechsel beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Anbalagan M, Huderson B, Murphy L, Rowan BG. (2012) Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* 10:1.

Athanasίου KA, Fleischli JG, Bosma J, Laughlin TJ, Zhu CF, Agrawal CM, Lavery LA. (1999) Effects of diabetes mellitus on the biomechanical properties of human ankle cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 368:182-189.

Becker I, Woodley SJ, Stringer MD. (2010) The adult human pubic symphysis: a systematic review. *J Anat* 217:475-487.

Ben-Hur H, Thole HH, Mashiah A, Insler V, Berman V, Shezen E, Elias D, Zuckerman A, Ornoy A. (1997) Estrogen, progesterone and testosterone receptors in human fetal cartilaginous tissue: immunohistochemical studies. *Calcif Tissue Int* 60:520-526.

Chen FP, Hsu T, Hu CH, Wang WD, Wang KC, Teng LF. (2004) Expression of estrogen receptors alpha and beta in human osteoblasts: identification of exon-2 deletion variant of estrogen receptor beta in postmenopausal women. *Chang Gung Med J* 27:107-115.

Claassen H, Hassenpflug J, Schünke M, Sierralta W, Thole H, Kurz B. (2001) Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in articular chondrocytes from cows, pigs and humans: in situ and in vitro results. *Ann Anat* 183:223-227.

Claassen H, Hornberger F, Scholz-Ahrens K, Schünke M, Schrezenmeir J, Kurz B. (2002) The effect of estrogens and dietary calcium deficiency on the extracellular matrix of articular cartilage in Göttingen miniature pigs. *Ann Anat* 184:141-148.

Claassen H, Schünke M, Kurz B. (2005) Estradiol protects cultured articular chondrocytes from oxygen-radical-induced damage. *Cell Tissue Res* 319:439-445.

Claassen H, Cellarius C, Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J, Glüer CC, Schünke M, Kurz B. (2006) Extracellular matrix changes in knee joint cartilage following bone-active drug treatment. *Cell Tissue Res* 324:279-289.

Claassen H, Mönig H, Sel S, Werner JA, Paulsen F. (2006) Androgen receptors and gender-specific distribution of alkaline phosphatase in human thyroid cartilage. *Histochem Cell Biol* 126:381-388.

Claassen H, Schlüter M, Schünke M, Kurz B. (2006) Influence of 17beta-estradiol and insulin on type II collagen and protein synthesis of articular chondrocytes. *Bone* 39:310-317.

Claassen H, Briese V, Manapov F, Nebe B, Schünke M, Kurz B. (2008) The phytoestrogens daidzein and genistein enhance the insulin-stimulated sulfate uptake in articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 333:71-79.

Claassen H, Steffen R, Hassenpflug J, Varoga D, Wruck CJ, Brandenburg LO, Pufe T. (2010) 17β-estradiol reduces expression of MMP-1, -3, and -13 in human primary articular chondrocytes from female patients cultured in a three dimensional alginate system. *Cell Tissue Res* 342:283-293.

Claassen H, Schicht M, Brandt J, Reuse K, Schädlich R, Goldring MB, Guddat SS, Thate A, Paulsen F. (2011a) C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes as well as human primary articular chondrocytes express sex hormone and insulin receptors - Useful cells in study of cartilage metabolism. *Ann Anat* 193:23-29.

Claassen H, Schicht M, Paulsen F. (2011b) Impact of sex hormones, insulin, growth factors and peptides on cartilage health and disease. *Prog Histochem Cytochem* 45:239-293. Review.

Collison M, Campbell IW, Salt IP, Dominiczak AF, Connell JM, Lyall H, Gould GW. (2000) Sex hormones induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes by reducing cellular content of IRS proteins. *Diabetologia* 43:1374-1380.

Deutzmann R, Bruckner-Tudermann L, Bruckner P: Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2003, S. 753-787.

Felson DT, Nevitt MC. (1998) The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10:269-272. Review.

Felson DT, Nevitt MC. (1999) Estrogen and osteoarthritis: how do we explain conflicting study results? *Prev Med* 28:445-450. Review.

Fernihough JK, Richmond RS, Carlson CS, Cherpes T, Holly JM, Loeser RF. (1999) Estrogen replacement therapy modulation of the insulin-like growth factor system in monkey knee joints. *Arthritis Rheum* 42:2103-2111.

Finger F, Schörle C, Zien A, Gebhard P, Goldring MB, Aigner T. (2003) Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/I2. *Arthritis Rheum* 48:3395-3403.

