

Aus der  
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**Die Veränderung der perizellulären Mikroumgebung im  
hyalinen Knorpel bei Arthrose**

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

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

**vorgelegt von  
Erler, Anna-Lisa**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Ihle

Tag der Disputation: 01.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Gelenknorpel.....	1
1.1.1	Aufbau.....	1
1.1.2	Die perizelluläre Mikroumgebung .....	3
1.1.3	Kollagen Typ VI .....	5
1.1.4	Kollagen Typ III .....	6
1.1.5	Perlekan .....	7
1.1.6	Biglykan.....	8
1.1.7	Fibrillin-1.....	9
1.2	Arthrose.....	10
1.2.1	Erkrankung.....	10
1.2.2	Pathogenese .....	11
1.2.3	Bisherige Therapieansätze .....	13
1.2.4	Zelluläre Organisation .....	14
1.3	Ziel der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material .....	16
2.1.1	Geräte und Instrumente.....	16
2.1.2	Antikörper.....	17
2.1.3	Zellkernfärbung .....	18
2.1.4	Reagenzien .....	18
2.1.5	Enzyme .....	19
2.1.6	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.7	Computersoftware .....	20
2.1.8	Lösungen .....	21
2.2	Methoden .....	21
2.2.1	Probengewinnung von humanem hyalinem Knorpel.....	21

2.2.2	Aufarbeitung des Probenmaterials.....	22
2.2.3	Anfertigung der Kryoschnitte .....	22
2.2.4	Indirekte Immunfluoreszenz.....	24
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	26
2.2.6	Auswertung der Bilder .....	27
2.2.7	Statistische Auswertung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Analyse der Patientendaten .....	31
3.2	Kollagen Typ VI.....	34
3.2.1	Veränderungen der PZM für Kollagen Typ VI .....	34
3.2.2	Analyse der PZM pro Fläche für Kollagen Typ VI .....	38
3.2.3	Analyse der PZM pro Zelle für Kollagen Typ VI .....	40
3.3	Kollagen Typ III .....	43
3.3.1	Veränderungen der PZM für Kollagen Typ III .....	43
3.3.2	Analyse der PZM pro Fläche für Kollagen Typ III.....	46
3.3.3	Analyse der PZM pro Zelle für Kollagen Typ III .....	48
3.4	Perlekan .....	49
3.4.1	Veränderungen der PZM für Perlekan0 .....	49
3.4.2	Analyse der PZM pro Fläche für Perlekan .....	51
3.4.3	Analyse der PZM pro Zelle für Perlekan .....	53
3.5	Biglykan.....	54
3.5.1	Veränderungen der PZM für Biglykan.....	54
3.5.2	Analyse der PZM pro Fläche für Biglykan.....	57
3.5.3	Analyse der PZM pro Zelle für Biglykan.....	59
3.6	Fibrillin-1.....	60
3.6.1	Veränderungen der PZM für Fibrillin-1.....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>

4.1	Methodik.....	64
4.2	Veränderungen der einzelnen PZM-Komponenten .....	65
4.2.1	Veränderungen von Kollagen Typ VI .....	66
4.2.2	Veränderungen von Kollagen Typ III .....	68
4.2.3	Veränderungen von Perlekan .....	70
4.2.4	Veränderungen von Biglykan.....	72
4.2.5	Veränderungen von Fibrillin-1 .....	74
4.3	Veränderung der PZM .....	74
4.3.1	Bedeutung des virtuellen PZM-Wertes .....	74
4.3.2	Zunahme der PZM pro Fläche.....	75
4.3.3	Abnahme der PZM pro Zelle.....	76
5	Zusammenfassung .....	78
6	Verzeichnis .....	79
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	79
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	80
6.3	Tabellenverzeichnis .....	82
7	Literaturverzeichnis .....	84
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	96
9	Veröffentlichungen.....	97
10	Danksagung.....	98



# 1 Einleitung

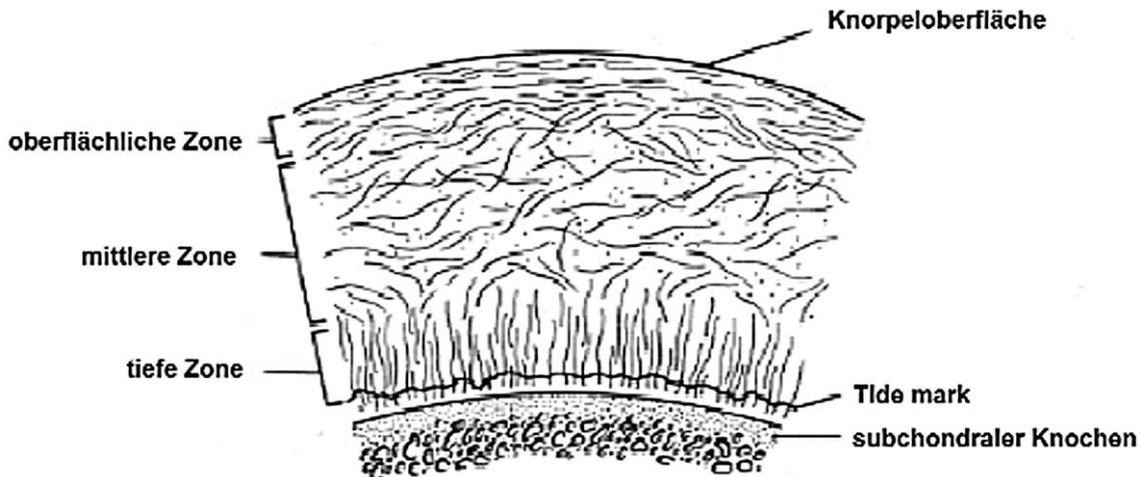
## 1.1 Gelenkknorpel

### 1.1.1 Aufbau

Gelenkknorpel als hochspezialisiertes Bindegewebe kleidet die Gelenkflächen aus und sorgt für eine fast reibungslose Bewegung (Brody 2015). Die Hauptkomponenten des hyalinen Gelenkknorpels bilden differenzierte Knorpelzellen, die Chondrozyten und die Extrazellulärmatrix (EZM) bestehend aus Strukturproteinen und Flüssigkeit. Die Chondrozyten sind für die Synthese der Strukturproteine zuständig und regulieren somit die Zusammensetzung sowie den Auf- und Abbau der Matrixmoleküle (Lohmander 1988). Die EZM setzt sich vor allem aus Wasser, Kollagenen, Proteoglykanen, einem kleinen Anteil Glykoproteinen und weiteren Strukturproteinen zusammen. Die Hauptkomponenten sind hier Kollagen Typ II sowie Kollagen Typ IX und XI (Eyre 2002). Dabei unterscheidet sich die Matrix, welche direkt die Zellen umgibt, sowohl in Struktur als auch Zusammensetzung von der restlichen EZM. Es ergeben sich um die Zellen herum drei Regionen: die perizelluläre Region, welche die Zelle direkt umgibt, die territoriale Region, die sich der perizellulären Region direkt anschließt und die interterritoriale Region zwischen den Zellen (Sophia Fox, Bedi et al. 2009). Kollagene bestehen aus langen Aminosäureketten. Sie sind reich an Prolin, Glycin und haben viele hydroxylierte Aminosäuren, welche für Quervernetzungen und somit für eine hohe Stabilität der Kollagenmatrix entscheidend sind. Drei helikale Polipeptidketten bilden zusammen das Tropokollagen. Durch Aggregation mehrerer Tropokollagenen und durch weitere Quervernetzungen bilden sich in der EZM die Kollagenfibrillen aus, welche sich schließlich zu den Kollagenfasern zusammen lagern (Malhotra and Erlmann 2015). Die Fasern verlaufen bogenförmig, das bedeutet sie ziehen von subchondral senkrecht zur Oberfläche, verlaufen dann parallel zur dieser und enden erneut subchondral. Durch diese Konformation sorgen die Fasern für eine starke Zugfestigkeit und bilden das Gerüst des Knorpels.

Proteoglykane setzen sich aus einem Kernprotein und bis zu 200 Seitenketten aus Glukosaminoglykanen (GAG) zusammen. Glukosaminoglykane sind lineare

Polysaccharide aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten. Die meisten Proteoglykane sind nichtkovalent über ein Verbindungsprotein (Link-Protein) an Hyaluronsäure gebunden und bilden so ein großes Netzwerk, welches mit dem Kollagenetzwerk verflochten ist. Durch die vielen negativen Seitenketten der Proteoglykane entstehen Dipolkräfte auf positiv geladene Ionen wie Natrium, wodurch es zu einem Wassereinstrom in das Gewebe kommt. Bei Druckbelastung weicht das Wasser aus dem Gewebe, der Knorpel wird komprimiert und gibt der Belastung nach. Somit dämpft er die Kräfte auf den darunterliegenden Knochen ab. Bei Entlastung nehmen die Proteoglykane ihre ursprüngliche Form wieder an, und die Flüssigkeit strömt zurück in das Gewebe. Sie spielen somit eine entscheidende Rolle darin, Stöße abzdämpfen und die Eigenelastizität zu erhalten. Der hyaline Gelenkknorpel ist nicht vaskularisiert, hat keine nervale Innervation und keine Lymphgefäße. Er wird somit ausschließlich über Diffusion versorgt. Anhand der unterschiedlichen Zusammensetzung der EZM und dem Verlauf der Kollagenfasern kann die Knorpelfläche in drei verschiedene Zonen eingeteilt werden: Die oberflächliche Zone bildet die an den Gelenkspalt angrenzende Knorpeloberfläche. Hier sind die Kollagenfasern parallel zur Oberfläche ausgerichtet. Die mittlere Zone bildet die Hauptzone: Die Fasern verlaufen hier diagonal. Die tiefe Zone grenzt an die kalzifizierte subchondrale Zone und den darunterliegenden Knochen an. Hier sind die Kollagenfibrillen senkrecht zur Oberfläche angeordnet. (Sophia Fox, Bedi et al. 2009)



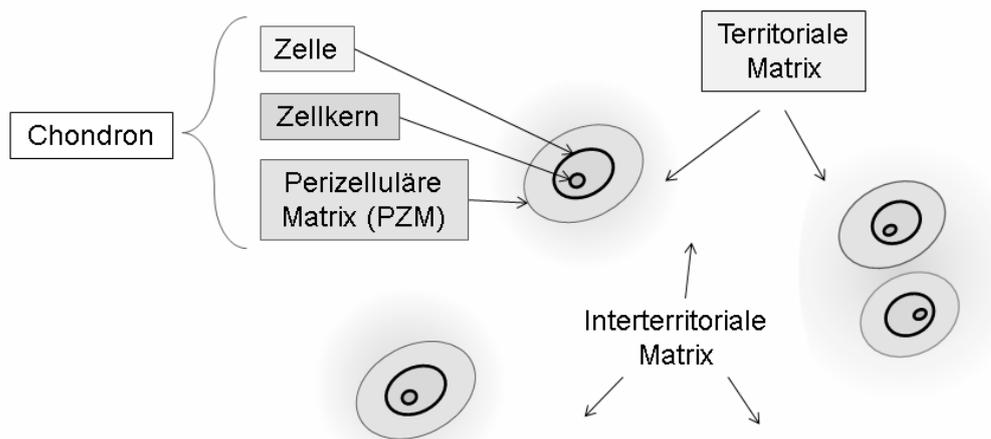
**Abbildung 1:** Zonen des hyalinen Gelenkknorpels. Gezeigt wird die Anordnung der Kollagenfasern in den verschiedenen Knorpelzonen in Bezug zum Knochen und der Knorpeloberfläche. (Quelle: Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, V. Martinek, 2003 (Martinek 2003))

### 1.1.2 Die perizelluläre Mikroumgebung

Angrenzend an die Zellmembran werden die Chondrozyten zunächst von einer besonderen Matrix umgeben, der Perizellulärmatrix (PZM). Sie umgibt die Zellen geflechtartig wie eine Art Kapsel. Die PZM und die von ihr umgebenden Zellen werden als eine funktionelle Einheit, als Chondron, bezeichnet (Choi, Youn et al. 2007). Als Bestandteil der EZM enthält die PZM viele Strukturproteine, die in der interterritorialen Matrix auch vorkommen, wie Kollagen Typ II (Youn, Choi et al. 2006), IX (Horikawa, Nakajima et al. 2004) und XI. (Smith, Hasty et al. 1989). Sie grenzt sich jedoch von der interterritorialen Matrix durch weitere Bestandteile ab: Charakteristisch ist das Vorkommen von Kollagen Typ VI (Youn, Choi et al. 2006), Kollagen Typ III (Hosseini, Weis et al. 2016), Perlekan, Laminin (Kvist, Nystrom et al. 2008), Biglykan (Miosge, Flachsbar et al. 1994), Fibrillin-1 (Yu and Urban 2010), Aggrecan, Hyaluronsäure (Knudson, Ishizuka et al. 2018), Fibronectin (Chang, Nakajima et al. 1997), und Chondroitinsulfat (Poole, Flint et al. 1988). Die enthaltene Hyaluronsäure, welche vor allem auch bei der Migration und Adhäsion von Zellen eine entscheidende Rolle spielt, dient als Brücke zwischen der Zellmembran und der extrazellulären Matrix (Cohen, Kam et al. 2006).

Als Schnittstelle zwischen der Zelle und ihrer Umgebung (Poole, Ayad et al. 1992) erfüllt die PZM viele wichtige Funktionen. Dazu zählt zum einen die Sicherstellung der Zellintegrität (Costell, Gustafsson et al. 1999). Zum anderen reguliert die PZM die Zellkommunikation durch Interaktion mit verschiedenen Signalmolekülen (Vincent, McLean et al. 2007, Decarlo, Belousova et al. 2012). Die PZM kann außerdem durch die Übertragung von Signalen auf Zellrezeptoren die Zellbiosynthese modulieren (Mow, Wang et al. 1999, Leitinger and Hohenester 2007). Eine der wichtigsten Aufgaben der PZM ist allerdings der Schutz der Zelle vor dem programmierten Zelltod, der Apoptose (Peters, Otto et al. 2011)

In den verschiedenen Zonen des Knorpels variiert die Morphologie der Chondrone. In der oberflächlichen Zone sind sie eher scheibenförmig und parallel zur Oberfläche ausgebildet, in der mittleren Zone sind sie kreisrund und in der tiefen Zone ellipsenförmig mit senkrechter Achse zur Oberfläche (Youn, Choi et al. 2006). Dies scheint in Zusammenhang mit der Krafteinwirkung auf die Zellen zu stehen. Dabei kommt es besonders in der oberflächlichen Zone zur Abschirmung vor einwirkenden Kräften, wohingegen in der tiefen Zone die Spannung auf die Zellen sogar verstärkt wird (Choi, Youn et al. 2007). Hier könnte die PZM eine wichtige Rolle bei der Übertragung von mechanischen Kräften über mechanosensitive Ionenkanäle auf physiochemische Reaktionen in der Zelle spielen (Mow, Wang et al. 1999). Außerdem konnten chondroprotektive Effekte gegen Inflammation (Chu, Zhang et al. 2017) beobachtet werden.



**Abbildung 2:** Zonen innerhalb der Extrazellulären Matrix im hyalinen Knorpel. An die Zelle grenzt direkt die perizelluläre Matrix. Die nachfolgende Territoriale Matrix geht in die Interterritoriale Matrix über. Die Interterritoriale Matrix befindet sich zwischen den Chondronen. (Quelle: Eigene Darstellung).

## 1.1.3 Kollagen Typ VI

Sehr charakteristisch für die PZM ist das Vorkommen von Kollagen Typ VI (Horikawa, Nakajima et al. 2004). Kapselähnlich um die Zelle angeordnet, erfüllt es eine Schlüsselrolle für die Interaktion der Zelle mit der EZM (Poole, Ayad et al. 1992). Zusammengesetzt aus drei verschiedenen Ketten, zählt es zu den perlschnurartigen Filamenten und findet sich in vielen Bindegeweben wieder. Den Kontakt zur Interterritorialen Matrix stellt Kollagen Typ VI sowohl durch Verbindungen zu Kollagen Typ II (Bidanset, Guidry et al. 1992, Soder, Hambach et al. 2002) als auch zu Hyaluronsäure (McDevitt, Marcelino et al. 1991) her und bildet somit eine wichtige Schnittstelle zwischen Zelloberfläche, dem Kollagennetzwerk und den Proteoglykanen. Im bei Arthrose degenerativ veränderten Knorpel wurde schon mehrfach eine Änderung der Kollagen Typ VI Konzentration beschrieben. So findet man in frühen Arthrostadien noch eine erhöhte Menge des Kollagen Typ VI (Swoboda, Pullig et al. 1999). Besonders am Übergang von der mittleren in die tiefe Zone ist die Expression von Kollagen Typ VI erhöht. In der oberflächlichen Zone hingegen ist ein Rückgang zu verzeichnen (Hambach, Neureiter et al. 1998). Insbesondere bei Clusterformationen der Chondrozyten im Rahmen von Arthrose konnte eine starke Reduktion von Kollagen Typ VI beobachtet werden (Felka, Rothdiener et al. 2016). Auch

die Lokalisation von Kollagen Typ VI ändert sich im Rahmen von Arthrose von streng perizellulär zu interterritorial (Soder, Hambach et al. 2002).

#### 1.1.4 Kollagen Typ III

Kollagen Typ III kommt in vielen Geweben wie in der Haut, in Blutgefäßen (Chung and Miller 1974), in Bändern, in der Synovialmembran (Eyre and Muir 1975) und im Knorpel vor. Eine besondere Rolle spielt Kollagen Typ III bei der Wundheilung. Hier werden sehr hohe Konzentrationen im Granulationsgewebe beobachtet (Hayakawa, Hashimoto et al. 1979). Bei genetischer Mutation des Kollagen Typ III (COL3A1) kann es zur phänotypischen Ausprägung des vaskulären Ehlers-Danlos-Syndroms kommen. Das Syndrom geht einher mit einer Schwäche in den Gefäßwänden bis hin zu Gefäßrupturen und Sinusfisteln. (Malfait, Francomano et al. 2017)

Wohingegen Kollagen Typ III in gesundem Knorpel vor allem perizellulär zu finden ist (Wotton and Duance 1994), kann bei Arthrose nicht nur eine erhöhte Konzentration, sondern auch ein vermehrtes Aufkommen interterritorial beobachtet werden (Adam and Deyl 1983, Hosseininia, Weis et al. 2016). Es wird dabei hauptsächlich von Zellen in der superfiziellen Zone (Aigner, Bertling et al. 1993) und oberen Mittelzone exprimiert (Sandell and Aigner 2001). Spannend ist auch, dass in Osteophyten eine erhöhte Expression von Kollagen Typ II und Typ III festgestellt wurde. Kollagen Typ III kann dabei sowohl perizellulär als auch interterritorial über den gesamten Osteophyten verstreut lokalisiert werden (Aigner, Dietz et al. 1995).

In den Kollagenfibrillen ist Kollagen Typ III oft eng mit Kollagen Typ II lokalisiert (Young, Lawrence et al. 2000) und quervernetzt (Wu, Weis et al. 2010). Das gemeinsame Auftreten legt eine gegenseitige Beeinflussung der Polymerisation der beiden Kollagen-Typen nahe (Young, Lawrence et al. 1995). Auch durch die Assoziation von Kollagen Typ III zu dünnen Fibrillen vermutet man eine tragende Rolle in der Neubildung von Kollagenfibrillen. Das dafür vermutlich verantwortliche Aminopropeptid von Kollagen Typ III wird nach der Sekretion von

Kollagen Typ III nur langsam abgespalten, und kann somit modulierend wirken (Fessler, Timpl et al. 1981, Fleischmajer, Timpl et al. 1981).

### 1.1.5 Perlekan

Perlekan wird auch als Heparansulfat Proteoglykan 2 bezeichnet. Es ist nicht nur eine typische Komponente der Basallamina, sondern kommt in vielen verschiedenen Geweben vor (Aviezer, Hecht et al. 1994). Perlekan hat zahlreiche modulierende Funktionen. Einige Beispiele sind die Modulation der Angiogenese, der Einsatz als vielseitiger Rezeptor für die Endozytose von Makromolekülen (Christianson and Belting 2014) und Modulation der Knorpelentwicklung bei enchondraler Ossifikation. Auch bei der Gewebedifferenzierung von Niere, Lunge, Leber und Milz spielt es schon früh eine tragende Rolle (Handler, Yurchenco et al. 1997). Bei Mutationen im HSPG2 Gen, welches Perlekan codiert, kann sich bei fehlerhafter Ausbildung phänotypisch das Schwartz-Jampel Syndrom zeigen. Dieses Syndrom beinhaltet unter anderem Myotonie und Chondrodysplasie. (Stum, Davoine et al. 2005). Fehlt Perlekan hingegen komplett, spricht man vom Silverman-Handmarker Typ, welcher mit Dyssegmentaler Dysplasie einher geht (Arikawa-Hirasawa, Wilcox et al. 2001). Die Dyssegmentale Dysplasie ist eine autosomal rezessiv vererbte und letal verlaufende Erkrankung, welche sich durch skelettalen Fehlbildungen und durch fetalen Kleinwuchs äußert. Bei Mäusen mit einer Null-Mutation für Perlekan konnte im Rahmen der Chondrodysplasie beobachtet werden, dass die Kollagenstränge verkürzt sind, das Kollagennetzwerk reduziert und die Expression von Genen für die EZM erhöht ist (Costell, Gustafsson et al. 1999)

Perlekan ist bei Jugendlichen und bei Erwachsenen im hyalinen Gelenkknorpel perizellulär lokalisiert (Wilusz, Defrate et al. 2012). Sowohl die Anzahl und die Art der GAG-Ketten (Melrose, Roughley et al. 2006), als auch die Größe des Kernproteins können variieren (Melrose, Roughley et al. 2006). Perlekan spielt eine tragende Rolle bei der Bildung von Kollagen Typ II Fibrillen (Kvist, Johnson et al. 2006) (Gustafsson, Aszodi et al. 2003). Des Weiteren bindet Perlekan den Wachstumsfaktor fibroblast growth factor 2 (FGF-2) welcher ebenfalls

perizellulär lokalisiert ist (Vincent, McLean et al. 2007). FGF-2 aktiviert die intrazelluläre Signaltransduktion über die Extracellular-signal Regulated Kinases (ERK) bei mechanischer Belastung und wirkt somit als Kraftübersetzer im Knorpel (Vincent, Hermansson et al. 2004).

Bei Arthrose konnte bereits eine erhöhte Expression und Konzentration von Perlekan, sowohl perizellulär, als auch interterritorial, in der angrenzenden Region zur Hauptdefektzone beobachtet werden (Tesche and Miosge 2004).

### 1.1.6 Biglykan

Biglykan, auch als Proteoglykan I bezeichnet, enthält zwei GAG-Ketten (Fisher, Termine et al. 1989). Biglykan kommt auch in vielen anderen Geweben wie Bindegewebe (Skelettmuskelfasern) und epithelialen Zellen (Tubulusepithel der Niere, Keratinozyten) vor und ist hauptsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert (Bianco, Fisher et al. 1990). Im hyalinen Gelenkknorpel der Femurkondylen konnte mit zunehmendem Alter erhöhte Mengen, insbesondere der nicht mit Proteoglykanen verknüpften Form von Biglykan, beobachtet werden (Roughley, White et al. 1993). Hierbei ist Biglykan im hyalinen gesunden Knorpel vorwiegend perizellulär angeordnet (Miosge, Flachsbar et al. 1994), wohingegen bei Arthrose Biglykan auch vermehrt interterritorial anzutreffen ist. Außerdem konnten Bock et al. anhand erhöhter mRNA-Konzentrationen für Biglykan und erhöhter intrazellulärer Biglykankonzentrationen zeigen, dass die Biglykansynthese bei verminderter Konzentration in der zellulären Umgebung hochreguliert ist. Die Region um die Hauptdefektzone im Knorpel hatte hierbei die höchste Syntheseaktivität (Bock, Michaeli et al. 2001). Als wichtiges Strukturprotein in der perizellulären Matrix interagiert Biglykan mit verschiedenen anderen Strukturproteinen und unterstützt den Zusammenbau von Kollagenfibrillen wie Kollagen Typ I, II und III. Dabei wird vor allem von Kollagen Typ II viel Biglykan gebunden (Douglas, Heinemann et al. 2006) (Toole and Lowther 1968). Biglykan bindet außerdem an Kollagen Typ I (Schonherr, Witsch-Prehm et al. 1995), an Kollagen Typ VI und an Mikrofibrillen, die sich aus Fibrillin-1 zusammensetzen (Reinboth, Hanssen et al. 2002). Biglykan erfüllt allerdings nicht nur Funktionen

als Strukturprotein, sondern spielt auch eine wichtige Rolle als Signalmolekül in der Signalübertragung. Dabei kann es beispielsweise an den Toll-like Rezeptor 2 und Toll-like Rezeptor 4 binden. Diese Rezeptoren können die ERK und das Signalmolekül NF- $\kappa$ B stimulieren, welche die Expression des Entzündungsmediators Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) anregen (Schaefer, Babelova et al. 2005, Schaefer and Iozzo 2008). Des Weiteren konnte von Moreno et al. für Biglykan eine wichtige hemmende Funktion im Signalweg des Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) beschrieben werden (Moreno, Munoz et al. 2005). BMP-4 reguliert unter anderem die Differenzierung von Chondrozyten und den Knorpelumbau. Bei zunehmender Arthrose zeigte sich eine Abnahme der BMP-4 Konzentration in der Synovialflüssigkeit (Bramlage, Haupl et al. 2006). In Granulationsgewebe, welches an der Wundheilung beteiligt ist, konnte eine vermehrte Expression von Biglykan durch Bindegewebszellen beobachtet werden. Die Expression wurde durch den Wachstumsfaktor Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) noch weiter erhöht (Hakkinen, Westermarck et al. 1996). Biglykan kann jedoch auch selbst an TGF- $\beta$ 1 binden (Hildebrand, Romaris et al. 1994).

### 1.1.7 Fibrillin-1

Fibrillin-1 ist ein Protein, welches sich in der EZM von vielen Bindegewebsarten befindet. Es bildet helikale Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 10nm (Sakai, Keene et al. 1986) und setzt sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Eine sich häufig wiederholende Domäne ist dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlich und bindet Kalzium. Diese Domäne ist wichtig für die Bildung und den Erhalt der Form der Mikrofibrillen (Handford, Downing et al. 1995). Bei Mutationen des Fibrillin-1-Gens kommt es zu Veränderungen in den Knochen, in den Augen und im kardiovaskulären System, welche unter dem Marfan-Syndrom zusammengefasst werden (Dietz and Pyeritz 1995). Fibrillin-1 gehört auch zum Fibrillennetzwerk im hyalinen Gelenkknorpel (Yu and Urban 2010). Hierbei findet man Fibrillin-1 in der Knorpelentwicklung und im frühen Jugendalter noch als lockere Bündel von Mikrofibrillen über den gesamten

Knorpel verteilt. Wohingegen im Erwachsenenalter Fibrillin-1 dichte Bündel mit vielen Quervernetzungen bildet und sich insbesondere perizellulär um die Knorpelzellen herum anordnet (Keene, Jordan et al. 1997). Als Strukturprotein können die fribrillinhaltigen Mikrofibrillen mit andern Strukturproteinen wie Biglykan (Reinboth, Hanssen et al. 2002) und Perlekan (Tiedemann, Sasaki et al. 2005) interagieren. Auch für die Interaktion zwischen der Zelle und der EZM spielen die Mikrofibrillen eine zentrale Schlüsselrolle (Zeyer and Reinhardt 2015). Sie können direkt mit Oberflächenrezeptoren von Zellen wie den Integrinen (Pfaff, Reinhardt et al. 1996) interagieren und so beispielsweise die Proteinsynthese von matrixabbauenden Enzymen wie Matrixmetalloproteinasen (Booms, Pregla et al. 2005) steuern. Außerdem speichern Mikrofibrillen bestimmte Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 sowie einige BMPs um deren Verfügbarkeit und Aktivität zu regulieren (Sengle, Ono et al. 2011).

## 1.2 Arthrose

### 1.2.1 Erkrankung

Arthrose als weltweit häufigste degenerative Gelenkerkrankung (WHO 2003) geht auch in Deutschland mit einer Gesamtprävalenz aller über 18-jährigen Personen von 17,9 % einher (Fuchs, Kuhnert et al. 2017). Dabei fällt vor allem eine altersabhängige Zunahme auf. In der Gruppe der über 65-Jährigen leiden 48,1 % der Frauen und 31,2 % der Männer an Arthrose (Fuchs, Kuhnert et al. 2017). Die Entstehung ist multifaktoriell, es konnten jedoch vier Hauptrisikofaktoren identifiziert werden: zunehmendes Alter, familiäre Vorbelastung, Übergewicht und jede Form von Gelenkverletzungen (WHO 2003).

