

INSTITUT FÜR TIERWISSENSCHAFTEN
ABTEILUNG PHYSIOLOGIE UND HYGIENE
DER RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN

**Matrixmetalloproteinase-2, Matrixmetalloproteinase-9 und Haptoglobin in histologisch
verändertem und unverändertem Gelenkknorpelgewebe von Mastschweinen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am
12.02.2009

von Dipl. Ing. agr. Gregor Schulze Willbrenning
aus Warendorf

Referentin: Frau Prof. Dr. Dr. H. Sauerwein
Korreferent: Herr Prof. Dr. K. Schellander
Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.unibonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2009

Matrixmetalloproteinase-2, Matrixmetalloproteinase-9 und Haptoglobin in histologisch verändertem und unverändertem Gelenkknorpelgewebe von Mastschweinen

Osteochondrose und Osteoarthritis sind bei Schweinen häufig auftretende degenerative Erkrankungen des Knorpelgewebes, bei deren Entstehung Matrix-Metalloproteinasen (MMP) eine entscheidende Rolle spielen. Verschiedene Studien zeigen, dass das Akute-Phase-Protein Haptoglobin (HP) inhibitorische Effekte auf die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 besitzt. Das Ziel der vorliegenden Studie bestand deshalb darin einen potentiellen Einfluss der Gelatinasen auf die Entstehung von Knorpeldegenerationen, sowie mögliche Zusammenhänge zwischen HP und der Aktivität der Gelatinasen im porcinen Knorpelgewebe zu untersuchen. Dazu wurden Gelenkoberflächen des proximalen und distalen Humerus und Femurs von Mastschweinen histopathologisch klassifiziert und Knorpelhomogenate und Synoviaprobe dieser Gelenke gewonnen. Die Analyse der Gelatinaseaktivitäten der Gewebhomogenate erfolgte mittels Zymographie und eines Aktivitätstestes. Zusätzlich wurden die HP-Konzentrationen der Knorpelhomogenate, der Synovia und des Serums unter Verwendung eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) bestimmt. Die Zymographie zeigte eine hohe enzymatische Aktivität der latenten Form der MMP-2 in allen Proben. Die aktive Form der MMP-2, sowie die latente und die aktive Form der MMP-9 konnten mit einer geringen zymographischen Aktivität in einigen Proben ermittelt werden. Zwischen Knorpelhomogenaten von veränderten und unveränderten Knorpelgewebeproben konnten keine Unterschiede hinsichtlich der zymographischen Aktivität ermittelt werden. Der Aktivitätstest war negativ. Die HP-Konzentrationen der Knorpelhomogenate und der Synovia unterschieden sich nicht zwischen Proben von veränderten und unveränderten Lokalisationen. Zur Betrachtung des Einflusses von HP auf die Aktivität der MMPs wurden die einzelnen Proben hinsichtlich ihres HP-Gehaltes in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die Nachweisgrenze des HP-ELISAs als Grenzwert fungierte. Knorpelhomogenate mit HP-Konzentrationen über der Nachweisgrenze zeigten eine erhöhte enzymatische Wirkung der aktiven Form der MMP-2.

Im Gegensatz zum Aktivitätstest werden Inhibitoren während der Zymographie von den MMPs abgespalten. Da anders als in der Zymographie im Aktivitätstest keine Gelatinaseaktivität nachgewiesen werden konnte, scheint es möglich, dass die Gelatinasen sowohl in unveränderten als auch pathologisch veränderten Knorpelgeweben inhibiert sind und dementsprechend keine oder nur sehr geringe Aktivitäten der Gelatinasen vorhanden sind. Die erhöhte Aktivität der aktiven Form der MMP-2 in Proben mit erhöhten HP-Konzentrationen ist möglicherweise auf eine Rückkopplung zurückzuführen: HP inhibiert die MMP-2 Aktivität, wodurch in Anwesenheit von HP eine höhere Konzentration der MMP-2 benötigt wird, um das gleiche Ausmaß des Gewebeabbaus zu erhalten. Da HP während der Zymographie von den MMPs abgespalten wird, zeigt sich eine erhöhte zymographische Aktivität.

Matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and haptoglobin in healthy and histologically altered articular cartilage of pigs

Osteochondrosis and osteoarthritis are conditions frequently observed in pigs. Matrix metalloproteinases (MMP) play a key role in the development of such degenerative joint diseases. The acute phase protein haptoglobin (HP) reportedly inhibits the two gelatinases MMP-2 and MMP-9. The objectives of this study were to investigate the activity of these MMPs in healthy and in degenerative cartilage and to characterize the relation with HP in articular cartilages of pigs.

Joint surfaces of the proximal and distal humerus and femur of fattening pigs were histopathologically classified. In addition, cartilage homogenates and synovia were obtained from these localisations. The tissue homogenates were analysed for gelatinase activity by zymography and by activity assay. The concentration of HP in cartilage homogenates, in synovia, and in serum were analyzed by ELISA.

High enzymatic activity of the MMP-2 latent form was observed in zymography for all samples. Zymographic activity of MMP-2 active form and MMP-9 (active and latent form) were detected at low levels in some samples. Comparing the zymographic activities of gelatinases in unaltered versus altered cartilages yielded no differences. In contrast to zymography, cartilage homogenates were negative for MMP-2 and MMP-9 in the activity assays. This is explained by the methodological approach since inhibitors are separated from the MMPs during zymography but not in the activity assay. The concentrations of HP in cartilage homogenates and in synovia from samples without alteration and from samples with massive alterations were not different. When classified according to their HP concentration, cartilage homogenates with increased HP concentrations had higher ($P < 0.05$) zymographic activities of the MMP-2 active form.

Our results indicate that both in healthy as well as in altered cartilage, MMP-2 and MMP-9 activities were absent or only low. Therefore these gelatinases are possibly not involved in the degradation of the cartilage. The increased MMP-2 activity in samples with greater HP concentrations is possibly due to a feedback loop: HP inhibits MMP-2 activity, and thus more MMP-2 is needed to get the same amount of tissue breakdown in the presence of HP. HP is separated from the MMPs during zymography, and thereby the detectable zymographic activity of MMP-2 is increased.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur.....	2
2.1	Synovialis und Synovia	2
2.2	Knorpel	2
2.2.1	Chondrozyten	3
2.2.2	Bestandteile der extrazellulären Matrix	4
2.2.3	Struktur des Gelenkknorpels	7
2.2.4	Enchondrale Ossifikation	9
2.3	Knorpeldegeneration bei Schweinen.....	9
2.3.1	Osteochondrose	9
2.3.2	Osteoarthrose.....	13
2.3.3	Häufigkeiten von Knorpeldegenerationen bei Schweinen.....	13
2.4	Matrixmetalloproteinasen	14
2.4.1	Struktur der Matrixmetalloproteinasen	14
2.4.2	Einteilung der Matrixmetalloproteinasen.....	15
2.4.3	Regulation der Matrixmetalloproteinasen.....	17
2.4.4	Nachweismethoden von Matrixmetalloproteinasen.....	19
2.5	Haptoglobin	20
2.5.1	Eigenschaften von Haptoglobin	20
2.5.2	Physiologische Funktionen von Haptoglobin	21
2.5.3	Haptoglobin und Gelenkserkrankungen.....	22
3	Manuscript: Gelatinase activities and haptoglobin concentrations in healthy and in degenerative articular cartilage of pigs.....	23
4	Erweiterte Diskussion und Ausblick.....	39
4.1	Einordnung der eigenen Arbeit	39
4.2	Diskussion der Nachweismethoden von Gelatinasen.....	39
4.3	Matrixmetalloproteinasen, Akute-Phase-Proteine und Knorpeldegenerationen	40

4.4	mRNA von Gelatinasen und Haptoglobin im Knorpelgewebe	44
4.5	Genetische Variationen der Gelatinasen.....	45
4.6	Ausblick.....	45
5	Zusammenfassung.....	47
6	Anhang	50
7	Literatur.....	56

Verwendete Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfatlösung
BCA	Biotin Acid Assay
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
CDMPs	Chondrocytes-Derived-Morphogenetic-Proteins
Da	Dalton
DM	Trockenmasse
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
HP	Haptoglobin
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IL	Interleukin
IL-1-ra	IL-1- Rezeptorantagonist
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IOD	integrierte optische Dichte
LIF	Leukämie-Inhibitor-Faktor
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-MMP	Membranständige Matrixmetalloproteinase
P	Signifikanz (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PBS	Phospat-Buffered Saline
r	Korrelationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	Tumor-Growth-Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TP	Gesamtprotein

1 Einleitung

Seit Ende der fünfziger Jahre wird dem sogenannten Beinschwächesyndrom des Schweines, charakterisiert durch Beeinträchtigung des Ganges und Schwierigkeiten des Tieres sich zu erheben, vermehrte Aufmerksamkeit gewidmet (REILAND, 1978). Die häufigsten Ursachen des Beinschwächesyndroms bei wachsenden Schweinen sind durch Osteochondrose oder Osteoarthrose hervorgerufenen Knorpeldegenerationen (NAKANO et al., 1987, JORGENSEN et al., 1995). Verschiedenste Studien zeigen sehr hohe Inzidenzen derartiger Veränderungen in den Gelenken (zur Übersicht siehe HILL, 1990). Die dadurch bedingten vorzeitigen Abgänge und verminderten Leistungen der Mast- und Zuchttiere bewirken erhebliche finanzielle Einbußen für schweinehaltende Betriebe (HILL, 1990). Neben diesen ökonomischen Gesichtspunkten ist es aber auch aus ethischen Gründen angezeigt, diese häufig auftretenden, mit Schmerzen für das Tier verbundenen Erkrankung, näher zu untersuchen und ihr entgegen zu wirken.

Die Ätiologie degenerativer Knorpelerkrankungen ist nur unzureichend bekannt. Nach MURPHY et al. (1990) spielen die MMP eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung solcher pathologischen Veränderungen. So konnte bei Gelenkserkrankungen von Pferden eine verstärkte Aktivierung der MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden (CLEGG & CARTER, 1999). Bei porcinen Gelenkknorpeldegenerationen fehlen vergleichbare Untersuchungen bislang. Neben der Aktivierung dieser Enzyme spielen jedoch auch mögliche Inhibitoren der MMP eine Rolle bei der Entwicklung von Gelenkserkrankungen. Bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass das Akute-Phase Protein HP inhibitorische Wirkung auf die MMP-2 und MMP-9 besitzt (DE KLEIJN et al., 2002). Die Untersuchung eines potenziellen Zusammenhanges zwischen HP-Konzentrationen im Knorpelgewebe, bzw. der Synovia und der Entstehung von Gelenkknorpeldegenerationen, steht bislang jedoch noch aus.

Ziel der eigenen Arbeit war es deshalb die Bedeutung der MMP-2 und MMP-9 bei der Degeneration des Gelenkknorpelgewebes des Schweines näher zu untersuchen. Dabei galt es ebenfalls zu klären, welchen Einfluss das Akute-Phase-Protein HP auf die Knorpelveränderung sowie auf die Aktivität der MMP besitzt.

2 Literatur

2.1 Synovialis und Synovia

Typischerweise setzen sich Gelenke aus von hyalinem Gelenkknorpel überzogenen Gelenkenden zweier oder mehrerer Knochen, aus der Gelenkkapsel und den Gelenkbändern zusammen. Die Gelenkkapsel geht an den Rändern der Gelenkflächen aus dem Periost (Knochenhaut) hervor und umschließt die Gelenkhöhle. Sie besteht aus einer äußeren fibrösen Schicht (Membrana fibrosa) und einer Innenschicht (Membrana synovialis). Diese Innenschicht, auch Synovialis genannt, ist stark mit Blut- und Lymphgefäßen, sowie Nervengewebe durchzogen. Neben der Sezernierung der Synovia ist die Synovialis auch in der Lage bestimmte Stoffe zu resorbieren. Es werden zwei Arten von Synovialzellen unterschieden. Die A- Synoviozyten ähneln in ihrem Aufbau und Funktion den Makrophagen. Die Typ-B Synoviozyten dagegen enthalten vermehrte Anteile an rauem endoplasmatischem Retikulum und bilden Hyaluronsäure und Glykoproteine (FASSBENDER, 1975).

Die Synovia ist eine muzinhaltige, dadurch fadenziehende, klare, bernsteinfarbige Flüssigkeit, die die glatte Oberfläche des Gelenkknorpels benetzt und somit die Reibung zwischen den Gleitflächen reduziert (NICKEL et al., 1992). Die Synovia stellt ein Dialysat des Blutes dar (PERMAN & CORNELIUS, 1980). Die Konzentration einzelner Plasmaproteine in der Synovia wird von der Molekülgröße, der Membranpermeabilität und durch die Möglichkeit einer lokalen Synthese bestimmt (JONES et al., 1984). Neben Elektrolyten enthält die Synovia kleinere Moleküle wie Glukose, Laktat, Sauerstoff und Hyaluronsäure. Die aus Glykoaminoglykanen bestehende Hyaluronsäure beeinflusst je nach Länge und Struktur die Viskosität der Gelenksflüssigkeit (FASSBENDER, 1975).

2.2 Knorpel

Hyaliner Knorpel besteht, wie jedes Bindegewebe, aus Zellen (Chondrozyten) und einer extrazellulären Matrix, die die mechanischen Eigenschaften des Gewebes bestimmt. Der Anteil von Chondrozyten am gesamten Knorpelvolumen ist sehr gering und schwankt je nach

Gelenk, Lokalisation und Spezies. Für humanen Gelenkknorpel werden Werte von 1- 3% Zellvolumen am gesamt Knorpelvolumen angegeben (BUCKWALTER & MANKIN, 1998), für porcinen Gelenkknorpel liegen keine Werte vor. Die extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpels besteht aus Wasser und einem Netzwerk strukturgebender Makromoleküle (Abb. 1), die dem Gewebe seine besondere Form und Eigenschaft verleihen.

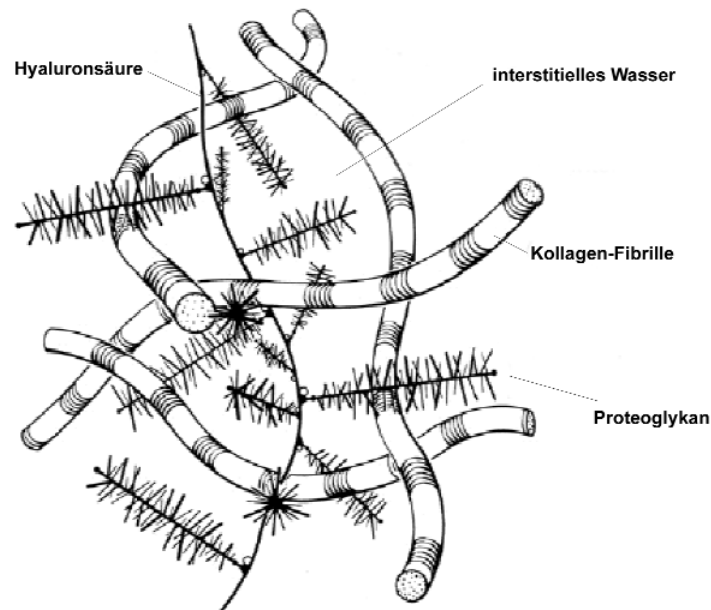


Abb. 1: Extrazelluläre Matrix des Knorpels (MARTINEK, 2003)

2.2.1 Chondrozyten

Im hyalinen Gelenkknorpel finden sich als einzige Zellart hochdifferenzierte Chondrozyten. Weitere pluripotente, zur Geweberegeneration befähigte Zellen, die es u. a. in der Muskulatur gibt, sind nicht vorhanden. Je nach Zone, in der die Chondrozyten lokalisiert sind, zeigen sich Unterschiede hinsichtlich Größe und metabolischer Aktivität (SICZKOWSKI & WATT, 1990). Einige Chondrozyten weisen Zilien auf, die von der Zelle in die extrazelluläre Matrix reichen. Diese kurzen Zellausläufer signalisieren den Chondrozyten mechanische Veränderungen in der Knorpelmatrix (BUCKWALTER & MANKIN, 1997). Da Chondrozyten jeweils von einer eigenen Matrix umgeben sind, werden keine interzellulären Kontakte ausgebildet. Einzelne Chondrozyten besitzen eine hohe metabolische Aktivität,

aufgrund der geringen Zelldichte zeigt das gesamte Knorpelgewebe jedoch nur geringe Stoffwechselraten (ARCHER & FRANCIS-WEST, 2003).

Knorpelzellen besitzen keine Verbindung zum Blutkreislauf, so dass eine Regelung des Stoffwechsels durch Substanzen wie z. B. Wachstumsfaktoren und Interleukine (IL) erfolgt, die durch die extrazelluläre Matrix diffundieren. Bei adulten Individuen erfolgt die Ernährung der Chondrozyten per Diffusion durch aus der Synovia stammende Nährstoffe. Dabei wird die Diffusion durch die Knorpelmatrix sowohl durch die Größe der Stoffe als auch durch deren Ladung und molekulare Konfiguration begrenzt (FISCHER et al., 1995). Bedingt durch die geringen Sauerstoffgehalte innerhalb des Knorpelgewebes erfolgt ein hauptsächlich anaerober Stoffwechsel. Die Aktivitäten und Funktionen der Chondrozyten des Gelenkknorpels unterscheiden sich zwischen juvenilen und adulten Tieren. Bei wachsenden Individuen weist das Knorpelgewebe eine große Anzahl an Chondrozyten mit einer hohen metabolischen Aktivität auf. Die Knorpelzellen bilden neues Gewebe, wodurch eine Vergrößerung und Umwandlung der Knorpeloberfläche erfolgt. Nach der Skelettreife erfolgt keine weitere Volumenvermehrung des Knorpelgewebes und es werden lediglich degradierte Makromoleküle ersetzt (BUCKWALTER, 1995; BUCKWALTER, 1996). Die wenigen verbleibenden Knorpelzellen erscheinen rundlich und sind komplett von der Matrix eingeschlossen (CAPLAN & BOYAN, 1994; BUCKWALTER & MANKIN, 1998). Zeitlebens sind jedoch teilungsfähige Zellen vorhanden (Chondroblasten), die in der Lage sind durch eine Steigerung der Proliferation und Matrixsynthese kleinere Gewebedefekte zu regenerieren (DRENCKHAHN, 1994). So zeigt sich nach beginnender arthrotischer Knorpeldegeneration, dass Chondrozyten durch Proliferation Zellcluster bilden, um so der Matrixdegeneration entgegenzuwirken. Ein Fortschreiten der Degeneration verhindert diese Zellvermehrung jedoch nicht (MARTINEK, 2003). HEMBRY et al. (2001) konnten solche Zellcluster ebenfalls nach der Erzeugung von Defekten in porcinem Knorpel nachweisen.

2.2.2 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Kollagene

Kollagene stellen mit 10 – 20% der Feuchtmasse (KUETTNER, 1992), bzw. mit etwa zwei Drittel der Trockenmasse (EYRE, 2002) des Knorpels, den Hauptbestandteil der Knorpelproteine dar. Die unlöslichen Fibrillen der Kollagene bilden ein dreidimensionales

Netzwerk aus, das als Rahmenkonstruktion des Gelenkknorpels dient und so diesem Gewebe seine Festigkeit verleiht (EYRE, 1991). Dieses Netzwerk schützt die Chondrozyten, bindet lösliche Bestandteile wie Proteoglykane und Glykoproteine und verankert den Knorpel am subchondralen Knochen (KUETTNER, 1992; DIJKGRAAF et al., 1995). Innerhalb dieses Netzwerkes lassen sich unterschiedliche Kollagentypen nachweisen. Bei fünf bis sechs Monate alten Schweinen konnten WARDAL & DUANCE (1993) die Kollagentypen I, II, VI, IX und XI im Gelenkknorpel identifizieren. Dabei zeigte der Kollagentyp II mit etwa 75% den größten Volumenanteil.

Kollagenmoleküle bestehen aus drei jeweils etwa 1050 Aminosäuren langen Polypeptidketten (α -Ketten). Die einzelnen Polypeptidketten sind jeweils zu einer linksgedrehten Helix geformt. Die drei einzelnen Ketten bilden dann eine gemeinsame rechtsgedrehte Helix, so dass eine seilähnliche Tertiärstruktur, die Tripelhelix, entsteht. Die Tripelhelix der Kollagene kann aus identischen Polypeptidketten (Homotrimer), z. B. bei Kollagen II und X, oder wie im Fall von Kollagen VI, IX und XI aus verschiedenen Ketten (Heterotrimer) gebildet werden. Beim Kollagentyp II bilden die Polypeptidketten eine Helix von 300 nm Länge, die anderen Kollagentypen sind deutlich kürzer. Die Kollagene vom Typ I, II, III und XI setzen sich zu speziell ausgerichteten supramolekularen Aggregaten (Fibrillen) mit charakteristischen Strukturen zusammen (GELSE et al., 2003). Der Kollagentyp II besitzt hohe Anteile an Kohlenhydratgruppen, wodurch eine höhere Wasserbindung erzielt wird als bei einigen anderen Kollagentypen. Typ IX Kollagen lässt sich als Anhang von Fibrillen finden (EYRE et al., 1987), wobei WOTTON et al. (1988) vermuten, dass dieser Kollagentyp Einfluss auf den Durchmesser der Fibrillen besitzt. Nach MARTINEK (2003) sind die Kollagentypen IX und XI an Quervernetzungen beteiligt und tragen somit zur Stabilisierung des Kollagengerüsts bei. Der Kollagentyp X wird ausschließlich in Zonen des mineralisierten Knorpels vorgefunden (BUCKWALTER & MANKIN, 1998).

