

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**Entstehung von Chondrozytenclustern bei Gonarthrose -
eine explorative Analyse in Bezug auf onkogene Prozesse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Wolfgang, Julius Michael
2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. K. Hofmann

2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Ehnert

Tag der Disputation: 10.06.2024

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Einleitung	4
2.1	Gelenke	4
2.1.1	Diarthrosen.....	4
2.1.2	Kniegelenk.....	5
2.1.3	Gelenkknorpel	6
2.2	Arthrose.....	10
2.2.1	Epidemiologie	10
2.2.2	Risikofaktoren.....	10
2.2.3	Pathophysiologie	11
2.2.3.1	Veränderungen auf zellulärer Ebene	13
2.2.3.2	Veränderungen auf molekularer Ebene	14
2.2.4	Diagnostik.....	27
2.2.5	Therapie	28
2.3	Onkoprozesse	29
2.3.1	Hallmarks of Cancer	30
2.3.2	Chondrosarkom	32
2.3.3	Immuncheckpoints.....	33
2.4	Zielsetzung der Arbeit.....	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Material.....	35
3.1.1	Farbstoffe	35
3.1.2	Multiplex Assay Kits.....	35
3.1.3	Zelllinien	39
3.1.4	Lösungen und Puffer	39
3.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	40
3.1.6	Geräte	41
3.1.7	Software	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	Auswahl und Herkunft der Patientenproben.....	43
3.2.2	Vorbereitung der Proben für Proteinextraktion	43
3.2.3	Proteinextraktion.....	45

3.2.4	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit Bradford-Test.....	47
3.2.5	Proteinnachweis mit Multiplex Assay	49
3.2.5.1	Messprinzip	49
3.2.5.2	Quantitativer Proteinnachweis mit Multiplex Assay	51
3.2.5.3	Semiquantitativer Proteinnachweis mit Multiplex Assay.....	55
3.2.6	Zellkultur.....	58
3.2.7	Statistische Auswertung	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Patienten	61
4.2	Proliferation/Apoptose	62
4.3	Inflammation	66
4.4	Zelldifferenzierung	67
4.5	Knochenumbau	70
4.6	Angiogenese.....	72
4.7	Immuncheckpoints.....	74
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
5	Diskussion.....	80
5.1	Zusammenfassung der Studie	80
5.2	Fragestellung.....	80
5.3	Detaillierte Aufschlüsselung der Ergebnisse mit Blick auf Onkoprozesse	81
5.3.1	Proliferation/Apoptose	81
5.3.2	Inflammation	86
5.3.3	Zelldifferenzierung	88
5.3.4	Knochenumbau	92
5.3.5	Angiogenese.....	94
5.3.6	Immuncheckpoints.....	98
5.4	Zusammenfassung der Diskussionsergebnisse	101
5.5	Abgleich der Diskussionsergebnisse unter spezieller Betrachtung der Hallmarks of Cancer	102
5.6	Limitationen der Studie	106
6	Zusammenfassung.....	108
7	Abkürzungsverzeichnis	109
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	111
9	Literaturverzeichnis	113

10	Erklärung zum Eigenanteil.....	129
11	Danksagung.....	130
12	Lebenslauf	131

2 Einleitung

2.1 Gelenke

Die außergewöhnliche Beweglichkeit der vielen verschiedenen Gelenke des menschlichen Körpers bedingt die besondere Mobilität und Autonomie des Menschen. Einerseits bildet die Vielfalt an Bewegungen die Grundlage für unser Überleben, denn wie auch für alle anderen mehrzelligen Organismen ist die Nahrungsbeschaffung und -aufnahme ohne Bewegungen kaum möglich. Andererseits bietet die enorme Präzision dieser Bewegungen die Möglichkeit so sozialisiert zu leben, wie es bei den Menschen heute der Fall ist. Zum Beispiel erlauben es uns die drei Freiheitsgrade im Daumensattelgelenk eine komplexere Körperhygiene auszuführen und die außergewöhnliche Beweglichkeit unserer Extremitäten befähigt uns dazu, sportliche Aktivitäten zu bestreiten und Geschicklichkeitsaufgaben zu meistern. Es wird also deutlich, weshalb Krankheiten des muskuloskelettalen Systems den Menschen nicht nur in seiner Lebensqualität einschränken, sondern auch seine Fähigkeit zur Selbstversorgung bedrohen.

2.1.1 Diarthrosen

Echte Gelenke (*Diarthrosen*) zeichnen sich dadurch aus, dass die miteinander artikulierenden Gelenkflächen (*Facies articularis*) vollständig voneinander getrennt sind. In dem einige hundert Mikrometer breiten Gelenkspalt (*Spatium articulare*) befindet sich eine visköse Flüssigkeit, auch Synovia, die von der Gelenkschleimhaut (*Membrana synovialis*) gebildet wird. Deshalb spricht man bei Diarthrosen auch von *Articulationes synoviales*. Unechte Gelenke (*Synarthrosen*) bilden hingegen keinen Gelenkspalt aus und sind eine knorpelige Verbindung zwischen Knochen, die nahezu unbeweglich ist. Kennzeichnend für Diarthrosen sind mit hyalinem Knorpel überzogene Gelenkflächen, die häufig unterschiedlich geformt sind. Darüber hinaus werden solche Gelenke von einer Gelenkkapsel (*Capsula articularis*) umgeben, die die Gelenkhöhle (*Cavitas articularis*) vollständig umschließt und oft Gelenktaschen (*Recessus articulares*) zu Zwecken der Bewegungsfreiheit der Gelenke ausbildet. Diese Taschen sind nicht zu verwechseln mit den Schleimbeuteln (*Bursae synoviales*), die gelenknah lokalisiert sind und teilweise auch mit der Gelenkhöhle kommunizieren. Die Gelenkschleimhaut bildet das Innere der Gelenkhöhle und ist für den Umsatz und die Produktion der Gelenkflüssigkeit zuständig. Neben intraartikulären Hilfseinrichtungen wie Gelenkzwischenscheiben (*Disci/Menisci articulares*) und Gelenklippen (*Labra articularia*), welche die kraftaufnehmende Fläche

vergrößern und Inkongruenzen ausgleichen, kommen auch Bandstrukturen (*Ligamenta*) vor, die das Gelenk stabilisieren. Die Bewegung der Diarthrosen wird dabei von über das Gelenk ziehenden Muskeln gesteuert. [1, 2]

2.1.2 Kniegelenk

Das Kniegelenk (*Articulatio genus*) (Abb. 1) ist das größte Gelenk im menschlichen Körper. Dort artikulieren drei Knochen miteinander, die zwei Gelenke bilden. Zum einen bilden die beiden Kondylen des Femurs zusammen mit dem Tibiaplateau das Femorotibi- algelenk (*Articulatio femorotibialis*), welches als Drehscharniergelenk zu klassifizieren ist (*Trochoginglymus*). Zum anderen ergibt sich das Femoropatellargelenk (*Articulatio femoropatellaris*) aus Femur und Patella, indem die Dorsalseite der Patella Kontakt zur ventralen Fläche des Femurs (*Facies patellaris femoris*) aufnimmt. Beide Gelenke liegen in einer gemeinsamen Gelenkhöhle, die vollständig von der Gelenkkapsel umschlossen wird. Oberhalb der Kniescheibe schließt sich eine geräumige Tasche an die Gelenkhöhle an (*Recessus suprapatellaris*), die als Reservefalte bei der Flexion dient. Seitlich artikuliert in einem eigenständigen Gelenk das proximale Köpfchen der Fibula mit dem lateralen Condylus der Tibia als Tibiofibulargelenk (*Articulatio tibiofibularis*) [1, 2].

Sowohl die Femurkondylen als auch das Tibiaplateau sind mit hyalinem Knorpel überzogen. Für eine schonendere Kraftübertragung und auch zum Ausgleich der inkongruenten Gelenkflächen, befinden sich in der Gelenkhöhle zwei Menisken (*Meniscus medialis*, *Meniscus lateralis*). Diese stellen sich halbmondförmig dar und ragen keilförmig in den Gelenkspalt hinein. Sie sind jeweils mittig am Tibiaplateau verankert [1, 2].

Die Stabilität des Gelenks wird durch zwei Bandsysteme gewährleistet. Für eine Limitation der Extension und Innenrotation im Kniegelenk sorgen die Kreuzbänder (*Ligamentum cruciatum anterius*, *Ligamentum cruciatum posterius*). Das vordere Kreuzband nimmt seinen Ursprung an der medialen Vorderfläche der Tibia und setzt dann an der Innenseite des lateralen Femurkondylus an. Das hintere Kreuzband zieht von der Dorsalfläche der Tibia zur Innenseite des medialen Femurkondylus [3].

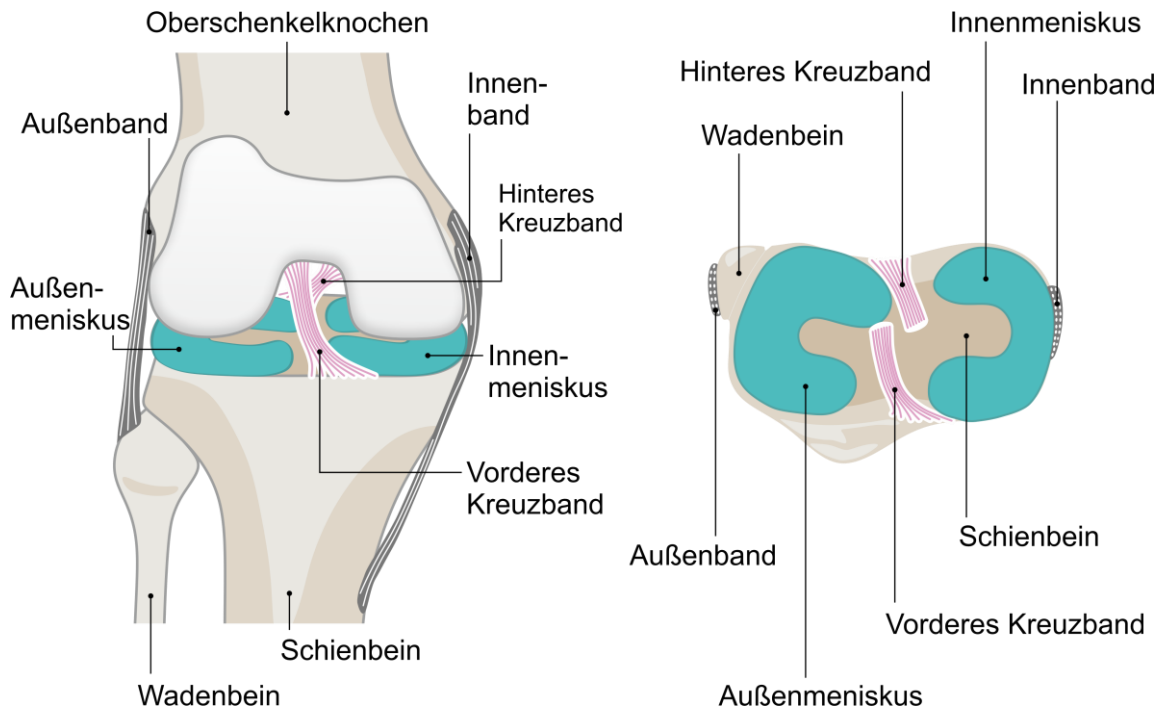


Abb. 1: Das Kniegelenk. Schematische Darstellung der wichtigsten funktionellen Strukturen des rechten Kniegelenkes in der Ansicht von frontal (links) und transversal (rechts) mit Blick auf das Schienbeinplateau. Auf die Darstellung der Kniescheibe wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Die Seitenbänder (*Ligamentum collaterale tibiale*, *Ligamentum collaterale fibulare*) spannen sich jeweils an den Seiten zwischen Femur zur Tibia. Sie stabilisieren das Kniegelenk medial und lateral und verhindern zusammen mit der allgemeinen Kapselspannung eine übermäßige Außenrotation und Aufklappbarkeit nach medial oder lateral. Außerdem sorgen sie für eine sichere Führung während der Flexion und Extension [3].

Unter Berücksichtigung der Weichteilhemmung bei der Flexion ergibt sich ein Bewegungsumfang für das Kniegelenk von 120-150° Flexion, 5-10° Extension, 10° Innenrotation und 30-40° Außenrotation [1].

2.1.3 Gelenkknorpel

Hyaliner Gelenkknorpel ist ein hoch spezialisiertes Gewebe (Abb. 2), das eine spiegelglatte Oberfläche an artikulierenden Knochen bildet und durch Zusatz von Synovialflüssigkeit eine reibungsarme Beweglichkeit und Kraftübertragung in Diarthrosen gewährleistet. Nur durch eine einwandfreie Architektur und Organisation der strukturellen Bestandteile ist der Erhalt dieser besonderen biomechanischen Eigenschaften gesichert [4].

Ein bemerkenswerter Aspekt dieses Knorpels bedingt die sehr limitierte Fähigkeit zur eigenen Regeneration, denn hyaliner Gelenkknorpel ist im Gegensatz zu anderen Knorpelarten nicht von einer äußeren Knorpelhaut (*Perichondrium*) bedeckt. Ohne ein Perichondrium, das neben Nervenendigungen und Blut- und Lymphgefäßen auch mesenchymale Stammzellen beherbergt, ist eine adäquate Gewebereparatur nicht möglich. Zusätzlich verfügt der wenige Millimeter dicke Gelenkknorpel selbst nicht über Gefäße oder Nerven und muss deshalb über die Synovialflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt werden [5, 6].

Das Gewebe imponiert durch einen sehr hohen Anteil an Extrazellulärmatrix, welche hauptsächlich aus Wasser, Kollagenen, Proteoglykanen und geringerem Gehalt an Glykoproteinen und nicht-kollagenen Proteinen besteht. Durch unterschiedliche Ausrichtung der Faseranteile lassen sich vier verschiedene Zonen definieren [7]: Eine oberflächliche Tangentialzone, in der die Faserzüge parallel zur Knorpeloberfläche verlaufen und so Resistenz gegen Scherkräfte vermitteln. Diese Schicht ist auf die obersten 10-20% der Gesamtdicke beschränkt. Eine dicke Mittelzone, in der die Kollagenfaserbündel schräg verlaufen. Eine tiefe Zone, die durch sehr kaliberstarke, senkrecht zur Knorpeloberfläche stehende Faserbündel besteht. Ihre hohe Druckresistenz wird durch den hohen Gehalt an Proteoglykanen und geringen Wassergehalt bedingt. Und zuletzt eine untere Mineralisationszone, die durch mineralisierten Knorpel für eine stabile Verbindung zum Knochen sorgt. Zwischen der tiefen Zone und der Mineralisationszone lässt sich histologisch eine Grenzlinie (Tidemark) darstellen, die den Übergang von nicht mineralisiertem zu mineralisiertem Knorpel kennzeichnet [4, 8].

Der zelluläre Anteil wird durch Chondrozyten repräsentiert und stellt lediglich 1-5% des Gesamtvolumens des Gelenkknorpels dar [9]. Nicht nur Faseranteile unterliegen zonenspezifischen Änderungen, sondern auch die zelluläre Morphologie und Distribution. Während Chondrozyten in oberflächlichen Regionen zahlreich vorkommen und sich klein und flach darstellen, sind die Chondrozyten der mittleren Schichten rundlich. In der tiefen Zone sind Zellen eher spärlich zu finden und hypertroph. Hier ordnen sie sich entlang der senkrecht stehenden Faserbündel säulenförmig an [4]. Chondrozyten, die sich aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln, sind spezialisiert auf die Entwicklung und den Erhalt von Knorpel indem sie die molekularen Bestandteile ihrer unmittelbaren Umgebung produzieren und umsetzen [10]. Stimuli wie Entzündungsfaktoren, Wachstumsfaktoren, hydrostatischer Druck und mechanische Belastung beeinflussen ihre Funktion und Differenzierung [11-14]. Eine Unausgeglichenheit in ihrer Funktion trägt zu degenerativen Erkrankungen wie Arthrose bei.

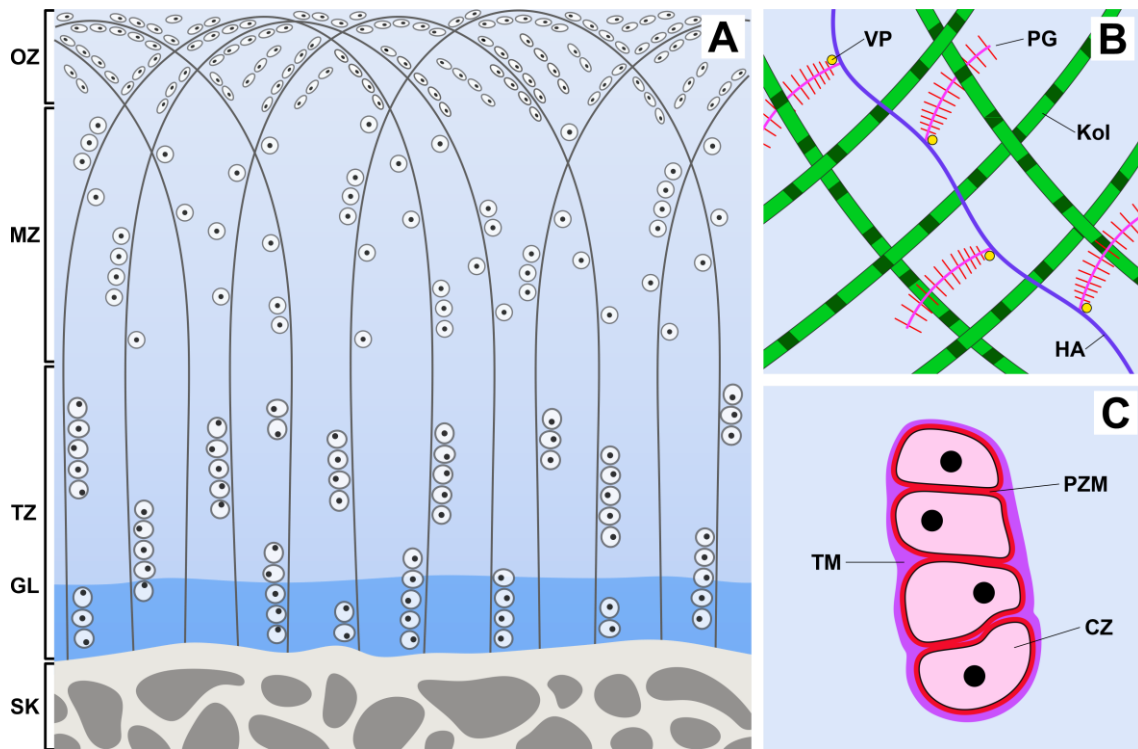


Abb. 2: Schematische Darstellung der Architektur von hyalinem Gelenkknorpel. Zonale Gliederung (A): oberflächliche Zone (OZ), Mittelzone (MZ), tiefe Zone (TZ), Grenzlinie (GL), subchondraler Knochen (SK). Zwischen Grenzlinie und subchondralem Knochen befindet sich die Zone des mineralisierten Knorpels. Extrazellulärmatrix des hyalinen Gelenkknorpels (B). Proteoglykane (PG) sind über Verbindungsproteine (VP) mit Hyaluronan (HA) verbunden und bilden zusammen mit Kollagenfasern (Kol) ein dichtes Maschwerk. Chondrozyteneinheit (C). Chondrozyten (CZ) umgeben von perizellulärer Matrix (PZM, rot) und territorialer Matrix (TM, lila).

Die direkte Umgebung eines Chondrozyten wird als perizelluläre Matrix beschrieben. Sie liegt jeder Zelle nah an, ist sehr kompakt und unterscheidet sich von übriger Matrix durch hohes Vorkommen von Kollagen Typ-VI. Die PZM vermittelt wahrscheinlich als Schnittstelle zwischen mechanischer Belastung und der zellulären Reaktion darauf [15]. Des Weiteren ist eine territoriale Matrix beschrieben, die wiederum eine Gruppe von Zellen und ihre PZM als dickes korbartiges Geflecht umgibt und diese möglicherweise vor mechanischem Stress schützt [16]. Zwischen diesen Territorien liegt die interterritoriale Matrix, die aufgrund ihres großen Anteils den größten Beitrag zur biomechanischen Eigenschaft des Gelenkknorpels leistet [4].

Den höchsten Massenanteil der EZM im Gelenkknorpel hat das Kollagen. Es macht dort rund 60% des Trockengewichts aus und ist durch zahlreiche Subtypen vertreten. Allen voran ist hier Kollagen Typ-II zu nennen, welches einen Anteil von 95% des Gesamtkollagens darstellt. Daneben kommen kleinere Mengen an Kollagen Typ-I, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII und XIV vor, die teilweise regionsspezifischen Verteilungsmustern

unterliegen und welche durch Verknüpfung zu Polypeptidketten und später triple Helices Fasern bilden [4, 17].

Eine weitere große Gruppe der Makromoleküle als Bestandteil der EZM sind die Proteoglykane mit Aggrecan als Hauptvertreter. Sie bestehen aus einem Proteinkern, der mit zahlreichen Glykosaminoglykanen wie Chondroitinsulfat oder Keratansulfat verbunden ist. Durch weitere Vernetzung mit Hyaluronan entstehen große Aggregate an Proteoglykanen, die durch ihre physikochemischen Eigenschaften über eine reversible Wasserbindungskapazität verfügen. Grund dafür sind die anionischen Gruppen der Sulfat- und Carboxylat-Reste der Glykosaminoglykane [18]. Ähnlich wie bei Chondrozyten und Kollagenfasern unterliegt die Proteoglykanverteilung und Wasserverteilung einem bestimmten Distributionsmuster. Während die tiefe Zone den höchsten Gehalt an Proteoglykanen aufweist, beträgt der Wasseranteil dort nur bis zu 65%. Zur Oberfläche hin sinkt der Proteoglykangehalt, während die Wasserkonzentration auf bis zu 80% ansteigt [6, 19, 20].

Die Kombination aus Kollagenfasern, Proteoglykanen und Wasser ist also maßgeblich verantwortlich für die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels. Während Faserzüge aus Kollagenen die Resistenz gegen Scher- und Zugkräfte vermitteln, bedingt das Zusammenspiel aus Wasser und Proteoglykanen die nötige Druckelastizität. Bei Druck auf den Knorpel kann das Wasser in umliegende Räume entweichen und die EZM verdichtet sich zunehmend. Negativ geladene Seitenketten der Proteoglykane stoßen sich gegenseitig ab und begrenzen so zusammen mit dem subchondralen Knochen die Komprimierbarkeit des Gelenkknorpels. Wenn sich mechanischer Druck von außen und Gewebedruck von innen im Gleichgewicht befinden, kann keine Kompression mehr stattfinden. Bei Entlastung strömt das Wasser durch osmotische Kräfte zurück, auch getrieben durch negative Ladungen. Der Gelenkknorpel quillt wieder auf sein Ursprungsvolumen zurück. Limitierend für die Ausdehnung sind dann die nicht-elastischen Kollagenfasern [21]. Beide Prozesse geschehen mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung, da der Flusswiderstand durch die engen Poren des Fasernetzwerkes sehr hoch ist [4]. Ein gesundes Maß an Be- und Entlastung und das damit verbundene Ein- und Ausströmen der Gelenkflüssigkeit ist somit unabdingbar für eine adäquate Nährstoffversorgung und den Erhalt des gesunden Gelenkknorpels.

2.2 Arthrose

Arthrose ist eine degenerative, nicht entzündliche Krankheit des muskuloskelettalen Systems, die sich nicht nur durch Verschleiß von hyalinem Gelenkknorpel, sondern auch durch Schäden an angrenzendem Gewebe wie Bändern, Gelenkschleimhaut und subchondralen Knochen auszeichnet [22, 23]. Von dieser Krankheit ist vor allem der ältere Teil der Gesellschaft betroffen. Im Laufe der Erkrankung verlieren die betroffenen Gelenke an Stabilität und Beweglichkeit und Schmerzen behindern alltägliche Bewegungen wie normales Laufen oder Treppensteigen bis hin zur Einschränkung der grundlegenden Selbstversorgung. Aus diesem Grund hat Arthrose einen ganz erheblichen Einfluss auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität der Patienten [24].

2.2.1 Epidemiologie

Belastbare Angaben zur deutschen Arthrose-Prävalenz sind bislang nur spärlich zu finden, jedoch verzeichnet das Robert-Koch-Institut in seiner Gesundheitsberichterstattung von 2013 eine Krankheitsprävalenz von 27,1% für Frauen und 17,9% für Männer, Tendenz steigend [25]. Bei der über 60-Jährigen Bevölkerung beträgt die Prävalenz sogar um die 50% [26]. Die Relevanz dieser Erkrankung wird also deutlich, vor allem unter Berücksichtigung der demografischen Entwicklung in Deutschland. Nicht nur hierzulande wird die sozioökonomische Herausforderung, die mit dieser Erkrankung einhergeht, immer größer. Die Kombination aus großen Operationen, zeitintensiver Rehabilitation und pharmakologischer Therapie auf der einen und Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und Frühberentung auf der anderen Seite machen die Behandlung von Arthrose und den damit verbundenen Aufwand sehr kostenintensiv. Sowohl auf gesundheitsökonomischer als auch auf volkswirtschaftlicher Ebene entstehen erhebliche Belastungen. So betragen die Ausgaben für Arthroseerkrankungen in Deutschland (ICD-10: M-15 - M-19) im Jahre 2008 7,62 Milliarden Euro. Diese Kosten stiegen von 2002 bis 2008 um 510 Millionen Euro an, was einem Zuwachs von etwa 7% entspricht. Die Zahl der arthrosebedingten Arbeitsunfähigkeitsfälle (ICD-10: M-15 - M-19) belief sich im Jahre 2011 auf 252.573 [25].

2.2.2 Risikofaktoren

Für die Entstehung einer Gelenkarthrose gibt es zahlreiche Risiken. Dabei kann zwischen systemischen und mechanischen Faktoren unterteilt werden. Als wichtiger

systemischer Faktor ist das Alter zu nennen [27]. Zwar ist eine Arthrose im hohen Alter nicht obligat, jedoch führt die Abnahme von Elastizität und Funktionalität des Gelenkknorpels zu einem erhöhten Verletzungsrisiko des Knorpels und somit auch zu erhöhtem Krankheitsrisiko. Außerdem spielt das weibliche Geschlecht bei der Ausbildung der Arthrose eine Rolle, wobei als Ursache die menopausale Hormonumstellung in Erwägung zu ziehen ist [27].

Bei den mechanischen Faktoren sind vor allem berufliche oder freizeitliche Überbeanspruchung mit einem erhöhten Arthrose-Risiko in Verbindung zu bringen. So wurde beispielsweise in der Berufsgruppe der Fliesenleger eine erhöhte Prävalenz für Gonarthrose beobachtet [28]. Für Sportler, die mit einer hohen Frequenz ihr Kniegelenk andauernd belasteten, gilt das Gleiche [29]. Darüber hinaus spielen Übergewicht ebenfalls aus Gründen der Überlastung und eine diskutierte globale hyperinflammatorische Situation, bedingt durch das Fettgewebe, eine große Rolle bei der Begünstigung von Arthrose im Kniegelenk [30]. Auch durch nicht oder inadäquat behandelte Verletzung von Gelenkstrukturen kann durch die daraus resultierende Fehlbelastung eher eine Arthrose entstehen [31].

2.2.3 Pathophysiologie

Je nach Ursache lässt sich Arthrose in einen primären und einen sekundären Typ einteilen. Während bei der primären Arthrose keine eindeutige Ursache zugrunde liegt und schlicht biologische Minderwertigkeit in Erwägung zu ziehen ist, ist die sekundäre Arthrose Folge angeborener oder erworbener Krankheiten. Neben Gelenkfehlstellungen, metabolischen und endokrinologischen Krankheiten als Ursache für eine Sekundärarthrose können die Auslöser auch post-traumatischer oder post-operativer Natur sein [32]. Entgegen der ursprünglichen Annahme, dass Arthrose ein rein mechanischer Verschleiß zugrunde liegt, ist heute bekannt, dass dieser Erkrankung sehr komplexe pathophysiologische Mechanismen zugrunde liegen beziehungsweise diese Erkrankung begleiten, welche in bestimmten Fällen auch unabhängig von mechanischen Ursachen eintreten können. Aigner et al. beschreiben das Reaktionsmuster der Chondrozyten in fünf verschiedenen Bereichen: Proliferation und Zelltod, Syntheseaktivität, Zersetzung der EZM, phänotypische Modulation der Chondrozyten und Bildung von Osteophyten [33].

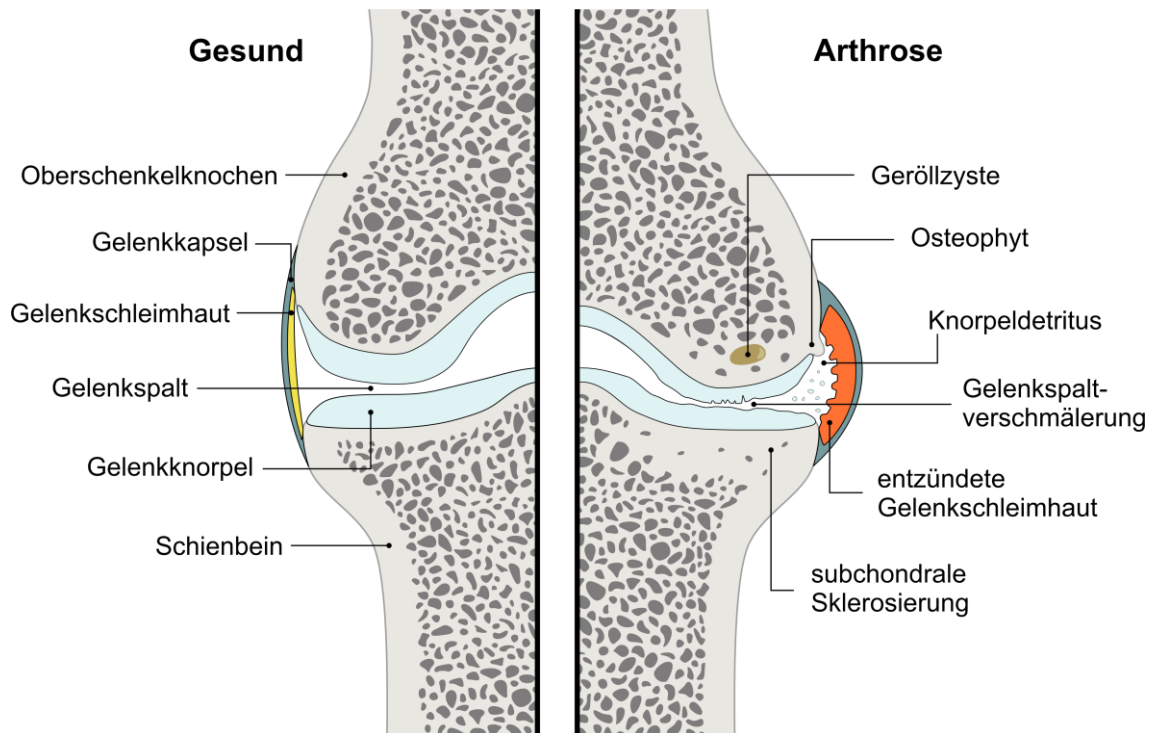


Abb. 3: Arthrosekennzeichen am Kniegelenk. Schematische Darstellung eines gesunden (links) und eines arthrotischen (rechts) Kniegelenkes im Frontalschnitt, ohne Darstellung der Menisken.

Es ist bekannt, dass im Verlauf der Arthrose nicht nur die Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels eine Rolle spielt, sondern dass auch alle übrigen Gelenkstrukturen am Krankheitsgeschehen beteiligt sind (Abb. 3) [22]. Einigkeit herrscht über die Annahme, dass der Beginn der Erkrankung durch ein Ungleichgewicht zwischen Knorpelabbau oder Zerstörung und Knorpelneubildung begleitet wird [23, 33, 34]. Auslösend für den Abbau sind die genannten primären oder sekundären Ursachen für Arthrose. Zunächst kann die beschädigte EZM durch Steigerung von chondrozytärer Syntheseleistung weitestgehend erhalten werden, jedoch ist der gebildete Ersatz der EZM minderwertig und kann den weiteren Gelenkbelastungen nicht ideal standhalten. Dadurch können in der Folge tiefe Fissuren bei gleichzeitiger Auffaserung der Knorpeloberfläche resultieren. Die für die reibungsarme Beweglichkeit des Gelenks so wichtige spiegelglatte Oberfläche des Gelenkknorpels geht verloren und es beginnt ein Teufelskreis, in dem raue und unebene Gelenkflächen aneinander reiben. Dies führt bis zur Abreibung von Knorpelfragmenten, solange bis der subchondrale Knochen freiliegt. Der Knorpeldetritus fluktuiert dann frei in der Gelenkflüssigkeit, reizt die Gelenkschleimhaut und es kommt zur Entzündungsreaktion, infolge derer auch intraartikuläre und periartikuläre Bandstrukturen in Mitleidenschaft gezogen werden. Durch die Entzündung der

empfindlichen Gelenkinnenhaut kommt es zur Überproduktion von Synovialflüssigkeit und somit zum Gelenkerguss [34].

Nach vollständiger Abtragung des Knorpels sorgen die ungedämpften mechanischen Kräfte für eine Verdichtung des subchondralen Knochens. Auch entzündliche Prozesse spielen dabei eine Rolle. Ohne den Gelenkknorpel verliert die Gelenkfläche ihre stoßdämpfende Eigenschaft und unter Freilegung von kleinen Knochenmarksräumen, in denen sich Knochen- und Knorpeldetritus sammelt, können sich Geröllzysten formieren [35]. Oft sind darüber hinaus Osteophyten, also Knochenvorsprünge, an den Ausläufern der Gelenkflächen zu finden. Es handelt sich dabei um Neubildungen von Knochen und minderwertigem Knorpel als Versuch die Gelenkfläche zu vergrößern und die Last besser zu verteilen [36]. Große Osteophyten können dann aber die Gelenkfunktion einschränken und tragen zusätzlich zum Gelenkerguss zur Vergrößerung und Deformierung des Gelenks bei [34, 37].

2.2.3.1 Veränderungen auf zellulärer Ebene

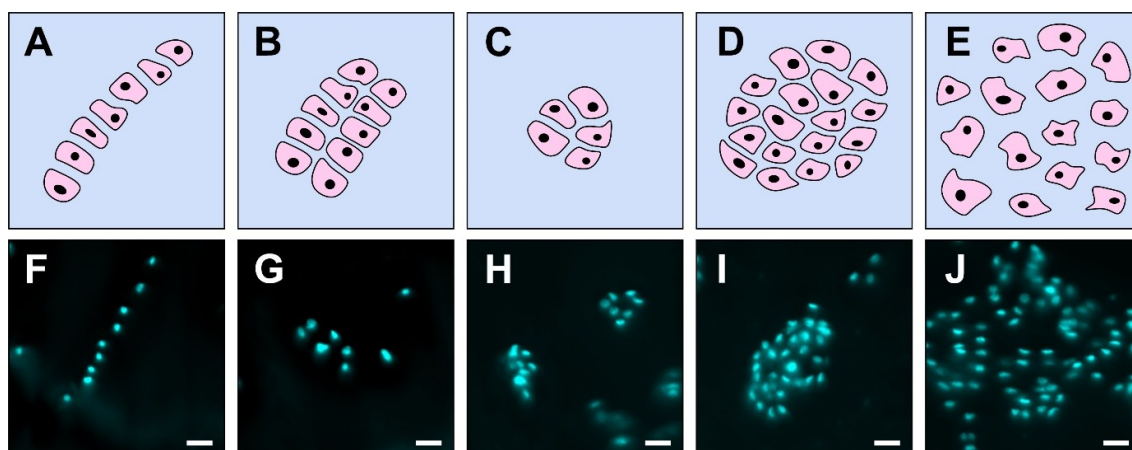


Abb. 4: Chondrozytenmuster. Schematische (A-E) und mikroskopische (F-J, eigene Aufnahmen) Darstellung von chondrozytären Mustern im Gelenkknorpel auf dem Weg hin zur Arthrose. String (A, F), Double String (B, G), Small Cluster (C, H), Big Cluster (D, I) und Diffuse Pattern (E, J). Mikroskopische Darstellung der Zellkerne mit DAPI-Färbung in 40-Facher Vergrößerung, Maßstabsbalken 20 µm.

Neben den makroskopisch sichtbaren Veränderungen, die mit der Gelenkarthrose einhergehen, gibt es auch Geschehnisse auf zellulärer Ebene, die bemerkenswert sind (Abb. 4). Die Chondrozyten formieren sich entlang der arkadenartigen Kollagenfaserstrukturen zu regelhaften Mustern. Dabei ist die physiologische und vorherrschende Anordnung der Zellen im Gelenkknorpel der Femurkondylen als perlenschnurartig

(Strings) zu beschreiben [38]. Mit beginnender Arthrose findet eine Änderung des Zellmusters statt und es bilden sich zunächst Doppelreihen (Double Strings), danach kleinere Zellhaufen (Small Cluster) und schließlich große Zellhäufungen (Big Cluster) bei weit fortgeschrittener Arthrose [39, 40]. Jene große Cluster können auch in unmittelbarer Umgebung von oberflächlichen Fissuren und Läsionen im Gelenkknorpel gefunden werden [41]. Darüber hinaus wird ein Muster beschrieben, bei dem sich die Zellen in keiner spezifischen Weise anordnen (Diffuse). Dort sind die Chondrozyten lediglich diffus verteilt und zahlreich vorhanden [40]. Der Weg von mechanischer Überlastung bis hin zu Clustern oder diffusen Formationen ist allenfalls in Ansätzen geklärt, jedoch ist bekannt, dass die Zellen der Cluster weiterhin in der Lage sind, Knorpelsubstanz zu produzieren. So besteht in der Theorie die Annahme, dass vermehrte Zellproliferation stattfindet, um bestehende Defekte mit erhöhter Synthese von EZM zu reparieren [42]. Nachdem die Entdeckung spezifischer Muster bei Arthrose und Knorpelschäden aufkam, wurde vorgeschlagen, zelluläre Muster als bildbasierte Biomarker für lokale Gewebedegeneration zu nutzen [43].

In gesundem, adultem Gelenkknorpel zeigen Chondrozyten normalerweise weder Proliferation noch weitere Differenzierungsaktivität. Bei arthrotischem Knorpel hingegen kann eine terminale, hypertrophe Differenzierung beobachtet werden, die dann auch mit phänotypischen Veränderungen einhergeht [44, 45]. Diese phänotypischen Veränderungen resultieren in einer Umstellung des Expressionsmusters, sodass sich schlussendlich auch die Zusammensetzung der unmittelbaren extrazellulären Umgebung verändert und in der Produktion von minderwertiger Knorpelsubstanz resultiert.

2.2.3.2 Veränderungen auf molekularer Ebene

Die Bildung spezifischer zellulärer Muster und die terminale Differenzierung von Chondrozyten im Verlauf der Gelenkarthrose stehen im Mittelpunkt hochkomplexer Geschehen auf molekularer Ebene. Um diese Prozesse ausreichend zu verstehen, ist ein umfassendes Verständnis von entsprechenden Signalwegen erforderlich. Auf der einen Seite gibt es bereits viele Erkenntnisse, was die Prozesse, die zur Degradation der EZM beitragen, angeht. Auf der anderen Seite aber gibt es noch viele Unklarheiten in Bezug auf Proliferation und Apoptose von Chondrozyten, Inflammation, Angiogenese und Osteogenese.

Die Regulation chondrozytärer Funktion und die damit verbundene Synthese von Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen, kann durch viele verschiedene Signalmoleküle modifiziert werden. Für den Erhalt des gesunden Knorpels ist es essenziell,

dass Auf- und Abbau der Knorpelsubstanz einer Balance unterliegen. In diesem Zusammenhang sind inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren dafür bekannt, anabole und/oder katabole Effekte hervorzurufen [12, 14].

Ein Einstieg in die Kaskade der molekularen Arthrosevorgänge geschieht durch Fragmente der extrazellulären Bestandteile. So ist bekannt, dass beispielsweise Bruchstücke von Fibronectin die chondrozytäre Expression von Matrix-Metalloproteasen induzieren, die ihrerseits in der Lage sind, die strukturellen Bestandteile der EZM zu degradieren, indem sie Kollagene und Proteoglykane spalten [46, 47]. Intaktes Fibronectin hingegen trägt wahrscheinlich zur Erhaltung und Reparatur der EZM bei [48]. Fibronectin ist ein viel vorkommendes Glykoprotein der EZM, das den Chondrozyten als Adhäsionsmolekül zum Kontakt mit Kollagenen und Proteoglykan dient. Auch das N-terminale Fragment eines Link-Proteins, ein Verbindungsmolekül innerhalb der großen Proteoglykan-Aggregate, wurde in seiner Funktion als Stimulator der Kollagen- und Proteoglykansynthese entdeckt [49].

Auf der katabolen Seite stehen pro-inflammatorische Zytokine. Moleküle wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) lösen eine erhöhte chondrozytäre Synthese von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs (ADAMTSs) aus. Herkunft dieser pro-inflammatorischen Faktoren sind dabei Chondrozyten selbst, aktivierte Synovialzellen der entzündeten Gelenkschleimhaut oder mononukleäre Zellen wie Makrophagen [50]. Wichtigste Vertreter für die Spaltung des im Gelenkknorpel am meisten vertretenen Kollagen II sind MMP-1 (Kollagenase-1) und MMP-13 (Kollagenase-3) [51]. Eine Degradation von Proteoglykan findet durch MMP-3 (Stromelysin-1) und ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) statt [52, 53]. Agonisierend auf katabole Effekte wirkt die zusätzlich verminderte Expression von MMP-Inhibitoren (TIMPs) [54]. Neben den genannten MMPs und ADAMTSs gibt es zahlreiche weitere Vertreter dieser Familien, die für Ihre Fähigkeit, Bestandteile der Matrix zu degradieren, bekannt sind [55]. Es werden deshalb große Hoffnungen in die medikamentöse Hemmung dieser Matrix-Abbauenden-Enzyme gesetzt. Auch eine Rolle als diagnostischer Marker im Krankheitsverlauf der Gelenkarthrose scheint möglich [56].

Ein weiteres pro-inflammatorisches Zytokin, der Macrophage Inhibitory Factor (MIF), ist in der jüngeren Vergangenheit mit Osteoarthritis in Verbindung gebracht worden. Initial war dieses Molekül entdeckt worden, weil es als Produkt von T-Zellen die Migration von Makrophagen fördert und somit eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems spielt. Dabei steht die Expression des MIF unter regulatorischer

Kontrolle von Entzündungsmediatoren wie Interferon Gamma und TNF- α [57]. Seinerseits nimmt es dann wiederum Einfluss auf die Produktion von TNF- α und Interleukinen wie Interleukin-8 (IL-8) [58]. Eine Studie konnte zeigen, dass isolierte Chondrozyten von Arthrosepatienten eine signifikant höhere Menge an MIF produzierten als die der gesunden Kontrollen. Darüber hinaus wurde in einem Experiment bei MIF^{-/-} Mäusen gezeigt, dass diese eine mildere altersbedingte Gelenkarthrose ausbildeten als Mäuse, die MIF exprimierten [59].