Gao W, Zeng C, Cai D, Liu B, Li Y, Wen X, Chen Y. (2010) Serum concentrations of selected endogenous estrogen and estrogen metabolites in pre- and post-menopausal Chinese women with osteoarthritis. *J Endocrinol Invest* 33:644-649.

Gokhale JA, Frenkel SR, Dicesare PE. (2004) Estrogen and osteoarthritis. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 33:71-80. Review

Goldring MB. (2004) immortalization of human articular chondrocytes for generation of stable, differentiated cell lines. *Methods Mol Med* 100:23-36.

González C, Alonso A, Díaz F, Patterson AM. (2003) Dose- and time-dependent effects of 17beta-oestradiol on insulin sensitivity in insulin-dependent tissues of rat: implications of IRS-1. *J Endocrinol* 176:367-379.

González-Canga A, Ugai K, Suzuki M, Okuzawa H, Negishi E, Ueno K. (2010) Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with rheumatoid arthritis symptoms. *Rheumatol Int* 30:1259-1262.

Ham KD, Loeser RF, Lindgren BR, Carlson CS. (2002) Effects of long-term estrogen replacement therapy on osteoarthritis severity in cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* 46:1956-1964.

Hamelers IHL, Steenbergh PH. (2003) Interactions between estrogen and insulin-like growth factor signaling pathways in human breast tumor cells. *Endocr Relat Cancer* 10:331-345.

Hellio Le Graverand MP, Reno C, Hart DA. (1998) Influence of pregnancy on gene expression in rabbit articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 6:341-350.

Hombach-Klonisch S, Kehlen A, Fowler PA, Huppertz B, Jugert JF, Bischoff G, Schlüter E, Buchmann J, Klonisch T. (2005) Regulation of functional steroid receptors and ligand-induced responses in telomerase-immortalized human endometrial epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 34:517-534.

Johnston SA. (1997) Osteoarthritis – Joint anatomy, physiology and pathobiology. *Veterinary Clinics of North America: Small animal practice* 27: 699-723.

Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. (2000) Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:279-285. Review.

Kerkhof HJ, Meulenbelt I, Carr A, Gonzalez A, Hart D, Hofman A, Kloppenburg M, Lane NE, Loughlin J, Nevitt MC, Pols HA, Rivadeneira F, Slagboom EP, Spector TD, Stolk L, Tsezou A, Uitterlinden AG, Valdes AM, van Meurs JB. (2010) Common genetic variation in the Estrogen Receptor Beta (ESR2) gene and osteoarthritis: results of a meta-analysis. *BMC Med Genet* 11:164.

Kinney RC, Schwartz Z, Week K, Lotz MK, Boyan BD. (2005) Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17beta-estradiol. *Osteoarthritis Cartilage* 13:330-337.

Koelling S, Miosge N. (2010) Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62:1077-1087.

Laadhar L, Zitouni M, Kalle-Sellami M, Mahjoub M, Sellami S, Makni S. (2007) Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms. *Rev Med Interne* 28:531-536. Review.

Leichtweiß HP, Schröder HJ: Sexuallfunktionen, Schwangerschaft und Geburt. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.): *Lehrbuch der Physiologie*. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003, S. 493-516.

Löffler G, Kellerer M, Häring HU: Endokrine Funktionen III: Die schnelle Stoffwechselregulation. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): Biochemie & Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2003, S. 837-864.

Morito K, Aomori T, Hirose T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. (2002) Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β . Biol Pharm Bull 25:48-52.

Nasatzky E, Schwartz Z, Soskolne WA, Brooks BP, Dean DD, Boyan BD, Ornoy A. (1994) Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures. Connect Tissue Res 30:277-294. Review.

Ng KP, Datuin JP, Bern HA. (2001) Effects of estrogens in vitro and in vivo on cartilage growth in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Gen Comp Endocrinol 121:295-304.

Niethard FU, Pfeil J: Orthopädie (Duale Reihe). 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003, S. 176-190.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J. (2001) Mechanism of estrogen action. Physiol Rev 81: 1535-1565.

Oliveria SA, Felson DT, Klein RA, Reed JI, Walker AM. (1996) Estrogen replacement therapy and the development of osteoarthritis. Epidemiology 7:415-419.

Petrides PE: Endokrine Funktionen IV: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): Biochemie & Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2003, S. 865-908.

Pfaffl MW. (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOSpektrum 1:92-95.

Pufe T, Claassen H, Scholz-Ahrens KE, Varoga D, Drescher W, Franke AT, Wruck C, Petersen W, Cellarius C, Schrezenmeir J, Glüer CC. (2007) Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in Göttingen miniature pigs and human osteoblasts. Calcif Tissue Int 80:184-191.