Proteoglykane

Proteoglykane bestehen zu etwa 80 - 94% aus Glykosaminoglykanen und zu 6 - 20% aus Proteinen (LOHMANDER, 1988). Bei Proteoglykanen handelt es sich um eine Subgruppe von Glykokonjugaten mit großen strukturellen und funktionellen Unterschieden (HARDINGHAM & BAYLISS, 1990), die als gemeinsames Merkmal einen zentralen Proteinkern aufweisen, an dem mindestens eine Glykoaminoglykankette kovalent gebunden

ist (LÖFFLER, 1990). Glykoaminoglykane sind unverzweigte Polysaccharide, die aus einem Dissaccharid entstanden sind. Wenigstens eine Komponente dieses Zuckers enthält eine negativ geladene Sulfat- oder Carboxylgruppe. Aus diesem Grund neigen Glykoaminoglykane dazu sich gegenseitig und Anionen abzustößeln und Kationen anzuziehen, wodurch eine hohe Wasserbindungsfähigkeit erzielt wird. Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat sind einige der Glykoaminoglykane, die normalerweise im Gelenkknorpel zu finden sind. Die einzelnen Proteoglykan-Monomere binden über Verbindungsproteine an Hyaluronsäure und bilden unterschiedlich große Aggregate (Aggrecane), wobei die Länge solcher Aggregate zwischen 100 nm und 10.000 nm liegen kann. Die Aggrecanmoleküle stellen mit etwa 90% den größten Anteil an der Knorpelmatrix und füllen fast den gesamten interfibrillären Raum aus. Proteoglykane werden intrazellulär in Chondrozyten und Synoviozyten gebildet, die Aggregation findet dagegen erst im extrazellulären Raum statt. Mit etwa 400 bis 800 Tagen Halbwertszeit ist die Umsatzrate der Proteoglykane deutlich höher als bei den Kollagenen. (ROUGHLEY & LEE, 1994; BUCKWALTER & MANKIN, 1998).

Proteoglykane bestimmen in erster Linie die viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels, während die Kollagenfasern hauptsächlich für die elastischen Eigenschaften verantwortlich sind (BADER & KEMPSON, 1994). Durch Druck auf den Knorpel wird die interstitielle Flüssigkeit, ähnlich wie bei einem Schwamm, mit erheblichem Strömungswiderstand durch die Poren der Proteoglykane gepresst. Erst nachdem die Flüssigkeit aus den Poren gedrückt wurde, entsteht Druck auf die Proteoglykane (MOW et al., 1984).

Nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine

Der Anteil an Glykoproteinen und nicht-kollagenen Proteinen an der Trockensubstanz des Knorpelgewebes liegt bei etwa 15 - 20%. Diese Proteine binden ebenso wie Proteoglykane Wasser, spielen darüber hinaus aber auch bei der Organisation und Stabilisierung des makromolekularen Netzwerkes, so wie bei der Anbindung der Chondrozyten an die Matrix, eine Rolle (BUCKWALTER & MANKIN, 1998).

Gewebeflüssigkeit

Der Gewichtsanteil der Flüssigkeit im Gelenkknorpelgewebe liegt bei 60 - 80%. Die Oberfläche des Gelenkknorpels zeigt mit etwa 80% den höchsten Wassergehalt, die tiefe Zone

mit etwa 60% den niedrigsten (MOW et al., 1984; MARTINEK, 2003). Neben Wasser enthält die Flüssigkeit Gase, Metabolite und eine große Anzahl an Kationen, die ein Gleichgewicht zu den negativ geladenen Glykoaminoglykanen in der extrazellulären Matrix herstellen. Der Austausch dieser Flüssigkeit mit der Synovia versorgt den avaskulären Knorpel mit Nährstoffen und Sauerstoff (BUCKWALTER & MANKIN, 1998).

2.2.3 Struktur des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel kann anhand der Morphologie und der biochemischen Eigenschaften der Matrix in vier Zonen eingeteilt werden (BUCKWALTER & MANKIN, 1998):

Oberflächliche Zone

Die oberflächliche Zone (10 - 20% der Knorpeldicke) des Knorpels stellt die dünnste Zone dar. Eine azelluläre Schicht aus Kollagenfasern deckt das Gelenk ab, an die sich eine Schicht von tangential zur Oberfläche angeordneten spindelförmigen Chondrozyten und Kollagenfasern anschließt. Die Matrix dieser Zone besitzt hohe Anteile an Kollagen und niedrige Anteile an Proteoglykanen (BUCKWALTER & MANKIN, 1998; MARTINEK, 2003).

Mittlere Zone

Die extrazelluläre Matrix der mittleren Zonen (40 - 60% der Knorpeldicke) besitzt längere und dickere Kollagenfibrillen, mehr Proteoglykane und geringe Gehalte an Kollagen und Wasser als die oberflächliche Zone. Die Fibrillen sind schräg oder wahllos zur Gelenkoberfläche ausgerichtet. Die Chondrozyten weisen in dieser Zone eine ovale bis längliche Form auf und sind in Säulen angeordnet, die senkrecht zur Oberfläche verlaufen (BUCKWALTER & MANKIN, 1998; MARTINEK, 2003).

Tiefe Zone

In der tiefen Zone des Gelenkknorpels (30% der Knorpeldicke) weisen die Chondrozyten eine rundliche Form auf und sind ebenfalls in Säulen angeordnet. Die Zellen zeigen eine hohe synthetische Aktivität, die nach WONG et al. (1996) etwa zehnfach höher liegt als bei Chondrozyten, die in der oberflächlichen Zone lokalisiert sind. Die in dieser Zone senkrecht verlaufenden Kollagenfasern tauchen in die sogenannte „Tidemark“ ein, eine im

Lichtmikroskop erkennbare basophile Linie, die die Grenze zwischen nicht-kalzifiziertem und kalzifiziertem Gelenkknorpel darstellt (BUCKWALTER & MANKIN, 1998; MARTINEK, 2003).

Zone des kalzifizierten Knorpels

Die dünne Zone des kalzifizierten Knorpels trennt den hyalinen Knorpel vom subchondralen Knochen. Die Zone des kalzifizierten Knorpels ist zapfenförmig ausgebildet, um eine verbesserte Integrität des Gewebes zu erreichen. Darüber hinaus bewirken die senkrecht durch die „Tidemark“ in den subchondralen Knochen verlaufenden Kollagenfasern eine zusätzlich Stabilität. Die Chondrozyten weisen eine rundliche Form auf, sind kleiner und teilweise vollständig vom kalzifizierten Knorpelgewebe umgeben. Die Knorpelzellen dieser Region weisen eine nur sehr geringe metabolische Aktivität auf (MARTINEK, 2003).

Chondrozyten-Matrix-Interaktion

Die Interaktion der Chondrozyten mit der sie umgebenden Matrix ermöglicht eine lebenslange Aufrechterhaltung der Komplexität und Funktionsfähigkeit des Knorpelgewebes. Die Matrix schützt die Chondrozyten gegen Schädigungen, so dass der Phänotyp dieser Zellen bei normaler Beanspruchung des Gelenkes unverändert bleibt. Nährstoffe, Substrate zur Synthese der Matrixmoleküle, neu synthetisierte Matrixmoleküle, metabolische Abfallprodukte, sowie Moleküle mit Funktionen bei der Regulation der Zellaktivität, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, werden durch die Matrix transportiert oder dort temporär gelagert (BUCKWALTER & MANKIN, 1998). Eine wesentliche Funktion der Matrix besteht in der Übertragung von äußeren Einflüssen auf die Chondrozyten. Durch mechanische Belastungen des Knorpels entstehen Signale, auf die die Knorpelzellen mit einer Veränderung der metabolischen Aktivität reagieren (MARTINEK, 2003). So beschreiben GRAY et al. (1988), dass eine chronische Entlastung des Knorpels zu einer Reduktion der Proteoglykansynthese und damit zu weitreichenden Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Knorpels führt.

2.2.4 Enchondrale Ossifikation

Während des Skelettwachstums lassen sich an jedem Ende der Röhrenknochen jeweils zwei Regionen mit speziellem Wachstumsknorpel unterscheiden. Die Wachstumszone der Epiphysen (zwischen Diaphyse und Epiphyse) bildet das primäre Verknöcherungszentrum und ist für das Längenwachstum der Knochen verantwortlich. Der artikuläre/epiphysäre Wachstums-Knorpel-Komplex, der das sekundäre Verknöcherungszentrum darstellt, ist unterhalb des Gelenkknorpels lokalisiert und ist für die Bildung und Formung der Enden der Röhrenknochen verantwortlich. In beiden Fällen wird der Wachstumsknorpel durch Knochen ersetzt, indem ein als enchondrale Ossifikation bezeichneter Prozess von Zellproliferation, extrazellulärer Matrixsynthese, zellulärer Hypertrophie, Matrixmineralisation und vaskulärer Invasion einsetzt (LEFEBVRE & SMITS, 2005; YTREHUS et al., 2007). Der Vorteil dieses Prozesses ist, dass das Wachstum der Knochen durch eine kontinuierliche Knorpelbildung mit anschließender Verknöcherung es den Individuen ermöglicht, bereits während des Wachstums Belastungen tragen zu können (YTREHUS et al., 2007).

Die Chondrozyten im Wachstumsknorpel können dabei in vier Zonen eingeteilt werden. Die Ruhezone enthält nur selten sich teilende Chondrozyten und fungiert vornehmlich als Vorstufe der Proliferationszone, in der eine intensive Teilung der Chondrozyten zu beobachten ist. Ausdifferenzierte hypertrophe Chondrozyten sondern eine hochspezialisierte Matrix ab, die das spätere Extremitätenskelett als Knorpelmodell abbildet. In der darauf folgenden Verknöcherungszone wird der Knorpel durch Chondro- und Osteoklasten abgebaut und gleichzeitig durch einwandernde Osteoblasten Knochengewebe aufgebaut. Dieser Prozess ist durch das Einwandern von Blutgefäßen in das Gewebe begleitet. Da das Wachstum des Knorpels langsamer erfolgt als das Voranschreiten des Verknöcherungsprozesses, nimmt die Dicke des Wachstumsknorpels mit der Zeit ab (YTREHUS et al., 2007).

2.3 Knorpeldegeneration bei Schweinen

2.3.1 Osteochondrose

Nach NAKANO et al. (1987) stellt Osteochondrose die Hauptursache bei der Entstehung des Beinschwächesyndroms dar, wobei die genaue Ätiologie und Pathogenese jedoch unklar ist.

Grundsätzlich scheint die Ursache für Osteochondrose in einem fokalen Ausbleiben der enchondralen Ossifikation zu liegen. Dadurch unterbleibt in einem begrenzten Bereich des Wachstumsknorpels die Kalzifizierung der Matrix, so dass Knorpelgewebe im subchondralen Knochen verbleibt (EKMAN & CARLSON, 1998). Diese Störung zeigt sich histologisch in einer lokalen Zone von verdicktem Knorpel, die durch einen ungleichmäßigen Knorpel-Knochen-Übergang gekennzeichnet ist. Mit Fortschreiten der Erkrankung erscheint das verbleibende Knorpelgewebe weich und rötlich. Das darunterliegende Knochenmark ist ödematös und hyperämisch (YTREHUS et al., 2007).

Hinsichtlich der Nomenklatur von Osteochondrose erfolgt keine eindeutige Unterscheidung zwischen osteochondrotischen Läsionen des artikulären/epiphysären Wachstums-Knorpels und der Epiphysenfugen (YTREHUS et al., 2007). Allerdings können morphologische Unterschiede zwischen Läsionen der beiden Lokalisationen ermittelt werden. Die primären Störungen der enchondralen Ossifikation der Epiphysenfugen sind vor allem durch eine veränderte Entwicklung der hypertrophen Chondrozyten gekennzeichnet (HILL et al., 1984). Dagegen zeigen sich im artikulären/epiphysären Wachstums-Knorpel, bereits bevor eine gestörte Ossifikation sichtbar wird, fokale nekrotische Läsionen, wobei aber weder der darüberliegende Gelenkknorpel noch der darunterliegende subchondrale Knochen von diesen Läsionen betroffen sind (EKMANN et al., 1990; CARLSON et al., 1991; CARLSON et al., 1995). AL-HIZAB et al. (2002) vermuten, dass diese fokalen Läsionen auf ein Ungleichgewicht der katabolen und anabolen Prozesse der Chondrozyten zurückzuführen ist. Nach YTREHUS et al. (2004) verursacht eine Unterbrechung der Gefäße die Versorgung des Wachstumsknorpels mit Blut, wodurch nekrotische Bereiche im Knorpel entstehen. Mit Fortschreiten der Erkrankung zeigen sich häufig Fissuren der Gelenkoberfläche, die schließlich zu einer teilweisen Herauslösung von Knorpelstücken (*Osteochondrosis dissecans*) führen können. Auch die Entstehung sekundärer Ostoarthrosen stellt eine häufige Folgeerkrankung der Osteochondrose dar (NAKANO et al., 1987).

Läsionen können sich in verschiedensten Lokalisationen entwickeln und treten in den Gelenken oft bilateral symmetrisch auf. Korrelationen von osteochondrotischen Veränderungen zwischen verschiedenen Lokalisationen (abgesehen von symmetrischen Lokalisationen) sind gering oder nicht vorhanden (JORGENSEN et al. 1995; JORGENSEN & ANDERSEN, 2000).

Erste osteochondrotische Veränderungen treten bei Schweinen in der Regel im Alter von etwa zwei Monaten auf (YTREHUS et al., 2007), allerdings zeigen einige Studien bereits Läsionen kurz nach der Geburt. So konnten HILL et al. (1985) bei Ferkeln bereits am ersten Lebenstag bei über 50% der untersuchten Tiere osteochondrotische Läsionen nachweisen und vermuten dementsprechend, dass es sich bei diesen Defekten um angeborene Veränderungen handelt. Klinische Anzeichen von Lahmheiten treten jedoch häufig erst bei jungen Schweinen im Alter ab vier Monaten auf (DEWEY, 1999).

Durch die Degeneration im Knorpel kommt es zu einer Verschiebung der Knorpelzusammensetzung. Dabei zeigt sich bei Osteochondrose, wie in Tab. 1 dargestellt, eine Veränderung der Anteile der einzelnen Kollagentypen (WARDAL & DUANCE, 1994).

Tab. 1: Prozentuale Anteile ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) verschiedener Kollagentypen im gesunden und durch Osteochondrose veränderten Gelenkknorpel von Schweinen (modifiziert nach WARDAL & DUANCE, 1994)

Kollagentyp	Gelenkknorpel (unverändert)	Gelenkknorpel (Osteochondrose)
I	11,6 ± 3,8	21,6 ± 6,0
II	75,5 ± 5,0	71,7 ± 4,7
IX	3,9 ± 1,8	0,8 ± 0,1
X	0	0,05 ± 0,03
XI	9,0 ± 2,9	5,9 ± 1,5

Osteochondrose gilt als eine Erkrankung mit multifaktorieller Ätiologie (EKMAN & CARLSON, 1998). Als mögliche Faktoren, die bei der Entstehung der Erkrankung eine Rolle spielen, gelten unter anderem schnelles Wachstum, genetische Einflüsse, Traumata, Ernährungsfaktoren und bestimmte Haltungsbedingungen (YTREHUS et al., 2007, NAKANO et al., 1987).

Wachstumsraten

Verschiedene Studien zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher Wachstumsrate und Beeinträchtigungen des Ganges (GRONDALEN, 1974a; LUNDEHEIM, 1987). Schnelles Wachstum und die damit verbundenen Zunahmen an Muskelmasse könnten zu mechanischen Belastungen führen, die die Physis des unreifen Tieres übersteigt

(NAKANO et al., 1987). Allerdings zeigt eine Reduzierung der Futtermittelaufnahme durch restriktive Fütterung (GRONDALEN, 1974a; ARTHUR et al., 1983) oder das Füttern eines energieärmeren Futtermittels (NAKANO et al., 1984; WOODARD et al., 1987) und die damit verbundenen geringeren Tageszunahmen keine Verminderung des Auftretens von Läsionen durch Osteochondrose bei Schlachtschweinen.

Genetische Einflüsse

Unterschiede in der Prävalenz von Osteochondrose verschiedener Schweinerassen lassen einen genetischen Einfluss bei der Entstehung der Krankheiten vermuten (YTREHUS et al., 2007). So weisen langsam wachsende Yucatan-Schweine keine Osteochondrose auf (FARNUM et al. 1984). Eine Studie von KADARMIDEEN et al. (2004) zeigt jedoch bei Schweinen (Schweizer Edelschwein, Schweizer Landrasse, Duroc) nur geringe bis mittlere Heritabilitäten für osteochondrotische Läsionen.

Traumata

NAKANO & AHERNE (1988) berichten, dass Schweine, die als Läufer Sprünge aus verschiedenen Höhen von unter einem Meter ausgesetzt wurden, bei der Schlachtung mehr osteochondrotische Läsionen zeigten als eine Kontrollgruppe. Allerdings vermuten YTREHUS et al. (2007) einen nur begrenzten Einfluss von Traumata auf die Entstehung von Osteochondrose, da in den meisten Fällen von Osteochondrose keine Traumata der Entstehung der Knorpeldegeneration zugeordnet werden können.

Fütterung

Auch der Einsatz von Futtermitteln mit Gehalten an verschiedenen Mineralien und Vitaminen, die über die in der Praxis angewendeten Empfehlungen hinausgehen, bewirken keine Verringerung der Gelenksveränderungen (NAKANO et al., 1987).

Haltungsfaktoren

Des Weiteren konnte bei einer unterschiedlichen Gestaltung der Stallböden (darunter auch Einstreu mit Stroh) keine verbesserte Gesundheit der Gelenke ermittelt werden (PERRIN et al., 1978). Vermehrte Bewegung führte ebenfalls nicht zu einer verminderten Häufigkeit oder Stärke von Gelenkerkrankungen (GRONDALEN, 1974a).

2.3.2 Osteoarthrose

Osteoarthrose ist eine nichtinfektiöse, chronische, durch fortschreitende Degeneration und anschließendem Verlust des Gelenkknorpels charakterisierte Erkrankung, die als primäre Erkrankung oder als Folge einer primären Ursache (sekundäre Osteoarthrose) entsteht. Während der Homöostase ist der Knorpelmetabolismus durch ein konstantes Gleichgewicht zwischen Synthese und Katabolismus gekennzeichnet. Während der Entstehung von Osteoarthrose wird dieses homöostatische Gleichgewicht durch eine gesteigerte Produktion und Aktivierung von Proteasen gestört (KUETTNER et al., 1992). Es wird vermutet, dass der initiale Schritt der Entstehung von Osteoarthrose durch den Abbau von Gelenkknorpelmatrix durch Proteasen (Kathepsin B und D) ausgelöst wird, die durch Chondrozyten-Lysosomen nach biomechanischer Zerstörung der Knorpelmatrix freigesetzt werden. Als Folge daraus werden Matrixmetalloproteinasen aktiviert, die zusätzlich durch Zytokine eine Steigerung ihrer Aktivität erfahren (MARTEL-PELLETIER et al., 1986; DEAN, 1991; HERMAN et al., 1991; SIPE et al., 1994). Wenn die Regenerationskapazität der Chondrozyten mit dem Verlust an Knorpelsubstanz nicht mithalten kann, kommt es dann zu fortschreitenden Knorpelverlusten (KUETTNER et al., 1992).

Obwohl Osteoarthrose als eine nichtentzündliche Erkrankung klassifiziert wird, können in vielen Fällen milde bis moderate Anzeichen einer Entzündung an Synovialmembran und in der Synovia nachgewiesen werden. So zeigen sich unter anderem eine Erhöhung der Leukozytenanzahl und morphologische Veränderungen der Synovialmembran (GOLDENBERG et al., 1982). Die Konzentrationen der Entzündungsmediatoren steigen in der Synovia an, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie bei einer Arthritis (SIPE, 1995).

2.3.3 Häufigkeiten von Knorpeldegenerationen bei Schweinen

Auf Osteochondrose und Osteoarthrose zurückzuführende Veränderungen des Knorpelgewebes sind in der Schweinehaltung von großer Bedeutung (HILL, 1990). GRONDALEN (1974a) zeigte bei Schweinen, die im Alter von 5 bis 6 Monaten geschlachtet wurden, eine nahezu hundertprozentige Inzidenz von Osteochondrose. Andere Studien finden bei Mastschweinen im Alter von 180 Tagen bei 90% der Tiere degenerative Veränderung des Gelenkknorpelgewebes (REILAND et al., 1978). Auch bei Zuchtieren besitzen Knorpeldegenerationen eine erhebliche Bedeutung. So konnte in Skandinavien bei

Zuchttieren, die aufgrund von Lahmheiten gemerzt wurden, bei 100% der Tiere Osteochondrose oder Osteoarthrose nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten bis zu 40% der Eber von Leistungsprüfanstalten durch Osteochondrose oder Osteoarthrose bedingte Knorpeldegenerationen (GRONDALEN, 1974a; GRONDALEN, 1974b).

2.4 Matrixmetalloproteinasen

2.4.1 Struktur der Matrixmetalloproteinasen

MMPs umfassen eine „Familie“ von kalziumabhängigen, zinkhaltigen Endopeptidasen, die strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Sie werden in einer inaktiven (latenten) Form sezerniert, die auch als Zymogen bezeichnet wird. Diese latenten MMPs benötigen einen Aktivierungsschritt, bevor sie in der Lage sind extrazelluläre Matrix zu spalten (BODE & MASKOS, 2000; BODE & MASKOS, 2003). MMPs bestehen normalerweise aus drei Domänen, dem aminoterminalen Propeptid, der katalytischen Domäne und einer Hemopexin-Domäne am Carboxylende. Die Propeptid-Domäne besteht aus etwa 80 Aminosäuren. Ein Cysteinrest innerhalb dieser Domäne bindet an ein aktives Zinkion innerhalb der katalytischen Domäne, wodurch die Inaktivität der Zymogene hervorgerufen wird (WOESNNER, 1991; BODE et al., 1999).