Auf der anabolen Seite stehen Wachstumsfaktoren wie Transforming growth factor Beta (TGF- β) mit Bone morphogenic proteins (BMPs) als Unterfamilie, Insulin-like growth factor 1 und Vertreter der Fibroblast growth factor Familie (FGFs). Auch diese werden in einer bislang unklaren Abfolge von Synoviozyten, Chondrozyten und Makrophagen freigesetzt [12, 60]. Die Effekte dieser Wachstumsfaktoren sind vielseitig und beeinflussen neben Knorpelzellen auch mesenchymale Stammzellen und Zellen der Gelenkschleimhaut. Dabei wirken die Wachstumsfaktoren stimulierend auf die chondrozytäre Synthese von Komponenten der EZM. Gleichzeitig wird für TGF- β eine Hemmung der IL-1 und MMP vermittelten Matrix-degradation berichtet [12]. Die induzierende Wirkung von Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen und ihre Rolle in der Chondrogenese sind lange bekannt [61]. Eine Nutzung der Matrixaufbauenden Eigenschaften der Wachstumsfaktoren für die Therapie von Knorpeldegeneration ist demnach denkbar [12, 61].

Für Transforming growth factor Alpha (TGF- α) hingegen wurde in Ratten eine erhöhte Expression von MMP-13 und eine erniedrigte Expression von Strukturproteinen wie Kollagen II und Aggrecan gezeigt. Außerdem konnte durch TGF- α eine erhöhte Zellproliferation und Clusterbildung induziert werden [62].

Unter unkontrolliertem Einfluss von Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen unterliegen die Chondrozyten weiterer Differenzierung und die molekularen Prozesse im Gelenkknorpel geraten in eine tödliche Einbahnstraße. Dies äußert sich durch phänotypische Änderungen der Knorpelzellen, die dann beginnen, ein verändertes Muster an Molekülen zu exprimieren. Dabei gibt es einerseits den Weg der Dedifferenzierung hin zu einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotypen, die dann anstatt Kollagen II, mehr Kollagen I, III und V produzieren [63]. Andererseits gibt es die Möglichkeit der Differenzierung in einen hypertrophen Zelltyp, der vorwiegend Kollagen X synthetisiert [60]. Zusätzlich zur dann ohnehin schon veränderten extrazellulären Umgebung gerät auch das empfindliche System aus MMPs und ADAMTS aus der Balance, sodass keine

adäquate Reparatur der beschädigten Matrix erfolgen kann und im Gesamten eine Degradation der EZM resultiert.

Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung

Wie auch in jedem anderen Gewebe spielen Zellproliferation und -apoptose eine wichtige Rolle für die Homöostase und den Gewebeerhalt. In hyalinem Gelenkknorpel gilt dasselbe. Dabei wird angenommen, dass Chondrozyten des adulten Knorpels keine bemerkenswerte Proliferation aufweisen [64]. Die Entdeckung von Zellhäufungen bei arthrotischem Knorpel und auch in unmittelbarer Nähe von Knorpelläsionen lässt vermuten, dass sich Chondrozyten im Rahmen von Schädigungen bei fortschreitender Arthrose vermehren [65]. Ursächlich dafür könnte die erhöhte Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren aus der Synovialflüssigkeit sein, sobald die Knorpeloberfläche Fissuren zeigt und die Kollagenmatrix geschädigt ist [66].

Auch regulierter Zelltod (Apoptose) scheint ein Schlüsselmechanismus auf dem Weg hin zur Gelenkarthrose zu sein. Auslösend dafür können mechanische Verletzungen, Verlust der EZM, Dysbalance von Wachstumsfaktoren oder übermäßige Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies sein [67]. Jedoch sind hier die genauen Mechanismen, zum Beispiel ob Apoptose eine Degradation der Matrix auslöst oder umgekehrt, ungeklärt. Auch in der Frage um das Ausmaß des apoptotischen Verhaltens herrscht Uneinigkeit: es ist die Rede von Zelltodraten von 5-11% in gesundem und 22-51% in arthrotischem Knorpel. Aigner et al. stellen diese Werte in Frage mit der Begründung auf den totalen Verlust der Synthese- und Reparatursfähigkeit der Chondrozyten bei derart hohen Apoptoseraten. Sie selbst geben eine sehr niedrige Rate von 0,1% (unveröffentlicht) an und schätzen die Rolle der Apoptose bei Arthrose als limitiert ein [33].

Proliferation und Apoptose unterliegen einer sehr präzisen Steuerung komplexer Signalkaskaden (Abb. 5). Dabei müssen bei der Apoptose prinzipiell zwei verschiedenen Wege unterschieden werden: Apoptose durch externe Signale (extrinsische Apoptose) und Apoptose durch interne Signale (intrinsische Apoptose). Auf dem extrinsischen Weg erfolgt das Auslösen der Kaskade durch Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Superfamilie. Innerhalb dieser Rezeptor-Superfamilie lassen sich drei Gruppen unterscheiden. Die erste Gruppe bilden die Rezeptoren, die sich durch Ausstattung mit einer intrazellulären „Todesdomäne“ auszeichnen. Mitglieder dieser Gruppe sind die Tumor necrosis factor receptors 1, Fas- und TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) Rezeptoren.

Fas Rezeptoren kommen hauptsächlich auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen vor, umso bemerkenswerter ist die Tatsache, dass sie auch von Chondrozyten exprimiert werden [68]. Neben der membrangebundenen Variante des Fas gibt es auch eine gelöste Form (soluble Fas, SFAS), die durch Spaltung von MMPs entsteht [69, 70]. Ein weiteres Mitglied dieser Gruppe sind die TRAIL Rezeptoren. Für TRAIL wurde eine apoptotische Wirkung auf Chondrozyten aus Rattenknorpel nachgewiesen [71]. Nach Aktivierung der Rezeptoren mit Todesdomänen durch TNF- α , entsprechende Fas-Liganden (u.a. soluble Fas ligand, SFASL) oder TRAIL entsteht unter Bindung von Co-Faktoren intrazellulär ein death-inducing signaling complex (DISC), der die Aktivierung von Procaspase 8 zu Caspase 8 (CASP8) katalysiert. Neben den „Todesrezeptoren“ gibt es als zweite Gruppe innerhalb der TNF-Superfamilie Rezeptoren, die sich nach Aktivierung durch zytoplasmatische Bindung von sogenannten TNF receptor associated factors (TRAFs) auszeichnen. Sie können ebenfalls von TNF- α aktiviert werden und initiieren dann paradoxerweise anti-apoptotische Signalwege über NF κ B. Die dritte Gruppe bilden die Decoy Rezeptoren, die nicht in der Lage sind, zytoplasmatische Signalwege loszutreten, sondern nur um Liganden konkurrieren und so die Aktivität der anderen Rezeptorgruppen regulieren [72].

Auf dem intrinsischen Weg stehen am Anfang Prozesse, die sich auf die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran auswirken. Diese Prozesse können zum einen durch schlichtes Fehlen von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen, die die Apoptotendenz unterdrücken, ausgelöst werden. Zum anderen werden sie durch Stimuli wie DNA-Schäden, metabolische Dysbalance, Hypoxie, Hyperthermie oder freie Radikale ausgelöst. Unter Einfluss genannter Faktoren kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von zwei Gruppen proapoptotischer Proteine. Die erste Gruppe besteht aus Cytochrom c, Smac/DIABLO und HtrA2/Omi. Cytochrom-c bindet und aktiviert Apaf-1 und Procaspase 9 und bildet so ein Apoptosom, das dann die aktivierte Caspase 9 (CASP9) enthält. Smac/Diablo und HtrA2/Omi vermitteln Apoptose über die Inhibition von sogenannten inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). Die zweite Gruppe wird von Apoptosis inducing factor (AIF), Endonuklease G und Caspase-activated DNase (CAD) gebildet und werden zu einem späteren Zeitpunkt erst nach eingeleiteter Apoptose freigesetzt. Dann bewirken sie im Zellkern DNA-Fragmentation und tragen letztendlich zur Kernkondensation bei.

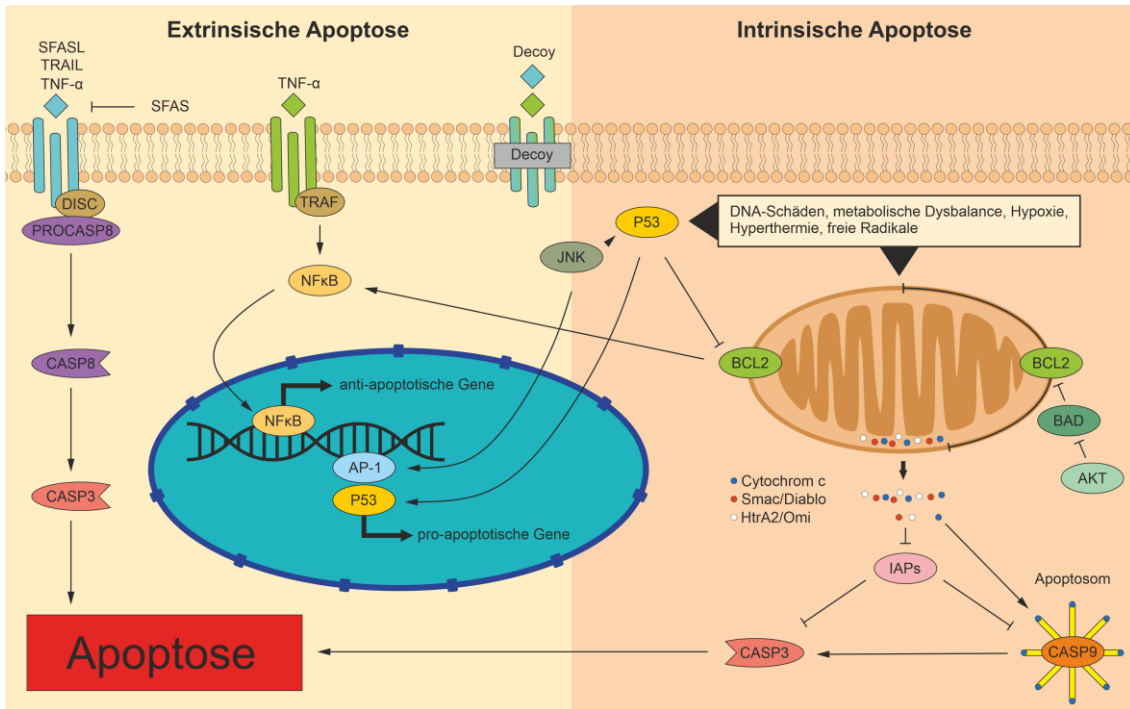


Abb. 5: Proliferation und Apoptose. Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung wichtiger Biomarker und Pfade von Prozessen der Zellproliferation und Apoptose. Die extrinsische Apoptose wird maßgeblich über Rezeptoren der TNF-Superfamilie reguliert. „Todesrezeptoren“ können von SFASL, TRAIL und TNF- α aktiviert werden, SFAS inhibiert die Bindung dieser Liganden. Der Death-inducing signaling complex (DISC) katalysiert die Aktivierung von Procaspase 8 (PROCASP8) zu Caspase 8 (CASP8). CASP8 aktiviert Caspase 3 (CASP3). CASP3 leitet über Aktivierung von Endonukleasen die Apoptose ein. TNF-Rezeptoren mit intrazellulärem TRAF führen über NF κ B zur Transkription von anti-apoptotischen Genen. Decoy-Rezeptoren konkurrieren um die Bindung von TNF-Rezeptor-Liganden. P53 und der intrinsische Apoptoseweg werden von DNA-Schäden, metabolischer Dysbalance, Hypoxie, Hyperthermie und/oder freien Radikalen aktiviert. Diese Prozesse destabilisieren das mitochondriale Membranpotenzial und führen dadurch zur Freisetzung von Cytochrom c, Smac/Diablo und HtrA2/Omi. Cytochrom c bildet zusammen mit Procaspase 9 ein Apoptosom, das die aktivierte Caspase 9 enthält. Caspase 9 (CASP9) aktiviert CASP3, die dann, wie beschrieben, die Apoptose einleitet. Smac/Diablo und HtrA2/Omi hemmen die Inhibitoren von Apoptosefaktoren (IAPs). BCL2 stabilisiert die Mitochondrienmembran und wirkt der Ausschüttung von Cytochrom c, Smac/Diablo und HtrA2/Omi entgegen. BAD hemmt BCL2 und AKT deaktiviert BAD. BCL2 nimmt über NF κ B Einfluss auf die Transkription von anti-apoptotischen Genen. P53 hemmt BCL2 und fungiert unter anderem als Transkriptionsfaktor für pro-apoptotische Gene. JNK aktiviert P53 und führt über Umwege zur Bildung von AP-1, das ebenfalls als Transkriptionsfaktor für pro-apoptotische Gene agiert.

CASP8 und -9 bilden dann als Initiatorcaspasen des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges zentrale Schlüsselstellen. Im weiteren Verlauf aktivieren sie diverse Effektorcaspasen, allen voran Caspase 3, die dann die Zerstörung der Zelle in einem gemeinsamen Weg einleitet. Die Effektorcaspasen aktivieren Endonucleasen für die Zersetzung von DNA-Material und Proteasen für den Abbau des Kern- und Zytoskeletts [73].

P53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, ist ein Tumorsuppressorprotein und stellt eine der wichtigsten Kontrollinstanzen für das Zellwachstum dar. Normalerweise liegt dieses Protein nur inaktiviert vor, gebunden an seinen Inhibitor Mdm2. Bei Schäden der DNA wird es aktiviert, seine Konzentration in der Zelle steigt an und induziert dann als Transkriptionsfaktor die Expression von Apoptosegenen [74]. Darüber hinaus werden DNA-Reparaturmechanismen in Gang gesetzt und der Zellzyklus wird vorübergehend in der G1-Phase arretiert, sodass vorerst keine Mitose und Zellteilung eingeleitet werden kann. Auch nach der S-Phase (Replikation des Genoms) kann noch ein Arrest in der G2-Phase erfolgen [75]. Bei hochgradiger Akkumulation von P53, also bei hochgradigen Schäden, werden dann vor allem pro-apoptische Gene der B-cell lymphoma 2 (BCL2) Familie exprimiert, insbesondere BCL2-associated X Protein (BAX), die ihrerseits eine Freisetzung von Caspasen auslösen, durch die der programmierte Zelltod schlussendlich eingeleitet wird [76, 77]. Aufgrund seiner zentralen Funktion in der Regulation von Proliferation und Apoptose steht das P53 im Mittelpunkt onkologischer Forschung. Denn bei Mutationen im P53-Gen kommt es zu einem fatalen Wegfall der Hemmung, die nötig ist, Zellen vor unkontrolliertem Wachstum und Schädigung zu schützen.

Die Proteine der BCL2 Familie spielen als Teil des intrinsischen Apoptoseweges eine wichtige Rolle auf dem Weg zum programmierten Zelltod. Dabei wird innerhalb dieser Proteine zwischen anti-apoptischen und pro-apoptischen Faktoren unterschieden. Das wichtigste Protein auf Seiten der anti-apoptischen Faktoren ist BCL2, einer seiner Inhibitoren auf Seiten der pro-apoptischen Faktoren ist BCL2 Antagonist of Cell Death (BAD). Das BCL2 selbst unterliegt unter anderem in einem bislang nicht ganz geklärten Zusammenhang der Regulation des P53 [78]. Als Bestandteil der Mitochondrienmembran kann es dort die Integrität des mitochondrialen Membranpotentials sicherstellen und so den Einfluss von Caspasen regulieren [79]. Zusätzlich wird eine anti-apoptische Wirkung über die Aktivierung des NF κ B, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von anti-apoptischen Faktoren induziert, erreicht. BAD entfaltet seine Wirkung, indem es BCL2 bindet und deaktiviert. Durch Proteinkinase-B-/RAC-alpha-serine/threonine-protein kinase-abhängige (PKB/AKT) Phosphorylierung wird BAD in einem Phosphoinosid-3-Kinase-abhängigen (PI3K) Signalweg inaktiviert [80].

Losgetreten wird der PI3K-Signalweg von Rezeptor-Tyrosinkinasen, die von Wachstumsfaktoren wie TGF- α , IGF-1 oder Epidermal growth factor (EGF) aktiviert werden [81-83]. Über Zwischenstationen mit Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) als Mediator kommt es zur Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung. AKT entspricht der Proteinkinase B und ist in der Lage, pro-apoptische Faktoren (BAX, BAD) durch

Phosphorylierung zu inaktivieren [84]. Außerdem beeinflusst AKT den weiteren Signalweg zur Induktion von anti-apoptotischen Genen über NFκB [83]. NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, der durch eine Vielzahl an Signalwegen in komplexen Kaskaden aktiviert werden kann und neben der Überexpression von anti-apoptotischen Faktoren schlussendlich auch eine erhöhte Expression von anderen Transkriptionsfaktoren wie E74-like factor (ELF3) oder Hypoxia inducible factor 2α (HIF-2α) bewirkt. Diese sorgen ihrerseits für eine Modulation von katabolischen und inflammatorischen Mediatoren, durch die sich intra- und extrazelluläre Bedingungen ändern und so eine Verbindung zwischen Inflammation und chondrozytärer Hypertrophie entsteht. Die zu beobachtende Hypertrophie wird von erhöhter MMP-13 Aktivität und Kollagen X Synthese begleitet, die bekanntermaßen auch eine Degradation der EZM kennzeichnen [85, 86]. Getriggert werden die Signalwege zur Aktivierung des NFκB vor allem durch inflammatorische Zytokine wie IL-1β und TNF-α, aber auch eine Initiierung über Toll-like receptors (TLRs), UV-Strahlung und freie Radikale ist möglich. Interessant ist dabei, dass das durch NFκB induzierte Expressionsmuster auch Faktoren beinhaltet, die ihrerseits den NFκB-Weg wieder aktivieren. So zum Beispiel IL-1β, TNF-α und Vertreter der TLRs. Darüber hinaus wird die Expression zahlreicher weiterer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) und -8, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren, Enzyme und Faktoren, die in Zellproliferation, Apoptose und Zellzyklus involviert sind, erhöht [87].

IL-6 ist ein Zytokin, das seine Wirkung ebenfalls über den PI3K-Signalweg entfaltet, nachdem es den gp130/JAK/STAT Rezeptorweg aktiviert. Somit ist es dann analog zu diversen Wachstumsfaktoren über AKT und NFκB in die Bremsung der Apoptose involviert. Darüber hinaus wurde für IL-6, seinem pro-inflammatorischem Charakter entsprechend ein induzierender Einfluss auf MMPs und reduzierender Einfluss auf Kollagen II Synthese festgestellt. Auch eine Involviertheit bezüglich subchondraler Knochenveränderungen wurde beobachtet, wobei IL-6 gleichzeitig Osteoklasten und Osteoblasten aktiviert und so an ossären Umbauprozessen beteiligt ist [88]. Die Synthese von IL-6 durch die Chondrozyten kann durch Wachstumshormone, TNF-α und IL-1β gesteigert werden. Eine erhöhte IL-6 Konzentration wurde interessanterweise in der Gelenkflüssigkeit von Arthrose-Patienten festgestellt [89, 90]. Außerdem soll an dieser Stelle erwähnt sein, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Proteohormon Leptin (LEP) und IL-6 gibt. LEP wurde ursprünglich wegen seiner Rolle im Fettstoffwechsel und der Hemmung von Hungergefühlen entdeckt. Studien zeigen jedoch auch eine Beteiligung bei der Entstehung von Arthrose, insofern, dass bei Arthrosepatienten die Konzentration im Serum und in der Synovialflüssigkeit erhöht ist [91]. Die Aktivität des LEP wird dabei

durch spezifische Leptin-Rezeptoren vermittelt, die dann folgend unter anderem den PI3K-Signalweg lostreten, welcher im Endeffekt wiederum eine erhöhte Expression von IL-6 induziert [92].

Interleukin-8, ein weiteres Zytokin, das ursprünglich wegen seiner Funktion als Entzündungsfaktor entdeckt wurde, spielt eine Rolle in der Ausbildung hypertropher Chondrozyten und ihrer Änderung des Phänotyps. Dabei vermittelt IL-8 seine Wirkung vor allem über den Mitogen activated protein kinase (MAPK) Signalweg, welcher in arthrotischem Knorpel zum einen Apoptose auslöst, zum anderen aber auch Hypertrophie triggert [93, 94]. Eine erhöhte Serum- und Synovialkonzentration an IL-8 wurde bei Patienten mit Gelenkarthrose gemessen [95]. Außerdem wurde eine Beteiligung bezüglich Angiogenese entdeckt [96].

Ein weiteres zentrales Molekül im Geschehen um Zellwachstum und programmiertem Zelltod sind die C-Jun N-terminale Kinasen (JNKs) als Mitglieder der Familie der MAPKs. Sie sind sowohl Teil des intrinsischen als auch des extrinsischen Apoptoseweges und werden aktiv durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Stressfaktoren wie UV- oder Röntgenstrahlung. Aktiviertes JNK transloziert in den Zellkern, wo es durch die Phosphorylierung von c-Jun die Bildung von Activator Protein 1 (AP-1) induziert. Dieses kann dann als Transkriptionsfaktor für zahlreiche pro-apoptotische Gene agieren. Darunter TNF- α , Fas-L und BCL2 homologous antagonist killer (BAK). JNK ist zudem selbst in der Lage, Transkriptionsfaktoren wie P53 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Während die pro-apoptotischen Eigenschaften der JNKs zunehmend verstanden werden, geht man auch davon aus, dass ein Engagement in Richtung der Zellproliferation, getriggert durch Wachstumsfaktoren, besteht [97]. Wie für die meisten in den Apoptoseweg involvierten Signalmoleküle reicht der Einfluss der JNKs in mehrere Signalwege hinein und stellt sich deshalb als komplex und vielseitig dar und muss deshalb noch genauer untersucht werden.

EGF und Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), zwei Wachstumsfaktoren, die vor allem mit malignen Tumoren in Zusammenhang gebracht werden, scheinen auch einen Einfluss auf die Progression von Arthrose zu haben. Beide entfalten ihre Wirkung auf die Zielzellen über die Gruppe der EGF-Rezeptoren, dessen bekanntester Vertreter wohl der HER2/c-neu-Rezeptor ist. Im Allgemeinen werden über verschiedene Signalwege schlussendlich Effekte wie Zellmigration, Zelladhäsion und Zellproliferation hervorgerufen [98]. Inwieweit dies auch für Chondrozyten und Gelenkknorpel übertragbar ist, bleibt zu untersuchen. Ihren Funktionen als Wachstumsfaktoren entsprechend würde man EGF und HB-EGF und ihrem weiteren Signalweg eine

knorpelprotektive Wirkung zuschreiben. Dies hat sich durch experimentelle Studien jedoch nicht schlüssig belegen lassen [99].

Angiogenese

Neben dem Verlust von Knorpelmatrix, Änderung der zellulären Strukturmuster und der Dysbalance von Proliferation und Apoptose ist der Prozess der Angiogenese seit längerem Bestandteil der Forschung zu Arthrose. Im Rahmen der enchondralen Ossifikation, also dem Umbau von Knorpel zu Knochen während der Entwicklung des Skeletts, ist die Angiogenese ein integraler Bestandteil. Eine Vaskularisierung von arthrotischem Knorpel wurde als erstes durch den Nachweis von angiogenese-spezifischen Markern, in Form von Vascular endothelial growth factor (VEGF) nachgewiesen [100]. Auch wenn in dieser Frage die genaue Ätiologie bislang ungeklärt bleibt, so wird vor allem der subchondrale Knochen zumindest als Ausgangspunkt für Gefäßeinsprossungen in den Gelenkknorpel hervorgehoben. Die nervale Begleitung von einwachsenden Blutgefäßen könnte dann ursächlich für die Schmerzen bei fortschreitender Arthrose sein [101]. Im Gesamten scheint die Interaktion zwischen veränderter Knorpelbiologie, entzündeter Gelenkschleimhaut und dem subchondralen Knochen dieses Phänomen in komplexer Weise zu regulieren [102]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Gelenkknorpel in der Vergangenheit immer wieder auf Biomarker untersucht, die im Allgemeinen mit Angiogenese in Verbindung zu bringen sind, um diesen Prozess zu entschlüsseln. Hier soll nun ein Überblick über wichtige angiogenetische Schlüssel-moleküle gegeben werden, die neben ihrem Einfluss auf Angiogenese oft auch Einfluss auf den chondrozytären Metabolismus haben.

Die Gruppe der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren ist wohl die Prominenteste in der Regulierung von Angiogenese. Ihre Isoformen sind dabei nicht nur in physiologische Prozesse verwickelt wie Skelettwachstum und enchondrale Ossifikation, sondern auch in pathologische Entwicklungen wie solides Tumorwachstum. Es wurde gezeigt, dass die Isoformen VEGF A-D und die VEGF-Tyrosinkinase-Rezeptoren 1-3 (VEGFR 1-3) auch von Chondrozyten exprimiert werden [103, 104]. In arthrotischem Knorpel führt eine erhöhte Präsenz von VEGF, ausgelöst durch Hypoxie, mechanischen Stress und inflammatorische Zytokine, einerseits zur Formation von Osteophyten und Matrixdegradation, aber andererseits auch zu einem geänderten Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose [105]. Über VEGFRs werden intrazellulär die PI3K und MAPK

Signalwege losgetreten, die letztendlich auch Zellproliferation und Zellüberleben vermitteln [106].

Eine andere Familie von Wachstumsfaktoren, die für ihre angiogenetische Potenz bekannt ist, ist die Familie der Fibroblast Growth Factors (FGFs). Es existieren zahlreiche Isoformen und entsprechende FGF-Tyrosinkinase-Rezeptoren (FGFRs). Wie auch für VEGF, ist die FGF-neutralisierende oder Rezeptor-blockierende Therapie durch Antikörper eine zentrale Säule in der Behandlung von vielen Krebsarten geworden. Ziel dabei ist es, das Tumorstadium durch Hemmung der Angiogenese einzudämmen. Die Blockade von FGF-Rezeptoren und dadurch wirksame Flussabwärtshemmung intrazellulärer Signalwege führt zu einer Inhibition von Proliferation und Migration von Endothelzellen [107]. Neben ihren angiogenetischen Effekten wirken FGF-1 und -2 vor allem über FGFR-1 auf den Metabolismus von Chondrozyten. Durch Aktivierung von chondrozytären FGFRs folgt im Gelenkknorpel eine erhöhte Produktion von MMPs, eine Inhibition der Matrixakkumulation und Proteoglykansynthese und die Formation von charakteristischen Zellclustern [108, 109]. In einem Tiermodell konnte bei FGFR-1-defizitären Mäusen bereits eine verminderte Knorpeldegeneration nachgewiesen werden [110]. Demgegenüber können auch FGF-1 und -2-vermittelte anabole Effekte vorliegen, hier jedoch vor allem über FGFR-3 [111].

Endoglin (ENG), ein Co-Rezeptor des TGF- β Rezeptorkomplexes, wird vorwiegend von proliferierenden Endothelzellen exprimiert und spielt deshalb eine wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung und Tumor-assoziierten Angiogenese [112]. Auch auf Chondrozyten wird Endoglin exprimiert, sogar in vergleichbarem Umfang wie bei Endothelzellen [113]. Somit scheint Endoglin, neben einer möglichen angiogenetischen Funktion zumindest den Einfluss von TGF- β -Liganden auf Chondrozyten zu regulieren. Dieser Zusammenhang wurde in der Vergangenheit in einem Mausmodell untersucht und es wurde gezeigt, dass Chondrozyten von Mäusen mit einem Endoglindefizit eine geringere Menge an Kollagen X und Cartilage Oligomeric Matrix Protein exprimierten [114]. Diese beiden Matrixbestandteile kommen in arthrotischem Gelenkknorpel gehäuft vor. Hiermit in Einklang stehend wurde für menschliche Chondrozyten bei erhöhter Endoglinexpression eine verminderte Kollagen II Expression festgestellt [115].

Angiopoietine (ANGPTs) regulieren über tie-Rezeptoren die Ausbildung und Integrität von Blut- und Lymphgefäßen. Dabei bewirkt der Einfluss von Angiopoietin-1 im Sinne eines Agonisten des tie-2 Rezeptors das Wachstum, Überleben und die Stabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen von Endothelzellen. Angiopoietin-2 (ANGPT2) wirkt dahingegen hauptsächlich im Sinne eines Antagonisten auf den tie-2-Rezeptor, kann

kontextabhängig aber auch eine agonistische Funktion bezüglich tie-2 erfüllen [116, 117]. Neben den vier Isoformen ANGPT1-4, gibt es zahlreiche verwandte Angiotensin-related proteins (ANGPTLs), die dementsprechend ähnliche Effekte auslösen [118, 119]. Eine Studie zeigte, dass die Menge an ANGPTL-2 zum einen in arthrotischem Knorpel erhöht ist und zum anderen auch Matrixdegradation und Ausschüttung von Inflammationsmediatoren vermittelt [120]. Zusätzlich wurde ein direkter Einfluss von ANGPTL-4 auf MMPs entdeckt, insofern, dass viele dieser Proteasen eine bestimmte Reaktion, also Zu- oder Abnahme bei erhöhtem ANGPTL-4 zeigten [121].

Endothelin-1 (ET-1) ist ein Peptidhormon, das in allen Gefäßen des Körpers nachweisbar ist und starke Vasokonstriktion hervorrufen kann [122]. Endothelinrezeptoren werden nicht nur auf Endothelzellen exprimiert, sondern auch auf vielen anderen Zellen, darunter Chondrozyten [123]. Es konnte gezeigt werden, dass mit Endothelin-1 behandelte Chondrozyten mehr MMP-13 produzierten [124].

Nach der Sicht auf einige angiogenetische Marker ist festzustellen, dass die Wirkweise einiger angiogenetischer Biomoleküle sehr vielfältig ist und sich oft nicht nur auf ein Organ oder Kompartiment beschränkt und auch nicht nur einem einzigen Attribut der Arthrose zuzuschreiben ist. Zusätzlich bleibt die Frage, an welcher Stelle der Prozess der Vaskularisierung im Arthrosegeschehen einzuordnen ist. Ist es lediglich ein Nebenprodukt der erhöhten angiogenetischen Faktoren, die durch metabolische Dysbalance der Chondrozyten vermehrt produziert werden und wie beschrieben, zur Destruktion der physiologischen Knorpelbiologie beitragen? Oder ist es ein gewollter Versuch, die Arthroseprogression in bislang unverstandener Weise durch Vaskularisierung aufzuhalten?

Knochenumbau

Als letzter Abschnitt in diesem Kapitel soll ein Blick auf ein weiteres Merkmal der Gelenkarthrose geworfen werden, nämlich die subchondrale Knochenveränderung. Es ist bekannt, dass es im Laufe der Arthrose zu einer Knochenverdichtung, Mikrofrakturen und der Ausbildung von Osteophyten kommt. Dies geschieht zum einen durch abnorme Belastung bei abnehmender Knorpeldicke und zum anderen durch direkten Kontakt von Entzündungs- und Wachstumsmediatoren der Synovialflüssigkeit mit dem subchondralen Knochen. Dieser Kontakt wird möglich, wenn die Knorpelschicht rissig wird und tiefe Fissuren entstehen, wobei auch Mikrofrakturen des subchondralen Knochens eine Rolle spielen [125]. Auch hier liegt also eine komplexe Interaktion von mehreren Bestandteilen des Gelenks zugrunde, bei der Signalketten von Biomolekülen zum Fortschritt der

Krankheit führen. Im Folgenden werden einige Moleküle vorgestellt, die in das Knochenremodeling bei Arthrose involviert sind.

Bone morphogenic proteins sind eine Gruppe von Signalmolekülen aus der TGF- β -Superfamilie, die von Makrophagen, Chondrozyten und Knochenzellen exprimiert werden und unter anderem eine Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, aber auch Chondrozyten induzieren können [126, 127]. Dem entsprechend kommt BMPs eine tragende Rolle bei der enchondralen Ossifikation zu [128]. Wegen ihrer bekannten Funktionen wurden einige ihrer Vertreter in der Vergangenheit dann auch auf die Beteiligung an der Entstehung von Arthrose untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass der Einfluss der BMPs über subchondrale Sklerosierung und Osteophytenbildung hinaus geht [129]. Ein ausgewogenes Vorkommen von BMPs ist nämlich unabdingbar für eine intakte Knorpelbiologie. Die Rolle von Bone morphogenic protein 9 (BMP9) ist dabei bislang nur schlecht verstanden, jedoch deuten Studien darauf hin, dass es ein wichtiger Regulator in der Ausbildung von Knorpel ist [130].

Ein weiterer wichtiger Faktor für den Knochenumbau ist Osteopontin (OPN), welches als erstes in Osteoblasten entdeckt wurde, aber auch von zahlreichen anderen Zellarten, mitunter Chondrozyten, produziert wird [131]. In Osteoblasten der sklerotischen Zone bei Arthrose ist es signifikant erhöht [132]. Neben der Vermittlung der Adhäsion zwischen Knochenzellen und Knochenmatrix wirkt OPN auch stimulierend auf die Osteoklastenfunktion und inhibierend auf die Matrix Mineralisierung [133]. Außerdem wurde gezeigt, dass OPN die Differenzierung und Proliferation bei von Osteoprogenitorzellen von Mäusen *in vitro* negativ reguliert [134]. Auch für den arthrotischen Gelenkknorpel wurde eine erhöhte Expression von OPN auf mRNA-Ebene gezeigt [135]. Für den Gelenkknorpel resultiert durch exzessiven Einfluss von OPN eine Degradation, nicht zuletzt durch eine vermehrte Ausschüttung von MMP-13 [136]. Und auch wenn die Menge an OPN in Gelenkflüssigkeit und Blutplasma mit dem jeweiligen Arthrosestatus korreliert, so bleibt bislang unklar, wie es genau zur arthrotischen Knochenveränderung beiträgt [136].

Follistatin (FST) ist ein omnipäsenes Glykoprotein, das in fast allen Geweben des Körpers zu finden ist – auch Chondrozyten produzieren FST und es ist im Gelenkknorpel vorhanden [137]. Für den Knochen wird seine Relevanz durch den Antagonismus der TGF- β -Superfamilie, zu der Activine und BMPs gehören, bedingt. Activine sind proinflammatorische Zytokine, die auch dafür bekannt sind, Knochenbildung zu induzieren [138]. Durch die Bindung und Inhibition von Activin, und dessen entzündlicher und

somit destruktiven Wirkung auf Knorpel und Gelenkschleimhaut konnte gezeigt werden, dass FST zur Gelenkphysiologie beiträgt [139].

Hepatocyte growth Factor (HGF) ist ein Wachstumsfaktor, der exzessiv von Osteoblasten des subchondralen Knochens ausgeschüttet wird [140]. In der Folge führt es zu einer Stimulation von Faktoren der TGF- β -Superfamilie, im speziellen von BMP-2, das für Knochenformation und Gefäßneubildung im Rahmen von Frakturheilung bekannt ist [141].

Dass HGF nicht von Chondrozyten exprimiert wird, aber trotzdem im Gelenkknorpel nachgewiesen wurde, zeigt einmal mehr die Komplexität der Zusammenhänge bei Arthrose [140]. Die Verfügbarkeit sämtlicher Biomarker in allen angrenzenden Strukturen im Gelenk, also Gelenkknorpel, Gelenkschleimhaut und subchondraler Knochen, macht eine präzise Zuordnung von Molekül und Wirkung nur schwer möglich. Schlüssel-moleküle und -prozesse müssen identifiziert werden, um alle Facetten der Veränderungen bei Arthrose zu verstehen.

2.2.4 Diagnostik

Eine ausführliche Anamnese bei Arthrose bildet die Grundlage für weiterführende Diagnostik. Dabei sollte am Ende des Gesprächs in jedem Fall die Schmerzbelastung und der Leidensdruck des Patienten eruiert sein, um später die Indikationsstellung für therapeutische Konsequenzen abwägen zu können. Im Rahmen der körperlichen Untersuchung können dann genauere Hinweise auf weitere möglicherweise erforderliche Diagnostik, auch apparativer Art gefunden werden.

Bildgebende Verfahren bieten die Möglichkeit, den Schweregrad der Gelenkerkrankung festzustellen und die Diagnose einer Arthrose objektiv zu sichern. Bei der Gonarthrose ist die primäre bildgebende Diagnostik eine konventionelle Röntgenuntersuchung, wobei typische Zeichen wie Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerosierung, osteophytäre Anbauten und Geröllzysten erkannt werden können. In speziellen Fragestellungen, wenn die Ursache der Beschwerden nach Anamnese, körperlicher und radiologischer Untersuchung noch nicht geklärt ist, können weitere bildgebende Verfahren wie Computertomografie, Magnetresonanztomografie oder Sonografie eingesetzt werden. Gelenkpunktionen mit anschließender Laboruntersuchung der Gelenkflüssigkeit können durchgeführt werden, um rheumatische Erkrankungen oder Infekte auszuschließen. Im äußersten Fall kann eine Gelenkspiegelung Aufschluss über den Zustand von Gelenkknorpel und Gelenkschleimhaut geben. Serologische Marker

oder gar Biomarker in Synovialflüssigkeit oder Gelenkknorpel, die für die Diagnose, Prognose oder Therapiekontrolle der Arthrose von Nutzen wären, sind bisher nicht etabliert. Wie bereits beschrieben, wurden in der Vergangenheit zahlreiche Biomarker bezüglich ihres diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Potenzials vorgeschlagen. Jedoch resultierte daraus bis heute kein praktischer Nutzen [25, 142]. Ein alternativer Vorschlag in diesem Zusammenhang sind chondrozytäre Muster als bildbasierte Biomarker [43].

Das Ausmaß der Gelenkschädigung wird somit bis heute überwiegend radiologisch klassifiziert. Den Anfang machte 1957 die Klassifikation nach Kellgren und Lawrence, bei der röntgenologisch anhand von Gelenkspaltverschmälerung, subchondraler Sklerosierung, Osteophytenbildung, Unregelmäßigkeit der Gelenkflächen und Deformation oder Nekrose der Gelenkpartner in vier Stadien kategorisiert wird [143]. Mit der Klassifikation von Outerbridge kam 1961 ein diagnostisches Werkzeug zur arthroskopischen Beurteilung des Gelenkknorpels dazu [144]. Etwas detaillierter aufgeschlüsselt und hierauf basierend veröffentlichte die Osteoarthritis Research Society International 2006 ein weiteres Klassifikationssystem auf rein histopathologischer Basis [145].

Neben den genannten Klassifikationen wurden in der Vergangenheit zahlreiche weitere Einteilungen veröffentlicht, immer mit dem Ziel, den Krankheitsstatus möglichst präzise zu erfassen, um dann eine sichere Indikationsstellung für die Therapie abzuleiten. In der Praxis besteht jedoch immer noch die weitgehende Abhängigkeit der Indikation zu einem operativen Vorgehen von der Patientenanamnese. Spezifische Einteilungen sind vor allem bei knorpelregenerativen Verfahren von Bedeutung. Gerade bei der Frage nach gelenkersetzenden Operationen können Patienten, die nach Kellgren und Lawrence eine hochgradige Arthrose haben, durchaus von ganz unterschiedlichen Leidensdrücken berichten, was entsprechende Konsequenzen auf die Therapieentscheidung hat.

Somit sind für die Zukunft Klassifikationssysteme wünschenswert, die zum einen direkter mit den anamnestischen Parametern korrelieren und zum anderen aber auch früher als radiologisch und makroskopisch erfassbar sind. Das Feld der molekularen Biomarker bietet dahingehend interessante Möglichkeiten, Diagnostik, Prognose und Therapie von Arthrose stichhaltig zu machen.

2.2.5 Therapie

Gelenkarthrose ist bis heute nicht heilbar, weshalb sich die Therapieziele auf Schmerzlinderung und den Funktionserhalt der betroffenen Gelenke beschränken. Die

Therapiestrategie ist dabei vor allem von Erkrankungsstadium, Erkrankungsursache und Symptomatik abhängig. Den Anfang bildet die konservative Therapie, die zunächst einmal nichtmedikamentös gestaltet werden kann. Neben der ausführlichen Aufklärung über den Krankheitsverlauf und dem Hinweis auf den eigenen Einfluss darauf können Physiotherapie, Physikalische Therapie, Ergotherapie, orthopädische Hilfsmittel und Naturheilverfahren Besserung verschaffen. Die medikamentöse Therapie erfolgt nach dem WHO-Stufenschema, mit dem Ziel, Schmerzen und Entzündung zu minimieren. Nichtsteroidale Antiphlogistika entsprechend Stufe 1 haben sich diesbezüglich bewährt; Opioidanalgetika, entsprechend Stufe 2 und 3 sind aufgrund ihrer Nebenwirkungen und ihres Abhängigkeitspotentials nur in Ausnahmefällen indiziert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der intraartikulären Injektion von Glucocortikoiden und Hyaluronsäure. Wenn die konservative Therapie nicht mehr ausreicht, um den Leidensdruck des Patienten zu mindern, kann über operative Methoden nachgedacht werden. Möglichkeiten der gelenkerhaltenden Operationen sind Arthroskopien, Umstellungsosteotomien und Methoden der Gelenkflächenwiederherstellung in Form von autologen osteochondralen Transplantationen oder matrixgekoppelten autologen Chondrozytentransplantationen. Ultima Ratio bei der Behandlung der Gelenkarthrose sind die gelenkersetzenden Operationen mit Einbau von Endoprothesen [25, 142].

Die Prävalenz von Arthrose wurde bereits dargelegt und der Blick auf die Operationszahlen zeigt, dass die Therapie für viele Arthrosepatienten in einer endoprothetischen Versorgung endet. Zum Beispiel belief sich die Zahl der Implantationen einer Endoprothese am Kniegelenk (OPS 5-822) im Jahre 2018 auf 190.427, womit derartige Eingriffe unter den 15 häufigsten Operationen für dieses Jahr liegen [146]. Auf dem Gebiet der Endoprothetik hat sich in den letzten Jahrzehnten viel getan. Mittlerweile können prinzipiell Endoprothesen individuell auf die Knorpeldefekte des Patienten angepasst werden und sämtliche Bandstrukturen bei der Operation erhalten werden. Dass so viele Patienten letztlich doch eine Prothese, in welcher Form auch immer benötigen zeigt, dass ein Therapieansatz zur Heilung der Arthrose sehr weit entfernt ist. Medikamentöse Interventionen auf Ebene von Biomarkern müssen noch besser erforscht werden, um aufwendige Operationen und verbundene Risiken in Zukunft zu vermeiden und vor allem, um Ursachen anstatt Symptome zu therapieren.

2.3 Onkoprozesse

Im Gegensatz zur anfänglichen Vermutung, dass Gelenkarthrose und die damit verbundene Knorpeldegeneration lediglich eine Folge von Nutzung und Abnutzung ist, ist

heutzutage verstanden, dass die zugrundeliegenden Mechanismen vielseitig und komplex sind. Bei Betrachtung der Attribute von Arthrose fällt auf, dass sich vereinzelt Ähnlichkeiten zum Wachstum von malignen Neoplasien ergeben. Besonders sticht dabei der Aspekt der Zellproliferation heraus, die in den allermeisten Fällen maßgeblich den Progress der Krebserkrankung befördert. Bei Arthrose kommt es im Laufe der Gewebedegeneration zur Entstehung von Zellclustern. Darüber hinaus gibt es bei beiden Entitäten häufig Änderungen in der zellulären Differenzierung beziehungsweise eine Änderung des zellulären Phänotyps. Beide Krankheiten werden regelhaft mit dem Vorkommen von inflammatorischen Prozessen begleitet. Angiogenese, eine ebenfalls zentrale Eigenschaft von vor allem schnell wachsenden malignen Neoplasien, wurde in der Vergangenheit immer wieder mit Arthrose in Verbindung gebracht, wobei der genaue Zusammenhang mit Arthrose bislang jedoch relativ unverstanden ist. Fast gänzlich unerforscht in Bezug auf Arthrose ist die Regulation des Immunsystems, insbesondere die Interaktion von Checkpoint-Proteinen. Im Bereich der onkologischen Forschung konnten durch Etablierung von Checkpoint-Inhibitoren bei der Behandlung von Tumoren bereits große Erfolge erzielt werden.