Klinisch geht die Arthrose mit vorwiegend belastungsabhängigen Schmerzen und Funktionseinschränkungen des Gelenks einher, die den Patienten in seiner Lebensqualität sehr einschränken können. Sie hat einen chronisch progressiven Verlauf mit einem fortschreitenden Gelenkumbau, bei dem die Symptome meist erst in einem späten Stadium auftreten. Die Diagnose Arthrose wird ausschließlich nach klinischen und radiologischen Kriterien gestellt. Radiologisch

kann eine Gelenkspaltverschmälerung, eine subchondrale Sklerosierung, die Bildung von Osteophyten und Geröllzysten beobachtet werden. Die am häufigsten genutzte radiologische Klassifikation zur Einteilung der Gelenkschädigung ist die Klassifikation nach Kellgren und Lawrence (Kellgren and Lawrence 1957). Sie unterteilt die Gelenkschädigung in vier Stadien. Stadium 1 zeichnet sich nur durch geringe subchondrale Sklerosierung aus, wohingegen im Stadium 4 eine ausgeprägte Gelenkspaltverschmälerung bis hin zur vollständigen Destruktion und Deformierung oder Nekrose der Gelenkpartner zu finden ist (Stöve 2018).

Die Krankheit wirkt sich zwar auf das ganze Gelenk, eingeschlossen der Gelenkkapsel, Bänder und Gelenkflüssigkeit aus, betrifft aber primär den hyalinen Gelenkknorpel, der im Rahmen der Erkrankung sukzessive zugrunde geht.

### 1.2.2 Pathogenese

Trotz umfangreichen Forschungen zu den molekularen Mechanismen, ist die genaue Pathogenese der Arthrose noch nicht vollständig geklärt. Sichtbar allerdings ist ein starker Verlust des hyalinen Gelenkknorpels. Die Knorpelmatrix untersteht physiologischerweise einem ständigen aktiven Auf- und Abbau. Die Zellen synthetisieren sowohl neue Strukturproteinen für den Matrixaufbau, als auch Enzymen, die für den Abbau der Strukturproteine zuständig sind. Durch dieses fließende Gleichgewicht von anabolen und katabolen Stoffwechselfvorgängen, bleibt der Knorpel anpassungs- und regenerationsfähig. Bei Arthrose wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten der katabolen Situation gestört. Es kommt zu einer Entzündungskaskade in Folge welcher sich die Knorpelmatrix in Aufbau, Menge und Zusammensetzung ändert und der Knorpel sukzessive verschwindet.

Man geht davon aus, dass die Knorpeldegeneration bei Arthrose in zwei Phasen abläuft. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe Biosynthese durch die Chondrozyten, als Versuch, die Matrix zu reparieren. In der zweiten Phase kommt es hingegen zum beschleunigten Abbau durch eine erhöhte Synthese der matrixabbauenden Enzyme (Woessner and Gunja-Smith 1991).

Es konnten verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 (Shen, Li et al. 2014) identifiziert werden, die sich in ihrem Vorkommen in arthrotisch verändertem Knorpel im Vergleich zu gesundem Knorpel unterscheiden. Des Weiteren zeigte sich auch eine veränderte Konzentration an inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) und TNF $\alpha$  (Wojdasiewicz, Poniatowski et al. 2014). Es liegt nahe, dass die Veränderungen der Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokine für die pathologische Chondrozytenaktivierung mitverantwortlich sind.

So konnte eine erhöhte Aktivität und erhöhtes Vorkommen von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMP), Enzyme die für den Abbau von Strukturproteinen zuständig sind, wie MMP-3 und MMP-8, bei Knorpeldefekten beschrieben werden. Interessanterweise führte eine erhöhte IL-1 $\beta$  Konzentrationen ebenfalls zu einer Erhöhung der MMP (Chubinskaya, Kuettner et al. 1999).

Die Zerstörung der Knorpelmatrix zeigt sich an einer Denaturierung der Kollagenfasern bis in die tiefen Zonen (Hollander, Pidoux et al. 1995). Insbesondere fällt eine Abnahme der Kollagen Typ II Fasern (Hollander, Heathfield et al. 1994, Stoop, Buma et al. 2001) auf, trotz erhöhter Synthese von Kollagenen insbesondere in den späten Stadien (Lorenzo, Bayliss et al. 2004). Des Weiteren geht die Matrixdegeneration mit einer Abnahme und Veränderung der Proteoglykane wie Aggrecan (Roughley, White et al. 1993) und Decorin (Poole, Rosenberg et al. 1996) einher.

Zugleich sind auch die strukturbildenden Proteine der perizellulären Matrix wie Kollagen Typ VI (Hambach, Neureiter et al. 1998), Kollagen Typ III (Hosseini, Weis et al. 2016), Perlekan (Tesche and Miosge 2004) und Biglykan (Poole, Rosenberg et al. 1996) mitbetroffen und nehmen ab. Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass die Steifigkeit der PZM mit zunehmender Degeneration abnimmt (Alexopoulos, Williams et al. 2005, Danalache, Kleinert et al. 2019). Folglich liegt es nahe, dass auch die PZM zerstört wird (Felka, Rothdiener et al. 2016) und es dadurch zu einem Funktionsverlust in der perizellulären Mikroumgebung kommt. Ebenso ändern sich auch die Chondrozyten

in ihrem Aussehen und werden hypertroph. Es kommt zu Änderungen der zellulären Organisation und einer erhöhten Zelldichte.

Doch auch der Knochen reagiert durch einen abnormen Knochenstoffwechsel auf die Erkrankung. In der direkt an den Knorpel angrenzenden Knochenzone kommt es zu Mikrofrakturen und einem Knochenödem (Bone Marrow Läsionen). Es werden Entzündungskaskaden angestoßen, und es sprießen vermehrt Blutgefäße und Nerven in den geschädigten Bereich ein, welche Schmerzsignale weiter leiten können (Donell 2019). Dabei bilden sich weniger, dafür aber dickere Trabekel mit einem veränderten Mineralgehalt (Lespessailles and Jennane 2012), welche zu subchondralen Sklerosierungen führen. Peripher kommt es zu Knochenneubildung in Form von Osteophyten. Auch sind subchondrale Zysten (Kothari, Guermazi et al. 2010), als Folge fokaler Resorptionen, sichtbar (Poole 1999). Der erhöhte Knochenstoffwechsel konnte bereits mittels Szintigraphie sichtbar gemacht werden (Dieppe, Cushnaghan et al. 1993).

Begleitend dazu ist die Gelenkinnenhaut, die Synovialis, mit betroffen. Durch Zerstörung der Knorpelmatrix lösen sich Knorpelbestandteile ab. Der Knorpelabrieb führt zu einer reaktiven Synovialitis. Doch nicht nur durch den Knorpelabrieb wird die Synovialis gereizt, sondern auch durch spezifische Stimulation der Rezeptoren der synovialen Fibroblasten und Makrophagen. Die Synovialis verdickt. Es kommt zur Immunantwort durch Ansammlung von Makrophagen zu Zellhaufen und Bildung von mehrkernigen Riesenzellen (Prieto-Potin, Largo et al. 2015). Durch die Immunantwort werden pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet und es entwickelt eine sich selbst verstärkende Kaskade (Stöve 2018).

### 1.2.3 Bisherige Therapieansätze

Derzeit gibt es noch keine wirksame Therapie der Arthrose, die das langfristige Fortschreiten der Krankheit verhindern kann. Die konservativen Therapieversuche sind primär symptomorientiert. Gewichtsreduktion, Anpassung der beruflichen und sportlichen Aktivität, antiphlogistische medikamentöse Therapie,

Krafttraining und sensomotorisches Aufbautraining, intraartikuläre Applikation von Kortikosteroiden, Hyaluronsäurepräparaten, und die symptomatische analgetische medikamentöse Therapie werden praktiziert. Knorpelreparative Therapieverfahren wie Mikrofrakturierung, die osteochondrale Transplantation oder knorpelregenerative Therapieverfahren wie die autologe matrixinduzierte Chondrogenese (AMIC), die autologe Chondrozytentransplantation (ACT), und der Allograft Ersatz sind vorwiegend bei akuten, kleinen und begrenzten Knorpeldefekten mit gesundem darunterliegendem Knochen erfolgversprechend (Steinwachs, Wopperer et al. 2014). Diese Methoden sind somit für die Arthrose als Krankheit, die im fortgeschrittenen Stadium schon große Teile des Gelenkknorpels und das ganze Gelenk betrifft, ungeeignet. Im Endstadium hilft als letzte Option meist nur noch eine Gelenkersatztherapie mittels Endoprothese. Die 10-Jahres Standzeiten der Kniegelenksprothese sind zwar mit 92-96 % sehr gut, je nach Lebenserwartung des Patienten allerdings nicht ausreichend und ein Prothesenwechsel ist nötig. Beim Auftreten von Komplikationen handelt es sich in den ersten fünf Jahren, anteilig an den Gesamtkomplikationen, am häufigsten um Infektionen (27 %) und Instabilität (24 %). Als Spätkomplikation tritt die aseptische Lockerung mit dem höchsten Anteil von 20-41 % am häufigsten auf (Stöve 2018). Das individuelle Risiko für die verschiedenen Komplikationen ist abhängig von Alter, Begleiterkrankungen wie Diabetes und Körpergewicht. Schwere Komplikationen nach Implantation sind jedoch mit 1,5-3,9 % intrahospital selten (Fath 2018).

#### 1.2.4 Zelluläre Organisation

Abhängig von der mechanischen Belastung finden sich in verschiedenen Gelenken unterschiedliche Anordnungen der Chondrozyten (Rolauffs, Williams et al. 2008). Das in der Femurkondyle physiologisch am häufigsten vorkommende Muster sind Einzel- und Doppelstränge (Schumacher, Su et al. 2002). Die Orientierung der Stränge folgt dem Verlaufsmuster der Kollagenfasern. Somit sind sie nahe der Knorpel-Knochen-Grenze senkrecht, flachen im Verlauf ab und werden parallel zur Oberfläche (Rolauffs, Williams et al. 2010).

Mit fortschreitender Arthrose ändert sich die zelluläre Organisation von einzelnen Strängen (SS = Single Strings) zuerst in Doppelstränge (DS = Double Strings) (Rolauffs, Williams et al. 2010), anschließend zu kleinen (SC = Small Clusters) und schlussendlich zu großen Zellhaufen (BC = Big Clusters) (Hellio Le Graverand, Sciore et al. 2001, Felka, Rothdiener et al. 2016). Die zelluläre Umorganisation korreliert hierbei mit der Schwere der Gewebeschädigung und kann somit als bildbasierter Biomarker auf zellulärer Ebene für die lokale Gewebedegeneration dienen (Rolauffs, Rothdiener et al. 2011, Aicher and Rolauffs 2014).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Veränderungen in der perizellulären Mikroumgebung der Knorpelzellen im hyalinen Gelenkknorpel bei fortschreitender lokaler Degeneration zu untersuchen. Dabei wurde sowohl auf die Zusammensetzung als auch auf die Integrität der perizellulären Matrix besonderes Augenmerk gelegt. Die Hypothese war, dass die Integrität der PZM im Verlauf der zellulären Umorganisation stark abnimmt und sich die Zusammensetzung ändert. Hierzu wurde Knorpel von menschlichen Femurcondylen bei diagnostizierter Gonarthrose untersucht. Fünf Hauptkomponenten der perizellulären Matrix (Kollagen VI, Kollagen III, Perlekan, Biglykan und Fibrillin-1) wurden mittels Immunhistochemie angefärbt. Die untersuchten Schnitte wurden senkrecht zur Knorpeloberfläche angefertigt, um ein möglichst großes zusammenhängendes Stück des Knorpels inklusive angrenzender Knorpel-Knochen-Grenze beurteilen zu können. Durch die Perspektive gelang es außerdem, die Verteilung der Muster und der perizellulären Matrix in Bezug zu den einzelnen Zonen zu setzen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Instrumente

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte und Instrumente

Gerät	Hersteller
Einkanal Pipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
HMC Dampfsterilisator HV 50	HMC Europe GmbH, Tüßlingen, Deutschland
Hohlmeißelzange (Bone Rongeur) FO521R	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Kryotom Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mik- roskopie und Histologie, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank (4 °C) 30 GT/N1201V	Haier, Qingdao, China
Laserscanning Mikroskop 510 Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Magnetrührer: Ikamag® RCT Kat.-Nr. 0481924	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlin- gen, Deutschland
Mikro-Pulverspatel 150mm Kat.-Nr. 231-1412	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter Five easy FE 20	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pinzette groß gerade stumpf 145mm Kat.-Nr. 232-0082	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pinzette klein Forceps, straight gerade fein 10.5mm Kat.-Nr. 232-0094	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotilabo Einmal-Wägeschalen Kat.-Nr. 1884.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schüttler Type AK82 Kat.-Nr. 102118	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Schüttler REAXtop	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage (0,5-4100 g) Kat.-Nr. 6J4100-2M	Kern, Balingen, Deutschland

Gerät	Hersteller
Waage (10 mg – 220g) ABJ220_4M	Kern, Balingen, Deutschland
Wägebapier MN 226	Macherey - Nagel, Deutschland

## 2.1.2 Antikörper

**Tabelle 2:** Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Kennzeichnung	Beschreibung	Herkunft	Hersteller
Anti-BGN antibody	HPA003157 SIG-MA	Monoklonaler IgG Antikörper (Hase) gegen Biglycan	Hase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Collagen III antibody	ab7778	Monoklonaler IgG Antikörper (Hase) gegen Kollagen Typ III	Hase	Abcam, Cambridge, England
Anti-Collagen VI antibody	[ERP17072] ab182744	Monoklonaler IgG Antikörper (Hase) gegen Kollagen Typ VI	Hase	Abcam, Cambridge, England
Fibrillin-1 Monoclonal antibody (11C1.3)	MA5-12770	Monoklonaler IgG Antikörper (Maus) gegen Fibrillin-1	Maus	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Perlecan (E-6)	sc-377219	Monoklonaler IgG Antikörper (Maus) gegen Perlekan	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

**Tabelle 3:** Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Kennzeichnung	Beschreibung	Konjugation	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594	Ab150116	Polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG H&L	Alexa594	Abcam, Cambridge, England
Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555	A-21429	Polyklonaler Antikörper gegen Hase IgG H&L	Alexa555	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

### 2.1.3 Zellkernfärbung

**Tabelle 4:** Verwendete Zellkernfärbung

Farbstoff	Kennzeichnung	Hersteller
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)	Kat.-Nr. D1306	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
SYTOX Green Nucleic Acid Stain	Ref.: S7020	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

### 2.1.4 Reagenzien

**Tabelle 5:** Reagenzienliste

Reagenz	Kennzeichnung	Hersteller
Amphotericin B	Kat.-Nr. P11-001	PAA Laboratories GmbH, Pasching Austria
Bovine serum albumin (BSA) (Albumin Fraktion V, pH 7,0)	Kat.-Nr. A1391,0050	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Descosept AF (Oberflächendesinfektion)	Kat.-Nr. 00-311-010	Dr. Schuhmacher, Malsfeld, Deutschland
DMEM, Cell culture medium	Ref.-Nr. 41966-029	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
DPBS (Dulbeccos's PBS, pH 7,2)	Kat.-Nr. 14190-094	Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	E-6758	Sigma Chemical Co. St. Louis, USA
Fluorescent Mounting medium	Ref.-Nr. S3023	Dako North America Inc., California, USA
Formaldehyd methanolfrei 30 %	Art.-Nr. 4235.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid Plätzchen rein	Kat.-Nr. 106482	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 100x	Kat.-Nr. P4333	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Ref.-Nr. 4583	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Triton X-100	Kat.-Nr. T9284	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 2.1.5 Enzyme

**Tabelle 6:** verwendete Enzyme

Enzym	Artikelnummer	Hersteller
Collagenase from Clostridium histolyticum Type XI	C7657	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hyaluronidase from bovine testes Type I-S CAS-Nr. 37326-33-3	H3506	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 7:** Verbrauchsmaterialien

Material	Kennzeichnung	Hersteller
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® plus	Kat.-Nr. 03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser mikroskopisch	Kat.-Nr. 01-2460/1	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Dosen Weithals mit Schraubverschluss	Kat.-Nr. 215-2522	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einmalskappell Feather Nr.21	Ref.-Nr. 200130021	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Eppendorf Gefäße 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml	0030124537 0030120086 0030120094	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotomklinge – S35	Ref.-Nr. 207500000	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Nitril Handschuhe (Reha soft Nitrile)	Kat.-Nr.942206	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Petrischale, 145x20 mm	Kat.-Nr. 639161	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl 100 µl 200 µl 1250 µl	Kat.-Nr.: 692150 692066 692069 790058	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material	Kennzeichnung	Hersteller
Polypropylen Röhrchen CELLSTAR® 15 ml 50 ml	Kat.-Nr.: 188261 210261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutsch- land
Schraubverschlüsse für Weit- hals-Dosen	Kat.-Nr. 215-3923	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml 10 ml 25 ml	Kat.-Nr.: 357543 357551 357525	Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA

## 2.1.7 Computersoftware

**Tabelle 8:** Verwendete Software

Software	Hersteller
Axio Vision Rel. 4.8 Ink. Modul MosaiX	Carl Zeiss Microscopy GmbH
ImageJ Version 1.51t	Wayne Rasband (NIH)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft Word	Microsoft Corporation
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation
SPSS Statistics 25	IBM Deutschland GmbH
EndNote X8	Clarivate Analytics, Alfasoft GmbH

## 2.1.8 Lösungen

**Tabelle 9:** Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
Blockier-Lösung	5 % (m/V) BSA und 0,3 % (V/V) Triton X100 gelöst in DPBS
BSA-Lösung	2,5 % (m/V) BSA gelöst in DPBS
EDTA-Lösung (20 %), pH 7,4	20 % (m/V) EDTA und 50 % (m/V) NaOH gelöst in H <sub>2</sub> O
Enzym-Lösung Hyaluronidase	1 mg/ml gelöst in DPBS
Enzym-Lösung Kollagenase	2 mg/ml gelöst in DPBS
Transportlösung	2 % (V/V) Penicillin-Streptomycin und 1,2 % (V/V) Amphotericin B gelöst in Nährmedium (DMEM)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Probengewinnung von humanem hyalinem Knorpel

Verwendet wurde hyaliner Gelenkknorpel der Femurkondylen bei diagnostizierter Gonarthrose ohne vorherig erinnertes Trauma oder andere systemische Begleiterkrankungen wie Rheuma. Insgesamt wurde der Knorpel von sechs Patienten mit einem Alter zwischen 50 und 85 Jahren untersucht. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission Tübingen lag vor (Aktenzeichen: 674/2016BO2). Der Knorpel mit angrenzendem Knochen wurde bei der operativen Implantation einer Kniegelenkstotalendoprothese (Knie-TEP) gewonnen. Die Resektate wurden im Transportmedium bei 4°C bis zur zügigen Weiterverarbeitung gelagert. Um die Chondrozyten bis zur Verarbeitung vital zu erhalten und mögliche Besiedelungen durch Bakterien oder Pilze zu vermindern, wurde die Transportlösung aus 2 % (V/V) Penicillin-Streptomycin, 1,2 % (V/V) Amphotericin B und Nährmedium (DMEM) hergestellt. Die Proben stammten aus der chirurgischen Fachklinik Winghofer Medicum aus Rottenburg a.N. und aus der Universitätsklinik Tübingen für Orthopädie.

## 2.2.2 Aufarbeitung des Probenmaterials

Zuerst wurde jedes Knorpelstück genau unter der Sterilbank begutachtet und streng nach makroskopischer Beschaffenheit und Größe sortiert. Folgende Kriterien wurden dabei berücksichtigt:

- Ursprung: Femurkondyle
- Größe: mindestens 3 cm Länge und 1 cm Breite
- Beschaffenheit: es musste eine sichtbare Schicht hyalinen Knorpels vorhanden sein

Anschließend wurden mit einer Luer-Knochenzange die Seitenränder entfernt, damit ein 0,5-1 cm x 2-4 cm großes Rechteck entstand. Der darunter liegende Knochen wurde vorsichtig bis kurz unter die Knorpel-Knochen-Grenze mit der Luer-Knochenzange abgetragen. Nach jedem nachfolgenden Arbeitsschritt folgten je drei Waschvorgänge mit DPBS für fünf Minuten. Um die Probe zu stabilisieren und die chemische Autolyse zu verhindern, folgte eine chemische Fixierung mit Formaldehyd (4 % v/v) für drei Stunden bei Raumtemperatur.

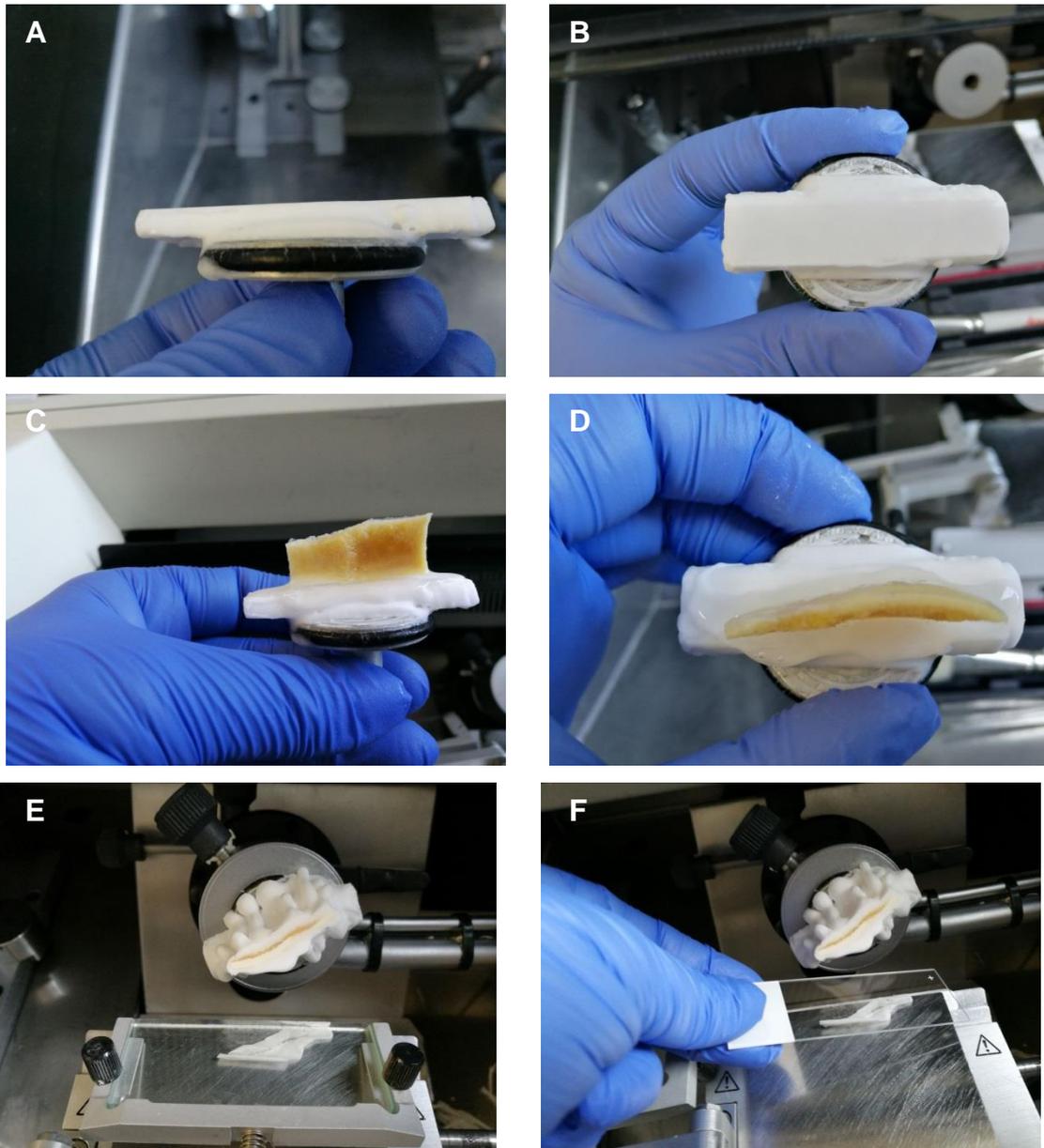
Damit für die Histologie Schnitte angefertigt werden konnten und der verbleibende Knochenrest besser zu entfernen war, musste eine mehrtägige Dekalzifizierung durchgeführt werden. Alle Stücke lagerten, von direktem Sonnenlicht geschützt, mit 20 % (v/v) EDTA-PBS-Lösung gut bedeckt, bei 37 °C, im Schüttler. Die EDTA-PBS-Lösung wurde alle 2-3 Tage komplett getauscht. Der Fortschritt wurde mechanisch mit einer Kanüle, welche in den Knochen eingestochen wurde, getestet. Insgesamt dauerte das Entkalken zwischen zwei und drei Wochen, abhängig von der Dicke der Knochenschicht.

## 2.2.3 Anfertigung der Kryoschnitte

Um eine bessere Qualität der Schnitte zu erreichen und eine genaue Positionierung der Knorpelstücke sicher zu stellen, wurde das gesamte Knorpelstück in Tissue Tek (ein Einbettmedium für Kryoschnitte, welches bei Raumtemperatur zähflüssig ist und bei -21 °C im Kryotom aushärtet) eingebettet. Als Grundlage für das Präparat diente ein bereits ausgehärtetes, 2x4 cm großes Tissue Tek

## Material und Methoden

Stück, welches auf dem Metallzylinder des Kryotoms mit Hilfe von sich noch aushärtendem Tissue Tek befestigt wurde (**Abbildung 3**). Darauf wurde das Präparat mit der Oberfläche senkrecht zur Grundlage aufgebracht, mit frischem Tissue Tek komplett eingedeckt und bei -21 °C bis zur Aushärtung des Tissue Tek gelagert. Der Metallzylinder wurde dann im Kryotom in einer für ihn bestimmten Vorrichtung fixiert. Durch manuelles Drehen einer Kurbel seitlich des Kryotoms bewegte sich der Metallzylinder mit dem Präparat auf die Mikrotomklinge zu. Um sowohl die PZM später gut darstellen zu können, als auch ein Eindringen des Antikörpers zu gewährleisten, hatte sich die Schnittdicke von 35 µm in den Vorversuchen bewährt. Mit jeder Umdrehung sammelte sich ein Schnitt unter einer Glasscheibe. Die Glasscheibe konnte zur Seite geklappt und der Schnitt mit einem Objektträger aufgesammelt werden. Um die Schnitte anschließend von den Objektträgern zu lösen und ein Austrocknen zu vermeiden, wurden sie in mit DPBS gefüllten Petrischalen zwischengelagert. Das aufgetaute Tissue Tek vermischte sich mit der Lösung. Die Schnitte konnten dadurch mit einem Spatel vorsichtig abgelöst, und in Eppendorfgefäßen weiterverarbeitet werden.



**Abbildung 3:** Zuschneiden am Kryotom. In **(A-B)** sieht man das auf dem Metallzylinder befestigte, bereits ausgehärtete, 2x4 cm große Tissue Tek Stück. Es dient als Grundlage für das Präparat. **(C-D)** Das zu schneidende Knorpelstück wurde mit der Knorpeloberfläche senkrecht zur Grundlage aufgebracht und anschließend mit Tissue Tek eingedeckt. **(E)** Der 35 µm breite Schnitt des Präparats sammelt sich unter der Glasscheibe. **(F)** Nach dem die Glasscheibe beiseite geklappt wurde, konnte der Schnitt mit Hilfe eines Objektträgers aufgesammelt werden.

#### 2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die Gewebeporosität zu steigern und die Antigene zu demaskieren, wurden die Schnitte je nach Zielepitop mit Hyaluronidase (1 mg/ml) oder Kollagenase (2 mg/ml) enzymatisch zersetzt, bei 37 °C für 60 min. Danach folgten

## Material und Methoden

drei Waschvorgänge mit DPBS für je fünf Minuten bei 20 °C. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern und eine unerwünschte Hintergrundmarkierung zu minimieren, wurden die Proben mit Rinderserumalbumin (5 % w/v BSA) und einem Detergenz (0,3 % v/v Triton X100), gelöst in DPBS, für eine Stunde bei 20 °C inkubiert. Es folgten erneut drei Waschvorgänge mit DPBS für fünf Minuten bei 20 °C. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das gesuchte Antigen. Es wurden Primärantikörper gegen Kollagen Typ VI, Kollagen Typ III, Perlekan, Biglykan und Fibrillin-1 verwendet. Die Primärantikörper wurden mit der BSA-Lösung (2,5 %) im Verhältnis 1:100 verdünnt. Um eine Negativkontrolle zu erhalten, wurde in diesem Schritt zusätzlich eine Probe anstelle des Primärantikörpers mit nur 2,5 % BSA-Lösung inkubiert. Der Primärantikörper hat über Nacht bei 4 °C gebunden. Es folgten drei Waschvorgänge für je fünf Minuten bei 20 °C. Der Sekundärantikörper band an die leichten und schweren Ketten des Primärantikörper. Damit später unter dem Mikroskop eine Detektion erfolgen konnte, waren an die Sekundärantikörper Fluorochrome (fluoreszierende Markersubstanzen) gekoppelt. Durch die Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome wurden alle weiteren Arbeitsschritte unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Der Sekundärantikörper wurde in DPBS im Verhältnis 1:100 verdünnt, DAPI für die Zellkernfärbung im Verhältnis 1:1000. Die Lösung konnte für zwei Stunden bei 20 °C sowohl auf die Proben, welche zuvor mit dem Primärantikörper inkubiert worden waren, als auch auf die Negativkontrolle einwirken. Es folgten erneut drei Waschvorgänge mit DPBS.