Die katalytische Domäne besteht aus etwa 170 Aminosäuren. Neben dem katalytischen Zinkatom enthält diese Domäne ein zusätzliches Zinkion und zwei bis drei Kalziumionen, die für die Stabilität des Enzyms sorgen sowie für die enzymatische Aktivität notwendig sind (BORKAKOTI, 2000). Die MMP-2 und MMP-9 besitzen innerhalb der katalytischen Domäne eine dreifache Wiederholung einer Fibronectin-Typ II Domäne, die mit Kollagen und Gelatine interagieren (ALLAN et al., 1995, STEFFENSEN et al., 1995). Die C-terminale Hemopexin-Domäne (210 Aminosäuren) spielt eine funktionelle Rolle bei der Substratbindung und Interaktion mit spezifischen Inhibitoren (MASSOVA et al., 1998) und ist darüber hinaus essentiell für die Spaltung von interstitiellem Kollagen (NAGASE & WOESSNER, 1999).

2.4.2 Einteilung der Matrixmetalloproteinasen

Auf Grundlage ihrer Substratspezifität, Sequenzgleichheit und Organisationen der Domänen werden die bislang 24 bekannten MMPs in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt (VISSE & NAGASE, 2003). Abb. 2 zeigt schematisch die Unterschiede in der Proteinstruktur zwischen den verschiedenen Gruppen der MMPs.

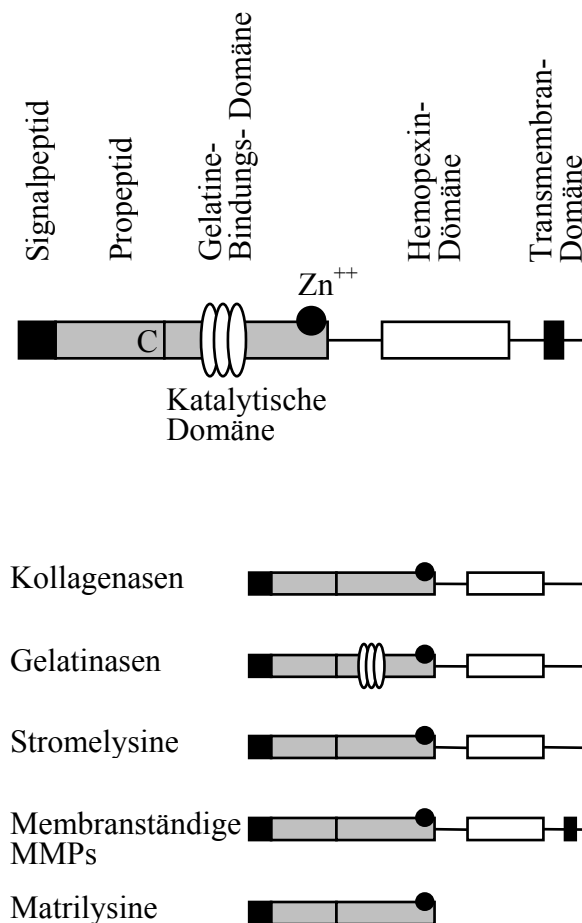


Abb. 2: Proteinstruktur der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die proteolytische Abtrennung des Propeptid bewirkt eine Konformationsänderung und Aktivierung der MMPs. Die Bindungsregion der katalytischen Domäne ist strukturell dem jeweiligen Substrat angepasst. Die Hämopexindomäne ist an der Substratbindung und an der Inaktivierung des Enzyms beteiligt (modifiziert nach CREEMERS et al., 2001).

Kollagenasen

MMP-1, MMP-8, MMP-13 und MMP-18 gehören zu der Gruppe der Kollagenasen. Die wichtigste Funktion liegt in der Spaltung der Kollagene I, II und III. Daneben können die

Kollagenasen auch eine große Anzahl weiterer Moleküle verdauen (VISSE & NAGASE, 2003).

Gelatinasen

Die MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) werden in dieser Gruppe zusammengefasst. Diese beiden Enzyme verdauen Gelatine, die denaturierte Form von Kollagen. Des Weiteren verdaut die MMP-2 die Kollagentypen I, II und III (AIMES & QUIGLEY, 1995; PATTERSON et al., 2001), sowie die Kollagen Typen IV, V, VII X, XI (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Die MMP-9 verdaut neben Gelatine noch die Kollagentypen IV und V (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). FOSSANG et al. (1992) konnten ebenfalls eine enzymatische Aktivität der Gelatinasen bei Spaltung von Aggrekan nachweisen.

Stromelysine

MMP-3, MMP-10 und MMP-11 werden zur Gruppe der Stromelysine gezählt. Die MMP-3 aktiviert einen Großteil der anderen Pro-MMPs (SUZUKI et al., 1990).

Matrilysine

Die zu dieser Gruppe zugeordnete MMP-7 und MMP-26 zeichnen sich durch ein Fehlen der Hemopexin-Domäne aus. Sie haben ein breites Substratspektrum an Bestandteilen der extrazellulären Matrix (VISSE & NAGASE, 2003).

Membranständige MMPs (MT-MMPs)

Sechs verschiedene MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) werden zur Gruppe der Membranständigen MMPs gezählt. MT-MMPs werden nicht sezerniert, sondern liegen an der Membran gebunden vor (VISSE & NAGASE, 2003).

Nicht klassifizierbare MMPs

Sieben MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27, MMP-28) werden nicht einer der oben genannten Kategorien zugeordnet (VISSE & NAGASE, 2003).

2.4.3 Regulation der Matrixmetalloproteinasen

Die Aktivität der MMPs wird durch die Beeinflussung der Transkription, der Aktivierung der Proenzyme und durch die Aktivität von Inhibitoren reguliert.

Expression

Die Expression von MMP-Genen wird durch verschiedene stimulatorische Faktoren, unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine (Interleukin (IL)-1, Tumornekrosefaktor (TNF)- α), Chemikalien und physikalische Einflüsse und suppressive Faktoren, z. B. Transforming Growth Factor β (TGF- β), Glukokorticoide, Retinoide, reguliert (NAGASE, 1996). Posttranskriptional wird die Aktivität der MMPs über die Halbwertszeit ihrer mRNA beeinflusst. So wird z. B. das Transkript von MMP-13 durch Glukokorticoide stabilisiert und durch TGF- β destabilisiert (DELANY et al., 1995; VINCENTI, 2001).

Aktivierung

Die Aktivierung der Pro-MMPs erfolgt durch die Zerstörung der Bindung zwischen dem Zinkion der katalytischen Domäne und dem Cysteinrest. Dieser Mechanismus wird als „cystein switch“ bezeichnet. Ein Wassermolekül bindet an das Zinkion und ersetzt den Cysteinrückstand nach der Dissoziation. Dadurch wird das bis dahin nicht katalytische Zink in ein katalytisch aktives umgewandelt, wodurch ein intermediär aktives Enzym entsteht. Anschließend wird die Pro-Domäne der MMPs durch autokatalytische Spaltung oder durch andere Proteasen entfernt. Diese Spaltung verursacht eine Reduktion der Molekularmasse und bewirkt die völlige Aktivierung des Enzyms (VAN WART & BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Die Reduktion der Molekularmasse bewegt sich etwa in einem Bereich von 8-10 kDa (PARK et al., 1991). Die Aktivierung der Pro-MMPs kann sowohl auf proteolytischer als auch auf nicht-proteolytischer Weise erfolgen. Für die proteolytische Aktivierung haben COCORDAN et al. (1996) verschiedene Mechanismen beschrieben. Zum einen ist auf der extrazellulären Ebene eine Aktivierung durch Nicht-MMP-Proteine möglich. So wirken Gewebe- oder Plasmaendopeptidasen aktivierend auf MMPs. Ebenfalls bewirkt die Peptidase Plasmin eine vollständige Aktivierung von Pro-MMP-9, Pro-MMP-3 und Pro-MMP-10 (CARMELIET et al., 1997; LIJNEN, 2002). Auch Kallikrein, Thermolysin, Chymotrypsin und Trypsin spielen bei der Aktivierung von MMPs eine Rolle (OKADA et al., 1988; DUNCAN et al., 1998; MOILANEN et al., 2003). Darüber hinaus rufen andere MMPs eine extrazelluläre

Aktivierung hervor. IMAI et al. (1995) beschreiben, dass Matriyly sine in der Lage sind Pro-MMPs-3 vollständig und Pro-MMPs-9 teilweise zu aktivieren. OGATA et al. (1992) zeigen, dass die MMP-3 wiederum in der Lage ist, die MMP-9 zu aktivieren. Darüber hinaus ist die MMP-2 in der Lage die Pro-MMP-9 zu aktivieren (FRIDMAN et al., 1995). Bei der Pro-MMP-2 findet der größte Teil der Aktivierung auf der Zelloberfläche durch MT-MMPs statt (TAKINO et al., 1995; BUTLER et al., 1997; LIANO et al., 1999; PEI, 1999; ENGLISH et al., 2000). Einen besonderen Aspekt stellt hierbei die Tatsache dar, dass ein „Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases“ (TIMP) zu Aktivierung benötigt wird. Der Inhibitor TIMP-2 bindet an der Zelloberfläche zunächst an eine bereits intrazellulär aktivierte MT-MMP. Anschließend bindet die Pro-MMP-2 an den gebundenen TIMP und bildet so einen Komplex aus MT-MMP, TIMP und Pro-MMP-2, der dann durch eine angrenzende MT-MMP aktiviert werden kann (STRONGIN et al., 1995; BUTLER et al., 1998; WANG et al., 2000).

Hemmung

Eine Hemmung der Aktivität der MMPs kann durch spezifische und unspezifische Inhibitoren erfolgen. Die Gruppe der TIMPs stellen die spezifischen Inhibitoren dar. Sie binden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 an MMPs. Bislang konnten vier verschiedene TIMPs bei Wirbeltieren ermittelt werden. TIMPs weisen eine Molekularmasse von 21 bis 29 kDa auf. Sie bestehen aus einer N- und C-terminalen Domäne, die durch jeweils drei Disulfidbrücken in ihrer Konformation stabilisiert werden (VISSE & NAGASE, 2003). Die TIMPs binden in der gleichen Weise wie die Substrate an die katalytische Domäne der MMPs (FERNANDEZ-CATALAN et al., 1998). Neben den TIMPs als spezifische Inhibitoren der MMPs gibt es auch unspezifische Inhibitoren, zu denen das Akute-Phase-Protein α_2 -Makroglobulin gehört. So berichten CAWSTON & MERCER (1986), dass in Lösungen die MMP-1 mit dem α_2 -Makroglobulin leichter reagiert als mit dem TIMP-1 und sowohl im Serum als auch in der Synovia mit über 95% den größten Anteil der Inhibitoraktivität besitzt. Neben dem α_2 -Makroglobulin konnten für das ebenfalls zu den Akute-Phase-Proteinen zählende HP inhibitorische Wirkungen auf die MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden (DE KLEJIN et al., 2002; SMEETS et al., 2003).

2.4.4 Nachweismethoden von Matrixmetalloproteinasen

Zymographie

Die Zymographie (Substratgelelektrophorese) ist eine Methode, die MMPs anhand des Verdauens ihres bevorzugten Substrates und des Molekulargewichtes identifiziert. Grundlage dieser Methode ist die Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970). Bei der Zymographie erfolgt die Trennung der Proteine in einem Polyacrylamidgel, dem ein spezifisches Substrat (zum Nachweis von Gelatinasen wird Gelatine hinzugefügt) beigemischt wird, welches zusammen mit Acrylamid polymerisiert. Während der Elektrophorese werden durch vorhandenes Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) Proteine denaturiert und dadurch die MMP inaktiviert. Gleichzeitig verursacht das SDS eine Dissoziation des Cysteinrückstandes vom Zinkmolekül, wodurch die latente Form der MMPs aktiviert wird. Nach der Elektrophorese wird das Gel gewaschen, wodurch ein Austausch des SDS erfolgt, die MMPs renaturieren und dadurch wieder in einen aktiven Zustand überführt werden. Während einer anschließenden Inkubationszeit verdauen die durch die Elektrophorese konzentrierten und renaturierten MMPs die Gelatine. Nach der Inkubation wird das Gel gefärbt und die MMPs erscheinen als klare Banden gegen einen dunklen Hintergrund von unverdaulichem Substrat. Auf Grundlage verschiedener Molekulargewichte können mit Hilfe der Zymographie sowohl die aktiven Formen der MMPs als auch die Proenzyme nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von SDS erfolgt jedoch auch eine Dissoziation der Inhibitoren von den MMPs. Dadurch zeigt sich in der Zymographie unter Umständen eine höhere Aktivität der MMPs, als sie *in vivo* vorliegt (SNOEK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005).

Aktivitätstest

Neben der Zymographie besteht die Möglichkeit, die Aktivität von Gelatinasen mit Hilfe eines Aktivitätstestes zu bestimmen. Dazu werden die zu untersuchenden Proben zu biotinmarkierter Gelatine gegeben. Während einer folgenden Inkubation spalten vorhandene Gelatinasen die Gelatinestränge. Anschließend wird das Gemisch auf biotinbindende, streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten gegeben. Nach einer Inkubationszeit werden ungebundene, biotinmarkierte Gelatinefragmente durch einen Waschschrift entfernt und

vorhandenes Biotin mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen und photometrisch gemessen.

Gelatinefragmente, die keine Biotinmarkierung aufweisen, können nicht an die streptavidinbeschichteten Platten binden und werden dementsprechend während des Waschvorganges entfernt. Fragmente, die einen Biotinrest tragen, werden an den Streptavidinplatten gebunden, enthalten allerdings kein weiteres Biotin mehr, das enzymatisch nachgewiesen werden könnte. Daher können nur Fragmente detektiert werden, die wenigstens zwei Biotinreste tragen. So bedeutet eine geringe Farbreaktion eine hohe Degradation der Gelatinestränge und somit eine hohe Aktivität der Gelatinasen. Im Gegensatz zur Zymographie wird mit Hilfe dieses Testes nur die Aktivität der Gelatinasen gemessen, die aktiviert und gleichzeitig nicht inhibiert sind (RATNIKOV et al., 2000).

2.5 Haptoglobin

2.5.1 Eigenschaften von Haptoglobin

HP, ein α_2 -Glykoprotein, gilt neben dem C-Reaktiven Protein und dem Pig Major Akute-Phase-Protein als eines der wichtigsten Proteine, das während der Akute-Phase-Reaktion beim Schwein gebildet werden (ECKERSALL et al., 1996). HP wird zu den positiven Akute-Phase-Proteinen gezählt, da die Konzentration im Plasma während der Akuten-Phase-Reaktion um mehr als 25% zunimmt (THOMPSON et al., 1992). Während beim Menschen, bedingt durch zwei Allele, drei phänotypisch unterschiedliche Formen von HP existieren (DOBRYSYCKA, 1997), konnte beim Schwein lediglich eine Form von HP ermittelt werden, die dem HP-Typ 1-1 des Menschen entspricht (FRASER & SMITH, 1970). Dieser Typ von HP weist eine vierkettige Struktur auf, die aus zwei leichten α - (Molekulargewicht 9100 Da) und zwei schweren β -Ketten (Molekulargewicht 40000 Da) besteht, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (DOBRYSYCKA, 1997).

2.5.2 Physiologische Funktionen von Haptoglobin

Eine wesentliche Funktion von HP liegt in der Bildung von stabilen Komplexen mit Hämoglobin. HP ist das Plasmaprotein mit der höchsten Bindungsaffinität zu Hämoglobin (FAGOONEE et al., 2005). Nach BOWMAN & KUROSUKY (1982) stellt dieser Komplex eine der stärksten in der Biologie bekannten nichtkovalenten Bindungen dar.

Hämoglobin-HP-Komplexe können nicht über die Niere ausgeschieden werden, so dass eine Wiederverwertung des Eisens in der Leber ermöglicht wird. Für den Hämoglobinmetabolismus spielt HP eine entscheidende Rolle, da der für den Abbau verantwortliche Rezeptor CD 163 der Monozyten bzw. Makrophagen ausschließlich Hämoglobin-HP-Komplexe bindet, nicht aber ungebundenes Hämoglobin (KRISTIANSEN et al., 2001). Nach der Bindung des Komplexes an den Rezeptor erfolgt die Aufnahme in die Zelle, in der das Eisen von HP mit Hilfe des Enzyms Hämoxygenase getrennt wird. Mit Hilfe des Eisentransporters MTP-1 gelangt das Eisen dann, an Proteinkomplexe gebunden in den extrazellulären Raum (YANG et al., 2002). Die makrophagenähnlichen Typ-A Synoviozyten der Synovialis besitzen ebenfalls den Rezeptor CD 163 (SCHMIDT et al., 2005).

Durch die Bindung von Eisen besitzt HP einen bakteriostatischen Effekt. Da das für Bakterien lebensnotwendige Eisen gebunden wird und so den Bakterien nicht mehr zur Verfügung steht, erfolgt eine Hemmung des Bakterienwachstums (EATON et al., 1982). So konnten DELANGHE et al. (1998) einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum des Bakteriums *Streptococcus pyogenes* durch humanes HP nachweisen.

Außerhalb der Erythrozyten stellt Hämoglobin ein hoch toxisches Oxidans dar. Die toxische Wirkung von freiem Hämoglobin und seinem Abbauprodukt Häm ist in erster Linie auf die Fähigkeit zurückzuführen, durch die Freisetzung von Eisen Hydroxylradikal zu bilden. Diese Wirkung wird durch die Bindung von HP an Hämoglobin verhindert. Extrazelluläres Oxyhämoglobin oxidiert zu Superoxidradikalen und Fe^{3+} . In der Gegenwart von Hydrogenperoxid oder Lipidperoxid werden Fe^{2+} oder Fe^{3+} weiter zu Fe^{4+} oxidiert, einer hochtoxischen Komponente mit einem Redoxpotential ähnlich dem freier Hydroxylradikaler (ALAYASH, 1999; LIM et al., 2001). Diese Radikale sind in der Lage durch Lipidperoxidationen Schäden in der Zellmembran zu verursachen oder die Sulfhydrylgruppen in Proteinen zu oxidieren, wodurch Rezeptorfunktionen, Enzyme und Transportproteine beeinträchtigt werden (ALLEN & TRESINI, 2000; DRÖGE, 2002). BECKMANN & AMES (1998) beschreiben darüber hinaus eine Schädigung der

Nukleinsäuren durch freie Radikale. Durch diese Vermeidung der Radikalenbildung schützt HP so auch die Niere vor Schädigungen, die andernfalls bei einer verstärkten Hämolyse durch ungebundenes Hämoglobin hervorgerufen würden (FRIEDRICHS et al., 1995; DOBRYSZYCKA, 1997).

2.5.3 Haptoglobin und Gelenkserkrankungen

HEINONEN et al. (2006) zeigten, dass Zuchtschweine, die an durch Osteochondrose, entzündlichen Hautläsionen oder Klauenläsionen hervorgerufenen Lahmheiten erkrankt waren, erhöhte HP-Serumkonzentrationen aufwiesen. Untersuchungen zu HP-Gehalten in der Synovia und im Knorpelgewebe bei lahmen Schweinen liegen nicht vor. WILLUMSEN & FRIIS (1975) wiesen bei Menschen mit Arthritis und Arthrose HP in der Synovia nach, wobei in Proben aus Gelenken mit arthritischen Veränderungen höherer HP-Konzentrationen ermittelt werden konnten. Die Autoren konnten darüber hinaus eine hohe Korrelation der HP-Konzentrationen im Serum und in der Synovia nachweisen und vermuten deshalb eine passive Diffusion aus dem Plasma durch die Synovialmembran in die Synovia.

3 Manuscript:

Gelatinase activities and haptoglobin concentrations in healthy and in degenerative articular cartilage of pigs

Abstract

Osteochondrosis and osteoarthritis are conditions frequently observed in pigs. Matrix metalloproteinases (MMPs) play a key role in the development of such degenerative joint diseases. The acute phase protein haptoglobin (HP) reportedly inhibits the two gelatinases MMP-2 and MMP-9. The objectives of this study were to investigate the activity of these MMPs in healthy and in degenerative cartilage and to characterize the relation with HP in articular cartilages of pigs.

Joint surfaces of the proximal and distal humerus and femur of fattening pigs were histopathologically classified. In addition, cartilage homogenates and synovia were obtained from these localisations. The tissue homogenates were analysed for gelatinase activity by zymography and by activity assay. The concentration of Hp in cartilage homogenates, in synovia, and in serum were analyzed by ELISA.

High enzymatic activity of the MMP-2 latent form was observed in zymography for all samples. Zymographic activity of MMP-2 active form and MMP-9 (active and latent form) were detected at low levels in some samples. Comparing the zymographic activities of gelatinases in unaltered versus altered cartilages yielded no differences. In contrast to zymography, cartilage homogenates were negative for MMP-2 and MMP-9 in the activity assays. This is explained by the methodological approach since inhibitors are separated from the MMPs during zymography but not in the activity assay. The concentrations of HP in cartilage homogenates and in synovia from samples without alteration and from samples with massive alterations were not different. When classified according to their HP concentration, cartilage homogenates with increased HP concentrations had higher ($P < 0.05$) zymographic activities of the MMP-2 active form.