Im folgenden Abschnitt sollen daher zunächst kurz allgemeine Kennzeichen der malignen Tumorentstehung erläutert werden. Anschließend wird das Chondrosarkom, ein maligner Knochentumor dessen Zellen Knorpelsubstanz produzieren, eingeführt. Dabei soll es auch um bisherige Forschungen zur Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren gehen.

2.3.1 Hallmarks of Cancer

Die Entstehung maligner Tumoren wurde durch zehn Merkmale gekennzeichnet [147]:

1. Selbstversorgung mit Wachstumssignalen:

Normalerweise benötigen die Zellen des Körpers externe Wachstumsfaktoren, um zu wachsen und um sich zu teilen. Krebszellen produzieren jene Faktoren selbst in autokriner Manier. Darüber hinaus werden Signalwege, die Wachstum und Zellteilung befördern, permanent aktiviert und Inhibitoren entsprechender Signalwege deaktiviert.

2. Unempfindlichkeit gegenüber anti-Wachstumssignalen:

Zellteilung und -wachstum unterliegen einer strikten Kontrolle von Tumor-suppressor-Proteinen, die sicherstellen, dass geschädigte Zellen nicht weiterwachsen und eventuell sogar in Apoptose gehen. Diese Tumor-suppressor-Proteine sind durch Mutation oder Inhibition so verändert, dass sie ihre Funktion verlieren. Zusätzlich entfällt der Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition.

3. Vermeidung von Apoptose:

Zellen sind in der Lage, sich in Form von programmiertem Zelltod selbst zu zerstören. Krebszellen können sich dem entziehen, indem sie Mechanismen zur Erkennung von Zellschäden verändern und Signalwege zur Induktion von Apoptose nicht aktiviert werden.

4. Endloses Replikationspotential:

Gesunde Zellen sterben nach einer bestimmten Anzahl an Teilungen. Krebszellen manipulieren dieses Limit, indem sie einerseits die Telomere der DNA verlängern und andererseits Tumor-suppressor-Proteine wie P53 deaktivieren.

5. Anhaltende Angiogenese:

Maligne Tumoren sind in der Lage, durch Ausschüttung von Angiogenesefaktoren wie VEGF die Bildung von Blutgefäßen zu initiieren, um die schnell wachsenden Krebszellen mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen.

6. Gewebeinvasion und Metastasierung:

Zellen maligner Tumoren sind in der Lage, sich von ihrer ursprünglichen Umgebung zu lösen, um umliegendes Gewebe zu infiltrieren oder sogar in fernere Orte des Körpers einzuwandern.

7. Deregulation des zellulären Metabolismus:

Krebszellen beziehen ihre Energie überwiegend aus der Glykolyse und Milchsäurevergärung. Sie umgehen anschließend die mitochondriale Atmungskette und nutzen das entstandene Pyruvat nicht für eine maximale ATP-Gewinnung, sondern als Bausteine für weitere Zellen.

8. Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem:

Durch veränderte Expression von Oberflächenmolekülen, die dem Immunsystem normalerweise anzeigen, dass eine Zelle eliminiert werden muss, geht diese Kontrollfunktion für Krebszellen verloren (detailliertere Darstellung siehe Abschnitt Immuncheckpoint-Inhibitoren).

9. Tumorfördernde Entzündung:

Viele maligne Tumoren werden von einer lokalen chronischen Inflammation begleitet, die Angiogenese und Immunantwort fördert.

10. Genommutation und Instabilität:

Krebszellen weisen oft mehrere schwere chromosomale Abnormalitäten auf, die den Tumorprogress bedingen.

2.3.2 Chondrosarkom

Das Chondrosarkom ist ein primärer maligner Knochentumor, der Knorpelmatrix produziert. Nach dem Osteosarkom ist es der zweithäufigste maligne Knochentumor beim Erwachsenen [148]. Das Grading von Stufe G1 bis G4 erfolgt histologisch nach klassischen malignen Charakteristika. Das Staging nach WHO-Klassifikation unterteilt zunächst in zentral-konventionell, wenn der Tumor dem Markraum des Knochens entspringt und sekundär, wenn der Ursprung einer bestehenden Knorpelläsion wie einem Osteochondrom oder Enchondrom ausgeht. Darüber hinaus gibt es die Klassen mesenchymal, dedifferenziert, klarzellig und periostal, die das Staging ergänzend definieren können [149]. Da

Chondrosarkome weitestgehend strahlen- und chemoresistent sind, bleibt als Therapiemöglichkeit fast ausschließlich die chirurgische Entfernung.

2.3.3 Immuncheckpoints

Wie für sämtliche andere maligne Neoplasien gelten auch für Chondrosarkome die oben genannten Kernmerkmale der malignen Tumorentstehung. In der Krebstherapie ist das Themenfeld der Immuncheckpoint-Inhibition in jüngerer Vergangenheit immer mehr in den Vordergrund gerückt, um das Merkmal „8. Vermeidung der Zerstörung des Immunsystems“ zu behandeln. Immuncheckpoints sind Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, die deren Immunantwort entweder steigern oder abschwächen. Physiologischerweise regulieren solche Rezeptoren vor allem die Aktivierung jener Immunzellen. Zu den abschwächenden Immuncheckpoints gehören Programmed cell death protein 1 (PD1), Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) und T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM3). Krebszellen versuchen mit entsprechenden Liganden die abschwächenden Immuncheckpoints zu binden, um die Immunantwort zu reduzieren. Dadurch kann der bösartige Tumor ungehinderter wachsen [150].

Bislang gibt es nur sehr wenige Studien zur Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei Chondrosarkomen. Festgestellt wurde, dass viele Chondrosarkome Programmed cell death 1 ligand 1 (PDL1), also einen Liganden von PD1, exprimieren. In Einzelfällen konnte auch gezeigt werden, dass der direkte Antikörper-Block von PD1, also Inhibition der Bindung durch PDL1, einen Nutzen in der Therapie von Chondrosarkomen bieten kann [151].

Eine erhöhte Expression von B7-H3 (CD267), ein Ligand des CTLA4 Rezeptors, wurde bereits in konventionellen und dedifferenzierten Chondrosarkomen nachgewiesen. CTLA4 Expression war in beiden Chondrosarkomtypen aber nur minimal erhöht. Die Expression von TIM3 hingegen war stark erhöht. Die Herkunft von CTLA4 und TIM3 in den Chondrosarkomen sind die tumor-infiltrierenden Lymphozyten [152]. Studien, die die Wirksamkeit von CTLA4 oder TIM3-Inhibition bei Chondrosarkomen geprüft hätten, gibt es bislang nicht.

Zu den Immuncheckpoints werden ebenfalls die TLRs gezählt. Eine Subgruppe, zu der auch Toll-like receptor 2 (TLR2) gehört, sind Membranproteine auf der Oberfläche von diversen Immunzellen. Es wirkt im Gegensatz zu den bereits genannten aber stimulatorisch auf die Immunantwort durch Induktion der Zytokinausschüttung. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TLRs auch von vielen Krebszellen exprimiert werden. Die

Funktionen in diesem Zusammenhang sind vielseitig, komplex und noch nicht endgültig verstanden [153]. Auch in Zusammenhang mit Chondrosarkomen gibt es bislang keine aussagekräftigen Studien.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, bestimmte Schlüsselaspekte der Knorpeldegeneration im Rahmen von Arthrose auf Molekularebene zu erarbeiten. Bei endgradiger Arthrose liegen die Chondrozyten in großen lokalen Zellhaufen (Clustern) vor unter Zunahme der Gesamtzellzahl im Knorpel. Diesem Zustand muss somit eine ausgedehnte Zellproliferation vorangegangen sein. Aus diesem Grund wurde als besonderer Blickwinkel auf die molekularen Veränderungen bei Arthrose der Vergleich zu Onkoprozessen gezogen, um hierzu Gemeinsamkeiten und Unterschiede herauszuarbeiten.

Es wurden 33 Biomarker aus den Bereichen Proliferation und Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints ausgewählt und quantitativ oder semi-quantitativ mittels Multiplex-Assay gemessen. Nahezu alle Biomarker wurden bereits zumindest teilweise im Zusammenhang mit Gelenkarthrose und/oder Krebsprozessen von anderen Forschungsgruppen untersucht und ließen sich von mir auch entsprechend der „Hallmarks of Cancer“ kategorisieren. Durch die Beschreibung von degenerationsstadienspezifischen Chondrozytenmustern bei Gelenkarthrose wurde jedoch nun eine optische Gewebeselektion möglich, die über den einfachen Vergleich von gesundem und arthrotischem Knorpel hinaus geht. Dadurch wurde eine sehr detaillierte und kleinschrittige Untersuchung der Pathophysiologie bei Arthrose möglich. Es konnte nun eine Einbettung der vorliegenden Prozesse in den zeitlichen Ablauf der Degeneration erfolgen durch eben die Zuordnung der untersuchten Proteinisolate aus dem Knorpel der Femurkondylen zu den verschiedenen beschriebenen räumlichen Chondrozytenmustern (Strings, Double Strings, Small Cluster, Big Cluster und Diffuse). Für den weiteren Vergleich diente Proteinisolat von intaktem Femurkondylen-Knorpel eines 14-jährigen Jungen und Chondrosarkomzellen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Farbstoffe

Farbstoff	Hersteller
Calcein	Cayman/Biomol Hamburg, Deutschland
DAPI	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA

Tab. 1: Verwendete Farbstoffe.

3.1.2 Multiplex Assay Kits

Multiplex Assay Kit	Hersteller
Human Circulating Cancer Biomarker Magnetic Bead Panel 1 (Kat. Nr. HCCBP1MAG-58K)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Angiogenesis / Growth Factor Magnetic Bead Panel 1 (Kat. Nr. HAGP1MAG-12K)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Panel Magnetic Bead Panel (Kat. Nr. HCKPMAG-11K)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
7-Plex Early Apoptosis Magnetic Bead Kit (Kat. Nr. 48-669MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Tab. 2: Verwendete Multiplex Assay Kits.

Lösungen und Puffer aus Multiplex Assay Kits

Lösung/Puffer aus Kit	Hersteller
10X Wash Buffer (Kat. Nr. L-WB)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
7-plex Early Apoptosis, Biotin (20X) (Detection Antibody)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

(Kat. Nr. 44-669KMG)	
Amplification Buffer (1X) (Kat. Nr. 43-024A)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Assay Buffer (Kat. Nr. L-AB)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Assay Buffer 2 (Kat. Nr. 43-041)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Bead Diluent (Kat. Nr. LBD-4)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Angiogenesis / Growth Factor Panel 1 Detection Antibodies (Kat. Nr. HAGGFP1-1012-1)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Circulating Cancer Biomarker Panel 1 Detection Antibodies (Kat. Nr. HCC-1058)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Detection Antibodies (Kat. Nr. HCKP-1011)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-Phycoerythrin (Kat. Nr. L-SAPE4)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Tab. 3: Verwendete Lösung/Puffer aus Multiplex Assay Kit.

Standards aus Multiplex Assay Kits

Standard	Hersteller
Human Angiogenesis / Growth Factor Panel 1 Standard (Kat. Nr. HAGGFP1-8012-1)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Circulating Cancer Biomarker Panel 1 Standard (Kat. Nr. HCC-8058)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Standard (Kat. Nr. HCKP-8011)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Tab. 4: Verwendete Standards aus Multiplex Assay Kits.

Qualitätskontrollen aus Multiplex Assay Kits

Qualitätskontrolle	Hersteller
A549 Cell Lysate: Camptothecin (Kat. Nr. 47-218)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
HeLa Cell Lysate: Lambda Phosphatase (Kat. Nr. 47-229)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Angiogenesis / Growth Factor Panel 1 Quality Controls 1 and 2 (Kat. Nr. HAGGFP1-6012-1)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Circulating Cancer Biomarker Quality Controls 1 and 2 (Kat. Nr. HCC-6058)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Quality Controls 1 and 2 (Kat. Nr. HCKP-6011)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Jurkat Cell Lysate: Anisomycin (Kat. Nr. 47-207)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Jurkat Cell Lysate: Paclitaxel (Kat. Nr. 47-220)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Tab. 5: Verwendete Qualitätskontrollen aus Multiplex Assay Kits.

Antikörper-immobilisierte magnetische Beads aus Multiplex Assay Kits

Antikörper-immobilisierte magnetische Beads	Hersteller
7-plex Early Apoptosis, Magnetic Beads (20X) (Kat. Nr. 42-669MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human Angiopoietin-2 Bead (Kat. Nr. HANGPT2-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human BMP-9 Bead (Kat. Nr. HBMP9-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human CTLA-4 Bead (Kat. Nr. CTLA-4-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human EGF Bead (Kat. Nr. HAGEGF-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Anti-Human Endoglin Bead (Kat. Nr. HENDGLN-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human Endothelin-1 Bead (Kat. Nr. HET1-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human FGF-1 Bead (Kat. Nr. HFGF1-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human FGF-2 Bead (Kat. Nr. HFGF2-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human Follistatin Bead (Kat. Nr. HFLSTN-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human HB-EGF Bead (Kat. Nr. HHBEGF-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human HGF Bead (Kat. Nr. HHGF-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human IL-6 Bead (Kat. Nr. HIL6-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human IL-8 Bead (Kat. Nr. HIL8-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human Leptin Bead (Kat. Nr. HCCLPTN-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human MIF Bead (Kat. Nr. HMIF-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human OPN Bead (Kat. Nr. HOPN-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human PD-1 Bead (Kat. Nr. PD1-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human PD-L1 Bead (Kat. Nr. PDL1-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human sFas Bead (Kat. Nr. HSFAS-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human sFasL Bead (Kat. Nr. HSFASLG-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human TGF α Bead (Kat. Nr. HTGFA-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human TIM-3 Bead (Kat. Nr. TIM3-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human TLR-2 Bead (Kat. Nr. TLR2-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Anti-Human TNF α Bead (Kat. Nr. HTNFA-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human TRAIL Bead (Kat. Nr. HTRAIL-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Anti-Human VEGF Bead (Kat. Nr. HVEGF-MAG)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland

Tab. 6: Verwendete Antikörper-immobilisierte magnetische Beads aus Multiplex Assay Kits.

3.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
Chondrosarkom Grad II SW-1353 (Art. Nr. 300440)	CLS Cell Lines Service GmbH Eppelheim, Deutschland

Tab. 7: Verwendete Zelllinien.

3.1.4 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller
70% Ethanol	SAV-LIQUID Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
Bovines Serumalbumin (REF A1391,0050)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10X) (REF 9803S)	Cell Signaling Technology Danvers, USA
Dimethyl Sulfoxide for cell culture (REF A3672,0100)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (REF 41966-029)	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium + Gluta- Max –I (REF 31966-021)	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (REF 14190-094)	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA
Fetal calf serum (FCS) (REF S0615)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim am Albuch, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium (S3023)	DakoCytomation GmbH Hamburg, Deutschland

Formaldehyd	Carl Roth GmbH&Co.KG Karlsruhe
Fungizone Antimycotic 6ml (Kat. Nr. 15290-026)	Life Technologies Carlsbad, USA
Penicillin Streptomycin 10 ml (Pen Strep) (Kat. Nr. 15140122)	Life Technologies Carlsbad, USA
Proteinase Inhibitor Cocktail Set III (REF 539134-1ML)	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Sheath Fluid (REF 171000055)	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Trypanblau-Lösung (REF T8154)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Trypsin EDTA (REF T4174)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Tab. 8: Verwendete Lösungen und Puffer.

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96 well-cell culture plate (REF 655160)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
96 well-filter plate (Kat. Nr. MX-Plate)	Merck Milipore Darmstadt, Deutschland
Biopsie-Stanzen (REF 49301)	pfm medical ag Köln, Deutschland
Deckgläser 24 x 50 mm	R. Langenbrinck GmbH Emmendingen, Deutschland
Desinfektionsmittel Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH Malsfeld, Hessen
Eppendorf Gefäße 0,5 ml (REF0030124537) 1,5 ml (REF 0030120086) 2 ml (REF 0030120094)	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen (REF 10654721)	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA
Nitril Handschuhe Größe M (REF 942206)	PAUL HARTMANN AG Heidenheim an der Brenz, Deutschland

Objektträger SuperFrost Plus (REF 03-0060)	R. Langenbrinck GmbH Emmendingen, Deutschland
Petrischalen 145 x 20 mm (REF 639161)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter 1-10 µl (REF 692063) 10-100 µl (REF 692066) 100-1000 µl (REF 790058)	Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland
Skalpell No. 21 (REF 02.001.30.021)	FEATHER Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan
Stangenpipetten mit Filter 5 ml (REF 357543) 10 ml (REF 357551) 25 ml (REF 357525)	Falcon Life Sciences Cornin, New York
Zellkulturflaschen 250 ml (REF 658170)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugationsgefäße 15 ml (REF 188261) 50 ml (REF 210261)	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland

Tab. 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

3.1.6 Geräte

Geräte	Hersteller
Aurum Vacuum Manifold	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Bio-Plex 200 System	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Brutschrank CB 150	neoLAB Heidelberg, Deutschland
Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe – Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Deutschland
Kolbenhubpipetten Research Plus 1-10 µl 10-100 µl	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

100-1000 µl	
Kryotom Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Nussloch, Deutschland
Laserscanning Mikroskop 510 Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland
Mikroskop Leica DM IRBE	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie Nussloch, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht "Assistent" GmbH Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH Sonnenbühl, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Vortexmischer REAXtop	Heidolph Schwabach, Deutschland
Wasserbad W 12	Labortechnik Medingen Hohenfels-Liggersdorf, Deutschland

Tab. 10: Verwendete Geräte.

3.1.7 Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Inc. San José, USA
Adobe Photoshop CC 2018	Adobe Inc. San José, USA
Axio Vision Rel. 4.8 Ink.	Carl Zeiss Microscopy GmbH Jena, Deutschland
Bio-Plex Manager 4.1.1	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, USA
Corel Draw Graphics Suite 2020	Corel Corporation Ottawa, Kanada
EndNote X9	Clarivate Analytics Philadelphia, USA

GraphPad Prism 8	GraphPad Software San Diego, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation Redmond, USA

Tab. 11: Verwendete Software.

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl und Herkunft der Patientenproben

In die Studie eingeschlossen wurden ausschließlich Patienten, die an einer altersbedingten Gonarthrose litten und sich deshalb der Implantation einer Knie totalprothese unterziehen mussten. Dabei wurden seitenunabhängig alle angefallenen Resektate der Femurkondylen für diese Studie verwendet. Der Gelenkersatz erfolgte entweder im Winghofer Medicum Rottenburg a.N. oder in der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer rheumatischen Gelenkerkrankung und Tumorerkrankungen des Binde- und Stützgewebes, die das Kniegelenk betreffen hätten. Darüber hinaus wurden alle Patienten ausgeschlossen, die an einer Infektion mit Hepatitis B, C und/oder HIV litten, aufgrund der Gefahr der parenteralen Übertragung bei der Präparation des Gewebes. Weiterhin wurde Gewebe eines 14-jährigen Tumorpatienten mit erforderlichem Kniegelenkersatz verwendet. Vor jeder Operation erfolgte eine Aufklärung der Patienten über die Studienteilnahme. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor (Nr. 674/2016BO2).

3.2.2 Vorbereitung der Proben für Proteinextraktion

Während der Operation angefallene Resektate der Femurkondylen wurden unmittelbar in mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gefüllten Probengefäßen gelagert und in das Zellforschungslabor überführt. Das DMEM enthielt einen Zusatz von 2% (v/v) Penicillin-Streptomycin und 1,2% (v/v) Amphotericin B, um die Proben vor bakterieller und mykotischer Kontamination zu schützen. Unter der Sterilbank erfolgte das Umbetten der Knorpel-Knochen-Fragmente in Petrischalen zur weiteren Verarbeitung. Es wurden etwa 1 x 1 cm große Chips der oberflächlichen Knorpelschicht durch tangentielle Schnittführung abgetrennt (Abb. 6 A, B). Als nächstes wurden Knorpelzylinder von 4 mm

Durchmesser aus den Knorpelchips ausgestanzt (Abb. 6 C, D) und zunächst in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen und DMEM gesammelt. Um nur an die oberflächlichste Schicht des Gelenkknorpels zu gelangen, mussten die Zylinder mit ihrer ehemals zur Gelenkfläche zeigenden Seite in eine 300 µm tiefe Aussparung einer spezialgefertigten Metallplatte gelegt werden (Abb. 6 E). Durch Fixieren der Knorpelzylinder und horizontale Schnittführung auf Niveau der Lochplatte entstanden 300 µm dicke Scheiben (Abb. 6 F), die anschließend wiederum in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß und DMEM gesammelt wurden. Für eine adäquate Färbung wurde dann je eine Scheibe in einem Schacht einer 96-Mikrotiterplatte zusammen mit der Färbelösung und 130 µm DMEM gelagert. Die Färbelösung bestand aus 4 µM Calcein AM Fluoreszenzfärbung, einer Zellfärbung, die nur unter lichtgeschützten Bedingungen verarbeitet wurde.

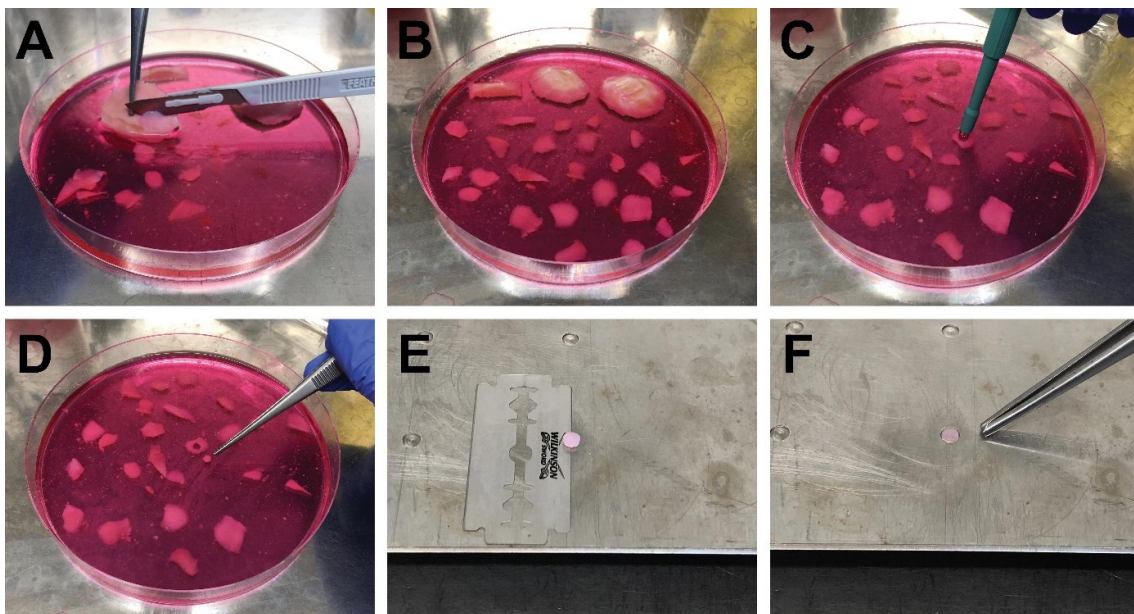


Abb. 6: Präparation des Kniegelenkknorpels für Proteinextraktion. Zunächst werden durch tangentielle Schnittführung (A) Knorpelchips vom Knochen abgetrennt (B). Anschließend werden mit einer Lochstanze Knorpelzylinder aus den Knorpelchips ausgestanzt (C, D). Zuletzt werden die oberflächlichen 300 µm der Knorpelzylinder mithilfe einer Rasierklinge und einer maßgefertigten Lochplatte abgeschnitten (E, F).

Nach dreißigminütiger Inkubationszeit bei 37 °C im Brutschrank konnte mit der Zuordnung der Knorpelscheiben entsprechend ihrer vorherrschenden zellulären Strukturmuster begonnen werden. Auf die Auswertung mit dem Polarisationsmikroskop und der Zuteilung der Scheiben zu den Gruppen Strings, Double Strings, Small Cluster, Big Cluster und Diffuse entsprechend des lokal dominanten Zellmusters der Chondrozyten (Abb. 7) folgte das Schockfrostten mit flüssigem Stickstoff der in Mikroreaktionsgefäßen

zusammengelegten Scheiben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben in einem Gefrierschrank bei -80 °C gelagert. Aus dem Tumorgewebe des 14-jährigen Tumorpatienten wurde zudem eine Chondrosarkom-Zelllinie (SW-1353) angezüchtet. Die Proteine dieser Zelllinie wurden unmittelbar nach Anzucht extrahiert.

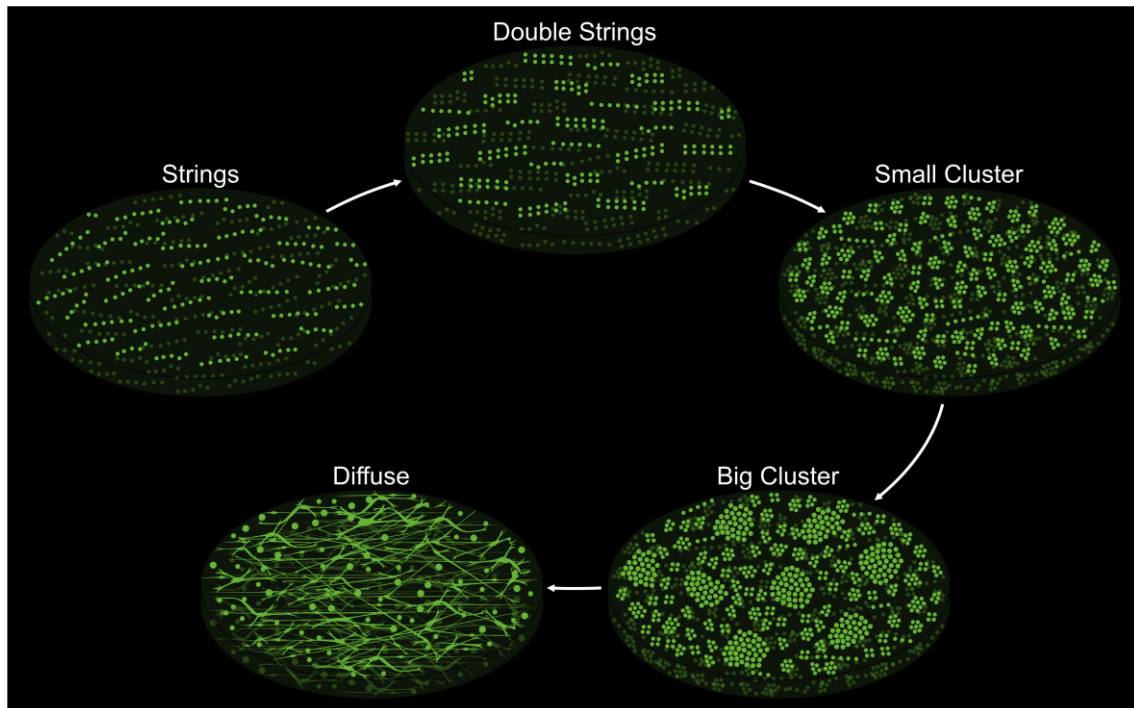


Abb. 7: Räumliche Chondrozytenmuster im Rahmen der Knorpeldegeneration. Abbildung zeigt die schematische Darstellung der für die Gewebeselektion entnommenen Knorpelscheiben mit den prädominanten Strukturmustern Strings, Double Strings, Small Clusters, Big Clusters und Diffuse, wobei die Zellen grün dargestellt sind. Unter dem Polarisationsmikroskop erscheinen die in den Experimenten mit Calcein angefärbten lebenden Chondrozyten grün, auch die Extrazellulärmatrix der Knorpelscheiben schimmert aufgrund von Autofluoreszenz grünlich.

3.2.3 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden für die Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht, Double Strings, Small Cluster, Big Cluster und Diffuse jeweils vier Gruppen, für vier Experimente, à 50 Knorpelscheiben (Discs) verarbeitet; für die Gruppe Strings zwei Gruppen à 50 Knorpelscheiben (Tab. 12). Jede Gruppe wurde jeweils in einem eigenen Mörser, Mikroreaktionsgefäß und einer eigenen Zentrifugen-Filtereinheit verarbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Weil kein verfügbarer Assay in der Lage ist die gesuchten Analyten in nur einer Knorpelscheibe oder auch in Knorpelscheiben von einer Musterkategorie von nur einem

Patienten nachzuweisen, war es notwendig, die Knorpelscheiben von verschiedenen Patienten in den jeweiligen Musterkategorien zu poolen. Nach Vorarbeiten aus dem eigenen Labor waren 50 Knorpelscheiben ausreichend, um letztlich eine Gesamtproteinmenge zu erreichen, die dann im Multiplex Assay voraussichtlich zu einem Ergebnis führen würde. Es wurden für die Musterkategorien Knorpelscheiben von 3 bis 18 Patienten gepoolt, um auf eine Gesamtmenge von 50 Knorpelscheiben zu kommen. Die Proteinextraktion für die Gruppe 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht konnte aus Knorpelscheiben nur eines Patienten erfolgen, da dort reichlich Knorpel vorhanden war und dieses wie zu erwarten nur Strings aufwies.

	Name des Experiments	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF	
quantitativ	1. Human Angiogenesis/Growth Factor Panel (HAGP1MAG-12K-10)	1 P	50 D	X		8 P	50 D	10 P	50 D	8 P	50 D	6 P	50 D
	2. Human Cancer Panel (HCCBP1MAG-58K-12)	1 P	50 D	18 P	50 D	9 P	50 D	5 P	50 D	4 P	50 D	4 P	50 D
	3. Human Immunocheckpoint Panel (HCKPMAG-11K-04)	1 P	50 D	9 P	50 D	13 P	50 D	5 P	50 D	4 P	50 D	4 P	50 D
semi-quantitativ	4. Early Apoptosis Panel (48-669MAG)	1 P	50 D	X		6 P	50 D	5 P	50 D	6 P	50 D	3 P	50 D

Tab. 12: Poolen der Knorpelscheiben. Die Tabelle zeigt die Anzahl der Patienten und die Anzahl der Knorpelscheiben (Discs), die in die jeweilige Musterkategorie (SS14-DIF), des jeweiligen Experiments eingeflossen sind. Die linke Spalte der Tabelle zeigt die Namen der Experimente an. Die linke Spalte innerhalb einer Musterkategorie zeigt an, von wie vielen verschiedenen Patienten die Discs jeweils gepoolt wurden. Die rechte Spalte innerhalb einer Musterkategorie gibt entsprechend an, wie viele Discs pro Musterkategorie für das entsprechende Experiment verwendet wurden. Bei X wurden keine Proben geladen. 14-Jahre alt Disc oberflächliche Schicht (SS14), Strings (SS), Double Strings (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC), Diffuse (DIF), Patienten (P), Discs (D).

Zunächst wurden die gefrorenen Knorpelscheiben in ihren Gruppen in flüssigem Stickstoff mit Stößel und Mörser zermahlen und danach in 200 µl Homogenisationspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2,5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml

leupeptin und Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 1:10) und Proteinaseinhibitoren 1:200 (100 mM AEBSF, 80 μ M Aprotinin, 5 mM Bestatin, 1,5 mM E-64, 2 mM Leupeptin und 1 mM Pepstatin A) in Mikroreaktionsgefäßen, 15 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Proben in einem Ultraschallbad behandelt. In fünf Zyklen wurden die Mikroreaktionsgefäße, die zuvor in einem Schaumstoff-Floß befestigt wurden, für jeweils 20 Sekunden beschallt, um die Zellmembranen der Chondrozyten zu zertrümmern und dann für 30 Sekunden auf Eis gelagert. Anschließend folgte die Zentrifugation der Proben bei 15000 g für 15 Minuten bei 4 °C und anschließender Sicherung der Proteinphase. Um das Proteinlysate weiter zu konzentrieren, wurden die Proben in Zentrifugen-Filtereinheiten überführt und nochmals für 15 Minuten bei 6000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zentrifugen-Filtereinheiten sind durchlässig für Proteine <5-10 kDa. Das Molekulargewicht keiner der für das Experiment relevanten Biomarker ist kleiner, somit wurden ausschließlich überflüssige Proteine abfiltriert. Die Rückstände in den jeweiligen Filtern wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration für die Multiplex-Assays verwendet.

Für die Proteinextraktion der Chondrosarkom-Zelllinie erfolgte keine Bearbeitung mit Stickstoff, Stößel und Mörser. Die Zellen wurden frisch aus der Kultur kommend zentrifugiert und der Überstand aus Zellkulturmedium wurde abpipettiert. Dann wurden die Zellen mit Homogenisationspuffer und Proteinaseinhibitoren versetzt. Das weitere Verfahren glich der Vorgehensweise mit den Knorpelscheiben.

3.2.4 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit Bradford-Test

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Messung von Proteinen in Lösung. Das Prinzip beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, welcher ungebunden in seiner doppelt protonierten, kationischen und roten Form (Absorptionsmaximum bei 470 nm) vorliegt. Nach der Komplexbildung von Proteinen mit dem Farbstoff wird seine deprotonierte, anionische und blaue (Absorptionsmaximum bei 595 nm) Form stabilisiert. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann dann photometrisch bestimmt werden und gilt als Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Für die genaue Konzentrationsbestimmung wird idealerweise eine Kalibrierungslösung des zu bestimmenden Proteins benötigt. Da in diesem Fall die Konzentration des Gesamtproteins aus Knorpellysate zu bestimmen war, wurde BSA als Standardprotein verwendet. Die Konzentration der Standardlösung betrug 1,41 mg/ml. Dafür wurde das BSA mit 0,9% (v/v) NaCl, 0,05% (v/v) NaN₃ Lösung zusammengebracht. Die Standardreihe bestand aus den Konzentrationen 0 μ g/ml (Nullwert), 5

µg/ml (Standard 1), 10 µg/ml (Std. 2), 20 µg/ml (Std. 3), 40 µg/ml (Std. 4), 60 µg/ml (Std. 5), 80 µg/ml (Std. 6) und 100 µg/ml (Std. 7). Die Proben wurden jeweils 1:100 verdünnt. Jeweils 80 µl von den Standardverdünnungen und den verdünnten Proben wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden jedem befüllten Well 20 µl Färbereagenz unter mehrmaligem resuspendieren hinzugegeben. Der gesamte Test wurde in Triplikaten durchgeführt (Abb. 8). Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte die Extinktion mit einem Photometer bei 620 nm gemessen werden.

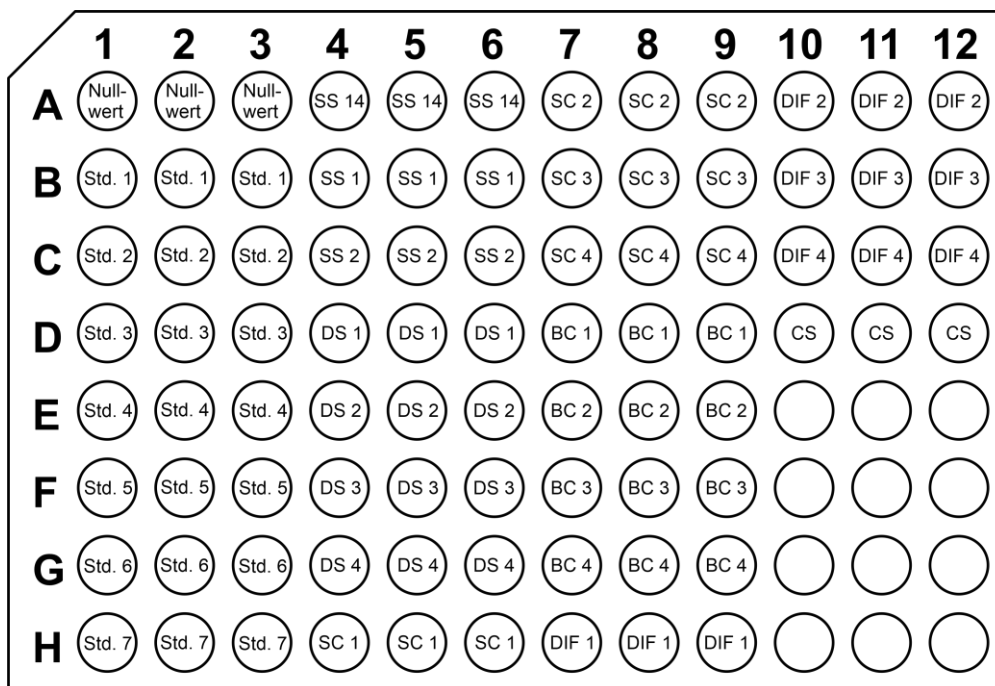


Abb. 8: Pipettierschema des Bradford-Tests. Standardreihe und Proben in Triplikaten: 14-Jahre alt Disc oberflächliche Schicht (SS 14), Strings (SS 1,2), Double Strings (DS 1-4), Small Cluster (SC 1-4), Big Cluster (BC 1-4), Diffuse Pattern (DIF 1-4), 14-Jahre alt Disc oberflächliche Schicht (SS 14), Chondrosarkomzellen (CS), Standard 1-7 (Std. 1-7).

Zur Bestimmung der Standardkurve wurden zunächst alle Mittelwerte für den Extinktions-Nullwert und jede Konzentration der Standardreihe berechnet. Anschließend wurde der gemittelte Nullwert von den gemittelten Werten der Standardreihe subtrahiert. Mit den ermittelten Werten wurde mithilfe von Microsoft Excel eine lineare Regression berechnet. Mit der entsprechenden Ausgleichgeraden der Form $y = mx + n$ ließ sich dann nach Umstellung die Probenkonzentration x bestimmen (Abb. 9).

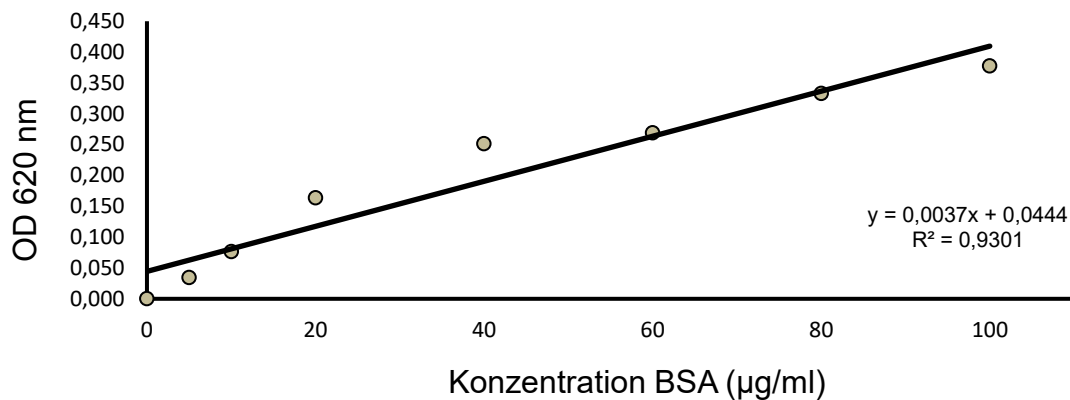


Abb. 9: Standardkurve des Bradford-Test. Diagramm zeigt die gemessene optische Dichte (OD) bei 620 nm (Y-Achse) in Abhängigkeit der Konzentration an bovinem Serumalbumin (BSA) in µg/ml (X-Achse). Aus den acht Messwerten bei 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml wurde die Ausgleichsgerade $y = 0,0037x + 0,0444$ berechnet und dargestellt mit $R^2 = 0,9301$. R^2 ist ein Gütemaß der linearen Regression und ist besser, je näher an 1.

3.2.5 Proteinnachweis mit Multiplex Assay

3.2.5.1 Messprinzip

Der Multiplex Assay ist eine Art von Immunoassay, bei dem mit Hilfe von antikörpergekoppelten magnetischen Mikrokugeln (Beads) mehrere Proteine/Analyten in einem Experiment gleichzeitig quantitativ oder semi-quantitativ nachgewiesen werden können. Die Mikrokugeln sind farbcodiert und tragen auf ihrer Oberfläche mehrere Analyten-spezifische Antikörper gegen jeweils ein Epitop pro Kugel. So kann bei der Messung jedem Farbcode einer Kugel automatisch ein spezifischer Antikörper zugeordnet werden. Diese Erstantikörper binden zunächst die Analyten der Probe. Anschließend wird dem Reaktionsansatz ein biotinylierter Erkennungsantikörper zugegeben, der in einem weiteren Schritt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wird. Diese binden nun an die bereits an den über Antikörper an den Mikrokugeln haftenden Analyte (Abb. 10 A). Bei der Messung mit einem Durchflusszytometer wird nun zunächst der Farbcode jeder Mikrokugel mit einem roten Laser bestimmt, um den Analyten als solches zuzuweisen. Zeitgleich wird mit einem grünen Laser die Intensität des Fluoreszenzsignals bestimmt, die von der Anzahl der Bindungsereignisse des Erstantikörpers an der Mikrokugel abhängt, welche dann entsprechend durch den Erkennungsantikörper mit Fluoreszenzsignal sichtbar gemacht werden kann (Abb. 10 B). So kann am Ende jedem Farbcode und somit jedem Analyten eine mediane Fluoreszenzintensität zugeordnet werden. Anhand von

Standardreihen kann bei quantitativen Nachweisen die genaue Menge (in pg/ml) des gesuchten Analyten in der Probe bestimmt werden. Bei semiquantitativen Nachweisen ohne Standardreihen wird nur die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt, mit der dann nur Aussagen über die Rangordnung von Mengenangaben in Relation zueinander getroffen werden können, nicht aber über die absolute Menge und Verhältnismäßigkeit der Vergleichsgruppen.