Riancho JA, García-Ibarbia C, Gravani A, Raine EV, Rodríguez-Fontenla C, Soto-Hermida A, Rego-Perez I, Dodd AW, Gómez-Reino JJ, Zarrabeitia MT, Garcés CM, Carr A, Blanco F, González A, Loughlin J. (2010) Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. *Osteoarthritis Cartilage* 18:927-933.

Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. (2000) Functional estrogen receptors in adult articular cartilage: estrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* 43:2081-2090.

Rojas-Rodríguez J, Escobar-Linares LE, Garcia-Carrasco M, Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, Zamora-Ustaran A. (2007) The relationship between the metabolic syndrome and energy-utilization deficit in the pathogenesis of obesity-induced osteoarthritis. *Med Hypotheses* 69:860-868.

Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. (2009) Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther* 11:241. Review.

Schwartz Z, Gates PA, Nasatzky E, Sylvia VL, Mendez J, Dean DD, Boyan BD. (1996) Effect of 17 beta-estradiol on chondrocyte membrane fluidity and phospholipid metabolism is membrane-specific, sex-specific, and cell maturation-dependent. *Biochim Biophys Acta* 1282:1-10.

Schmidt W: Histologie, Gewebelehre. In: Schiebler TH, Schmidt W (Hrsg.): Anatomie. 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2002, S. 35-98.

Silbermann M: Hormones and cartilage. *Cartilage – development, differentiation and growth*, Volume 2. Academic Press 1983; pp. 327-368.

Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, S. 279-280.

Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA. (2006) Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 54:2481-2487.

Spector TD, Campion GD. (1989) Generalised osteoarthritis: a hormonally mediated disease. *Ann Rheum Dis* 48:523-527. Review.

Spector TD, Perry LA, Jubb RW. (1991) Endogenous sex steroid levels in women with generalised osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 10:316-319.

Spector TD, Nandra D, Hart DJ, Doyle DV. (1997) Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women?: The Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 56:432-434.

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Nishioka J, Ohkubo I, Hukuda S. (1998) Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis. *J Rheumatol* 25:134-137.

Velasquez MT, Katz JD. (2010) Osteoarthritis: another component of metabolic syndrome? *Metab Syndr Relat Disord* 8:295-305.

Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD. (2000) Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas* 35:183-199. Review.

8 Thesen

1. Arthrose ist eine Verschleißerkrankung des Knorpelgewebes analog der Osteoporose als Verschleißerkrankung des Knochengewebes. Östrogenmangel ist als eine mögliche Ursache der Osteoporose bekannt. Bei Arthrose wird ein ähnlicher Zusammenhang vermutet.
2. Insulin hat an vielen Geweben eine anabole Wirkung. Ein Mangel an Insulin bzw. eine periphere Insulinresistenz durch verringerte Rezeptorenanzahl wie bei Diabetes mellitus Typ 2 kann eine Destruktion von Knorpelgewebe begünstigen.
3. Die immortalisierten Knorpelzelllinien C-28/12 und T/C-28a2 können als Modell für menschliche Knorpelzellen verwendet werden.
4. Primäre humane Knorpelzellen verändern in vitro ihre Zellmorphologie. Eine Veränderung des Rezeptorstatus und der Reaktion auf hormonelle Stimulationen in vitro ist nicht auszuschließen.
5. Gelenkknorpelgewebe exprimiert die Östrogenrezeptoren ER α und ER β . Die Expressionsstärke ist bei Männern und Frauen unterschiedlich.
6. Im Genom einer Knorpelzelle zeigt sich bereits die geschlechtsspezifische Expressionsstärke der Östrogenrezeptoren ER α und ER β .
7. Mit zunehmendem Alter sinkt bei Frauen nicht nur der Östrogenspiegel im Serum. Auch die Östrogenrezeptoren am Knorpelgewebe werden herunter reguliert.
8. Bei Männern fallen keine altersabhängigen Veränderungen hinsichtlich der Östrogenrezeptoren am Knorpelgewebe auf. Östrogene könnten hier eher eine untergeordnete Rolle spielen und Testosteron eher die übergeordnete Rolle.
9. Knorpelgewebe exprimiert den Insulinrezeptor IR. Seine Expressionsstärke kann durch Stimulationen mit 17 β -Östradiol beeinflusst werden.

10. Eine Regulierung des Insulinrezeptors IR durch 17β -Östradiol ist auch auf mRNA-Ebene zu beobachten.
11. Stimulationen mit 17β -Östradiol oder Insulin beeinflussen die Kollagenproduktion von Knorpelzellen.
12. Eine aufeinander folgende Stimulation mit 17β -Östradiol und Insulin führt zum deutlichen Anstieg der Kollagenproduktion.
13. Arthrose könnte zu den Komponenten des metabolischen Syndroms gezählt werden.