Our results indicate that both in healthy as well as in altered cartilage, MMP-2 and MMP-9 activities were absent or only low. Therefore these gelatinases are possibly not involved in the degradation of the cartilage. The increased MMP-2 activity in samples with greater HP concentrations is possibly due to a feedback loop: HP inhibits MMP-2 activity, and thus more MMP-2 is needed to get the same amount of tissue breakdown in the presence of HP. HP is separated from the MMPs during zymography, and thereby the detectable zymographic activity of MMP-2 is increased.

Keywords: pig, cartilage, gelatinase, haptoglobin

Introduction

Leg weakness is a disease characterized by lameness and by difficulties in standing up. The condition is frequently observed in pigs. Osteochondrosis and osteoarthritis are considered to be the most common non-infectious causes of this disease (REILAND, 1978). Osteochondrosis is a non-inflammatory disturbance of the process of osteochondral ossification in joint cartilage and growth plates (GRONDALEN, 1974a). Osteoarthritis is a degenerative process of joints characterized by progressive deterioration and erosion of cartilage which develops frequently as a result of osteochondrosis (REILAND et al., 1978). The etiology of degenerative cartilage alterations is poorly understood. It is known that MMPs play a key role in the formation of such pathological conditions (MURPHY et al., 1990). MMPs form a family of zinc endopeptidases which are structurally and functionally related. They are secreted as latent forms and need an activation step before they are able to degrade extracellular matrix macromolecules. The activities of the MMPs are regulated by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and unspecific inhibitors (CAWSTON, 1996). MMP-2 and MMP-9 form the subgroup of the gelatinases and are able to degrade gelatin and different collagens (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). For the acute phase protein HP, inhibitory effects on gelatinase activity have been demonstrated (DE KLEIJN et al., 2002). HP is a α_2 -glycoprotein with haemoglobin-binding capacity; it is mainly produced in the liver, but expression can also be induced in various other tissues (DOBRYSZYCKA, 1997, THIELEN et al., 2007). In rats, tendons, ankle and knee are described as expression sites of HP (SMEETS et al., 2003).

We herein aimed to characterize gelatinase activity in normal porcine cartilage and in cartilage with histopathologically proven alterations. In addition, we investigated the relationship between HP and gelatinase activity in articular cartilage of pigs.

Materials and Methods

Animals

136 fattened pigs of a F2 generation of Duroc x Pietrain and Pietrain x Duroc were used. The final live weights ranged from 88 to 130 kg (mean 110 kg). The pigs were housed under standard conditions in groups of two per pen on a partly slatted floor at the Training and Research Center Frankenforst, of the University of Bonn. Water and feed (13.5 MJ ME/kg (88% DM); 16.5% crude protein (cystein: 0.3%, lysine: 1.0%, methionine: 0.28%, threonine: 0.59%); 2.9% crude fat, 3.6% crude fibre, 4.55% ash (phosphorus: 0.55%, sodium: 0.13%)) were offered ad libitum.

Sample collection

Slaughter blood and synovial fluid from the elbow, shoulder, knee and hip joints of the right carcass half were collected at slaughter. In addition, the humerus and the femur were dissected and the cartilage was peeled off superficially (maximal 1 mm deep) from a 1 x 3.5 cm area of each the humeral head, medial humeral condyle, femoral head and medial femoral condyle using a scalpel. The cartilage samples were snap-frozen in liquid nitrogen. Sagittal sections (0.5 cm x 2 cm x 1 cm) from the lateral humeral condyle, lateral femoral condyle, humeral head and femoral head were sawed. Blood serum was obtained by centrifugation (3000 g, 10 min, 4°C) after clotting. All samples were stored at -80 °C until further analysis.

Histological evaluation of joint surfaces

The sagittal sections were fixed in Bouin's fixative for 2 days, decalcified in RDO (Apex Engineering Products Co., Plainfield, IL, USA) and dehydrated for 4 h through a series of alcohol concentrations (70, 80, 90, and 100%). Subsequently, the sections were incubated in Rotihistol (Roth, Karlsruhe, Germany) and embedded in paraffin. Slices of 7 µm thickness were cut and stained according to the method of Masson-Goldner (ROMEIS, 1998). Two slices from two different sections per localisation were examined microscopically at a

magnification of 132 and 264. The localisations were graded as 0, 1, 2 or 3 according to a system adapted from a previous study of clinical grading (GODEGEBUURE et al., 1980). Grade 0 classified normal cartilage morphology (Figure 1A), grade 1 (Figure 1B) comprised sections with minor alterations caused by fibrillation, early hyperplasia or minor vascularisation, and sections with alterations in the deeper structure like massive fibrillation, hyperplasia and massive vascularisation were classified as grade 2 (Figure 1C). Grade 3 represented extensive areas of necrosis and ossification.

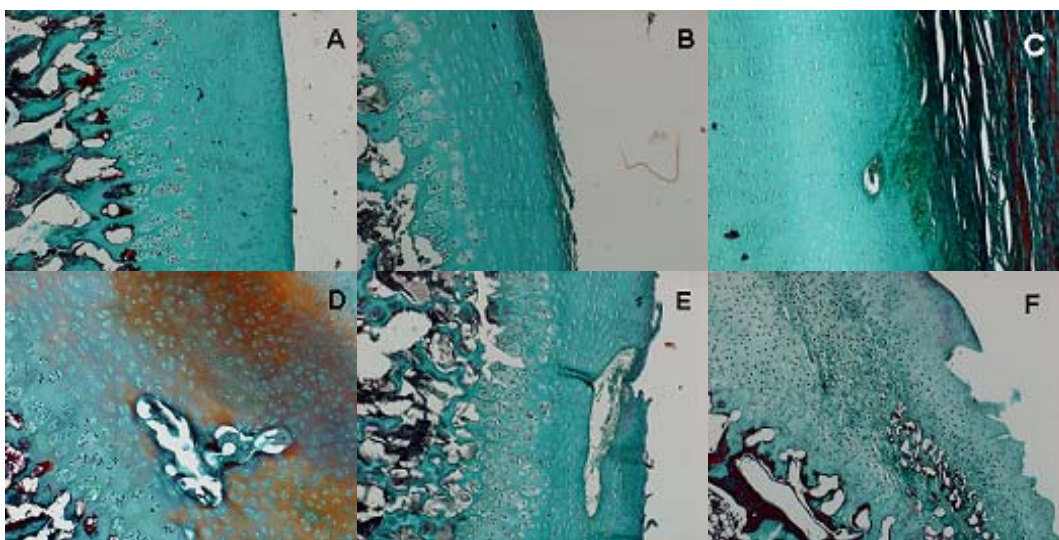


Figure 1. Representative photomicrographs for different degenerative morphological changes of the joint surfaces of the distal humerus with the corresponding grading in fattened pigs

(A) Grade 0: normal cartilage morphology, (132 \times); (B) Grade 1: surface erosion, (132 \times); (C) Grade 2: surface erosion with fibrillation, capillary (132 \times); (D) Grade 3: massive eosinophilic matrix, ossification area (264 \times); (E) Grade 3: hyperplasia, capillary, vertical cleft (264 \times); (F) Grade 3: hyperplasia, surface erosion, ossification area (264 \times)

Preparation of cartilage homogenates

Cartilage samples from localisations graded as 0 (n=36, from 31 different pigs) and 3 (n=31, from 26 different pigs) from humeral head and femoral head were used for preparing cartilage homogenates. The homogenates were prepared according to SCHURIGT et al. (2005). In brief, frozen cartilage was ground with mortar and pestle under liquid nitrogen. Forty mg of the powdered tissue were then transferred to a reaction tube, and 200 μ L of a homogenisation buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.4, 300 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, protease inhibitors according

to manufacturer's instruction (Complete, Mini, EDTA-free leaving the stability and the function of MMPs unaffected; Roche, Basel, Switzerland)) were added. The powder suspension was homogenised by using a shaker for 2 min and was incubated for 30 min on ice. Afterwards the samples were centrifuged for 30 min at 16.000 g and 4°C. The supernatant was re-centrifuged for 2 min at 16.000 g and 4°C, and the resulting supernatant was frozen at -80°C.

Determination of HP and TP concentration

The HP concentration in serum, synovial fluid and cartilage homogenates was analyzed by an ELISA (HISS et al., 2003). The concentration of total protein (TP) in synovial fluid and in cartilage homogenates was determined with a bicinchoninic acid assay (Sigma, Deisenhofen, Germany).

Gelatine zymography

The cartilage homogenates (1 mg TP/mL) were mixed 1:2 with electrophoresis loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.1% bromphenol blue and 10% glycerol) and 15 µL were subjected to an 8% SDS-PAGE co-polymerised with 1 mg/mL gelatine (Sigma) under non-reducing conditions. Following electrophoresis, the gels were washed 4 times with 2.5% Triton X-100 (Roth, Karlsruhe, Germany) for 15 min each and incubated for 24 h in 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij-35[®] (AppliChem, Darmstadt, Germany). The gels were then stained with 0.025% Coomassie brilliant blue G-250 (Roth) in a mixture of methanol: acetic acid: water (4.9:1:4.9) for 40 min and destained in 4% methanol with 8% acetic acid (12 h). The gelatinolytic activities were detected as transparent lysis bands against the background of Coomassie blue-stained gelatine. Prestained molecular weight marker (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany; 5 µL per lane) and MMP-2 and MMP-9 (Gelatinase A/ B, Chemicon, Temecula, Canada) as positive controls were used. In addition, a two-fold serial dilution of a mixture of the MMP-2 and MMP-9 positive control (gelatinase A/B, Chemicon) with PBS from 1:8 to 1:2048 was prepared and was used in one zymography to identify the limit of detection.

One sample was used in all gels as a reference control. To quantify the zymographic activities of the detected enzymes, zymograms were digitised with a scanner (Epson Perfection 2480 Photo, Seiko Epson Corp., Tokyo, Japan). The pictures were scanned in greyscale, inverted

and the lysis bands were analyzed by using the ImageQuant TL software (GE Healthcare, Freiburg, Germany). The zymographic activity of the MMPs was expressed as integrated optical density (IOD = optical density \times area). IOD values of latent MMP-2 obtained from the reference control were used to normalize the IOD values obtained from the samples. Zymographic band intensity was expressed as a percentage of reference control values. As control, one zymography was repeated in the presence of 20 mM EDTA (MMP inhibitor) in the incubation buffer.

Assay for MMP activity

Inhibitors of MMPs are separated from the MMPs during zymography (SNOEK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005) and thus the activity of the native enzymes might not be correctly determined by this method. We therefore performed an activity assay for MMP-2 and MMP-9 according to the method of RATNIKOV et al. (2000). The method is based on the cleavage of biotin-labelled gelatine through MMPs which is determined by immobilizing the amount of biotinylated fragments after incubation with the MMPs on streptavidin microtiter plates and quantifying them through enzyme-labelled streptavidin. Briefly, 10 mg of gelatine were dissolved in 0.1 M sodium borate buffer pH 9.0, at 60°C for tracer synthesis. Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide (Sigma), dissolved in dimethyl sulfoxide (AppliChem) at 100 mg/mL, was added to the gelatine solution at a final concentration of 3 mg/mL. The mixture was incubated for 3 h at room temperature and then 1 M NH₄Cl (200 μ L/mL) were added to stop the reaction. PBS was added in a ratio of 1.5:1 and the biotinylated gelatine was applied to a PD-10 column (GE Healthcare) and eluted with PBS. The protein concentrations of the different fractions were determined by a bicinchoninic acid assay (Sigma). The tracer containing fractions were pooled, mixed with the same volume of glycerol and stored at -20 °C.

Polypropylene reaction tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were filled with 55 μ L biotinylated gelatine, 30 μ L Tris-buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl, 0.005% Brij 35, pH 7.5) and 25 μ L of cartilage homogenates per well. As control, a two-fold serial dilution of MMP-2 and MMP-9 (gelatinase A/B, Chemicon) with PBS, yielding a final concentration from 1:8 to 1:2,048, was pipetted into the plates instead of the cartilage homogenates. The mixtures were incubated for 4 h at 37 °C; 45 μ L were transferred in duplicates into the wells of a streptavidin-coated plate (Greiner, Frickenhausen, Germany)

and incubated for 30 min at 37 °C. After five washes using a microtiter plate washer (EL404, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany) with 0.05% Tween20 in PBS, 100 µL streptavidin-peroxidase (Biozol, Eching, Germany), diluted 1:10,000 in Tris-buffer were filled into each well and incubated for 30 min at 37°C. Subsequently, the plates were re-washed, the wells were filled with 100 µL freshly prepared substrate solution containing 0.05 M citric acid, 0.055 M Na₂HPO₄, 0.05% urea hydrogen peroxide, 0.02% ProClin (Sigma) and 1% of a tetramethylbenzidine (AppliChem) solution (12.5 mg/mL dimethyl sulfoxide) and were incubated at room temperature for 30 min in the dark.

The reaction was stopped with 50 µL 1 M oxalic acid added to each well and dye production was determined photometrically at 450 nm (with 630 nm as reference) on a microtiter plate reader (ELX800, BioTek Instruments).

Statistical analyses

Analyses were performed with the statistical software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). HP and TP concentrations as well as the MMP activity were analyzed with the Kruskal–Wallis test for comparing the medians of different joints, histopathological grades and HP groups (groups classified according to the HP concentration in cartilage homogenates as being either above or below the limit of detection). To determine which specific differences were significant, the Mann-Whitney test was used. An alpha adjustment for multiple comparisons was performed. The frequency of histopathological grades for the different localisations (humeral condyle, humeral head, femoral condyle, femoral head) was compared by using the likelihood ratio Chi-Square test. For each test, $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. Correlations were calculated according to Spearman.

Results

Grading of histopathological alterations

From 544 localisations (due to technical reasons it was not possible to analyze all samples of every pig) 465 samples were histopathologically classified. The assessment of the histological samples provided grades from 0 to 3 for humeral condyle, humeral head, femoral condyle and

femoral head. Figure 2 shows the percentage of localisations observed at each grade of cartilage alteration.

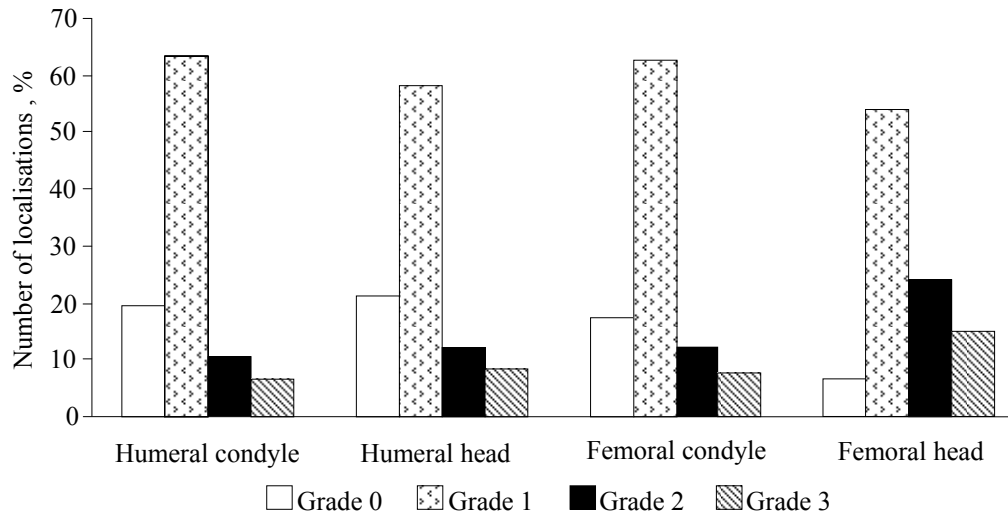


Figure 2. Distribution of histopathological grades on different articular localisations in fattened pigs (Chi- Square test; $P = 0.003$)

Concentration of HP and TP

The concentration of TP in porcine synovia ($n = 402$) ranged from 2 mg/mL to 640 mg/mL (median 142 mg/mL). HP concentration in synovia ($n = 465$) ranged from 0.3 $\mu\text{g/mL}$ to 1590 $\mu\text{g/mL}$ (median 172 $\mu\text{g/mL}$). Differences between the TP ($P < 0.001$) and HP concentration ($P < 0.001$) in synovia of shoulder, elbow, hip and knee were observed (Fig. 3).

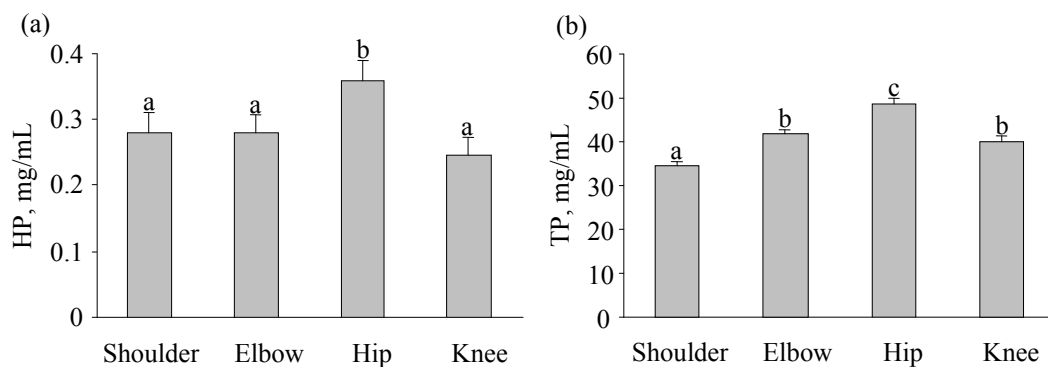


Figure 3. (a) Haptoglobin (HP) and (b) total protein (TP) concentrations in synovia of different joints (mean + SEM) in fattened pigs; different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

The ratio HP:TP in synovia ranged from 0.1 to 10 μg HP/mg TP. No differences in the synovial HP/TP ratio were detected between the different joints. HP concentrations in serum ($n = 124$) were between 18 and 2990 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (median 1196 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The serum/synovia ratio of HP is presented in Figure 4 for the different localisations.

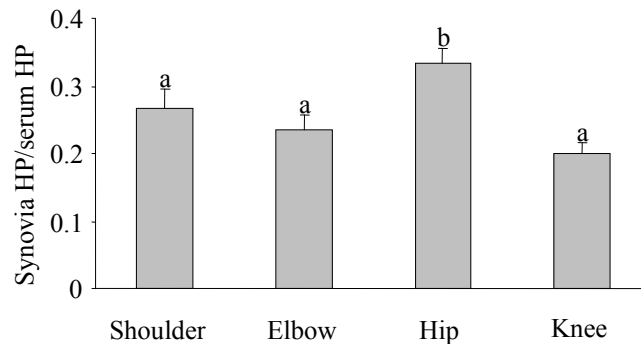


Figure 4. Partition ratios of the haptoglobin concentration between simultaneously collected specimens of synovia and blood serum of different joints in fattened pigs (mean + SEM; $P < 0.001$); different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

HP concentrations in the cartilage homogenates ($n = 67$) from humeral head and femoral head (graded as 0 or 3) ranged from 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (limit of detection) to 5.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (median 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In 31 samples, the HP concentrations were below the limit of detection.

Serum HP and HP in synovia were correlated, whereby the concentration in serum was 4.1 fold greater ($r = 0.63$; $P = 0.01$). In addition, HP in cartilage homogenates and serum ($r = 0.71$; $P = 0.01$) were correlated as well as HP in cartilage homogenates and synovia ($r = 0.83$; $P = 0.01$).

Zymography and activity assay

As shown in Figure 5, high relative IOD values of the zymographic activity of latent MMP-2 were detected in every sample ($n = 67$). The MMP-2 active form showed lysis bands with low IOD values in 38 cartilage homogenates. MMP-9 (latent and active forms) were detected at low levels of IOD values in 25 and 8 samples, respectively.

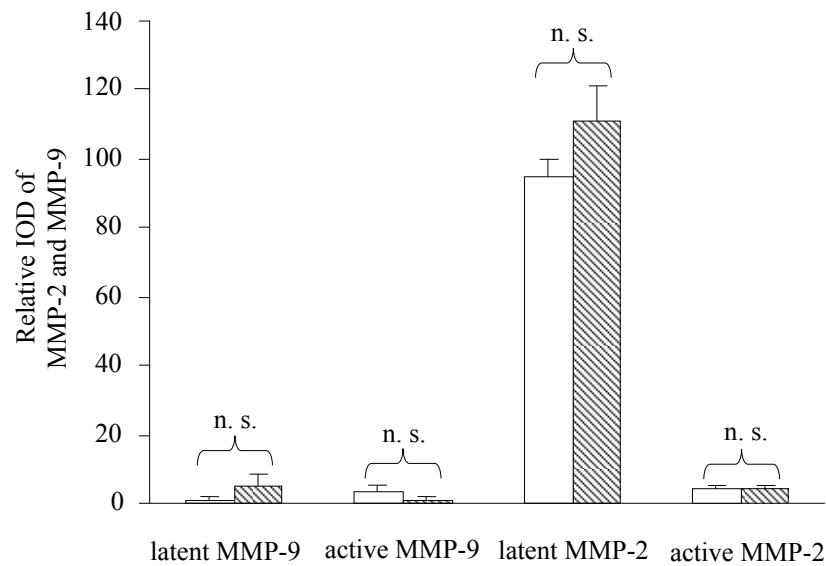


Figure 5. Relative activity of the MMP-2 and MMP-9 (IOD: integrated optical density) in unaltered cartilage (open bars) and cartilage with massive alterations (shaded bars) in fattened pigs (mean + SEM; n.s.: not significant)

Figure 6 shows an exemplary zymogram of the cartilage homogenates. Control zymograms with incubation buffer containing 20 mM EDTA (MMP inhibitor) showed no digestion of the substrate after 18 h. The MMP activity assay showed no activity of MMP-2 and MMP-9 in the cartilage homogenates, neither for unaltered nor for histopathologically altered tissue. To compare the sensitivity of the zymography and the activity test, a serial dilution of a control of MMP-2 and MMP-9 was used in both tests. The zymogram showed lysis bands up to a dilution of 1:64 of the MMP-2 and MMP-9 control. In the MMP activity assay, the control of MMP-2 and MMP-9 was detectable up to a dilution of 1:2,048.

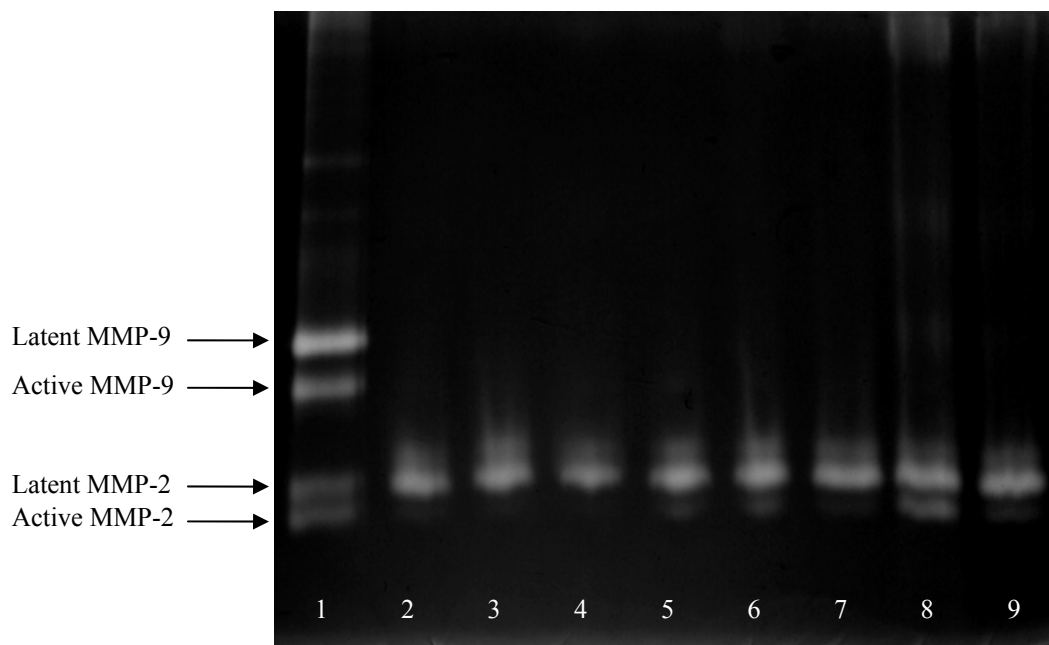


Figure 6. Exemplary zymogram demonstrating activity of MMP-2 and MMP-9
 Lane 1 contains a control of human MMP-2 and MMP-9 (active and latent form).
 Lane 2 to 9 show gelatinolytic activity of cartilage homogenates. The cartilage
 extract of lane 6 was used as a reference control in every zymogram.

Influence of histopathological alterations on HP, TP and MMP

The TP concentration in synovia from joints with massive alterations (grade 3) was higher ($P = 0.018$) than in joints without alterations (grade 0). In contrast, HP concentrations in synovia and the serum-synovia ratio from joints with different histopathological grades were not different. In addition, the concentrations of HP and the zymographic activity in cartilage homogenates from localisations graded as 0 or 3 showed no differences.

When classifying tissue samples according to their HP concentration, i.e. as being below or above the limit of detection at $0.2 \mu\text{g/mL}$, the lysis bands of the MMP-2 active form yielded stronger relative IOD values ($P = 0.034$) in samples $> 0.2 \mu\text{g HP/mL}$ than in samples below this threshold (Figure 7). For the MMP-9 and the MMP-2 active forms, no differences were observed.

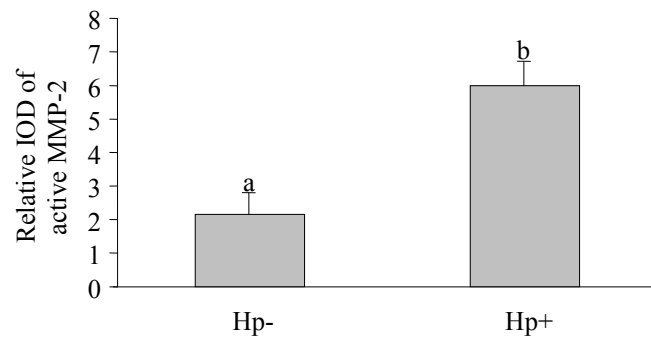


Figure 7. Relative activity (mean + SEM) of the MMP-2 active form (IOD: integrated optical density) of cartilage homogenates from fattened pigs with haptoglobin concentrations in this tissue being above (Hp+) or below the limit of detection (Hp-). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

Discussion

Degenerative alterations of the articular cartilage are frequently observed in growing pigs. In our study histopathological alterations were present in nearly 85% of the joint localisations. HEINONEN et al. (2007) reported alterations of the cartilage related to degenerative joint diseases in more than 94% of joints in fattening pigs at slaughter. In the present work, most of the lesions occurred in the distal femur, an observation which is supported by others (HILL et al., 1984; JORGENSEN & ANDERSON, 2000). In contrast to these works, JORGENSEN et al. (1995) reported the highest prevalence of osteochondrosis in the distal humerus. However, different breeds were used in these studies and the occurrence of osteochondral lesions is known to differ between breeds (GODEGEBURE et al., 1980; KADARMIDEEN et al., 2004). A F2 population of Duroc x Pietrain and Pietrain x Duroc was used in our study because such a resource population provides a larger gene pool with greater phenotypic variations.

The zymographic examinations showed no increased concentrations of active as well as latent MMP-2 and MMP-9 in cartilage tissue of localisations with degenerative alterations compared to normal cartilage. In contrast, CLEGG & CARTER (1999) demonstrated by zymography that normal equine articular tissues solely produces latent MMP-2 whereas similar tissues obtained from degenerative joint diseases produce both, latent and active MMP-2. This corresponds to findings of IMAI et al. (1997) who identified activated MMP-2 in human osteoarthritic cartilage but not in unaltered tissue. Moreover, CLEGG & CARTER

(1999) found no zymographic activity corresponding to MMP-9 in unaltered equine cartilage whereas some cartilage samples obtained from horses suffering from osteochondrosis showed activated MMP-9. SÖDER et al. (2006) demonstrated by immunohistochemistry MMP-9 in a subset of normal and in a large portion of osteoarthritic chondrocytes in men. By the use of zymography, active and latent forms of the MMPS can be distinguished on the basis of their molecular weights. However, during zymography inhibitors are separated from the MMPS which may result in a greater activity than *in vivo* (WOESSNER, 1995). Therefore an activity assay was carried out which determined solely the non-inhibited activated MMP-2 and MMP-9. When comparing the limit of detection between zymography and activity assay, the activity assay was found to be 32 times more sensitive. In the zymography, active forms of the MMP-2 and MMP-9 were detected in 38 and 8 samples, respectively. In contrast, MMP-2 and MMP-9 were not detectable in the cartilage homogenates by the activity assay. We assume that inhibitors which are separated during zymography inhibited the MMP-2 and MMP-9. This finding suggests that in altered as well as in physiological cartilage samples we collected no or only low activity of MMP-2 and MMP-9 was present.

AL-HIZAB et al. (2002) using *in situ* zymography, found markedly increased gelatinase activity in equine cartilage with osteochondrosis dissecans lesions. This activity was particularly prominent in the deep cartilage zone, whereas in the superficial zone only small areas of digestion were detected. These results support our findings, as our samples were collected from the superficial cartilage. Another possible explanation for the absent gelatinase activity is that histological alterations might be attributable to impairments being a thing of the past and the sampling was done when cartilage damages have already developed. However, examinations from PERRIN et al. (1978) showed that the severity of lesions is increased with the weight of the pigs, so that most severe lesions scores are found at 120 kg. Lesions may thus develop during a longer period and it is unlikely that during our sampling no cartilage degeneration was present.

The low or absent activity of MMP-2 and MMP-9 we observed in porcine cartilage may have negative effects on the ability to regenerate this tissue. It is described that a spatially and temporally controlled expression of different MMPs is implemented in reaction to soft tissue wounding (MARTIN, 1997; MADLENER et al., 1998). HEMBRY et al. (2001) found that after generation of partial-thickness defects in porcine cartilage, macrophages migrate into defects and synthesize and deposit MMP-9 onto damaged cartilage matrix and newly

synthesized matrix in the defects whereby an extracellular cleavage is mediated. However, the authors described that already 3 weeks after creation of the defect, no MMP-9 is apparent in the zone of cartilage necrosis and that after further 3 weeks there was only limited proteolytic degradation in the zone of cartilage necrosis. HEMBRY et al. (2001) presumed that thereby a zone of mechanical weakness remains which contributes to a subsequent instability of this region and that, over time, compressive stress will lead to degenerative changes. Thus, it would be interesting to compare our results with the activity of MMP-2 and MMP-9 in cartilage of breeds which have a low prevalence of degenerative cartilage alterations, e.g. Yucatan pigs (FARNUM et al., 1984).

In the synovia different proteins are elevated during degenerative joint diseases (YAMAGIWA et al., 2003). Therefore, it is not surprising that in the present study the TP concentration in the synovia was increased with the severity of histopathological cartilage alterations. HP concentration in the synovia was not influenced by the severity of the histopathological alteration. WILLUMSEN & FRIES (1975) reported that HP is elevated in rheumatoid arthritis (an inflammatory disease) in man compared with that seen in osteoarthritis, but no studies have been reported comparing concentrations of HP in synovia of joints with degenerative diseases with samples from healthy patients. Regardless of the alteration of the cartilage, a high correlation ($r = 0.63$) between HP in the synovia and in the serum was observed. This correlation may explain the high variability of the HP concentration in the synovia, as the HP serum concentrations are affected by influences which were not particularly addressed in our study, e.g. respiratory infections (HALL et al., 1992). WILLUMSEN & FRIES (1975) found a high correlation ($r = 0.79$) between the HP concentration in synovia and serum in men. They determined a difference in the serum-synovia ratio of HP between joints suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis, but did not examine healthy patients. PEJOVIC et al. (1995) showed that during rheumatoid arthritis, the permeability of the synovial membrane increases. In our results no differences in the ratio of HP in synovia and serum between unaltered joints and joints with degenerative alterations were established. However, differences in the concentration of TP and HP in the synovia as well as in the HP serum-synovia ratio among different joints were found. Therefore, it seems that different joints have different permeabilities of the synovial membrane or differ in the local synthesis of HP. Our results indicate that HP is present in porcine cartilage tissue. A high correlation was observed between HP concentration in the

cartilage and HP concentration in synovia ($r = 0.83$) as well as in serum ($r = 0.71$). However, for the acute phase protein α_1 -antitrypsin, it is described that due to its relatively high molecular mass (56 kDa) and its negative charge, it cannot enter articular cartilage (FISCHER et al., 1999). On the basis of the range of the isoelectric point values from 5.05 to 6.95 in the haptoglobin chains (KANNO & KATHO, 2001) and the pH of 7.29 to 7.45 in synovia (TURITTO & SLACK, 1998), synovial HP is assumingly charged negative. Due to this characteristic and the molecular mass of 120 kDa (PETERSEN et al., 2004), we speculate that the HP we detected in the cartilage homogenates does not originate from the synovia. This idea is supported by the evidence of HP mRNA in the cartilage homogenates as demonstrated by RT-PCR (data not shown). In addition, STEVENS et al. (2008) reported that chondrocytes of cartilage explants from bovine stifle joints express HP and that this synthesis is increased by $IL-1\beta$ and $TNF-\alpha$. Thus local expression of HP in cartilage can be assumed. Elevated concentrations of HP in serum are mainly attributable to hepatic synthesis in response to $IL-6$, $IL-1$ and tumor necrosis factor α (CASTELL et al., 1989). Based on the high correlation between HP in serum and in cartilage homogenates, circulating cytokines might influence the production of HP by chondrocytes.

A well known biological function of HP is its ability to bind haemoglobin (DOBRYSZYCKA, 1997). This may be an important feature in the prevention of cartilage degenerations in joints. It is shown that exposure of cartilage to blood as well as to mononuclear cells plus red cells induces cartilage damages (HOOIVELD et al., 2003a; HOOIVELD et al., 2003b; JANSEN et al., 2007). HOOIVELD et al. (2003c) hypothesize that haemoglobin-derived iron in combination with an increased production of hydrogen peroxide by chondrocytes results in the formation of hydroxyl radicals in the vicinity of chondrocytes. This mechanism may result in chondrocyte damage. It is supposed that the hydroxyl radicals generated by this so-called Fenton reaction, activate MMP-9 (KUBOTA, 2007). TAJAIMA et al. (2005) described that haemoglobin stimulates the secretion of MMP-2 and MMP-9 by synovial tissue. JANSEN et al. (2007) reported that the MMP activity in cartilage shows a blood concentration-dependent increase directly after exposure. ZAMBONI et al. (2005) presumed that iron release could be a necessary link to the activation of MMPs.

In addition to the indirect influence of HP on the secretion and activation of MMPs through the avoidance of iron release, HP has possibly a function as non-specific inhibitor of MMP-2 and MMP-9. DE KLEIJN et al. (2002) showed *in vitro* that gelatin degradation by MMP-2

and MMP-9 is reduced in the presence of human HP. Therefore, the increased MMP-2 activity in the zymography in cartilage homogenates with HP concentration above the limit of detection is possible due to a feedback loop: HP inhibits MMP-2 activity, and thus more MMP-2 is needed to get the same amount of tissue breakdown, when HP is present. HP is separated from the MMPs during zymography, and thereby the detected zymographic activity of MMP-2 is increased (DE KLEIJN et al., 2002). In contrast to these findings, BANNIKOV et al. (2007) described, that activated MMP-9-HP complexes in sera of cows have the same activity as activated HP-free MMP-9. Thus the importance of HP for MMP-2 and MMP-9 in the pig needs further investigation.

In conclusion, we hypothesise that MMP-2 and MMP-9 are not involved in the degeneration of the articular cartilage in fattening pigs. Furthermore, we showed that HP is present in the cartilage and speculate that HP may have a function as unspecific inhibitor of the gelatinases in the cartilage of the pig.

4 **Erweiterte Diskussion und Ausblick**

4.1 **Einordnung der eigenen Arbeit**

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes, in dem Gene und Chromosomenregionen bei Schweinen identifiziert werden sollen, die Einfluss auf die Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung und somit auf die Fundamentstabilität ausüben. Das Ziel der eigenen Arbeit bestand darin, einen möglichen Einfluss der MMP-2, MMP-9 und HP auf die Entwicklung von Knorpeldegenerationen zu bestimmen, um so zu überprüfen, ob die Gene dieser Proteine in einem funktionellen Zusammenhang mit der Entstehung des Beinschwächesyndroms stehen.

4.2 **Diskussion der Nachweismethoden von Gelatinasen**

Die Nachweise der MMP-2 und MMP-9 wurden unter Verwendung der Zymographie und eines Aktivitätstest durchgeführt. Mit Hilfe der Zymographie war es möglich, sowohl zwischen den beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, als auch zwischen den jeweiligen aktiven und inaktiven Enzymstufen zu differenzieren. Dadurch können Aussagen über die relative Quantität der einzelnen Gelatinasen und über das Ausmaß der Enzymaktivierung getroffen werden. Nachteilig an dieser Methode ist, dass potentielle Inhibitoren während der Zymographie von den MMPs getrennt werden und dem entsprechend die Zymographie unter Umständen eine höhere Aktivität wiedergibt als sie *in vivo* vorliegt. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich ein Aktivitätstest durchgeführt. Diese Nachweismethode ermöglicht es zwar nicht, zwischen den beiden Gelatinasen zu unterscheiden, jedoch wird ausschließlich die Aktivität der Enzyme wiedergegeben, die aktiviert und gleichzeitig nicht inhibiert sind. Dementsprechend lässt sich unter Verwendung des Aktivitätstestes die Gelatinaseaktivität nachweisen, wie sie *in vivo* vorliegt.

Auf die Verwendung von Nachweismethoden unter Einsatz von Antikörpern gegen MMP-2 und MMP-9 (Immunhistochemie, Westernblot) wurde bei der vorliegenden Arbeit verzichtet. Diese Methoden können nicht zwischen einer aktiven und inaktiven Form sowie zwischen

inhibierten und nicht-inhibierten Enzymen differenzieren und hätten dem entsprechend nicht zu zusätzlichen Kenntnissen geführt.

4.3 Matrixmetalloproteinasen, Akute-Phase-Proteine und Knorpel-degenerationen

Während der Homöostase ist der Knorpelmetabolismus durch ein konstantes Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau gekennzeichnet. Krankhafte Veränderungen entstehen dann, wenn das Gleichgewicht zwischen der Synthese von Matrixkomponenten, sowie der Synthese, Aktivierung und Inhibierung von Proteasen gestört ist. Es wird vermutet, dass dabei die Aktivierung von MMPs den fundamentale Schritt in der Entwicklung von pathologischen Veränderungen des Knorpelgewebes darstellt (CLEGG & CARTER, 1999). Sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen spielen Zytokine im Knorpelgewebe eine wichtige Rolle, indem sie die Synthese sowie den Abbau von Matrixbestandteilen regulieren (VAN DEN BERG, 1999).

Grundsätzlich können die Zytokine, die einen Einfluss auf den Chondrozytenmetabolismus besitzen, drei Gruppen zugeordnet werden: destruktive Zytokine, regulative Zytokine und anabole Faktoren. Zur Gruppe der destruktiven Zytokine gehört unter anderem das IL-1. Dieses Zytokin besitzt einen suppressiven Effekt auf die Proteoglykansynthese (VAN DEN BERG, 1999) und stimuliert gleichzeitig die Chondrozyten MMPs auszuschütten, die einen Knorpelabbau bewirken (FERNANDES et al., 2002; STEVENSEN et al., 2008). MOHATI et al. (1993) konnten zeigen, dass IL-1 α im Knorpelgewebe die Synthese von MMP-9-mRNA und MMP-9 erhöht. Der Nettoeffekt der IL-1 Wirkung liegt also in einer Reduktion der Matrixsynthese und einer Steigerung des Abbaus, was zu einem schnellen Abbau der Proteoglykane und Kollagene führt. So konnten OLEKSYSZYN & AUGUSTINE (1996) bei bovinen und humanen Gelenkknorpelkulturen durch Zugabe von IL-1 eine Degradation des Gewebes hervorrufen. Zu den Faktoren mit ähnlicher Wirkung gehören TNF- α , Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF) und IL-17. TNF- α und LIF werden hauptsächlich durch Chondrozyten gebildet, wohingegen IL-17 ein Derivat der T-Zellen darstellt. Verglichen mit IL-1 bewirkt der TNF- α jedoch eine deutlich geringere Steigerung des Knorpelgewebeabbaus. Die Bedeutung von LIF und IL-17 wurde bislang *in vivo* nicht weiter untersucht (VAN DEN BERG, 1999).

Die zweite Gruppe stellen die sogenannten regulativen Zytokine dar, zu der IL-4, IL-10 und IL-13 zugeordnet werden. Diese Zytokine können die Produktion der destruktiven Zytokine IL-1 und TNF durch Makrophagen und Chondrozyten inhibieren und zusätzlich die Synthese von Inhibitoren gegen IL-1 und TNF steigern, darunter den IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1-ra). IL-4 besitzt darüber hinaus einen direkten Effekt auf die Chondrozyten durch die Reduktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Dieses Enzym wird durch Chondrozyten unter Einfluss von IL-1 gebildet und bewirkt den Großteil der durch IL-1 hervorgerufenen Verminderung der Proteoglykansynthese. IL-6 ist ein Zytokin, das ebenfalls zu der regulativen Gruppe gehört. Dieses IL stimuliert die Synthese von TIMPs und inhibiert so, den durch Zytokine ausgelösten Abbau von Knorpelmatrix (VAN DEN BERG, 1999). So konnten *In-vivo*-Studien bei Mäusen mit einem IL-6 Defizit eine deutlich erhöhte Knorpelzerstörung festgestellt werden (VAN DE LOO et al., 1997).

Die dritte Kategorie bilden die Wachstumsfaktoren. Die zu dieser Gruppe gehörigen Zytokine interferieren nicht direkt mit der IL-1 Bildung, sondern sind in der Lage dem katabolen Effekt von IL-1 entgegenzuwirken, indem sie die Synthese von Matrixkomponenten erhöhen. Der Insulin-Like-Growth-Faktor-1 (IGF-1) stellt unter physiologischen Bedingungen den wichtigsten anabolischen Faktor im adulten Gelenkknorpel dar. Neben IGF-1 können eine ganze Reihe von Wachstumsfaktoren, darunter der Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β), die Syntheseleistung von Chondrozyten stimulieren. Auch scheinen Bone-Morphogenetic-Proteins (BMPs) und Chondrocytes-Derived-Morpogenetic-Proteins (CDMPs) eine stimulierende Wirkung auf die Bildung von extrazellulärer Matrix zu besitzen (VAN DEN BERG, 1999).

Verschieden Zytokine, unter anderem das IL-1, IL-6 und der TNF- α spielen ebenfalls als Mediatoren bei der sogenannten Akute-Phase-Reaktion eine Rolle. Die Akute-Phase-Reaktion bezeichnet eine unspezifische, physiologische Reaktion des Organismus auf Störungen der Homöostase (ECKERSALL, 1995; ALAVA et al., 1997), die auch bei Knorpeldegenerationen ausgelöst wird. So konnte SIPE (1995) nachweisen, dass bei osteoarthrotischen Veränderungen die Plasmakonzentrationen der Akute-Phase-Proteine C-reaktives-Protein und Serum-Amyloid-A ansteigen. Aber auch im Knorpelgewebe selbst können Akute-Phase-Proteine ausgeschüttet werden. So steigt die Konzentration des Serum-Amyloid-A im Knorpelgewebe nach einer Behandlung mit IL-1 α , IL-1 β oder TNF- α bei *In-vitro*-Untersuchungen an (GRUBER et al., 2004; STEVENS et al., 2008). Auch das, als

unspezifischer Proteaseinhibitor bekannte Akute-Phase-Protein α_2 -Makroglobulin kann in Knorpelgewebekulturen nachgewiesen werden (MILNER et al., 2006). OLEKSYSZYN & AUGUSTINE (1996) zeigten *in vitro*, dass die Zugabe von α_2 -Makroglobulin den Abbau von Knorpelsubstanz verhindern kann. STEVENS et al. (2008) berichteten, dass die Ausschüttung von HP in bovinen Knorpelimplantaten nach einer Behandlung mit IL-1 β oder TNF- α ansteigt. Dem entsprechend scheint IL-1 eine in sich antagonistische Wirkung zu besitzen, da dieses Zytokin zum einen eine verstärkte MMP-Aktivität, zum anderen auch eine Erhöhung, der zum Teil als unspezifische Inhibitoren wirkenden Akute-Phase-Proteine, in den Chondrozyten hervorruft.

FISCHER et al. (1999) zeigten, dass das IL-6 einen Anstieg in der Synthese des unspezifischen Proteaseinhibitors und Akute-Phase-Proteins α_1 -Antitrypsin der Chondrozyten bewirkt. Die Autoren vermuten deshalb in der Existenz einer lokalen Akute-Phase-Reaktion im Knorpelgewebe und der damit verbundenen Synthese von Akute-Phase-Proteinen eine für das Knorpelgewebe schützende Wirkung. Dieses gilt im Besonderen für die als unspezifischen Proteaseinhibitoren bekannten α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin. Auch der bereits erwähnte, durch die regulativen Zytokine beeinflusste IL-1-ra gehört zu den Proteinen, die während der Akute-Phase Reaktion verstärkt gebildet werden (GABAY et al., 1997).

Da für das Akute-Phase-Protein HP ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die MMP-2 und MMP-9 festgestellt werden konnte (DE KLEIJN et al., 2002), besitzt dieses Protein möglicherweise ebenfalls eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der Homöostase im Knorpelgewebe. Allerdings konnten in den eigenen Untersuchungen keine Beziehung zwischen der Haptoglobinkonzentration im Knorpelgewebe und dem Auftreten von Knorpeldegenerationen ermittelt werden. Abb. 3 zeigt zusammenfassend mögliche Zusammenhänge zwischen MMPs und Akute-Phase-Proteinen auf die Knorpelhomöostase.

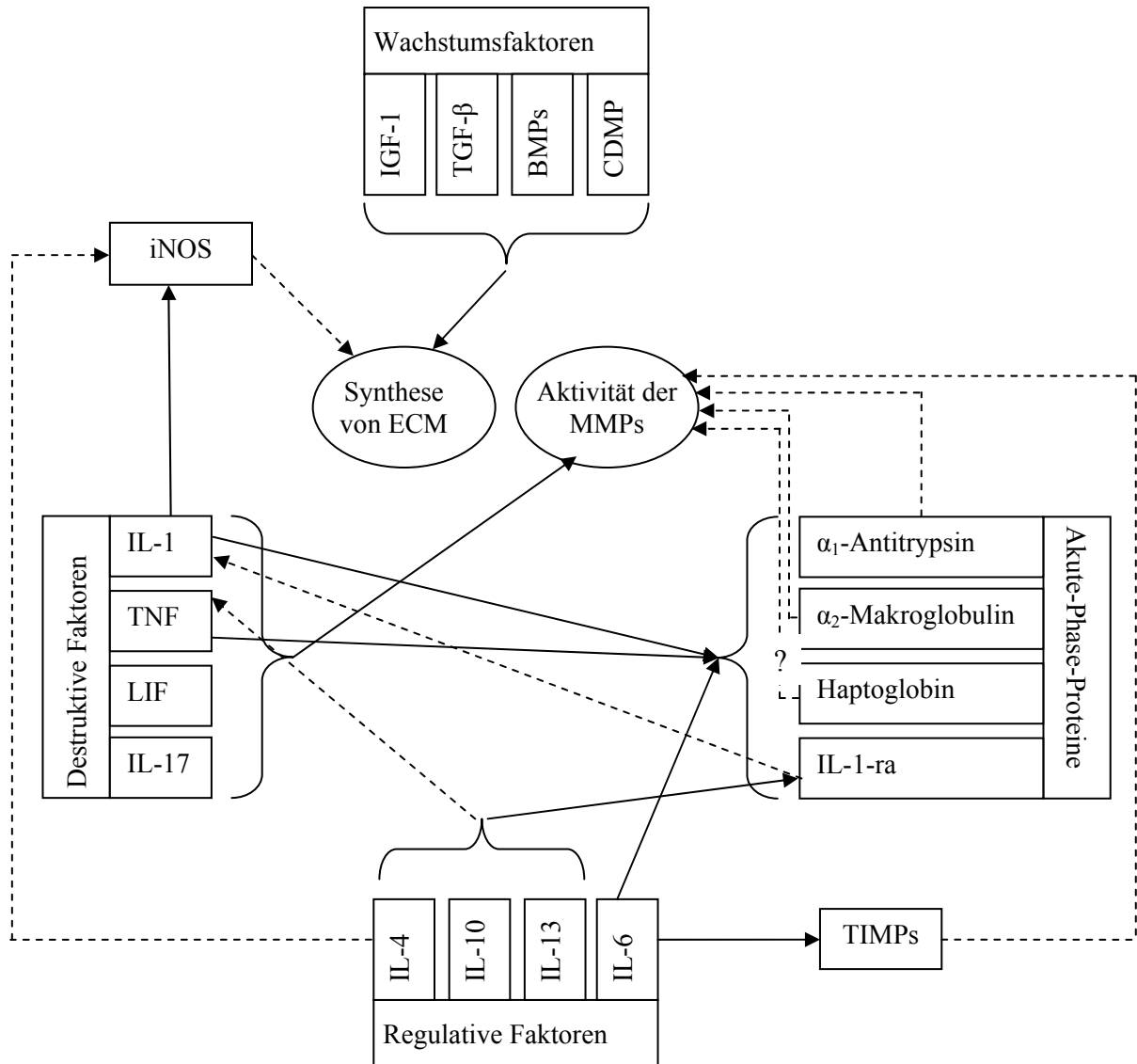


Abb. 3: Wechselwirkungen von Zytokinen und Akute-Phase-Proteine auf den Knorpelmetabolismus

Die gestrichelten Linien bedeuten eine reduzierende, die durchgezogenen Linien eine verstärkende Wirkung (teilweise entnommen von VAN DEN BERG, 1999). (BMPs = Bone Morphogenetic Proteins, CDMP = Chondrocytes-Derived-Morphogenetic-Proteins, ECM = extrazelluläre Matrix, IGF-1 = Insulin-Like Growth Factor 1, IL = Interleukin, IL-1-ra = IL-1- Rezeptorantagonist, LIF = Leukämie-Inhibitor-Faktor, iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase MMPs = Matrix-Metalloproteinasen, TGF = Tumor-Growth-Factor, TIMPs = Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, TNF = Tumor-Nekrose-Faktor)

4.4 mRNA von Gelatinasen und Haptoglobin im Knorpelgewebe

In den eigenen Untersuchungen konnten die MMP-2 und -9 im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Neben einer Diffusion aus der Synovia könnten die Enzyme auch aus einer Synthese innerhalb des Knorpelgewebes stammen. Untersuchungen von GEPSTEIN et al. (2002) zeigten mRNA der MMP-2 und -9 im gesunden murinen Knorpelgewebe. In humanen Chondrozyten erfolgte der Nachweis von MMP-2 mRNA im normalen, als auch im osteoarthrotischen Gewebe, wobei ein fünffacher Anstieg der mRNA in durch Osteoarthrose veränderten Chondrozyten ermittelt wurde. Auch als Protein zeigte sich die MMP-2 in den Chondrozyten und zwar sowohl im gesunden als auch veränderten Gewebe, wobei auch hier eine höhere Konzentration im veränderten Gewebe vorlag (DUERR et al., 2004). Die Autoren vermuten deshalb, dass die MMP-2 nicht nur bei Knorpeldegenerationen sondern auch während des physiologischen Knorpelumsatzes eine Rolle spielt. SÖDER et al. (2006) wiesen MMP-9 mRNA im human osteoarthrotischen Chondrozyten, nicht aber im gesunden Knorpel nach. Mittels Immunhistochemie konnten bei einem Großteil der osteoarthrotische Chondrozyten ebenfalls die MMP-9 ermittelt werden, während im unveränderten Gewebe die Chondrozyten nur in wenigen Fällen die MMP-9 enthielten. Aus diesem Grunde nehmen die Autoren an, dass anders als bei der MMP-2, die MMP-9 im physiologischen Knorpelumsatz eine nur sehr geringe oder ausschließlich fokal begrenzte Rolle spielt. Die eigenen Untersuchungen an porcinen Knorpel können zum Teil vergleichbare Rückschlüsse zulassen. So konnte die latente Form der MMP-2 in allen untersuchten Knorpelgewebeproben nachgewiesen werden und die aktive Form in 56% aller untersuchten Proben, wobei keine Unterschiede zwischen normalem und verändertem Gewebe vorlagen. Bei der MMP-9 hingegen zeigte sich nur bei etwa 37 % der Proben die latente Form und nur in 11% die aktive Form, wobei auch das Ausmaß der zymographischen Aktivität der MMP-9 deutlich geringer war, als bei der MMP-2. In den eigenen Untersuchungen konnten aber im Gegensatz zu SÖDER et al. (2006) auch bei der MMP-9 keine Unterschiede zwischen veränderten als auch unveränderten Geweben nachgewiesen werden. Möglicherweise ist das auf beginnende Veränderungen des untersuchten Knorpelgewebes zurückzuführen, die pathohistologisch noch nicht erfasst werden konnten.

HP mRNA konnte in institutseigenen Untersuchungen in porcinem Knorpelgewebe nachgewiesen werden (Daten nicht veröffentlicht). Auch WISLON et al. (2008) konnten bei Mäusen HP mRNA in Knorpelextrakten von Fermurköpfen nachweisen.

4.5 Genetische Variationen der Gelatinasen

PETERS et al. (1999) zeigten, dass eine Variation in der Promoterregion des humanen MMP-9-Gens zu einer Variation der Expression auf Ebene der Transkription führt. Die Autoren stellten fest, dass dieser genetische Polymorphismus feine Unterschiede in der MMP-9 Aktivität hervorruft, die zu Veränderungen von Blutgefäßen führen (erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Bildung von intrakranialen Aneurysmen). Auch für das humane MMP-2-Gen sind Variationen in der Promoterregion beschrieben, die vermutlich die Transkription des MMP-2 Gens beeinflussen (PRICE et al., 2001). Dementsprechend scheint es möglich, dass auch beim Schwein genetische Polymorphismen der MMP-2 und MMP-9 vorhanden sind, die möglicherweise einen Einfluss auf die Entstehung degenerativer Knorpelerkrankungen besitzen.

4.6 Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich neue Fragstellungen, die in weiteren Untersuchungen geklärt werden sollten.

In der vorliegenden Arbeit konnte HP im Knorpelgewebe nachgewiesen und bei Knorpelhomogenaten mit einer HP-Konzentration über der Nachweisgrenze eine erhöhte zymographische Aktivität der MMP-2 Aktivform ermittelt werden. Da für verschiedene Spezies jedoch widersprüchliche Aussagen über die Funktionen von HP als Inhibitor existieren, sollten die inhibitorischen Effekte von porcinem HP auf die porcine MMP-2 und MMP-9 *in vitro* überprüft werden, um so Aussagen über Funktionen von HP im Knorpel des Schweines treffen zu können. An Knorpelgewebekulturen könnte darüber hinaus geklärt werden, ob eine durch IL-1 ausgelöste Knorpeldegeneration durch Zugabe von HP beeinflusst werden kann.

Da in der Literatur die MMP nicht nur als Ursache von Knorpeldegenerationen, sondern auch als wichtiger Bestandteil von Regenerationsprozessen beschrieben wird, bleibt zu klären, ob die geringe oder nicht vorhandene Aktivität der Gelatinasen Anzeichen für eine geringere Regenerationsfähigkeit des untersuchten Gelenkknorpels darstellt. Diese möglicherweise eingeschränkte Regenerationsfähigkeit z. B. gegenüber kleineren Verletzungen des Knorpelgewebes könnte die Entwicklung von Knorpeldegeneration begünstigen. Eine Möglichkeit diese Fragestellung näher zu untersuchen bestünde darin, die Gelatinaseaktivität in Knorpelproben von Schweinerassen mit sehr geringer Anfälligkeit gegenüber Gelenkserkrankungen (z. B. Yucatan - Schweine) zu bestimmen.

Die dieser Untersuchung zugrunde liegenden Knorpelproben entstammen aus dem oberflächlichen Bereichen des Gelenkknorpels. Durch Osteochondrose verursachte Schädigungen des Knorpels entstehen jedoch in den Ossifikationszentren des unterhalb des Gelenkknorpels liegenden artikulären/epiphysären Wachstums-Knorpels oder in den Epiphysenfugen. Da vermutet wird, dass die Entwicklung von Osteochondrose auf ein Ungleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Prozessen zurückzuführen ist (AL-HIZAB et al., 2002), könnten die MMP-2 und MMP-9 als Bestandteil von katabolen Prozessen eine Rolle bei der Entstehung von Osteochondrose im Wachstumsknorpel spielen. In weiterführenden Untersuchungen sollten deshalb Knorpelproben aus den Wachstumszonen des Knorpels entnommen und auf die Aktivität von MMP untersucht werden. Auch HP könnte in den Verknöcherungszonen von Bedeutung sein. Durch die inhibitorische Wirkung auf die MMP-2 und MMP-9 bewirkt HP vermutlich eine Akkumulation von Gelatine, die dann als temporäre Matrix für die Zellmigration dienen könnte (DE KLEIJN et al., 2002), eine Funktion, die auch bei der Ossifikation des Wachstumsknorpels von Bedeutung sein könnte.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der eigenen Arbeit bestand darin die Bedeutung der MMP-2 und MMP-9 bei der Degeneration des Gelenkknorpelgewebes des Schweines näher zu untersuchen. Dabei galt es ebenfalls zu klären, welchen Einfluss das Akute-Phase-Protein HP auf die Ausprägung der Knorpelveränderung sowie auf die Aktivität der MMP besitzt.

Von 136 Mastschweinen einer F2 Generation von Pietrain x Duroc and Duroc x Pietrain wurden während der Schlachtung Blut sowie Synovia von Schulter-, Ellenbogen-, Hüft- und Kniegelenk aus der rechten Schlachtkörperhälfte gewonnen. Zusätzlich wurden Humerus und Femur präpariert. Anschließend wurde craniodorsal des Caput femoris, dorsal des Condylus medialis femoris, craniomedial des Caput humeri sowie dorsal des Condylus medialis humeri Knorpelproben entnommen und aus den Gelenkflächen von Humerus und Femur sagittale Scheiben gesägt. Diese Gelenkkochenscheiben wurden in Paraffin eingebettet und anschließend aus diesen Blöcken 7 µm dicke histologische Schnitte angefertigt. Anschließend erfolgten die Färbungen der Schnitte nach Masson-Goldner sowie eine histopathologische Einstufung. Dabei wurde eine vierstufige Einteilung der histologischen Schnitte (unverändert, geringgradig verändert, mittelgradig verändert und hochgradig verändert) vorgenommen. Aus Knorpelproben des Caput femoris und des Caput humeri, die histopathologisch als unverändert oder hochgradig verändert eingestuft wurden, erfolgte die Erstellung von Knorpelhomogenaten. Dazu wurde unter Zusatz von flüssigem Stickstoff das Gewebe zermörsert und anschließend unter Verwendung eines Puffers homogenisiert. Darauf folgend wurden die Homogenate zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgeschöpft.

Die HP-Konzentrationen des aus dem Schlachtblut gewonnen Serums, der Synovia und den Knorpelhomogenaten wurden unter Verwendung eines ELISAs ermittelt. Darüber hinaus wurden mit Hilfe eines BCA Testes die TP-Konzentrationen in der Synovia gemessen. Die Aktivität der MMP-2 und MMP-9 in den Knorpelhomogenaten wurde mit Hilfe der Gelatinezymographie und eines Aktivitätstestes untersucht.

Von den 136 Mastschweinen, die der Untersuchung zu Grunde lagen, wurden insgesamt 465 (aus technischen Gründen konnten nicht alle Gelenke klassifiziert werden) Gelenkslokalisationen histologisch eingestuft. Von diesen Lokalisationen wiesen fast 85% histopathologische Veränderungen auf, wobei die meisten Veränderungen im distalen Femur zu finden waren. Die Untersuchung der Synovia zeigte Gesamtproteingehalte (TP) von 2 bis 640 mg/mL (Median 142 mg/mL) und HP-Gehalte von 0,3 bis 1590 µg/mL (Median 172 mg/mL). Die Konzentration von HP und TP unterschieden sich signifikant zwischen Schulter, Ellenbogen, Hüfte und Knie. Der Anteil von HP am TP variierte von 0,1 bis 10 µg HP/mg TP. Die HP-Konzentrationen im Serum ergaben Werte zwischen 18 und 2990 mg/mL (Median 1196 mg/mL). Die Untersuchung der Knorpelextrakte (n = 67) der Humerusköpfe und Femurköpfe, die histopathologisch als unverändert oder hochgradig verändert eingestuft wurden, wiesen HP-Konzentration zwischen der Nachweisgrenze von 0,2 µg/mL und 5,58 µg/mL auf. Bei 31 Proben konnte HP-Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt werden. Die HP Konzentration im Serum und in der Synovia waren korreliert ($r = 0,63$; $P = 0,01$), wobei die HP Konzentration im Serum einen 4,1 fach höheren Wert aufwies. Die HP-Konzentration der Knorpelextrakte korrelierte mit den Konzentrationen des Serums ($r = 0,71$; $P = 0,01$) und denen der Synovia ($r = 0,83$; $P = 0,01$). Die latente Form der MMP-2 zeigte mit 101% die höchste zymographische Aktivität. Die aktive Form der MMP-2 und die MMP-9 (latente als auch aktive Form) zeigte eine zymographische Aktivität von unter 5%, wobei auch nur in einem Teil der untersuchten Knorpelextrakte eine zymographische Aktivität nachweisbar war. Der durchgeführte Aktivitätstest zeigte, mit Ausnahme der Positivkontrolle, in keinem der untersuchten Knorpelhomogenate eine Aktivität der Gelatinasen. Im Gegensatz zur Zymographie werden beim Aktivitätstest aktivierte MMPs, die inhibiert sind, nicht detektiert. Um die Nachweisgrenzen der Zymographie mit dem Aktivitätstest vergleichen zu können, wurde bei beiden Nachweismethoden einer Standardverdünnungsreihe einer Kontrolle von Gelatinasen verwendet. In der Zymographie konnte bis zu einer Verdünnung von 1:64 Gelatinasen nachgewiesen werden, während mit Hilfe des Aktivitätstestes eine gelatinolytische Aktivität bis zu einer Verdünnung von 1:2048 ermittelt werden konnte. Die TP Konzentration in der Synovia von Gelenken mit massiven Veränderungen zeigte im Vergleich zu der Synovia von Gelenken ohne Veränderungen höhere Werte. Hingegen konnten bei der HP-Konzentration in der Synovia sowie dem Synovia-Serum Verhältnis von HP keine Unterschiede zwischen verschiedenen

histopathologischen Einstufungen ermittelt werden. Ebenfalls zeigten sich keine Unterschiede bei Knorpelhomogenaten von unveränderten und hochgradig veränderten Lokalisationen hinsichtlich Aktivität der Gelatinasen und der HP-Konzentration. Zur Betrachtung des Einflusses von HP auf die Aktivität der MMPs wurden die einzelnen Proben hinsichtlich ihres HP-Gehaltes in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die Nachweisgrenze des HP-ELISAs von 0,2 µg HP/mL als Grenzwert fungierte. Zwischen diesen beiden Gruppen zeigte sich ein Unterschied ($p = 0,034$) für die MMP-2 Aktivform. Während der Median der zymographischen Aktivität bei der HP - Gruppe unterhalb der Nachweisgrenze bei 0 lag, zeigte sich in der Gruppe oberhalb der Nachweisgrenze ein Median von 2,68%. Für die MMP-9 in der Pro- und Aktivform und für die MMP-2 Proform konnten keine Unterschiede zwischen den beiden HP-Gruppen ermittelt werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte HP im Knorpelgewebe nachwiesen werden. Dementsprechend scheint es möglich, dass HP aufgrund seiner Funktion als Inhibitor von Gelatinasen einen Einfluss auf die Entstehung von Degenerationen im porcinen Gelenksknorpel ausübt.

6 Anhang

Chemikalien und Puffer

Reinstwasser

Leitungswasser aufbereitet über eine zweistufige Umkehrosiose (elect water purifier, USF Deutschland GmbH, Rausbach-Baumbach)

Knorpelhomogenisierung

Homogenisierungspuffer

50 mM Tris/HCl	(Roth, Karlsruhe)
300 mM KCl	(Roth)
2,5 mM MgCl ₂	(Roth)
1 Tablette Proteasinh inhibitor auf 10 mL Puffer (Complete, Mini, EDTA-free)	(Roche, Mannheim)
pH 7,4	

Zymographie

Trenngelpuffer

0,15 M Tris/HCl	(Roth)
0,4% Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Sigma, Deisenhofen)
pH 8,8	

Trenngel 8 %ig

2,67 mL Acrylamid (30%) (Rotiphorese® Gel A)	(Roth)
1,07 mL Bisacrylamid (2%) (Rotiphorese® Gel B)	(Roth)
2,50 mL Trenngelpuffer	
3,76 mL H ₂ O	
5,00 mg Gelatine	(AppliChem, Darmstadt)

Das Gemisch wird mit

45 μ L 10% Ammoniumpersulfatlösung (APS) (Sigma)

5 μ L Tertramethyldiamin (TEMED) (Roth)

versetzt.

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl (Roth)

0,4% SDS (Sigma)

pH 8,8

Sammelgel 4 %ig

0,80 mL Acrylamid (30%) (Rotiphorese® Gel A) (Roth)

0,30 mL Bisacrylamid (2%) (Rotiphorese® Gel B) (Roth)

1,25 mL Sammelgelpuffer

0,50 mL H₂O

Das Gemisch wird mit

40 μ L 10% APS (Sigma)

10 μ L TEMED (Roth)

versetzt.

Bromphenolblaulösung

20 mg Bromphenolblau (Sigma)

10 mL 0,1 M Tris/HCl (Sigma)

pH 7,5

Probenpuffer (2 x konzentriert)

3 mL Bromphenolblaulösung

40 mL Glycerin (Merck, Darmstadt)

10 mL 20% SDS-Lösung (Sigma)

4 mL 1M Tris/HCl pH 6,8 (Roth)

mit H₂O auf 100 mL auffüllen

Laufpuffer

0,25 mM Tris/HCl	(Roth)
0,2 M Glycerin	(Roth)
0,1 % SDS	(Sigma)

Inkubationspuffer

50 mM Tris/HCl	(Roth)
200 mM NaCl	(AppliChem)
5 mM CaCl ₂	(AppliChem)
0,02% Brij-35	(AppliChem)

Waschpuffer

2,5% Triton [®] X-100 (v/v)	(Sigma)
--------------------------------------	---------

Färbelösung für Gele

2,5 g Coomassiebrilliantblau (Brilliant Blau R 250)	(Roth)
454 mL Methanol	(Roth)
92 mL Eisessig	(Roth)
mit H ₂ O auf 1L auffüllen	

Entfärbelösung

100 mL Methanol	(Roth)
150 mL Eisessig	(Roth)
mit H ₂ O auf 1 L auffüllen	

Aktivitätstest

Waschpuffer PBS (10 fach Konzentrat)

1,36 M NaCl	(AppliChem)
81 mM Na ₂ HPO ₄	(AppliChem)
27 mM KCl	(Roth)
15 mM KH ₂ PO ₄	(Sigma)

0,05% Tween® 20 (Roth)
zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurden 10 mL auf 1L aufgefüllt
(pH 7,3)

Biotinamidocaproate N-hydroxysuccinimide Lösung

100 mg BiotinamidocaproateN-hydroxysuccinimide (Sigma)
1 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) (AppliChem)

Tracer

10 mg/mL Gelatine (Sigma)
0,1 M Natriumboratpuffer pH 9,0
3 mg/mL BiotinamidocaproateN-hydroxysuccinimide Lösung

Trispuffer

50 mM Tris/HCl (Roth)
150 mM NaCl (AppliChem)
5 mM CaCl (AppliChem)
0,005 Brij35 (AppliChem)
pH 7,5

Tetramethylbenzidin (TMB)-Stammlösung

12,5 mg 3,3', 5,5'-TMB (AppliChem)
1 mL DMSO (AppliChem)

Substratpuffer

0,05 M Zitronensäure (Roth)
0,055 M Na₂HPO₄ (Sigma)
0,05% Harnstoffperoxid (Sigma)
20 mL/L ProClin 150® (Sigma)
pH 4,05

Substratlösung

17 mL Substratpuffer

170 µL TMB-Stammlösung

Stoppreagenz

1 M Oxalsäure (Roth)

HP ELISA

Beschichtungspuffer

0,05 M NaHCO₃ (Roth)

200 µL/L Proteaseinhibitor Complete™ (Roche)

20 mL/L Pro Clin 150® (Sigma)

pH 9,6

Caseinlösung

0,05 M NaOH (AppliChem)

2,5% Casein (Sigma)

1,5 mM EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat) (Roth)

200 µL/L Proteaseinhibitor Complete™ (Roche)

20 mL/L Pro Clin 150® (Sigma)

pH 7,2

Testpuffer

0,12 M NaCl (Roth)

0,002 M Na₂HPO₄ (Sigma)

0,01 M EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat) (Roth)

0,005% Chlorhexidin (Sigma)

0,01 M Gelatine (Gelatin Hydrolysate) (Sigma)

0,05% Tween® 20 (AppliChem)

0,002% Phenolrot (Sigma)

200 µL/L Proteaseinhibitor (Complete™) (Roche)

20 mL/L ProClin 150® (Sigma)

pH 7,2

Waschpuffer PBS (10 fach Konzentrat)

1,36 M NaCl	(Roth)
81 mM Na ₂ HPO ₄	(AppliChem)
27 mM KCl	(Roth)
15 mM KH ₂ PO ₄	(Sigma)
55 g/L Tween® 20	(AppliChem)
20 mL/L ProClin 150®	(Sigma)

zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurden 10 mL auf 1L aufgefüllt (pH 7,3)

Streptavidin-Peroxidase

Streptavidin-Peroxidase	(Biozol, Eching)
-------------------------	------------------

Substratpuffer

siehe Aktivitätstest

TMB-Stammlösung

siehe Aktivitätstest

Substratlösung

17 mL Substratpuffer
340 µL TMB-Stammlösung

Stopplösung

siehe Aktivitätstest

7 Literatur

AIMES, R. T. & J. P. QUIGLEY (1995):

Matrix Metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase: inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific $\frac{3}{4}$ - and $\frac{1}{4}$ - length fragments.

J. Biol. Chem. 270, 5872-5876

ALAYASH, A. I. (1999):

Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants?

Nat. Biotechnol. 17, 545-549

AL-HIZAB, F., P. D. CLEGG, C. C. THOMPSON & S. D. CARTER (2002):

Microscopic localization of active gelatinases in equine osteochondritis dissecans (OCD) cartilage.

Osteoarthritis Cartilage 10, 653-661

ALLAN, J. A., A. J. P. DOCHERTY, P. J. BARKER, N. S. HUSKISSON, J. J. REYNOLDS & G. MURPHY (1995):

Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain.

Biochem. J. 309, 299-306

ALLEN, R. G. & M. TRESINI (2000):

Oxidative stress and gene regulation.

Free Radic. Biol. Med. 28, 463-99

ALAVA, M. A., N. GONZALES-RAMON, P. HEEGAARD, S. GUZYLACK, M. J. M. TOUSSANT, C. LIPPERHEIDE, F. MADEC, E. GRUYS., P. D. ECKERSALL, F. LAMPREAVE & A. PINEIRO (1997):

Pig-map, porcine acute phase proteins and standardisation of assays in Europe.

Comp. Heam. Int. 7, 208-213

ARCHER, C. & P. FRANCIS-WEST (2003):

The chondrocytes.

Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 401-404

ARTHER, S. R., E. T. KORNEGAY, H. R. THOMASA, H. P. VEIT, D. R. NOTTER, K. E. WEBB J. R. & J. L. BAKER (1983):

Restricted energy intake and elevated calcium and phosphorus intake for gilts during growth. IV. Characterization of metacarpal, metatarsal, femur humerus and turbinatate bones of sows during three parties.

J. Anim. Sci. 57, 1200-1214

- BADER, D. L. & G. E. KEMPSON (1994):
The short-term compressive properties of adult human articular cartilage.
Biomed. Mater. Eng. 4, 245-256
- BANNIKOV, G. A., J. S. MATTOON, E. J. ABRAHAMSEN, C. PREMANANDAN, K. B. GREEN-CHURCH, A. E. MARSH, & J. LAKRITZ (2007):
Biochemical and enzymatic characterization of purified covalent complexes of matrix metalloproteinases-9 and haptoglobin released by bovine granulocytes *in vitro*.
Am. J. Vet. Res. 68, 995-1004
- BECKMANN, K. B. & B. N. AMES (1998):
The free radical theory of ageing matures.
Physiol. Rev. 78, 547-581
- BIRKEDAL-HANSEN, H. W., G. I. MOORE, M. K. BODDEN, L. J. WINDSOR, B. BIRKEDAL-HANSEN, A. DECARLO & J. A. ENGLER (1993):
Matrix metalloproteinases: a review.
Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 4, 197-250
- BODE, W., C. FERNANDEZ-CATALAN, H. TSCHESCHE, F. GRAMS, H. NAGASE & K. MASKOS (1999):
Structural properties of matrix metalloproteinases.
Cell. Mol. Life Sci. 55, 639-652
- BODE, W. & K. MASKOS (2000):
Structural studies on MMPs and TIMPs.
In: CLARK, I. (Hrsg.): Methods in Molecular Biology 151, Matrix Metalloproteinase Protocols.
Humana, Totowa, NJ, USA 45-77
- BODE, W. & K. MASKOS (2003):
Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases.
Biol. Chem. 384, 863-872
- BORKAKOTI, N. (2000):
Structural studies of matrix metalloproteinases.
J. Mol. Med. 78, 261-268
- BOWMANN, B. H. & A. KUROSUKY (1982):
Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation.
Adv. Hum. Genet. 12, 189-261
- BUCKWALTER, J. A. (1995):
Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse and abuse: experimental studies.
J. Rheumatol., Supplement 43, 13-15

- BUCKWALTER, J. A. (1996):
Regenerating articular cartilage: why the sudden interest?
Orthop. Today 16, 4-5
- BUCKWALTER, J. A. & H. J. MANKIN (1997):
Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions.
J. Bone Joint Surg. Am. 79, 600-611
- BUCKWALTER, J. A. & H. J. MANKIN (1998):
Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions.
Instr. Course. Lect. 47, 477-488
- BUTLER, G. S., H. WILL, S. J. ATKINSON & G. MURPHY (1997):
Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases.
Eur. J. Biochem. 244, 653-657
- BUTLER, G. S., M. J. BUTLER, S. J. ATKINSON, H. WILL, T. TAMURA, S. S. VAN WESTRUM, T. CRABBE, J. CLEMENTS, M. P. D'ORTHO & G. MURPHY (1998):
The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A: a kinetic study.
J. Biol. Chem. 173, 871-880
- CAPLAN, A. I. & B. D. BOYAN (1994):
Endochondral bone formation: the lineage cascade.
In: HALL, B. K. (Hrsg.): Bone.
CRC Press, Boca Raton FL, USA, 1-46
- CARLSON, C. S., D. J. MEUTEN & D. C. RICHARDSON (1991):
Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis.
J. Orthop. Res. 9, 317-329, 1991
- CARLSON, C. S., L. D. CULLINS & D. J. MEUTEN (1995):
Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply.
Vet. Pathol. 32, 641-647
- CARMELIET, P., L. MOONS, R. LIJNEN, M. BAES, V. LEMAITRE, P. TIPPING, A. DREW, Y. EECKHOUT, S. SHAPIRO, F. LUPU & D. COLLEN (1997):
Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation.
Nat. Genet. 17, 439-444
- CASTELL, J. V., M. J. GÓMEZ-LECHÓN, M. DAVID, T. ANDUS, T. GEIGER, R. TRULLENQUE, R. FABRA & P. C. HEINRICH (1989):
Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult hepatocytes.
FEBS Lett. 242, 237-239

- CAWSTON, T. E. & E. MERCER (1986):
Preferential binding of collagenase to α_2 -macroglobulin in the presence of tissue inhibitor of metalloproteinases.
FEBS Lett. 209, 9-12
- CAWSTON, T. E (1996):
Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown.
Pharmacol. Ther. 70, 163-182
- CLEGG, P. D., & S. D. CARTER (1999):
Matrix metalloproteinase-2 and -9 are activated in joint diseases.
Equine Vet. J. 31, 324-330
- CORCORAN, M. L., R. E. HEWITT, D. E. KLEINER & W. G. STETLER-STEVENSON (1996):
MMP-2: expression, activation and inhibition.
Enzyme Protein 49, 7-19
- CREEMERS, E. E., J. P. CLEUTJENS, J. F. SMITS & M. J. DAEMEN (2001):
Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction – a new approach to prevent heart failure?
Circ. Res. 89, 201-210
- DE KLEIJN, D. P. V., M. B. SMEETS, P. P. C. W. KEMMEREN, S. K. LIM, B. J. VAN MIDDELAAR, E. VELEMA, A. SCHONEVELD, G. PASTERKAMP & C. BORST (2002):
Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring.
FASEB J. 16, 1123-1125
- DEAN, D. (1991):
Proteinase-mediated cartilage degradation in osteoarthritic.
Semin. Arthritis Rheum. 20, 2-11
- DELANGHE, J. J., M. R. LANGLOIS, J. OUYANG, G. CLAEYS, M. DE BUYZERE & B. WUYTS (1998):
Effect of haptoglobin phenotype on the growth on *Streptococcus pyogenes*.
Clin. Chem. Lab. Med. 36, 691-696
- DELANY, A. M., J. J. JEFFREY, S. RYDZIEL & E. CANALIS (1995):
Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms.
J. Biol. Chem. 270, 26607–26612
- DEWEY, C. (1999):
Diseases of the nervous and locomotor systems.
In: STRAW, B. S. D'ALLAIRE, W. MENGELING & D. TAYLOR (Hrsg.): Diseases of swine.
8. Auflage, Blackwell Science, Oxford, GB, 861-883

- DIJKGRAAF, L. C., L. G. DE BONT, G. BOERING & R. S. LIEM (1995):
Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature.
J. Oral. Maxillofac. Surg. 53, 924-929
- DOBRYSZYCKA, W. (1997):
Biological functions of haptoglobin - new pieces to an old puzzle.
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 35, 647-654
- DRENCKHAHN, D. (1994):
Allgemeine Gelenklehre, Arthrologie.
In: BENNINGHOFF, A. (Hrsg.): *Anatomie Bd. 1*,
15. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Deutschland 215-228
- DRÖGE, W. (2002):
Free radicals in the physiological control of cell function.
Physiol. Rev. 82, 47-95
- DUERR, S., S. STREMMER, S. SOEDER, B. BAU & T. AIGNER (2004):
MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is
increased in osteoarthritic cartilage.
Clin. Exp. Rheumatol. 22, 603-608
- DUNCAN, M. E., J. P. RICHARDSON, G. I. MURRAY, W. T. MELVIN & J. E.
FOTHERGILL (1998):
Human matrix metalloproteinase-9: activation by limited trypsin treatment and generation of
monoclonal antibodies specific for the activated form.
Eur. J. Biochem. 258, 37-43
- EATON, J. W., P. BRANDT & J. R. MAHONEY (1982):
Haptoglobin: a natural bacteriostat.
Science 215, 691-693
- ECKERSALL, P. D. (1995):
Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions.
Comp. Haematol. Int. 5, 93-97
- ECKERSALL, P. D., P. K. SAINI & C. MCCOMB (1996):
The acute phase response of acid soluble glycoprotein, α -I-acid glycoprotein, ceruloplasmin,
haptoglobin and C-reactive protein in the pig.
Vet. Immunol. Immunopathol. 51, 377-385
- EKMAN, S., H. RODRIGUEZ-MARTINEZ, L. PLOEN (1990):
Morphology of normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage. A study in
the domestic pig and minipig of wild hog ancestry.
Acta. Anat. 139, 239-253,

- EKMANN, S., C. S. CARLSON (1998):
The pathophysiology of osteochondrosis.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 28,17-32
- ENGLISH, W. R., X. S. PUENTE, J. M. FREIJE, V. KNÄUPER, A. AMOUR, A. MERRYWEATHER, C. LOPEZ-OTIN & G. MURPHY (2000):
Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP 17): has tumor necrosis factor- α convertase activity but does not activate pro-MMP-2.
J. Biol. Chem. 275, 14046-14055
- EYRE, D. R., S. APON, J.-J. WU, L.H. ERICSON & K. WALSH (1987):
Collagen IX: evidence for covalent linkage to type II collagen in cartilage.
FEBS Lett. 220, 337-341
- EYRE, D. R. (1991):
The collagens of articular cartilage.
Semin. Arthritis Rheum. 21, 2
- EYRE, D. R. (2002):
Articular cartilage and change in arthritis: collagen of articular cartilage.
Arthritis. Res. 4, 30-35
- FAGOONEE, S., J. GBUREK, E. HIRSCH, S. MARRO, S. K. MOESTRUP, J. M. LAURBERG, E. I. CHRISTENSEN, L. SILENGO, F. ALTRUDA & E. TOLOSANO (2005):
Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading.
Am. J. Pathol. 166, 973-983
- FARNUM, C. E., N. J. WILSMAN & H. D. HILLEY (1984):
An ultrastructural analysis of osteochondritic growth plate cartilage in growing swine.
Vet. Pathol. 21, 141-151
- FASSBENDER, H. G. (1975):
Pathologie rheumatischer Erkrankungen.
1. Auflage, Springer, Berlin, Deutschland 295-318
- FERNANDES, J. C., J. MARTEL-PELLETIER & J. P. PELLETIER (2002):
The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.
Biorheology. 39, 237-246
- FERNANDEZ-CATALAN, C., W. BODE, R. HUBER, D. TURK, J. J. CALVETE, A. LICHTHE, H. TSCHESCHE & K. MASKOS (1998):
Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor.
EMBO J. 17, 5238-5248

- FISCHER, A. E., T. A. CARPETER, J. A. TYLER & L. D. HALL (1995):
Visualization of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging.
Mag. Reson. Imaging 13, 819-826
- FISCHER, D.-C., B. SIEBERTZ, E. VAN DE LEUR, K.-H. SCHIWY BOCHAT, L. GRAEVE, P.-C. HEINRICH & H.-D. HAUBECK (1999):
Induction of α_1 -antitrypsin synthesis in human articular chondrocytes by interleukin-6-type cytokines.
Arthritis Rheum. 42, 1936-1945
- FOSANG, A. J., P. J NEAME, K. LAST, T. E. HARDINGHAM, G. MURPHY & J. A. HAMILTON (1992):
The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B.
J. Biol. Chem. 267, 19470-19474
- FRASER, I. H. & D. B. SMITH (1970):
Studies on porcine haptoglobin and its complex with human hemoglobin.
Can. J. Biochem. 49, 141-147
- FRIDMAN, R., T. M. PENA & S. MOBASHERY (1995):
Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP2).
Cancer Res. 55, 2548-2555
- FRIEDRICH, W. E., A. L. NAVARIJO-ASHBAUGH, B. H. BOWMAN & F. YANG (1995):
Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 209, 250-256
- GABAY, C., M. F. SMITH, JR., D. EIDLEN & P. AREND (1997):
Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) is an acute-phase protein.
J. Clin. Invest. 99, 2930-2940
- GELSE, K., E. PÖSCHEL & T. AIGNER (2003):
Collagens-structure, function and biosynthesis.
Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 1531-1546
- GEPSTEIN, A., S. SHAPIRO, G. ARBEL, N. LAHAT & E. LIVNE (2002):
Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging.
Arthritis Rheum. 46, 3240-3250
- GOEDEGEBUURE, S. A., H. J. HANI, P. C. VAN DER VALK & P. G. VAN DER WAL (1980):
Osteochondrosis in six breeds of slaughter pigs. I. A morphological investigation of the status of osteochondrosis in relation to breed and level of feeding.
Tijdschr. Diergeneesk. 105, 28-41

- GOLDENBERG, D. L., M. S. EGAN & A. S. COHEN (1982):
Inflammatory synovitis in degenerative joint disease.
J. Rheumatol. 9, 204-209
- GRAY, M. L., A. M. PIZZANELLI, A. J. GRODZINSKY & R. C. LEE (1988):
Mechanical and physiochemical determinants of chondrocyte biosynthetic response.
J. Orthop. Res. 6, 777-792
- GRONDALEN, T. (1974a):
Osteochondrosis and arthrosis in pigs. I Incidence in animals up to 120kg live weight.
Acta. Vet. Scand. 15, 1-25
- GRONDALEN, T. (1974b):
Osteochondrosis and arthrosis in pigs. II Incidence in breeding animals
Acta. Vet. Scand. 15, 26-42
- GRUBER, J., T. L. VINCENT, M. HERMANSON, M. BOLTON, R. WAIT & J. SAKLATVALA (2004):
Induction of interleukin-1 in articular cartilage by explantation and cutting.
Arthritis Rheum. 50, 2539-2546
- HALL, W. F., T. E. EURELL, R. D. HANSEN & G. HERR (1992):
Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with
Actinobacillus pleuropneumoniae.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 1730-1733
- HARDINGHAM, T. & M. BAYLISS (1990):
Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease.
Semin. Arthritis Rheum. 20, 12-33
- HEINONEN, M. J. ORAVAINEN, T. ORRO, L. SEPPÄ-LASSILAL, E. ALA-KURIKKA,
J. VIROLAINEN, A. TAST & O. A. PELTONIEMI (2006):
Lameness and fertility of sows and gilts in randomly selected loose-housed herds in Finland.
Vet. Rec. 159, 383-387
- HEINONEN, M., S. HAKALA, P. HÄMEENOJA, A. MURRO, T. KOKKONEN, K.
LEVONEN & O. A. T. PELTONIEMI (2007):
Case-control study of factors associated with arthritis detected at slaughter in pigs from 49
farms.
Vet. Rec. 160, 573-578
- HEMBRY, R. M., J. DYCE, I. DRIESANG, E. B. HUNZIKER, A. J. FOSANG, J. A.
TYLER & G. MURPHY (2001):
Immunolocalization of matrix metalloproteinases in partial-thickness defects in pig articular
cartilage.
J. Bone Joint Surg. 83-A, 826-838

- HERMAN, J. H., W. G. SOWDER & E. V. HESS (1991):
NSAID induction of interleukin 1/ catabolin inhibitor production by osteoarthritic synovial tissue.
J. Rheumatol. 18, 124-126
- HILL, M. A., G. R. RUTH, H. D. HILLEY & C. HANSGEN (1984):
Dyschondroplasias, including osteochondrosis, between 25 and 169 days of age: histological changes.
Am. J. Vet. Res. 45, 903-916
- HILL, M. A., G. R. RUTH, H. D. HILLEY, J. L. TORRISON, J. K. BAGENT & A. D. LEMAN (1985):
Dyschondroplasias of growth cartilages (osteochondrosis) in crossbred commercial pigs at one and 15 days of age: radiological, angiomicrographical and histological findings.
Vet. Rec. 116, 40-47
- HILL, M. A. (1990):
Economic relevance, diagnosis, and countermeasure for degenerative joint disease (osteoarthrosis) and dyschondroplasia (osteochondritis) in pigs.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 254-259
- HISS, S., S. KNURA-DESZCKA, G. REGULA, M. HENNIES, S. GYMNICH, B. PETERSEN & H. SAUERWEIN (2003):
Development of an enzyme immuno assay for the determination of porcine haptoglobin in various body fluids: testing the significance of meat juice measurements for quality monitoring programs.
Vet. Immunol. Immunopathol. 96, 73-82
- HOOIVELD, M. J., G. ROOSEDAAL, M. WENTING, H. M. VAN DEN BERG, J. W. BIJLSMA & F. P. LAFEBER (2003a):
Short-term exposure of cartilage to blood results in chondrocytes apoptosis.
Am. J. Pathol. 162, 943-951
- HOOIVELD, M. J., G. ROOSEDAAL, M. VIANEN, H. M. VAN DEN BERG, J. W. BIJLSMA & F. P. LAFEBER (2003b):
Blood-induced joint damage: longterm effects *in vitro* and *in vivo*.
J. Rheumatol. 30, 339-344
- HOOIVELD, M. J., G. ROOSEDAAL, H. M. VAN DEN BERG, J. W. BIJLSMA & F. P. LAFEBER (2003c):
Haemoglobin-derived iron-dependent hydroxyl radical formation in blood induced joint damage: an *in vitro* study.
Rheumatology 42, 784-790
- IMAI, K., Y. YOKOHAMA, I. NAKANISHI, E. OHUCHI, Y. FUJII, N. NAKAI & Y. OKADA (1995):
Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells.
J. Biol. Chem. 270, 6691-6697

- IMAI, K., S. OHTA, T. MATSUMOTO, N. FUJIMOTO, H. SATO, M. SEIKI & Y. OKADA (1997):
Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage.
Am. J. Pathol. 151, 245-256
- JANSEN, N. W. D., G. ROOSENDAAL, J. W. J. BIJLSMA, J. DEGROOT & F. P. LAFEBER (2007):
Exposure of human cartilage tissue to low concentrations of blood for a short period of time leads to prolonged cartilage damage.
Arthritis Rheum. 56, 199-207
- JONES, V., P. C. R. TAYLOR, R. K. JACOBY & T. B. WALLINGTON (1984):
Synovial synthesis of rheumatoid factors and immune complex constituents in early arthritis
Ann. Rheum. Dis. 43, 235-239
- JORGENSEN, B., J. ARNBJERG & M. AASLYNG (1995):
Pathological and radiological investigations on osteochondrosis in pigs, associated with weakness.
Zentralbl. Veterinarmed. 42, 489-504
- JORGENSEN, B. & S. ANDERSON (2000):
Genetic parameters for osteochondrosis in Danish Landrace and Yorkshire boars and correlation with leg weakness and production traits.
Anim. Sci. 71, 427-434
- KADARMIDEEN, H. N., D. SCHWOERER, H. ILAHI, M. MALEK & A. HOFER (2004):
Genetics of osteochondral disease and its relationship with meat quality and quantity, growth, and feed conversion traits in pigs.
J. Anim. Sci. 82, 3118-3127
- KANNO, H. & N. KATHO (2001):
Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and 2-dimensional electrophoresis of haptoglobin in the high-density lipoprotein fraction in cows.
J. Vet. Med. Sci. 63:61-66.
- KRISTIANSEN, M., J. H. GRAVERSEN, C. JACOBSEN, O. SONNE, H. J. HOFFMANN, S. K. A. LAW & S. K. MOESTRUP (2001):
Identification of the haemoglobin scavenger receptor.
Nature 409, 198-201
- KUBOTA, E. (2007):
Generation of active-form of matrix metalloproteinases-9 induced by hydroxyl radical: a possible *in vitro* model for oxidative stress-induced degradation of cartilage matrix in the TMJ.
J. Oral Maxillofac. Surg. 65, 40.e3-40.e4.

- KUETTNER, K. E. (1992):
Biochemistry of articular cartilage in health and disease.
Clin. Biochem. 25, 155-163
- LAEMMLI, U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685
- LEFEBVRE, V. & P. SMITS (2005):
Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation.
Birth Defect Res. C. Embryo Today 75, 200-212
- LIANO, E., A. M. FREIJE, A. NAKANO, V. KNÄUPER, G. MURPHY & C. LOPEZ-OTIN (1999):
Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase A overexpressed in brain tumors.
Cancer Res. 59, 2570 – 2576
- LIJNEN, H. R. (2002):
Matrix Metalloproteinases and Cellular Fibrinolytic Activity.
Biochemistry 67, 92-98
- LIM, S.-K., B. FERRARO, K. MOORE & B. HALLIWELL (2001):
Role of haptoglobin in free hemoglobin metabolism.
Redox Report 6, 219-227
- LÖFFLER, G. (1990):
Kohlenhydrate.
In: LÖFFLER, G. & P. E. PETRIDES (Hrsg.): *Physiologische Chemie*,
4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Deutschland 39-54
- LOHMANDER, S. (1988):
Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease.
Baillieres. Clin. Rheumatol. 2, 37-62
- LUNDEHEIM, N. (1987):
Genetic analysis of osteochondrosis and leg weakness in the Swedish pig progeny testing scheme.
Acta. Agric. Scand. 37, 159-173
- MADLENER, M., W. C. PARKS & S. WERNER (1998):
Matrix metalloproteinases (MMPs): and their physiological inhibitors (TIMPs): are differentially expressed during excisional skin wound repair.
Exp. Cell Res. 242, 201-210

- MARTEL-PELLETIER, J., J. M. CLOUTER & J. P. PELLETIER (1986):
Neutral proteases in human osteoarthritic synovium.
Arthritis Rheum. 29, 1112-1121
- MARTIN, P. (1997):
Wound healing-aiming for perfect skin regeneration.
Science 276, 75-81
- MARTINEK, V. (2003):
Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels.
Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 6, 166-170
- MASSOVA, I., L. P. KOTRA, R. FRIDMAN & S. MOABASHERY (1998):
Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.
FASEB J. 12, 1075-1095
- MILNER, J. M., A. D. ROWAN, T. E. CAWSTON & D. A. YOUNG (2006):
Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage reveals pro-collagenase activation as a critical step for collagenolysis.
Arthritis Res. Ther. 8, R142
- MOHATI, M., R. L. SMITH, D. J. SCHUMAN, Y. TSUJI, F. M. TORTI, N. I. HUTCHINSON, W. G. STETLER-STEVENSON & G. I. GOLDBERG (1993):
Expression of 92-kd type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1.
J. Clin. Invest. 92, 179-185
- MOILANEN, M., T. SORSA, M. STENMAN, P. NYBERG, O. LINDY, J. VESTERINEN, A. PAJU, Y. T. KONTTINEN, U. H. STENMAN & T. SALO (2003):
Tumor-associated trypsinogen-2 (trypsinogen-2) activates procollagenases (MMP-1, -8, -13) and stromelysin-1 (MMP-3) and degrades type I collagen.
Biochemistry 42, 5414-5420
- MOW, V. C., M. H. HOLMES & W. M. LAI (1984):
Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review.
J. Biochem. 17, 377-394
- MURPHY, G., R. M. HEMBRY, C. E. HUGHES, A. J. FOSSANG & T. E. HARDINGHAM (1990):
Role and regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover.
Biochem. Soc. Trans. 18, 812-815
- NAGASE, H. (1996):
Matrix Metalloproteinases.
In: HOOPER N. M. (Hrsg.): *Zinc Metalloproteinases in Health and Disease*.
Taylor & Francis, London, GB, 153-204

NAGASE, H. & J. F. WOESSNER (1999):

Matrix Metalloproteinases.

J. Biol. Chem. 274, 21491-21494

NAKANO, T., F. X. AHERNE, J. J. BRENNAN & J. R. THOMPSON (1984):

Effect of growth rate on the incidence of osteochondrosis in growing swine.

Can. J. Anim. Sci. 64, 139-146

NAKANO, T., J. J. BRENNAN & F. X. AHERNE (1987):

Leg weakness and osteochondrosis in swine: a review.

Can. J. Anim. Sci. 67, 883-901

NAKANO, T. & F. X. AHERNE (1988):

Involvement of trauma in the pathogenesis of osteochondritis dissecans in swine.

Can. J. Vet. Res. 52, 154-155

NICKEL, R., A. SCHUMMER & E. SEIFERLE (1992):

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.

6. Auflage, Paul Parey, Berlin, Deutschland 215-220

OGATA, Y., J. J. ENGHILD & H. NAGASE (1992):

Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9.

J. Biol. Chem. 267, 3581-3584

OKADA, Y., E. D. HARRIS & H. NAGASE (1988):

The precursor of a metalloendopeptidase from human rheumatoid synovial fibroblasts.

Purification and mechanisms of activation by endopeptidases and 4-aminophenylmercuric acetate.

Biochem. J. 254, 731-741

OLEKSYSZYN, J. & A. J. AUGUSTINE (1996):

Plasminogen modulation of IL-1-stimulated degradation in bovine and human articular cartilage explants. The role of the endogenous inhibitors: PAI-1, alpha 2-antiplasmin, alpha 1-PI, alpha 2-macroglobulin and TIMP.

Inflamm. Res. 45, 464-472

PARK, A. J., L. M. MATRISIAN, A. F. KELLS, R. PEARSON, Z. YUAN & M. NAVRE (1991):

Mutational analysis of the transin (rat stromelysin) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the "cystine switch".

J. Biol. Chem. 266, 1584-1590

PATTERSON, M. L., S. J. ATKINSON, V. KNÄUPER & G. MURPHY (2001):

Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain

FEBS Lett. 503, 158-162

- PEI, D. (1999):
Identification and characterisation of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP.
J. Biol. Chem. 274, 8925-8932
- PEJOVIC, M., A. STANKOVIC & D. R. MITROVIC (1995):
Determination of the apparent synovial permeability in the knee joint of patients suffering from osteoarthritis and rheumatoid arthritis.
Br. J. Rheumatol. 34, 520-524
- PERMANN, V. & G. E. CORNELIUS (1980):
Synovial fluid.
In: KANEKO, J. J. (Hrsg.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*
3. Auflage, Academic Press, Orlando 749-783
- PERRIN, W. R., F. X. AHERNE, J. P. BOWLAND & R. T. HARDIN (1978):
Effects of age, breed and floor type on the incidence of articular cartilage lesions in pigs.
Can. J. Anim. Sci. 58, 129-138
- PETERS, D. G., A. KASSAM, P. L. S. JEAN, H. YONAS & R. E. FERREL (1999):
Functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm.
Stroke 30, 2612-2616
- PETERSEN, H. H., J. P. NIELSEN & P. M. H. HEEGAARD (2004):
Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry.
Vet. Res. 35, 163-187
- PRICE, S. J., D. R. GREAVES & H. WATKINS (2001):
Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene.
J. Biol. Chem. 276, 7549-7558
- RATNIKOV, B., E. DERYUGINA, J. LENG, G. MARCHNKO, D. DEMBROW & A. STRONGIN (2000):
Determination of matrix metalloproteinase activity using biotinylated gelatin.
Anal. Biochem. 286, 149-155
- REILAND, S. (1978):
Pathology of so-called leg weakness in the pig.
Acta Radiol. Suppl. 358, 23-44
- REILAND, S., N. ORDELL, N. LUNDEHEIM & S.-E. OLSSON (1978):
Heredity of osteochondrosis, body constitution and leg weakness in the pig.
Acta. Radiol. Suppl. 358, 123-137

- ROMEIS, B., (1998):
Mikroskopische Technik.
Urban & Schwarzenberg, Munich, Germany
- ROUGHLEY, P. J. & E. R. LEE (1994):
Cartilage proteoglycans: structure and potential functions.
Microsc. Res. Tech. 28, 385-397
- SCHMIDT, M., C. WEIDLER, H. NAUMANN, S. ANDERSEN. J. SCHÖLMERICH & R. H. STRAUB (2005):
Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes-androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens.
Arthritis. Res. Ther. 7, R938-R948
- SCHURIGT, U., N. STOPFEL, M. HÜCKEL, C. PFIRSCHKE, B. WIEDERANDERS & R. BRÄUER (2005):
Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis.
Arthritis Res. Ther. 7, R174-R188
- SICZKOWSKI, M. & F. M. WATT (1990):
Subpopulations of chondrocytes from different zones of pig articular cartilage.
Isolation, growth and proteoglycan synthesis in culture.
J. Cell Sci. 97, 349-360
- SIPE, D., J. MARTEL-PELLETIER, I. G. OTTERNESS & J.-P. PELLETIER (1994):
Cytokine reduction in treatment of joint conditions.
Mediators Inflammation 3, 243-256
- SIPE, J. D. (1995):
Acute-phase proteins in osteoarthritis.
Semin. Arthritis Rheum. 25, 75-86
- SMEETS, M. B. J. FONTIJN, A. KAVELAARS, G. PASTERKAMP & D. P. V DE KLEIJN (2003):
The acute phase protein haptoglobin is locally expressed in arthritic and oncological tissue.
Int. J. Exp. Path. 84, 69-74
- SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M. & J. W. VON DEN HOFF (2005):
Zymographic technique for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors.
Bio. Techniques 38, 73-83
- SÖDER, S., H. I., ROACH, S. OEHLER, B. BAU, J. HAAG & T. AIGNER (2006):
MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage.
Clin. Exp. Rheumatol. 24, 302-304

- STEFFENSEN, B., U. M. WALLON & C. M. OVERALL (1995):
Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen.
J. Biol. Chem. 270, 11555–11566
- STEVENSEN, A. L., J. S. WISHNOK, D. H. CHAI, A. J. GRODZINSKY & S. R. TANNENBAUM (2008):
A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis-liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of bovine cartilage tissue response to mechanical compression injury and the inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta.
Arthritis Rheum. 58, 489-500
- STRONGIN, A. Y., I. COLLIER, G. BANNIKOV, B. L. MARMER, G. A. GRANT & G. I. GOLDBERG (1995):
Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase: isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.
J. Biol. Chem. 270, 5331-5338
- SUZUKI, K., J. J. ENGHILD, T. MORODOMI, G. SALVESEN & H. NAGASE (1990):
Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin).
Biochemistry 28, 10261-10270
- TAJIMA, T., E. YOSHIDA, A. YAMASHITA, S. OHMURA, Y. TOMITAKA, M. SUGIKI, Y. ASADA, AND M. MARUYAMA (2005):
Hemoglobin stimulates the expression of matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9 by synovial cells: a possible cause of joint damage after intra-articular hemorrhage.
J. Orthop. Res. 23, 891-898
- TAKINO, T., H. SATO & M. SEIKI (1995):
Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP-2): gene from a human placenta cDNA library: MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family.
J. Biol. Chem. 270, 23013-23020
- THIELEN, M. A., M. MIELENZ, S. HISS, H. ZERBE, W. PETZL, H-J. SCHUBERTH, H-M. SEYFERT & H. SAUERWEIN (2007):
Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland.
J. Dairy Sci. 90, 1215-1219.
- THOMPSON, D., A. MILFORD-WARD & J. T. WHICHER (1992):
The value of acute phase proteins measurements in clinical practice.
Ann. Clin. Biochem. 29, 123-131

TURITTO, V. & S. M. SLACK (1998):

Blood and related fluids.

In: BLACK, J. & G. HASTINGS (Hrsg.): Handbook of biomaterial properties.

Chapman & Hall, London, UK, 115

VAN DEN BERG, W. B. (1999):

The roles of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

Z. Rheumatol. 58, 136-141

VAN DEN LOO, F. A. J., S. KUIPER, F. H. J. VAN ENCKEVORT, O. J. ARNTZ & W. B. VAN DEN BERG (1997):

IL-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in IL-6 deficient mice.

Am. J. Pathol. 151, 177-191

VAN WART, H. E. & H. BIRKEDAL-HANSEN (1990):

The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5578-5582

VINCENTI, M. P. (2001):

The matrix metalloproteinases (MMP): and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP) genes.

In: CLARK, I. (Hrsg.): Methods in Molecular Biology 151, Matrix Metalloproteinase Protocols.

Humana, Totowa, NJ, USA, 121-148

VISSE, R. & H. NAGASE (2003):

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.

Circ. Res. 92, 827-839

WANG, Z., R. JUTTERMANN & P. D. SOLOWAY (2000):

TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*.

J. Biol. Chem. 275, 26411-26415

WARDALE, R. J. & V. C. DUANCE (1993):

Quantification and immunolocalisation of porcine articular and growth plate cartilage collagens.

J. Cell Sci. 105, 975-984

WARDALE, R. J. & V. C. DUANCE (1994):

Characterization of articular and growth plate cartilage collagens in porcine osteochondrosis.

J. Cell Sci. 107, 47-59

- WILLUMSEN, L. & J. FRIIS (1975):
A comparative study of the protein pattern in serum and synovial fluid.
Scand. J. Rheumatology 4, 234-240
- WILSON, R., D. BELLUOCIO, C. B. LITTLE, A. J. FOSSANG & J. F. BATEMAN (2008):
Proteomic characterization of mouse cartilage degradation *in vitro*.
Arthritis Rheum. 58, 3120-3131
- WOESSNER, J. F., JR (1991):
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.
FASEB J. 5, 2145- 2154
- WOESSNER, J.F., JR. (1995):
Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples.
Methods Enzymol. 248, 510-528
- WONG, M., P. WUETHRICH, P. EGGLI & E. HUNZIKER (1996):
Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography.
J. Orthop. Res. 14, 424-432
- WOODARD, J. C., H. N BECKER & P. W. POULES J. R. (1987):
Effect of diet on longitudinal bone growth and osteochondrosis in swine.
Vet. Pathol. 24, 109-117
- WOTTON, S. F., V. C. DUANCE & P. R. FRYER (1988):
Type IX collagen: a possible function in articular cartilage.
FEBS Lett. 234, 79-82
- YAMAGIWA, H. G. SAKAR, M. C. CHARLESWORTH, D. J. MCCORMICK & M. E. BOWLANDER (2003):
Two-dimensional gel electrophoresis of synovial fluid: method for detecting candidate protein markers for osteoarthritis.
J. Orthop. Sci. 8, 482-490
- YANG, F., D. J. HAILE, F. G. BEREGR, D. C. HERBERT, E. VAN BEVEREN & A. J. GHIO (2002):
Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood.
Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 284, 402-409
- YTREHUS, B., H. HAGA, C. MELLUM, L. MATHISEN, C. S. CARLSON, S. EKMAN, J. TEIGE & F. P. REINHOLT (2004):
Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis.
J. Orthop. Res. 22,1201-1209

YTREHUS, B., C. S. CARLSON & S. EKMAN (2007):

Etiology and pathogenesis of osteochondrosis.

Vet. Pathol. 44, 429-448

ZAMBONI, P., G. SCAPOLI, V. LANZARA, M. IZZO, P. FORTINI, A. LEGNARO, A. PALAZZO, S. TOGNAZZO & D. GEMMATI (2005):

Serum iron and matrix metalloproteinase-9 variations in limbs affected by chronic venous disease and venous leg ulcers.

Dermatol. Surg. 31, 644-649

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung in allen Phasen meiner Promotion. Herrn Prof. Dr. Karl Schellander danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. Stephanie Hiss danke ich für die jederzeit gewährte Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Fragen und für die gute und intensive Betreuung.

Dem gesamten Laborteam des Institutes sei gedankt, namentlich Frau Birgit Mielenz für ihren Rat bei der Laborarbeit. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Karin Strack für die geduldvolle Unterstützung bei der Entwicklung der Analysemethoden sowie der Messung der Proben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden, so wie allen weiteren Mitarbeitern für die nette Arbeitsatmosphäre und Hilfe bei allen auftretenden kleineren und größeren Problemen.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mir auch während der Promotion stets eine sehr wichtige Stütze gewesen sind.

Bedanken möchte ich mich auch bei Ulrich Möllmann, Bettina Kesse und meinen Schwestern Geva und Birgit, die mir durch ihr Korrekturlesen eine große Hilfe waren.