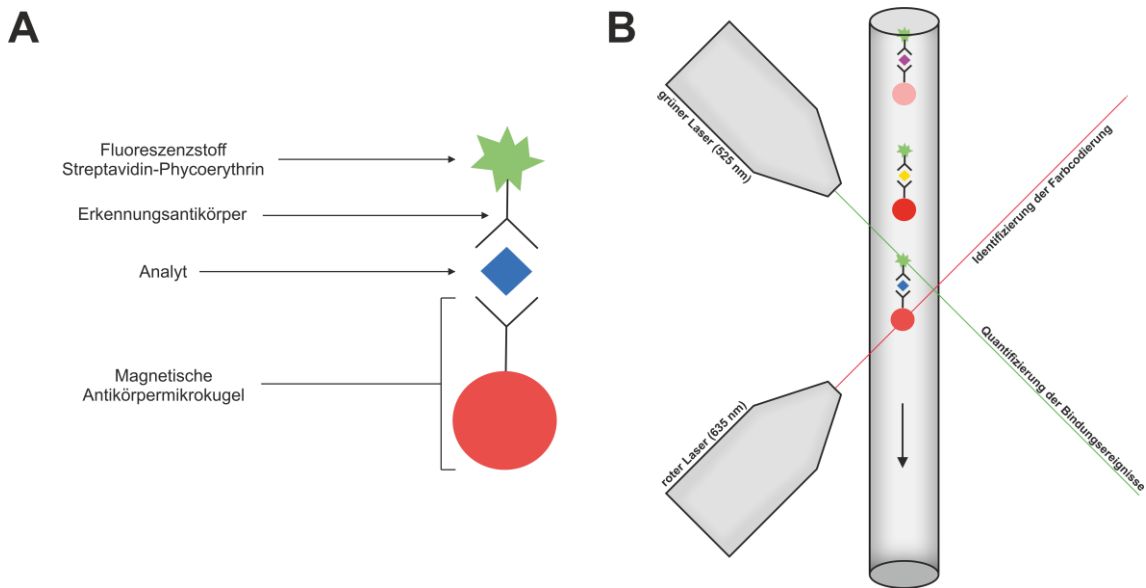


Abb. 10: Messvorgang beim Multiplex Assay. Die Abbildung A zeigt die Komplexe mit den magnetischen Antikörpermikrokugeln nach Durchführung des Protokolls. Die Komplexe bestehen aus der magnetischen Mikrokugel, die mit spezifischen Antikörpern gekoppelt ist, dem gebundenen Analyten, dem Erkennungsantikörper und dem Fluoreszenzstoff Streptavidin-Phycoerythrin. Die Abbildung B zeigt vereinfacht das Messprinzip der Durchflusszytometrie beim Multiplex Assay. Verschiedene Analyte (bunte Rechtecke) werden von farbcodierten Antikörper-Mikrokugeln (Punkte in Rottönen) und fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (grüne Sternchen) gebunden. Diese Komplexe werden resuspendiert in einer Mantelflüssigkeit (Sheath Fluid) nacheinander durch eine Messkanüle geleitet. Dabei identifiziert ein roter Laser jeweils die dem Analyten zugehörige Farbcodierung der Mikrokugeln und ein grüner Laser misst die zugehörige Fluoreszenzintensität, abhängig von der Anzahl der Bindungsereignisse.

3.2.5.2 Quantitativer Proteinnachweis mit Multiplex Assay

Für den quantitativen Proteinnachweis (Tab. 12) wurden drei individuell zusammengestellte Multiplex Assay Kits für ausgewählte Biomarker verwendet:

1. Human Angiogenesis/Growth Factor Panel: Angiopoietin-2 (ANGPT2), Bone morphogenic protein 9 (BMP-9), Epidermal growth factor (EGF), Endoglin (ENG), Endothelin-1 (ET-1), Fibroblast growth factor 1 (FGF-1), Fibroblast growth factor 2 (FGF-2), Follistatin (FST), Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), Hepatocyte growth factor (HGF).
2. Human Cancer Panel: Hepatocyte growth factor (HGF), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Leptin (LEP), Macrophage migration inhibitory factor (MIF), Osteopontin (OPN), Soluble FAS receptor (SFAS), Soluble Fas ligand (SFASL), Transforming growth factor alpha (TGF- α), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), Vascular endothelial growth factor (VEGF).
3. Human Immunocheckpoint Panel: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4), Programmed cell death protein 1 (PD1), Programmed cell death 1 ligand 1 (PDL1), T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM3), Toll-like receptor 2 (TLR2).

Die quantitativen Multiplex Assays wurden alle nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Das Protokoll gliederte sich in einen Vorbereitungsteil und einen Hauptteil (Abb. 11). Im Vorbereitungsteil wurden der Standard und die Qualitätskontrollen in Lösung gebracht und die immobilisierten antikörperbeladenen Mikrokugeln wurden mobilisiert. Im Hauptteil wurden die Proteine des Standards, der Qualitätskontrollen und der Proben mit den mobilisierten antikörperbeladenen Mikrokugeln in Verbindung gebracht und dann mittels Erkennungsantikörpern und Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) messbar gemacht. Alle Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und es wurden 96-Well Filterplatten benutzt. Im Vorbereitungsteil wurde als erstes die Standardreihe vorbereitet, indem den mitgelieferten Behältnissen (Standard 7) zunächst 250 μ l deionisiertes Wasser hinzugegeben wurde. In diesen mitgelieferten Behältnissen (Standard 7) lag eine bestimmte und bekannte Menge jedes gesuchten Proteins/Analyts in Pulverform vor. Durch Zugabe von deionisiertem Wasser gingen diese Proteine in Lösung. Anschließend wurden die Behältnisse wenige Male mit der Hand invertiert und dann für zehn Sekunden gevortext. Danach folgte eine zehnmütige Ruhephase. In dieser Zeit wurden sechs

Mikroreaktionsgefäße mit jeweils 200 µl Assaypuffer befüllt. Die Mikroreaktionsgefäße wurden von eins bis sechs beschriftet (Standard 1-6). Für die serielle Verdünnung der Standards wurden dann jeweils 100 µl ausgehend von den bereits befüllten Behältnissen (Standard 7) in das nächstfolgende Mikroreaktionsgefäß (Standard 6,5,4,3,2,1) pipettiert. Somit ergab sich eine absteigende Standardkonzentration von Standard 7 mit der höchsten Proteinkonzentration bis Standard 1 mit der niedrigsten Proteinkonzentration. Zusätzlich wurde ein Mikroreaktionsgefäß für den Nullwert (Standard 0) mit 200 µl reinem Assaypuffer ohne gelöste Proteine angefertigt. Nach jedem Pipettiervorgang wurde mehrmals resuspendiert und die Pipettenspitze gewechselt.

Für die Präparation der Qualitätskontrollen (Quality Control 1, 2) wurden beide mitgelieferten Behältnisse mit jeweils 250 µl deionisiertem Wasser aufgefüllt. Auch hier lag in beiden Behältnissen jeweils eine bestimmte und bekannte Menge jedes gesuchten Proteins/Analyts in Pulverform vor. Die Gefäße wurden wenige Male mit der Hand invertiert, um sie dann für zehn Minuten ruhen zu lassen.

Außerdem wurde jedes mitgelieferte Gefäß mit den immobilisierten antikörperbeladenen Mikrokugeln für 30 Sekunden in einem Ultraschallbad beschallt und anschließend für eine Minute gevortext. Dann wurden jeweils 150 µl magnetische Antikörperkugeln, die durch das Vortexen mobilisiert worden waren, in ein abgedunkeltes Mischgefäß überführt. Abhängig von der Anzahl der Zielproteine in den entsprechenden Kits wurde das abgedunkelte Mischgefäß dann mit dem vom Hersteller mitgelieferten zugehörigen Verdünnungsmittel auf 3000 µl aufgefüllt entsprechend dem folgenden Schema:

1. Human Angiogenesis/Growth Factor Panel: 10 Zielproteine: $10 \times 150 \mu\text{l} = 1500 \mu\text{l}$ magnetische Antikörpermikrokugeln. $3000 \mu\text{l}$ Gesamtmenge - $1500 \mu\text{l}$ magnetische Antikörpermikrokugeln = $1500 \mu\text{l}$ Verdünnungsmittel.
2. Human Cancer Panel: 12 Zielproteine: $12 \times 150 \mu\text{l} = 1800 \mu\text{l}$ magnetische Antikörpermikrokugeln. $3000 \mu\text{l}$ Gesamtmenge - $1800 \mu\text{l}$ magnetische Antikörpermikrokugeln = $1200 \mu\text{l}$ Verdünnungsmittel.
3. Human Immunocheckpoint Panel: 5 Zielproteine: $5 \times 150 \mu\text{l} = 750 \mu\text{l}$ magnetische Antikörpermikrokugeln. $3000 \mu\text{l}$ Gesamtmenge - $750 \mu\text{l}$ magnetische Antikörpermikrokugeln = $2250 \mu\text{l}$ Verdünnungsmittel.

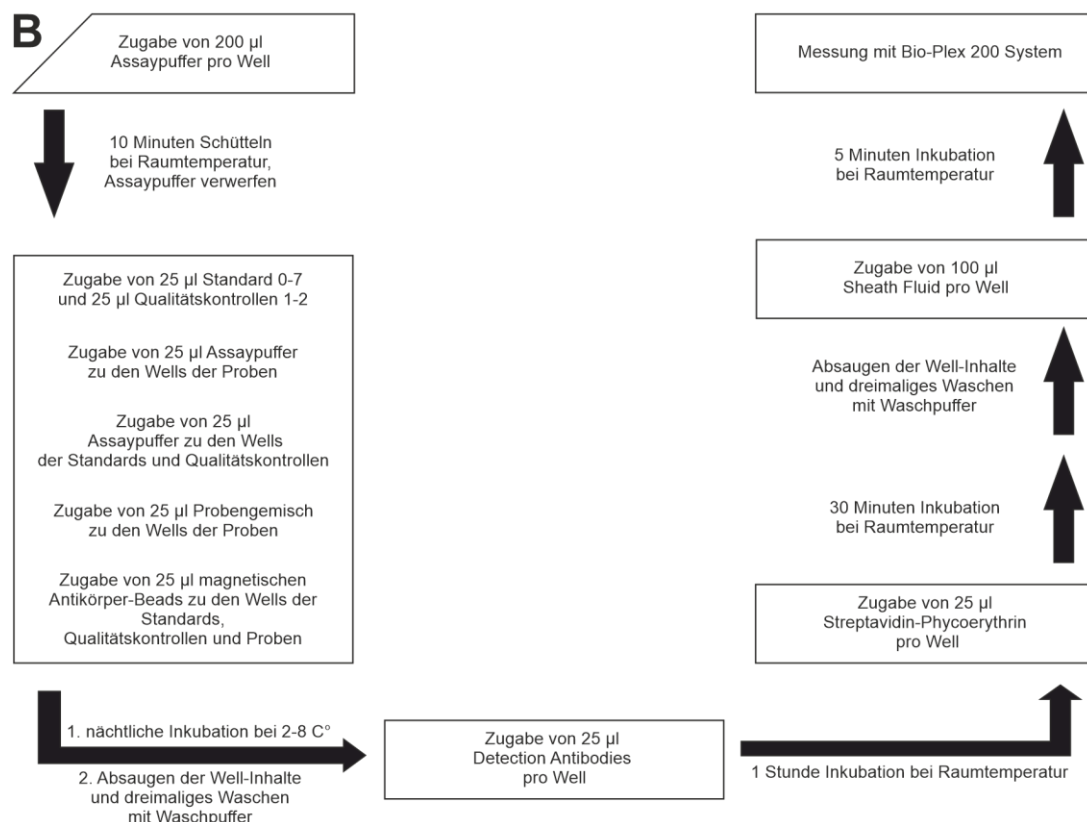
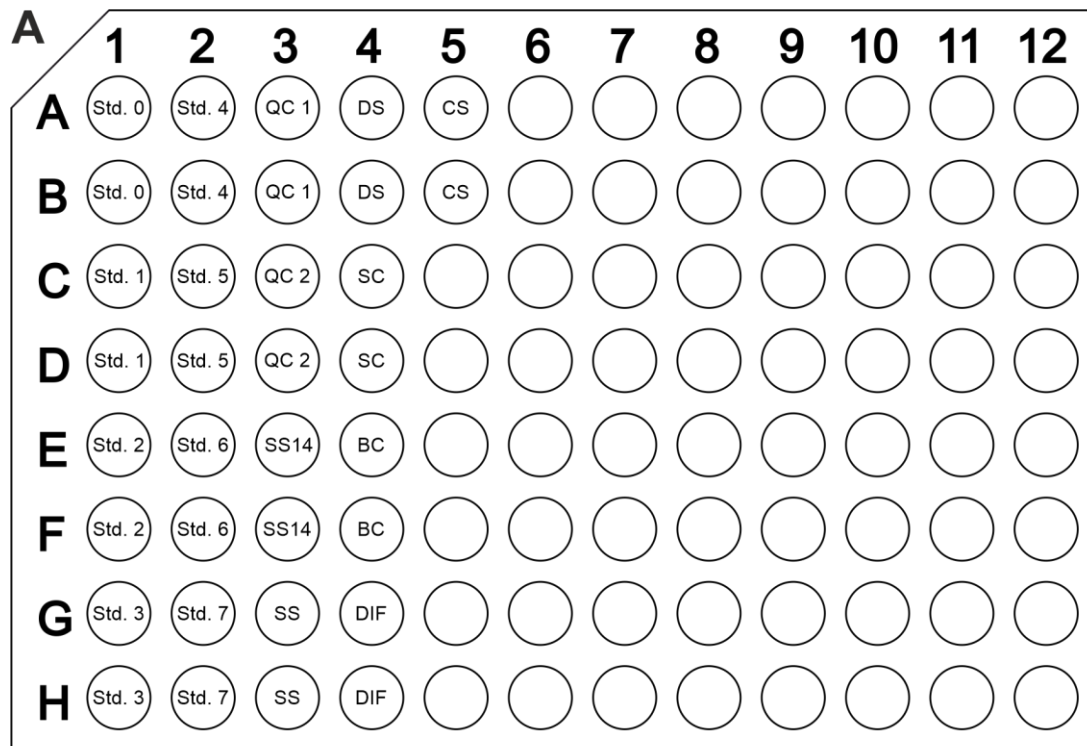


Abb. 11: Pipettierschema und Versuchsschema der quantitativen Multiplex Assays. Das Pipettierschema (A) zeigt eine 96-Well-Filterplatte mit Zuordnung zu den Wells der Standards (Std. 0-7), der Qualitätskontrollen (QC 1, 2) und der Proben (14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Strings (SS), Double Strings (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkom (CS)). Das Flussdiagramm (B) zeigt die wichtigsten Abläufe des Hauptteils des Experiments.

Zu Beginn des Hauptteils des Experiments wurden alle zu verwendenden Wells der 96-Well-Filterplatten mit 200 µl Assaypuffer befüllt. Danach wurde die Platte versiegelt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Anschließend wurde die Platte mit der Oberseite nach unten umgedreht und durch vorsichtiges Klopfen auf Papiertücher entleert. Nun wurden in die Wells für die spätere Nullwertmessung 25 µl von der Nullwertlösung für die Standardreihe von der Standardlösung und für die Qualitätskontrolle von der entsprechenden Qualitätskontrollenlösung gegeben. Ebenfalls wurden den bis dahin leeren Wells für die spätere Analytenmessung der Proben 25 µl Assaypuffer hinzugefügt. Danach folgte die Zugabe von 25 µl Assaypuffer zu den Wells des Nullwerts, der Standards und der Qualitätskontrollen. Dann wurden den Wells der Proben jeweils 25 µl Probengemisch hinzugegeben. Nachdem das Mischgefäß mit den magnetischen Antikörpermikrokugeln gevortext worden war, wurden dann jeweils 25 µl daraus in jedes Well pipettiert. Die Wells der Standards, Qualitätskontrollen und Proben waren schließlich mit 75 µl befüllt (Tab. 13). Die 96-Well-Filterplatte wurde versiegelt und für 18 Stunden bei 4 Grad Celsius auf einem Orbitalschüttler mit 800 revolutions per minute (Drehungen pro Minute (rpm)) geschüttelt.

	Wells der Standards	Wells der Qualitätskontrollen	Wells der Proben
Std. 0-7	25 µl	-	-
QC 1, 2	-	25 µl	-
PG	-	-	25 µl
AP	25 µl	25 µl	25 µl
MAK	25 µl	25 µl	25 µl
Gesamt	75 µl	75 µl	75 µl

Tab. 13: Übersicht der Reagenzien bis zur Inkubation mit magnetischen Antikörper Beads bei quantitativem Nachweis. Tabelle zeigt die Menge der jeweiligen Reagenzien in den Wells der Standards, Qualitätskontrollen und Proben zum Zeitpunkt der Inkubation mit magnetischen Antikörpermikrokugeln in Mikrolitern (µl). Jedes Well ist mit insgesamt 75 µl befüllt. Standard 0-7 (Std. 0-7), Qualitätskontrolle 1, 2 (QC 1, 2), Probengemisch (PG), Assaypuffer (AP), magnetische Antikörpermikrogueln (MAK).

Nach 18-stündiger Inkubation wurde als erstes das Waschpuffer vorbereitet, indem 60 ml des mitgelieferten Waschpuffers in 540ml deionisiertem Wasser verdünnt wurden, was einer Verdünnung des Waschpuffers von 1:10 entsprach. Als nächstes wurde der Inhalt der Wells mit einer Vakuumabsaugung bei etwa -10 bar abgesaugt und dann dreimal gewaschen. Die Waschung erfolgte bei jedem der drei Male mit jeweils 200 µl Waschpuffer (1:10) und jeweiliger anschließender Vakuumabsaugung bei etwa -

10 bar. Danach wurden jedem Well 25 µl der mitgelieferten Lösung mit Erkennungsantikörper hinzugefügt und die 96-Well-Filterplatte wurde versiegelt bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Orbitalschüttler mit 800 rpm geschüttelt. Nun wurden jedem Well 25 µl SAPE hinzugefügt. Die 96-Well-Filterplatte wurde dann für 30 Minuten bei 800 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte erneut eine dreimalige Waschung mit jeweils 200 µl Waschpuffer (1:10) und jeweiliger anschließender Vakuumabsaugung bei etwa -10 bar. Zuletzt wurden jedem Well 100 µl der mitgelieferten Mantelflüssigkeit (Sheath Fluid) hinzugegeben und die Platte nochmals fünf Minuten auf dem Orbitalschüttler mit 800 rpm geschüttelt. Die Messung erfolgte mit einem Bio-Plex 200 System und die Auswertung mit einer Bio-Plex Manager 4.1.1 Software.

3.2.5.3 Semiquantitativer Proteinnachweis mit Multiplex Assay

Durch die limitierten Nachweismöglichkeiten von Apoptoseproteinen musste herstellerbedingt für dieses Panel auf einen semiquantitativen Assay zurückgegriffen werden (Tab. 12):

4. Early Apoptosis Panel: B-cell lymphoma 2 (BCL2)(Ser70), BCL2 associated agonist of cell death (BAD)(Ser112), C-Jun N-terminale Kinase (JNK)(Thr183/Tyr185), RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT)(pS473), Caspase 8 (CASP8)(Asp384), Caspase 9 (CASP9)(Asp315), P53 (Ser46)

Das Protokoll gliederte sich in einen Vorbereitungsteil und einen Hauptteil. Im Vorbereitungsteil wurden die immobilisierten Antikörper Beads mobilisiert, die biotinylierten Erkennungsantikörper und das Streptavidin-Phycoerythrin verdünnt und die Zelllysate im Sinne von Qualitätskontrollen in Lösung gebracht. Im Hauptteil wurden die Proteine der Zelllysate und der Proben mit den mobilisierten Antikörper Beads in Verbindung gebracht und dann mittels Erkennungsantikörpern und Streptavidin-Phycoerythrin messbar gemacht. Das Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt und es wurden 96-Well-Filterplatten verwendet. Vorbereitungsteil: In diesem Multiplex Assay Kit wurden die immobilisierten antikörperbeladenen Mikrokugeln bereits gemischt und nicht jeweils separat in einem Gefäß geliefert. Als erstes wurden also die immobilisierten antikörperbeladenen Mikrokugeln mobilisiert, indem das die Mikrokugeln enthaltende Gefäß für 15 Sekunden beschallt und dann für 30 Sekunden gevortext wurde. Anschließend wurden 150 µl magnetische antikörperbeladene Mikrokugeln (20X) mit 2850 µl Assaypuffer 2 in einem

abgedunkelten Mischgefäß zusammengeführt und für 15 Sekunden gevortext, also um den Faktor 20 auf die vorgesehene Arbeitskonzentration verdünnt (1X). Danach wurden die biotinylierten Erkennungsantikörper vorbereitet. Dafür wurde das mitgelieferte Gefäß mit den biotinylierten Erkennungsantikörpern (20X) für zehn Sekunden gevortext. Dann wurden 150 µl daraus mit 2850 µl Assaypuffer 2 in einem abgedunkelten Mischgefäß vermischt, also um den Faktor 20 auf die vorgesehene Arbeitskonzentration verdünnt (1X). Außerdem wurde das Streptavidin-Phycoerythrin (25X, SAPE) vorbereitet, wobei das SAPE enthaltende Gefäß zehn Sekunden gevortext wurde, um dann 120 µl daraus mit 2880 µl Assaypuffer 2 in einem abgedunkelten Mischgefäß zu vermischen, also eine 25-fache Verdünnung auf die vorgesehene Arbeitskonzentration (1X). Zuletzt wurden die mitgelieferten Zelllysate im Sinne von Qualitätskontrollen vorbereitet, indem zu jedem der vier die Zelllysate enthaltenden Behältnisse zunächst 100 µl destilliertes Wasser und nach vortexen und fünfminütiger Ruhephase 150 µl Assaypuffer 2 hinzugegeben wurde.

Zu Beginn des Hauptteils des Experiments wurden alle zu verwendenden Wells der 96-Well-Filterplatte mit 50 µl Assaypuffer befüllt. Danach wurde die Platte versiegelt und für zehn Minuten auf einem Orbitalschüttler, bei Raumtemperatur, geschüttelt. Anschließend wurde die Platte umgekehrt und durch vorsichtiges Klopfen auf Papiertücher entleert. Danach wurden die mit Antikörpern beladenen magnetischen Mikrokugeln für 10 Sekunden gevortext und dann jeweils 25 µl davon in alle zu verwendenden Wells pipettiert. Darüber hinaus wurden jeweils 25 µl Assaypuffer zu den Wells zur Bestimmung des Nullwertes hinzugegeben. Nun wurden 25 µl der Zelllysate und der Proben in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Wells des Nullwertes, der Zelllysate und der Proben waren letztlich mit 50 µl befüllt (Tab. 14). Dann wurde die 96-Well-Filterplatte versiegelt und für 18 Stunden bei 4 °C auf einem Orbitalschüttler mit 800 rpm geschüttelt.

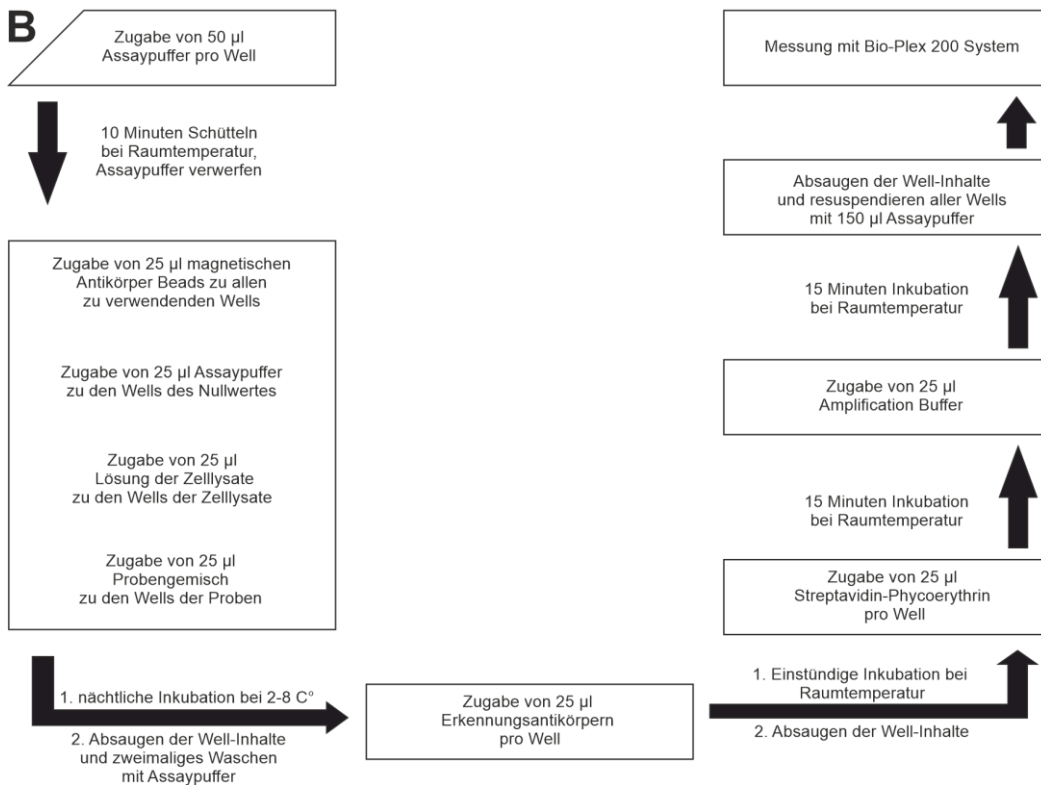
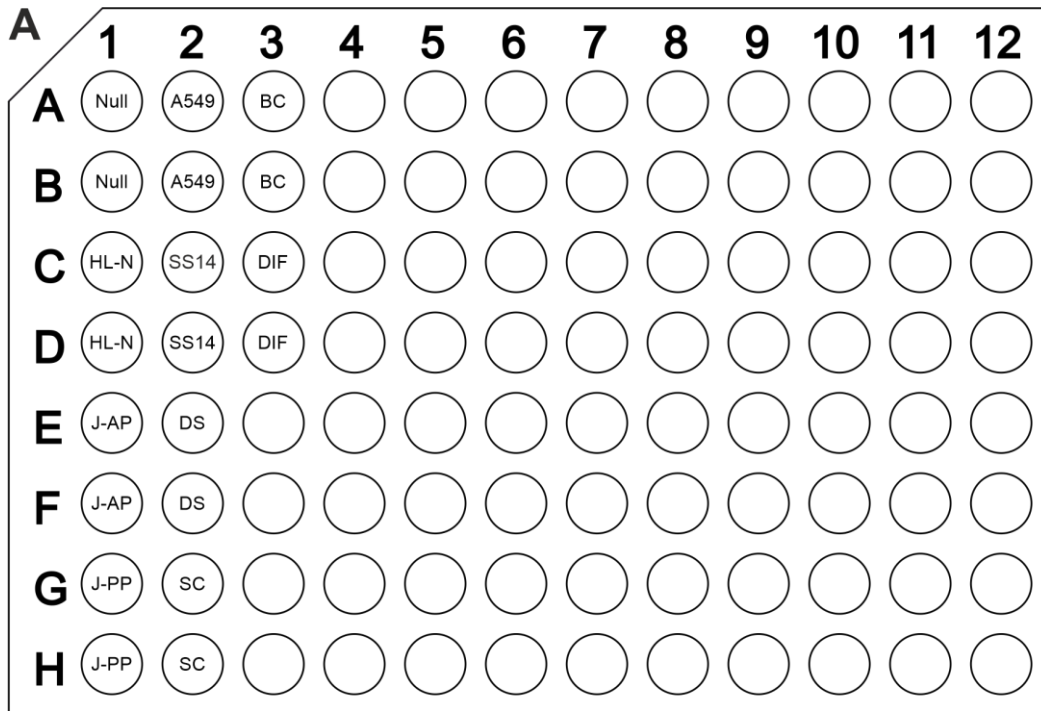


Abb. 12: Pipettierschema und Versuchsschema des Early Apoptosis Panels. Semiquantitativer Multiplex Assays: Pipettierschema (A) zeigt 96-Well-Filterplatte mit Zuordnung zu dem Nullwert (Null), den Wells der Zellysate (HeLa: Lamda Phosphatase negative control (HL-N), Jurkat: Anisomycin positive control (J-AP), Jurkat: Paclitaxel positive control (J-PP), A549: Camptothecin positive control (A549)) und den Wells der Proben (14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Double Strings (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkom (CS)). Versuchsschema (B) zeigt die wichtigsten Abläufe des Hauptteils des Experiments.

	Wells des Nullwertes	Wells der Zellysate	Wells der Proben
MAK	25 µl	25 µl	25 µl
AP	25 µl	-	-
ZL	-	25 µl	-
PG	-	-	25 µl
Gesamt	50 µl	50 µl	50 µl

Tab. 14: Übersicht der Reagenzien bis zur Inkubation mit magnetischen Antikörper Beads bei dem Early Apoptosis Panel. Tabelle zeigt die Menge der jeweiligen Reagenzien in den Wells des Nullwertes, der Zellysate und Proben zum Zeitpunkt der Inkubation mit magnetischen Antikörper Beads in Mikrolitern (µl). Jedes Well ist mit insgesamt 50 µl befüllt. Magnetische Antikörperkugeln (MAK), Assaypuffer (AP), Zellysate (ZL), Probengemisch (PG).

Nach 18 Stunden Inkubationszeit wurde der Inhalt der Wells mit einer Vakuumabsaugung abgesaugt und zweimal mit 100 µl Assaypuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 µl der verdünnten Lösung mit Erkennungsantikörpern (1X) zu jedem Well. Die 96-Well-Filterplatte wurde versiegelt und bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Orbitalschüttler mit 800 rpm geschüttelt. Die Flüssigkeit der Wells wurde durch Vakuumabsaugung entfernt und 25 µl der verdünnten Lösung mit SAPE (1X) wurden hinzugefügt. Danach wurde die 96-Well-Filterplatte für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 800 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 µl Amplifikationspuffer (1X) und die 96-Well-Filterplatte wurde erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 800 rpm geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde wieder mittels Vakuumabsaugung entfernt und 150 µl Assaypuffer wurden hinzugegeben. Nachdem die 96-Well-Filterplatte nochmals für fünf Minuten geschüttelt wurde, konnte die Messung und Auswertung mit einem Bio-Plex 200 System und einer Bio-Plex Manager 4.1.1. Software erfolgen.

3.2.6 Zellkultur

Die für die Zellkultur verwendete Chondrosarkom-Zelllinie wurde zur Aufbewahrung im Stickstofftank in einem 1 ml Kryoröhrchen und Einfriermedium bei 80 °C gelagert. Das Einfriermedium bestand aus 10% Dimethyl Sulfoxid und 90% fetalem Kälberserum. Nach Entfernung des Kryoröhrchens aus dem Stickstofftank wurde dieses eine Minute lang im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt. Anschließend wurde die Suspension aus Zelllinie und Einfriermedium in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt und bis zur 50 ml Markierung mit Dulbecco's Modified Eagle Medium +GlutaMax -I (DMEM +G -I)

aufgefüllt. Es folgte eine siebenminütige Zentrifugation mit 1500 rpm bei 7 °C. Danach wurde der Überstand aus Einfriermedium und Zellkulturmedium abpipettiert und dem Zellabsatz wurden 15 ml DMEM +G -I hinzugefügt. Nach mehrmaliger Resuspension wurde das Gemisch aus Zellen und DMEM +G -I in eine 250 ml Zellkulturflasche überführt. Neben regelmäßigem Wechsel des DMEM +G -I wurde die Zellkultur bedarfsabhängig geteilt, um eine Überwucherung der Zellen zu verhindern. Letzteres geschah, wenn die Zellen eine achtzigprozentige Konfluenz erreichten.

Zum Teilen der Zellkultur wurde zunächst das DMEM +G -I aus der Zellkulturflasche abgezogen. Als nächstes wurde der Zellrasen einmal mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um ihn danach mit 2 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden zu lösen. Nach fünfminütiger Inkubationszeit bei 37 °C erfolgte dann die mikroskopische Kontrolle, ob sich alle Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten. Abhängig von der Zelldichte wurde eine sinnvolle Aufteilung der Zellen gewählt. Das Teilungsverhältnis ist abhängig von der Zellart und der vorliegenden Zelldichte. Ein niedriges Teilungsverhältnis bei schnell teilenden Zellen und bereits hoher vorliegender Zelldichte führt dazu, dass auch die nächste Aufteilung relativ rasch erfolgen muss, weil eine Überwucherung absolut vermieden werden muss. Eine zu hohe Aufteilung kann dazu führen, dass zu wenige Zellen adhären, keine Zellkommunikation entsteht und die Zellkultur vollständig stirbt. In diesem Experiment wurde auf Grund von achtzigprozentiger Konfluenz und schnell teilenden Chondrosarkomzellen ein Teilungsverhältnis von 1:3 gewählt. Das bedeutet, dass die Zellen aus der ursprünglichen Zellkulturflasche gedrittelt und dann auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt wurden. Dafür wurden 43 ml DMEM +G -I in die Zellkulturflasche hinzugegeben, um das entstandene Gesamtvolumen von 45 ml dann auf drei 250 ml Zellkulturflaschen zu verteilen, also jeweils 15 ml DMEM +G -I-Zelllinien-Gemisch pro 250 ml Zellkulturflasche.

Über drei Tage wurde täglich ein DMEM +G -I Wechsel und eine Überprüfung der Zelldichte vorgenommen. Am dritten Tag erfolgte bei achtzigprozentiger Konfluenz in allen drei Zellkulturflaschen eine Zellzählung mit einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurde zunächst wieder das DMEM +G -I aus allen drei Zellkulturflaschen abgezogen, um den Zellrasen dann mit 10 ml PBS zu waschen. Nach entsprechender Absaugung des PBS folgte die Ablösung der Zellen vom Zellkulturflaschenboden durch Zugabe von jeweils 2 ml Trypsin-EDTA und anschließender fünfminütiger Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde den gelösten Zellen jeweils 10 ml DMEM +G -I hinzugegeben und mehrmals resuspendiert. Die drei Zellsuspensionen wurden in einem 50 ml Zentrifugationsgefäß zusammengeführt und so 7 Minuten mit 1500 rpm und bei 7 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde das gesamte Medium entfernt und das verbliebene Zellpellet in 1 ml DMEM +G -I gelöst. Für die Färbung der Zellen wurden 10 µl der Zellsuspension und 90 µl Trypanblau in einem Schacht einer 96-Well-Mikrotiterplatte vermischt. Anschließend wurde die Neubauer-Zählkammer mit 10 µl der gefärbten Zellsuspension bespickt. Die Auszählung der Zellen erfolgte bei 10-facher Vergrößerung. Die Zellzählung ergab etwa 5.000.000 Zellen.

3.2.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde für jeden Biomarker der Mittelwert aus den zwei Messungen (Duplikate) einer gepoolten Stichprobe für die entsprechenden Musterkategorien (SS, DS, SC, BC, DIF) berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte analog für die einzelnen nicht-gepoolten Stichproben von SS14 und CS. Da die Probengewinnung von gesundem String-Knorpel in der Verfügbarkeit aufgrund der fortgeschrittenen Arthrose als Voraussetzung zur Durchführung eines Gelenkersatzes deutlich limitiert ist, wurde die Vergleichsgruppe Strings nicht mit jedem Biomarker gemessen. An entsprechenden Stellen wurde dies als nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet. Dafür wurde als vermeintlich gesunde Kontrolle Knorpel von Femurcondylen eines 14-jährigen Jungen in jedem Experiment mituntersucht. Der Biomarker HGF wurde in zwei Experimenten gemessen, dementsprechend ist für HGF der Mittelwert und der Variationskoeffizient aus vier Messungen dargestellt. VEGF wurde in den Säulendiagrammen nicht dargestellt, weil dort keine adäquate Standardkurve berechnet werden konnte. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte auf Grundlage der chondrozytären Muster im Kniegelenksknorpel. Dabei wurde angenommen, dass die Entwicklung von SS14 nach DIF einer progressiven Knorpeldegeneration bei Arthrose, also von gesund nach krank, entspricht. Es wurden alle Messwerte innerhalb der Nachweisbarkeitsgrenzen der Technik in die Auswertung mit einbezogen. Messwerte unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze wurden als „out of range <“ (OOR <), Messwerte oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze wurden als „out of range >“ (OOR >) gekennzeichnet. Bei quantitativen Nachweisen wurde anhand der Standardreihen die jeweils gemessene MFI in die absolute Menge (pg/ml) des jeweiligen Biomarkers umgerechnet. Semiquantitative Nachweise wurden in ihrer rohen Form, also MFI, angegeben. Als Streuungsmaß innerhalb der Duplikate wurde der Variationskoeffizient berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte automatisch durch die Bio-Plex Manager 4.1.1 Software am Ende jedes Experiments. Die Darstellung der Mittelwerte in den Säulendiagrammen wurde mit GraphPad Prism 8 umgesetzt.

4 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 33 Biomarker ausgewählt, um deren Vorkommen und Ausprägung in bis zu sechs verschiedenen Knorpelzuständen und beim Chondrosarkom zu untersuchen. Die Gruppe der Biomarker wurde in die Kategorien Proliferation/Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints unterteilt. Die untersuchten Knorpelgewebe waren Gewebe mit als prädominantem Chondrozytenmuster Strings von einem 14 Jahre alten Jungen aus der Superfizialschicht (SS14), von Arthrosepatienten Strings (SS), Double Strings (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC) und Diffuse Pattern (DIF) sowie Zellen einer Chondrosarkomlinie (CS).

4.1 Patienten

Insgesamt wurde Gewebe eines Kollektivs von 40 Patienten in die Vergleichsgruppen des arthrotischen Knorpels aufgenommen (Abb. 13 A, B). Der gesunde Kniegelenkknorpel stammte von Femurkondylen eines 14-jährigen Patienten, der sich aufgrund eines Osteosarkoms einer distalen Femurresektion unterziehen musste. Der femorale Gelenkknorpel war nicht vom Tumor infiltriert. Die Zellen der Grad II Chondrosarkomlinie (SW-1353) entstammten einer 72-jährigen Patientin und wurden kommerziell erworben.

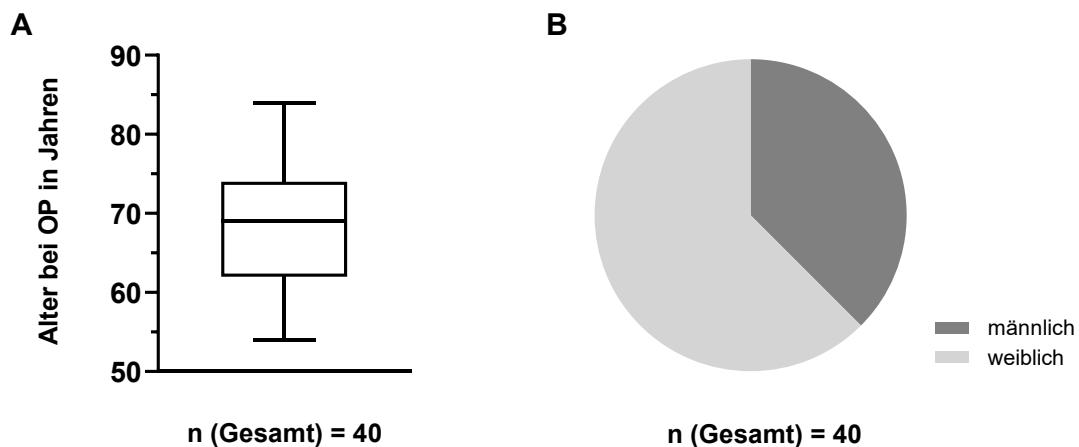


Abb. 13: Alters- und Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs der Arthrosepatienten. Box-Whisker-Plot (A) zeigt die Altersverteilung der Patienten bei Operation, das Kreisdiagramm (B) die Geschlechterverteilung der Patienten.

4.2 Proliferation/Apoptose

In der Kategorie Proliferation/Apoptose wurden Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen auf die Biomarker BCL2, AKT, P53, BAD, JNK, CASP8, CASP9, SFAS, SFASL und TRAIL untersucht (ausführliche Ergebnisse siehe Tab. 15).

BCL2 stabilisiert die Mitochondrienmembran, AKT inaktiviert pro-apoptotische Faktoren der BCL2-Familie. Somit bremsen beide vor allem den intrinsischen Apoptoseweg. Während die Messung von BCL2 (Abb. 14 A) nur eine leichte Erhöhung rund um Small Clusters zeigte, ergab sich für AKT (Abb. 14 B) eine deutliche Zunahme der Messwerte mit Maximum bei BC. Der Messwert von CS bei BCL2 lag höher als bei den Knorpelproben, bei AKT lag CS zwischen DS und SC.

BAD ist ein Inhibitor des BCL2, JNK ist Teil des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges und vermittelt letztlich die Transkription von Apoptosegenen. Sowohl BAD (Abb. 14 C) als auch JNK (Abb. 14 D) zeigten eine Zunahme der Messwerte von SS14 nach DIF. Der Messwert von CS lag bei BAD und JNK jeweils höher als die Messwerte der Knorpelproben.

P53 ist eine der wichtigsten Kontrollinstanzen für Zellwachstum und Zellteilung, induziert also Apoptose. Die Messung von P53 (Abb. 14 E) zeigte keine große Dynamik. Der Messwert bei CS war im Vergleich mit den Knorpelproben erhöht.

CASP8 ist die zentrale Caspase des extrinsischen Apoptoseweges, CASP9 die zentrale Caspase der intrinsischen Apoptose. Die Messung von CASP8 (Abb. 14 G) zeigte keine große Dynamik, die Messung von CASP9 (Abb. 14 F) zeigte eine moderate Zunahme von SS14 nach DIF. Der Messwert von CS war sowohl bei CASP8 als auch bei CASP9 gegenüber den Knorpelproben erhöht.

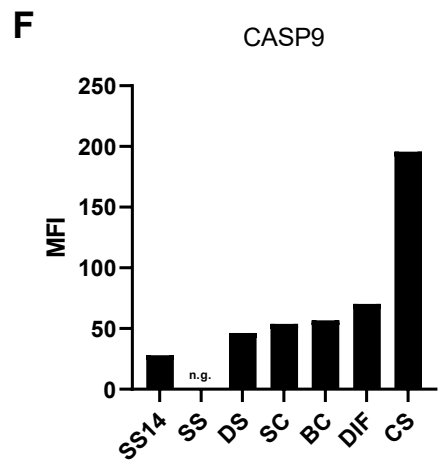
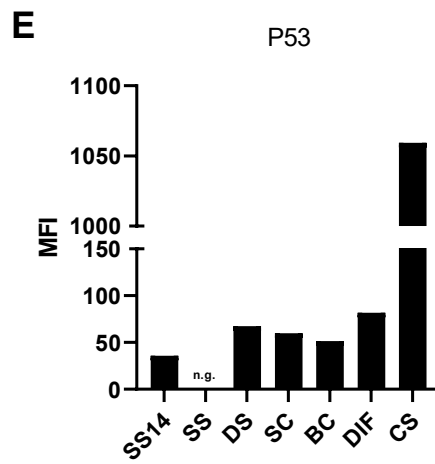
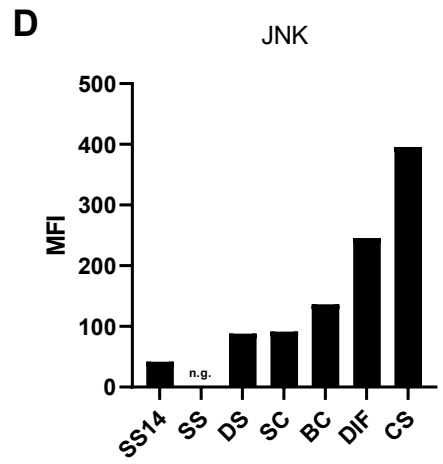
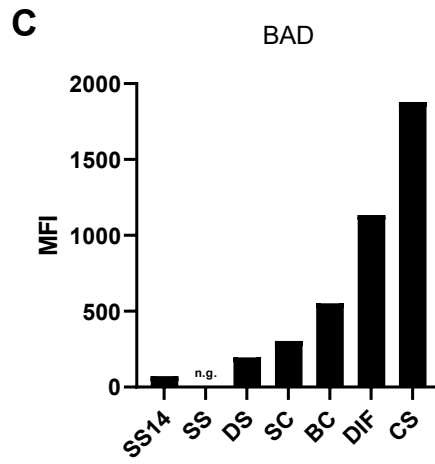
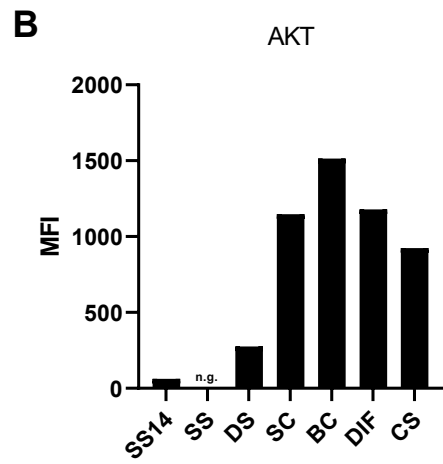
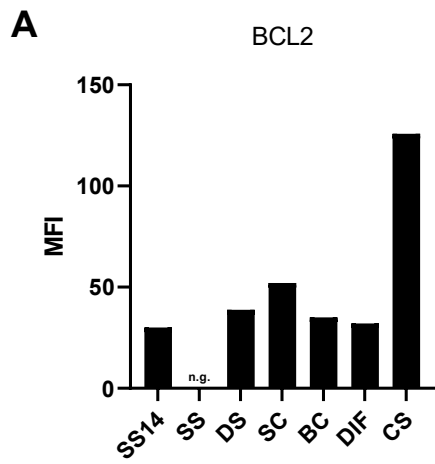
SFASL und TRAIL sind Liganden von TNF-Rezeptoren, die mit einer intrazellulären Todesdomäne ausgestattet sind und den extrinsischen Apoptosepfad aktivieren – SFAS ist ein löslicher Rezeptor, der diese Interaktion inhibiert. Die Messung von SFASL (Abb. 14 I) lag unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze, die Messung von TRAIL (Abb. 14 J) zeigte isoliert hohe Werte bei SS und dann auf niedrigem Niveau einen Anstieg von DS zu DIF. Bei TRAIL lag der Messwert von CS unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Auch die Messung für SFAS (Abb. 14 H) zeigte keine große Dynamik, der Messwert von CS war im Vergleich zu den Knorpelproben erhöht.