Lebenslauf

Name	Katharina Reuse
Geburtsdatum	8. Juli 1983
Geburtsort	Kassel
Wohnsitz & Anschrift	Max-Nenke-Str. 2 06120 Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

8/1989 – 7/1993	Grundschule Helfensteinschule Ahnatal - Weimar
9/1993 – 6/2002	Engelsburg - Gymnasium Kassel
6/2002	Abitur und Latinum

Hochschulstudium

10/2002 – 3/2009	Studium der Humanmedizin an der Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg
9/2004	Physikum (nach alter ÄAppO)
11/2005	Beginn der vorliegenden Dissertation
10/2008	2. Staatsexamen (nach neuer ÄAppO)
11/2008	Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

seit 4/2009	Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin 2 am Martha - Maria - Krankenhaus Halle - Dölau
-------------	---

Wissenschaftlicher Werdegang

01. April 2007 102. Internationales Treffen der Anatomischen Gesellschaft, Justus - Liebig - Universität Gießen
Poster - Veröffentlichung: Estrogen and insulin receptors in human primary articular chondrocytes analysed by Western blot.
www.anatomische-gesellschaft.de, www.anatges2007.de
31. Oktober 2009 11. Herbsttagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Pneumologie, Dresden
Poster - Veröffentlichung: Differentialdiagnostische Probleme bei Kehlkopftuberkulose – Analyse zweier Kasuistiken.
Pneumologie 63:601.
30. Oktober 2010 12. Herbsttagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Pneumologie, Bad Zeulenroda
Poster - Veröffentlichung: Nichtsteroidale Therapiealternativen mit Infliximab, Adalimumab und Mycophenolat Mofetil bei Sarkoidose.
Pneumologie 64:718.
20. Februar 2011 Claassen H, Schicht M, Brandt J, Reuse K, Schädlich R, Goldring MB, Guddat SS, Thate A, Paulsen F. C-28/12 and T/C-28a2 chondrocytes as well as human primary articular chondrocytes express sex hormone and insulin receptors - Useful cells in study of cartilage metabolism.
Ann Anat 193:23-29.
29. Oktober 2011 13. Herbsttagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Pneumologie, Quedlinburg
Poster - Veröffentlichung: Der T-Spot-Tb in der bronchoalveolären Lavage im Vergleich zum Blut.
Pneumologie 65:778.
- Halle (Saale), 01.07.2012

Selbstständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbstständig ohne unzulässige Hilfsmittel oder Unterstützung Dritter erstellt. Die Beziehungen auf Ergebnisse und Verfahren anderer Arbeiten sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung dieser Arbeit keine Entgelte zuliefernder Industrie oder Konzerne entgegen genommen habe. Ferner hat niemand von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde im In- oder Ausland vorgelegt.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich bisher keine weiteren Promotionsversuche an der Martin-Luther-Universität oder einer anderen Universität im In- und Ausland unternommen habe.

Halle (Saale), 01.07.2012

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit, die erforderlichen Versuche durchführen zu können, möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Horst Claassen besonders bedanken. Es war stets eine offene und rege Diskussion über die Gestaltung der Arbeit möglich.

Ein großer Dank gilt Ricarda Schädlich. Sie war während der gesamten Zeit eine zuverlässige Freundin und Laborkollegin.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Friedrich Paulsen und Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Horst Claassen danke ich für die tatkräftige Unterstützung. Dipl.-Biol. Martin Schicht, Dipl.-Biol. Fabian Garreis und Dr. med. Ulrike Hampel möchte ich für die wissenschaftliche Beratung danken. Annett Thate, Ute Beyer und Susann Möscher haben viel praktische Hilfe bei der Laborarbeit geleistet.

Der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin, Direktor Prof. Dr. med. Karl-Stefan Delank, an der Martin-Luther-Universität danke ich für die Bereitstellung der Knorpelzellen aus den Knie-Operationen. Insbesondere gilt mein Dank PD Dr. med. Jörg Brandt und Angela Rosemeier.

Den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer und Prof. Dr. med. Elmar Peschke danke ich ebenfalls für die Hifestellungen im Labor.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Freunden und Kollegen für die vielen Ratschläge und weiterführenden Gespräche: Angelika Platner, Dr. med. Thomas Frese, PD Dr. med. Wolfgang Schütte und PD Dr. med. Matthias Steinert haben mich sehr in meiner Arbeit bestärkt.

Zuletzt gilt mein Dank ganz besonders meinen Eltern und meiner Familie, die mich mit sehr viel Geduld gefördert haben.