Zum Aufbringen der Schnitte auf einen Objektträger wurde der Inhalt der Eppendorfgefäße in eine mit DPBS gefüllte Petrischale gegeben. In der Flüssigkeit ließen sich die Schnitte mit Hilfe einer Pinzette entfalten. Die kurze Kante des Objektträgers tauchte in das Wasser und mit der Pinzette konnten so die entfaltenen Schnitte auf den Objektträger gezogen werden. Direkt im Anschluss wurden die Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium eingedeckt und ein Deckgläschen vorsichtig aufgebracht. Bis zur Aufnahme der mikroskopischen Bilder lagerten die Schnitte lichtgeschützt bei 4 °C.

**Tabelle 10:** Zuordnung Antikörper

Struktur	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Kollagen Typ VI	Anti-Collagen VI antibody	Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555
Kollagen Typ III	Anti-Collagen III antibody	Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555
Perlekan	Perlecan (E-6)	Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594
Biglykan	Anti-BGN antibody	Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555
Fibrillin-1	Fibrillin 1 Monoclonal antibody (11C1.3)	Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594

### 2.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Um möglichst vergleichbare Bilder zu erhalten und die maximale Fluoreszenz der Sekundärantikörper auszunutzen, erfolgten die mikroskopischen Aufnahmen in den folgenden 30 Stunden. Die Bilder wurden mit dem Laserscanning Mikroskop 510 von Carl Zeiss aufgenommen.

Für die Beurteilung der PZM in Bezug zur Zelle musste sowohl die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers als auch der Zellkernfärbung in einem Bild dargestellt werden. Dabei wurden die Bilder mit dem Sekundärantikörper „Alexa 555“ mit monochromatischem Licht aus einer Quecksilberhochdruckdampflampe angeregt. Auch das DAPI wurde hier mit monochromatischem Licht aus einer Quecksilberhochdruckdampflampe angeregt. Der Sekundärantikörper „Alexa 594“ wurde für die Aufnahmen mit einer LED Lampe mit 590 nm angeregt, das DAPI mit einer LED Lampe mit 350 nm. Für die Mehrkanalaufnahmen wurde das Präparat zuerst mit der einen, dann mit der zweiten Wellenlänge, für zuvor festgelegte Zeit, beleuchtet und die zwei entstandenen Bilder zu einem Bild verrechnet.

Um einen möglichst großen Überblick zu erhalten und die verschiedenen Zonen im Kontext zu ihrer Umgebung und den Bezug zueinander darzustellen, wurde vom gesamten Präparat eine Mosaikaufnahme angefertigt. Dabei wurden mit dem Modul MosaiX im Programm AxioVision Rel. 4.8 von Zeiss viele einzelne Aufnahmen gemacht und anschließend zu einem großen Gesamtbild zusam-

mengefügt. Zuerst wurde ein Raster für verschiedene Positionen eingestellt, in dem jedes Kästchen für eine Bildaufnahme stand. Damit das Gesamtbild den Schnitt möglichst stufenlos darstellen konnte, wurde eine Überschneidung der Kästchen von 15 % gewählt. Anschließend wurden zuerst alle Stellen des Schnittes manuell scharf gestellt und diese Einstellungen den Kästchen zugeordnet gespeichert. Nach Wahl einer für alle Bereiche möglichst optimalen Belichtungszeit, wurden mit einem automatischen und motorisierten Tisch die zuvor gespeicherten Positionen abgefahren und die Aufnahmen gemacht.

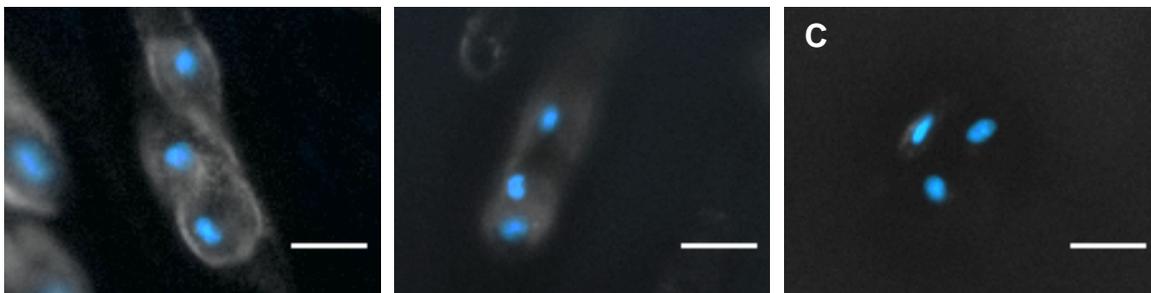
### 2.2.6 Auswertung der Bilder

Im Programm AxioVision Rel.4.8 wurden Felder ähnlicher Größe definiert, um Regionen mit dem gewünschten Zellmuster auszuwerten. Für jedes Muster wurde nach Möglichkeit pro Patient zwei Felder ausgewählt, die das Muster möglichst gut abbildeten. Für die visuelle Beurteilung der Bilder wurde anschließend, um den Kontrast zum schwarzen Hintergrund zu verbessern, die Farben rot zu weiß und dunkelblau zu hellblau geändert. Die Beurteilung erfolgte über AxioVision Rel.4.8. Ein kontrastoptimiertes Bild wurde zur Dokumentation ausgeschnitten, exportiert und gespeichert. Im Programm ImageJ konnte nach Kalibrierung des Maßstabes die exakte Fläche der einzelnen Felder bestimmt werden. Die Auszählung der Zellen erfolgte manuell mit Unterstützung durch das Plug-in cell counter in ImageJ. Für jede Zelle wurde die sie umgebende Färbung nach Aussehen und Vollständigkeit beurteilt, um die Zellen daraufhin den verschiedenen Kategorien zuzuordnen, wie in **Tabelle 11** und **Abbildung 4** dargestellt.

Die Beurteilung der Färbung erfolgte nach folgendem Schema:

**Tabelle 11:** Kategorien zur Einteilung der PZM

Beurteilungsstufen	Kriterien
Kategorie 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- rund</li> <li>- scharf begrenzt</li> <li>- einer Zelle zuzuordnen</li> <li>- perizellulär</li> </ul>
Kategorie 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diffus</li> <li>- unscharf</li> <li>- mehrere Zellen umfassend</li> </ul>
Kategorie 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kaum bis nicht sichtbar</li> <li>- rudimentär</li> <li>- Artefakte</li> </ul>

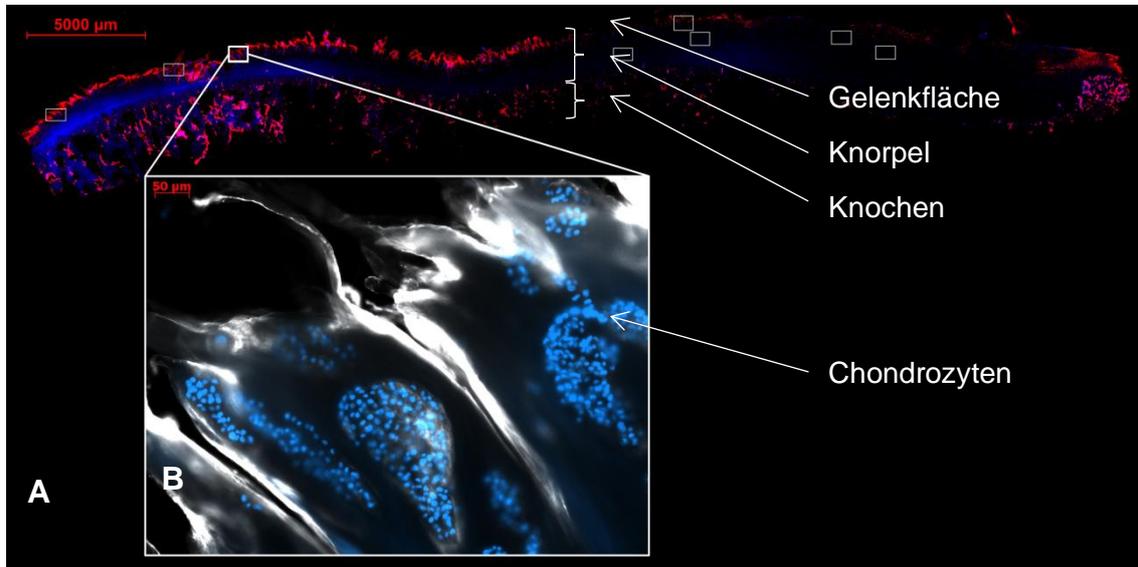


**Abbildung 4:** Kategorien für die Zellzuordnung. Die Fluoreszenzaufnahmen sind markiert mit DAPI (blau, Zellkern) und Antikörper gegen Kollagen Typ VI (weiß, perizelluläre Matrix). **(A)** zeigt Zellen der Kategorie 1, **(B)** zeigt Zellen der Kategorie 2 und **(C)** zeigt Zellen der Kategorie 3. Maßstabsbalken: 20 µm. Quelle: Eigene Darstellung

Daraus ließ sich für jede Kategorie eine Zellzahl ermitteln. Diese wurde anschließend durch die dazugehörige Fläche dividiert, um einen vergleichbaren Wert, die Zelldichte, zu erhalten. Somit konnte jedem Muster eine Zelldichte für die unterschiedlichen Kategorien zugeordnet werden, und eine semiquantitative Auswertung konnte erfolgen.

Die qualitative Auswertung erfolgte sowohl direkt unter dem Mikroskop, als auch bei Übersicht der Mosaikbilder. Unter Einbezug von Aussehen und Vollständigkeit konnte somit eine umfassendere und individuellere Beurteilung, sowohl der einzelnen Zelle, als auch der Umgebung gemacht werden. Die

verschiedenen Helligkeiten und Zellebenen konnten bei Betrachtung unter dem Mikroskop am besten beurteilt werden. Dabei wurden sowohl das genauere Aussehen der perizellulären und intrazellulären Färbung, als auch die Veränderungen in der Extrazellulärmatrix und die Lage der Zellen in den verschiedenen Knorpelzonen mit einbezogen.



**Abbildung 5:** Übersicht Querschnittaufnahme mit Auswahl der Zonen zur statistischen Auswertung. **(A)** Übersichtsaufnahme des Schnittes, Fluoreszenzfärbung des Zellkerns (dunkelblau) und Kollagen Typ III (rot), Maßstabsbalken: 5000 µm; **(B)** Ausschnitt, Fluoreszenzfärbung des Zellkerns (hellblau) und Kollagen Typ III (weiß), Maßstabsbalken: 50 µm.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Pro Patient wurde für jede Färbung und für jedes Muster je zwei Bereiche ausgezählt und als statistisch abhängig gewertet. Aus beiden Bereichen wurde ein Mittelwert für die Zelldichte gebildet. Die Proben der verschiedenen Patienten wurden als statistisch unabhängig gewertet. Insgesamt konnte von sechs Patienten Probenmaterial gewonnen und ausgewertet werden. Allerdings lagen nicht bei jedem Schnitt alle Muster vor. Im Falle von Normalverteilung erfolgte eine parametrische, bei keiner Normalverteilung eine nicht-parametrische Auswertung. Zur semiquantitativen Auswertung des Vorhandenseins der PZM, und

um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Mustern vornehmen zu können, wurden die Mittelwerte der verschiedenen Zelldichten (ZD) für die drei Kategorien jeweils gewichtet. Dabei erhielt die Kategorie 1 (ZD1), als bester Repräsentant der perizellulären Matrix, eine Gewichtung von 0,75. Kategorie 2 (ZD2) wurde mit 0,5 und Kategorie 3 (ZD3) mit 0,25 gewichtet.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$ZD1 \times \frac{3}{4} + ZD2 \times \frac{2}{4} + ZD3 \times \frac{1}{4} \quad (1)$$

Der so entstandene virtuelle Wert für die perizelluläre Matrix bezieht sich auf die Fläche (in mm<sup>2</sup>) und wird im Folgenden als PZM/Fläche abgekürzt.

Da es bei den unterschiedlichen Mustern auch zu einer Zunahme der Zelldichte kommt, wurde außerdem eine zweite Formel verwendet, um das Ausmaß der Veränderung auf die einzelne Zelle besser zu verdeutlichen:

$$\frac{ZD1 \times \frac{3}{4} + ZD2 \times \frac{2}{4} + ZD3 \times \frac{1}{4}}{ZD1 + ZD2 + ZD3} \quad (2)$$

Nach der Division durch die Summe der einzelnen Zelldichten, konnte so ein virtueller Wert für die perizelluläre Matrix pro Zelle ermittelt werden und wird im Folgenden als PZM/Zelle abgekürzt. Eine ähnliche Gewichtung wurde bereits von Hofmann, Steidle et al. verwendet (Hofmann, Steidle et al. 2018).

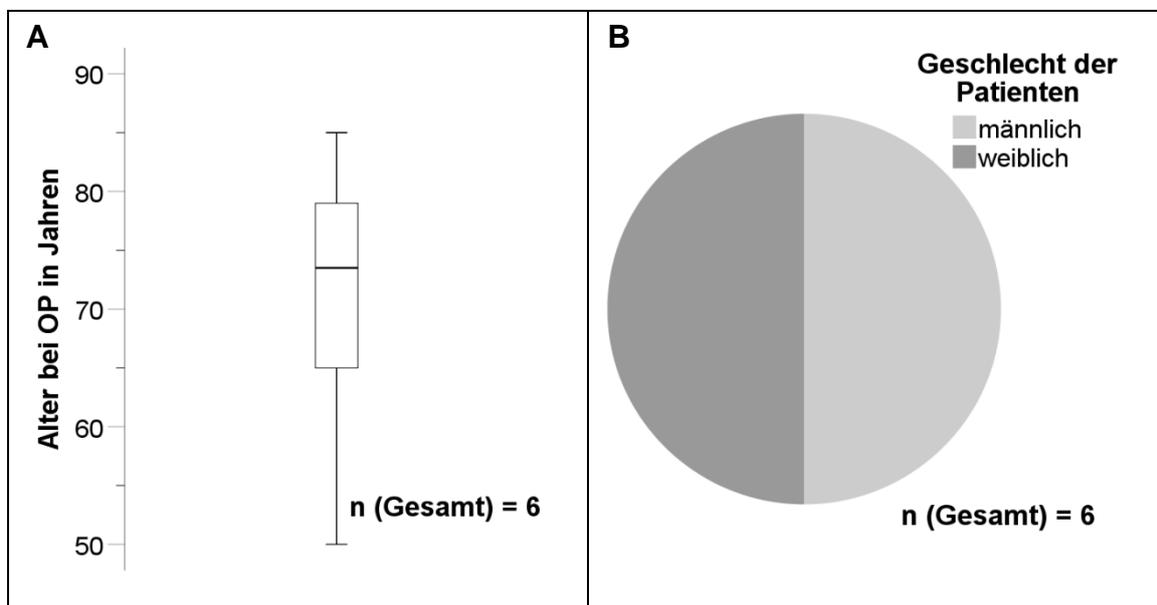
Es erfolgte ein nicht parametrischer Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgender post-hoc Analyse bei unabhängigen Variablen wenn  $p < 0,1$  mittels Mann-Whitney-U-Test. Die Variable „Muster“ wurde als ordinal skaliert gewertet. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Eine alpha-Adjustierung wurde nicht vorgenommen. Die Statistik erfolgte mittels des Statistikprogramms SPSS 25.

### 3 Ergebnisse

Die hier gewonnenen Daten wurden bereits im Journal of Orthopaedic Research (Danalache, Erler et al. 2020) veröffentlicht (Danalache, Erler et al. 2020). Eine weitere gesonderte Zitierweise der im Folgenden präsentierten Daten erfolgt daher nicht.

#### 3.1 Analyse der Patientendaten

Es wurden insgesamt bei sechs Patienten Übersichtsaufnahmen für Kollagen Typ VI, Kollagen Typ III, Perlekan und Biglykan angefertigt. Bei zwei Patienten konnten keine repräsentativen Regionen für BC gefunden werden. Die Verteilung des Patientenalters lag zwischen 50 und 85 Jahren, wobei der Median sich bei 75 Jahren befand. Die Geschlechterverteilung war ausgeglichen (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6:** Klinische Daten der untersuchten Patientenproben. Das Alter der untersuchten Patienten hatte eine Spannweite von 50 bis 85 Jahren, wobei der Median bei 75 Jahren lag (**A**). Es wurden gleich häufig Proben von männlichen wie von weiblichen Patienten untersucht (**B**). Insgesamt wurden 6 Patientenproben untersucht.

Die Zelldichte änderte sich im Verlauf der geänderten zellulären Organisation und nahm konstant zu. Insbesondere am Übergang zu den BC kam es zu einer

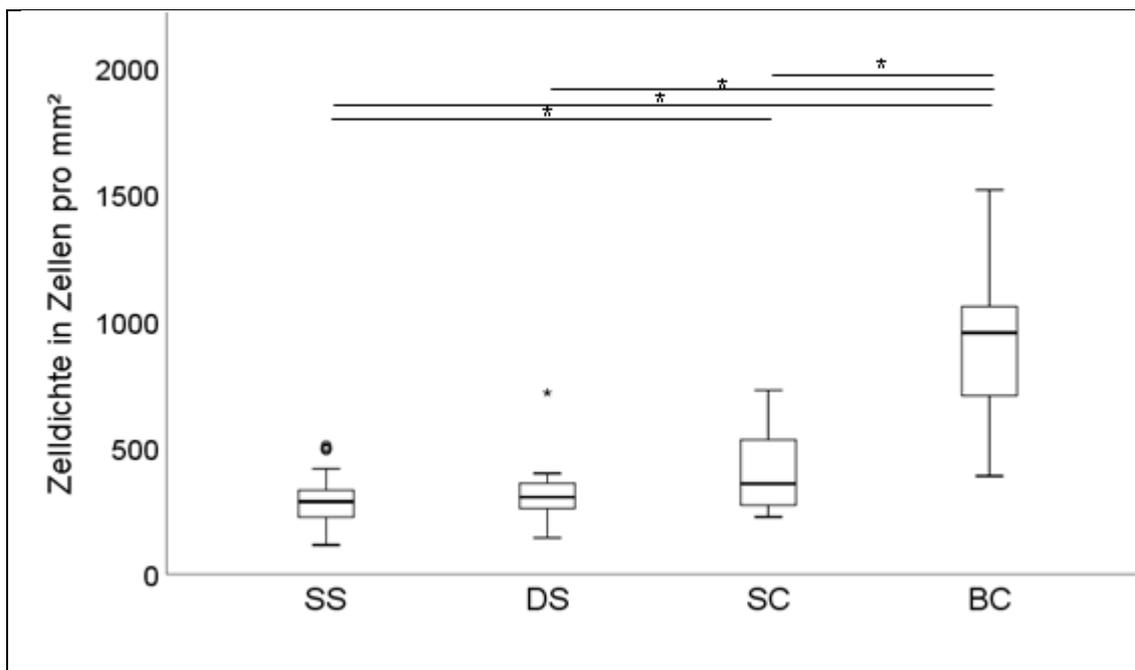
sprunghaft erhöhten Zelldichte. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied mit  $p=0,006$  (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Verteilung der Zelldichten. Zelldichte in Zellen pro  $\text{mm}^2$  auf ganze Zahlen gerundet, p-Wert auf die dritte Nachkommastelle gerundet. Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Zellmuster	Zelldichte		
	Median	Spannweite	p-Wert
SS	287	393	0,000
DS	305	574	
SC	358	501	
BC	955	1132	

Die Zelldichte zeigte eine klare Zunahme im Verlauf der geänderten Zellorganisation von SS über DS, SC zu BC. Insbesondere fiel eine sprunghafte Zunahme der Zelldichte um mehr als das Doppelte bei BC auf (**Abbildung 7**). Die einzelnen Zelldichten der Muster zeigten im Mann-Whitney-U-Test als post-hoc Untersuchung einen signifikanten Unterschied zwischen SS und BC, DS und BC und auch zwischen SC und BC (Tabelle 13).

## Ergebnisse



**Abbildung 7:** Zunahme der Zelldichte bei fortschreitender Zellumorganisation. Die Boxplots zeigen den Median der Zelldichten in mm<sup>2</sup> im Verlauf der zellulären Umorganisation. Es ist ein klarer Anstieg zu beobachten, der insbesondere am Übergang von den SC zu den BC sprunghaft zunimmt. Ein signifikanter Unterschied (\* $p < 0,05$ ) zeigt sich zwischen SS und BC, SS und SC, DS und BC, und auch zwischen SC und BC. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

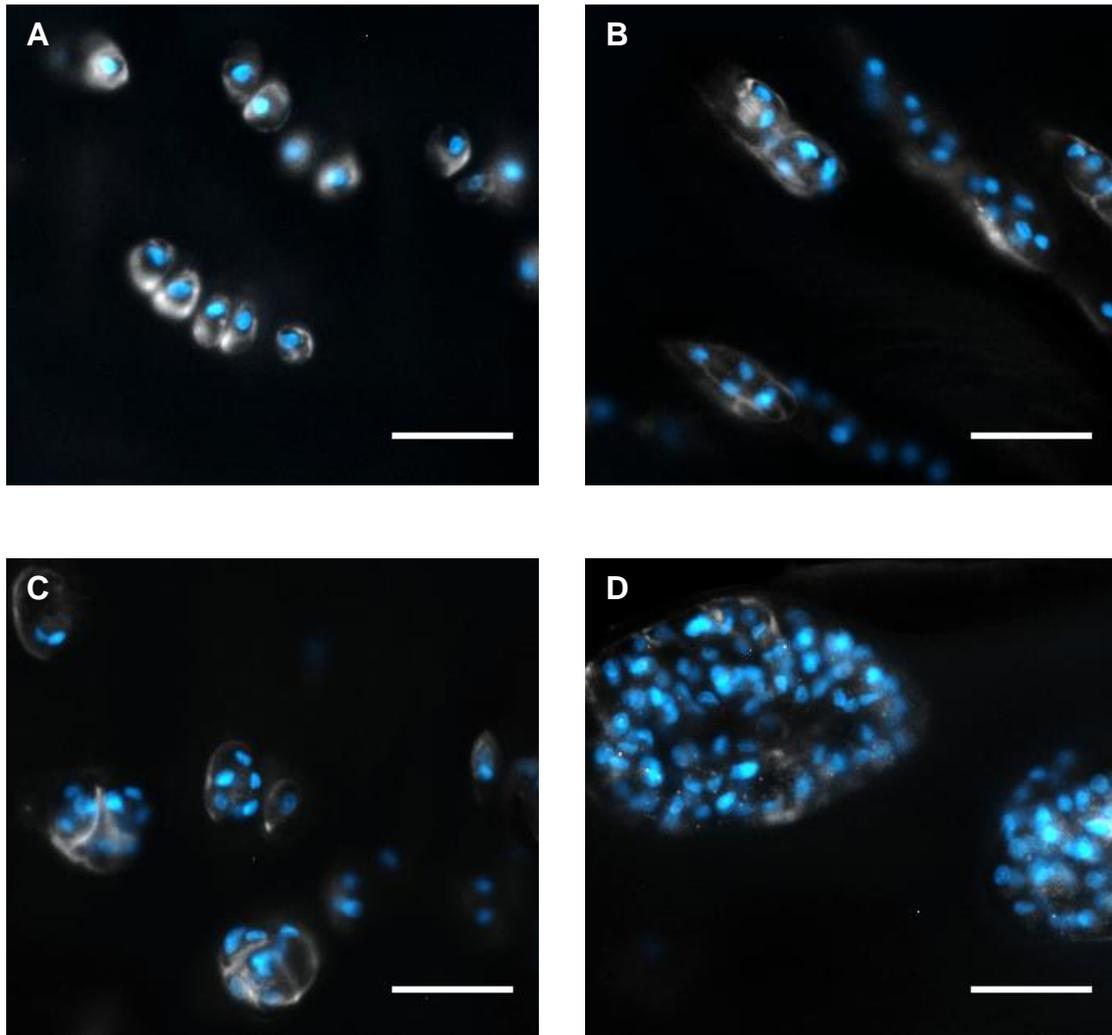
**Tabelle 13:** Post-hoc Analyse der Zelldichten in den Zellmustern. Zelldichte in Zellen pro mm<sup>2</sup>, p-Wert auf die 3. Nachkommastelle gerundet. Vergleich der verschiedenen Zelldichten von den Zellmustern. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters

Vergleich der Zelldichten (Zellen/mm <sup>2</sup> )	p-Wert
SS - DS	0,557
SS - SC	0,017
SS - BC	0,000
DS - SC	0,068
DS - BC	0,000
SC - BC	0,000

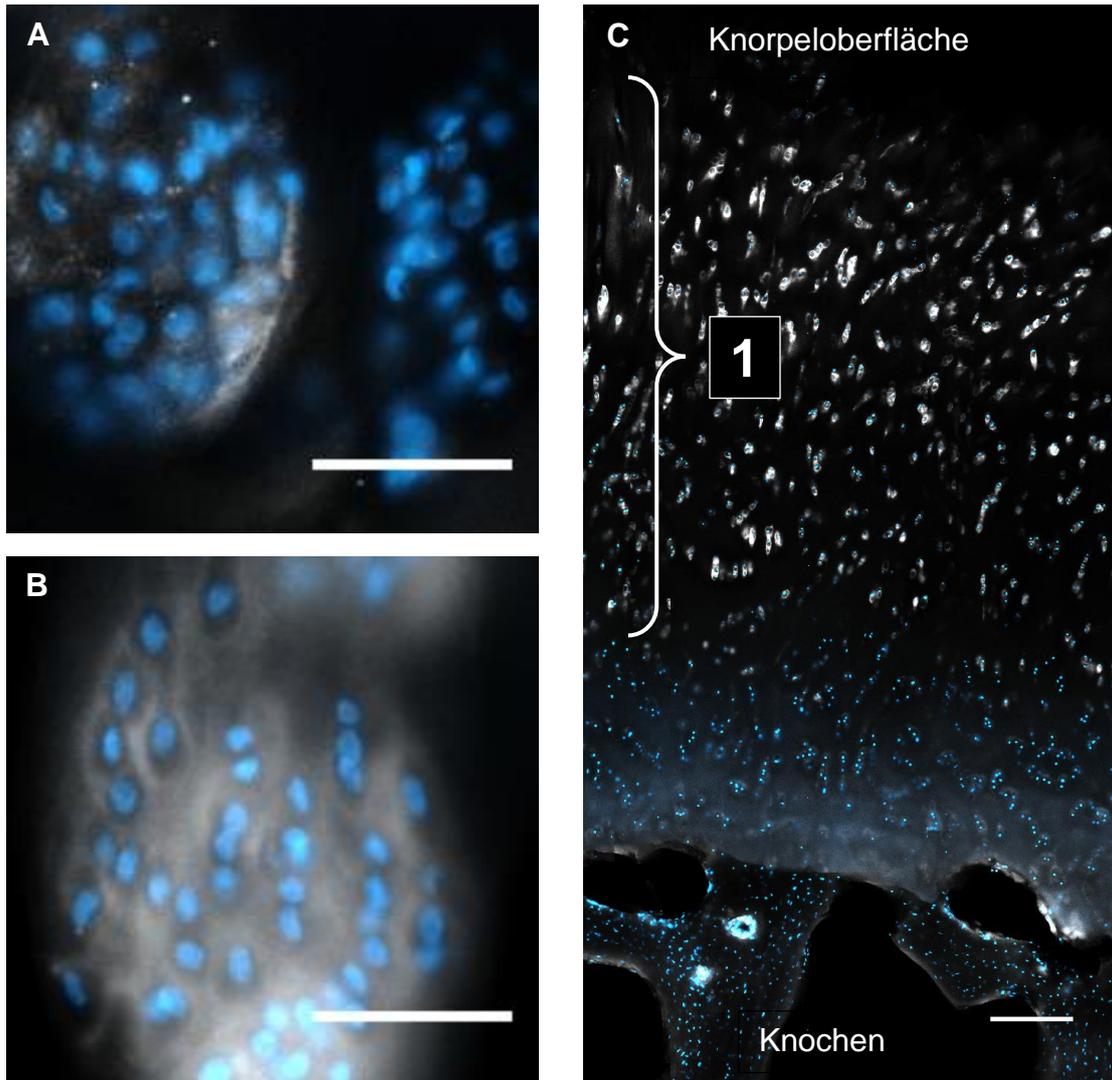
## 3.2 Kollagen Typ VI

### 3.2.1 Veränderungen der PZM für Kollagen Typ VI

Die Verteilung von Kollagen Typ VI in den verschiedenen Zellmustern zeigte sich besonders um die SS klar perizellulär, aber auch noch bei den DS und SC ließ sich eine scharf begrenzte Anfärbung von Kollagen Typ VI perizellulär darstellen. In der EZM war vorwiegend kein Kollagen Typ VI sichtbar (**Abbildung 8**). Bei den BC gab es wenige Zellen mit einer auffallend starken Färbung. Der überwiegende Großteil zeigte nur noch wenig, eher diffus verteiltes, unscharf begrenztes Kollagen Typ VI (**Abbildung 9**). Sowohl Zellen der oberflächlichen als auch der mittleren Zone zeigten eine PZM aus Kollagen Typ VI. Selbst im oberen Bereich der tiefen Zone war eine PZM erkennbar, wenn auch abgeschwächt.