Insgesamt zeigten sich zunehmende Messwerte bei voranschreitender Knorpeldegeneration, sowohl auf Seiten der anti-Apoptose bei AKT als auch auf Seiten der Apoptose bei JNK, BAD, CASP9. Die Messergebnisse von BCL2, P53, CASP8, TRAIL

und SFAS zeigten keine großen Veränderungen. Die Messwerte von SFASL lagen vollständig unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze.

	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS	
	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)
BCL2	30	(0,12)	n.g.	(-)	38,8	(0,28)	52	(0,84)	35	(0,23)	32	(0,34)	125,8	(1,13)
AKT	63	(0,10)	n.g.	(-)	275,8	(0,44)	1146,8	(0,34)	1514,5	(0,01)	1179,8	(0,48)	924,5	(1,01)
P53	35,8	(0,05)	n.g.	(-)	67,3	(0,09)	59,8	(0,03)	51,5	(0,13)	81,8	(0,33)	1059,3	(0,81)
BAD	73	(0,06)	n.g.	(-)	196	(1,01)	303,5	(0,71)	553	(0,02)	1134	(0,44)	1879	(0,91)
JNK	42	(0,22)	n.g.	(-)	88	(0,48)	91,3	(0,37)	136,3	(0,03)	245,8	(0,41)	395,8	(0,84)
CASP8	44	(0,07)	n.g.	(-)	49,3	(0,01)	49,3	(0,01)	65	(0,17)	44,8	(0,70)	151	(1,85)
CASP9	28	(0,36)	n.g.	(-)	46,3	(3,30)	53,8	(2,99)	56,8	(1,41)	70,3	(3,04)	195,8	(0,90)
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
SFAS	OOOR <	(-)	41,15	(0,40)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	31,83	(0,15)	189,46	(0,35)
SFASL	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)
TRAIL	9,97	(0,09)	107	(1,33)	10,14	(0,11)	8,72	(0,62)	17	(0,02)	29,09	(0,12)	OOOR <	(-)

Tab. 15: Proliferations- und Apoptosemarker. Die Tabelle zeigt die Messung von zehn Proliferations-/Apoptosemarkern mit Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC), Diffuse (DIF) und Chondrosarkomzellen (CS). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) oder Konzentration in pg/ml. Daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Der obere Teil der Tabelle zeigt Messwerte der semiquantitativen Messungen in MFI, der untere Teil zeigt Messwerte der quantitativen Messung in pg/ml. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOOR <) gekennzeichnet. Für die Kategorie SS wurden nicht alle Experimente mit Proben geladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet.



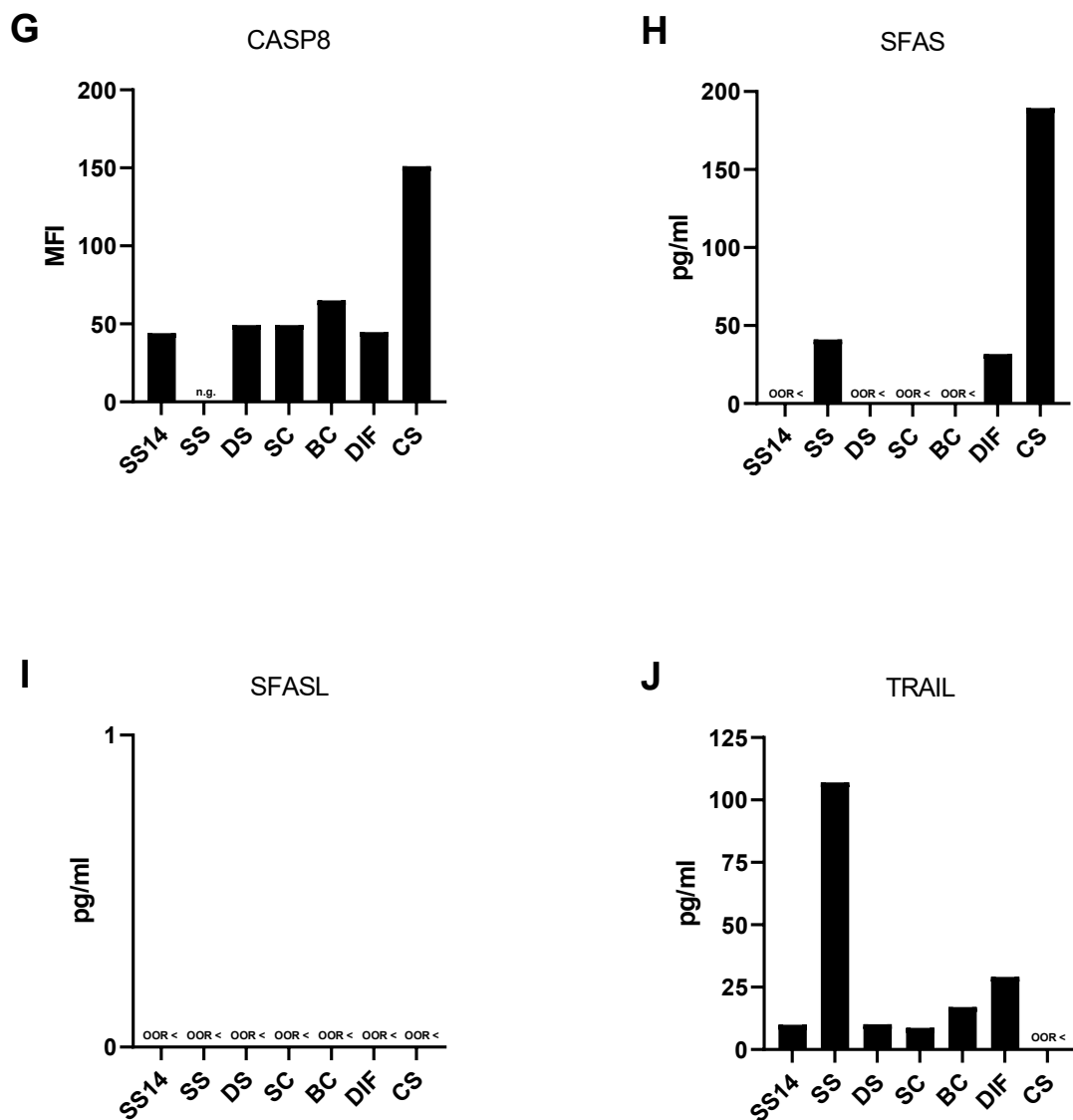


Abb. 14: Proliferations- und Apoptosemarker. Die Säulendiagramme zeigen die Messungen von Proliferations- und Apoptosemarkern bei Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen (A-J). Die Säulen zeigen jeweils die Mittelwerte der gemessenen medianen Fluoreszenzintensität (MFI) oder Konzentrationen in pg/ml aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe an. Die Messung des anti-apoptotischen Faktors RAC-alpha serine/threonine-protein kinase (AKT)(B) zeigte eine Zunahme der Messwerte innerhalb der Knorpelproben, ebenso wie die Messungen der pro-apoptotischen Faktoren BCL2 associated agonist of cell death (BAD)(C), C-Jun N-terminale Kinase (JNK)(D) und Caspase 9 (CASP9)(F). Bei den Messungen der pro-apoptotischen Faktoren B-cell lymphoma 2 (BCL2)(A), P53(E), Caspase 8 (CASP8)(G), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)(J) und soluble FAS receptor (SFAS)(H) zeigten sich keine großen Veränderungen. Bei AKT lag der Messwert von CS zwischen DS und SC, bei TRAIL unterhalb der Nachweisgrenze. Bei allen anderen Markern lag der Messwert von CS höher als der der Knorpelproben. Bei der Messung von Soluble FAS receptor ligand (SFASL)(I) lagen alle Messwerte unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Bei SS wurden nicht alle Experimente mit Proben beladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet. Abkürzungen: 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkomzellen (CS), unterhalb der Nachweisgrenze (OOOR <).

4.3 Inflammation

In der Kategorie Inflammation wurden Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen auf die Biomarker MIF und TNF- α (ausführliche Ergebnisse siehe Tab. 16) untersucht.

MIF bewirkt im Sinne eines inflammatorischen Zytokins die Einwanderung von Makrophagen. Die Messung von MIF (Abb. 15 A) zeigte keine große Dynamik. TNF- α ist ein sehr vielseitiges inflammatorisches Zytokin, das Einfluss auf die Expression von MMPs und anderen inflammatorischen Zytokinen nimmt und darüber hinaus über NF- κ B auch Proliferation und Apoptose reguliert. Die Messung von TNF- α (Abb. 15 B) blieb in nahezu allen Bereichen unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze mit Ausnahme von SS14 und DIF, wo TNF- α in niedriger Konzentration gemessen wurde.

	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
MIF	2009,39	(0,01)	OOOR >	(-)	3833,39	(0,02)	5237,48	(0,03)	2958,86	(0,03)	4099,61	(0,10)	3799,63	(0,20)
TNF-α	3,49	(0,02)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	9,62	(0,39)	OOOR <	(-)

Tab. 16: Inflammationsmarker. Die Tabelle zeigt die Messung von zwei Inflammationsmarkern mittels Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF) und Chondrosarkomzellen (CS). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in pg/ml. Daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOOR <) gekennzeichnet. Messwerte, die oberhalb der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range > (OOOR >) gekennzeichnet.

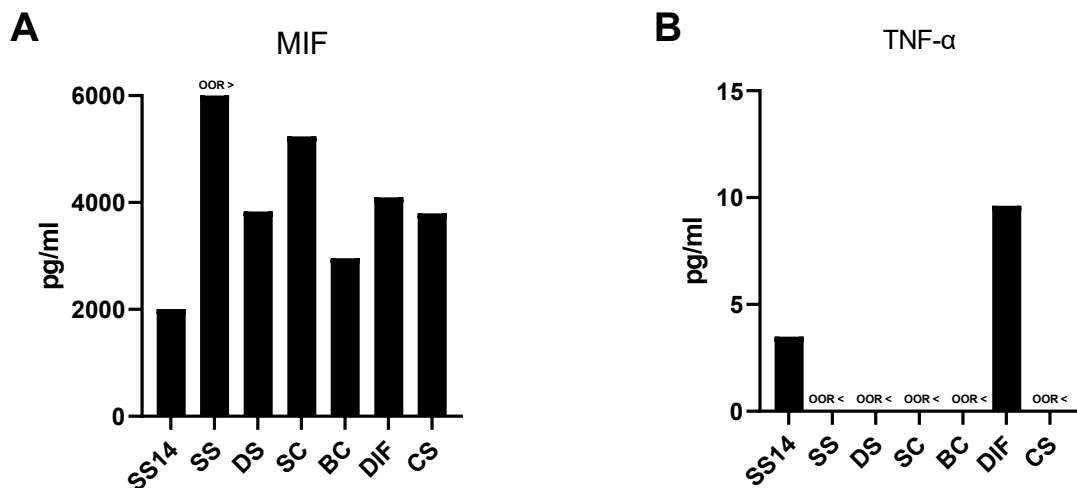


Abb. 15: Inflammationsmarker. Die Säulendiagramme (A, B) zeigen die Messungen von Inflammationsmarkern bei Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen. Die Säulen zeigen jeweils die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe an. Die Messung bei Macrophage migration inhibitory factor (MIF)(A) zeigte keine großen Veränderungen. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)(B) war in den meisten Proben unterhalb der Nachweisgrenze mit Ausnahme von SS14 und DIF. Abkürzungen: 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkomzellen (CS), unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (OOR <), oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (OOR >).

4.4 Zelldifferenzierung

In der Kategorie Zelldifferenzierung wurden Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen auf die Biomarker IL-6, IL-8, TGF- α , LEP, EGF und HB-EGF (ausführliche Ergebnisse siehe Tab. 17) untersucht.

IL-6 ist ein inflammatorisches Zytokin. IL-6 kommt bezüglich Zelldifferenzierung eine besondere Rolle zu, da es über PI3K und NF- κ B Pfade hin zur chondrozytären Hypertrophie lostritt. Die Messung von IL-6 (Abb. 16 A) zeigte eine Zunahme der Messwerte von SS zu BC. Der Messwert von CS lag unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Ganz ähnlich zu IL-6 ist die Rolle von IL-8 als Induktor hypertropher Differenzierung. Die Messung von IL-8 (Abb. 16 B) zeigte niedrige Messwerte bei SS14, SS und DS, während die Messwerte bei den Musterkategorien des degenerativen Knorpels (SC, BC, DIF) erhöht waren. Der Messwert von CS lag auf einem niedrigen Niveau. LEP steht in engem Zusammenhang mit IL-6 und wirkt über eigene Rezeptoren und schließlich den PI3K-Signalweg auf die Differenzierung von Chondrozyten. Die Messung von LEP (Abb. 16 D) zeigte ein Punctum Maximum bei SC und danach einen kontinuierlichen Abfall hin zu

DIF. Der Messwert von CS lag auf einem niedrigen Niveau. Die Messwerte für TGF- α (Abb. 16 C) lagen alle unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze.

Auch EGF und HB-EGF aktivieren PI3K-Signalwege und nehmen so Einfluss auf die chondrozytäre Differenzierung. Bei der Messung von EGF (Abb. 16 E) blieben alle Messwerte mit Ausnahme von DS unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Die Messwerte von HB-EGF (Abb. 16 F) zeigten keine eindeutige Dynamik mit dem höchsten Wert für SS14. Der Messwert von CS war im Vergleich zu den Messwerten der Musterkategorien durchschnittlich.

	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
IL-6	18,24	(0,37)	OOOR <	(-)	10,06	(0,32)	13,66	(0,68)	62,31	(0,36)	37,68	(0,01)	OOOR <	(-)
IL-8	6,6	(0,28)	6,14	(0,94)	2,43	(0,19)	21,99	(1,26)	12,45	(0,71)	23,22	(0,39)	2,54	(0,37)
TGF-α	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)
LEP	OOOR <	(-)	108,87	(0,31)	128,96	(0,51)	218,99	(0,37)	108,87	(0,31)	85,37	(0,00)	71,52	(0,71)
EGF	OOOR <	(-)	n.g.	(-)	0,25	(0,93)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)
HB-EGF	200,95	(0,08)	n.g.	(-)	40,37	(0,27)	31,29	(0,01)	30,34	(0,36)	92,17	(0,40)	74,99	(0,10)

Tab. 17: Zelldifferenzierungsmarker. Die Tabelle zeigt die Messung von sechs Zelldifferenzierungsmarkern mit Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF) und Chondrosarkomzellen (CS). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in pg/ml, daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOOR <) gekennzeichnet. Für die Kategorie SS wurden nicht alle Experimente mit Proben beladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g) gekennzeichnet.

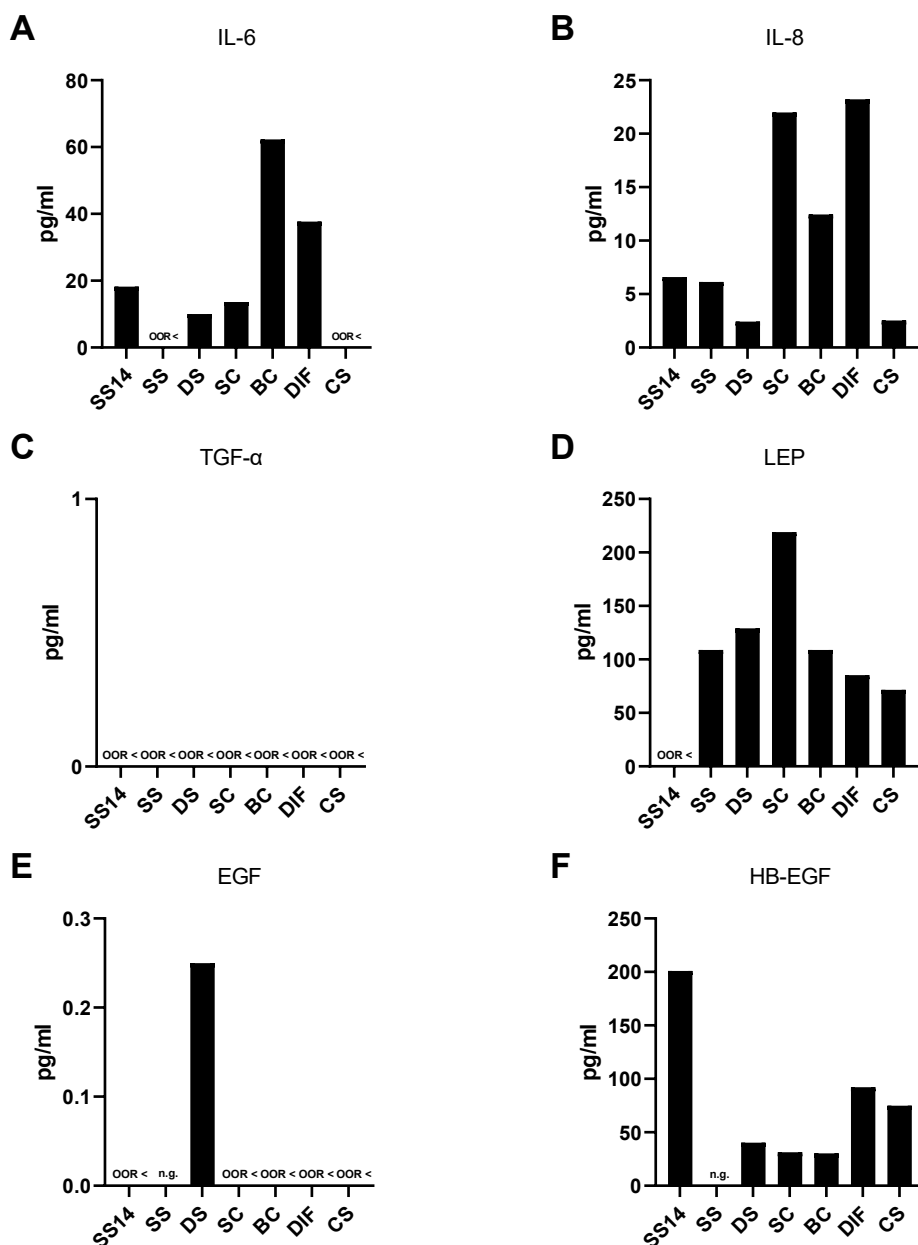


Abb. 16: Zelldifferenzierungsmarker. Die Säulendiagramme zeigen die Messungen von Zelldifferenzierungsmarkern bei Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen (A-F). Die Säulen zeigen jeweils die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe an. Die Messung für Interleukin-6 (IL-6)(A) zeigte zunehmende Messwerte von SS zu BC. Die Messung für Interleukin-8 (IL-8)(B) zeigte niedrige Messwerte bei SS14, SS und DS, während die Messwerte bei den Musterkategorien des degenerativen Knorpels erhöht waren. Bei Transforming growth factor α (TGF- α)(C) lagen alle Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze. Die Messung für Leptin (LEP)(D) zeigte ein Punctum Maximum bei DS und danach einen kontinuierlichen Abfall hin zu DIF. Bei der Messung für Epidermal growth factor (EGF)(E) blieben alle Messwerte mit Ausnahme von DS unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Die Messwerte von Heparin binding EGF like growth factor (HB-EG)(F) zeigten nur eine geringe Streuung mit einem isoliert höheren Messwert bei SS14. Abkürzungen: 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkomzellen (CS), unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (OOR <). Bei EGF und HB-EGF wurden für SS keine Proben geladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet.

4.5 Knochenumbau

In der Kategorie Knochenumbau wurden Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen auf die Biomarker OPN, FST, HGF und BMP9 untersucht (ausführliche Ergebnisse siehe Tab. 18).

OPN (Abb. 17 A) wirkt stimulierend auf Osteoklastenfunktion und inhibierend auf die Matrixmineralisierung. FST (Abb. 17 B) antagonisiert Faktoren der TGF- β -Superfamilie und inhibiert dadurch die Bildung von Knochen. HGF (Abb. 17 C) ist eng verknüpft mit der Expression von BMPs, auch BMP9 (Abb. 17 D) und induziert somit die Formation von Knochen. Bei FST zeigte sich von SS14 zu BC ein kontinuierlicher Abfall der Werte, um dann bei DIF und CS wieder höhere Werte zu präsentieren. Aus den Messergebnissen für OPN, HGF und BMP9 ließen sich jeweils keine klaren Zusammenhänge mit der vorliegenden Musterform ableiten.

	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
OPN	275,05	(0,45)	5431,17	(0,32)	2574,03	(0,10)	2348,92	(0,48)	3354,39	(0,17)	6361,65	(0,24)	OOOR <	(-)
FST	116,59	(0,06)	n.g.	(-)	70,97	(0,45)	30,38	(0,07)	OOOR <	(-)	136,16	(0,57)	801,47	(1,35)
HGF	518,735	(0,53)	228,28	(0,25)	234,71	(0,28)	280,72	(1,13)	233,285	(0,56)	599,943	(0,77)	106,995	(0,92)
BMP9	OOOR <	(-)	n.g.	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)

Tab. 18: Knochenumbaumarker. Die Tabelle zeigt die Messung von vier Knochenumbau-Markern mit Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF) und Chondrosarkomzellen (CS). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in pg/ml. Daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOOR <) gekennzeichnet. Für die Kategorie SS wurden nicht alle Experimente mit Proben beladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet.

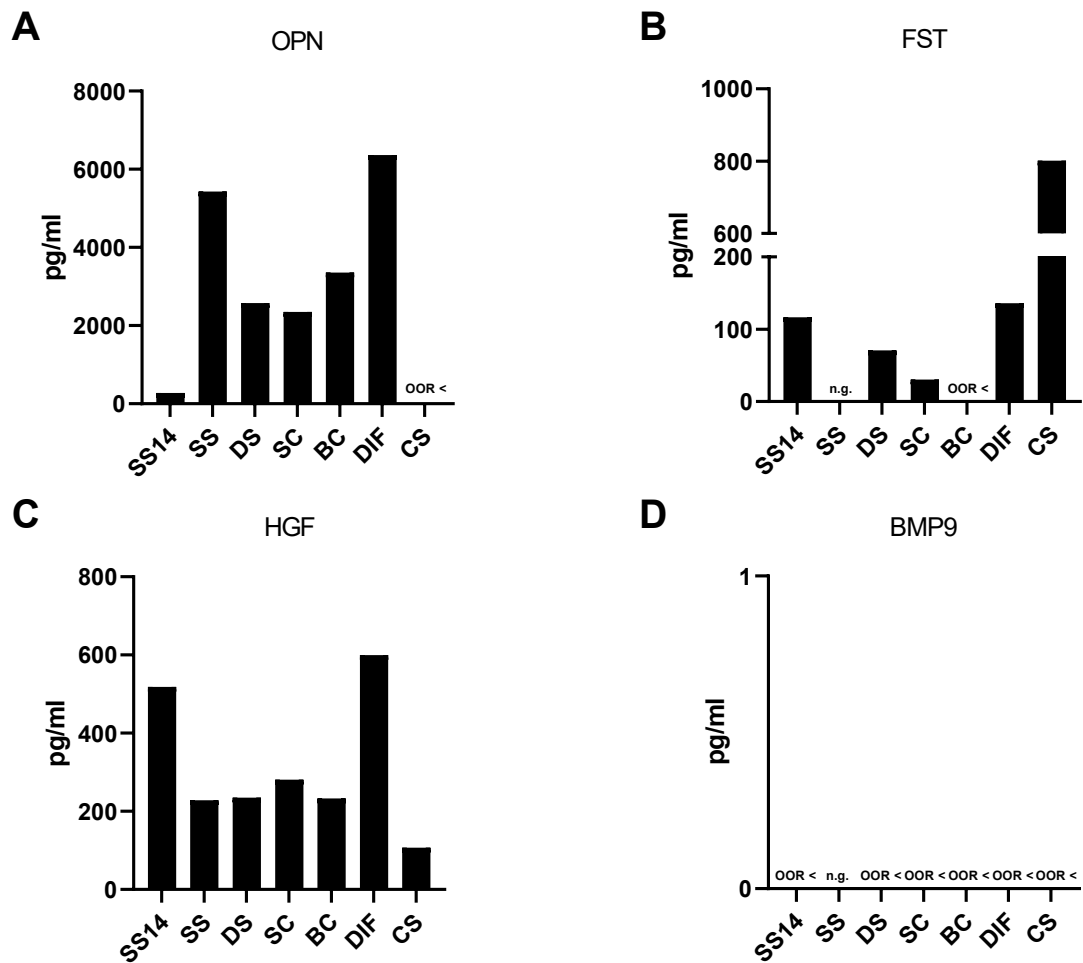


Abb. 17: Knochenbaumarbeiter. Die Säulendiagramme zeigen die Messungen von Biomarkern des Knochenbaus aus dem Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen (A-D). Die Säulen zeigen jeweils die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe an. Aus den Messergebnissen für Osteopontin (OPN)(A), Follistatin (FST)(B) und Hepatocyte growth factor (HGF)(C) ließen sich jeweils keine klaren Zusammenhänge mit der vorliegenden Musterform ableiten. BMP9 blieb überall unterhalb der Nachweisgrenze (D). Abkürzungen: 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkomzellen (CS), unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (OOR <). Für die Kategorie SS wurden nicht alle Experimente mit Proben beladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g) gekennzeichnet.

4.6 Angiogenese

In der Kategorie Angiogenese wurden Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen auf die Biomarker VEGF, FGF1, FGF2, ENG, ANGPT2, ET-1 (ausführliche Ergebnisse siehe Tab. 19) untersucht.

Alle dieser Biomarker beeinflussen in der einen oder anderen Weise die Bildung und Einsprossung von Blutgefäßen. Die Messung von VEGF (Tab. 19) zeigte relativ gleichbleibende Werte von SS bis BC. Alle übrigen Messwerte waren unterhalb der Nachweisgrenze. Die Messung von VEGF ist jedoch kritisch zu betrachten, weil bei einem großen Teil der Standardreihe ein Messfehler vorlag.

Die Messung von FGF-1 (Abb. 18 A) zeigte einen leichten kontinuierlichen Anstieg der Messwerte von SS14 zu BC, mit aber einem niedrigen Messwert bei DIF. Der Messwert bei CS lag im Vergleich zu den Messwerten der Musterkategorien auf einem durchschnittlichen Niveau. Die FGF-2-Messwerte (Abb. 18 B) lagen auf gleichbleibender Höhe. Die Messung von ENG (Abb. 18 C) zeigte den niedrigsten Messwert bei DS mit einer Zunahme hin zu DIF. Der Messwert von CS lag dort im Vergleich zu den Messwerten der Musterkategorien auf einem durchschnittlichen Niveau.

Die Messung von ANGPT2 (Abb. 18 D) zeigte einen tendenziellen Abstieg der Messwerte von SS14 nach BC und einen deutlich erhöhten Wert bei DIF. Der Messwert von CS war dort nahe dem niedrigsten Messwert bei BC. Bei der Messung von ET-1 (Abb. 18 E) waren alle Werte des Knorpelgewebes unterhalb der Nachweisgrenze, lediglich bei CS konnte ein niedriger Wert erfasst werden.

	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
VEGF	OOB <	(-)	351,06	(0,44)	351,06	(0,74)	346,01	(0,89)	339,83	(0,32)	OOB <	(-)	OOB <	(-)
FGF-1	712,74	(0,12)	n.g.	(-)	743	(0,22)	843,72	(0,04)	1080,83	(0,19)	277,42	(0,25)	533,45	(1,08)
FGF-2	7277,51	(0,02)	n.g.	(-)	6473,14	(0,00)	7013,93	(0,05)	6475,71	(0,16)	6756,65	(0,00)	6957,78	(0,01)
ENG	3732,16	(0,01)	n.g.	(-)	2491,6	(0,18)	2534,6	(0,01)	4232,98	(0,22)	6034,38	(0,08)	3210,14	(0,73)
ANGPT2	164,27	(0,28)	n.g.	(-)	95,8	(0,17)	83,08	(0,00)	45,89	(0,26)	136,72	(0,04)	51,48	(1,33)
ET-1	OOB <	(-)	n.g.	(-)	OOB <	(-)	OOB <	(-)	OOB <	(-)	OOB <	(-)	5,27	(2,21)

Tab. 19: Angiogenesemarker. Die Tabelle zeigt die Messung von sechs Biomarkern mit Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF) und Chondrosarkomzellen (CS). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in pg/ml. Daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOB <) gekennzeichnet. Für die Kategorie SS wurden nicht alle Experimente mit Proben beladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet.

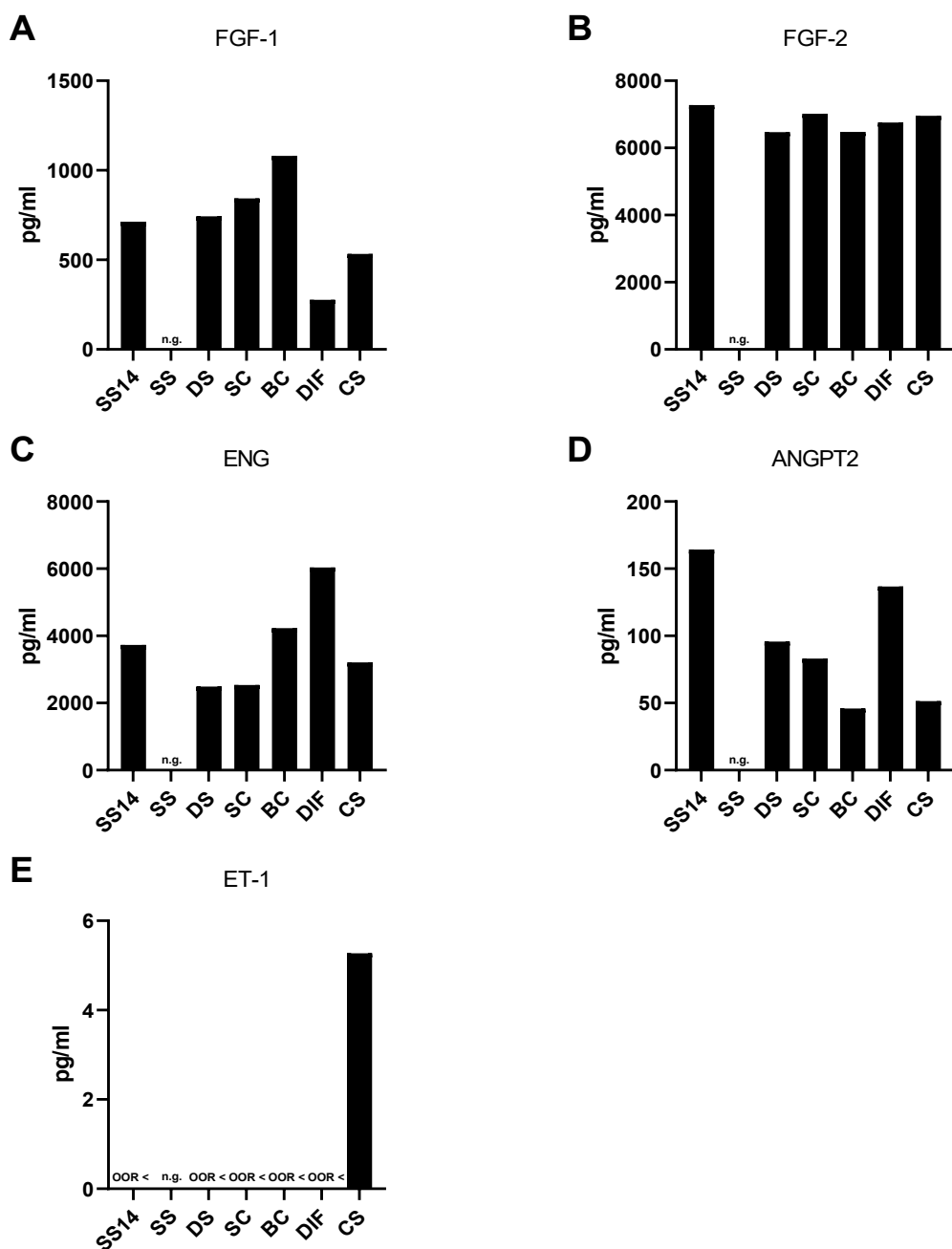


Abb. 18: Angiogenesemarker. Die Säulendiagramme zeigen die Messungen von Angiogenesemarkern bei Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen (**A-E**). Die Säulen zeigen jeweils die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe an. Die Messung von Fibroblast growth factor 1 (FGF1)(**A**) zeigte einen leichten kontinuierlichen Anstieg der Messwerte von SS14 zu BC und niedrigem Messwert bei DIF. Die Fibroblast growth factor 2 Messwerte (FGF2)(**B**) lagen auf gleichbleibender Höhe. Die Messung von Endoglin (ENG)(**C**) zeigte den niedrigsten Messwert bei DS mit einer Zunahme hin zu DIF. Die Messung von Angiopoietin-2 (ANGPT2)(**D**) zeigte einen Abstieg der Messwerte von SS14 nach BC und deutlich erhöhten Werten bei DIF. Bei Endothelin-1 (ET-1) konnte lediglich ein niedriger Wert bei CS gemessen werden (**E**). Abkürzungen: 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkomzellen (CS). Für die Kategorie SS wurden keine Proben geladen. Diese sind mit nicht geladen (n.g.) gekennzeichnet.

4.7 Immuncheckpoints

In der Kategorie Immuncheckpoints wurden die Biomarker PD1, PDL1, CTLA4, TIM3 und TLR2 untersucht (ausführliche Ergebnisse siehe Tab. 20).

PD1 und sein Ligand PDL1, CTLA4 und TIM3 gehören zu den abschwächenden Immuncheckpoints, das bedeutet durch deren Aktivierung auf Immunzellen wird die Antwort der Immunzellen reduziert. Die Messungen für PD1, PDL1, CTLA4 und TIM3 (Abb. 19 A-D) lagen größtenteils unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze oder auf sehr niedrigem Niveau. Ausnahmen bildeten PD1 und TIM3, die bei DIF hohe Messwerte zeigten, und PDL1, das bei CS deutlich erhöht war. Außerdem war bei CTLA4 der Messwert von SS deutlich erhöht. TLR2 schwächt die Immunantwort nicht ab, sondern stimuliert sie. TLR2 (Abb. 19 E) war in allen Vergleichsgruppen nachweisbar und zeigte den höchsten Wert analog zu PD1 und TIM3 bei DIF.

Insgesamt zeigten sich die Messergebnisse der Immuncheckpoints bemerkenswert. Die Messwerte bei DIF von PD1, TIM3 und TLR2 waren gegenüber den restlichen Messwerten jeweils deutlich erhöht. Bei PDL1 war der Messwert von CS, bei CTLA4 der Messwert von SS deutlich erhöht.

	SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
PD1	7,14	(1,89)	0,55	(0,00)	7,14	(0,63)	2,61	(16,97)	OOOR <	(0,30)	73,54	(0,26)	1,04	(2,12)
PDL1	1,57	(0,00)	1,57	(0,94)	1,27	(0,35)	0,72	(0,28)	0,62	(0,27)	1,37	(0,00)	60,84	(0,17)
CTLA4	OOOR <	(-)	130,99	(2,12)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)
TIM3	0,54	(0,39)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	22,28	(0,17)	0,36	(0,02)
TLR2	167,76	(0,19)	48,6	(1,02)	75,27	(0,09)	187,35	(0,52)	96,02	(0,09)	569,31	(0,07)	12,55	(2,48)

Tab. 20: Immuncheckpoints. Die Tabelle zeigt die Messung von Biomarkern mit Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF) und Chondrosarkomzellen (CS). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (\bar{x}) aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in pg/ml. Daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOOR <) gekennzeichnet.

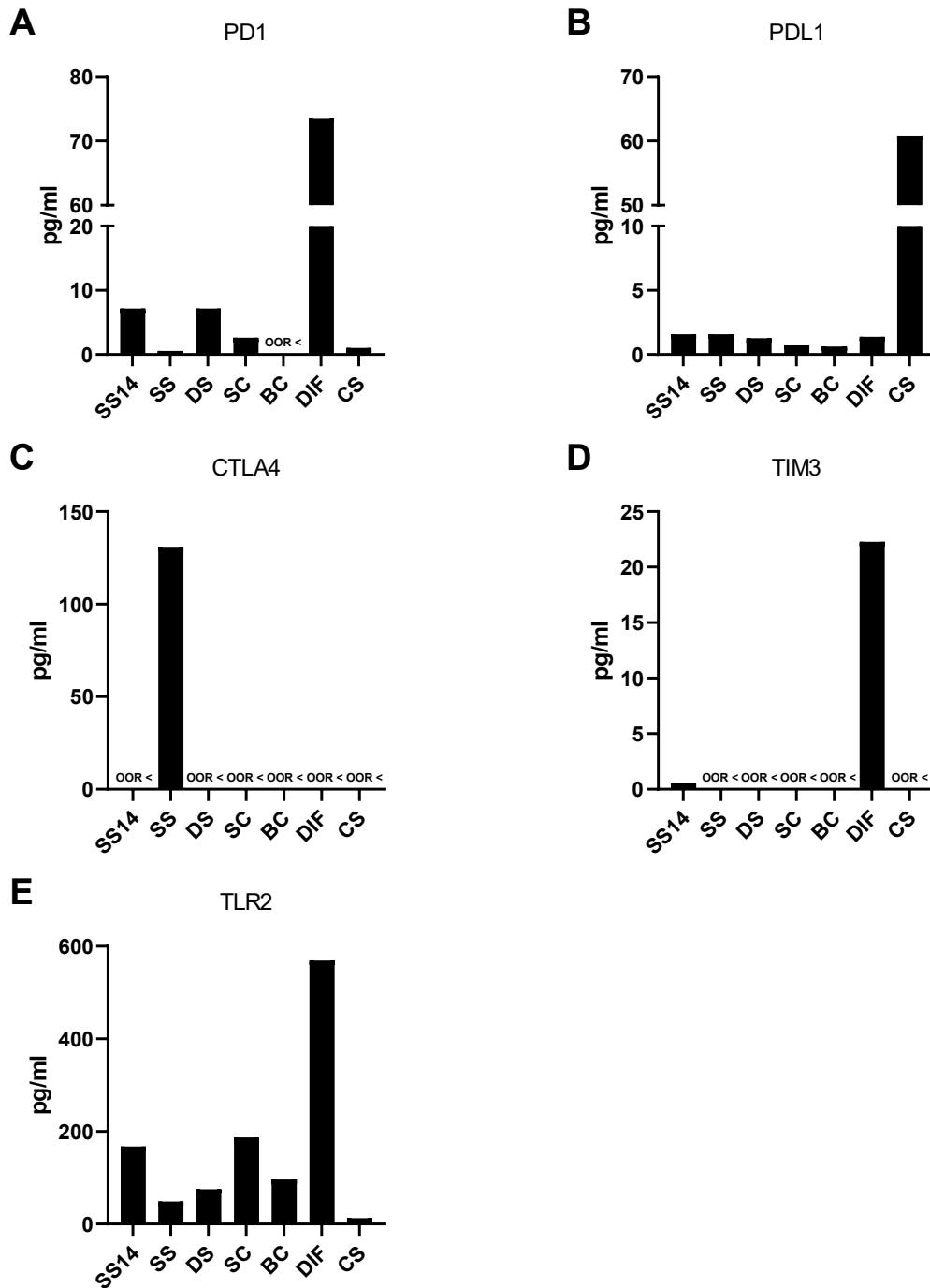


Abb. 19: Immuncheckpoints. Die Säulendiagramme zeigen die Messungen von Immuncheckpoints bei Kniegelenksknorpel und Chondrosarkomzellen (A-E). Die Säulen zeigen jeweils die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe an. Die Messung von Programmed cell death protein 1 (PD1)(A), Programmed cell death 1 ligand 1 (PDL1)(B), Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (CTLA4)(C) und T cell immunoglobulin and mucin domain containing 3 (TIM3)(D) lagen größtenteils unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze oder auf sehr niedrigem Niveau. Ausnahmen bildeten PD1 und TIM3, die bei DIF hohe Messwerte zeigten, und PDL1, das bei CS deutlich erhöht war. Außerdem war bei CTLA4 der Messwert von SS deutlich erhöht. Toll like receptor 2 (TLR2)(E) war in allen Vergleichsgruppen nachweisbar und zeigte den höchsten Wert bei DIF. Abkürzungen: 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), Chondrosarkomzellen (CS), unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze (OOR <).

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 33 Biomarker aus den Kategorien Proliferation/Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints bei bis zu sechs Knorpelzuständen und zusätzlich Chondrosarkomzellen auf Vorkommen und Ausprägung untersucht (Zusammenfassung siehe Tab. 21). Die Kategorisierung fand entsprechend der relevantesten bekannten Funktionen der Biomarker in Bezug auf Knorpeldegeneration statt.

Bezüglich anti-Apoptose zeigten sich bei dem intrazellulären Biomarker AKT und in der Kategorie Apoptose bei den intrazellulären Biomarkern JNK, BAD und CASP9 eindeutig steigende Messwerte von gesundem hin zu arthrotischem Knorpel, also von SS14 nach DIF. Auch das extrazelluläre und apoptotisch wirksame TRAIL zeigte diesen Trend (mit Einschränkungen aufgrund eines ausreißenden Messwertes bei SS). Bemerkenswert war, dass bei dem anti-Apoptosefaktor AKT der Messwert von BC gegenüber CS noch deutlich erhöht war. Andererseits waren bei den intrazellulären Apoptosefaktoren die Messwerte von CS gegenüber BC oder DIF noch deutlich erhöht. Die Messwerte von BCL2 zeigten sich rund um Small Clusters leicht erhöht, die Messwerte von P53, CASP8, SFAS und SFASL zeigten sich auf den ersten Blick uneindeutig.

Der Kategorie Inflammation wurden lediglich zwei Biomarker direkt zugeordnet, da Inflammation bei Arthrose mehr eine unspezifische Begleiterscheinung als ein spezifisches und hinreichendes Merkmal ist. So ist die Analyse von einigen Biomarkern, die prinzipiell ebenfalls Inflammation anzeigen, unter anderen Gesichtspunkten wie Zelldifferenzierung oder Angiogenese aufschlussreicher. Die Messwerte von MIF zeigten keine eindeutige Tendenz. TNF- α war nicht nachweisbar bis auf einen stark erhöhten Messwert bei DIF.

Bezüglich Zelldifferenzierung zeigten sich mit IL-6 und IL-8 zwei klassische Biomarker zur Induktion von hypertropher Chondrozytendifferenzierung bei den Musterkategorien des höhergradig arthrotischen Knorpels erhöht. Die Werte von CS waren dort vergleichsweise niedrig. Bei LEP lagen die höchsten Werte bei SC vor, danach kam es wieder zu einem leichten Abfall. HB-EGF präsentierte isoliert hohe Werte bei SS14, sowie leicht erhöhte Werte bei DIF und CS. EGF lag isoliert bei DS erhöht vor.

Bei den Markern des Knochenumbaus zeigte sich FST von SS14 zu BC kontinuierlich abfallend, um dann bei DIF und CS wieder höhere Werte zu präsentieren. Bei OPN und HGF konnte kein Bezug auf Veränderung des Vorhandenseins in Abhängigkeit der zellulären Organisation beobachtet werden.

VEGF, FGF-1, FGF-2, ENG, ANGPT2 und ET-1 beeinflussen alle in der einen oder anderen Weise die Neubildung oder Aussprossung von Blutgefäßen. Analog zu dem Verlauf der Messwerte bei FST war die Messung von ANGPT2 – kontinuierlicher Abfall der Messwerte von SS14 nach BC mit starkem Anstieg bei DIF. Einen nun für FST und ANGPT2 beschriebenen gegensätzlichen Trend zeigten die Messwerte von FGF-1, wo Messwerte von SS14 nach BC anstiegen, um dann bei DIF wieder deutlich abzufallen. Bei ENG zeigte sich ein deutlicher Anstieg hin zu DIF. Die Messwerte von FGF-2 waren tendenziell gleichbleibend, die Messwerte von ET-1 uneindeutig.

Die in Bezug auf Arthrose fast gänzlich unerforschten Immuncheckpoints zeigten durchaus bemerkenswerte Ergebnisse. PD1 und TIM3 waren als Immunantwort- abschwächende Faktoren jeweils bei DIF deutlich erhöht. TLR2 war als Immunantwort- fördernder Faktor bei DIF ebenfalls deutlich erhöht. Bei PDL1 war der Messwert von CS, bei CTLA4 der Messwert von SS deutlich erhöht. Alle anderen Messergebnisse für diese Checkpoints waren sehr niedrig bzw. unterhalb der Nachweisgrenze.

		SS14		SS		DS		SC		BC		DIF		CS		
		\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	\bar{x} MFI	(CV)	
Proliferation/Apoptose	BCL2	30	(0,12)	n.g.	(-)	38,8	(0,28)	52	(0,84)	35	(0,23)	32	(0,34)	125,8	(1,13)	
	AKT	63	(0,10)	n.g.	(-)	275,8	(0,44)	1146,8	(0,34)	1514,5	(0,01)	1179,8	(0,48)	924,5	(1,01)	
	P53	35,8	(0,05)	n.g.	(-)	67,3	(0,09)	59,8	(0,03)	51,5	(0,13)	81,8	(0,33)	1059,3	(0,81)	
	BAD	73	(0,06)	n.g.	(-)	196	(1,01)	303,5	(0,71)	553	(0,02)	1134	(0,44)	1879	(0,91)	
	JNK	42	(0,22)	n.g.	(-)	88	(0,48)	91,3	(0,37)	136,3	(0,03)	245,8	(0,41)	395,8	(0,84)	
	CASP8	44	(0,07)	n.g.	(-)	49,3	(0,01)	49,3	(0,01)	65	(0,17)	44,8	(0,70)	151	(1,85)	
	CASP9	28	(0,36)	n.g.	(-)	46,3	(3,30)	53,8	(2,99)	56,8	(1,41)	70,3	(3,04)	195,8	(0,90)	
			\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
	SFAS	OOOR <	(-)	41,15	(0,40)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	31,83	(0,15)	189,46	(0,35)	
	SFASL	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	
TRAIL	9,97	(0,09)	107	(1,33)	10,14	(0,11)	8,72	(0,62)	17	(0,02)	29,09	(0,12)	OOOR <	(-)		
		\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	
INF	MIF	2009,39	(0,01)	OOOR >	(-)	3833,39	(0,02)	5237,48	(0,03)	2958,86	(0,03)	4099,61	(0,10)	3799,63	(0,20)	
	TNF- α	3,49	(0,02)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	9,62	(0,39)	OOOR <	(-)	
Zellidifferenzierung	IL-6	18,24	(0,37)	OOOR <	(-)	10,06	(0,32)	13,66	(0,68)	62,31	(0,36)	37,68	(0,01)	OOOR <	(-)	
	IL-8	6,6	(0,28)	6,14	(0,94)	2,43	(0,19)	21,99	(1,26)	12,45	(0,71)	23,22	(0,39)	2,54	(0,37)	
	TGF- α	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	
	LEP	OOOR <	(-)	108,87	(0,31)	128,96	(0,51)	218,99	(0,37)	108,87	(0,31)	85,37	(0,00)	71,52	(0,71)	
	EGF	OOOR <	(-)	n.g.	(-)	0,25	(0,93)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	
	HB-EGF	200,95	(0,08)	n.g.	(-)	40,37	(0,27)	31,29	(0,01)	30,34	(0,36)	92,17	(0,40)	74,99	(0,10)	
Knochen- umbau	OPN	275,05	(0,45)	5431,17	(0,32)	2574,03	(0,10)	2348,92	(0,48)	3354,39	(0,17)	6361,65	(0,24)	OOOR <	(-)	
	FST	116,59	(0,06)	n.g.	(-)	70,97	(0,45)	30,38	(0,07)	OOOR <	(-)	136,16	(0,57)	801,47	(1,35)	
	HGF	518,735	(0,53)	228,28	(0,25)	234,71	(0,28)	280,72	(1,13)	233,285	(0,56)	599,943	(0,77)	106,995	(0,92)	
	BMP9	OOOR <	(-)	n.g.	-	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	
Angiogenese	VEGF	344	(0,44)	351,06	(0,74)	346,01	(0,89)	339,83	(0,32)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	
	FGF-1	712,74	(0,12)	n.g.	(-)	743	(0,22)	843,72	(0,04)	1080,83	(0,19)	277,42	(0,25)	533,45	(1,08)	
	FGF-2	7277,51	(0,02)	n.g.	(-)	6473,14	(0,00)	7013,93	(0,05)	6475,71	(0,16)	6756,65	(0,00)	6957,78	(0,01)	
	ENG	3732,16	(0,01)	n.g.	(-)	2491,6	(0,18)	2534,6	(0,01)	4232,98	(0,22)	6034,38	(0,08)	3210,14	(0,73)	
	ANGPT2	164,27	(0,28)	n.g.	(-)	95,8	(0,17)	83,08	(0,00)	45,89	(0,26)	136,72	(0,04)	51,48	(1,33)	
	ET-1	OOOR <	(-)	n.g.	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	5,27	(2,21)	
Immuncheckpoints	PD1	7,14	(1,89)	0,55	(0,00)	7,14	(0,63)	2,61	(16,97)	OOOR <	(-)	73,54	(0,26)	1,04	(2,12)	
	PDL1	1,57	(0,00)	1,57	(0,94)	1,27	(0,35)	0,72	(0,28)	0,62	(0,27)	1,37	(0,00)	60,84	(0,17)	
	CTLA4	OOOR <	(-)	130,99	(2,12)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	
	TIM3	0,54	(0,39)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	OOOR <	(-)	22,28	(0,17)	0,36	(0,02)	
	TLR2	167,76	(0,19)	48,6	(1,02)	75,27	(0,09)	187,35	(0,52)	96,02	(0,09)	569,31	(0,07)	12,55	(2,48)	

Tab. 21: Übersicht aller gemessenen Biomarker - Hitzediagramm. Die Tabelle zeigt die Messung der 33 gemessenen Biomarker mit Multiplex Assays in Abhängigkeit der chondrozytären Musterkategorien 14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht (SS14), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (DIF), und Chondrosarkomzellen (CS). Unterteilung der Biomarker in die Kategorien Proliferation/Apoptose, Inflammation (INF), Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei Messungen einer gepoolten Stichprobe, gemessen in der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) für die Kategorie Proliferation/Apoptose und gemessen in pg/ml für die Kategorien Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints. Daneben jeweils der Variationskoeffizient (CV) in Klammern. Nicht vorhandene Variationskoeffizienten wurden mit "-" gekennzeichnet. Messwerte, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range < (OOR <) gekennzeichnet. Messwerte, die oberhalb der Multiplex Assays lagen, wurden mit Out Of Range > (OOR >) gekennzeichnet. Für die Kategorie SS wurden nicht alle Experimente mit Proben beladen. Diese sind dort mit nicht geladen (n.g) gekennzeichnet. Farbcodierung der Messwerte innerhalb der chondrozytären Musterkategorien erfolgte in Abhängigkeit der MFI oder Konzentration von niedrig (grün) nach hoch (rot). Farbcodierung von CS jeweils in der Farbe des nächstgelegenen Wertes aus der Musterkategorie desselben Biomarkers.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Studie

Für diese Studie wurden in einem ersten Versuch 33 Biomarker der Kategorien Proliferation und Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints bei bis zu sechs verschiedenen Knorpelzuständen und Chondrosarkomzellen untersucht. Die Grundlage für die Bemessung der Knorpelzustände bildeten die in jüngerer Vergangenheit etablierten Chondrozytenmuster Strings, Double Strings, Small Clusters, Big Clusters und Diffuse. Es wurde Gelenkknorpel von den Femurkondylen von insgesamt 41 Patienten gesammelt. Der Knorpel wurde zunächst zu kleinen Scheiben verarbeitet, um diese dann mithilfe von Polarisationsmikroskopie der entsprechenden Musterkategorie zuzuordnen. Zusätzlich wurden in der Zellkultur Chondrosarkomzellen angezüchtet. Mithilfe von Multiplex Assays wurde dann die Verteilung und Ausprägung der Biomarker quantitativ oder semi-quantitativ in den chondrozytären Musterkategorien und bei Chondrosarkomzellen gemessen.

5.2 Fragestellung

Hintergrund der vorliegenden Studie war die Beschreibung der sich ändernden zellulären Organisation bei fortschreitender Arthrose. Neben der Ausbildung von Double Strings und Small Clusters sind es vor allem die Big Clusters, denen eine ausgedehnte fokale Proliferation von Chondrozyten vorausgegangen sein muss. Aus diesem Grund wurde als besonderer Blickwinkel auf die molekularen Veränderungen bei Arthrose der Vergleich zu Onkoprozessen gezogen. Es stellte sich also die Frage, ob es Gemeinsamkeiten oder Unterschiede nicht nur hinsichtlich Proliferation und Apoptose, sondern auch hinsichtlich Inflammation, Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints gibt.

5.3 Detaillierte Aufschlüsselung der Ergebnisse mit Blick auf Onkoprozesse

5.3.1 Proliferation/Apoptose

Proliferation und Apoptose spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Behandlung von malignen Neoplasien. Im Zusammenhang mit Arthrose ist das Ausmaß beider Prozesse noch nicht endgültig geklärt.

BCL2 ist ein sehr prominentes Protoonkogen, das bei hoher Expression anti-apoptotische Wirkung durch Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotenzials entfaltet. Studien zeigten, dass auf mRNA-Ebene für BCL2 kein signifikanter Unterschied zwischen gesundem und arthrotischem Knorpel festgestellt werden konnte [154, 155]. Eine weitere Studie zeigte hingegen ein signifikant erhöhtes intrazelluläres BCL2-Niveau bei arthrotischen isolierten Chondrozyten im FACS-Nachweis [156]. Bei hier vorliegender Betrachtung basierend auf den speziellen Chondrozytenmustern zeigte sich zumindest eine leichte Erhöhung bei Degeneration vor allem bei den Small Clusters. Interessanterweise konnte bei einer Vielzahl von malignen Tumoren ebenfalls eine erhöhte Expression an BCL2 festgestellt werden, unter anderem auch in Chondrosarkomen [157, 158]. Dies zeigt sich auch im eigenen Datensatz. Interessanterweise war eine Inhibition von BCL2 in Chondrosarkomzellen viel weniger wachstumshemmend als die Hemmung von anderen Mitgliedern der BCL2-Familie [158].

Phosphoryliertes und damit aktiviertes AKT inaktiviert pro-apoptotische Faktoren der BCL2-Familie. Die semiquantitativen Messdaten der vorliegenden Arbeit von phosphoryliertem AKT zeigten einen deutlichen Anstieg von SS zu BC. Zwei Studien zeigten mittels Western Blot ebenfalls ein erhöhtes Vorkommen von phosphoryliertem AKT bei Knorpel von Arthrosepatienten [159, 160]. Auch immunhistochemisch wurde vermehrt phosphoryliertes AKT in der Umgebung von Chondrozytenclustern nachgewiesen [159]. Eine Dysregulation von AKT oder eine Mutation im AKT-Gen selbst, ist oft eine der Schlüsselpathologien bei malignen Tumoren. Seiner Funktion entsprechend kommt es bei Veränderungen zur Ausbildung aggressiver Phänotypen [161]. Bezüglich der Relevanz von AKT bei Chondrosarkomen gibt es bislang keine Studien. Der gemessene Wert bei CS zeigt phosphoryliertes AKT ebenfalls in relevanter Weise vorhanden, jedoch deutlich weniger als andere untersuchte Marker für Proliferation. Es könnte geschlossen werden, dass bei Chondrosarkomen andere Biomarker eine größere Rolle für die erhöhte Proliferations- und Wachstumstendenz spielen.

p53 ist ein prominentes Tumorsuppressorprotein, das bei DNA-Schäden vermehrt gebildet wird. Als nukleärer Transkriptionsfaktor induziert es die Expression von

Apoptosegenen und kann auch einen Zell-Zyklus-Arrest auslösen. Die vorliegenden semiquantitativen Messdaten von P53 zeigten keine große Dynamik mit allenfalls einer leichten Erhöhung in Diffuse. Es war bereits beobachtet worden, dass isolierte Chondrozyten von Arthrosepatienten eine größere Menge P53 aufwiesen als isolierte Chondrozyten aus gesundem Knorpel [162]. Bei P53^{-/-} Mäusen wurden nach Immobilisierung nur wenige apoptotische Chondrozyten und im Allgemeinen geringe Knorpeldegeneration im Kniegelenk festgestellt [163]. Im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs ist P53 häufig mutiert und kann dann nicht mehr seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ agieren. In der vorliegenden Studie wurde eine vergleichsweise hohe Konzentration P53 bei CS nachgewiesen. Eine Studie zeigte, dass P53-Mutationen bei Chondrosarkomen eher eine Minderheit darstellen und überwiegend bei Grad III und -IV Chondrosarkomen vorkommen [164].

TRAIL ist ein ubiquitär vorkommender Apoptosefaktor, der entsprechende TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bindet und dann den extrinsischen Apoptosepfad aktiviert. Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Daten von TRAIL zeigten zunächst keine große Dynamik. Unter Berücksichtigung des hohen Variationskoeffizienten (1,33) bei SS könnte man mit Einschränkungen eine steigende Tendenz von gesundem nach arthrotischem Knorpel interpretieren mit dann vor allem etwas erhöhten Werten bei Diffuse. Eine in vitro-Studie zeigte einen Apoptose-induzierenden Effekt von TRAIL auf humane Chondrozyten [165]. Eine weitere Studie zeigte erhöhte Expression von TRAIL in Rattenknorpel nach experimentell induzierter Arthrose [71]. Die Bedeutung des TRAIL im Zusammenhang mit Krebsprozessen ist bislang uneindeutig. Der für TRAIL gemessene vorliegende Wert bei CS lag unterhalb der Nachweisgrenze, was mit Blick auf seine Funktion als Apoptosefaktor bei einer malignen Neoplasie durchaus plausibel wäre. Klinische Studien mit Trail-Rezeptor-Agonisten zeigten überwiegend keine Wirksamkeit [166]. Andererseits konnte eine Fallstudie an einem Patienten mit metastasiertem Chondrosarkom zeigen, dass humanes rekombinantes TRAIL einen bildmorphologisch vollständigen Rückgang der Lungenmetastasen bewirkte [167].

BAD ist in der Lage Apoptose zu induzieren, indem es BCL2 deaktiviert. Es selbst wird wiederum durch Wachstumsfaktoren und unter anderem AKT inaktiviert. Die vorliegenden semiquantitativen Messdaten von BAD zeigten einen deutlichen Anstieg von SS14 zu DIF. Weitere Studien, die BAD im Gelenknorpel quantifiziert hätten, gibt es bislang nicht. Entsprechend seiner ubiquitären Funktion im menschlichen Organismus wäre zunächst jedoch eine erhöhte Apoptoseinduktion auch bei Chondrozyten des arthrotischen Knorpels zu anzunehmen. Ein relativ erhöhtes Vorkommen von BAD in

verschiedenen Tumorarten konnte bereits gezeigt werden [168]. Interessant hierbei ist, dass durch Inhibition von BAD, also Unterdrückung der Apoptosetendenz, gleichzeitig das Überleben und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung von Krebsstammzellen inhibiert wird [169]. Dies erscheint paradox, denn zu erwarten wäre eine Proliferationstendenz und Tumorwachstum bei Inhibition von BAD. Deshalb ist auch mit Blick auf die Arthrospregredienz fraglich, welche Rolle BAD letztlich einnimmt.

JNK ist in den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg involviert und kann die Expression von pro-apoptischen Genen auslösen. Aber nicht nur apoptoseinduzierende Wirkungen wurden für JNK berichtet, sondern auch proliferative. Die vorliegenden semiquantitativen Messwerte von JNK zeigten eine deutliche Zunahme bei den Musterkategorien des arthrotischen Knorpels. Eine *in vitro* Studie an isolierten Chondrozyten zeigte, dass aktiviertes JNK nur im Zytoplasma von arthrotischen Chondrozyten vorkam, nicht aber im Zytoplasma der gesunden [170]. Viel besser erforscht als die Wirkung des JNK auf Apoptose bei Arthrose, ist die Wirkung auf die Knorpeldegeneration. Hier gibt es zahlreiche Studien, die zeigen konnten, wie schädigend vermehrtes JNK auf die Knorpelhomöostase wirkt [171]. In Bezug auf die Rolle des JNK bei malignen Neoplasien herrscht bislang noch weniger Klarheit, weil sowohl proliferative als auch apoptotische Wirkungen beschrieben wurden. JNK war in CS in der vorliegenden Studie gegenüber den Knorpelproben erhöht, jedoch ist eine Interpretation aufgrund fehlender Forschungserkenntnisse unmöglich. Die Wirkung scheint abhängig von der JNK-Isoform und dem Zelltyp zu sein. Darüber hinaus sind bei vielen Krebsarten JNK-Gene mutiert [172]. Somit trägt eine Dysbalance des JNK in jedem Fall zu einem veränderten Zellmetabolismus bei – in welche Richtung, muss im Einzelnen erforscht werden.

CASP8 stellt ein zentrales Schlüsselmolekül auf dem extrinsischen Apoptoseweg dar, der durch Vertreter der TNF-Superfamilie losgetreten wird. Die vorliegenden semiquantitativen Messergebnisse von CASP8 zeigten keine große Dynamik, obgleich der höchste Wert bei Big Clusters gemessen wurde. In einem Tierversuch mit Kaninchen zeigten sich deutlich erhöhte CASP8-Level auf mRNA Ebene nach operativ induzierter Arthrose [173]. Und auch die Injektion von Caspase-Inhibitoren, darunter CASP8-Inhibitor, in die Kniegelenke von Kaninchen mit experimentell induzierter Arthrose, resultierte in einer mildereren Knorpeldegeneration [174]. Den Signalwegen entsprechend würden vermehrtes Vorkommen von TNF- α oder TRAIL bei DIF als Aktivatoren des extrinsischen Apoptoseweges letztlich auch vermehrte Expression von CASP8 bewirken. Die Ergebnisse zeigten dies jedoch nicht. Die Erkenntnisse zur Wirkung von CASP8 im Kontext von malignen Neoplasien ist deutlich begrenzt. Der vorliegende Messwert für

CS war im Gegensatz zu den Knorpelproben deutlich erhöht. Auch wenn mittlerweile auch wachstumsfördernde Effekte von CASP8 entdeckt wurden, so wird trotzdem davon ausgegangen, dass es tendenziell apoptotisch und somit anti-onkogen wirkt [175].

CASP9 stellt ein zentrales Schlüsselmolekül auf dem intrinsischen Apoptoseweg dar, der durch stressbedingte zellinterne Prozesse ausgelöst wird. Die vorliegenden semiquantitativen Messwerte von CASP9 zeigten einen eindeutigen Anstieg von SS14 zu DIF. Eine andere Studie untersuchte den Einfluss von CASP9-Inhibition nach Traumaexposition bei Pferdeknochen. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der chondrozytären Apoptose gegenüber der Kontrollgruppe ohne Inhibition von CASP9 [176]. Eine weitere Studie auf immunhistochemischer Ebene zeigte eine signifikante Erhöhung von CASP9 bei induzierter Apoptose durch Stickstoffmonoxid respektive freie Radikale [177]. Die Rolle von CASP9 im Zusammenhang mit malignen Tumoren ist allenfalls in Ansätzen geklärt. Der vorliegende Messwert für CS war im Vergleich zu den in den Knorpelproben gemessenen Werten deutlich erhöht. In diesem Kontext aufschlussreich ist die resultierende Resistenz gegen Chemotherapeutika und Wachstumstendenz durch Inhibition von CASP9 bei einigen Tumorzelllinien [178].

SFAS und SFASL sind die löslichen Formen des Fas-Liganden und des membranengebundenen Fas-Rezeptors. SFASL induziert extrinsische Apoptose durch Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Superfamilie mit intrazellulärer Todesdomäne – SFAS inhibiert die Bindung von SFASL. Die vorliegenden Messwerte für SFASL lagen alle unterhalb der Nachweisgrenze, die Daten von SFAS zeigten keine große Dynamik. Hashimoto et al. fanden heraus, dass SFASL in der Synovialflüssigkeit von Arthrosepatienten vorhanden sein kann, jedoch in viel geringerem Ausmaß als bei rheumatoider Arthritis. Bezüglich des Effekts entdeckte die Arbeitsgruppe nur für die membranbindende Variante FASL eine apoptoseinduzierende Wirkung auf Chondrozyten, nicht aber für SFASL [69]. In Verbindung mit malignen Neoplasien wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von SFAS in vielen Krebsarten zu finden ist, eine tumorprotektive Rolle zu Teil wird und mit einer schlechten Prognose korreliert [179].

Die Frage um Proliferation und Apoptose wird seit Anbeginn der Arthroseforschung sehr kontrovers diskutiert. Hinweise für die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges ließen sich mit Einschränkungen durch die vorliegenden Daten von TNF- α und TRAIL zeigen. Diese zeigten vermehrtes Vorkommen bei DIF. Die Messwerte von CASP8 als zentrale Caspase des extrinsischen Apoptosepfades unterstützen dies nicht – allerdings bleibt offen, welche Rolle CASP8 in diesem Kontext genau einnimmt. Im Gegensatz zur entgleisten molekularen chondrozytären Umgebung als Auslöser für

extrinsische Apoptose stehen bei der intrinsischen Apoptose physikochemische Auslöser im Vordergrund. Neben Mikrotraumata sind es erhöhte Temperaturen und freie Sauerstoffradikale des Stickstoffmonoxid, die durch das Entzündungsgeschehen im Gelenk bedingt werden und lange mit Gelenkarthrose assoziiert sind. Dies ließ sich durch die gemessenen Werte für CASP9 belegen. Darüber hinaus zeigte sich der Apoptosemarker BAD von BC nach DIF eindeutig erhöht. Die Rolle von JNK als Auslöser von Apoptose ist nicht endgültig geklärt, zeigte sich in arthrotischem Knorpel aber ebenfalls von BC nach DIF deutlich erhöht.

Auch für Anti-Apoptose gab es eindeutige Hinweise auf Molekularebene. Die Messwerte von AKT zeigten diesbezüglich eine eindeutig steigende Tendenz Richtung BC und anschließend Abfall nach DIF in arthrotischem Knorpel. In der Frage um Proliferation, zumindest fokaler Natur, herrscht Einigkeit. Die Zellcluster, die zahlreich überwiegend im Bereich von Knorpelfissuren, aber auch allgemein bei arthrotischem Knorpel zu finden sind, werden als Hinweis auf chondrozytäre Proliferation verstanden [40, 41, 180, 181]. Apoptose- und Proliferationsprozesse scheinen einer gewissenusterspezifischen Dynamik zu unterliegen. Während anti-apoptische Signale durch BCL2 und AKT zunächst anstiegen, um von SC/BC nach DIF wieder rückläufig zu werden, zeigten die Apoptosefaktoren BAD, JNK, P53 – und TRAIL mit Einschränkungen – gerade von BC nach DIF Zuwächse. An dieser Stelle kommt es also vermeintlich zu einer Umkehr der Verhältnisse, sodass Apoptose möglicherweise erst ab BC an Bedeutung gewinnt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Blick auf SS14 lassen vermuten, dass nicht ein Prozess auf einem geringeren Niveau stattfindet als beim Gesunden, sondern dass durch den allgemeinen Erregungszustand, in dem sich das System Gelenkknorpel bei Arthrose befindet, die Chondrozyten auf einem erhöhten und dysbalancierten metabolischen Niveau agieren.

5.3.2 Inflammation

Es gibt zahlreiche Biomarker, die in der Vergangenheit in ihrer Rolle als zentrale Entzündungsfaktoren bei Arthrose identifiziert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei allgemeine inflammatorische Biomarker untersucht – MIF und TNF- α .

MIF bewirkt im Sinne eines inflammatorischen Zytokins die Einwanderung von Makrophagen. Die vorliegenden Messergebnisse von MIF zeigten keine eindeutige Dynamik. Bezüglich MIF existieren sehr gegensätzliche Forschungsergebnisse. Xi et al. beschrieben, dass Arthrosepatienten eine geringere Menge MIF im Serum und der Synovialflüssigkeit aufwiesen als bei Gesunden. Dadurch wurde geschlussfolgert, dass MIF eine protektive Rolle bei Arthrose zukommt [182]. Die vorliegenden Messwerte von MIF zeigten zumindest innerhalb der Musterkategorien der Arthrosepatienten den höchsten Wert bei SS und den niedrigsten Wert bei BC – was entsprechend den Ergebnissen von Xi et al. wäre. Andererseits wurde beschrieben, dass MIF nicht nur im Serum und der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthrose erhöht ist, sondern auch, dass isolierte Chondrozyten von Arthrosepatienten mehr MIF produzierten als die gesunde Kontrolle [59]. Dazu würde passen, dass bei den Messungen der vorliegenden Arbeit, die Musterkategorien des Knorpels von Arthrosepatienten insgesamt mehr MIF aufwiesen als der Knorpel des 14-jährigen Jungen. In der onkologischen Forschung ist das Interesse an MIF in den letzten Jahren immer größer geworden, weil neben der Rekrutierung von Makrophagen über CD74-Rezeptoren auch Signalwege für Zellwachstum und -überleben losgetreten werden [183]. Der vorliegende Messwert für CS lag auf einem Niveau ähnlich des der Knorpelproben.

TNF- α ist eines der vielseitigsten pro-inflammatorischen Zytokine im Zusammenhang mit Arthrose. Die Wirkungen reichen von Matrixdegradation über MMPs und ADAMTs bis hin zu Apoptoseinduktion über TNFRs. Aber auch Beteiligungen an Zellwachstum und -überleben über NF- κ B wurden beschrieben. Die vorliegenden Messdaten von TNF- α blieben in nahezu allen Bereichen unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze mit Ausnahme von SS14 und DIF. Der Umstand, dass bei DIF auch TNF- α erhöht nachweisbar war, deutet darauf hin, dass inflammatorische Prozesse auch in diesem Stadium noch eine große Rolle spielen. Dies wird ebenfalls durch die deutlich erhöhten IL-6- und IL-8-Werte bei fortgeschrittener Knorpeldegeneration bestätigt. Bisher wurden erhöhte TNF- α Werte im Serum von Patienten mit Arthrose berichtet [184]. In der Synovialflüssigkeit zeigte jedoch die gemessene Konzentration TNF- α keine Korrelation mit dem Kellgren-Lawrence Score der Arthrosepatienten [185]. Verglichen mit der von Ding et al.

nachgewiesenen Konzentration in der Synovialflüssigkeit bei Arthrosepatienten liegt die hier gemessene Konzentration in der Vergleichsgruppe DIF um etwa das zwanzigfache höher. So scheinen die Konzentrationsverhältnisse im Gelenkknorpel deutlich größere Dimensionen zu besitzen, als in der Synovialflüssigkeit – auch der Blick auf IL-6 und IL-8 würde dies bestätigen. Weiterhin muss aber herausgestellt werden, dass das Muster DIF einen selektiven zellulären Endzustand bei Arthrose darstellt, der nicht zwangsläufig mit einem Kellgren-Lawrence Grad von 4 global korrelieren muss. Direkte Vergleiche sind in dieser Hinsicht also nicht sinnvoll. Quantitative Messungen von Biomarkern im Gelenkknorpel unter vor allem differenzierter musterbasierter Betrachtung sind bislang nicht vorhanden. Weil TNF- α ein so zentraler Entzündungsmediator ist und auch von Chondrozyten produziert wird, scheint es schwer vorstellbar, dass es in anderen Mustergruppen kaum oder nicht vorhanden ist, so wie es die Messergebnisse zeigen. Denkbar wäre zumindest, dass die gemessene Konzentration aller Vergleichsgruppen außer DIF und SS14 unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze von 0,3 pg/ml lag, aber nicht null war. Bezüglich TNF- α -Mengen oder -Konzentrationen ist in diesem Kontext bei prämatu-rem Knorpel nichts bekannt. Eine pro-proliferative Wirkung von TNF- α auf chondro- gene Keimzelltumorzellen von Mäusen wurde bereits nachgewiesen, bei gleichzeitig je- doch hemmender Wirkung auf die Chondrogenese [186]. Im Umkehrschluss könnte man vermuten, dass ein höheres Proliferationsniveau bei heranreifendem Knorpel eine hö- here Menge TNF- α erfordert als eine gesunde adulte Kontrolle. Ob TNF- α letztlich Proliferation oder Apoptose oder beides simultan auslöst, scheint am Ende möglicher- weise eine Frage der Dosisabhängigkeit zu sein. Deshalb herrscht auch im Kontext der Krebsforschung bis jetzt ein gewisses Unverständnis über die letztliche Wirkung auf ma- ligue Tumorentstehung und -progression. Die Krebs-inhibitorische Wirkung scheint je- doch zu überwiegen [187]. Während für zahlreiche Tumorarten ein erhöhtes TNF- α -Ex- pressionslevel gezeigt wurde, zeigten zumindest SW1353 Chondrosarkomzellen keine TNF- α -Expression auf Gen Ebene [187, 188]. Im Hinblick darauf stellt sich der vorlie- gende Messwert bei CS schlüssig dar.

Mit IL-6 und IL-8 wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei universelle Entzündungs- marker untersucht, die sich in den Musterkategorien des hochgradig degenerierten Knor- pels deutlich erhöht zeigten. Beide Marker wurden im Rahmen der Zelldifferenzierung ausführlicher beleuchtet.

Es ist lange bekannt, dass Inflammation ein Kernmerkmal von Gelenkarthrose und malignen Neoplasien ist. Die Entzündung nimmt in beiden Fällen Einfluss auf den zellulären Metabolismus und die Mikroumgebung. Bei letzterem steht dabei die lokale

Gewebedestruktion durch vermehrte MMPs und ADAMTs im Fokus. Was für den malignen Tumor eine nützliche Wachstumshilfe darstellt, ist bei Arthrose möglicherweise ein nutzloses oder gar schädliches Nebenprodukt. Außerdem lohnt sich ein Blick auf chronisch entzündliche Prozesse, die die Basis für maligne Neoplasien bilden können – wenn auch nicht allein. Die Kombination aus ständiger Zellproliferation, DNA-Schäden und Inflammation können in malignen Neoplasien resultieren. Vergleichbar wäre in Bezug auf Arthrose die Ausbildung von Osteophyten, bei denen es sich zumindest um benigne Neoplasien handelt. Die permanente Inflammation sorgt durch Veränderung der zellulären Phänotypen also für ein unkontrolliertes Wachstum von subchondralem Knochen, aber gleichzeitig auch für eine unkontrollierte Destruktion von Knorpel.

5.3.3 Zelldifferenzierung

Zwei Hauptwege der chondrozytären Differenzierung wurden bislang im Zusammenhang mit Knorpeldegeneration und Arthrose identifiziert – der Weg der hypertrophen Differenzierung und der Weg der Dedifferenzierung. Beide Phänotypen sind durch morphologische und expressorische Besonderheiten gekennzeichnet.

IL-8 ist im Allgemeinen als Entzündungsfaktor bekannt, im Zusammenhang mit Arthrose ist seine Wirkung auf Chondrozyten einer genaueren Untersuchung wert. Im Mittelpunkt steht dabei die Induktion der hypertrophen Differenzierung, mit der dann im Verlauf knorpeldegradierendes Potential einhergeht [189]. Die Messung von IL-8 zeigte niedrige Messwerte bei SS14, SS und DS, während die Messwerte bei den Musterkategorien des degenerativen Knorpels (SC, BC, DIF) erhöht waren. Für den Literaturvergleich ließen sich lediglich Studien mit quantitativen IL-8-Messungen in der Synovialflüssigkeit heranziehen. Die gemessene Menge IL-8 belief sich im Median in zwei Studien auf 0,27 pg/ml und 171 pg/ml bei Arthrosepatienten und war in beiden Fällen gegenüber der gesunden Kontrolle erhöht [95, 185]. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Wert betrug in der Kategorie DIF im Mittelwert für Gelenkknorpelisolat 23,2 pg/ml. Insgesamt zeigte der Vergleich der gesunden mit den arthrotischen Musterkategorien einen Anstieg und somit auch eine prinzipielle Übereinstimmung mit der Literatur. Viele Tumorarten überexprimieren IL-8. Ob das Chondrosarkom dazu gehört, ist bislang nicht bekannt. Der vorliegende Messwert von CS lag niedrig innerhalb der Vergleichsgruppen. Das zeigt, dass zumindest SW-1353 Chondrosarkomzellen keine erhöhte Expression von IL-8 aufweisen. Ungeachtet davon zeigte eine Studie, dass IL-8 beim Chondrosarkom Tumorprogression, Metastasierung und Angiogenese beeinflusst [190]. Dabei sind es vor

allem die PI3K- und MAPK-Signalwege, die schlussendlich über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermehrt Gene für Zellproliferation, Zellüberleben, Invasion und Angiogenese exprimieren lassen [191].

Auch IL-6 ist ein bedeutendes Zytokin, das vorrangig durch seine Wirkung auf die Chondrozytendifferenzierung und Knorpeldegeneration zur Arthroseprogression beiträgt. Es wurde beschrieben, dass IL-6 auch bei Chondrozyten PI3K- und MAPK-Signalwege aktiviert [192]. Der PI3K-Signalweg wurde dabei als Schlüsselmediator für die terminale, hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten bei Arthrose identifiziert [193]. Eine in-vitro Studie zeigte, dass Chondrozyten unter Einfluss von klassischen Entzündungs- und Wachstumsfaktoren, wie sie auch bei Arthrose erhöht sind, erhöhte Mengen IL-6 produzieren [90]. Die vorliegenden Messdaten von IL-6 zeigten eine Zunahme der Messwerte von SS zu BC. Quantifizierungen auf Proteinebene lassen sich in der Literatur nur von der Synovialflüssigkeit finden. Dort lagen die Werte der Mediane bei arthrotischen Gelenken gegenüber den gesunden Kontrollen erhöht und bei 0,75 pg/ml, 119,8 pg/ml und 16900 pg/ml [89, 95, 185]. Der in der vorliegenden Studie gemessene höchste Mittelwert beim Gelenkknorpelisolat belief sich auf 62,3 pg/ml in der Kategorie BC. Insofern zeigten sich die Werte im Vergleich mit der Literatur tendenziell schlüssig, auch wenn sich die Größenordnungen teilweise stark unterscheiden. In Verbindung mit Tumorgenese stellt IL-6 einen absoluten Promotor der Wachstumsprogression und Metastasierung dar. IL-6 wird in vielen malignen Tumoren überexprimiert und Signalwege, die auch bei Arthrose überaktiv werden, führen bei malignen Tumorzellen unter anderem zu Zellüberleben, Proliferation, Invasion und Angiogenese [194]. Die Wirkung von IL-6 auf Chondrosarkome ist bislang nur schlecht verstanden und es wurde beschrieben, dass die IL-6 Expression bei JJ012 Chondrosarkomzellen 86-fach geringer war als bei C28 Chondrozyten [195]. Der in der vorliegenden Arbeit gemessene Wert für SW-1353 Chondrosarkomzellen lag unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze, was im Vergleich mit der genannten Studie im Einklang stünde.

Wie LEP genau zum Arthroseprogress beiträgt ist weitestgehend unklar. Eine Wirkung über IL-6 und den PI3K-Signalweg spielt vermutlich eine Schlüsselrolle [92]. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Daten für LEP zeigten ihr Punctum maximum bei SC und dann einen kontinuierlichen Abfall hin zu DIF. Dumond et al. zeigten, dass der BMI signifikant mit der Menge LEP in der Synovialflüssigkeit der Arthrosepatienten korrelierte. Der Mittelwert der Messung bei Arthrose für Frauen betrug dort 8160 pg/ml und 12950 pg/ml für Männer [196]. Eine andere Studie zeigte eine positive Korrelation zwischen der Leptinmenge in der Synovialflüssigkeit und dem Kellgren-Lawrence-

Score bei Arthrosepatienten [197]. Ein Blick auf die Funktionen des LEP bei malignen Neoplasien könnte Hinweise auf den Einfluss im Gelenkknorpel geben. Der in der vorliegenden Studie gemessene Wert für CS lag auf einem niedrigen Niveau des Knorpels von Arthrosepatienten aber höher als die gesunde Kontrolle des 14-Jährigen. Neben Aktivierung von MMPs, Angiogenese und Interaktionen mit Krebs-assoziierten Fibroblasten, wird der Invasion und Metastasenbildung in diesem Kontext eine herausragende Rolle zu Teil. Es wurde gezeigt, dass LEP in die epithelial-mesenchymale Transition involviert ist. Daher ist es nicht verwunderlich, dass erhöhte LEP Serum-Level oft mit einer schlechten Prognose bei Krebs einhergehen [198]. Yang et al. zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Grading des Chondrosarkoms und der LEP Expression von Chondrosarkomzellen [199].

EGF und HB-EGF sind zwei Liganden der EGF-Rezeptoren, die über PI3K und MAPK sowohl Signalwege zur Proliferation, Hypertrophie und zum Zellüberleben lostreten, aber auch katabole Prozesse wie die verminderte Kollagen II Synthese und erhöhte MMP Produktion ankurbeln [99]. Die Messwerte von HB-EGF zeigten keine eindeutige Dynamik mit dem höchsten Wert für SS14, der Messwert von DIF war relativ erhöht. Die Messwerte von EGF lagen bis auf DS alle unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Eine erhöhte Expression von HB-EGF auf RNA-Ebene wurde bei menschlichem arthrotischem Gelenkknorpel bereits nachgewiesen [200]. Qin et. al zeigten, dass HB-EGF vor allem in den späten Stadien der Arthrose erhöht ist [99]. Vor diesem Hintergrund zeigt sich der Wert von BC vermeintlich nicht schlüssig, der starke Anstieg von DIF als letzte Stufe der Degeneration könnte diese Ergebnisse aber unterstützen. Der vergleichsweise hohe Wert für SS14 erscheint plausibel, weil EGFR-Signalwege und HB-EGF ganz entscheidenden Einfluss auf enchondrale Ossifikation und Knorpelwachstum der Gelenkoberflächen haben – ihrer Funktion als Wachstumsfaktoren entsprechend [201]. Es scheint, als würde der Knorpelmetabolismus zwischen BC und DIF an einen Wendepunkt kommen, an dem eine Differenzierung zurück zu einem Status des heranwachsenden Knorpels eingeleitet wird, um den Zerfall des Systems zu kompensieren. Dies muss selbstverständlich nicht für alle Biomarker gelten, sondern kann sich auf einzelne Bereiche beschränken. HB-EGF ist in vielen malignen Neoplasien überexprimiert und befördert das Tumorwachstum und die Metastasenbildung [202]. Eine Studie auf histologischer Ebene zeigte keinen immunhistochemischen Nachweis von HB-EGF bei Chondrosarkomen [203]. Das Messergebnis von CS lag in der vorliegenden Studie auf einem Niveau mit DIF, was nicht für eine außergewöhnlich hohe Expression beim Chondrosarkom spricht.

Viel wurde in der Vergangenheit zur hypertrophen Differenzierung von Chondrozyten erforscht. Morphologisch besticht dieser Phänotyp durch seine vergrößerte, eben hypertrophe Erscheinung. Darüber hinaus ist dieser Typ vor allem gekennzeichnet durch vermehrte Synthese von Kollagen X und MMP13 und trägt somit zur Degradation des Gelenkknorpels bei Arthrose bei. Van der Kraan et al. schlugen vor, dass Chondrozyten während des Arthroseprogresses den Weg zurück zu den Phänotypen der Chondrozyten der enchondralen Ossifikation und Wachstumsfugen einschlagen. Dies würde die hypertrophe Erscheinung und auch den autolytischen, knorpeldestruktiven Charakter erklären, den dieser Phänotyp mit sich bringt [204]. Vor diesem Hintergrund ist vor allem das Messergebnis von HB-EGF interessant, das für diese Theorie sprechen könnte. IL-6 und IL-8 zeigten tendenziell hohes Vorkommen bei BC und DIF und lagen dann gegenüber dem prämaternen Knorpel deutlich erhöht. Die Wirkung dieser beiden Entzündungsfaktoren auf das Knorpelwachstum oder die enchondrale Ossifikation ist nicht genauer erforscht. Somit sind die gemessenen Ergebnisse bei IL-6 und IL-8 zunächst einmal schlicht als Hinweis auf chondrozytäre Hypertrophie bei hochgradig arthrotischem Knorpel zu interpretieren.

Weniger Erkenntnisse gibt es bislang zu dem dedifferenzierten Phänotyp, der wahrscheinlich eine mindestens genau so große Relevanz im Arthrosekontext hat wie der hypertrophe Phänotyp. Der dedifferenzierte Phänotyp exprimiert ein viel unspezifischeres Proteinprofil als die Chondrozyten im gesunden Knorpel, im Gegensatz zum hypertrophen Typ aber weniger Kollagen X und MMP13 [205]. Neben diesen beiden Phänotypen wurden auf RNA-Ebene zahlreiche weitere Phänotypen identifiziert [206]. Zur Beurteilung des Differenzierungsgrades von Tumorzellen bestimmen Pathologen das Grading. Dabei wird letztlich festgestellt, wie stark die Tumorzelle in ihrer Morphologie und ihrem Expressionsmuster von der gesunden Ursprungszelle abweicht. Die molekulare Subtypisierung von malignen Neoplasien spielt heutzutage eine immer größere Rolle, bei der nach Expression von Rezeptoren oder anderen Metaboliten klassifiziert wird und das Grading zusätzlich definiert. Es gibt also tumorartspezifische Biomarker, die Aufschluss über den Differenzierungsgrad der Tumorzellen geben. Zusammen mit der Zellmorphologie ergibt sich somit ein Bild, das der ursprünglichen Zelle entweder ganz ähnlich ist oder ganz fremd ist. Im Äußersten spricht man dann von der Anaplasie, bei der anhand der optischen Erscheinung der Tumorzellen nicht mehr deren Ursprung bestimmt werden kann. Zahlreiche Studien, darunter auch die Vorliegende, haben gezeigt, dass sich mit fortschreitender Arthrose auch die Expression von spezifischen Biomarkern sukzessive verändert. Ganz besonders interessant scheint in dieser Hinsicht

das diffuse Muster, das sich im Bereich der Biomarker teilweise stark von den großen Clustern abweichend zeigte. Dies spiegelt sich auch auf morphologischer Ebene wider – die Knorpelzellen erscheinen Fibroblasten-ähnlich.