**Abbildung 8:** Zellmuster mit Anfärbung des Kollagen Typ VI in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme mit Zellkernfärbung (DAPI, hellblau) und Kollagen Typ VI-Antikörper (weiß). **(A)** Single Strings; **(B)** Double Strings; **(C)** Small Clusters; **(D)** Big Clusters; Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$ . Kollagen Typ VI befindet sich perizellulär und hat eine charakteristische, kapselartige Form, um jede einzelne Zelle **(A)**. Es wird im Verlauf von Double Strings zu Small Clusters **(B-C)**, vor allem aber bei Big Clusters **(D)** weniger und diffuser.

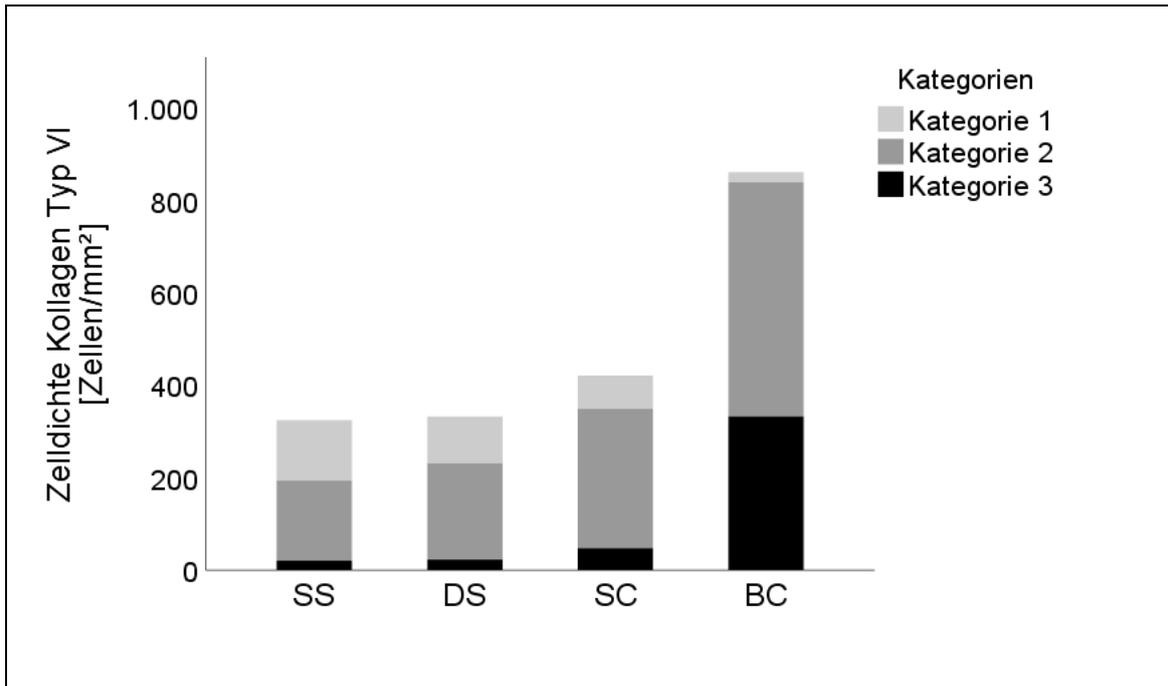


**Abbildung 9:** Big Clusters mit Anfärbung des Kollagen Typ VI in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkern gefärbt mit DAPI (hellblau) und Kollagen Typ VI-Antikörper (weiß). **(A)** Big Clusters mit wenig diffuser Anfärbung von Kollagen Typ VI; entspricht der großen Mehrheit der Big Clusters. **(B)** Big Cluster mit sehr starker Anfärbung von Kollagen Typ VI; entspricht nur einzelnen Big Clusters. Maßstabsbalken: 50 µm. **(C)** Sowohl Zellen der oberflächlichen als auch der mittleren Zone zeigen eine PZM aus Kollagen Typ VI (1). Selbst im oberen Bereich der tiefen Zone ist eine PZM erkennbar, wenn auch abgeschwächt. Maßstabsbalken 200 µm.

Bei Betrachtung der Veränderung von Kollagen Typ VI in der PZM mit fortschreitender zellulärer Umorganisation von SS über DS und SC zu BC, fiel zunächst eine deutliche Zunahme der Zelldichte auf. Des Weiteren änderte sich im Verlauf auch die Struktur von Kollagen Typ VI in der PZM. Durch die Einteilung der Zellen in die drei ordinalen? Ausprägungskategorien der PZM konnte

## Ergebnisse

illustriert werden, wie sich die Anteile der Kategorien und damit die Struktur und Integrität der PZM ändert. Der Anteil an Zellen aus der Kategorie 1 nahm im Verlauf stark ab. Im Gegensatz dazu nahm der Anteil der Kategorie 2 am Übergang von den DS zu den SC etwas zu und erhöhte sich um den Faktor 1,67 am Übergang von SC zu den BC. Auffallend war ein zu Beginn noch mäßiger Anstieg der Kategorie 3 mit einer sprunghaften Zunahme beim Übergang von SC zu BC um mehr als das Sechsfache (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10:** Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Kollagen Typ VI. Gestapeltes Balkendiagramm, gezeigt werden die Mittelwerte der Zelldichten der unterschiedlichen Zellkategorien für die einzelnen Zellmuster. Die Zelldichte nimmt insgesamt im Verlauf von den SS zu den BC stetig zu. Insbesondere zwischen den SC und BC ist eine sprunghafte Erhöhung zu verzeichnen. Auch die Zusammensetzung der PZM aus den unterschiedlichen Zellkategorien ändert sich im Verlauf massiv. So nimmt die Anzahl an Zellen aus Kategorie 1 im Verlauf ab, Kategorie 2 nimmt insbesondere am Übergang von den SC zu den BC stark zu. Für Kategorie 3 ist am Übergang von den DS zu den SC schon eine deutliche Zunahme zu verzeichnen, die am Übergang von den SC zu den BC massiv gesteigert ist. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

### 3.2.2 Analyse der PZM pro Fläche für Kollagen Typ VI

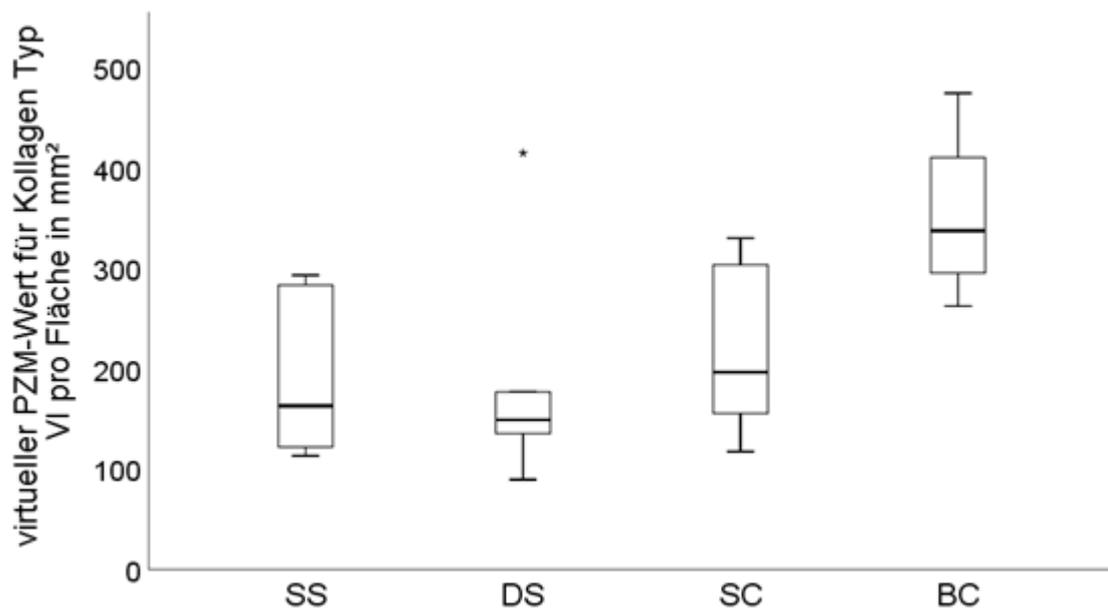
Für den virtuellen PZM-Wert pro Fläche wurde die Zelldichte von Kategorie 1 mit einem Faktor von 0,75, Kategorie 2 mit 0,5 und Kategorie 3 mit 0,25 gewichtet. Somit erniedrigte sich der virtuelle PZM-Wert pro Fläche sowohl durch eine geringe Zelldichte, als auch durch einen hohen Anteil von Zellen der Kategorie 3. Der virtuelle PZM-Wert pro Fläche soll einen Eindruck vermitteln wie sich allgemein die Menge des angefärbten Strukturproteins in der PZM bei fortschreitender Degeneration verändert. Der virtuelle PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ VI zeigte eine ansteigende Tendenz, welche jedoch im Kruskal-Wallis-Test keinen signifikanten Unterschied zeigte mit  $p=0,086$  (Tabelle 14).

## Ergebnisse

**Tabelle 14:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Kollagen Typ VI. Zelldichte in Zellen pro mm<sup>2</sup> auf die 2. Nachkommastelle gerundet. Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test, p-Wert auf die 3. Nachkommastelle gerundet. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters

Färbung:	Kollagen Typ VI		
Zellmuster	Median	Spannweite	p-Wert
SS	163,13	180,11	0,086
DS	149,22	325,44	
SC	196,66	212,49	
BC	337,59	212,14	

Aufgrund des klaren Trends bei Kollagen Typ VI wurde für den direkten Vergleich der einzelnen zellulären Organisationsformen der Mann-Whitney-U-Test zur Bestimmung der p-Werte verwendet (**Tabelle 15**). Auch wenn der Unterschied nicht statistisch signifikant war, so konnte interessanterweise in der deskriptiven Auswertung gesehen werden, dass im vorliegenden Datensatz der virtuelle PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ VI im Zuge der zunehmend pathologischen Zellmuster einen Anstieg zeigte, mit der größten Differenz zwischen SS und BC (**Abbildung 11**).



**Abbildung 11:** Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ VI. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Kollagen Typ VI bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die Fläche in mm<sup>2</sup>. Es ist eine leichte Zunahme im Verlauf der fortschreitenden Degeneration erkennbar. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters

**Tabelle 15:** Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Kollagen Typ VI. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters

Vergleich der Zellmuster (Kollagen Typ VI)	p-Wert
SS - DS	0,873
SS - SC	0,423
SS - BC	0,033
DS - SC	0,262
DS - BC	0,055
SC - BC	0,055

### 3.2.3 Analyse der PZM pro Zelle für Kollagen Typ VI

Der virtuelle PZM-Wert pro Zelle ist ausschließlich abhängig von den Anteilen der Kategorien. Somit soll ein Eindruck vermittelt werden, wie sich die fort-

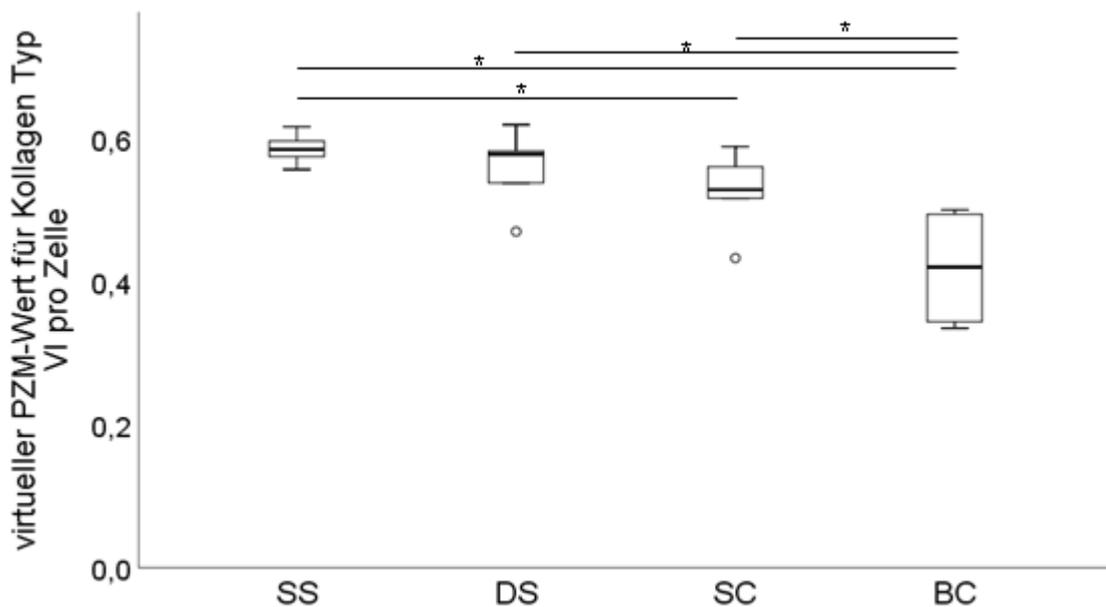
## Ergebnisse

schreitende Degeneration auf die angefärbte Struktur in der PZM der einzelnen Zelle auswirkt. Dies gelang über ein Herausrechnen der Zellzahl pro Fläche, welche wie oben aufgeführt im Laufe der Degeneration eine deutliche Zunahme erfuhr und hierdurch auch in absoluter Menge den Gehalt an Kollagen Typ VI zu steigen lassen schien. Somit wurde eine klare Abnahme der PZM pro Zelle über die Entwicklung der verschiedenen Zellmustern deutlich. Diese Entwicklung zeigte sich auch mit signifikantem Ergebnis im Kruskal-Wallis-Test mit  $p=0,012$  (**Tabelle 16**).

**Tabelle 16:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Kollagen Typ VI. Zelldichte in Zellen pro  $\text{mm}^2$ , auf die 3. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung: Zellmuster	Kollagen Typ VI		
	Median	Spannweite	p-Wert
SS	0,586	0,060	0,012
DS	0,579	0,150	
SC	0,529	0,156	
BC	0,421	0,166	

Für den direkten Vergleich der einzelnen zellulären Organisationsformen wurde für die post-hoc Analyse der Mann-Whitney-U-Test verwendet (**Tabelle 17**). Hierbei zeigten sich zwischen SS und SC, zwischen SS und BC, zwischen DS und BC und auch zwischen SC und BC signifikante Unterschiede (**Abbildung 12**).



**Abbildung 12:** Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Kollagen Typ VI. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Kollagen Typ VI bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die einzelne Zelle. Es ist eine Abnahme im Verlauf der fortschreitenden Degeneration mit signifikanten Unterschieden (\* $p < 0,05$ ) zwischen SS und SC, SS und BC, DS und BC und des Weiteren zwischen SC und BC erkennbar. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

**Tabelle 17:** Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle der verschiedenen Zellmuster für Kollagen Typ VI. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters

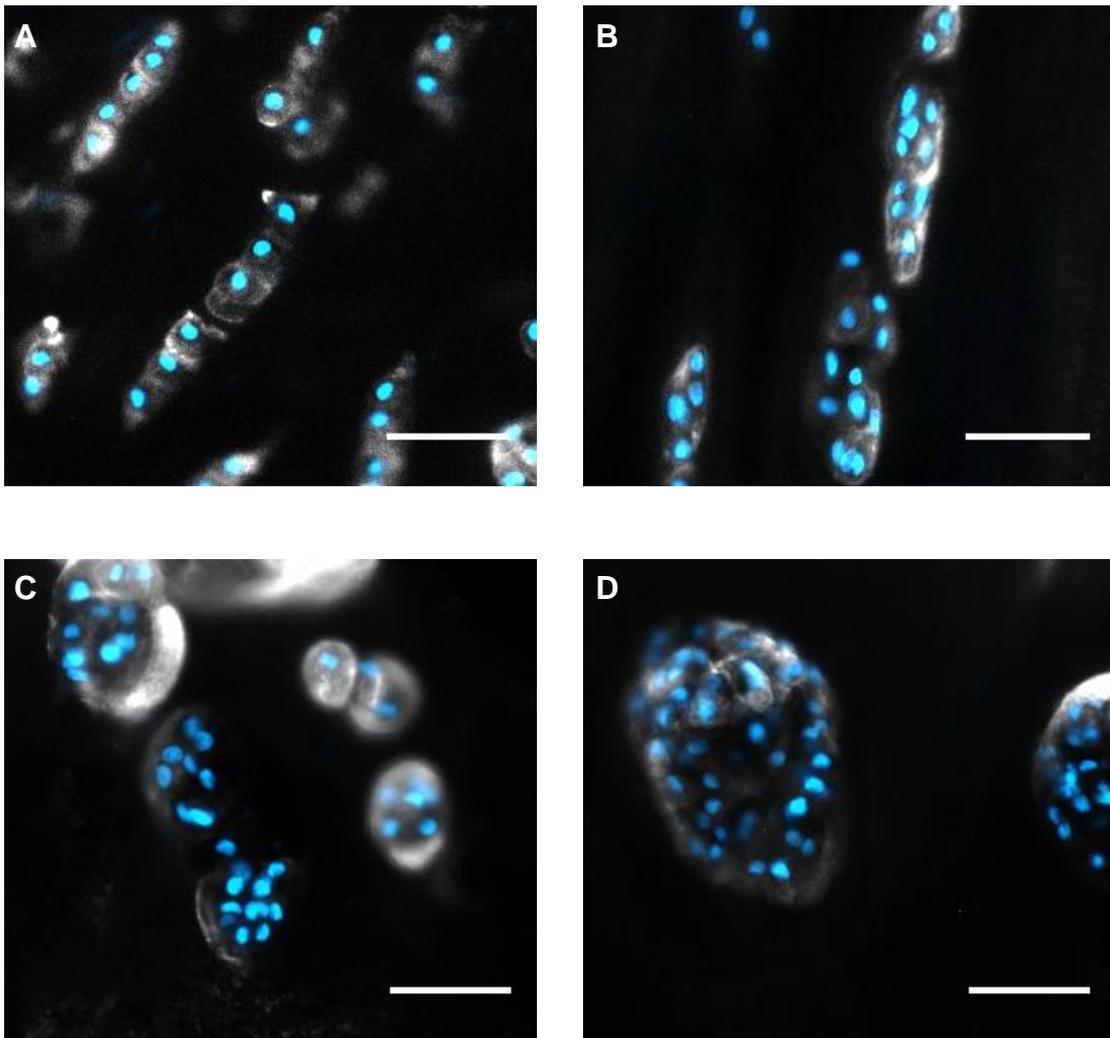
Vergleich der Zellmuster (Kollagen Typ VI)	p-Wert
SS - DS	0,631
SS - SC	0,025
SS - BC	0,011
DS - SC	0,200
DS - BC	0,033
SC - BC	0,033

### 3.3 Kollagen Typ III

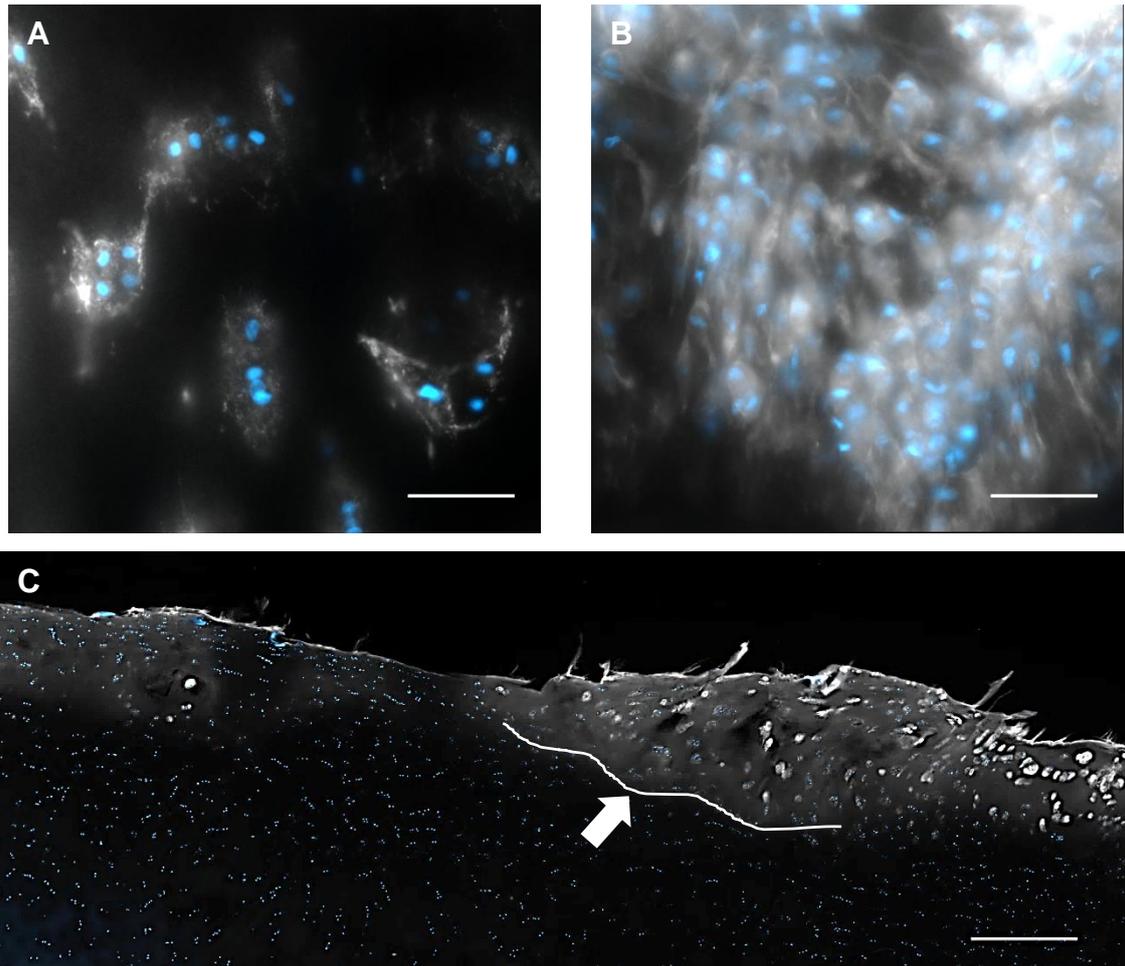
#### 3.3.1 Veränderungen der PZM für Kollagen Typ III

Kollagen Typ III zeigte sich bei den SS klar im Bereich der perizellulären Matrix scharf begrenzt und zellbezogen. Auch bei den DS war das Kollagen Typ III noch scharf begrenzt. Die perizelluläre Matrix umfasste allerdings bereits teilweise schon mehrere Zellen. In den SC und BC hingegen zeigte sich Kollagen Typ III weniger scharf begrenzt, dafür fiel eine verbreiterte Anfärbung um die Cluster, aber auch zwischen den Zellen auf (**Abbildung 13**).

Kollagen Typ III präsentierte sich dort sowohl perizellulär, als auch in bestimmten Regionen in der extrazellulären Matrix. Hier konnte man ein feines Netz beobachten, welches sich zwischen den Zellen aufspannt und in die PZM übergeht. Außerdem gab es BC mit einer hohen Menge von diffusem Kollagen Typ III zwischen den Zellen. Auffällig war bei der Kollagen Typ III-Färbung des Weiteren, dass bestimmte Regionen im Knorpel Kollagen Typ III in der PZM haben, andere jedoch nicht. Ein direkter Zusammenhang mit den Zellmustern oder Knorpelzonen war offensichtlich nicht erkennbar. Kollagen Typ III kam besonders in der oberflächlichen Zone und dem oberen Teil der mittleren Zone vor (**Abbildung 14**).



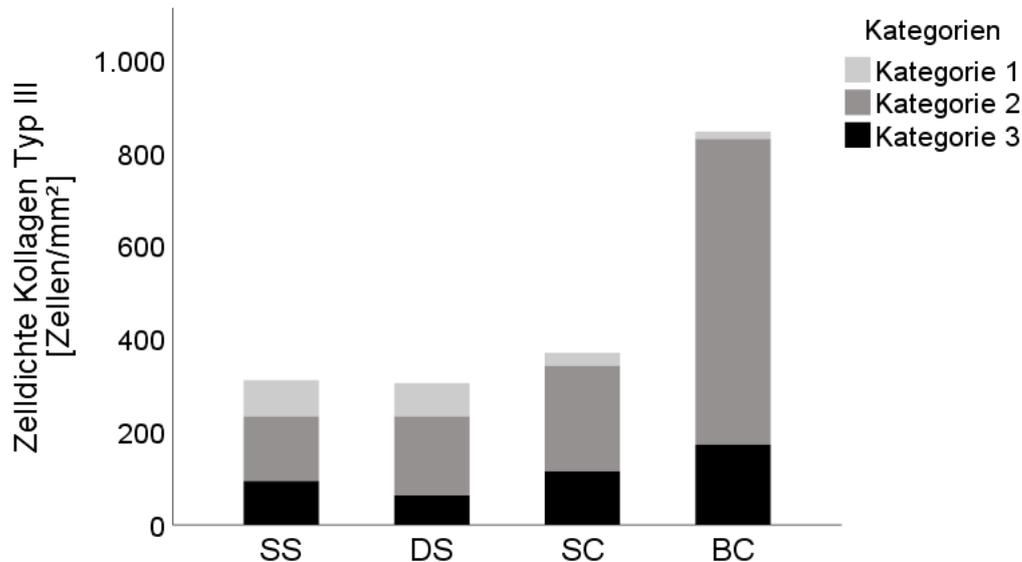
**Abbildung 13:** Zellmuster mit Anfärbung des Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkerne gefärbt mit DAPI (hellblau) und perizelluläre Matrix mit Kollagen Typ III-Antikörper (weiß). **(A)** Single Strings: Das Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix zeigt sich scharf begrenzt und zellbezogen. **(B)** Double Strings: Auch hier ist das Kollagen Typ III noch scharf begrenzt, die perizelluläre Matrix umfasst allerdings teilweise schon mehrere Zellen. **(C)** Small Clusters: Kollagen Typ III zeigt sich weniger scharf begrenzt, dafür ist eine verbreiterte Anfärbung um die Zellhaufen beobachtbar. **(D)** Big Clusters: Kollagen Typ III ist besonders ausgeprägt zwischen den Zellen und am Rand der Big Clusters. Maßstabsbalken: 50µm.



**Abbildung 14:** Anfärbung des Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkerne gefärbt mit DAPI (hellblau) und perizelluläre Matrix mit Kollagen Typ III-Antikörper (weiß). **(A)** Übergang von Kollagen Typ III von der perizellulären Matrix in die interterritoriale Matrix, netzartige Verbindung zwischen den Zellen untereinander; Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m; **(B)** Big Cluster mit übermäßig starker und diffuser Ausprägung von Kollagen Typ III; Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m; **(C)** Übersichtsaufnahme, bestimmte Regionen mit Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix aber auch interterritorial ( $\rightarrow$ ), andere Regionen ohne Kollagen Typ III. Insgesamt ist allerdings kein offensichtlich erkennbarer Zusammenhang mit den Knorpelzonen oder den Zellmustern erkennbar. Kollagen Typ III zeigt sich in der oberflächlichen Zone und dem oberen Teil der mittleren Zone. Maßstabsbalken: 500 $\mu$ m.

In Bezug auf die perizelluläre Färbung von Kollagen Typ III zeigte sich im Verlauf eine Abnahme des Anteils der Kategorie 1. Im Gegensatz dazu konnte eine konstante Zunahme des Anteils der Kategorie 2 beobachtet werden. Kategorie 3 nahm ebenfalls zu. Während bei den SS die Anteile der Kategorien weitge-

hend ausgeglichen waren, verschob sich das Gleichgewicht bei den BC zu Gunsten von Kategorie 2 (**Abbildung 15**).



**Abbildung 15:** Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Kollagen Typ III. Gestapeltes Balkendiagramm. Gezeigt werden die Mittelwerte der Zelldichten der unterschiedlichen Zellkategorien für die einzelnen Zellmuster. Die Zelldichte nimmt insgesamt im Verlauf von den SS zu den BC stetig zu. Insbesondere zwischen den SC und BC ist eine sprunghafte Erhöhung zu verzeichnen. Auch die Zusammensetzung der PZM aus den unterschiedlichen Zellkategorien ändert sich im Verlauf massiv. So nimmt Kategorie 1 im Verlauf ab, Kategorie 2 nimmt konstant zu, mit einer massiven Erhöhung am Übergang von den SC zu den BC. Kategorie 3 zeigt hingegen nur eine leichte Zunahme. Während bei den SS die Anteile der Kategorien weitgehend zu gleichen Teilen verteilt ist, verschiebt es sich bei den BC zugunsten von Kategorie 2. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

### 3.3.2 Analyse der PZM pro Fläche für Kollagen Typ III

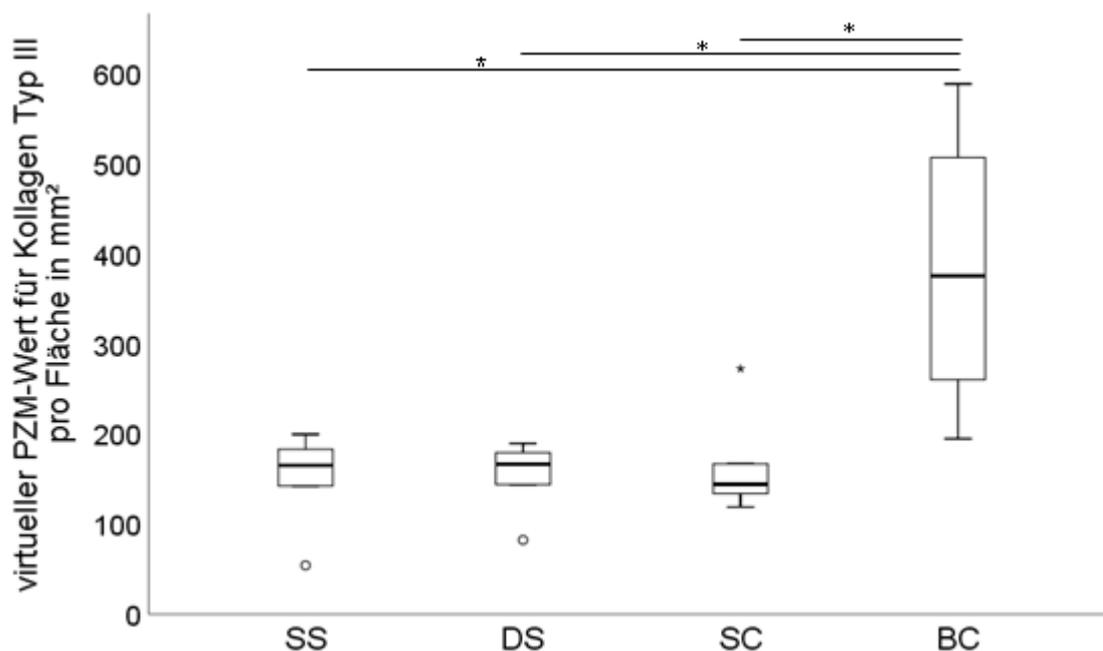
Der virtuelle PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ III nahm im Verlauf, insbesondere jedoch am Übergang von den SC zu den BC, zu. Dies spiegelte sich auch in einem signifikanten Unterschied im Kruskal-Wallis-Test mit  $p=0,033$  wider (**Abbildung 16**).

## Ergebnisse

**Tabelle 18:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Kollagen Typ III. Zelldichte in Zellen pro mm<sup>2</sup>, auf die 3. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung:	Kollagen Typ III		
Zellmuster	Median	Spannweite	p-Wert
SS	165,01	145,50	0,033
DS	166,20	107,32	
SC	143,95	153,61	
BC	375,37	393,78	

Vergleicht man den virtuellen PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ III der verschiedenen Zellmuster einzeln miteinander, ist eine Zunahme, sowohl zwischen SS und BC, als auch zwischen DS und BC und zwischen SC und BC zu beobachten (**Abbildung 16**). Dieser Unterschied erwies sich auch im Mann-Whitney-U-Test als statistisch signifikant (**Tabelle 19**).



**Abbildung 16:** Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix der einzelnen zellulären Organisationsformen. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Kollagen Typ III bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die Fläche in mm<sup>2</sup>. Es ist eine sprunghafte Zunahme am Übergang zu den BC zu verzeichnen, mit signifikanten Unterschieden (\* $p < 0,05$ ) zwischen SS und BC, DS und BC und außerdem zwischen SC und BC. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

**Tabelle 19:** Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Kollagen Typ III. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Vergleich der Zellmuster (Kollagen Typ III)	p-Wert
SS - DS	0,873
SS - SC	0,522
SS - BC	0,019
DS - SC	0,522
DS - BC	0,011
SC - BC	0,019

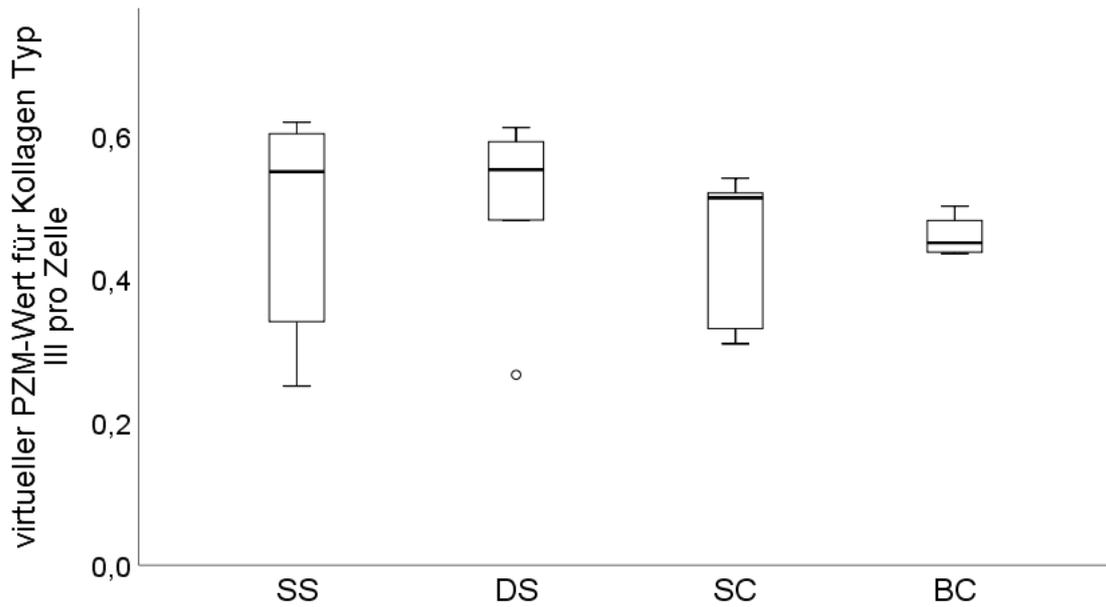
### 3.3.3 Analyse der PZM pro Zelle für Kollagen Typ III

Vergleicht man den virtuellen PZM-Wert pro Zelle von Kollagen Typ III der zellulären Organisationsformen, kann man weder eine Zu- noch eine Abnahme verzeichnen (**Abbildung 17**). Auch im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit  $p=0,449$  (**Tabelle 20**).

**Tabelle 20:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Kollagen Typ III. Zelldichte in Zellen pro  $\text{mm}^2$ , auf die 3. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung: Zellmuster	Kollagen Typ III		
	Median	Spannweite	p-Wert
SS	0,549	0,37	0,449
DS	0,552	0,35	
SC	0,513	0,23	
BC	0,450	0,07	

## Ergebnisse

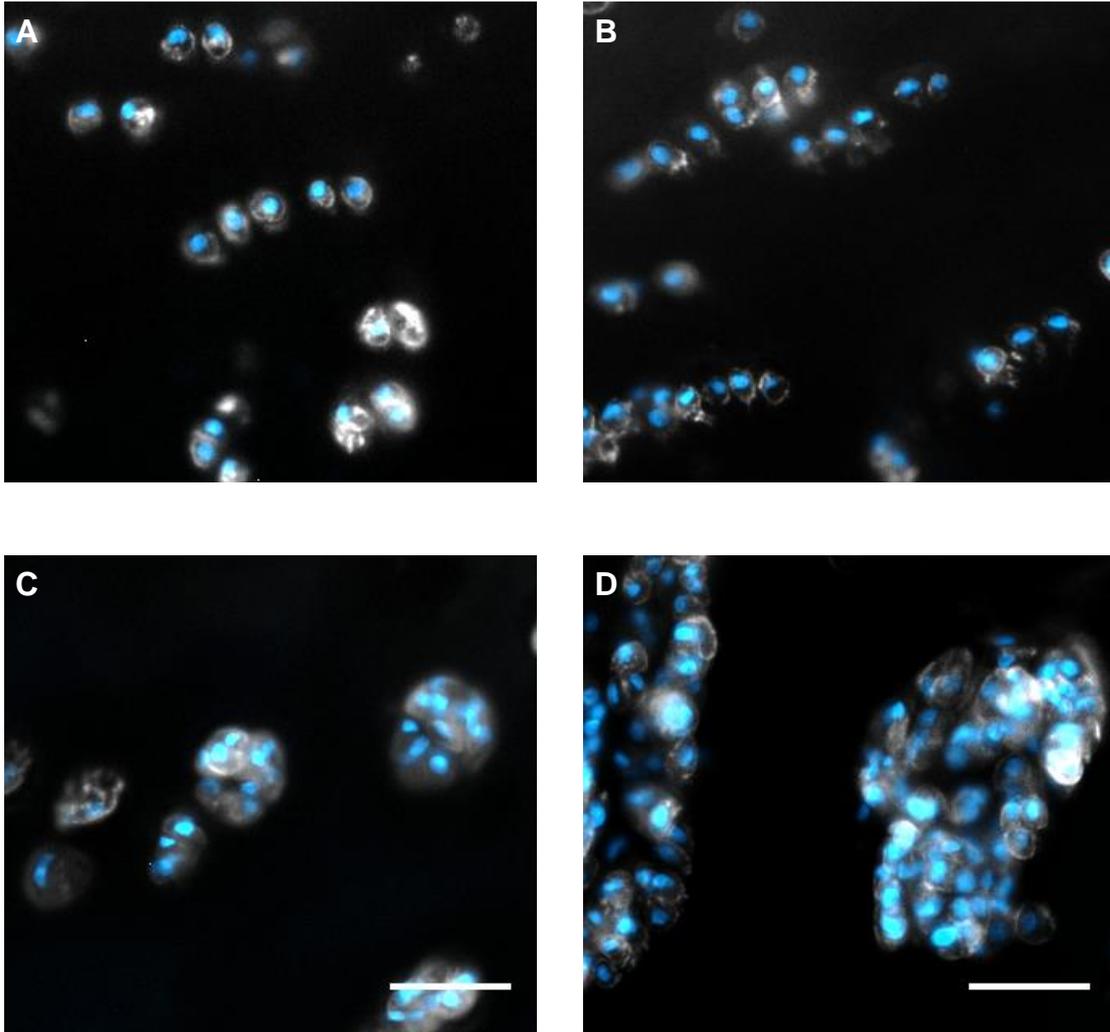


**Abbildung 17:** Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Kollagen Typ III. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Kollagen Typ III bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die einzelne Zelle. Es ist ein konstanter Verlauf bei fortschreitender Degeneration zu sehen. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

## 3.4 Perlekan

### 3.4.1 Veränderungen der PZM für Perlekan0

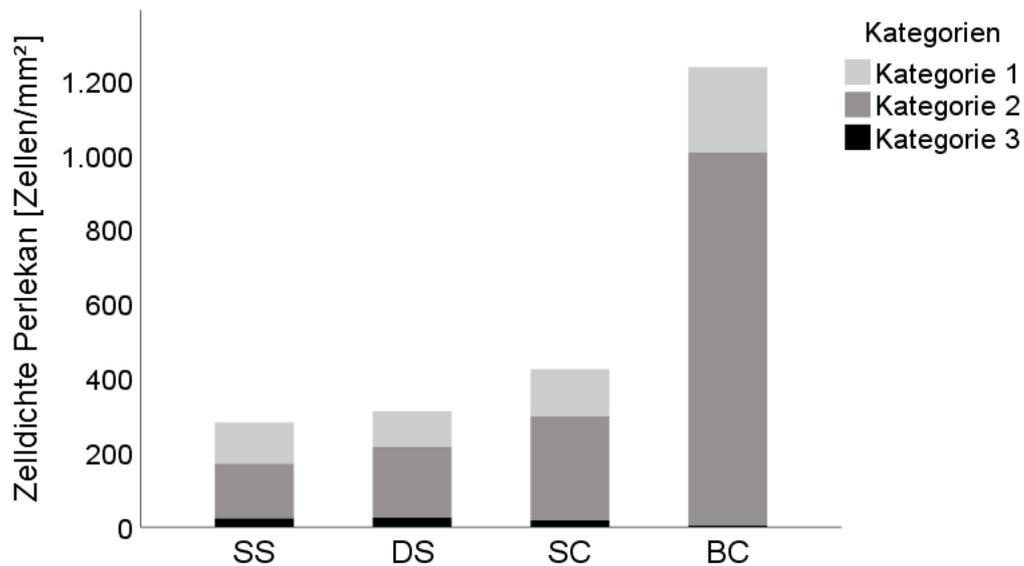
Perlekan zeigte sich in allen vier Zellmustern klar perizellulär und scharf begrenzt. Im Gegensatz zu Kollagen Typ VI, Kollagen Typ III und Biglykan, war Perlekan auch noch bei den BC zellbezogenen ausgeprägt. (**Abbildung 18**)



**Abbildung 18:** Zellmuster mit Anfärbung von Perlekan in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkerne gefärbt mit DAPI (hellblau) und perizelluläre Matrix mit Perlekan-Antikörper (weiß). **(A)** Single Strings; **(B)** Double Strings; **(C)** Small Clusters; **(D)** Big Clusters. Perlekan ist bei allen Zellmustern noch klar perizellulär, scharf begrenzt und zellbezogen ausgeprägt; Maßstabsbalken: 50µm.

Die perizelluläre Färbung von Perlekan zeigte eine Zunahme an Kategorie 1 und Kategorie 2. Hierbei überwog die Zunahme an Kategorie 2 und das Verhältnis verschob sich mit zunehmender Degeneration zu dessen Gunsten. Kategorie 3 konnte nur wenig beobachtet werden und nahm im Verlauf weiter ab (**Abbildung 19**).

## Ergebnisse



**Abbildung 19:** Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Perlekan. Gestapeltes Balkendiagramm. Gezeigt werden die Mittelwerte der Zelldichten der unterschiedlichen Zellkategorien für die einzelnen Zellmuster. Die Zelldichte nimmt insgesamt im Verlauf von SS zu BC stetig zu. Insbesondere zwischen den SC und BC ist eine sprunghafte Erhöhung zu verzeichnen. Auch die Zusammensetzung der PZM aus den unterschiedlichen Zellkategorien ändert sich im Verlauf massiv. So nimmt Kategorie 1 im Verlauf ab, Kategorie 2 nimmt insbesondere am Übergang von den SC zu den BC sprunghaft zu. Für Kategorie 3 ist zunächst eine leichte Zunahme am Übergang von SS zu den DS, ist jedoch dann wieder rückläufig und bei den BC kaum mehr vorhanden. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

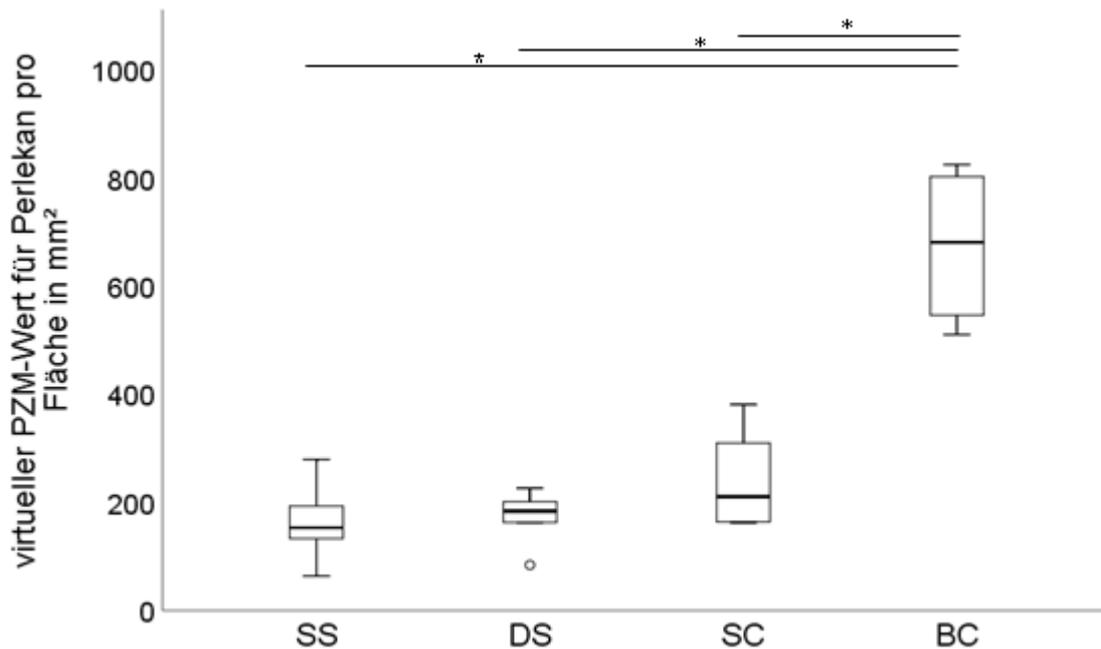
### 3.4.2 Analyse der PZM pro Fläche für Perlekan

Der virtuelle PZM-Wert pro Fläche für Perlekan zeigte eine klare Zunahme im Verlauf der zellulären Umorganisation (**Abbildung 20**). Die Zunahme war auch im Kruskal-Wallis-Test mit  $p=0,008$  statistisch signifikant (**Tabelle 21**).

**Tabelle 21:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Perlekan. Zelldichte in Zellen pro mm<sup>2</sup>, auf die 3. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung:	Perlekan		
Zellmuster	Median	Spannweite	p-Wert
SS	152,86	215,48	0,008
DS	183,33	142,07	
SC	210,20	218,22	
BC	680,73	314,43	

Der paarweise Mann-Whitney-U-Test als post-hoc Analyse (**Tabelle 22**) zeigte für den virtuellen PZM-Wert pro Fläche bei Perlekan einen signifikanten Unterschied zwischen SS und BC, DS und BC und außerdem zwischen SC und BC.



**Abbildung 20:** Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Perlekan. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Perlekan bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die Fläche in mm<sup>2</sup>. Es ist eine deutliche Zunahme im Verlauf der fortschreitenden Degeneration mit einem signifikanten Unterschied (\* $p < 0,05$ ) zwischen SS und BC, DS und BC und auch zwischen SC und BC erkennbar. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

**Tabelle 22:** Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Perlekan. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

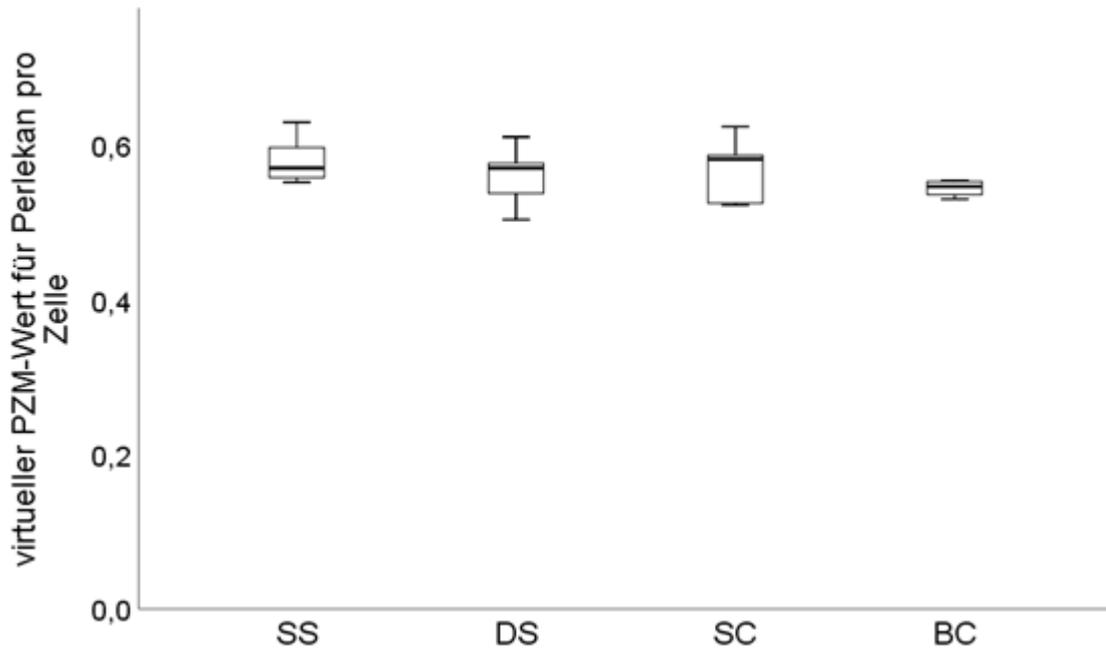
Vergleich der Zellmuster (Perlekan)	p-Wert
SS - DS	0,337
SS - SC	0,055
SS - BC	0,011
DS - SC	0,337
DS - BC	0,011
SC - BC	0,011

### 3.4.3 Analyse der PZM pro Zelle für Perlekan

Vergleicht man den virtuellen PZM-Wert pro Zelle von Perlekan, zeigte sich im Verlauf der zellulären Umorganisation kein Unterschied (**Abbildung 21**). Auch im Kruskal-Wallis-Test konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden mit  $p=0,296$  (**Tabelle 23**).

**Tabelle 23:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Perlekan. Zelldichte in Zellen pro  $\text{mm}^2$ , auf die 3. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung:	Perlekan		
Zellmuster	Median	Spannweite	p-Wert
SS	0,571	0,08	0,296
DS	0,571	0,11	
SC	0,582	0,10	
BC	0,547	0,02	



**Abbildung 21:** Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Perlekan. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Perlekan bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die einzelne Zelle. Auch wenn eine leichte abnehmende Tendenz im Verlauf der fortschreitenden Degeneration anmutet, so sind die vorliegenden Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant ( $p=0,296$ ). Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

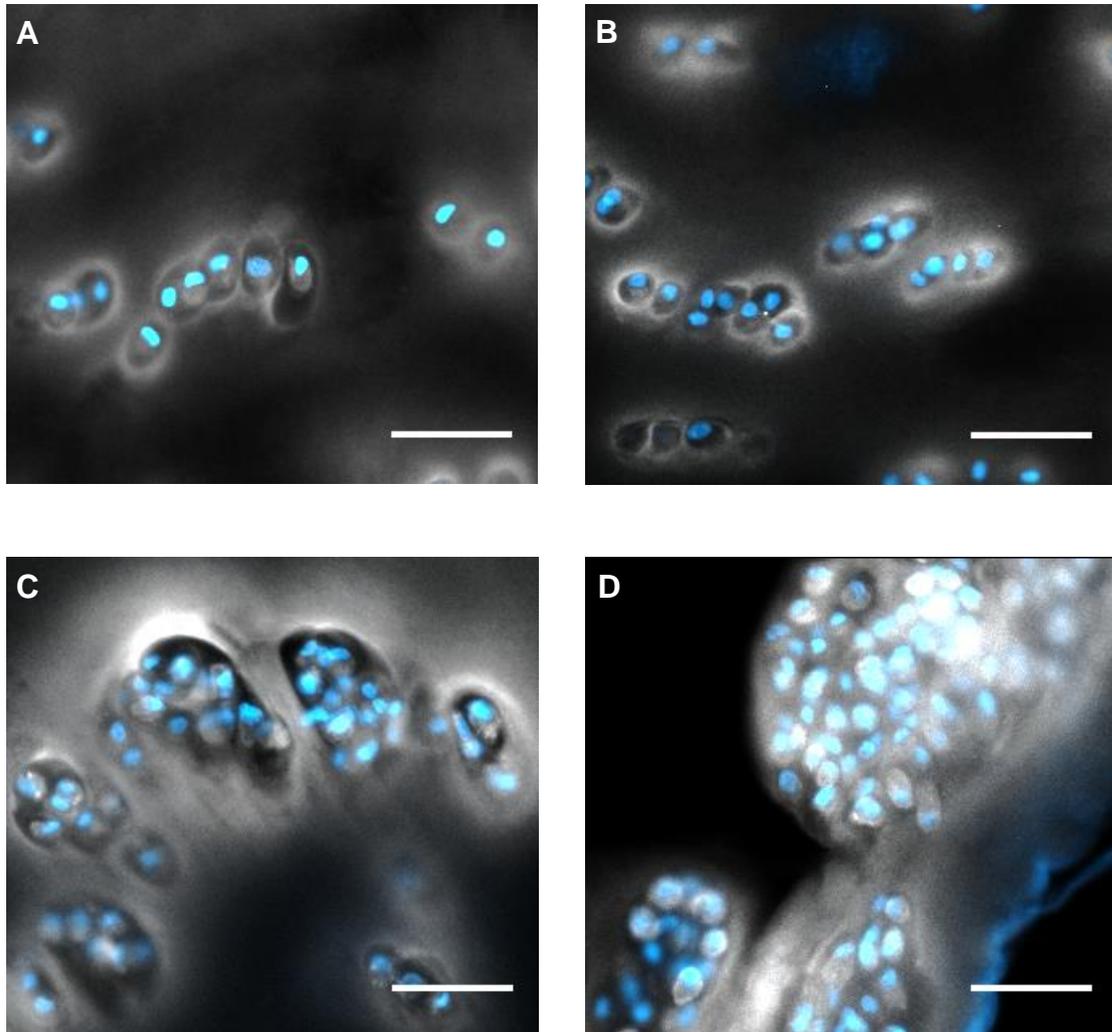
## 3.5 Biglykan

### 3.5.1 Veränderungen der PZM für Biglykan

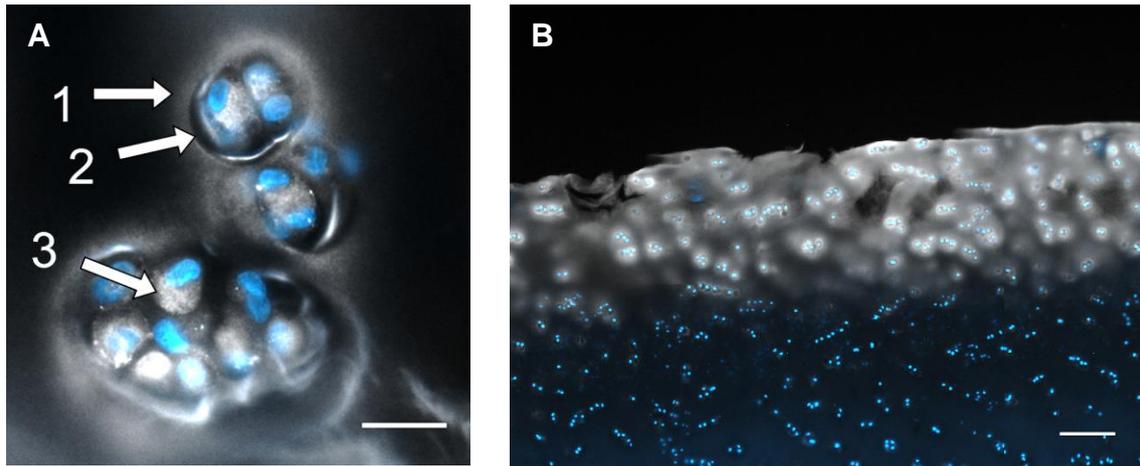
In den histologischen Färbungen zeigte Biglykan weniger die typische perizelluläre Färbung mit scharfer Begrenzung nach außen, wie man es bei Kollagen Typ VI, Kollagen Typ III und Perlekan beobachten konnte. Während Biglykan bei SS und DS noch zellbezogen vorkam, konnte bei SC und vor allem bei BC eine auffällige Biglykananfärbung direkt um den Zellkern und territorial sowie interterritorial beobachtet werden (**Abbildung 22**). Im Gegensatz dazu konnte man mit etwas Abstand zur Zelle kein Biglykan mehr beobachten. Nach dieser Lücke trat, mit einer scharfen Begrenzung in Richtung Zelle, erneut Biglykan auf. Die Färbung wurde nach außen hin schwächer. Vereinzelt war direkt um die Zellkernfärbungen eine Anfärbung des Biglykans sichtbar (**Abbildung 23.A**). Die Verteilung des Biglykans war vor allem in der oberflächlichen Zone und oberen Mittelzone. Auffällig war hier ein relativ scharf begrenzter Übergang zu

## Ergebnisse

der tiefen Mittelzone und der tiefen Zone mit Zellen ohne perizellulär angefarbtes Biglykan (**Abbildung 23.B**).



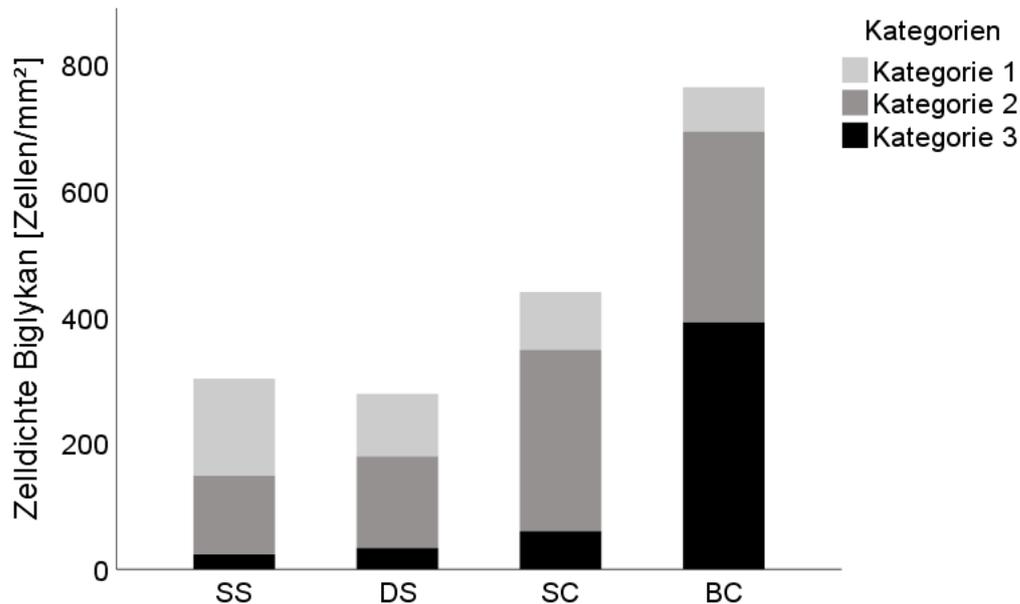
**Abbildung 22:** Zellmuster mit Anfärbung des Biglykans in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkerne gefärbt mit DAPI (hellblau) und perizelluläre Matrix mit Biglykan-Antikörper (weiß). Während Biglykan bei den **(A)** Single Strings und **(B)** Double Strings noch einen klaren Zellbezug zeigt, kann bei den **(C)** Small Clusters und vor allem bei **(D)** Big Clusters eine auffallende Biglykananfärbung direkt um den Zellkern und territorial sowie interterritorial beobachtet werden. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.



**Abbildung 23:** Anfärbung des Biglykans in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkerne gefärbt mit DAPI (hellblau) und perizelluläre Matrix mit Biglykan-Antikörper (weiß). **(A)** Biglykan befindet sich perizellulär und territorial und verblasst mit zunehmender Entfernung zur Zelle in Richtung interterritorial. Dort ist keine scharfe Grenze sichtbar ( $\rightarrow$  1). In Richtung Zelle ist eine scharfe Begrenzung sichtbar ( $\rightarrow$ 2). Vereinzelt befindet sich direkt um die Zellkernfärbungen herum eine Anfärbung des Biglykans ( $\rightarrow$ 3). Maßstabsbalken: 25  $\mu$ m. **(B)** Biglykan in der oberflächlichen Zone und am Übergang in die Mittelzone. Auffällig ist hier ein relativ scharf begrenzter Übergang zu der tiefen Mittelzone und der tiefen Zone mit Zellen ohne perizellulär angefärbtes Biglykan. Maßstabsbalken: 150  $\mu$ m.

Bei Betrachtung der perizellulären Färbung von Biglykan nahm der Anteil der Kategorie 1 im Verlauf stark ab. Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme des Anteils der Kategorie 2 festgestellt werden. Auffallend war ein mäßiger Anstieg von Kategorie 3 mit einer starken Zunahme beim Übergang von SC zu BC (**Abbildung 24**).

## Ergebnisse



**Abbildung 24:** Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Biglykan. Gestapeltes Balkendiagramm. Gezeigt werden die Mittelwerte der Zelldichten der unterschiedlichen Zellkategorien für die einzelnen Zellmuster. Die Zelldichte nimmt insgesamt im Verlauf von den SS zu den BC zu. Insbesondere zwischen den SC und BC ist eine sprunghafte Erhöhung zu verzeichnen. Auch die Zusammensetzung der PZM aus den unterschiedlichen Zellkategorien ändert sich im Verlauf massiv. So nimmt Kategorie 1 im Verlauf ab, Kategorie 2 nimmt insbesondere am Übergang von den DS zu den SC vermehrt zu. Für Kategorie 3 ist am Übergang von den DS zu den SC schon eine deutliche Zunahme zu verzeichnen, die am Übergang von den SC zu den BC massiv gesteigert ist. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

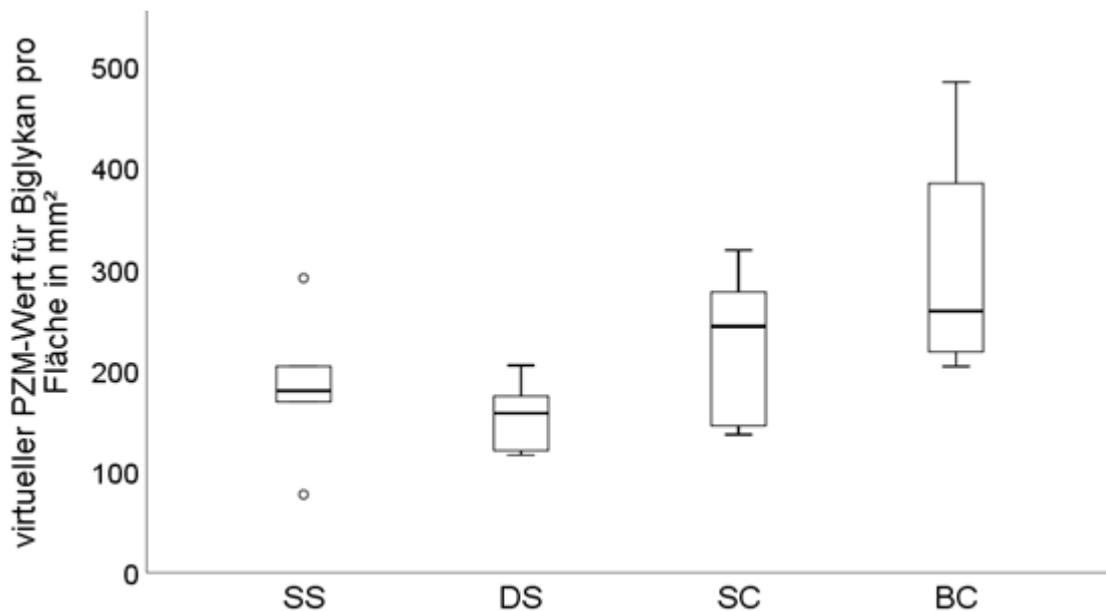
### 3.5.2 Analyse der PZM pro Fläche für Biglykan

Der virtuelle PZM-Wert pro Fläche für Biglykan zeigte einen Anstieg des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche mit einem Median von 179,73 in SS auf 258,58 in BC. Diese Zunahme war zwar nicht statistisch signifikant, jedoch konnte man bei einem  $p=0,066$  einen klaren Trend erkennen (**Tabelle 24**).

**Tabelle 24:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Biglykan. Zelldichte in Zellen pro mm<sup>2</sup>, auf die 2. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung:	Biglykan		
Zellmuster	Median	Spannweite	p-Wert
SS	179,73	213,92	0,066
DS	157,59	88,66	
SC	243,53	182,45	
BC	258,58	281,18	

Aufgrund des Trends bei Biglykan wurde für den direkten Vergleich der einzelnen zellulären Organisationsformen der Mann-Whitney-U-Test zur Bestimmung der p-Werte verwendet (**Tabelle 25**). So konnte bei Kollagen Typ VI zwischen DS und BC der größte Unterschied verzeichnet werden (**Abbildung 25**).



**Abbildung 25:** Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Biglykan. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Kollagen Typ VI bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die Fläche in mm<sup>2</sup>. Es ist eine leichte Zunahme im Verlauf der fortschreitenden Degeneration mit dem größten Unterschied zwischen DS und BC erkennbar. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

**Tabelle 25:** Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Biglykan. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters

Vergleich der Zellmuster (Biglykan)	p-Wert
SS - DS	0,262
SS - SC	0,423
SS - BC	0,055
DS - SC	0,109
DS - BC	0,019
SC - BC	0,394

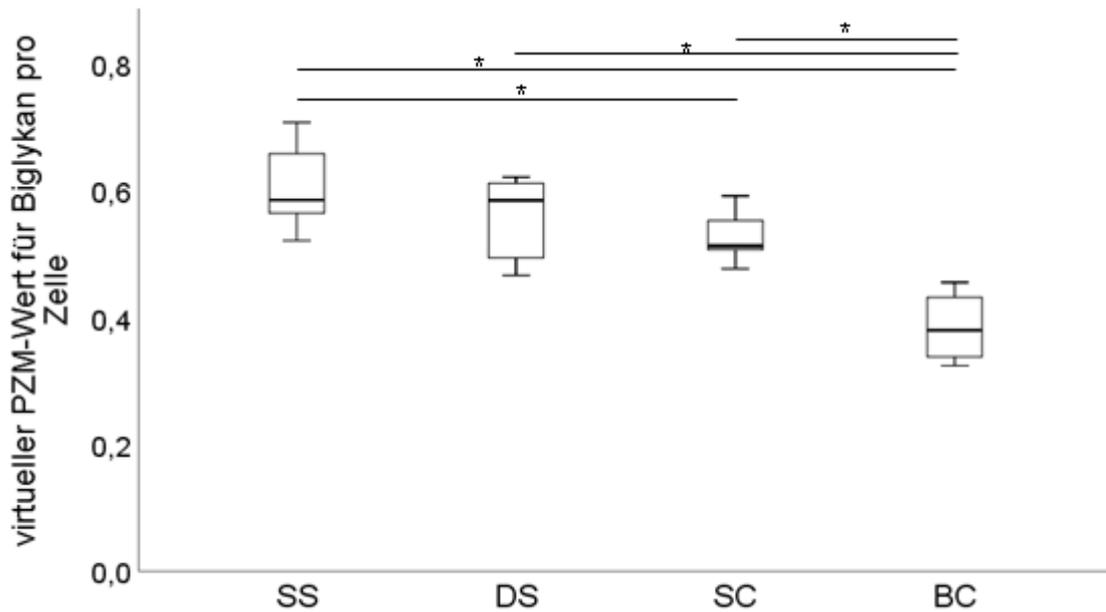
### 3.5.3 Analyse der PZM pro Zelle für Biglykan

Vergleicht man den virtuellen PZM-Wert pro Zelle von Biglykan, zeigte sich im Verlauf der zellulären Umorganisation eine klare Abnahme (**Abbildung 26**). Der Abfall der Werte bewies sich auch im Kruskal-Wallis-Test mit  $p=0,007$  als statistisch signifikant (**Tabelle 26**).

**Tabelle 26:** Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Biglykan. Zelldichte in Zellen pro  $\text{mm}^2$ , auf die 3. Nachkommastelle gerundet, Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

Färbung:	Biglykan		
Zellmuster	Median	Spannweite	p-Wert
SS	0,586	0,19	0,007
DS	0,586	0,16	
SC	0,514	0,11	
BC	0,381	0,13	

In der darauf folgenden Post-hoc-Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen SS und SC, SS und BC, DS und BC und außerdem zwischen SC und BC (**Tabelle 27**).



**Abbildung 26:** Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Biglykan. Die Boxplots zeigen den Median der PZM für Biglykan bei fortschreitender zellulärer Umorganisation in Bezug auf die einzelne Zelle. Es ist ein Abnahme im Verlauf der fortschreitenden Degeneration mit signifikanten Unterschieden (\* $p < 0,05$ ) zwischen SS und SC, SS und BC, DS und BC und des Weiteren zwischen SC und BC erkennbar. Abkürzungen: PZM = perizelluläre Matrix; SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

**Tabelle 27:** Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle der verschiedenen Zellmuster für Biglykan. Signifikanzberechnung mittels Mann-Whitney-U-Test. Abkürzungen: SS = Single Strings; DS = Double Strings; SC = Small Clusters; BC = Big Clusters.

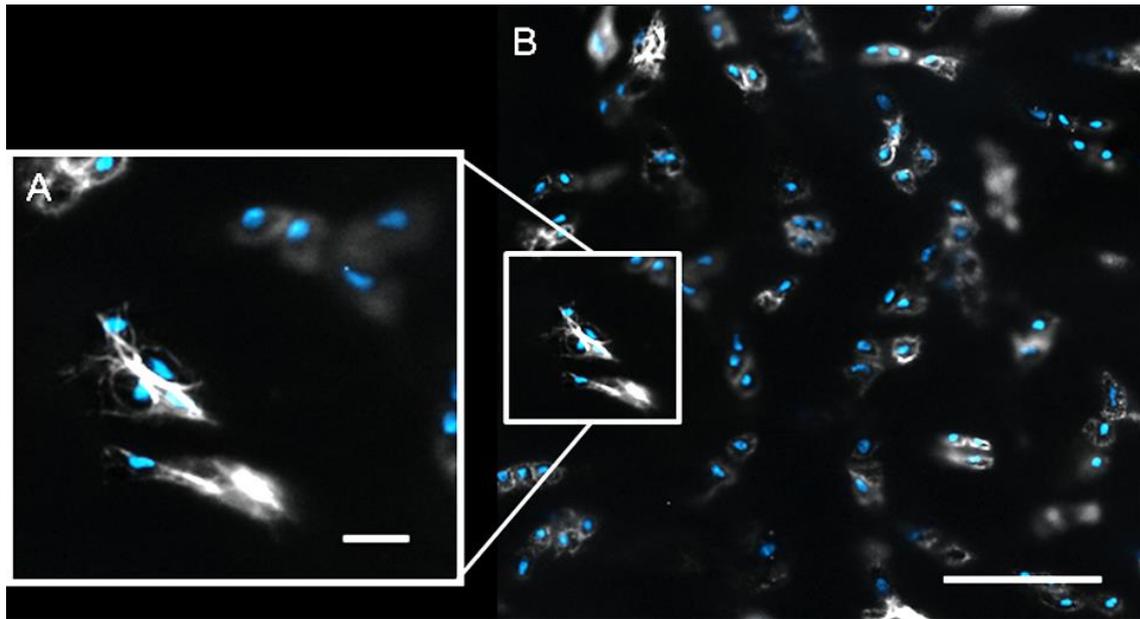
Vergleich der Zellmuster (Biglykan)	p-Wert
SS - DS	0,522
SS - SC	0,037
SS - BC	0,011
DS - SC	0,337
DS - BC	0,011
SC - BC	0,011

### 3.6 Fibrillin-1

#### 3.6.1 Veränderungen der PZM für Fibrillin-1

## Ergebnisse

Um den Knorpel im Querschnitt beurteilen zu können, war es notwendig, das verbliebene Knochenmaterial am Knorpel vor dem Schneiden am Kryotom zu entkalken. Um das Kalzium aus dem Knochen heraus zu lösen, wurde der Chelatbinder EDTA verwendet. Der Fibrillin-Komplex enthält allerdings Kalzium als zentrales Ion. Durch das Entkalken mit EDTA wurde vermutlich auch das Kalzium aus dem Fibrillin-Komplex herausgelöst und somit die quartäre Proteinstruktur zerstört. Dadurch veränderte sich vermutlich auch die spezifische Bindungsstelle für den Antikörper gegen Fibrillin-1. Eine Immunhistochemie mit dem Fibrillin-1-Antikörper war somit entsprechend des Protokolls für die anderen Färbungen für den Querschnitt erfolglos. Auch der Versuch, nach dem Entkalken erneut mit Hitze und Kalziumchlorid dem Fibrillin-1 neue Kalziumionen zur Verfügung zu stellen, wie von (Kielty and Shuttleworth 1993) zuvor beschrieben, führte höchstwahrscheinlich aufgrund der zu hohen EDTA Konzentration und der zu starken Zerstörung, nicht zu einer Renaturierung. Somit konnte keine Beurteilung am gesamten Knorpel und der Bezug zu den Schichten, sowie zu den Zellmustern stattfinden. Durch den Verzicht auf das Entkalken konnte allerdings aus der oberflächlichen Zone eine Probe parallel zur Oberfläche geschnitten werden. Hierbei gelang es Fibrillin-1 anzufärben. Man kann hier die perizelluläre Ansammlung von Fibrillin-1, mit faserartigen Ausläufern von der Zelle in die Peripherie, beobachten (**Abbildung 27**).



**Abbildung 27:** Zellmuster mit Anfärbung des Fibrillin-1 in der perizellulären Matrix. Fluoreszenzaufnahme, Zellkerne gefärbt mit DAPI (hellblau) und perizelluläre Matrix mit Fibrillin-1-Antikörper (weiß). **(A)** Vergrößerte Aufnahme der perizellulären Matrix mit Ausläufern, die von der Zelle in die Peripherie ziehen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  **(B)** Übersichtsaufnahme mit perizellulär angefarbtem Fibrillin-1. Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

## 4 Diskussion

Die PZM als zentraler Vermittlungspunkt zwischen Zelle und Umgebung hat sowohl großen Einfluss auf die Zelle, als auch auf die restliche EZM. Sie bindet Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Chemokine (Vincent, McLean et al. 2007) und kann somit sowohl für lokale Konzentrationserhöhungen als auch für Inaktivierung durch Bindung sorgen. Die Signalmoleküle wiederum haben direkte Auswirkungen auf den Zellmetabolismus. Die EZM und damit die gesamte Knorpelarchitektur wird durch die PZM zentral gesteuert, indem sie beispielweise die Bildung der Kollagen Typ II Fibrillen beeinflusst (Soder, Hambach et al. 2002). Außerdem moduliert und überträgt sie die im Knorpel wirkenden Kräfte auf die einzelnen Zellen über mechanosensitive Ionenkanäle (Youn, Choi et al. 2006). Auch bei Inflammation zeigt sie chondroprotektive Effekte (Chu, Zhang et al. 2017). Arthrose betrifft zwar das gesamte Gelenk, wirkt sich allerdings primär auf den hyalinen Gelenkknorpel aus. Der Metabolismus ist gestört und die Veränderungen zeichnen sich auch auf zellulärer Ebene ab. Es liegt nahe, dass die Veränderungen sowohl zum Teil reaktiv als Kompensation des veränderten Stoffwechsels, zum Teil aber vermutlich auch durch den veränderten Stoffwechsel selbst zustande kommen. Es liegt auch nahe, dass die PZM als zentrales Modulationsorgan für den Knorpelstoffwechsel eine tragende Rolle spielt. So konnten auch Guilak und Nims et al. sowie Liu und Wang et al. den Verdacht bestärken, dass der Erhalt der PZM Integrität sowohl den Beginn, als auch den irreversiblen fortschreitenden Verlauf von Arthrose positiv beeinflussen könnte (Guilak, Nims et al. 2018, Liu, Wang et al. 2018).

Obwohl es bisher viele Studien zu der PZM und ihren biomechanischen Eigenschaften gibt, wurden hauptsächlich Kollagen Typ VI und Perlekan als repräsentative Vertreter untersucht. Die weiteren Hauptkomponenten und insbesondere die Veränderung der Zusammensetzung bei Arthrose sind noch wenig untersucht. Im Verlauf der arthrotisch bedingten Knorpeldegeneration konnte nachgewiesen werden, dass die zunehmende Knorpelschädigung mit einer zellulären Umorganisation einhergeht. Die Änderung der Zellorganisation dient als Grundlage für einen optischen Biomarker, der den Progress der Arth-

rose auf zellulärer Basis widerspiegelt. Anhand dieses zellulären Biomarkers konnte gezeigt werden, dass sich nicht nur die EZM, sondern auch die PZM in ihren biomechanischen Eigenschaften, wie der Steifigkeit, ändert. In diesem Zusammenhang konnte auch bereits immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass sich damit einhergehend Kollagen Typ VI und Perlekan in der PZM verändern. (Danalache, Kleinert et al. 2019)

Ziel der hier präsentierten Studie war es, die Veränderungen in der PZM als Funktion der zellulären Umorganisation bei Arthrose zu untersuchen. Dazu wurden fünf Hauptkomponenten ausgewertet: Kollagen Typ VI und Kollagen Typ III als Vertreter der Kollagene, Perlekan und Biglykan als wichtige Proteoglykane und Fibrillin-1 als Vertreter der Glykoproteine. Die Hypothese war, dass sich die verschiedenen Komponenten der PZM ändern und diese Veränderungen mit denen in der Zellorganisation vorkommenden korrelieren. Vermutet wurde insbesondere, dass es zu einem zunehmenden Verlust der Integrität der PZM im Rahmen der zunehmenden Gewebedegeneration kommt.

## 4.1 Methodik

Untersucht wurde humaner Knorpel von Patienten mit diagnostizierter Gonarthrose. Die Arbeit mit humanen Knorpelproben entspricht zwar sehr nah der tatsächlichen Situation in vivo, zog allerdings auch einige Einschränkungen mit sich: Damit die Antikörper durch das dicke Kollagenmaschenwerk zu den Zellen und zur PZM durchdringen konnten, mussten die Knorpelproben enzymatisch angedaut werden. Durch die enzymatische Zersetzung sind mögliche Artefakte denkbar. Außerdem mussten die Proben, um mit anliegender Knorpel-Knochen-Übergangszone geschnitten werden zu können, entkalkt werden. Durch den Entkalkungsprozess mittels EDTA kam es zu einer irreversiblen Zerstörung der Quartärstruktur von Fibrillin-1. Der Versuch einer Wiederherstellung mittels CaCl<sub>2</sub> wie von Kielty et al. beschrieben, zeigte keinen Erfolg. Dies könnte der langen Dauer des Entkalkens und der hohen Konzentration des EDTAs geschuldet sein. In der Tat konnten Kielty et al. zeigen, dass die Denaturierung

des Fibrillin-1 durch Kalziumentzug nur bis zu einem gewissen Grad reversibel ist (Kielty and Shuttleworth 1993).

Bei den zellulären Organisationsmustern handelt es sich um Verteilungen im dreidimensionalen Raum. Folglich konnten bei dickeren Schnitten die angrenzenden Zellen besser ins Gesamtbild mit einbezogen werden. Außerdem wurde durch eine gewisse Mindestdicke bei der Verarbeitung die Stabilität und somit die Unversehrtheit der Präparate gewährt. Bei zweidimensionalen Bildaufnahmen konnte letztlich jedoch nur eine Fokusebene scharf aufgenommen werden. Auch das Durchdringen der Antikörper war bei geringerer Dicke besser. Somit kann die Schnittdicke von 35  $\mu\text{m}$  als Kompromiss zwischen diesen Aspekten betrachtet werden. Eine mögliche Lösung dieser Problematik wäre für die Zukunft eine dreidimensionale Aufnahme des Gewebes, wie beispielsweise mittels hochauflösender  $\mu\text{-CT}$ . Durch die beschriebene Problematik der unscharfen Ebenen auf einer Aufnahme, ist möglicherweise die erhöhte Anzahl von Zellen, die der Kategorie 2 zugeordnet wurden, im noch intakten Knorpel mit vielen SS erklärbar. Bei der Aufnahme von den sehr großen zusammenhängenden Knorpelstücken konnte teilweise eine unterschiedliche Helligkeit innerhalb eines Schnittes beobachtet werden. Diese könnte möglicherweise durch unterschiedliche Penetration des Antikörpers in das Gewebe oder eine inhomogene Verteilung der Antikörper erklärt werden. Hierdurch bedingt ist insbesondere bei den Mosaikaufnahmen die Belichtungszeit ein Kompromiss zwischen den beiden Extremen. Zur Verbesserung der späteren visuellen Beurteilung wurde für die individuell zu beurteilenden Bereiche der Kontrast etwas hervorgehoben. Außerdem wurde die Farbe des roten Kanals auf weiß geändert und die des blauen Kanals auf hellblau, um den Kontrast zum schwarzen Hintergrund der Bilder für das menschliche Auge zu maximieren.

## 4.2 Veränderungen der einzelnen PZM-Komponenten

Es konnte gezeigt werden, dass sich die PZM im Verlauf der zellulären Umorganisation von SS zu BC sowohl in ihrer Zusammensetzung aus den einzelnen Strukturproteinen, als auch in ihrer Integrität und Form ändert. Somit stützen die

gewonnenen Ergebnisse das Modell des zellulären Biomarkers für lokale Gewebeschädigung anhand der Zellorganisation. Wie von Danalache et al. gezeigt, ändert sich die PZM auch in ihren biomechanischen Eigenschaften korrelierend mit der veränderten Zellorganisation. (Danalache, Kleinert et al. 2019) Auch hier wurden schon Änderungen von Kollagen Typ VI und Perlekan beschrieben. Diese Änderungen konnten nun durch die Analyse weiterer Strukturproteine der PZM genauer präzisiert werden.

#### 4.2.1 Veränderungen von Kollagen Typ VI

Bei Kollagen Typ VI konnte der schrittweise fortschreitende Verlauf korrelierend zur zellulären Umorganisation beobachtet werden. Während man bei SS und DS noch eine klare, scharf begrenzte perizelluläre Anfärbung von Kollagen VI erkennen konnte, wurde das Signal bei SC bereits geringer und war bei BC kaum noch vorhanden sowie diffus verteilt. In der semiquantitativen Auswertung zeigte sich eine Zunahme der Zellen mit diffuser oder fehlender PZM der Kategorie 3. Diese Zunahme erfolgte sowohl in absoluten Zahlen als auch anteilmäßig. Daraus konnte somit eine Abnahme von Kollagen Typ VI in der PZM bei zunehmender Degeneration und damit einhergehender Zellumorganisation gefolgert werden. Bei Betrachtung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche zeigte Kollagen Typ VI den größten Anstieg zwischen den SC und den BC. Insgesamt nahm allerdings die Zellzahl im Verlauf der zellulären Umorganisation zu und damit korrelierend auch die PZM pro Fläche. Bei Betrachtung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle war Kollagen Typ VI jedoch im Verlauf stark rückläufig. Insgesamt zeigten sich hier für Kollagen Typ VI bereits im Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede ( $p=0,012$ ) und stützen die beobachtete Fragmentierung und Abnahme der PZM.

Kollagen Typ VI als typisches Strukturprotein der PZM (Poole, Ayad et al. 1992) wurde schon vielfach zuvor in gesundem und arthrotisch verändertem Knorpel beschrieben und untersucht. Durch seine wichtigen Funktionen als Schnittstelle zwischen Zelle und der EZM liegt es nahe, dass Kollagen Typ VI für die intakte Funktion der PZM wichtig ist. Besonders herausstechend ist die Bindung von

Kollagen Typ VI an Kollagen Typ II (Soder, Hambach et al. 2002), welches am häufigsten im hyalinen Knorpel vorkommt und die Basis für die Struktur der EZM bildet. Auch Kollagen Typ II ist bei Arthrose vermindert und liegt vermehrt denaturiert vor (Hollander, Heathfield et al. 1994). Durch die Verbindung der beiden Strukturproteine wäre hier eine wechselseitige Beeinflussung denkbar. Die gewonnenen Ergebnisse würden mit dieser Hypothese übereinstimmen. Auch weitere Autoren konnten bereits eine Veränderung des Kollagen Typ VI Gehalts feststellen: So wurde sowohl von Danalache et al. (Danalache, Kleinert et al. 2019) mittels quantitativer ELISA, als auch von Felka et al. (Felka, Rothdiener et al. 2016) mittels Immunofluoreszenz und „second harmonic generation multiphoton microscopy (SHG)“, einer Methode zur Quantifizierung der Kollagenintensität, eine Verminderung des Kollagen Typ VI insbesondere bei Clusterbildung beobachtet. Interessanterweise steht dem gegenüber, dass bei Clusterformationen und in der tieferen Zone des Knorpels eine erhöhte mRNA Expression festgestellt werden konnte (Pullig, Weseloh et al. 1999). Die vermutlich reaktiv erhöhte Synthese, trotz erniedrigter Konzentrationen in der Umgebung, spricht für einen Kollagen Typ VI Verlust durch abbauende Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass strukturelle Änderungen unter anderem von Kollagen Typ VI in der PZM bereits Einfluss auf die Mechanik und Kraftübertragung auf die Zellen hatten, auch wenn bis zu diesem Zeitpunkt noch keine makroskopischen Veränderungen sichtbar waren (Khoshgoftar, Torzilli et al. 2018). Auch die beschriebene optische Veränderung der PZM, die sich bei SS noch streng perizellulär präsentiert und dann zunehmend diffuser wird und ihre typische kapselartige Form verliert, könnte mit den Beobachtungen von Soder et al. (Soder, Hambach et al. 2002) übereinstimmen, welche eine Veränderung von perizellulär nach interterritorial bei Arthrose beschrieben haben. Insofern kann die hier in der semiquantitativen Auswertung der PZM pro Fläche beobachtete Zunahme an Kollagen Typ VI eher im Sinne der Zunahme des Verbreitungsareals gesehen werden, als im Sinne einer Zunahme der tatsächlichen absoluten Proteinmenge. In anderen Geweben spielt Kollagen Typ VI auch eine Rolle in der Modulation von Makrophagen und bei der Regeneration von peripheren Nerven (Chen, Cescon et al. 2015). Ähnliche

Funktionen wären auch im Knorpel denkbar, wodurch ein Funktionsverlust und eine Abnahme von Kollagen Typ VI die Progression von Arthrose fördern würde.

Auffallend waren allerdings vereinzelte BC mit sehr viel Kollagen Typ VI in ihrer perizellulären Umgebung. Ungewöhnlich war hier die übermäßig starke Helligkeit, die sonst bei keinen anderen Zellen zu beobachten war. Aufgrund der weit überwiegenden Mehrzahl an BC mit diffuser PZM und auch der ungewöhnlich starken Helligkeit wäre es denkbar, dass es sich hierbei um ein Artefakt handeln könnte. Ansonsten wäre es möglich, dass es eine zweite Art von BC mit überschießender Kollagen Typ VI Produktion gibt. Bereits Hambach et al. (Hambach, Neureiter et al. 1998) konnten aufzeigen, dass in manchen Gewebeproben signifikant erhöhte mRNA Expression für Kollagen Typ VI sogar in der oberflächlichen Zone vorkommt, während andere Proben dies nicht aufwiesen. Möglicherweise könnten hier Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen. So zeigten Horikawa et al. bereits auf, dass sich die Kollagen Typ VI Menge um Chondrozyten in Zellkulturen nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1, einem Wachstumsfaktor der auch im Knorpel an der Homöostase beteiligt ist, vermehrt (Horikawa, Nakajima et al. 2004). Des Weiteren konnte schon zuvor gezeigt werden, dass die lösliche Form von Kollagen Typ VI sowohl in gesundem Knorpel, als auch in Knorpel mit Arthrose die Proliferation von Chondrozyten anregt (Smeriglio, Dhulipala et al. 2015). Denkbar wäre hier auch eine Mitbeteiligung an der Bildung der BC durch eine Formänderung des Kollagen Typ VI.

#### 4.2.2 Veränderungen von Kollagen Typ III

Bei Kollagen Typ III fällt auf, dass es bei fortschreitendem Verlauf der Gewebeschädigung sowohl perizellulär als auch interterritorial vermehrt vorkommt. Vor allem bei SC und BC ist die Veränderung der Lokalisation ausgeprägt. Im Gegensatz zu Kollagen Typ VI und Biglykan nimmt Kollagen Typ III pro Zelle nicht ab. Stattdessen kommt es am Übergang von den SC zu den BC zu einer massiven Zunahme von Kollagen Typ III pro Fläche, am ehesten als Folge der Zellvermehrung. Besonders die starke Zunahme von Zellen der Kategorie 2 und

der relativ geringen Anzahl von Zellen der Kategorie 3 spricht dafür, dass sich Kollagen Typ III bei zunehmender Degeneration reaktiv erhöht. Bei Betrachtung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche zeigte auch Kollagen Typ III den größten Anstieg zwischen den SC und den BC. Die allgemeine Zunahme der Zellzahl im Verlauf und die starke Zunahme an Zellen der Kategorie 2 könnte die Signifikanz für die PZM pro Fläche im Kruskal-Wallis-Test ( $p=0,033$ ) erklären. Der virtuelle PZM-Wert pro Zelle zeigte hingegen keine Signifikanz bei weitgehend gleichbleibendem Median. Dies deutet darauf hin, dass Kollagen Typ III reaktiv vermehrt produziert wird. Kollagen Typ III ist ein Protein, welches in Granulationsgewebe bei der Wundheilung eine tragende Rolle spielt (Hayakawa, Hashimoto et al. 1979) und möglicherweise somit auch im Knorpel wesentlich an Reparaturvorgängen beteiligt ist. Das erhöhte extrazelluläre Vorkommen könnte auf einen möglichen Heilungsversuch des Knorpels hindeuten. Der überwiegende Anteil an Zellen der PZM-Kategorie 1 mit Kollagen Typ III wurde auch hier bei den SS gefunden. Dies spricht für eine intakte PZM und passt zur bereits vorher beschriebenen perizellulären Lokalisation von Kollagen Typ III in gesundem Knorpel (Wotton and Duance 1994). Einhergehend mit der zunehmenden Zellzahl gab es im Verlauf immer mehr Zellen mit Kollagen Typ III in ihrer PZM. Selbst bei den BC war immer noch viel Kollagen Typ III erkennbar. Allerdings hatte es hier seine kapselartige Struktur verloren und war diffuser verteilt. Auffallend waren hier auch BC mit einer übermäßig starken Kollagen Typ III Ansammlung im perizellulären Bereich. Somit fand sich hier vor allem ein großer Anteil an Zellen der Kategorie 2. Passend dazu konnte das Vorkommen von Kollagen Typ III bei Clustern bereits von Hosseininia et al. (Hosseininia, Weis et al. 2016) beschrieben werden. Auffallend waren allerdings Regionen, in denen kein Kollagen Typ III zu finden war. Ob es sich hierbei um Artefakte durch ungenügende Antikörperdurchdringung des Gewebes handelt, ob die Expression von Kollagen Typ III herunterreguliert war oder ob das Kollagen Typ III bereits durch verschiedene matrixabbauende Enzyme wie MMPs abgebaut wurde, bleibt zum aktuellen Zeitpunkt ungeklärt. Interessant ist, dass in Osteophyten eine erhöhte Expression von Kollagen Typ II und Typ III vorhanden ist. Kollagen Typ III ist dabei sowohl perizellulär als auch interterritorial über den

gesamten Osteophyten verstreut (Aigner, Dietz et al. 1995). Die enge Lokalisation und Quervernetzung von Kollagen Typ III mit Kollagen Typ II spielt aber auch im Knorpel eine zentrale Rolle für die Neubildung von Kollagenfibrillen (Young, Lawrence et al. 2000, Wu, Weis et al. 2010). Kollagen Typ III scheint somit nicht nur bei der Knorpelhomöostase im gesunden Gewebe, sondern auch bei Arthrose eine zentrale Rolle zu spielen.

#### 4.2.3 Veränderungen von Perlekan

Perlekan zeigte sich in allen Zellmustern vorwiegend perizellulär, wie es auch schon bei Jugendlichen und Erwachsenen beschrieben wurde (Wilusz, Defrate et al. 2012). Die Zellen der Kategorie 1 nahmen anteilmäßig zwar ab, jedoch wurden es im Verlauf von SS zu BC immer mehr Zellen der Kategorie 2 mit diffusem aber doch ausgeprägtem Perlekananteil. Gleichzeitig gab es kaum Zellen ohne Perlekan in ihrer Umgebung (Kategorie 3). Dies bestätigt die Ergebnisse von Tesche et al, welche eine erhöhte Konzentration von Perlekan angrenzend zur Hauptdefektzone bei Arthrose beschrieben haben. (Tesche and Miosge 2004). Während die BC sonst kaum oder nur diffuse perizelluläre Anfärbungen aufweisen, fällt auf, dass Perlekan auch hier überwiegend zellbezogen und PZM-ähnlich auftritt. Bei Betrachtung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche nimmt Perlekan, einhergehend mit der steigenden Zellzahl, stark zu. Auch hier gibt es den größten Anstieg zwischen den SC und den BC. Die Zunahme der Zellzahl, aber auch die auffallende Zunahme an Zellen der Kategorie 2 besonders bei den BC, können hier die Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test ( $p=0,008$ ) erklären. Der Perlekangehalt in der PZM pro Zelle bleibt allerdings nahezu unverändert in Bezug auf das Ausgangsniveau. Perlekan als Modulator und Bindungspartner von vielen Gewebemediatoren ist nicht nur ein Marker in der Knorpelbildung (Chondrogenese), sondern kann sie zumindest in vitro auch fördern (French, Smith et al. 1999). Auch bei der Heilung von Knochenfrakturen wird Perlekan bereits in der frühen Phase vermehrt gebildet und trägt auch hier zur Heilung des Gewebes bei (Wang, Vishwanath et al. 2006). Ähnliches wäre auch für die Heilungsversuche des Knorpels denkbar. Es liegt somit nahe, dass

## Diskussion

Perlekan mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eine zentrale Rolle bei Arthrose spielt. Beispielhaft für die modulierende Funktion von Perlekan ist der Wachstumsfaktor Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) zu nennen. Die genaue Rolle die FGF-2 bei Arthrose ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings ist bekannt, dass FGF-2 im Knorpel an Perlekan gebunden vorliegt und somit perizellulär lokalisiert ist (Vincent, McLean et al. 2007). Da sich Perlekan sowohl in der Größe des Kernproteins (Melrose, Roughley et al. 2006) als auch in der Anzahl und Art der GAG-Ketten (Wilusz, Defrate et al. 2012) ändern kann, wäre es interessant, ob es eine Änderung der Perlekanstruktur im Verlauf der Umorganisation gibt. Denn je nach Struktur kann FGF-2 mit unterschiedlicher Stärke gebunden werden (Knox, Merry et al. 2002). Bei Belastung des Gewebes konnte in Zellkulturen mit Chondrozyten nachgewiesen werden, dass es über die FGF2-abhängige Aktivierung der ERK sowohl zur Transduktion des mechanischen Reizes in Signalkaskaden in der Zelle, als auch zur Hemmung von MMP-1 kommt (Vincent, Hermansson et al. 2004). Die funktionelle Rolle von Perlekan für die Mechanotransduktion und Regulation von matrixabbauenden Enzymen scheint somit wichtig. Durch den Abbau von Perlekan bei Arthrose könnte das somit vermehrt freivorliegende FGF-2 (Malemud 2010) seine knorpelschützende Funktion (Chia, Sawaji et al. 2009) verlieren. Ein weiteres Signalprotein, welches an Perlekan bindet und somit durch Perlekan mit reguliert wird, ist das bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (Decarlo, Belousova et al. 2012). Es gehört zu der Gruppe der TGF- $\beta$  Wachstumsfaktoren. BMP-2 spielt eine wichtige Rolle in der Produktion der EZM (Srinivasan, McCoy et al. 2012). Insbesondere bei Arthrose konnte eine erhöhte Expression von BPM-2 nachgewiesen werden (Blaney Davidson, Vitters et al. 2006). Es lässt sich folglich vermuten, dass BMP-2, und somit auch Perlekan, auf die Reparaturversuche bei Arthrose einen Einfluss haben könnten. Zusätzlich bindet Perlekan an  $\beta$ 1-Integrin (Hayashi, Madri et al. 1992) und kann somit an Zellen binden und mit ihnen interagieren. Durch die Nähe von  $\beta$ 1-Integrin zu verschiedenen Transportermolekülen, wie der Na-K-ATPase und spannungsabhängigen Calciumkanälen (Shakibaei and Mobasheri 2003) bei Chondrozyten von Mäusen, sind ähnliche Formationen und Interaktionen für den Mensch denkbar.

#### 4.2.4 Veränderungen von Biglykan

Biglykan zeigte sich bei SS und DS noch klar perizellulär wie auch schon von Miosge et al. (Miosge, Flachsbar et al. 1994) beschrieben wurde. Am Übergang zu SC und BC fiel allerdings auf, dass Biglykan entweder lakunär oder direkt am Zellkern auftrat. Hier kam es zu einem Wandel. Die lakunäre Färbung grenzte sich scharf zur Zelle hin und mit auffälligem Abstand ab. Dieser Abstand war bei den anderen Färbungen nicht zu verzeichnen. Es scheint, als komme es hier zu einer Verschiebung von perizellulär nach territorial. Das veränderte Vorkommen wurde auch schon in den Untersuchungen von Bock, Michaeli et al. aufgezeigt. Sie beschrieben bei Arthrose, im Gegensatz zu gesundem Knorpel, eine Erhöhung von interterritorialem Perlekan (Bock, Michaeli et al. 2001). Das direkt an den Zellkern angrenzende Biglykan könnte sich hierbei intrazellulär befinden. Vermutlich handelt es sich um synthetisiertes Biglykan. Auch das entspricht den Untersuchungen von Bock et. al., die aufgezeigt haben, dass die Biglykan-Synthese durch Erniedrigung des perizellulären Biglykans erhöht ist. Speziell bei Arthrose wurde die höchste Syntheseaktivität angrenzend zur Hauptdefektzone beschrieben (Bock, Michaeli et al. 2001). Es liegt somit nahe, dass die erhöhte Produktion kompensatorisch mit dem Verlust der PZM vor allem bei SC und BC einhergeht. Die kompensatorisch erhöhte Synthese passt zu den hier gewonnenen Ergebnissen, welche bereits eine signifikante Abnahme der PZM pro Zelle am Übergang von den DS zu den SC zeigten. Die Abnahme verstärkte sich jedoch bei den BC nochmal deutlich. Auch bei der Analyse des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle konnte man bei Biglykan einen massiven Rückgang, mit einer Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test ( $p=0,007$ ), verzeichnen. Betrachtet man hingegen den virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Biglykan, fällt auf, dass es schon am Übergang von den DS zu den SC zu einer großen Zunahme kommt, welche mit einem frühen Anstieg an Zellen der Kategorie 2 bei den SC übereinstimmt. Da Zellen, die der Kategorie 2 zugeordnet sind, einen Strukturverlust in der PZM haben, passt auch das zu den beschriebenen Veränderungen von Biglykan.

## Diskussion

Die scharfe Grenze mit etwas Abstand zur Zelle hin scheint den Übergang von Biglykan zur PZM darzustellen. Hier könnte es sein, dass Biglykan seine Funktion ändert, und nun für die Kommunikation zwischen der PZM und der restlichen EZM zuständig ist. Durch seine Interaktion mit anderen Strukturproteinen im Knorpel, wie Kollagen Typ II, wirkt es beim Aufbau des Kollagenfibrillennetzwerks mit (Douglas, Heinemann et al. 2006). Perlekan bindet aber auch typische Strukturproteine der PZM wie Kollagen Typ VI und Fibrillin-1 haltige Mikrofibrillen (Reinboth, Hanssen et al. 2002). Biglykan würde sich somit ideal als Mediator zwischen der Grenze der PZM und der interterritorialen Matrix anbieten. So kann Biglykan zum Beispiel auch als Signalmolekül direkt an Oberflächenrezeptoren von Makrophagen binden wie beispielweise Toll-like Rezeptor 2 und 4, und über Signalweiterleitung die Expression des Entzündungsmediators TNF $\alpha$  erhöhen (Schaefer, Babelova et al. 2005, Schaefer and Iozzo 2008). Interessant ist hierbei, dass der Entzündungsmediator TNF $\alpha$  bei Arthrose erhöht ist (Fernandes, Martel-Pelletier et al. 2002). Des Weiteren kann Biglykan den Signalweg des Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) hemmend beeinflussen (Moreno, Munoz et al. 2005). Die von BMP-4 regulierte Differenzierung von Chondrozyten bei Knorpelumbau wird auch bei Arthrose mit beeinflusst. Es konnte eine Abnahme der BMP-4 Konzentration in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (Bramlage, Haupl et al. 2006). Darüber hinaus spielt Biglykan auch bei der Wundheilung eine tragende Rolle. Besonders im Granulationsgewebe konnte eine Erhöhung von Biglykan verzeichnet werden. Interessanterweise kann dessen Expression durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 noch weiter gesteigert werden (Hakkinen, Westermarck et al. 1996). Allerdings kann Biglykan TGF- $\beta$ 1 auch direkt binden (Hildebrand, Romaris et al. 1994). Biglykan kommt somit eine nicht zu verachtende Mediatorposition zu: als Signalmolekül, Regulator und vielfacher Bindungspartner zwischen der PZM und der restlichen EZM zu.

#### 4.2.5 Veränderungen von Fibrillin-1

Fibrillin-1 stellte sich wie schon zuvor von Keene et al. (Keene, Jordan et al. 1997) beschrieben, als perizellulär, um die Knorpelzellen verdichtet, dar. Interessant waren hier die faserartigen Ausläufer, die vermutlich an der Kommunikation zwischen den Zellen mitbeteiligt sein könnten. Durch die Interaktion sowohl mit anderen Strukturproteinen wie Biglykan (Reinboth, Hanssen et al. 2002) und Perlekan (Tiedemann, Sasaki et al. 2005), als auch mit der Zelle direkt über Oberflächenrezeptoren wie Integrine (Pfaff, Reinhardt et al. 1996), scheint Fibrillin-1 eine wichtige Funktion bei der Bildung der EZM einzunehmen. Auch durch die Regulierung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$  und BMPs (Sengle, Ono et al. 2011), aber auch die Beeinflussung von matrixabbauenden Enzymen, wie Matrixmetalloproteinasen (Booms, Pregla et al. 2005), steuert Fibrillin-1 zu einem noch unbekanntem, aber vermutlich großen Teil den Auf- und Abbau der Knorpelmatrix. Die Entwicklung von Fibrillin-1 bei fortschreitendem Verlauf der Arthrose scheint somit relevant und sollte weiter untersucht werden.

### 4.3 Veränderung der PZM

#### 4.3.1 Bedeutung des virtuellen PZM-Wertes

Die Auszählung und Einteilung in die verschiedenen Kategorien erfolgte verblidet durch den Untersucher. Eine subjektive Beeinflussung der Beurteilung kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Gewichtung der Zellkategorien erfolgte nach Vorbild von Hofmann et al. (Hofmann, Steidle et al. 2018). Es wurde hierbei allerdings Augenmerk sowohl auf das Vorkommen der Strukturproteine in der PZM, als auch auf die strukturelle Form der PZM gelegt. Die Kategorie 1 kam mit ihrer intakten kapselartigen Form der in der Literatur beschriebenen Struktur der PZM am nächsten und wurde somit mit dem höchsten Wert gewichtet. Zellen der Kategorie 3, die keine oder nur noch rudimentäre Reste der untersuchten Strukturproteinen in ihrer perizellulären Mikroumgebung aufwiesen, wurden mit dem geringsten Wert gewichtet. Die Zellen der Kategorie

2 wiesen zwar ein Strukturdefizit auf, jedoch war noch das untersuchte Strukturprotein, wenn auch vermindert, perizellulär vorhanden. Durch den Wichtungsfaktor entstand somit ein virtueller Wert für die PZM. Dieser ermöglichte es, die Veränderungen im Verlauf der geänderten Zellorganisationformen zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Es liegt nahe, dass die Funktionen der PZM von mehreren Faktoren abhängig sind. Voraussetzung ist in erster Linie das Vorkommen und somit die Konzentration der Strukturproteine in der perizellulären Mikroumgebung. Darüber hinaus scheint auch die Zusammensetzung aus den unterschiedlichen Strukturproteinen eine wesentliche Rolle für die PZM zu spielen, da jeweils unterschiedliche Bindungspartner in Frage kommen und somit an unterschiedlichen Stoffwechselprozessen beteiligt sein können. Des Weiteren ist es logisch, dass auch die Architektur für die Funktion von großer Bedeutung ist. Nur durch die strukturelle Intaktheit kann die Kommunikation zu anderen Bindungspartnern und Gewebemediatoren geordnet funktionieren. Aber auch wirkende Kräfte können nur so koordiniert übertragen oder abgelenkt werden. Die genauen Auswirkungen der veränderten Struktur, Zusammensetzung und Menge der PZM auf den Knorpelstoffwechsel sind allerdings bis heute ungeklärt und sollten wichtiger Bestandteil weiterer Forschung sein.

### 4.3.2 Zunahme der PZM pro Fläche

Angesichts der geringen Fallzahl sollte den p-Werten, wenn isoliert betrachtet, nicht zu hohe Bedeutung beigemessen werden. Während die PZM pro Fläche mit den Mustern in allen Färbungen zunahm, konnte man ebenso in allen Untersuchungen sehen, dass es im Verlauf von SS und DS über SC zu BC konstant zu einer Zunahme der Zelldichte kam. Insbesondere bei den BC wurde die höchste Zelldichte verzeichnet. Die Anzahl der perizellulären Matrices die gezählt wurden, bezog sich auf die Zellen und geht somit mit der erhöhten Zellzahl einher. Hierbei konnte nicht die genaue Proteinmenge erfasst werden, sondern lediglich die Form der PZM, welche den Kategorien zugeordnet wurde. Im Vergleich zu Zellen der Kategorie 1 mit Wichtungsfaktor 0,75, zeigten die Zellen der Kategorie 2 bereits einen Strukturverlust, weshalb der Wichtungsfaktor für diese

Kategorie mit 0,5 schon geringer ausfiel. Durch eine hohe Anzahl von Zellen der Kategorie 2 fällt trotz Abnahme der Zellen der Kategorie 1 insgesamt der Wert für die PZM pro Fläche höher aus. Zusammenfassend lässt sich somit die Tendenz festhalten, dass immer mehr Zellen pro Fläche vorhanden waren, und dass auch insbesondere Zellen der Kategorie 2 zugenommen hatten. Durch diese Untersuchung wurde deutlich, dass eine alleinige Proteinmengenbestimmung des Gewebes möglicherweise zu falschen Schlussfolgerungen führen könnte. Deshalb sollte man die Proteinkonzentration in Relation zu der Zelldichte setzen.

#### 4.3.3 Abnahme der PZM pro Zelle

Um nun die Veränderungen für die einzelne Zelle besser beurteilen zu können, wurden die Werte für die virtuelle PZM durch die jeweilige Zelldichte dividiert. Je kleiner der Wert, desto schlechter war somit die Qualität der PZM. Erst hier wird der Strukturverlust der PZM und die mögliche Bedeutung auf die einzelne Zelle deutlich. Im Verlauf der zellulären Umorganisation und der damit einhergehenden Degeneration kam es bei allen Strukturproteinen der PZM zu einer Abnahme. Diese war jedoch individuell unterschiedlich stark, so dass nicht nur von einem Verlust an Strukturproteinen und Änderung der Lokalisation der Proteine in der PZM, sondern auch von einer geänderten Zusammensetzung aus den verschiedenen Anteilen ausgegangen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass sich die PZM sowohl in ihrer Zusammensetzung und Intaktheit als auch in ihrer Struktur im Verlauf von den SS über DS, SC und BC deutlich ändert. Die Änderung der Struktur wird von den Untersuchungen von Danalache et al. unterstützt, die bereits eine von der Zellorganisation abhängige Änderung der Steifigkeit zeigen konnten (Danalache, Kleinert et al. 2019). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass strukturelle Änderungen, unter anderem von Kollagen Typ VI in der PZM, bereits Einfluss auf die Mechanik und Kraftübertragung auf die Zellen hatten, auch wenn bis zu diesem Zeitpunkt noch keine makroskopischen Veränderungen sichtbar waren (Khoshgoftar, Torzilli et al. 2018). Noch ungeklärt bleiben die genauen Auswirkungen der veränderten Zusammensetzung und der Struktur

## Diskussion

der PZM auf den Metabolismus des Knorpels. Durch die Interaktion der Strukturproteine der PZM mit verschiedenen Rezeptoren, Gewebemediatoren und anderen Strukturproteinen liegt eine wechselseitige Beeinflussung und eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Arthrose sehr nahe.

## 5 Zusammenfassung

Arthrose als weltweit sehr häufige degenerative Gelenkerkrankung geht bisher mit einem schmerzhaften chronisch progressiven Verlauf ohne Aussicht auf Heilung einher. Hierbei kommt es primär zu einer Destruktion des hyalinen Gelenkknorpels. Untersuchungen zeigen, dass schon früh mikroskopisch Änderungen der Knorpelstruktur und der zellulären Anordnung beobachtet werden können, bevor makroskopische Veränderungen sichtbar werden. Die Einteilung nach der zellulären Organisation eröffnet die Möglichkeit, die Zellmuster als bildbasierten Biomarker zu verwenden. Die Chondrozyten sind im intakten Knorpel umgeben von ihrer perizellulären Matrix (PZM,) die die Zellen geflechtartig wie eine Kapsel umgibt. Als wichtige Schnittstelle zwischen der Zelle und ihrer Umgebung erfüllt sie viele Funktionen in Bezug auf die Zellkommunikation, die Modulation der Zellbiosynthese, den Zellschutz vor Apoptose und Inflammation, der Zellintegrität und der biomechanischen Übertragung und Verteilung wirkender Kräfte auf die Zellen. In der aktuellen Arbeit wurden die Veränderungen der Strukturproteine der PZM Kollagen Typ VI, Kollagen Typ III, Perlekan, Biglykan und Fibrillin-1 bei Arthrose als Funktion der veränderten zellulären Organisation untersucht. Dazu wurde der hyaline Gelenkknorpel der Femurkondylen von Patienten mit Gonarthrose verwendet. Die untersuchten Strukturproteine wurden mittels Immunfluoreszenz sichtbar gemacht und anschließend semiquantitativ und qualitativ ausgewertet. Die Hypothese, dass die Integrität der PZM im Verlauf der zellulären Umorganisation stark abnimmt und sich die Zusammensetzung ändert, konnte bestätigt werden. Es zeigte sich für die untersuchten Proteine ein individueller Verlauf, allerdings konnte durchweg eine Zerstörung der kapselartigen Struktur mit fortschreitender zellulärer Organisationsänderung beobachtet werden. Durch die Beteiligung der Strukturproteine an verschiedenen Stoffwechselprozessen im Knorpel liegt es nahe, dass sich die Änderungen in der PZM direkt auf den Metabolismus auswirken. Des Weiteren sind vermutlich die anderen Funktionen wie der Schutz der Zellen und die koordinierte Übertragung wirkender Kräfte nicht mehr gewährleistet.

## 6 Verzeichnis

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACT	.....	autologe Chondrozytentransplantation
AMIC	.....	autologe matrixinduzierte Chondrogenese
BC	.....	Big Clusters
BMP-2	.....	Bone morphogenetic protein-2
BMP-4	.....	Bone morphogenetic protein-4
BSA	.....	Bovine serum albumin
DS	.....	Double Strings
EDTA	.....	Ethylendiaminetetraacetic acid
EGF	.....	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	.....	Extracellular-signal Regulated Kinases
EZM	.....	Extazellulärmatrix
FGF-2	.....	Fibroblast growth factor 2
GAG	.....	Glucosaminoglykane
IgG	.....	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	.....	Interleukin-1 $\beta$
Knie-TEP	.....	Kniegelenkstotalendoprothese
MMP	.....	Matrixmetalloproteinase
PZM	.....	perizelluläre Matrix
SC	.....	Small Clusters
SS	.....	Single Strings
TGF- $\beta$ 1	.....	Transforming growth factor beta 1
TNF- $\alpha$	.....	Tumornekrosefaktor- $\alpha$

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Zonen des hyalinen Gelenkknorpels.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Zonen innerhalb der Extrazellulären Matrix im hyalinen Knorpel .....	5
<b>Abbildung 3:</b> Zuschneiden am Kryotom.....	24
<b>Abbildung 4:</b> Kategorien für die Zellzuordnung.....	28
<b>Abbildung 5:</b> Übersicht Querschnittaufnahme mit Auswahl der Zonen zur statistischen Auswertung .....	29
<b>Abbildung 6:</b> Klinische Daten der untersuchten Patientenproben .....	31
<b>Abbildung 7:</b> Zunahme der Zelldichte bei fortschreitender Zellumorganisation.....	33
<b>Abbildung 8:</b> Zellmuster mit Anfärbung des Kollagen Typ VI in der perizellulären Matrix .....	35
<b>Abbildung 9:</b> Big Clusters mit Anfärbung des Kollagen Typ VI in der perizellulären Matrix .....	36
<b>Abbildung 10:</b> Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Kollagen Typ VI .....	38
<b>Abbildung 11:</b> Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ VI .....	40
<b>Abbildung 12:</b> Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Kollagen Typ VI .....	42
<b>Abbildung 13:</b> Zellmuster mit Anfärbung des Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix .....	44
<b>Abbildung 14:</b> Anfärbung des Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix ....	45
<b>Abbildung 15:</b> Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Kollagen Typ III.....	46
<b>Abbildung 16:</b> Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Kollagen Typ III in der perizellulären Matrix der einzelnen zellulären Organisationsformen .....	47
<b>Abbildung 17:</b> Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Kollagen Typ III.....	49
<b>Abbildung 18:</b> Zellmuster mit Anfärbung von Perlekan in der perizellulären Matrix .....	50
<b>Abbildung 19:</b> Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Perlekan .....	51
<b>Abbildung 20:</b> Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Perlekan .....	52

<b>Abbildung 21:</b> Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Perlekan .....	54
<b>Abbildung 22:</b> Zellmuster mit Anfärbung des Biglykans in der perizellulären Matrix .....	55
<b>Abbildung 23:</b> Anfärbung des Biglykans in der perizellulären Matrix.....	56
<b>Abbildung 24:</b> Verteilung der Zelldichten der unterschiedlichen Kategorien in den einzelnen Zellmustern für Biglykan .....	57
<b>Abbildung 25:</b> Virtueller PZM-Wert pro Fläche für Biglykan .....	58
<b>Abbildung 26:</b> Virtueller PZM-Wert pro Zelle für Biglykan .....	60
<b>Abbildung 27:</b> Zellmuster mit Anfärbung des Fibrillin-1 in der perizellulären Matrix .....	62

## 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Geräte und Instrumente .....	16
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete primäre Antikörper .....	17
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete sekundäre Antikörper .....	17
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Zellkernfärbung .....	18
<b>Tabelle 5:</b> Reagenzienliste .....	18
<b>Tabelle 6:</b> verwendete Enzyme .....	19
<b>Tabelle 7:</b> Verbrauchsmaterialien .....	19
<b>Tabelle 8:</b> Verwendete Software.....	20
<b>Tabelle 9:</b> Lösungen.....	21
<b>Tabelle 10:</b> Zuordnung Antikörper .....	26
<b>Tabelle 11:</b> Kategorien zur Einteilung der PZM.....	28
<b>Tabelle 12:</b> Verteilung der Zelldichten .....	32
<b>Tabelle 13:</b> Post-hoc Analyse der Zelldichten in den Zellmustern .....	33
<b>Tabelle 14:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Kollagen Typ VI .....	39
<b>Tabelle 15:</b> Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Kollagen Typ VI .....	40
<b>Tabelle 16:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Kollagen Typ VI .....	41
<b>Tabelle 17:</b> Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle der verschiedenen Zellmuster für Kollagen Typ VI .....	42
<b>Tabelle 18:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Kollagen Typ III.....	47
<b>Tabelle 19:</b> Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Kollagen Typ III.....	48
<b>Tabelle 20:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Kollagen Typ III.....	48
<b>Tabelle 21:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Perlekan ....	52
<b>Tabelle 22:</b> Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Perlekan .....	53
<b>Tabelle 23:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Perlekan .....	53

<b>Tabelle 24:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche für Biglykan.....	58
<b>Tabelle 25:</b> Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Fläche der verschiedenen Zellmuster für Biglykan.....	59
<b>Tabelle 26:</b> Verteilung des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle für Biglykan.....	59
<b>Tabelle 27:</b> Vergleich des virtuellen PZM-Wertes pro Zelle der verschiedenen Zellmuster für Biglykan.....	60

## 7 Literaturverzeichnis

Adam, M. and Z. Deyl (1983). "Altered expression of collagen phenotype in osteoarthritis." Clin Chim Acta **133**(1): 25-32.

Aicher, W. K. and B. Rolauffs (2014). "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 **73**(4): 645-653.

Aigner, T., W. Bertling, H. Stoss, G. Weseloh and K. von der Mark (1993). "Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage." J Clin Invest **91**(3): 829-837.

Aigner, T., U. Dietz, H. Stoss and K. von der Mark (1995). "Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes." Lab Invest **73**(2): 236-243.

Alexopoulos, L. G., G. M. Williams, M. L. Upton, L. A. Setton and F. Guilak (2005). "Osteoarthritic changes in the biphasic mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage." J Biomech **38**(3): 509-517.

Arikawa-Hirasawa, E., W. R. Wilcox, A. H. Le, N. Silverman, P. Govindraj, J. R. Hassell and Y. Yamada (2001). "Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene." Nat Genet **27**(4): 431-434.

Aviezer, D., D. Hecht, M. Safran, M. Eisinger, G. David and A. Yayon (1994). "Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis." Cell **79**(6): 1005-1013.

Bianco, P., L. W. Fisher, M. F. Young, J. D. Termine and P. G. Robey (1990). "Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues." J Histochem Cytochem **38**(11): 1549-1563.

Bidanset, D. J., C. Guidry, L. C. Rosenberg, H. U. Choi, R. Timpl and M. Hook (1992). "Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI." J Biol Chem **267**(8): 5250-5256.

Blaney Davidson, E. N., E. L. Vitters, P. M. van der Kraan and W. B. van den Berg (2006). "Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation." Ann Rheum Dis **65**(11): 1414-1421.

Bock, H. C., P. Michaeli, C. Bode, W. Schultz, H. Kresse, R. Herken and N. Miosge (2001). "The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **9**(7): 654-663.

Booms, P., R. Pregla, A. Ney, F. Barthel, D. P. Reinhardt, A. Pletschacher, S. Mundlos and P. N. Robinson (2005). "RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome." Hum Genet **116**(1-2): 51-61.

Bramlage, C. P., T. Haupl, C. Kaps, U. Ungethum, V. Krenn, A. Pruss, G. A. Muller, F. Strutz and G. R. Burmester (2006). "Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **8**(3): R58.

Brody, L. T. (2015). "Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function." Physical Therapy in Sport **16**(4): 301-316.

Chang, J., H. Nakajima and C. A. Poole (1997). "Structural colocalisation of type VI collagen and fibronectin in agarose cultured chondrocytes and isolated chondrons extracted from adult canine tibial cartilage." J Anat **190 ( Pt 4)**: 523-532.

Chen, P., M. Cescon, G. Zuccolotto, L. Nobbio, C. Colombelli, M. Filaferro, G. Vitale, M. L. Feltri and P. Bonaldo (2015). "Collagen VI regulates peripheral nerve regeneration by modulating macrophage recruitment and polarization." Acta Neuropathol **129**(1): 97-113.

Chia, S. L., Y. Sawaji, A. Burleigh, C. McLean, J. Inglis, J. Saklatvala and T. Vincent (2009). "Fibroblast growth factor 2 is an intrinsic chondroprotective agent that suppresses ADAMTS-5 and delays cartilage degradation in murine osteoarthritis." Arthritis Rheum **60**(7): 2019-2027.

Choi, J. B., I. Youn, L. Cao, H. A. Leddy, C. L. Gilchrist, L. A. Setton and F. Guilak (2007). "Zonal changes in the three-dimensional morphology of the chondron under compression: the relationship among cellular, pericellular, and extracellular deformation in articular cartilage." J Biomech **40**(12): 2596-2603.

Christianson, H. C. and M. Belting (2014). "Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor." Matrix Biol **35**: 51-55.

Chu, W. C., S. Zhang, T. J. Sng, Y. J. Ong, W. L. Tan, V. Y. Ang, C. B. Foldager and W. S. Toh (2017). "Distribution of pericellular matrix molecules in the temporomandibular joint and their chondroprotective effects against inflammation." Int J Oral Sci **9**(1): 43-52.

Chubinskaya, S., K. E. Kuettner and A. A. Cole (1999). "Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints." Lab Invest **79**(12): 1669-1677.

Chung, E. and E. J. Miller (1974). "Collagen polymorphism: characterization of molecules with the chain composition (alpha 1 (3)03 in human tissues." Science **183**(130): 1200-1201.

Cohen, M., Z. Kam, L. Addadi and B. Geiger (2006). "Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes." Embo j **25**(2): 302-311.

Costell, M., E. Gustafsson, A. Aszodi, M. Morgelin, W. Bloch, E. Hunziker, K. Addicks, R. Timpl and R. Fassler (1999). "Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes." J Cell Biol **147**(5): 1109-1122.

Danalache, M., A. L. Erler, J. M. Wolfgang, M. Schwitalle and U. K. Hofmann (2020). "Biochemical changes of the pericellular matrix and spatial chondrocyte organization-Two highly interconnected hallmarks of osteoarthritis." J Orthop Res.

Danalache, M., R. Kleinert, J. Schneider, A. L. Erler, M. Schwitalle, R. Riester, F. Traub and U. K. Hofmann (2019). "Changes in stiffness and biochemical composition of the pericellular matrix as a function of spatial chondrocyte organisation in osteoarthritic cartilage." Osteoarthritis Cartilage **27**(5): 823-832.

Decarlo, A. A., M. Belousova, A. L. Ellis, D. Petersen, H. Grenett, P. Hardigan, R. O'Grady, M. Lord and J. M. Whitelock (2012). "Perlecan domain 1 recombinant proteoglycan augments BMP-2 activity and osteogenesis." BMC Biotechnol **12**: 60.

Dieppe, P., J. Cushnaghan, P. Young and J. Kirwan (1993). "Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy." Ann Rheum Dis **52**(8): 557-563.

Dietz, H. C. and R. E. Pyeritz (1995). "Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders." Hum Mol Genet **4 Spec No**: 1799-1809.

Donell, S. (2019). "Subchondral bone remodelling in osteoarthritis." EFORT Open Rev **4**(6): 221-229.

Douglas, T., S. Heinemann, S. Bierbaum, D. Scharnweber and H. Worch (2006). "Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan." Biomacromolecules **7**(8): 2388-2393.

Eyre, D. (2002). "Collagen of articular cartilage." Arthritis Res **4**(1): 30-35.

Eyre, D. R. and H. Muir (1975). "Type III collagen: A major constituent of rheumatoid and normal human synovial membrane." Connect Tissue Res **4**(1): 11-16.

Fath, R. (2018). "Knie-Totalendoprothesen: Ein anspruchsvoller Gelenkersatz." Deutsches Ärzteblatt **115**(8): 332-333.

Felka, T., M. Rothdiener, S. Bast, T. Uynuk-Ool, S. Zouhair, B. G. Ochs, P. De Zwart, U. Stoeckle, W. K. Aicher, M. L. Hart, T. Shiozawa, A. J. Grodzinsky, K. Schenke-Layland, J. K. Venkatesan, M. Cucchiaroni, H. Madry, B. Kurz and B. Rolaufts (2016). "Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology." Osteoarthritis Cartilage **24**(7): 1200-1209.

Fernandes, J. C., J. Martel-Pelletier and J. P. Pelletier (2002). "The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology." Biorheology **39**(1-2): 237-246.

Fessler, L. I., R. Timpl and J. H. Fessler (1981). "Assembly and processing of procollagen type III in chick embryo blood vessels." J Biol Chem **256**(5): 2531-2537.

Fisher, L. W., J. D. Termine and M. F. Young (1989). "Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species." J Biol Chem **264**(8): 4571-4576.

Fleischmajer, R., R. Timpl, L. Tuderman, L. Raisher, M. Wiestner, J. S. Perlish and P. N. Graves (1981). "Ultrastructural identification of extension aminopeptides of type I and III collagens in human skin." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7360-7364.

French, M. M., S. E. Smith, K. Akanbi, T. Sanford, J. Hecht, M. C. Farach-Carson and D. D. Carson (1999). "Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro." J Cell Biol **145**(5): 1103-1115.

Fuchs, J., Kuhnert and Scheidt-Nave (2017). "12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland." Journal of Health Monitoring.

Guilak, F., R. J. Nims, A. Dicks, C. L. Wu and I. Meulenbelt (2018). "Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix." Matrix Biol **71-72**: 40-50.

Gustafsson, E., A. Aszodi, N. Ortega, E. B. Hunziker, H. W. Denker, Z. Werb and R. Fassler (2003). "Role of collagen type II and perlecan in skeletal development." Ann N Y Acad Sci **995**: 140-150.

Hambach, L., D. Neureiter, G. Zeiler, T. Kirchner and T. Aigner (1998). "Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage." Arthritis Rheum **41**(6): 986-996.

Handford, P., A. K. Downing, Z. Rao, D. R. Hewett, B. C. Sykes and C. M. Kielty (1995). "The calcium binding properties and molecular organization of epidermal growth factor-like domains in human fibrillin-1." J Biol Chem **270**(12): 6751-6756.

Handler, M., P. D. Yurchenco and R. V. Iozzo (1997). "Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis." Dev Dyn **210**(2): 130-145.

Hayakawa, T., Y. Hashimoto, Y. Myokei, H. Aoyama and Y. Izawa (1979). "Changes in type of collagen during the development of human post-burn hypertrophic scars." Clin Chim Acta **93**(1): 119-125.

Hayashi, K., J. A. Madri and P. D. Yurchenco (1992). "Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan." J Cell Biol **119**(4): 945-959.

Hellio Le Graverand, M. P., P. Sciore, J. Eggerer, J. P. Rattner, E. Vignon, L. Barclay, D. A. Hart and J. B. Rattner (2001). "Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus." Arthritis Rheum **44**(8): 1808-1818.

Hildebrand, A., M. Romaris, L. M. Rasmussen, D. Heinegard, D. R. Twardzik, W. A. Border and E. Ruoslahti (1994). "Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta." Biochem J **302** ( Pt 2): 527-534.

Hofmann, U. K., J. Steidle, M. Danalache, F. Bonnaire, C. Walter and B. Rolaufts (2018). "Chondrocyte death after mechanically overloading degenerated human intervertebral disk explants is associated with a structurally impaired pericellular matrix." J Tissue Eng Regen Med **12**(9): 2000-2010.

Hollander, A. P., T. F. Heathfield, C. Webber, Y. Iwata, R. Bourne, C. Rorabeck and A. R. Poole (1994). "Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay." J Clin Invest **93**(4): 1722-1732.

Hollander, A. P., I. Pidoux, A. Reiner, C. Rorabeck, R. Bourne and A. R. Poole (1995). "Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration." J Clin Invest **96**(6): 2859-2869.

Horikawa, O., H. Nakajima, T. Kikuchi, S. Ichimura, H. Yamada, K. Fujikawa and Y. Toyama (2004). "Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes." J Orthop Sci **9**(1): 29-36.

Hosseini, S., M. A. Weis, J. Rai, L. Kim, S. Funk, L. E. Dahlberg and D. R. Eyre (2016). "Evidence for enhanced collagen type III deposition focally in the territorial matrix of osteoarthritic hip articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **24**(6): 1029-1035.

Keene, D. R., C. D. Jordan, D. P. Reinhardt, C. C. Ridgway, R. N. Ono, G. M. Corson, M. Fairhurst, M. D. Sussman, V. A. Memoli and L. Y. Sakai (1997). "Fibrillin-1 in human cartilage: developmental expression and formation of special banded fibers." J Histochem Cytochem **45**(8): 1069-1082.

Kellgren, J. H. and J. S. Lawrence (1957). "Radiological assessment of osteoarthrosis." Ann Rheum Dis **16**(4): 494-502.

Khoshgoftar, M., P. A. Torzilli and S. A. Maher (2018). "Influence of the pericellular and extracellular matrix structural properties on chondrocyte mechanics." J Orthop Res **36**(2): 721-729.

Kielty, C. M. and C. A. Shuttleworth (1993). "The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils." FEBS Lett **336**(2): 323-326.

Knox, S., C. Merry, S. Stringer, J. Melrose and J. Whitelock (2002). "Not all perlecan are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors." J Biol Chem **277**(17): 14657-14665.

Knudson, W., S. Ishizuka, K. Terabe, E. B. Askew and C. B. Knudson (2018). "The pericellular hyaluronan of articular chondrocytes." Matrix Biol.

Kothari, A., A. Guerhazi, J. S. Chmiel, D. Dunlop, J. Song, O. Almagor, M. Marshall, S. Cahue, P. Prasad and L. Sharma (2010). "Within-subregion relationship between bone marrow lesions and subsequent cartilage loss in knee osteoarthritis." Arthritis Care Res (Hoboken) **62**(2): 198-203.

Kvist, A. J., A. E. Johnson, M. Morgelin, E. Gustafsson, E. Bengtsson, K. Lindblom, A. Aszodi, R. Fassler, T. Sasaki, R. Timpl and A. Aspberg (2006). "Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation. Implications for perlecan chondrodysplasias." J Biol Chem **281**(44): 33127-33139.

Kvist, A. J., A. Nystrom, K. Hultenby, T. Sasaki, J. F. Talts and A. Aspberg (2008). "The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent?" Matrix Biol **27**(1): 22-33.

Leitinger, B. and E. Hohenester (2007). "Mammalian collagen receptors." Matrix Biol **26**(3): 146-155.

Lespessailles, E. and R. Jennane (2012). "Assessment of bone mineral density and radiographic texture analysis at the tibial subchondral bone." Osteoporos Int **23 Suppl 8**: S871-876.

Liu, C., B. Wang, L. Xiao, Y. Li, L. Xu, Z. Zhao and L. Zhang (2018). "Protective effects of the pericellular matrix of chondrocyte on articular cartilage against the development of osteoarthritis." Histol Histopathol **33**(8): 757-764.

Lohmander, S. (1988). "Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease." Baillieres Clin Rheumatol **2**(1): 37-62.

Lorenzo, P., M. T. Bayliss and D. Heinegard (2004). "Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis." Matrix Biol **23**(6): 381-391.

Malemud, C. J. (2010). "Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date." Drugs Aging **27**(2): 95-115.

Malfait, F., C. Francomano, P. Byers, J. Belmont, B. Berglund, J. Black, L. Bloom, J. M. Bowen, A. F. Brady, N. P. Burrows, M. Castori, H. Cohen, M. Colombi, S. Demirdas, J. De Backer, A. De Paepe, S. Fournel-Gigleux, M. Frank, N. Ghali, C. Giunta, R. Grahame, A. Hakim, X. Jeunemaitre, D. Johnson, B. Juul-Kristensen, I. Kapferer-Seebacher, H. Kazkaz, T. Kosho, M. E. Lavalley, H. Levy, R. Mendoza-Londono, M. Pepin, F. M. Pope, E. Reinstein, L. Robert, M. Rohrbach, L. Sanders, G. J. Sobey, T. Van Damme, A. Vandersteen, C. van Mourik, N. Voermans, N. Wheeldon, J. Zschocke and B. Tinkle (2017). "The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes." Am J Med Genet C Semin Med Genet **175**(1): 8-26.

Malhotra, V. and P. Erlmann (2015). "The pathway of collagen secretion." Annu Rev Cell Dev Biol **31**: 109-124.

Martinek, V. (2003). "Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels." Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin **54**(6): 166-170.

McDevitt, C. A., J. Marcelino and L. Tucker (1991). "Interaction of intact type VI collagen with hyaluronan." FEBS Letters **294**(3): 167-170.

Melrose, J., P. Roughley, S. Knox, S. Smith, M. Lord and J. Whitelock (2006). "The structure, location, and function of perlecan, a prominent pericellular proteoglycan of fetal, postnatal, and mature hyaline cartilages." J Biol Chem **281**(48): 36905-36914.

Miosge, N., K. Flachsbarth, W. Goetz, W. Schultz, H. Kresse and R. Herken (1994). "Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage." Histochem J **26**(12): 939-945.

Moreno, M., R. Munoz, F. Aroca, M. Labarca, E. Brandan and J. Larrain (2005). "Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway." Embo j **24**(7): 1397-1405.

Mow, V. C., C. C. Wang and C. T. Hung (1999). "The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **7**(1): 41-58.

Peters, H. C., T. J. Otto, J. T. Enders, W. Jin, B. R. Moed and Z. Zhang (2011). "The protective role of the pericellular matrix in chondrocyte apoptosis." Tissue Eng Part A **17**(15-16): 2017-2024.

Pfaff, M., D. P. Reinhardt, L. Y. Sakai and R. Timpl (1996). "Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1." FEBS Lett **384**(3): 247-250.

Poole, A. R. (1999). "An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis." Front Biosci **4**: D662-670.

Poole, A. R., L. C. Rosenberg, A. Reiner, M. Ionescu, E. Bogoch and P. J. Roughley (1996). "Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage." J Orthop Res **14**(5): 681-689.

Poole, C. A., S. Ayad and R. T. Gilbert (1992). "Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy." J Cell Sci **103** (Pt 4): 1101-1110.

Poole, C. A., M. H. Flint and B. W. Beaumont (1988). "Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure." J Orthop Res **6**(3): 408-419.

Prieto-Potin, I., R. Largo, J. A. Roman-Blas, G. Herrero-Beaumont and D. A. Walsh (2015). "Characterization of multinucleated giant cells in synovium and subchondral bone in knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis." BMC Musculoskelet Disord **16**: 226.

Pullig, O., G. Weseloh and B. Swoboda (1999). "Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage." Osteoarthritis Cartilage **7**(2): 191-202.

Reinboth, B., E. Hanssen, E. G. Cleary and M. A. Gibson (2002). "Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1." J Biol Chem **277**(6): 3950-3957.

Rolauffs, B., M. Rothdiener, C. Bahrs, A. Badke, K. Weise, K. E. Kuettner, B. Kurz, M. Aurich, A. J. Grodzinsky and W. K. Aicher (2011). "Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis." Arthritis Rheum **63**(6): 1637-1647.

Rolauffs, B., J. M. Williams, M. Aurich, A. J. Grodzinsky, K. E. Kuettner and A. A. Cole (2010). "Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis." Arthritis Rheum **62**(2): 489-498.

Rolauffs, B., J. M. Williams, A. J. Grodzinsky, K. E. Kuettner and A. A. Cole (2008). "Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints." J Struct Biol **162**(2): 335-344.

Roughley, P. J., R. J. White, M. C. Magny, J. Liu, R. H. Pearce and J. S. Mort (1993). "Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage." Biochem J **295 ( Pt 2)**: 421-426.

Sakai, L. Y., D. R. Keene and E. Engvall (1986). "Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils." J Cell Biol **103**(6 Pt 1): 2499-2509.

Sandell, L. J. and T. Aigner (2001). "Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis." Arthritis Res **3**(2): 107-113.

Schaefer, L., A. Babelova, E. Kiss, H. J. Hausser, M. Baliova, M. Krzyzankova, G. Marsche, M. F. Young, D. Mihalik, M. Gotte, E. Malle, R. M. Schaefer and H. J. Grone (2005). "The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages." J Clin Invest **115**(8): 2223-2233.

Schaefer, L. and R. V. Iozzo (2008). "Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction." J Biol Chem **283**(31): 21305-21309.

Schonherr, E., P. Witsch-Prehm, B. Harrach, H. Robenek, J. Rauterberg and H. Kresse (1995). "Interaction of biglycan with type I collagen." J Biol Chem **270**(6): 2776-2783.

Schumacher, B. L., J. L. Su, K. M. Lindley, K. E. Kuettner and A. A. Cole (2002). "Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage." Anat Rec **266**(4): 241-248.

Sengle, G., R. N. Ono, T. Sasaki and L. Y. Sakai (2011). "Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability." J Biol Chem **286**(7): 5087-5099.

Shakibaei, M. and A. Mobasheri (2003). "Beta1-integrins co-localize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes." Histol Histopathol **18**(2): 343-351.

Shen, J., S. Li and D. Chen (2014). "TGF-beta signaling and the development of osteoarthritis." Bone Res **2**.

Smeriglio, P., L. Dhulipala, J. H. Lai, S. B. Goodman, J. L. Dragoo, R. L. Smith, W. J. Maloney, F. Yang and N. Bhutani (2015). "Collagen VI enhances cartilage tissue generation by stimulating chondrocyte proliferation." Tissue Eng Part A **21**(3-4): 840-849.

Smith, G. N., Jr., K. A. Hasty and K. D. Brandt (1989). "Type XI collagen is associated with the chondrocyte surface in suspension culture." Matrix **9**(3): 186-192.

Soder, S., L. Hambach, R. Lissner, T. Kirchner and T. Aigner (2002). "Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **10**(6): 464-470.

Sophia Fox, A. J., A. Bedi and S. A. Rodeo (2009). "The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function." Sports Health **1**(6): 461-468.

Srinivasan, P. P., S. Y. McCoy, A. K. Jha, W. Yang, X. Jia, M. C. Farach-Carson and C. B. Kirn-Safran (2012). "Injectable perlecan domain 1-hyaluronan microgels potentiate the cartilage repair effect of BMP2 in a murine model of early osteoarthritis." Biomed Mater **7**(2): 024109.

Steinwachs, M., S. Wopperer, G. Salzmann and B. Waibl (2014). "Regenerative Knorpeltherapie." Orthopädie und Unfallchirurgie up2date.

Stoop, R., P. Buma, P. M. van der Kraan, A. P. Hollander, R. C. Billingham, T. H. Meijers, A. R. Poole and W. B. van den Berg (2001). "Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats." Osteoarthritis Cartilage **9**(4): 308-315.

Stöve, P. D. J. (2018). "S2k-Leitlinie Gonarthrose." AWMF.

Stum, M., C. S. Davoine, B. Fontaine and S. Nicole (2005). "Schwartz-Jampel syndrome and perlecan deficiency." Acta Myol **24**(2): 89-92.

Swoboda, B., O. Pullig, B. Kladny, D. Pfander and G. Weseloh (1999). "[Collagen type VI content in healthy and arthritis knee joint cartilage]." Z Orthop Ihre Grenzgeb **137**(6): 540-544.

Tesche, F. and N. Miosge (2004). "Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint." Osteoarthritis Cartilage **12**(11): 852-862.

Tiedemann, K., T. Sasaki, E. Gustafsson, W. Gohring, B. Batge, H. Notbohm, R. Timpl, T. Wedel, U. Schlotzer-Schrehardt and D. P. Reinhardt (2005). "Microfibrils at basement membrane zones interact with perlecan via fibrillin-1." J Biol Chem **280**(12): 11404-11412.

Toole, B. P. and D. A. Lowther (1968). "Dermatan sulfate-protein: isolation from and interaction with collagen." Arch Biochem Biophys **128**(3): 567-578.

Vincent, T. L., M. A. Hermansson, U. N. Hansen, A. A. Amis and J. Saklatvala (2004). "Basic fibroblast growth factor mediates transduction of mechanical signals when articular cartilage is loaded." Arthritis Rheum **50**(2): 526-533.

Vincent, T. L., C. J. McLean, L. E. Full, D. Peston and J. Saklatvala (2007). "FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer." Osteoarthritis Cartilage **15**(7): 752-763.

Wang, K., P. Vishwanath, G. S. Eichler, M. O. Al-Sebaei, C. M. Edgar, T. A. Einhorn, T. F. Smith and L. C. Gerstenfeld (2006). "Analysis of fracture healing by large-scale transcriptional profile identified temporal relationships between metalloproteinase and ADAMTS mRNA expression." Matrix Biol **25**(5): 271-281.

WHO, S. G. (2003). "The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium." World Health Organ Tech Rep Ser **919**: i-x, 1-218, back cover.

Wilusz, R. E., L. E. Defrate and F. Guilak (2012). "A biomechanical role for perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage." Matrix Biol **31**(6): 320-327.

Woessner, J. F., Jr. and Z. Gunja-Smith (1991). "Role of metalloproteinases in human osteoarthritis." J Rheumatol Suppl **27**: 99-101.

Wojdasiewicz, P., L. A. Poniatowski and D. Szukiewicz (2014). "The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis." Mediators Inflamm **2014**: 561459.

Wotton, S. F. and V. C. Duance (1994). "Type III collagen in normal human articular cartilage." Histochem J **26**(5): 412-416.

Wu, J. J., M. A. Weis, L. S. Kim and D. R. Eyre (2010). "Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage." J Biol Chem **285**(24): 18537-18544.

Youn, I., J. B. Choi, L. Cao, L. A. Setton and F. Guilak (2006). "Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy." Osteoarthritis Cartilage **14**(9): 889-897.

Young, R. D., P. A. Lawrence, V. C. Duance, T. Aigner and P. Monaghan (1995). "Immunolocalization of type III collagen in human articular cartilage prepared by high-pressure cryofixation, freeze-substitution, and low-temperature embedding." J Histochem Cytochem **43**(4): 421-427.

Young, R. D., P. A. Lawrence, V. C. Duance, T. Aigner and P. Monaghan (2000). "Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage." J Histochem Cytochem **48**(3): 423-432.

Yu, J. and J. P. Urban (2010). "The elastic network of articular cartilage: an immunohistochemical study of elastin fibres and microfibrils." J Anat **216**(4): 533-541.

Zeyer, K. A. and D. P. Reinhardt (2015). "Fibrillin-containing microfibrils are key signal relay stations for cell function." J Cell Commun Signal **9**(4): 309-325.

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im orthopädischen Zelllabor des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann und Marina Danalache, PhD-Studentin der Universität Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Marina Danalache und Rosa Riester) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann durch mich.

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

Tübingen, den

---

## 9 Veröffentlichungen

1. Danalache M., **Erlor A. L.**, Wolfgart J., Schwitalle M., Hofmann U. K. „Biochemical Changes of the Pericellular Matrix and Spatial Chondrocyte Organization – Two Highly Interconnected Hallmarks of Osteoarthritis” Journal of Orthopaedic Research ©, 2020.
2. Danalache M., Kleinert R., Schneider J., **Erlor A. L.**, Schwitalle M., Riester R., Traub F., Hofmann U. K.: "Changes in stiffness and biochemical composition of the pericellular matrix as a function of chondrocyte organisation in osteoarthritic cartilage." Osteoarthritis and Cartilage, 2019. IF 5,5; Rang Orthopädie 2/77 JCR 2017.
3. Nicht peer-reviewed: Danalache M.\*, Kleinert R., Schneider J., **Erlor A. L.**, Schwitalle M., Riester R., Traub F., Hofmann U. K.: "Perizelluläre Matrix im Gelenkknorpel bei Arthrose." Orthopädische Nachrichten, 2019.

### Podiumsbeiträge bei wissenschaftlichen Kongressen:

1. Danalache M., **Erlor A. L.**, Schwitalle M., Hofmann U. K.: "Die Knorpel-degeneration bei Arthrose ist nicht nur ein Phänomen der extrazellulären Matrix, sondern auch der zellulären Mikroumgebung." 67. Jahrestagung VSOU, Baden-Baden 05/2019.
2. Danalache M., Kleinert R., Schneider J., **Erlor A. L.**, Schwitalle M., Riester R., Traub F., Hofmann U. K.: " Änderungen in Steifheit und Zusammensetzung der perizellulären Matrix im Gelenkknorpel bei Arthrose." Kongreß DKOU Berlin 10/2019.

### Posterbeiträge bei wissenschaftlichen Kongressen:

1. Danalache M., **Erlor A. L.**, Schwitalle M., Hofmann U. K.: "Cartilage degeneration in osteoarthritis - not just a phenomenon of the extracellular matrix but also of the cellular microenvironment." 20ter EFORT Kongress, Lissabon/Portugal 06/2019.

## 10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater PD Dr. med. Ulf Krister Hofmann, für die hervorragende Betreuung, die mitreißende Begeisterung und für die unermüdliche Unterstützung und Anregung, über mich hinaus zu wachsen.

Besonders danken möchte ich auch Marina Danalache, für ihr unglaublich großes Engagement und die vielen lieben Worte, die weit über die gemeinsame Laborzeit hinausgehen. Mit ihrer Unterstützung, ihrer Leidenschaft und ihrem Zuspruch war sie mir immer eine sehr große Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern Karl und Jolande Erler, die mich immer und in allem voll unterstützt haben.

Danken möchte ich auch meinen Freundinnen und Mitstudentinnen, insbesondere Katrin und Anne-Sophie, die mich im Rahmen meines Studiums begleitet haben, für die seelische und moralische Unterstützung. Danke Alexander, dass du mein Ruhepol bist.