5.3.4 Knochenumbau

Eine Änderung des zellulären Metabolismus und Expressionsprofils während fortschreitender Arthrose kann nicht nur bei Chondrozyten, sondern auch bei Zellen des subchondralen Knochens beobachtet werden und führt dort einerseits zu einer allgemeinen subchondralen Sklerosierung und andererseits zur Entstehung von knöchernen Auswüchsen, den Osteophyten. In diesem Kapitel ist die Voraussetzung für die Interpretation, dass die Verfügbarkeit der gemessenen Biomarker über den Nachweisort Gelenkknorpel hinaus geht und die Biomarker Zugang zum subchondralen Knochen erhalten.

OPN ist einer der Faktoren, die in der Vergangenheit mit der subchondralen Knochenveränderung in Verbindung gebracht wurden. Dabei wurde vor allem die stimulierende Wirkung auf Osteoklasten und die Inhibierende Wirkung auf die Mineralisierung der Knochenmatrix hervorgehoben [133]. Sowohl für die Osteoblasten des subchondralen Knochens als auch im Gelenkknorpel selbst wurden bei Arthrosepatienten deutlich erhöhte Vorkommen an OPN gemessen [132, 135]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie von OPN zeigten keinen klaren Zusammenhang mit der vorliegenden Musterform. Jedoch war OPN im Durchschnitt bei den arthrotischen Knorpelproben deutlich erhöht, mit höchstem Messwert bei DIF. OPN wurde bereits mit zahlreichen Krebsarten in Verbindung gebracht und kann in diesem Zusammenhang ganz unterschiedliche Funktionen hinsichtlich Zellproliferation, Zellmigration, Angiogenese, Knochenmineralisierung und weiteren wahrnehmen [207]. In vitro konnte bei JJ012 Chondrosarkomzellen nach Applikation von OPN der Aspekt verstärkter Migration bei gleichzeitiger Erhöhung von MMP-9 gezeigt werden, jedoch ungeachtet davon, ob die Verfügbarkeit des OPN in Chondrosarkomen erhöht ist – es wurde sich dabei allein auf die Verfügbarkeit des OPN aus dem umliegenden Knochen berufen [208]. In der vorliegenden Studie lag der gemessene Wert von OPN bei CS unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Somit wäre zumindest ein autokriner Einfluss des OPN bei SW-1353 Chondrosarkomen ausgeschlossen.

FST ist ein Antagonist von Activinen und Faktoren der TGF- β -Superfamilie, zu denen auch BMPs gehören. Somit bindet und hemmt FST in Biomarker, die ganz erheblich für die Entwicklung des Skelettes und auch für die allgemeine Bildung von Knochen verantwortlich sind [138]. Erhöhte Produktion von FST auf RNA- und Proteinebene bei

isolierten Chondrozyten von Arthrosepatienten wurde bereits gezeigt [209]. Eine andere Studie an Hunden zeigte signifikante Zunahmen an FST positiven Chondrozyten auf immunhistochemischer Ebene in der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels nach induzierter Arthrose [210]. In der vorliegenden Studie zeigten die Messwerte von FST auf den ersten Blick keinen klaren Zusammenhang mit der vorliegenden Musterform. Zu verzeichnen war entgegen den Ergebnissen in der Literatur ein Abfall der Messwerte von SS14 nach BC bis unter die Nachweisbarkeitsgrenze der Assays. Das bedeutet, dass durch abnehmende Verfügbarkeit von FST im Gelenkknorpel auf dem Weg zur Clusterbildung auch die Inhibition von knochenbildungsfördernden Faktoren abnimmt und letztlich neue Knochensubstanz gebildet wird. Interessanterweise kam es bei DIF zu einer Umkehr der Verhältnisse und die Verfügbarkeit von FST lag dort wieder auf einem Niveau von dem gesunden Gelenkknorpel von SS14. Dies widerspiegelt einen Trend der bei HGF, aber auch bei den Angiogenesefaktoren FGF-1 und ANGPT2 zu beobachten war. Es ist also anzunehmen, dass die Knochenbildung bei DIF durch Anstieg von FST rückläufig ist. Auch im Zusammenhang mit malignen Neoplasien geht die Wirkung von FST von der Bindung von Activinen und BMPs aus, die neben ihrer Effekte auf den Knochen auch Gewebemöostase und Apoptose regulieren; FST ist regelhaft in zahlreichen Tumorarten erhöht [211]. Der Messwert von FST bei CS war im Vergleich mit den Musterkategorien des Gelenkknorpels deutlich erhöht und spräche also für eine massive Inhibition der Knochenneubildung. Dies schiene vor dem Hintergrund, dass von den entarteten Chondrozyten des Chondrosarkoms Knorpel und keine Knochensubstanz produziert wird, denkbar.

HGF ist ein sehr ubiquitär vorkommender Wachstumsfaktor, der von Osteoblasten des subchondralen Knochens, nicht aber von Chondrozyten produziert wird [140]. Neben seiner Wirkung auf Chondrozyten und den Gelenkknorpel sind auch Effekte auf den subchondralen Knochen bei Arthrose beschrieben worden. Zentral ist dabei die HGF getriggerte Ausschüttung von BMPs die letztlich durch Knochenbildung und Angiogenese zur Frakturheilung beitragen [141]. Die vorliegenden Messwerte von SS14 und DIF lagen wie auch bei anderen Biomarkern auf einem ähnlichen Niveau. Die übrigen Musterkategorien der Arthrosepatienten zeigten sich dagegen allgemein erniedrigt. In Verbindung mit malignen Neoplasien wurde HGF bislang vorwiegend hinsichtlich Proliferation und Migration untersucht. Eine Studie zeigte eine deutliche Erhöhung der HGF-Expression in Chondrosarkomen gegenüber normalem Knorpel und zusätzlich verstärkte Migration von Chondrosarkomzellen unter Einfluss von HGF [212]. Der in der vorliegenden Studie gemessene Wert von HGF bei CS war im Vergleich zu den

Messwerten der Knorpelproben gering und steht damit im Widerspruch zu den von Tsou et al. veröffentlichten Daten.

BMPs als Faktoren der TGF- β -Superfamilie nehmen großen Einfluss auf die Entwicklung des Skeletts und die allgemeine Knochenbildung und spielen deshalb auch eine zentrale Rolle bei der enchondralen Ossifikation. BMP9 im speziellen wurde als einer der potentesten Induktoren der orthotopen Ossifikation beschrieben [213]. Außerdem wurde gezeigt, dass BMP9 die osteoblastische Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen induziert [214]. In Verbindung mit Knorpel wurde gezeigt, dass BMP9 chondrozytäre Hypertrophie und Matrixbildung auslöste [215]. Obwohl es viele Studien zur Wirkung des BMP9 auf Knochen und Knorpel gibt, lassen sich bislang keine Daten zur Menge von BMP9 in Gelenkknorpel finden. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte für BMP9 lagen alle unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze des Assays. Das bedeutet, dass es im Gelenkknorpel entweder nicht vorhanden ist oder aber in verhältnismäßig geringem Ausmaß. BMPs wurden in der Vergangenheit mit fast allen Facetten des malignen Tumorwachstums in Verbindung gebracht. Dabei kamen Studien zu ganz unterschiedlichen und teils paradoxen Ergebnissen [216]. Deshalb gestaltet sich eine vereinfachte Darstellung seiner Funktionen in diesem Kontext schwierig und wenig aufschlussreich. Die Expression von BMP9 bei Chondrosarkomen wurde bislang nicht untersucht. Der in der vorliegenden Studie gemessene Wert von BMP9 bei CS lag ebenfalls unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze.

5.3.5 Angiogenese

Verschiedene Biomarker sind in der Vergangenheit mit der Einsprossung von Blutgefäßen in den Gelenkknorpel oder deren Erhalt in Verbindung gebracht worden. Exakte Zusammenhänge bleiben jedoch bis heute unverstanden. Das Phänomen der Vaskularisierung des Gelenkknorpels ist mit ursächlich für den Leidensdruck der Patienten, weil entsprechende Blutgefäße von Nerven begleitet werden und diese Nerven dann die Schmerzhaftigkeit der Gelenkarthrose erhöhen.

VEGF bewirkt im Gelenkknorpel die Aussprossung von Blutgefäßen aus dem subchondralen Knochen und befördert über MMPs die Matrixdegradation, sodass Blutgefäße leichter Einsprossen können. Es wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt, die auf immunhistochemischer und RNA Ebene ein vermehrtes Vorkommen von VEGF in arthrotischem Gelenkknorpel zeigen konnten [217]. Auch in der Synovialflüssigkeit aus Kniegelenken mit Arthrose ist die Menge an VEGF

signifikant gegenüber einer gesunden Kontrolle erhöht [218]. Dort lag der Mittelwert des gemessenen VEGF bei 693,7 pg/ml. Die Messwerte von VEGF lagen bei SS, DS, SC und BC annähernd bei 350 pg/ml; alle anderen Messwerte lagen unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. Die vorliegende Messung von VEGF ist jedoch kritisch zu betrachten, weil ein großer Teil der Standards außerhalb der Nachweisbarkeitsgrenzen lag und somit keine adäquate Berechnung der Standardkurve möglich war. Im Zusammenhang mit Onkoprozessen wurde VEGF als Schlüsselmediator der Angiogenese identifiziert. Dabei führt die vermehrte Expression von VEGF der Tumorzellen zur Formation und Ausbreitung von strukturell und funktionell abnormalen Blutgefäßen, die den wachsenden Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. VEGF-Inhibitoren sind heutzutage zentrale Bestandteile bei der Behandlung von bestimmten Krebsarten [219]. Für die Chondrosarkom Zelllinie OUMS-27 konnte gezeigt werden, dass VEGF überexprimiert war und der Hauptregulator für Angiogenese ist [220]. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte für VEGF bei CS lagen unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze und bestätigen die Ergebnisse zumindest für die Chondrosarkom Zelllinie SW-1353 nicht.

Auch FGF ist ein ubiquitär vorkommender Induktor der Angiogenese. FGF-1 ist das potenteste Mitglied der FGF-Familie und dessen Wirkweise in Bezug auf Angiogenese im Zusammenhang mit Arthrose ist unerforscht. Ein erhöhtes Vorkommen FGF-1 wurde bislang lediglich im Serum und in der Synovialmembran von Arthrosepatienten gezeigt [221]. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte für FGF-1 zeigten einen interessanten Trend mit stetigem Anstieg von SS14 nach BC und dann niedrigem Messwert bei DIF. Es wäre also anzunehmen, dass während der Formation von großen Zellclustern auch die FGF-1 vermittelte Einsprossung von Blutgefäßen aus dem subchondralen Knochen in den Knorpel vermehrt stattfindet. Zusätzlich werden auch katabole Prozesse, die zur Degradation der Matrix beitragen, befördert. Auf dem Weg zu DIF kommt es scheinbar zu einer Umkehr der Verhältnisse und FGF-1 ist bei dem diffusen Muster nur noch spärlich vorhanden – sogar weniger als bei gesundem Knorpel bei SS14. Auch die Rolle von FGF-2 ist hinsichtlich Angiogenese im Zusammenhang mit Arthrose nicht genauer erforscht. Dass FGF-2 im arthrotischen Gelenkknorpel vermehrt vorhanden ist, wurde bis heute nicht gezeigt. Für FGF-2 wurde lediglich dessen die Wirkung von FGF-2 auf Chondrozyten in vitro wurde genauer untersucht. So konnte beispielsweise unter Einfluss von FGF-2 die Bildung von Clustern induziert werden [39]. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte für FGF-2 lagen alle auf einem gleichbleibenden Niveau unabhängig vom Grad der Knorpeldegeneration. Unter Annahme eines tatsächlich zunehmenden Effektes von FGF-2 während fortschreitender

Degeneration wäre alternativ eine gleichbleibende Verfügbarkeit bei gesteigerter Expression von FGF-Rezeptoren denkbar, wodurch dann vermehrt Signalwege losgetreten werden, die zum Beispiel Clusterbildung induzieren. Alternativ ist die Rolle von FGF-2 jedoch auch nicht so hoch wie bislang angenommen. Ursprünglich wurden FGFs im Zusammenhang mit Onkoprozessen als Angiogenesefaktoren beschrieben, aber auch deren Beteiligung an allgemeinem Tumorwachstum, Inflammation und Medikamentenresistenz wurde mittlerweile beschrieben [222]. Eine relevante Verbindung von FGFs und Angiogenese bei Chondrosarkomen wurde bislang jedoch nicht gezeigt, lediglich ein wachstumsfördernder Effekt auf Chondrosarkomzellen [220]. Die in der vorliegenden Studie gemessenen Werte für FGF-1 und FGF-2 bei CS lagen im Vergleich zu den Knorpelproben auf einem durchschnittlichen Niveau. Man könnte also schlussfolgern, dass FGF-1 und FGF-2 eine eher untergeordnete Rolle bei der Progression von Angiogenese bei Chondrosarkomen zuteilwird.

Endoglin ist ein Co-Rezeptor des TGF- β Rezeptorkomplexes, wird vor allem von proliferierenden Endothelzellen produziert und ist deshalb als Biomarker für tumorassoziierte Angiogenese nutzbar. Endoglin wurde im Zusammenhang mit Arthrose auch mit Angiogenese in Verbindung gebracht und es konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten Endoglin exprimieren und dass Endoglin in der Synovialflüssigkeit vorkommt [113, 223]. Es wurde gezeigt, dass dedifferenzierte Chondrozyten in vitro mehr Endoglin exprimieren [224]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie für ENG zeigten den niedrigsten Messwert bei DS mit einer Zunahme hin zu DIF. Der höchste Messwert bei DIF würde sich mit der Beobachtung von überwiegend dedifferenzierten Chondrozyten bei dem diffusen Muster in der Literatur decken. Endoglin trägt zur Vaskularisierung und Metastasierung von Tumoren bei [112]. Für high-grade-Chondrosarkome konnte gezeigt werden, dass diese eine höhere Menge Endoglin exprimierten als low-grade-Chondrosarkome [225]. Der in der vorliegenden Studie gemessene Wert für CS lag auf einem durchschnittlichen Niveau, verglichen mit den Musterkategorien des Knorpels. Da die SW-1353 Chondrosarkomzellen mit Grad II einem low-grade-Chondrosarkom entspricht, stünden die Messergebnisse möglicherweise im Einklang mit den Angaben in der Literatur.

ANGPT2 wirkt hauptsächlich im Sinne eines Antagonisten auf den tie-2-Rezeptor, also anti-angiogenetisch. Die Messergebnisse von ANGPT2 in der vorliegenden Studie zeigten einen interessanten Trend, bei dem die Messwerte von SS14 nach BC zunächst stetig abfielen, und deutlich erhöhtem Messwert bei DIF. Zu interpretieren ist also eine Zunahme der Angiogenese auf dem Weg der Formation von großen Zellclustern.

Analog zu FGF-1 war auch bei ANGPT2 eine Umkehr der Verhältnisse bezüglich Angiogenese zwischen BC und DIF zu verzeichnen – also starker Angiogenese bei BC und geringer Angiogenese bei DIF. Eine vermehrte Deregulation von Angiopoietinen bei dem Wachstum von malignen Neoplasien wurde hinreichend belegt [226]. Im Zusammenhang mit Chondrosarkomen konnte zumindest gezeigt werden, dass ANGPT2 von dieser Tumorart exprimiert wird, aber dass die Expression dort sehr variabel ist [227]. Der Messwert von ANGPT2 bei CS war im Vergleich mit den Musterkategorien auf einem geringen Niveau. Geringe anti-angiogenetische Wirkung erschien im Kontext der malignen Neoplasie des Chondrosarkoms sinnhaft.

Endothelin-1 ist nicht nur Regulator der Gefäßweite, sondern auch Regulator der tumor-assoziierten Angiogenese. Es wurde gezeigt, dass die Menge an ET-1 in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Kniegelenksarthrose mit steigendem Kellgren-Lawrence-Score ebenfalls anstieg. Dort lag die im Mittel gemessene Menge an ET-1 in der Synovialflüssigkeit der Arthrosepatienten sehr niedrig bei 0,7 pg/ml [228]. In der vorliegenden Studie lagen alle Messwerte der Musterkategorien unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze von 1,4 pg/ml. Aufgrund seiner natürlichen Wirkung auf Angiogenese wurde ET-1 auch in Verbindung mit malignen Neoplasien ausgiebig untersucht. Es wurde gezeigt, dass mit steigendem Grading bei Chondrosarkom auch die Menge des exprimierten ET-1 ansteigt und damit auch die Wahrscheinlichkeit der Metastasierung [229]. In der vorliegenden Studie wurde einzig bei CS ein Messwert oberhalb der Nachweisgrenze gemessen. ET-1 ist in Chondrosarkomzellen also prinzipiell mehr vorhanden als im Gelenkknorpel und vermutlich ist deshalb in Chondrosarkomen auch die ET-1 bedingte Angiogenese höher als im Gelenkknorpel.

Es bleibt ungeklärt, ob die Vaskularisierung des sonst avaskulären Knorpels einen Vorteil für die Instandhaltung oder gar Reparatur des Gelenkknorpels bietet oder ob dieses Phänomen lediglich ein Nebeneffekt der entglittenen Metabolismen von Chondrozyten, Synoviozyten und subchondralen Osteozyten ist. Aber auch ein knorpelschädigender Einfluss wäre denkbar, weil durch Aushebelung von Avaskularität beziehungsweise Bradytrophie, destruktive Vorgänge möglicherweise noch schneller ablaufen können. Festzustellen ist ein eindeutiger Trend hin zur erhöhten Angiogenese im Gelenkknorpel auf dem Weg hin zur Clusterbildung, bei Betrachtung der Messwerte von FGF-1, ANGPT2 und auch ENG. Neben der Beobachtung, dass mit der Entstehung von Chondrozytenclustern auch sukzessive die Angiogenese befördert wird, scheint bei dem diffusen Muster genau das Gegenteil der Fall zu sein. Interessant dabei ist, dass sich bei FGF-1 und ANGPT2 der Messwert von DIF dem Messwert von SS14, also

kerngesundem Gelenkknorpel, annäherte. Nähme man an, dass das diffuse Muster tatsächlich das Korrelat höchster Knorpeldegeneration ist und chronologisch nach der Entstehung von großen Zellclustern einzuordnen ist, dann könnte man annehmen, dass es zwischen BC und DIF zu einem Wechsel des Zellprogrammes kommt, der dann wiederum mit einer Änderung des grundsätzlichen Phänotyps einhergeht. Dies wurde in der Art bislang nicht in der Literatur beschrieben. In welcher Form diese Prozesse auf Me-taebene zu werten sind, muss diskutiert werden. Denkbar wäre eine Aufgabe der Funktion im Sinne der charakteristischen Knorpelphysiologie und vielmehr eine Übernahme der Funktion von narbenartigem Gewebe, das durch fibroblastenartige Zellen geprägt ist. Das chondrozytenartige Zellprogramm als Teil des Funktionsgewebes Knorpel würde bei DIF also verlassen werden. Bereits aus 2D-Kultivierung von Chondrozyten ist bekannt, dass diese nach Verlust ihrer natürlichen 3D-Umgebung eher einen fibroblasten-ähnlichen morphologischen Charakter annehmen [230]. Die Messergebnisse von ENG sind nicht ganz mit dieser Theorie in Einklang zu bringen, wenngleich eine Änderung des prädominanten zellulären Phänotyps nicht zwangsläufig mit der Änderung der Expression eines jeden einzelnen Biomarkers einher gehen muss. Aber auch der Blick in andere Kategorien der Biomarker zeigt die wiederkehrende Analogie des diffusen Musters und dem gesunden Knorpel des 14-jährigen Jungen. Das Wachstum von malignen Neoplasien ist ebenso regelhaft von Vaskularisierung begleitet. Ab einer bestimmten Größe ist die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen und die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nur noch mit der massiven Neubildung von Blutgefäßen zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang spricht man vom "angiogenetic switch": Ein Zeitpunkt, ab dem die Balance von Gefäßaufbau und Gefäßabbau vollständig verloren gegangen ist und angioproliferative Prozesse erheblich überlegen sind. Dieses Modell lässt sich also allenfalls in Teilen auf die Vaskularisierung im Gelenkknorpel übertragen, denn wie am Beispiel von FGF-1 und ANGPT2 gezeigt scheint es einen Punkt zu geben, an dem angioproliferative Prozesse tendenziell wieder rückläufig sind. Mit der Ausbildung von großen Clustern bei BC zeigen die Biomarker FGF-1, ANGPT2 und ENG allerdings auch eine temporäre sehr hohe Angiogenese an.

5.3.6 Immuncheckpoints

Ein nahezu unberührtes Thema im Kontext der Arthrose ist die Regulation des Immunsystems durch die Interaktion von Checkpoint-Proteinen. In der Krebsforschung sind Checkpoint-Inhibitoren in jüngerer Vergangenheit immer mehr zu festen Bestandteilen

von Therapien geworden. Immuncheckpoints sind Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, die deren Immunantwort entweder steigern oder abschwächen.

Bekanntester Immuncheckpoint ist das PD1, ein Immunantwort abschwächender Rezeptor und sein Ligand PDL1. Die Expression von PDL1 bei Chondrosarkomen ist nicht obligat, aber häufig [151]. Vor diesem Hintergrund scheint das Messergebnis der vorliegenden Studie mit deutlich erhöhten Werten von PDL1 bei CS sinnhaft. Es wurde ebenfalls bereits gezeigt, dass auch Chondrozyten PDL1 exprimieren [231]. Bei den Musterkategorien des Knorpels war die Ausprägung von PDL1 einheitlich gering, verglichen mit CS. Sehr bemerkenswert waren die Ergebnisse auf Seiten des PD1, denn bislang ist dieser Rezeptor nur mit Lymphozyten in Verbindung gebracht worden. In der vorliegenden Studie zeigten alle Musterkategorien des Knorpels ein Vorkommen von PD1 und einen sehr hohen Messwert bei DIF. Es stellt sich also die Frage nach der Herkunft des PD1. Normalerweise ist Immunzellen das Einwandern in den Gelenkknorpel durch die sehr dichte EZM verwehrt. Fissuren und aufgerauter degenerierter Knorpel würden die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Immunzellen im Gelenkknorpel erhöhen, weil Immunzellen je nach Arthrosestatus auch in der Synovialflüssigkeit vorkommen. Es wäre denkbar, dass bei der Proteinextraktion des Knorpelgewebes auch T-Lymphozyten mit homogenisiert wurden und deshalb PD1 im Assay nachgewiesen wurde. Die inflammatorische Gesamtsituation könnte demnach bei DIF ganz besonders erhöht sein – dazu würde auch die hohe Menge an TNF- α im Gelenkknorpel bei DIF passen. Oder aber die Chondrozyten selbst exprimieren PD1, was einen sehr bemerkenswerten Fund darstellen würde. Diese Frage muss in Zukunft geklärt werden und für den Fall, dass Chondrozyten der Ursprung des PD1 im Gelenkknorpel sind, auch welche Funktion dieser Rezeptor dann bei Chondrozyten und im Arthrosekontext erfüllt.

Ein weiterer die Immunantwort abschwächender Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten ist TIM3. Es wurde gezeigt, dass TIM3 in konventionellen und dedifferenzierten Chondrosarkomen stark erhöht war – die Expression ging dort von den tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus [152]. Der Wert der vorliegenden Messung von TIM3 bei CS lag unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze; dies scheint nicht verwunderlich, da hier SW 1353 Chondrosarkomzellen isoliert wurden und nicht Chondrosarkomgewebe, in dem Lymphozyten vorkommen könnten – ein Blick auf TIM3 Liganden wäre in dieser Hinsicht interessanter. Die Immunmodulation bei Arthrose wurde in der Vergangenheit nur ganz vereinzelt untersucht. Eine Studie zeigte, dass genetischer Polymorphismus von TIM3 die Anfälligkeit für Arthrose durch Beeinflussung der Interferon- γ -Expression erhöht [232]. Bemerkenswert war in der hier präsentierten Studie der isoliert

hohe Messwert bei DIF, was der Beobachtung von PD1 entspricht. Analog zu PD1 bleibt die Frage nach Herkunft und Wirkung des TIM3 zunächst unbeantwortet.

CTLA4 ist ebenfalls ein Immunantwort abschwächender Rezeptor auf T-Lymphozyten, der in konventionellen und dedifferenzierten Chondrosarkomen nur minimal erhöht war. B7-H3 (CD267), ein Ligand des CTLA4 war dagegen vergleichsweise stark exprimiert [152]. Die vorliegende Messung von CTLA4 bei CS lag unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze, was analog zu TIM3 und PD1 als Rezeptoren auf Seiten der Lymphozyten sinnhaft ist. Interessanterweise lag bei CTLA4 nur der Messwert von SS deutlich oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze. In Anbetracht der Tatsache, dass bei der Messung von SS der Variationskoeffizient bei 2,12 lag und einer der Messwerte des Duplikats sogar unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze lag, muss die Interpretation dieses Ergebnisses mit Zurückhaltung erfolgen. Auch vor dem Hintergrund, dass kein anderes Ergebnis der CTLA4-Messreihe oberhalb der Nachweisbarkeitsgrenze lag.

Eine Gruppe der Immunantwort fördernden Immuncheckpoints sind die TLRs und TLR2 wird auch auf der Oberfläche von JJ02 Chondrosarkomzellen exprimiert [233]. Bislang gibt es keine Studien, die die Bedeutung von TLR2 in ihrer Wirkung auf Chondrosarkomzellen genauer untersucht hätten. Die vorliegenden Daten für TLR2 zeigten ein relativ geringes Vorkommen bei CS verglichen mit den Knorpelproben. TLRs wurden wie andere Immuncheckpoints vor allem im Zusammenhang mit Immunzellen untersucht. Sillat et al. aber zeigten, dass TLRs und auch TLR2 von Chondrozyten exprimiert werden und schlugen vor, dass sie in diesem Kontext als Rezeptoren für Produkte der Matrixdegradation dienen und durch Aktivierung die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen befördert wird [234]. Die Messdaten von TLR2 in der vorliegenden Studie zeigen ein deutliches Vorkommen in allen Musterkategorien des Gelenkknorpels. Auffällig erhöht zeigte sich lediglich der Messwert bei DIF. Es liegen jedoch zu wenig Erkenntnisse über die Bedeutung TLRs im Allgemeinen vor, um eine Interpretation zu ermöglichen. Darüber hinaus lässt auch hier der Entwurf der Studie keine Aussage über die Herkunft des TLR2 zu.

Es existieren fast keine Informationen über die Funktion von Checkpoint-Proteinen im Zusammenhang mit Chondrozyten, weshalb sich eine Interpretation der hier gemessenen Daten sehr schwierig gestaltet. Vor dem Hintergrund, dass hier mit PD1, CTLA4, TIM3 und TLR2 Rezeptoren auf Seiten der T-Lymphozyten gemessen wurden, sind die Messergebnisse von CS absolut plausibel. Für diese Biomarker lagen die Messwerte der hier durchgeführten Untersuchung entweder alle unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze oder niedrig, verglichen mit den Musterkategorien des Knorpels. Dies war

sehr erwartbar, weil im Rahmen der vorliegenden Studie Proteine aus einer Zellkultur von Chondrosarkomzellen isoliert wurden und nicht aus ganzem Tumorgewebe. PDL1, als einziger gemessener Ligand, zeigte sich einzig bei CS deutlich erhöht und deckt sich somit mit der Vorstellung, dass maligne Tumoren durch Interaktion von PD1 und PDL1 T-Lymphozyten deaktivieren, um den eigenen Wachstumsprozess zu gewährleisten. Während die Messergebnisse für CS vollständig plausibel erschienen, zeigten die Messungen der Checkpoint-Proteine bei den Knorpelproben ganz bemerkenswerte Ergebnisse. Obwohl die Trends dort überwiegend uneindeutig waren, war der Gelenkknorpel der Kategorie DIF bei PD1, TIM3 und TLR2 jeweils deutlich erhöht. Das diffuse Muster scheint in Verbindung mit Immuncheckpoints also eine ganz bedeutende Rolle zuteilzuwerden. Ob die Herkunft der Checkpoint-Proteine die Chondrozyten selbst oder eingewanderte T-Lymphozyten oder beides sind, könnte Bestandteil weiterführender Forschungen sein. Es gibt Hinweise, dass ein Teil der Chondrozyten bei Arthrose einen Differenzierungsweg Richtung Immunzellen einschlagen [206]. Es muss also erforscht werden, welche Rolle die Immuncheckpoints im Arthrosekontext spielen.

5.4 Zusammenfassung der Diskussionsergebnisse

Apoptose- und Proliferationsprozesse scheinen einer gewissen musterspezifischen Dynamik zu unterliegen. Während anti-apoptotische Signale durch BCL2 und AKT zunächst anstiegen, um von SC/BC nach DIF wieder rückläufig zu werden, zeigten die Apoptosefaktoren BAD, JNK, P53 und TRAIL – mit Einschränkungen – gerade von BC nach DIF Zuwächse. An dieser Stelle kommt es also vermeintlich zu einer Umkehr der Verhältnisse, sodass Apoptose möglicherweise erst zwischen BC und DIF an Bedeutung gewinnt. Der Umstand, dass TNF- α isoliert im Erwachsenen bei DIF erhöht nachweisbar war, deutet darauf hin, dass inflammatorische Prozesse auch in diesem Stadium der vermeintlich höchstgradigen Knorpeldegeneration noch eine große Rolle spielen. Dies wird ebenfalls durch die deutlich erhöhten IL-6- und IL-8-Werte bei fortgeschrittener Knorpeldegeneration bestätigt. Ebenfalls bestätigt wird die durch beide Faktoren ausgelöste hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten in den Stadien des degenerierten Knorpels.

Durch abnehmende Verfügbarkeit von FST im Gelenkknorpel auf dem Weg zur Clusterbildung nimmt auch die Inhibition von knochenbildungsfördernden Faktoren ab und dadurch kann letztlich neue Knochensubstanz gebildet werden. Interessanterweise

kam es bei DIF zu einer Umkehr der Verhältnisse und die Verfügbarkeit von FST lag dort wieder auf einem Niveau von dem gesunden Gelenkknorpel von SS14.

Eine Verlaufsumkehr der Werte zwischen BC und DIF war ebenfalls bei den Angiogenesefaktoren FGF-1 und ANGPT2 zu verzeichnen. Synergistisch sprechen steigende FGF-1-Werte und abnehmende ANGPT2 Werte von SS14 nach BC für eine zunehmende Angiogenese im Rahmen der Knorpeldegeneration, die bei DIF dann tendenziell rückläufig ist. Der Angiogenesemarker ENG zeigte eine Zunahme von DS nach DIF.

Die Immuncheckpoints PD1, TIM3 und TLR2 zeigten isoliert hohe Werte bei der Musterkategorie DIF. Herkunft und Wirkung dieser Immuncheckpoints in Bezug auf Knorpel und Chondrozyten müssen erst erforscht werden, bevor eine Diskussion möglich wird.

5.5 Abgleich der Diskussionsergebnisse unter spezieller Betrachtung der Hallmarks of Cancer

Seit Anbeginn der Arthroseforschung wurde versucht, diese Krankheit einem Formenkreis zuzuordnen. Dieses Unterfangen soll dabei helfen, die entsprechende Krankheit ganzheitlich zu verstehen und auch mit anderen ähnlichen Erkrankungen in Verbindung zu bringen, um perspektivisch Pathomechanismen, Diagnostiken und Therapien ableiten zu können. Anfänglich wurde Arthrose ganz pragmatisch als eine Krankheit von Verschleiß (*wear and tear*) klassifiziert. Obwohl mittlerweile klar ist, dass der Arthrose ganz komplexe Pathomechanismen zugrunde liegen, hat sich die generelle Betrachtungsweise in all den Jahren der Forschung nicht wesentlich verändert. Zumindest die angelsächsische Formulierung „Osteoarthritis“ schafft einen gewissen Bezug zum Formenkreis der rheumatoiden Erkrankungen oder genauer der rheumatoiden Arthritis, bei der inflammatorische Aspekte im Vordergrund stehen. Insbesondere der Aspekt der fokalen Proliferation von Chondrozyten bei entstehenden Clustern lässt vermuten, dass im arthrotischen Gelenkknorpel eine Art Entartung der Zellen stattfindet. Zusammen mit vermehrter Inflammation, veränderter zellulärer Differenzierung und erhöhter Angiogenese liegt die Verbindung zu malignen Neoplasien nahe. Aus diesem Grund und auch mit Blick auf immunmodulatorische Prozesse soll hier noch einmal ein Abgleich der Diskussionsergebnisse in Bezug auf die Hallmarks of Cancer stattfinden.

1. Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, und
2. Unempfindlichkeit gegenüber anti-Wachstumssignalen:

Die Differenzierung von Chondrozyten steht im Mittelpunkt der veränderten biomechanischen und molekularen Verhältnisse bei Arthrose. Abnormale Kräfte und der Einfluss von Entzündungsfaktoren und Matrixbruchstücken führen zu einer phänotypischen Verwandlung von Chondrozyten, die mit einer veränderten Morphologie und einem geänderten Stoffwechselverhalten einhergeht. Auf mikroskopischer Ebene lassen sich bei Arthrose sichtbare Veränderungen bei Knorpelzellen feststellen, die entweder durch Hypertrophie oder lange verzweigte, spindelförmige Ausläufer imponieren. Die Änderung der chondrozytären Morphologie wurde im Rahmen der vorliegenden Studie nicht genauer untersucht, die zahlreichen Beobachtungen während des Sortierens der Knorpelscheiben sowie weitere unveröffentlichte Daten aus dem eigenen Labor bestätigten jedoch die in der Literatur beschriebenen Phänotypen. Die Verhaltensänderung auf Stoffwechselebene äußert sich durch alternierende Produktion von Matrixbestandteilen und Biomarkern, die zur destruktiven Gesamtsituation im Knorpel beitragen. Ein Beleg für die sukzessive Veränderung des zellulären Phänotyps erfolgt letztendlich durch alle in der vorliegenden Studie gemessenen Biomarker, die auch eine sukzessive Veränderung auf dem Weg hin zu arthrotischem Knorpel zeigen – besondere gewählte Marker hierfür waren in dieser Studie IL-6, IL-8 und HB-EGF. Die entglittene Stoffwechselsituation von Chondrozyten im arthrotischen Knorpel führt zu einem autokrinen Teufelskreis indem eben solche Faktoren wie zum Beispiel IL-6 und IL-8 vermehrt produziert werden und diese dann Wachstum Richtung Hypertrophie induzieren. Auch hier lässt sich also eine Analogie zu Kennzeichen eins von Krebs, Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, erkennen. Eng damit verknüpft ist auch Kennzeichen zwei, Unempfindlichkeit von anti-Wachstumssignalen, auch wenn die genetische Mutation von Apoptosefaktoren kein Merkmal bei Arthrose ist.

Im Kontext der Zelldifferenzierung scheint das diffuse Muster eine ganz besondere Rolle einzunehmen. Phänotypisch haben diese dedifferenzierten Chondrozyten keine Ähnlichkeit mehr zur ursprünglichen Gestalt der Chondrozyten. Da die morphologischen Charakteristika von dedifferenzierten Chondrozyten nicht komplett unspezifisch sind, sondern eher einem fibroblastischen Zelltyp ähneln, kann hier wohl nicht von einer Anaplasie gesprochen werden. Insgesamt ist die sich ändernde Morphologie von Chondrozyten bei Arthrose ein Merkmal, das sich zumindest in ähnlicher Form auch bei Krebszellen wiederfinden lässt.

3. Vermeidung von Apoptose:

Auch wenn die Frage um Proliferation und Apoptose von Chondrozyten bei Arthrose bis heute nicht abschließend geklärt ist, so lässt sich schon auf rein mikroskopischer Ebene in Form von Chondrozytenclustern ein Hinweis auf stattfindende Proliferation finden. Es wurde bereits gezeigt, dass mit fortschreitender Knorpeldegeneration auch die Chondrozytendichte zunimmt [181]. Zwar wäre prinzipiell auch eine Migration von Chondrozyten denkbar, aber vor dem Hintergrund extrem dichter EZM bei Knorpel scheint eine Wanderung von Zellen in diesem System als ausschließliche Erklärung abwegig. Die vorliegende Studie zeigte auch ein vermehrtes Vorkommen von anti-apoptotischen Faktoren im arthrotischen Knorpel am Beispiel von AKT. Ein Anstieg des Apoptosefaktors BAD von SS14 nach BC wird also zunächst durch die Inaktivierung von AKT bis in die BC hinein noch in seiner Wirkung stark reduziert. Somit ist nach Übersicht der Informationen davon auszugehen, dass zumindest in den mittleren Arthrosegraden eine gewisse Analogie zu Kennzeichen drei von Krebs, nämlich Vermeidung von Apoptose, vorliegt.

4. Endloses Replikationspotential:

Dieser Aspekt der Krebsentstehung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

5. Anhaltende Angiogenese:

Angiogenese begleitet Arthrose. Bis heute sind die Einzelheiten dieses Phänomens nicht entschlüsselt und es bleibt zu erforschen, ob Angiogenese lediglich ein Nebenprodukt des entglittenen Stoffwechsels und der erhöhten inflammatorischen Situation ist, oder ob es ein gewollter Prozess ist, der bei der Regeneration des Knorpels helfen soll. In der Literatur wurden hinreichende Beweise für eine Vaskularisierung des Knorpels erbracht und auch die vorliegende Studie zeigte am Beispiel von FGF-1, ANGPT2 und ENG eine deutlich erhöhte Angiogenesetendenz bei arthrotischem Knorpel mit großen Clustern – auch hier nahm das diffuse Muster bei FGF-1 und ANGPT-2 eine Sonderstellung ein, weil es zu einer abrupten Umkehr der entsprechenden Signale kam. Angiogenese bei Krebs erfüllt den Zweck der Anpassung an den erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen des wachsenden Tumors. Auch wenn der Zweck der Vaskularisierung von arthrotischem Knorpel nicht verstanden ist, so kann mit Kennzeichen fünf von Krebs,

anhaltende Angiogenese, eine eindeutige Übereinstimmung bis zu den BC festgemacht werden.

6. Gewebeinvasion und Metastasierung:

Dieser Aspekt der Krebsentstehung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

7. Deregulation des zellulären Metabolismus:

Dieser Aspekt der Krebsentstehung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

8. Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem:

Die Modulation des Immunsystems im Sinne der Interaktion von Checkpointproteinen ist im Zusammenhang mit Arthrose unerforscht. Vor diesem Hintergrund konnte die vorliegende Studie ganz bemerkenswerte Ergebnisse zeigen, da im Knorpel des diffusen Musters die Verfügbarkeit der Immuncheckpoints PD1, TIM3 und TLR2 jeweils deutlich erhöht war. Weiterführende Forschung in diese Richtung muss angestrebt werden, um herauszufinden, welche Rolle die Immunmodulation im Kontext der Arthrose spielt. In der Krebsforschung konnten enorme Erfolge durch die Etablierung von Checkpoint-Inhibitoren erzielt werden, die bewirken, dass T-Lymphozyten wie gedacht Tumorzellen attackieren können und nicht von Selbigen durch Ligandenbindung deaktiviert werden. Das Kennzeichen acht von Krebs, Vermeidung der Zerstörung durch das Immunsystem, bleibt aufgrund der unklaren Rolle der Checkpoints im Knorpel derzeit noch offen.

9. Tumorfördernde Entzündung:

Inflammation ist seit Langem als Kernmerkmal der Gelenkarthrose beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte anhand von TNF- α zumindest für die Kategorie des diffusen Knorpels eine erhöhte inflammatorische Situation belegt werden. Darüber hinaus zeigten sich IL-6 und IL-8 als allgemeine Entzündungsmarker erhöht. Entzündungsfaktoren im Allgemeinen nehmen ganz erheblichen Einfluss auf die chondrozytäre Differenzierung, die Degradation der EZM und auch auf Angiogenese. Gleiche Effekte von Entzündungsfaktoren wurden auch im Zusammenhang mit Onkoprozessen entdeckt.

Dementsprechend zeigt sich eine Übereinstimmung hinsichtlich Kennzeichen neun von Krebs – tumorfördernde Entzündung.

10. Genommutation und Instabilität:

Dieser Aspekt der Krebsentstehung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es viele Überschneidungen zwischen den Merkmalen der Arthrose auf zellulärer und molekularer Ebene und Krebs gibt. Übereinstimmungen finden sich in den Bereichen Proliferation und Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung und Angiogenese. Die Rolle der Immunmodulation bei Arthrose muss weiter erforscht werden, um einen Abgleich mit Onkoprozessen zu ermöglichen. Drei Kennzeichen von Krebs, nämlich Deregulation des zellulären Metabolismus, Genommutation und Instabilität und Gewebeinvasion und Metastasierung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die größte Kritik an der Veröffentlichung der Hallmarks of Cancer war, dass alle Aspekte bis auf Gewebeinvasion und Metastasierung auch auf benigne Tumoren zutreffen. Diese berechtigte Kritik zeigt, dass die Merkmale der Krebsentstehung nicht als exklusiv zu betrachten sind und sich durchaus in anderen Krankheitsentitäten wiederfinden. Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass Ziel dieser Arbeit nicht war, zu zeigen, dass Arthrose Krebs ist. Der Abgleich der Merkmale beider Krankheiten sollte dabei helfen, die Gesamtbetrachtung der Arthrose voranzubringen und um neue Perspektiven zu erweitern, um in Zukunft von Aspekten der Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie bei Krebs lernen zu können.

5.6 Limitationen der Studie

Zunächst ist zu sagen, dass eine Stichprobengröße von drei bis achtzehn Patienten pro Vergleichsgruppe als von teilweise sehr kleinem Umfang zu beschreiben ist. Um eine populationsbezogene Aussage treffen zu können wurden die Proben außerdem gepoolt. Eine Aussage zu Verläufen bei Individuen ist damit nicht möglich. Durch das Poolen war die tatsächliche Stichprobengröße eins, womit keine Analyse im Sinne einer schließenden Statistik möglich ist. Die dargestellten Statistiken sind rein deskriptiv. Der Variationskoeffizient zeigte sich innerhalb der gemessenen Duplikate bei einem kleinen Teil der Experimente über 1, was in diesen Fällen die Genauigkeit der Ergebnisse begrenzt erscheinen lässt. Als mögliche Erklärung hierfür wären denkbar Partikelinterferenzen. Dennoch lag der Variationskoeffizient bei etwa 75% der Werte kleiner als 0,5. Zusätzlich

muss bei Werten, die unterhalb der Nachweisbarkeitsgrenze lagen, beachtet werden, dass nicht automatisch der Schluss gezogen werden kann, dass der Analyt in der entsprechenden Vergleichsgruppe nicht vorhanden war. Beim Vergleich der Werte der Gruppe CS mit denen des Knorpels muss berücksichtigt werden, dass die Vergleichsgruppe CS das Proteinextrakt von Zellen und nicht von Knorpel beziehungsweise Gewebe enthielt. Somit ist ein direkter Vergleich möglicherweise nicht aussagekräftig und kann vor allem einen Vergleich innerhalb der Biomarker für CS erlauben.

6 Zusammenfassung

Die Betrachtung von Gelenkknorpel in Abhängigkeit sich verändernder räumlicher Chondrozytenmuster ist eine neue Perspektive in der Erforschung von Arthrose. Die Ursache der Ausbildung großer Zellcluster ist vermeintlich die reichliche Vermehrung von Chondrozyten. Gleichzeitig präsentieren sich die Chondrozyten in großen Clustern nicht mehr geordnet eingebettet in die Matrix, sondern ungeordnet mit einem scheinbar veränderten Phänotyp. Daraus ergibt sich auf den ersten Blick eine Analogie zu einer Krankheit dessen Kernmerkmal auch die reichliche Vermehrung von veränderten Zellen ist, nämlich Krebs. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Studie in explorativer Weise als besonderer Blickwinkel auf die molekularen und zellulären Veränderungen bei Arthrose der Vergleich zu Onkoprozessen gezogen.

Dafür wurden 33 Biomarker aus den Bereichen Proliferation und Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung, Knochenumbau, Angiogenese und Immuncheckpoints ausgewählt und quantitativ oder semiquantitativ mittels Multiplex Assay im Gelenkknorpel gemessen. Eine Einbettung der vorliegenden Prozesse in den zeitlichen Ablauf der Degeneration erfolgte über die Zuordnung der untersuchten Proteinisolate aus dem Knorpel der Femurkondylen zu den verschiedenen beschriebenen räumlichen Chondrozytenmustern (Strings, Double Strings, Small Clusters, Big Clusters und Diffuse). Für den weiteren Vergleich diente Proteinisolat von intaktem Femurkondylen-Knorpel eines 14-jährigen Jungen und Chondrosarkomzellen.

Die Messergebnisse ergaben ein gemischtes Bild von erwartbaren Ergebnissen mit beispielsweise erhöhtem IL-6 und IL-8 in arthrotischem Knorpel und sehr bemerkenswerten Ergebnissen wie beispielsweise einem deutlichen Anstieg des anti-apoptotischen Markers AKT während der Knorpeldegeneration. Völlig neu war der Nachweis der Immuncheckpoints PD1 und TIM3 in der Kategorie des diffusen Musters. Auch wenn nicht alle Charakteristika von Krebszellen untersucht wurden und hier auch teilweise gar keine Übereinstimmung zu erwarten gewesen wäre, so konnte in der hier durchgeführten Studie festgestellt werden, dass zwischen Arthrose und Krebs Überschneidungen in den Bereichen Proliferation und Apoptose, Inflammation, Zelldifferenzierung und Angiogenese existieren. Die hier präsentierten Daten können insgesamt dazu ermutigen, den Blickwinkel auf Arthrose weiter von reinen degenerativen Überlegungen zu lösen und tiefer auf Transformationsprozesse im Rahmen inflammatorischer Zellveränderungen einzugehen.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
AKT	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ANGPT2	Angiopoietin-2
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BC	Big Cluster
BCL2	B-cell lymphoma 2
BMP9	Bone morphogenic protein 9
BSA	Bovines Serumalbumin
CASP8	Caspase 8
CASP9	Caspase 9
CS	Chondrosarkom
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
D	Discs
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DIF	Diffuse
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM +G -I	Dulbecco's Modified Eagle Medium +Glutamax -I
DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
DS	Double Strings
EGF	Epidermal growth factor
ENG	Endoglin
ET-1	Endothelin 1
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF1	Fibroblast growth factor 1
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FST	Follistatin
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HGF	Hepatocyte growth factor

ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Health Related Problems, 10. Auflage
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
kDa	Kilodalton
LEP	Leptin
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mM	millimolar
MMPs	Matrix-metalloproteasen
OPN	Osteopontin
OPS	Operationen- und Prozedurenschlüssel
P	Patienten
PD1	Programmed cell death protein 1
PDL1	Programmed cell death 1 ligand 1
PZM	Perizellulärmatrix
rpm	revolutions per minute
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SC	Small Cluster
SFAS	Soluble Fas receptor
SFASL	Soluble Fas ligand
SS	Single Strings
SS14	14-Jahre alt Discs oberflächliche Schicht
Std.	Standard
Tab.	Tabelle
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	Vascular endothelial growth factor
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Das Kniegelenk.	6
Abb. 2: Schematische Darstellung der Architektur von hyalinem Gelenkknorpel.....	8
Abb. 3: Arthrosekennzeichen am Kniegelenk.....	12
Abb. 4: Chondrozytenmuster.	13
Abb. 5: Proliferation und Apoptose.....	19
Abb. 6: Präparation des Kniegelenkknorpels für Proteinextraktion.....	44
Abb. 7: Räumliche Chondrozytenmuster im Rahmen der Knorpeldegeneration.....	45
Abb. 8: Pipettierschema des Bradford-Tests.....	48
Abb. 9: Standardkurve des Bradford-Test.....	49
Abb. 10: Messvorgang beim Multiplex Assay.....	50
Abb. 11: Pipettierschema und Versuchsschema der quantitativen Multiplex Assays...	53
Abb. 12: Pipettierschema und Versuchsschema des Early Apoptosis Panels.....	57
Abb. 13: Alters- und Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs der Arthrosepatienten.	61
Abb. 14: Proliferations- und Apoptosemarker.....	65
Abb. 15: Inflammationsmarker.	67
Abb. 16: Zelldifferenzierungsmarker.	69
Abb. 17: Knochenumbau marker.	71
Abb. 18: Angiogenesemarker.....	73
Abb. 19: Immuncheckpoints.....	75

Tab. 1: Verwendete Farbstoffe.....	35
Tab. 2: Verwendete Multiplex Assay Kits.	35
Tab. 3: Verwendete Lösung/Puffer aus Multiplex Assay Kit.	36
Tab. 4: Verwendete Standards aus Multiplex Assay Kits.	36
Tab. 5: Verwendete Qualitätskontrollen aus Multiplex Assay Kits.	37
Tab. 6: Verwendete Antikörper-immobilisierte magnetische Beads aus Multiplex Assay Kits.	39
Tab. 7: Verwendete Zelllinien.....	39
Tab. 8: Verwendete Lösungen und Puffer.....	40
Tab. 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	41
Tab. 10: Verwendete Geräte.....	42
Tab. 11: Verwendete Software.....	43
Tab. 12: Poolen der Knorpelscheiben.	46
Tab. 13: Übersicht der Reagenzien bis zur Inkubation mit magnetischen Antikörper Beads bei quantitativem Nachweis.	54
Tab. 14: Übersicht der Reagenzien bis zur Inkubation mit magnetischen Antikörper Beads bei dem Early Apoptosis Panel.	58
Tab. 15: Proliferations- und Apoptosemarker.....	63
Tab. 16: Inflammationsmarker.	66
Tab. 17: Zelldifferenzierungsmarker.....	68
Tab. 18: Knochenumbaumarker.....	70
Tab. 19: Angiogenesemarker.....	72
Tab. 20: Immuncheckpoints.....	74
Tab. 21: Übersicht aller gemessenen Biomarker - Hitzediagramm.....	79

9 Literaturverzeichnis

1. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *PROMETHEUS Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 4 ed. 2014, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
2. Aumüller, G., G. Aust, and A. Doll, *Duale Reihe: Anatomie*. 2010, Stuttgart: Thieme.
3. Abulhasan, J.F. and M.J. Grey, *Anatomy and Physiology of Knee Stability*. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology*, 2017. 2(4): p. 34.
4. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. *Sports Health*, 2009. 1(6): p. 461-8.
5. Adam, C., et al., *The distribution of cartilage thickness within the joints of the lower limb of elderly individuals*. *J Anat*, 1998. 193 (Pt 2): p. 203-14.
6. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions*. *Instr Course Lect*, 1998. 47: p. 477-86.
7. Pearle, A.D., R.F. Warren, and S.A. Rodeo, *Basic science of articular cartilage and osteoarthritis*. *Clin Sports Med*, 2005. 24(1): p. 1-12.
8. Benninghoff, A., *Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1925. 2(5): p. 783-862.
9. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. *Br Med Bull*, 2008. 87: p. 77-95.
10. Archer, C.W. and P. Francis-West, *The chondrocyte*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003. 35(4): p. 401-404.
11. Elder, B.D. and K.A. Athanasiou, *Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration*. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2009. 15(1): p. 43-53.
12. Fortier, L.A., et al., *The role of growth factors in cartilage repair*. *Clinical orthopaedics and related research*, 2011. 469(10): p. 2706-2715.
13. Liu, Q., et al., *Effects of mechanical stress on chondrocyte phenotype and chondrocyte extracellular matrix expression*. *Scientific Reports*, 2016. 6: p. 37268.
14. Kapoor, M., et al., *Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis*. *Nature Reviews Rheumatology*, 2010. 7: p. 33.
15. Wilusz, R.E., J. Sanchez-Adams, and F. Guilak, *The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage*. *Matrix Biol*, 2014. 39: p. 25-32.
16. Szirmai, J.A., *Structure of cartilage*. *Aging of Connective and Skeletal Tissue*, 1969: p. 163-200.

17. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res, 2002. 4(1): p. 30-5.
18. Lohmander, S., *Proteoglycans of joint cartilage: Structure, function, turnover and role as markers of joint disease*. Baillière's Clinical Rheumatology, 1988. 2(1): p. 37-62.
19. Jung, E., et al., *Quantitative analysis of water distribution in human articular cartilage using terahertz time-domain spectroscopy*. Biomedical optics express, 2012. 3(5): p. 1110-1115.
20. Mow, V.C. and X.E. Guo, *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. Annu Rev Biomed Eng, 2002. 4: p. 175-209.
21. Mow, V.C., et al., *Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments*. Journal of Biomechanical Engineering, 1980. 102(1): p. 73-84.
22. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. 64(6): p. 1697-707.
23. Hunter, D.J. and D.T. Felson, *Osteoarthritis*. BMJ (Clinical research ed.), 2006. 332(7542): p. 639-642.
24. Farr li, J., L.E. Miller, and J.E. Block, *Quality of life in patients with knee osteoarthritis: a commentary on nonsurgical and surgical treatments*. The open orthopaedics journal, 2013. 7: p. 619-623.
25. Rabenberg, M., *Arthrose*, in *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2013, Robert Koch-Institut. p. 14-15.
26. Fuchs, J., M. Rabenberg, and C. Scheidt-Nave, *Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen*. 2013, Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung - Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.
27. Felson, D.T., et al., *Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors*. Annals of Internal Medicine, 2000. 133(8): p. 635-646.
28. Jensen, L.K., et al., *Radiographic knee osteoarthritis in floorlayers and carpenters*. Scand J Work Environ Health, 2000. 26(3): p. 257-62.
29. Kujala, U.M., et al., *Knee osteoarthritis in former runners, soccer players, weight lifters, and shooters*. Arthritis Rheum, 1995. 38(4): p. 539-46.
30. King, L.K., L. March, and A. Anandacoomarasamy, *Obesity & osteoarthritis*. The Indian journal of medical research, 2013. 138(2): p. 185-193.
31. Gelber, A.C., et al., *Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis*. Ann Intern Med, 2000. 133(5): p. 321-8.

32. Michael, J.W.P., K.U. Schlüter-Brust, and P. Eysel, *The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee*. Deutsches Arzteblatt international, 2010. 107(9): p. 152-162.
33. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Res, 2001. 3(2): p. 107-13.
34. Hackenbroch, M., *Periphere Arthrosen*. Praxis der konservativen Orthopädie, 2009.
35. Durr, H.D., et al., *The cause of subchondral bone cysts in osteoarthrosis: a finite element analysis*. Acta Orthop Scand, 2004. 75(5): p. 554-8.
36. Oni, O.O. and C.J. Morrison, *The mechanical 'quality' of osteophytes*. Injury, 1998. 29(1): p. 31-3.
37. Markhardt, B.K., G. Li, and R. Kijowski, *The Clinical Significance of Osteophytes in Compartments of the Knee Joint With Normal Articular Cartilage*. AJR. American journal of roentgenology, 2018. 210(4): p. W164-W171.
38. Aicher, W.K. and B. Rolauffs, *The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2014. 73(4): p. 645-53.
39. Felka, T., et al., *Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology*. Osteoarthritis and Cartilage, 2016. 24(7): p. 1200-1209.
40. Rolauffs, B., et al., *Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2010. 62(2): p. 489-98.
41. Lotz, M.K., et al., *Cartilage cell clusters*. Arthritis and rheumatism, 2010. 62(8): p. 2206-2218.
42. Hoshiyama, Y., et al., *Chondrocyte clusters adjacent to sites of cartilage degeneration have characteristics of progenitor cells*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2015. 33(4): p. 548-555.
43. Rolauffs, B., et al., *Onset of preclinical osteoarthritis: The angular spatial organization permits early diagnosis*. Arthritis & Rheumatism, 2011. 63(6): p. 1637-1647.
44. Dreier, R., *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*. Arthritis research & therapy, 2010. 12(5): p. 216-216.
45. Singh, P., et al., *Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2019. 1442(1): p. 17-34.

46. Homandberg, G.A., R. Meyers, and D.L. Xie, *Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture*. J Biol Chem, 1992. 267(6): p. 3597-604.
47. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. Front Biosci, 2006. 11: p. 529-43.
48. Martin, J.A. and J.A. Buckwalter, *Effects of fibronectin on articular cartilage chondrocyte proteoglycan synthesis and response to insulin-like growth factor-I*. J Orthop Res, 1998. 16(6): p. 752-7.
49. Liu, H., L.A. McKenna, and M.F. Dean, *An N-terminal peptide from link protein can stimulate biosynthesis of collagen by human articular cartilage*. Arch Biochem Biophys, 2000. 378(1): p. 116-22.
50. Fernandes, J.C., J. Martel-Pelletier, and J.P. Pelletier, *The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology*. Biorheology, 2002. 39(1-2): p. 237-46.
51. Billinghamst, R.C., et al., *Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage*. The Journal of Clinical Investigation, 1997. 99(7): p. 1534-1545.
52. Troeberg, L. and H. Nagase, *Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis*. Biochimica et biophysica acta, 2012. 1824(1): p. 133-145.
53. Wu, J.J., et al., *Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage*. J Biol Chem, 1991. 266(9): p. 5625-8.
54. Naito, K., et al., *Measurement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in patients with knee osteoarthritis: Comparison with generalized osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford, England), 1999. 38: p. 510-5.
55. Yoshihara, Y., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2000. 59(6): p. 455-461.
56. Pasternak, B. and P. Aspenberg, *Metalloproteinases and their inhibitors-diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics*. Acta Orthop, 2009. 80(6): p. 693-703.
57. Bernhagen, J., et al., *Purification, Bioactivity, and Secondary Structure Analysis of Mouse and Human Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)*. Biochemistry, 1994. 33(47): p. 14144-14155.
58. Donnelly, S.C., et al., *Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome*. Nature Medicine, 1997. 3(3): p. 320-323.
59. Rowe, M.A., et al., *Reduced Osteoarthritis Severity in Aged Mice With Deletion of Macrophage Migration Inhibitory Factor*. Arthritis Rheumatol, 2017. 69(2): p. 352-361.

60. Akkiraju, H. and A. Nohe, *Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration*. Journal of developmental biology, 2015. 3(4): p. 177-192.
61. Augustyniak, E., et al., *The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration*. International Orthopaedics, 2015. 39(5): p. 995-1003.
62. Appleton, C.T., et al., *Transforming growth factor alpha suppression of articular chondrocyte phenotype and Sox9 expression in a rat model of osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2007. 56(11): p. 3693-705.
63. Benya, P.D., S.R. Padilla, and M.E. Nimni, *Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture*. Cell, 1978. 15(4): p. 1313-1321.
64. Horvai, A., *Chapter 15 - Cartilage-Forming Tumors*, in *Bone and Soft Tissue Pathology*, A.L. Folpe and C.Y. Inwards, Editors. 2010, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 330-354.
65. G. Rothwell, A. and G. Bentley, *Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage*. The Journal of bone and joint surgery. British volume, 1973. 55: p. 588-94.
66. Meachim, G. and D.H. Collins, *Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) in vitro*. Ann Rheum Dis, 1962. 21: p. 45-50.
67. Del Carlo, M. and R.F. Loeser, *Cell death in osteoarthritis*. Current Rheumatology Reports, 2008. 10(1): p. 37-42.
68. Hashimoto, S., et al., *FAS/FAS ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes*. Arthritis & Rheumatism, 1997. 40(10): p. 1749-1755.
69. Hashimoto, H., et al., *Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 1998. 41(4): p. 657-662.
70. Tanaka, M., et al., *Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes*. The EMBO journal, 1995. 14(6): p. 1129-1135.
71. Lee, S.W., et al., *TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2004. 50(2): p. 534-42.
72. Dempsey, P.W., et al., *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2003. 14(3): p. 193-209.
73. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. 35(4): p. 495-516.
74. Lane, D.P., *p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. 358(6381): p. 15-16.

75. Agarwal, M.L., et al., *p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(18): p. 8493-7.
76. Brady, C.A. and L.D. Attardi, *p53 at a glance*. Journal of Cell Science, 2010. 123(15): p. 2527-2532.
77. Schuler, M. and D.R. Green, *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2001. 29(Pt 6): p. 684-8.
78. Hemann, M.T. and S.W. Lowe, *The p53–Bcl-2 connection*. Cell Death & Differentiation, 2006. 13(8): p. 1256-1259.
79. Marsden, V.S., et al., *Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome*. Nature, 2002. 419(6907): p. 634-637.
80. Yang, E., et al., *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death*. Cell, 1995. 80(2): p. 285-91.
81. Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito, *PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer*. Apoptosis, 2004. 9(6): p. 667-676.
82. Jia, G., et al., *Insulin-like growth factor-1 induces phosphorylation of PI3K-Akt/PKB to potentiate proliferation of smooth muscle cells in human saphenous vein*. Experimental and molecular pathology, 2010. 89(1): p. 20-26.
83. Hou, C.H., et al., *Transforming growth factor alpha promotes osteosarcoma metastasis by ICAM-1 and PI3K/Akt signaling pathway*. Biochem Pharmacol, 2014. 89(4): p. 453-63.
84. Datta, S.R., et al., *Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery*. Cell, 1997. 91(2): p. 231-241.
85. Olivotto, E., et al., *Pathophysiology of osteoarthritis: canonical NF- κ B/IKK β -dependent and kinase-independent effects of IKK α in cartilage degradation and chondrocyte differentiation*. RMD open, 2015. 1(Suppl 1): p. e000061-e000061.
86. Marcu, K.B., et al., *NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA*. Current drug targets, 2010. 11(5): p. 599-613.
87. Roman-Blas, J.A. and S.A. Jimenez, *NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(9): p. 839-48.
88. Wojdasiewicz, P., Ł.A. Poniatowski, and D. Szukiewicz, *The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis*. Mediators of inflammation, 2014. 2014: p. 561459-561459.
89. Vuolteenaho, K., et al., *High synovial fluid interleukin-6 levels are associated with increased matrix metalloproteinase levels and severe radiographic changes in osteoarthritis patients*. Osteoarthritis and Cartilage, 2017. 25: p. S92-S93.

90. Guerne, P.A., D.A. Carson, and M. Lotz, *IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro*. J Immunol, 1990. 144(2): p. 499-505.
91. Yan, M., et al., *The role of leptin in osteoarthritis*. Medicine, 2018. 97(14): p. e0257-e0257.
92. Yang, W.-H., et al., *Leptin Induces IL-6 Expression through OBRI Receptor Signaling Pathway in Human Synovial Fibroblasts*. PLOS ONE, 2013. 8(9): p. e75551.
93. Zhen, X., et al., *Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone*. J Biol Chem, 2001. 276(7): p. 4879-85.
94. Pelletier, J.P., et al., *Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase*. J Rheumatol, 2001. 28(11): p. 2509-19.
95. Kaneko, S., et al., *Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis*. Cytokines Cell Mol Ther, 2000. 6(2): p. 71-9.
96. Brat, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. 7(2): p. 122-33.
97. Dhanasekaran, D.N. and E.P. Reddy, *JNK signaling in apoptosis*. Oncogene, 2008. 27(48): p. 6245-6251.
98. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. Molecular systems biology, 2005. 1: p. 2005.0010-2005.0010.
99. Qin, L. and F. Beier, *EGFR Signaling: Friend or Foe for Cartilage?* 2019. 3(2): p. e10177.
100. Pufe, T., et al., *The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage*. 2001. 44(5): p. 1082-1088.
101. Mapp, P.I. and D.A. Walsh, *Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis*. Nature Reviews Rheumatology, 2012. 8(7): p. 390-398.
102. Bonnet, C.S. and D.A. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology, 2004. 44(1): p. 7-16.
103. Bluteau, G., et al., *VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes*. Bone, 2007. 40(3): p. 568-76.
104. Beckmann, R., et al., *Mechanical forces induce changes in VEGF and VEGFR-1/sFlt-1 expression in human chondrocytes*. International journal of molecular sciences, 2014. 15: p. 15456-15474.

105. Murata, M., K. Yudoh, and K. Masuko, *The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: How the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?* Osteoarthritis and Cartilage, 2008. 16(3): p. 279-286.
106. Shibuya, M., *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies.* Genes & cancer, 2011. 2(12): p. 1097-1105.
107. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition.* Trends Pharmacol Sci, 2001. 22(4): p. 201-7.
108. Ellman, M.B., et al., *Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis.* J Cell Biochem, 2013. 114(4): p. 735-42.
109. El-Seoudi, A., et al., *Catabolic effects of FGF-1 on chondrocytes and its possible role in osteoarthritis.* Journal of cell communication and signaling, 2017. 11(3): p. 255-263.
110. Weng, T., et al., *Genetic inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 in knee cartilage attenuates the degeneration of articular cartilage in adult mice.* Arthritis and rheumatism, 2012. 64(12): p. 3982-3992.
111. Chen, F. and K. Hristova, *The physical basis of FGFR3 response to fgf1 and fgf2.* Biochemistry, 2011. 50(40): p. 8576-8582.
112. Nassiri, F., et al., *Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy.* Anticancer Res, 2011. 31(6): p. 2283-90.
113. Parker, W.L., M.B. Goldring, and A. Philip, *Endoglin is expressed on human chondrocytes and forms a heteromeric complex with betaglycan in a ligand and type II TGFbeta receptor independent manner.* J Bone Miner Res, 2003. 18(2): p. 289-302.
114. Chi, Y., et al., *Endoglin regulates transforming growth factor-beta signaling and chondrocyte function.* Osteoarthritis and Cartilage, 2014. 22: p. S159.
115. Finnsen, K., et al., *Endoglin Expression is linked to chondrocyte phenotype, TGF-β responsiveness, and type II collagen production in human chondrocytes.* Osteoarthritis and Cartilage, 2009. 17.
116. Meurs, M., et al., *Bench-to-bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target?* Critical care (London, England), 2009. 13: p. 207.
117. Harvey, N.L., *Chapter 8.4 - Lymphatic Vascular Development*, in *Heart Development and Regeneration*, N. Rosenthal and R.P. Harvey, Editors. 2010, Academic Press: Boston. p. 543-565.
118. Thomas, M. and H.G. Augustin, *The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis.* Angiogenesis, 2009. 12(2): p. 125-37.

119. Santulli, G., *Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look*. *Frontiers in endocrinology*, 2014. 5: p. 4-4.
120. Shan, W., et al., *Angiopoietin-like 2 upregulation promotes human chondrocyte injury via NF- κ B and p38/MAPK signaling pathway*. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2019. 37(6): p. 976-986.
121. Murata, M., et al., *Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation*. *J Orthop Res*, 2009. 27(1): p. 50-7.
122. Kawanabe, Y. and S.M. Nauli, *Endothelin*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2011. 68(2): p. 195-203.
123. Khatib, A.M., et al., *Endothelin 1 receptors, signal transduction and effects on DNA and proteoglycan synthesis in rat articular chondrocytes*. *Cytokine*, 1998. 10(9): p. 669-79.
124. Manacu, C.A., et al., *Endothelin-1 in osteoarthritic chondrocytes triggers nitric oxide production and upregulates collagenase production*. *Arthritis research & therapy*, 2005. 7(2): p. R324-R332.
125. Donell, S., *Subchondral bone remodelling in osteoarthritis*. *EFORT open reviews*, 2019. 4(6): p. 221-229.
126. Loi, F., et al., *Inflammation, fracture and bone repair*. *Bone*, 2016. 86: p. 119-30.
127. Lin, S., et al., *The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone*. *Bone Research*, 2016. 4(1): p. 16005.
128. Tsumaki, N. and H. Yoshikawa, *The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005. 16(3): p. 279-285.
129. Zoricic, S., et al., *Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans*. *Journal of anatomy*, 2003. 202(Pt 3): p. 269-277.
130. Deng, Z.H., et al., *Bone morphogenetic proteins for articular cartilage regeneration*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018. 26(9): p. 1153-1161.
131. Pullig, O., et al., *Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage*. *Matrix Biology*, 2000. 19(3): p. 245-255.
132. Sanchez, C., et al., *Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone*. *Arthritis Rheum*, 2008. 58(2): p. 442-55.
133. Giachelli, C.M. and S. Steitz, *Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization*. *Matrix Biol*, 2000. 19(7): p. 615-22.

134. Huang, W., et al., *Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells*. Bone, 2004. 34(5): p. 799-808.
135. Li, Y., et al., *The Expression of Osteopontin and Wnt5a in Articular Cartilage of Patients with Knee Osteoarthritis and Its Correlation with Disease Severity*. BioMed research international, 2016. 2016: p. 9561058-9561058.
136. Cheng, C., S. Gao, and G. Lei, *Association of osteopontin with osteoarthritis*. Rheumatol Int, 2014. 34(12): p. 1627-31.
137. Funaba, M., et al., *Follistatin and activin in bone: expression and localization during endochondral bone development*. Endocrinology, 1996. 137(10): p. 4250-4259.
138. Fahmy-Garcia, S., et al., *Follistatin Effects in Migration, Vascularization, and Osteogenesis in vitro and Bone Repair in vivo*. 2019. 7(38).
139. Yamada, J., et al., *Follistatin alleviates synovitis and articular cartilage degeneration induced by carrageenan*. International journal of inflammation, 2014. 2014: p. 959271-959271.
140. Reboul, P., et al., *Hepatocyte growth factor in osteoarthritis: when bone and cartilage decide to have a chat*. Arthritis Research & Therapy, 2003. 5(Suppl 3): p. 162-162.
141. Zhen, R., et al., *Hepatocyte growth factor improves bone regeneration via the bone morphogenetic protein2mediated NFkappaB signaling pathway*. Mol Med Rep, 2018. 17(4): p. 6045-6053.
142. (DGOOC), D.G.f.O.u.O.C., *S2k-Leitlinie Gonarthrose*. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), 2018.
143. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 1957. 16(4): p. 494-502.
144. Outerbridge, R.E., *The etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg Br, 1961. 43-b: p. 752-7.
145. Pritzker, K.P., et al., *Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. 14(1): p. 13-29.
146. Bundesamt, S., *Gesundheit: GesundheitFallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik)Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnenund Patienten in Krankenhäusern (4-Steller) 2018*. 2019.
147. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-674.
148. van Praag, V.M., et al., *Incidence, outcomes and prognostic factors during 25 years of treatment of chondrosarcomas*. Surgical Oncology, 2018. 27(3): p. 402-408.

149. Leddy, L.R. and R.E. Holmes, *Chondrosarcoma of bone*. *Cancer Treat Res*, 2014. 162: p. 117-30.
150. Paluch, C., et al., *Immune Checkpoints as Therapeutic Targets in Autoimmunity*. *Frontiers in immunology*, 2018. 9: p. 2306-2306.
151. Thanindratarn, P., et al., *Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy*. *Journal of bone oncology*, 2019. 15: p. 100221-100221.
152. Richert, I., et al., *The immune landscape of chondrosarcoma - potential for therapeutic targeting of CSFR1+ macrophages*. *Journal of Bone Oncology*, 2020. 20: p. 100271.
153. Du, B., et al., *Targeting Toll-like receptors against cancer*. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2016. 2: p. 463.
154. Karaliotas, G.I., et al., *Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression*. *Mol Med Rep*, 2015. 12(3): p. 4514-4521.
155. Kourtis, A., et al., *Quantitative analysis and study of the mRNA expression levels of apoptotic genes BCL2, BAX and BCL2L12 in the articular cartilage of an animal model of osteoarthritis*. *Annals of Translational Medicine*, 2018. 6(12): p. 5.
156. Iannone, F., et al., *Increased Bcl-2/p53 ratio in human osteoarthritic cartilage: a possible role in regulation of chondrocyte metabolism*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2005. 64(2): p. 217-221.
157. Frenzel, A., et al., *Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer*. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 2009. 14(4): p. 584-596.
158. de Jong, Y., et al., *Bcl-xl as the most promising Bcl-2 family member in targeted treatment of chondrosarcoma*. *Oncogenesis*, 2018. 7(9): p. 74.
159. Xie, J., et al., *Sustained Akt signaling in articular chondrocytes causes osteoarthritis via oxidative stress-induced senescence in mice*. *Bone research*, 2019. 7: p. 23-23.
160. Chen, Q., et al., *Increased apoptosis in human knee osteoarthritis cartilage related to the expression of protein kinase B and protein kinase C β in chondrocytes*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012. 50(1): p. 137-43.
161. Yoeli-Lerner, M. and A. Toker, *Akt/PKB Signaling in Cancer: A Function in Cell Motility and Invasion*. *Cell Cycle*, 2006. 5(6): p. 603-605.
162. Hashimoto, S., et al., *Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain*. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(8): p. 2340-9.
163. Okazaki, R., et al., *Apoptosis and p53 expression in chondrocytes relate to degeneration in articular cartilage of immobilized knee joints*. *J Rheumatol*, 2003. 30(3): p. 559-66.

164. Terek, R.M., et al., *p53 mutations in chondrosarcoma*. *Diagn Mol Pathol*, 1998. 7(1): p. 51-6.
165. Pettersen, I., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces, apoptosis in human articular chondrocytes in vitro*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. 296: p. 671-6.
166. von Karstedt, S., A. Montinaro, and H. Walczak, *Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy*. *Nature Reviews Cancer*, 2017. 17(6): p. 352-366.
167. Subbiah, V., et al., *Targeting the apoptotic pathway in chondrosarcoma using recombinant human Apo2L/TRAIL (dulanermin), a dual proapoptotic receptor (DR4/DR5) agonist*. *Molecular cancer therapeutics*, 2012. 11(11): p. 2541-2546.
168. Kitada, S., et al., *Expression and location of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BAD in normal human tissues and tumor cell lines*. *The American journal of pathology*, 1998. 152(1): p. 51-61.
169. Sastry, K.S.R., et al., *Targeting proapoptotic protein BAD inhibits survival and self-renewal of cancer stem cells*. *Cell Death & Differentiation*, 2014. 21(12): p. 1936-1949.
170. Clancy, R., et al., *Activation of stress-activated protein kinase in osteoarthritic cartilage: evidence for nitric oxide dependence*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001. 9(4): p. 294-299.
171. Ge, H.X., et al., *JNK pathway in osteoarthritis: pathological and therapeutic aspects*. *J Recept Signal Transduct Res*, 2017. 37(5): p. 431-436.
172. Tournier, C., *The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer*. *Genes & cancer*, 2013. 4(9-10): p. 397-400.
173. Robertson, C.M., et al., *Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2006. 14(5): p. 471-476.
174. D'Lima, D., et al., *Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis*. *Arthritis & Rheumatism*, 2006. 54(6): p. 1814-1821.
175. Stupack, D.G., *Caspase-8 as a therapeutic target in cancer*. *Cancer letters*, 2013. 332(2): p. 133-140.
176. Huser, C.A., M. Peacock, and M.E. Davies, *Inhibition of caspase-9 reduces chondrocyte apoptosis and proteoglycan loss following mechanical trauma*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. 14(10): p. 1002-10.
177. Matsuo, M., et al., *Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage*. *Acta Med Okayama*, 2001. 55(6): p. 333-40.
178. Li, P., et al., *Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application*. *Oncotarget*, 2017. 8(14): p. 23996-24008.

179. Owen-Schaub, L., *Soluble Fas and Cancer*. Clinical Cancer Research, 2001. 7(5): p. 1108-1109.
180. Roach, H.I., et al., *Pathobiology of osteoarthritis: pathomechanisms and potential therapeutic targets*. Curr Drug Targets, 2007. 8(2): p. 271-82.
181. Danalache, M., et al., *Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging*. Scientific Reports, 2021. 11(1): p. 9783.
182. Xie, Z., et al., *Macrophage migration inhibitory factor may play a protective role in osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2020. 28: p. S121.
183. Farr, L., S. Ghosh, and S. Moonah, *Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair*. Frontiers in immunology, 2020. 11: p. 1273-1273.
184. Stannus, O., et al., *Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. 18(11): p. 1441-7.
185. Ding, J., et al., *Expression of synovial fluid biomarkers in patients with knee osteoarthritis and meniscus injury*. Exp Ther Med, 2017. 14(2): p. 1609-1613.
186. Horiguchi, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha up-regulates the expression of BMP-4 mRNA but inhibits chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic ec cells, ATDC5 Cytokine*, 2000. 12(5): p. 526-530.
187. Wang, X. and Y. Lin, *Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?* Acta pharmacologica Sinica, 2008. 29(11): p. 1275-1288.
188. Gebauer, M., et al., *Comparison of the chondrosarcoma cell line SW1353 with primary human adult articular chondrocytes with regard to their gene expression profile and reactivity to IL-1beta*. Osteoarthritis Cartilage, 2005. 13(8): p. 697-708.
189. Merz, D., et al., *IL-8/CXCL8 and Growth-Related Oncogene α /CXCL1 Induce Chondrocyte Hypertrophic Differentiation*. The Journal of Immunology, 2003. 171(8): p. 4406-4415.
190. Lee, C.Y., et al., *IL-8 increases integrin expression and cell motility in human chondrosarcoma cells*. J Cell Biochem, 2011. 112(9): p. 2549-57.
191. Waugh, D.J.J. and C. Wilson, *The Interleukin-8 Pathway in Cancer*. Clinical Cancer Research, 2008. 14(21): p. 6735-6741.
192. Wiegertjes, R., F.A.J. van de Loo, and E.N. Blaney Davidson, *A roadmap to target interleukin-6 in osteoarthritis*. Rheumatology, 2020. 59(10): p. 2681-2694.
193. Kita, K., et al., *PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation*. Genes Cells, 2008. 13(8): p. 839-50.
194. Kumari, N., et al., *Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance*. Tumor Biology, 2016. 37(9): p. 11553-11572.

195. Galoian, K., et al., *Effect of cytostatic proline rich polypeptide-1 on tumor suppressors of inflammation pathway signaling in chondrosarcoma*. Molecular and Clinical Oncology, 2016. 5.
196. Dumond, H., et al., *Evidence for a Key Role of Leptin in Osteoarthritis*. Arthritis and rheumatism, 2003. 48: p. 3118-29.
197. Ku, J.H., et al., *Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis*. Clinical Rheumatology, 2009. 28(12): p. 1431-1435.
198. Ray, A. and M.P. Cleary, *The potential role of leptin in tumor invasion and metastasis*. Cytokine & growth factor reviews, 2017. 38: p. 80-97.
199. Yang, W.-H., et al., *Leptin increases VEGF expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2014. 1840(12): p. 3483-3493.
200. Long, D.L., et al., *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is increased in osteoarthritis and regulates chondrocyte catabolic and anabolic activities*. Osteoarthritis Cartilage, 2015. 23(9): p. 1523-31.
201. Zhang, X., et al., *The critical role of the epidermal growth factor receptor in endochondral ossification*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2011. 26(11): p. 2622-2633.
202. Ongusaha, P.P., et al., *HB-EGF Is a Potent Inducer of Tumor Growth and Angiogenesis*. Cancer Research, 2004. 64(15): p. 5283-5290.
203. Musumeci, G., et al., *Immunolocalization of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) as a possible immunotarget in diagnosis of some soft tissue sarcomas*. Acta Histochemica, 2013. 115(7): p. 719-727.
204. van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg, *Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration?* Osteoarthritis and Cartilage, 2012. 20(3): p. 223-232.
205. Schulze-Tanzil, G., *Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair*. Ann Anat, 2009. 191(4): p. 325-38.
206. Ji, Q., et al., *Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2019. 78(1): p. 100.
207. Zhao, H., et al., *The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour*. Cell Death & Disease, 2018. 9(3): p. 356.
208. Chen, Y.J., et al., *Osteopontin increases migration and MMP-9 up-regulation via alphavbeta3 integrin, FAK, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in human chondrosarcoma cells*. J Cell Physiol, 2009. 221(1): p. 98-108.
209. Tardif, G., et al., *Differential gene expression and regulation of the bone morphogenetic protein antagonists follistatin and gremlin in normal and*

- osteoarthritic human chondrocytes and synovial fibroblasts*. Arthritis & Rheumatism, 2004. 50(8): p. 2521-2530.
210. Tardif, G., et al., *The BMP antagonists follistatin and gremlin in normal and early osteoarthritic cartilage: an immunohistochemical study*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 2008. 17: p. 263-70.
 211. Shi, L., et al., *Clinical and Therapeutic Implications of Follistatin in Solid Tumours*. Cancer genomics & proteomics, 2016. 13(6): p. 425-435.
 212. Tsou, H.-K., et al., *HGF and c-Met interaction promotes migration in human chondrosarcoma cells*. PloS one, 2013. 8(1): p. e53974-e53974.
 213. Kang, Q., et al., *Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery*. Gene Therapy, 2004. 11(17): p. 1312-1320.
 214. Cheng, H., et al., *Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)*. J Bone Joint Surg Am, 2003. 85(8): p. 1544-52.
 215. Blunk, T., et al., *Bone morphogenetic protein 9: a potent modulator of cartilage development in vitro*. Growth Factors, 2003. 21(2): p. 71-7.
 216. Zhang, L., et al., *BMP signaling and its paradoxical effects in tumorigenesis and dissemination*. Oncotarget, 2016. 7(47): p. 78206-78218.
 217. Pfander, D., et al., *Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2001. 60(11): p. 1070.
 218. Gaballah, A., et al., *Correlation between synovial vascular endothelial growth factor, clinical, functional and radiological manifestations in knee osteoarthritis*. The Egyptian Rheumatologist, 2016. 38(1): p. 29-34.
 219. Carmeliet, P., *VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer*. Oncology, 2005. 69 Suppl 3: p. 4-10.
 220. Furumatsu, T., et al., *Human chondrosarcoma secretes vascular endothelial growth factor to induce tumor angiogenesis and stores basic fibroblast growth factor for regulation of its own growth*. International Journal of Cancer, 2002. 97(3): p. 313-322.
 221. Xie, Y., et al., *Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair*. Nat Rev Rheumatol, 2020. 16(10): p. 547-564.
 222. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factors (FGFs) in cancer: FGF traps as a new therapeutic approach*. Pharmacol Ther, 2017. 179: p. 171-187.
 223. Honsawek, S., A. Tanavalee, and P. Yuktanandana, *Elevated circulating and synovial fluid endoglin are associated with primary knee osteoarthritis severity*. Arch Med Res, 2009. 40(7): p. 590-4.

224. Finnsen, K., et al., *Endoglin differentially regulates TGF- β -induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes*. Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society, 2010. 18: p. 1518-27.
225. Boeuf, S., et al., *BMP and TGFbeta pathways in human central chondrosarcoma: enhanced endoglin and Smad 1 signaling in high grade tumors*. BMC Cancer, 2012. 12: p. 488.
226. Fagiani, E. and G. Christofori, *Angiopoietins in angiogenesis*. Cancer Lett, 2013. 328(1): p. 18-26.
227. Kalinski, T., et al., *Differential expression of VEGF-A and angiopoietins in cartilage tumors and regulation by interleukin-1beta*. Cancer, 2006. 106(9): p. 2028-38.
228. Zhao, Z., et al., *Endothelin-1 concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis*. Journal of Investigative Medicine, 2016. 64(4): p. 872.
229. T., B., et al., *Endothelin-Expression in chondrosarcoma*. Orthopaedic Proceedings, 2010. 92-B(SUPP_III): p. 475-475.
230. Caron, M.M.J., et al., *Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures*. Osteoarthritis and Cartilage, 2012. 20(10): p. 1170-1178.
231. Osiecka-Iwan, A., et al., *Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases*. Central-European journal of immunology, 2018. 43(2): p. 209-219.
232. Li, S., et al., *TIM-3 Genetic Variations Affect Susceptibility to Osteoarthritis by Interfering with Interferon Gamma in CD4+ T Cells*. Inflammation, 2015. 38(5): p. 1857-63.
233. Galoian, K., et al., *Toll like receptors TLR1/2, TLR6 and MUC5B as binding interaction partners with cytosolic proline rich polypeptide 1 in human chondrosarcoma*. International journal of oncology, 2018. 52(1): p. 139-154.
234. Sillat, T., et al., *Toll-like receptors in human chondrocytes and osteoarthritic cartilage*. Acta orthopaedica, 2013. 84(6): p. 585-592.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Zelforschungslabor der orthopädischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann und Frau PhD M.Sc. Marina Danalache.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig (mit Unterstützung durch Frau PhD M.Sc. Marina Danalache und Herrn Dr. rer. nat. Constantin Adams) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.07.2023

Julius Michael Wolfgart

11 Danksagung

Ein herausragender Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann dafür, dass ich dieses besondere wissenschaftliche Projekt bearbeiten durfte. Ich danke ihm für das Vertrauen, die äußerst intensive Betreuung und die ausführliche inhaltliche Wissensvermittlung in unseren unzähligen Gesprächen. Durch seinen begeisterten, wohlwollenden Charakter hat er maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Dissertation mit größtmöglicher Motivation und größtmöglichem Engagement geschrieben habe. Zusätzlich hat er mir, über die Grenzen der Grundlagenforschung hinaus, tiefere Einblicke in die orthopädische Universitätsmedizin gewährt - ich danke ihm also auch im Sinne eines Mentors.

Außerdem möchte ich Frau PhD M.Sc. Marina Danalache für ihre bedingungslose Unterstützung auf allen erdenklichen Ebenen danken. Insbesondere bedanke ich mich für das geduldige Einführen in die labortechnischen Methoden und das Vermitteln der inhaltlichen Grundlagen der Arthroseforschung. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle auch die freundschaftliche Beziehung, die während meiner Zeit im Labor entstanden ist und die über unsere wissenschaftliche Zusammenarbeit hinaus geht.

Auch möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. rer. nat. Constantin Adams für die Nutzung seiner Laborräume und seine Unterstützung bei der Messung der Multiplex Assays ganz herzlich danken.

Des Weiteren danke ich allen Doktorandinnen und Doktoranden des orthopädischen Zellforschungslabores, die mich auf meinem Weg der Promotion begleitet haben. Durch den permanenten Austausch von Ideen und Perspektiven wurde das wissenschaftliche Arbeiten nicht nur freud-, sondern auch gehaltvoller.

Zuallerletzt möchte ich meinen Eltern Herrn Dr. med. Martin Wolfgart und Frau Ute Wolfgart für die ausnahmslose finanzielle Unterstützung danken, ohne die ein solch umfangreicher Einsatz in die Wissenschaft schwer möglich gewesen wäre.

12 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt