

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**Chondrozytendifferenzierung in der altersbedingten
Knorpeldegeneration als eine Funktion der räumlichen
Chondrozytenanordnung**

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

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

vorgelegt von

Hemayatkar-Fink, Sascha

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

Tag der Disputation: 18.01.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Einleitung des Projektes.....	6
1.2 Hyaliner Gelenkknorpel.....	6
1.3 Die Anatomie des Kniegelenks	9
1.4 Arthrose.....	11
1.4.1 Epidemiologie	11
1.4.2 Risikofaktoren und Diagnostik	11
1.4.3 Therapie.....	13
1.4.4 Pathophysiologie.....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Farbstoffe.....	23
2.1.2 Primärantikörper	23
2.1.3 Sekundärantikörper.....	24
2.1.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	24
2.1.5 Lösungen und Puffer.....	24
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.7 Geräte	28
2.1.8 Softwares	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Probengewinnung	30
2.2.2 Immunhistologische Färbung.....	31

2.2.3	Probenverarbeitung und Enzyme-linked Immunosorbent Assay	.36
2.2.4	Positivkontrolle für die Proliferations- und Apoptoseantikörper	...44
2.2.5	Western Blot47
2.2.6	Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung50
2.2.7	Statistische Analysen51
3	Ergebnisse52
3.1	Patienten52
3.2	Immunhistologische Färbung und Enzyme-linked Immunosorbent Assay	54
3.2.1	Kollagen X55
3.2.2	Annexin V60
3.2.3	Caspase 365
3.2.4	Ki-6770
3.2.5	PCNA74
3.2.6	VEGF-A77
3.2.7	PECAM-181
3.3	Western Blot85
3.4	Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung86
4	Diskussion88
4.1	Erhöhter Gehalt von Kollagen X und die damit verbundene Umstrukturierung der EZM88
4.2	Annexin V und seine Bedeutung bei der Entwicklung der Arthrose89
4.3	Caspase 3 als Indikator einer gesteigerten Apoptose bei der Arthrose	90
4.4	Gesteigerte Konzentration des Proliferationsmarkers Ki-6791
4.5	Erhöhte PCNA-Konzentration als weiterer Hinweis gesteigerter Proliferation92

4.6	VEGF-A als potenzieller Marker für aktivierte Arthrose	93
4.7	PECAM-1 als möglich wichtige Komponente bei einer Inflammation .	94
4.8	Erkenntnisse der Arthroseforschung im Vergleich zu anderen Entitäten 95	
5	Zusammenfassung	98
6	Abkürzungsverzeichnis	99
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	101
7.1	Abbildungsverzeichnis	101
7.2	Tabellenverzeichnis	102
8	Literaturverzeichnis.....	104
9	Anhang.....	110
10	Erklärung zum Eigenanteil.....	111
11	Danksagung.....	112

1 Einleitung

1.1 Einleitung des Projektes

Arthrose spielt klinisch und volkswirtschaftlich eine wichtige Rolle in Deutschland. Am häufigsten sind Gelenke betroffen, die einer großen Last ausgesetzt sind – beispielsweise das Kniegelenk. Mit einer gut etablierten Schmerztherapie und entsprechenden physiotherapeutischen Maßnahmen, kann der Verlauf lange Zeit noch symptomatisch kontrolliert werden. In fortgeschrittenen Stadien ist auch die operative Therapie in Deutschland weit verbreitet. Die Therapie von Arthrose erfolgt bei fehlenden größeren strukturellen Schäden zumeist symptomatisch orientiert und aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes. Da die der Arthrose zugrunde liegenden Prozesse noch nicht ausreichend verstanden sind, kann dem Voranschreiten der Erkrankung bisher nur eingeschränkt entgegengewirkt werden. Es bedarf daher weiterer Forschung, die sich mit der Pathophysiologie der Erkrankung auseinandersetzt, um neue Therapieansätze zur Verhinderung einer Krankheitsprogression zu etablieren.

1.2 Hyaliner Gelenkknorpel

Die wichtigsten pathologischen Vorgänge der Arthrose sind die Abnutzung des Gelenkknorpels sowie die Veränderungen im subchondralen Knochen [1]. Da die Mechanismen hinter Arthrose eine hohe Komplexität aufweisen, wird im Folgenden zunächst auf die Physiologie des Knorpels eingegangen. Hyaliner Gelenkknorpel wird zum passiven Bewegungsapparat gezählt und besitzt eine hohe Zug- und Druckelastizität [2]. Dadurch kann er den mechanischen Ansprüchen alltäglicher, aber auch extremer Belastungen standhalten. Durch seine glatte Oberfläche sorgt der Knorpel für eine möglichst geringe Reibung bei Bewegung [3]. Der Gelenkknorpel besitzt weder Blutgefäße, noch Nervenfasern oder ein lymphatisches System [3-5]. Dies macht den Knorpel

Einleitung

schmerzunempfindlich, was wiederum häufig zu einer verzögerten Diagnose in den Anfangsstadien der Arthrose führt. Aufgrund fehlender eigener Blutgefäße wird der Knorpel mittels Diffusion durch die Synovialflüssigkeit versorgt. Diese verringert zusätzlich die Reibungskräfte zwischen den artikulierenden Gelenkflächen. Der hyaline Knorpel besteht aus spezialisierten Zellen, den Chondrozyten, die in eine ausgedehnte Extrazellulärmatrix (EZM) eingebettet sind. Die Zellen direkt umgebend findet sich weiterhin eine spezialisierte Sonderform der EZM, die sogenannte Perizellulärmatrix (PZM). Die Chondrozyten machen lediglich etwa zwei Prozent des gesamten Volumens der Knorpelsubstanz aus und entstehen aus den Chondroblasten [6]. Nach der Differenzierung zu Chondrozyten haben die Zellen das Endstadium der Knorpeldifferenzierung erreicht und bleiben metabolisch aktiv und teilungsfähig. Die Chondrozyten sind im hyalinen Knorpel in isogenen Gruppen angeordnet. Dabei stammen die Chondrozyten von mesenchymalen Stammzellen ab und synthetisieren die Matrix im hyalinen Knorpel [2].

Eine weitere wichtige Komponente des hyalinen Knorpels ist die EZM. Diese setzt sich überwiegend aus den drei Bestandteilen Wasser, Typ II Kollagen sowie Proteoglykanen zusammen [2, 7].

Einleitung

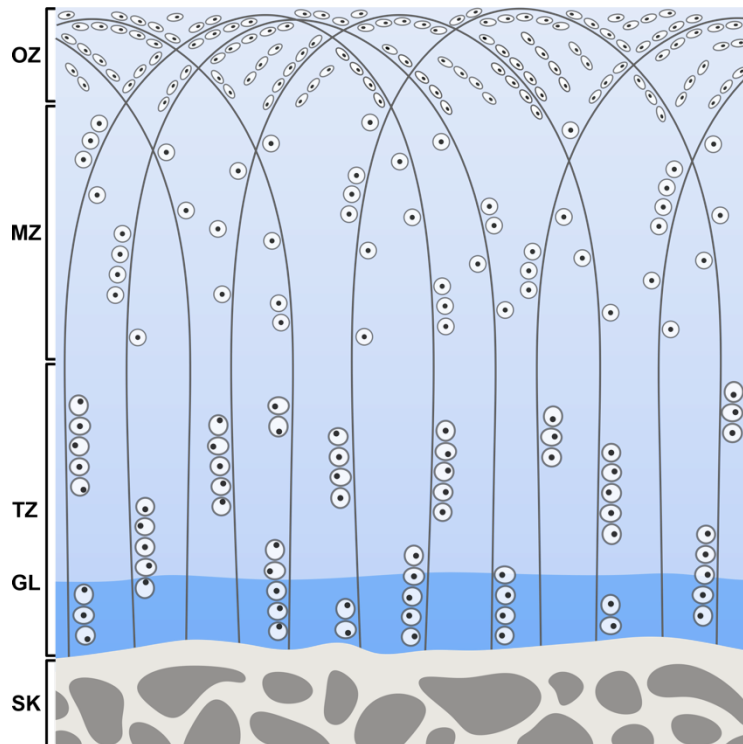


Abbildung 1: Schematische Darstellung von Chondrozyten und Kollagenfasern im hyalinen Gelenkknorpel.

Gliederung der Zonen: Oberflächliche Zone (OZ), Mittelzone (MZ), tiefe Zone (TZ), Grenzlinie (GL), subchondraler Knochen (SK). Im Bereich der Grenzlinie befindet sich eine kalzifizierende Übergangszone, die zur Druckübertragung vom Knorpel auf den Knochen dient.

Zusätzlich enthält die EZM geringe Mengen an Phospholipiden, nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen [7]. In Abbildung 1 ist der Verlauf und die Anordnung der Kollagenfibrillen und die damit verbundene Einteilung des hyalinen Knorpels in verschiedene Zonen zu erkennen. Von der Oberfläche beginnend in Richtung Knochen liegen die Tangential-, Übergangs-, Radiär- und Mineralisierungszone [8, 9]. Die Tangentialzone macht etwa 10 bis 20% der gesamten Knorpeldicke aus [2]. Die Funktion sowie die Anordnung der Chondrozyten variiert abhängig von der Knorpelzone. In der Tangentialzone sind die Chondrozyten oval, länglich und parallel zur Oberfläche angeordnet, was zu einer höheren Kompaktheit und einer größeren Resistenz gegenüber Zugspannung führt [2]. In der vorliegenden Arbeit werden insbesondere die Chondrozyten und die EZM der Tangentialzone, auch Superficial Zone genannt, untersucht.

Einleitung

Die PZM umschließt die Zellen direkt und besteht, anders als die EZM, aus Kollagen Typ VI, Fibromodulin, Matrilin 3 und Perlecan [10, 11]. Im Gegensatz zur EZM kommt Kollagen Typ II in der PZM kaum bis gar nicht vor [10]. Der Unterschied zwischen Gelenkknorpel und anderem hyalinen Knorpel besteht unter anderem darin, dass der Gelenkknorpel kein Perichondrium besitzt, welches sonst den Knorpel umgibt und die Regeneration und Ernährung des Knorpels unterstützt. Aufgrund dessen ist die Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels nach Schädigung deutlich limitiert.

1.3 Die Anatomie des Kniegelenks

Das menschliche Kniegelenk (*Articulatio genus*) besteht aus zwei Teilgelenken. Das Femoropatellargelenk wird von der Gelenkfläche der Patella sowie der *Facies patellaris* des Femurs gebildet. Das Femorotibialgelenk wird von den *Condyli medialis femoris* und *lateralis femoris* zusammen mit den *Condyli medialis tibiae* und *lateralis tibiae* gebildet. Das Kniegelenk ist zusätzlich von einer zweischichtigen Gelenkkapsel umgeben. Die äußere *Membrana fibrosa* enthält eine stabilisierende Faserschicht. Die innere *Membrana synovialis* spielt eine wichtige Rolle bei der Nährstoffversorgung des Gelenkknorpels.

Einleitung

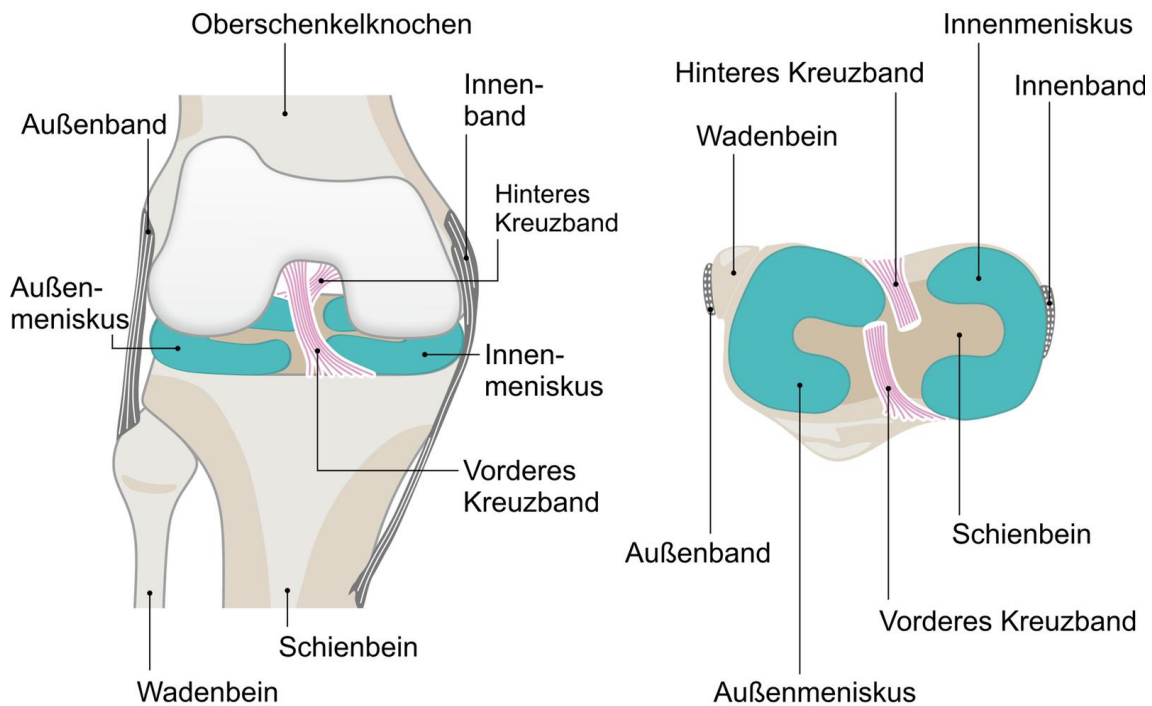


Abbildung 2: Das Kniegelenk in einer schematischen Darstellung mit den wichtigsten Komponenten.

Links in der Ansicht von frontal und rechts in axialer Ansicht. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde auf die Patella verzichtet.

Die artikulierenden Gelenkflächen weisen eine gewisse Inkongruenz auf. Durch den 2-4 Millimeter (mm) dicken hyalinen Knorpel wird diese Inkongruenz verbessert [2]. Trotz der abfedernden Wirkung des Knorpels ist das Kniegelenk einer hohen Druckbelastung ausgesetzt. Daher ist eine Verteilung der Belastung auf die Gelenkfläche essenziell. Eine noch bessere Kraftverteilung wird durch einen medialen und lateralen c-förmigen Meniskus erreicht [12].

Als Drehscharniergelenk kann das Kniegelenk flektiert und extendiert werden. Im flektierten Zustand ist außerdem eine Außen- und Innenrotation möglich. Um auch bei hohen Belastungen und komplexen Bewegungsabläufen eine gute Stabilität zu gewährleisten, ist das Kniegelenk von einem mehrteiligen Bandapparat umgeben [13]. Die Seitenbänder dienen der Stabilisierung des Kniegelenks gegenüber Varus- und Valgusstress. Das *Ligamentum collaterale mediale* ist zusätzlich mit dem medialen Meniskus verwachsen. Das vordere und hintere Kreuzband limitieren den Bewegungsumfang des Kniegelenks nach ventral und dorsal. Zusätzlich wird das *Articulatio genus* durch mehrere ventrale

und dorsale Bänder stabilisiert, wodurch die beteiligten Strukturen zusätzlich fixiert werden.

1.4 Arthrose

1.4.1 Epidemiologie

Arthrose ist eine nicht primär entzündliche, degenerative Erkrankung, die vor allem den hyalinen Gelenkknorpel betrifft [14]. Auch angrenzende Strukturen des erkrankten Gelenks, wie zum Beispiel Knochen, Muskeln und Bänder können von den krankhaften Veränderungen betroffen sein [15]. Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit und betrifft meistens das Kniegelenk, das Hüftgelenk und die Gelenke der Hände, was zu einer starken Einschränkung der Patienten im Alltag führt [16]. In Deutschland betrug die Lebenszeitprävalenz im Jahre 2013 einer Frau 25% und die eines Mannes 16% [17]. Arthrose lässt sich in eine primäre und sekundäre Form unterteilen. Die primäre Arthrose ist idiopathisch, wohingegen bei der sekundären Arthrose angeborene oder erworbene Erkrankungen und Verletzungen den Verlauf begünstigen. Arthrose ist eine multifaktorielle Erkrankung, wobei die genauen pathophysiologischen Prozesse noch nicht in Gänze verstanden sind.

1.4.2 Risikofaktoren und Diagnostik

Sowohl endogene als auch exogene Faktoren tragen zu der Ausbildung einer Arthrose bei. Zu den endogenen Risikofaktoren zählt beispielweise das weibliche Geschlecht [18]. Hierfür wird die menopausale Hormonumstellung als Grund vermutet [18]. Außerdem tragen das Alter und die genetische Veranlagung zu einem Großteil der Erkrankung bei. Exogene Risikofaktoren können Traumata, Übergewicht (hoher BMI), Überbelastung, wie auch Fehlstellungen des betroffenen Gelenks sein [19]. Auch entzündliche Prozesse begünstigen das Voranschreiten der Arthrose. Dies wird auch als aktivierte Arthrose bezeichnet

Einleitung

[20]. Die inkongruenten Gelenkflächen sowie Überbelastung verstärken diesen Prozess. In der Frühphase der Erkrankung bemerken die betroffenen Patienten sowohl einen dumpfen Schmerz zu Bewegungsbeginn als auch bei langanhaltender oder starker Belastung des Gelenks. In der Spätphase hingegen treten die Beschwerden schon in Ruhe und teilweise nachts auf [21]. Da Arthrose nicht kurativ behandelt werden kann und progredient verläuft, ist eine frühe Diagnosestellung wichtig, um ein rasches Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. Für die Diagnosestellung von Arthrose spielen Anamnese des Patienten und körperliche klinische Untersuchung eine hohe Rolle. Weiterhin von Bedeutung ist die radiologische Bildgebung: Die konventionelle Röntgenuntersuchung ist nach wie vor Primärdiagnostik bei der Diagnosestellung. Im Röntgenbild sind bei vorhandener Arthrose eine Verschmälerung des Gelenkspalts, subchondrale Sklerosierung, Osteophyten, Geröllzysten oder auch eine ungleichmäßige Gelenkfläche charakteristisch [22]. Anhand der zuvor genannten Pathologien kann die Arthrose in vier Stufen nach Kellgren and Lawrence eingeteilt werden [23]. Um andere Differentialdiagnosen mit ähnlicher Symptomatik auszuschließen, wie beispielsweise Gicht und rheumatoide Arthritis, können Blutwerte erhoben werden. Stark erhöhte Entzündungswerte sprechen hierbei eher gegen eine aktivierte Arthrose.

1.4.3 Therapie

Nach erfolgter Diagnosestellung wird üblicherweise in eskalierender Weise anhand eines Therapiestufenschemas zur Behandlung der Arthrose therapiert (Abbildung 3).

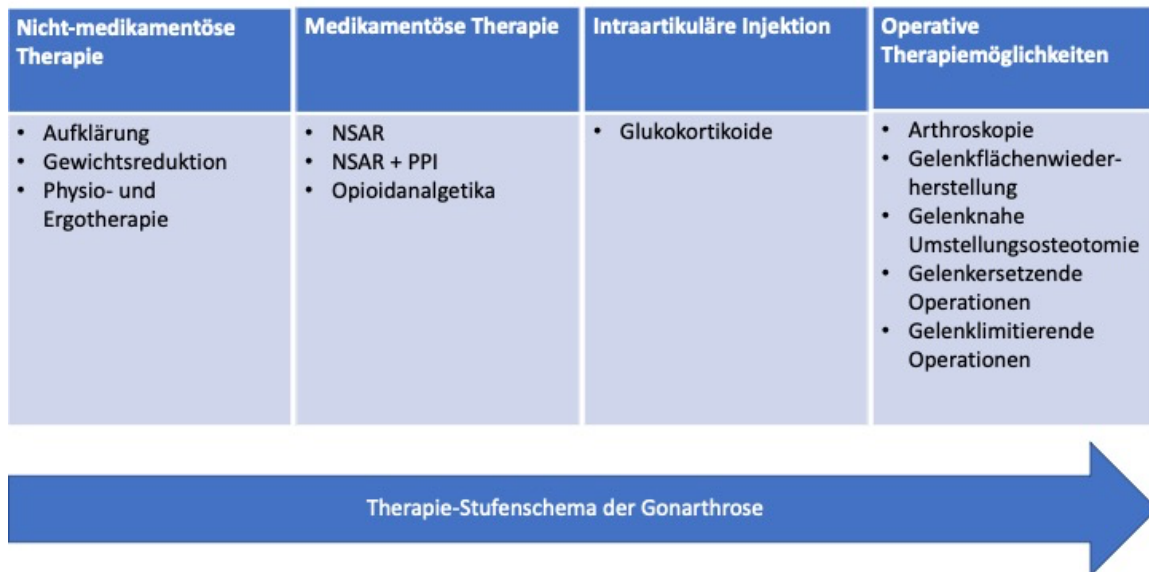


Abbildung 3: Therapiestufenschema der Gonarthrose modifiziert nach [24].

NSAR=Nichtsteroidale Antirheumatika, PPI=Protonenpumpeninhibitoren.

Da Arthrose nicht kurativ behandelt werden kann, geht es bei der Therapie in erster Linie um Schmerzreduktion und um Aufrechterhaltung der Lebensqualität [25, 26]. Der erste Schritt im Therapieschema ist die konservative, nicht-medikamentöse Therapie. Hier stehen die Aufklärung über den Umgang mit der Krankheit und die Patientenschulung im Vordergrund. Weiterhin ist eine Vermittlung einer möglichen Körpergewichtsreduktion, wie auch die Maßnahmen durch Physio- oder Ergotherapie wichtig. Oftmals wirken auch orthopädische Hilfsmittel, wie zum Beispiel Pufferabsätze, unterstützend, um die Lebensqualität zu verbessern. Sind die Schmerzen trotz dieser Therapiemöglichkeiten nicht ausreichend eindämmbar, wird eine konservative, medikamentöse Therapie eingeleitet. Mittel der Wahl sind hierbei Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), wobei insbesondere gastrointestinale wie kardiovaskuläre Nebenwirkungen zu

Einleitung

beachten und gegebenenfalls mitzubehandeln sind. Ein möglicher gastrointestinaler Schutz stellt die gleichzeitige Einnahme von NSAR und Protonenpumpeninhibitoren dar. Bei Schmerzpersistenz kommen Opioidanalgetika zum Einsatz. Eine optimale Behandlung der Beschwerden wird erreicht, indem die nicht-medikamentöse und medikamentöse Therapie kombiniert wird. Weiterhin ist zu erwähnen, dass es bei Arthrose durch Knorpelteile oder Knochenstücke zu einer Entzündung und Reizung der synovialen Gelenkhaut kommen kann [27]. Eine solche Entzündung kann im Rahmen der Arthrose mittels NSAR oder durch die nächste Stufe im Therapieschema, der Glukokortikoid-Injektion in die Gelenkhöhle, mitbehandelt werden. Die Wirkungsdauer der Injektion ist meist auf vier bis fünf Wochen beschränkt. Auch sollte eine Anzahl von vier Injektionen pro Jahr nicht überschritten werden. Bei weiterhin eingeschränkter Lebensqualität wird daher meist eine Operation in Betracht gezogen [17]. Als minimalinvasivstes Verfahren kommt die Arthroskopie in Frage. Diese bietet die Möglichkeit der Lavage (Spülung der Gelenkhöhle) und Abtragung freier Gelenkkörper und Knochenwucherungen. Jedoch wird die Wirksamkeit der Arthroskopie kontrovers gesehen und ist zudem aktuell nicht abrechenbar über die Krankenkasse. Beim offen chirurgischen Verfahren kommt es meistens zum Einsetzen einer Kniegelenksendoprothese, bei der die Gelenkflächen durch künstliches Material ersetzt werden. Wichtige Bestandteile von modernen Knieprothesen sind Stahllegierungen aus beispielsweise Cobalt, Chrom und Molybdän und dazugehörig ein Polyethylen-Inlay. Die Ultima Ratio Therapie der Kniegelenksarthrose stellt die Arthrodesse, eine gelenklimitierende Operation, dar. Hierbei wird das Kniegelenk in einem offenen chirurgischen Verfahren versteift, um eine belastungsfähige Gliedmaße zu erhalten oder um chronische Schmerzen auszuschalten.

Durch die limitierte und vorwiegend symptomatische Therapie wird erneut deutlich, welchen Stellenwert die Forschung der Pathophysiologie hat, um eine kausale Therapiemöglichkeit gegen die Arthrose den Patienten entwickeln zu können.

1.4.4 Pathophysiologie

Im Rahmen der Schädigung und Abnutzung des Gelenkknorpels kommt es zu Veränderungen der EZM und zu Anpassungsprozessen der Chondrozyten. Eine aktivierte Arthrose, beziehungsweise eine Inflammation im Gelenk, kann den Verlauf der Arthrose erheblich beschleunigen. Im gesunden Knorpel herrscht ein Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen der Chondrozyten. Bei Arthrose kommt es zu Veränderungen dieses Gleichgewichts. Die katabolen Prozesse überwiegen und sorgen für eine Degeneration des Knorpels [28]. Hingegen wirken Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel TNF-alpha und Interleukin-1, für eine gesteigerte Matrixproduktion [28]. Sobald die katabolen Enzyme der Chondrozyten die Matrix verändert haben, ist nach bisherigem Wissensstand das Gewebe nicht mehr in seine ursprüngliche Zusammensetzung zurückführbar [10]. Insgesamt lassen sich mehrere wesentliche Prozesse der Arthrose im Knorpelgewebe festhalten. Die Veränderung der Syntheseaktivität, Proliferation und Apoptose, phänotypische Modulation der Chondrozyten, Osteophytenbildung, sowie die Degeneration der Knorpelmatrix und der Chondrozyten [28, 29]. Diese Abläufe im Knorpelgewebe werden in den folgenden Kapiteln genauer erläutert.

1.4.4.1 Veränderungen der räumlichen Chondrozytenanordnung

Auf mikroskopischer Ebene lassen sich verschiedene Veränderungen der Zellen bei Arthrose erkennen. Die Chondrozyten können verschiedene Phänotypen annehmen, wie beispielsweise eine hypertrophe Form oder auch einen fibroblastischen Phänotyp. Weiterhin verändern die Chondrozyten, welche sich entlang der Kollagenfibrillen befinden, ihre räumliche Anordnung im Verlauf der Arthrose [28]. Hierbei wird eine gesteigerte Proliferation vermutet, welche wiederum zu einer gesteigerten Synthese der Matrix führen soll [30].

Rollaufs et. al nutzte die Annahme, dass sich die räumliche Anordnung der Chondrozyten ändert, um mikroskopisch eine Einteilung der Arthrostadien zu ermöglichen [31]. In gesundem, adultem Knorpel sind die Zellen in einfachen

Einleitung

Reihen angeordnet. Diese Anordnung wird als Single Strings bezeichnet. Bei beginnender Arthrose formen die Zellen eine sogenannte Double Strings Struktur, bei der sich die Chondrozyten in einer parallelen Doppelreihe arrangieren. Schließlich führt die gesteigerte Proliferation zu einer Gruppierung der Zellen, die als Small Cluster und Big Clustern bezeichnet werden. Die letzte Stufe der Arthrose beinhaltet diffus angeordnete Chondrozyten, bei denen keine räumliche Struktur mehr zu erkennen ist. Dabei ist noch zu klären, ob dies eine logische Fortsetzung in der Veränderung der Musterausbildung ist, beginnend von Strings, oder ob es sich hierbei um ein narbiges Ersatzgewebe anderer Ätiologie handelt. In dieser Arbeit wurden daher nur die Stufen von Strings bis Big Clusters untersucht. In Abbildung 4 sind alle genannten Stufen beispielhaft abgebildet [32].

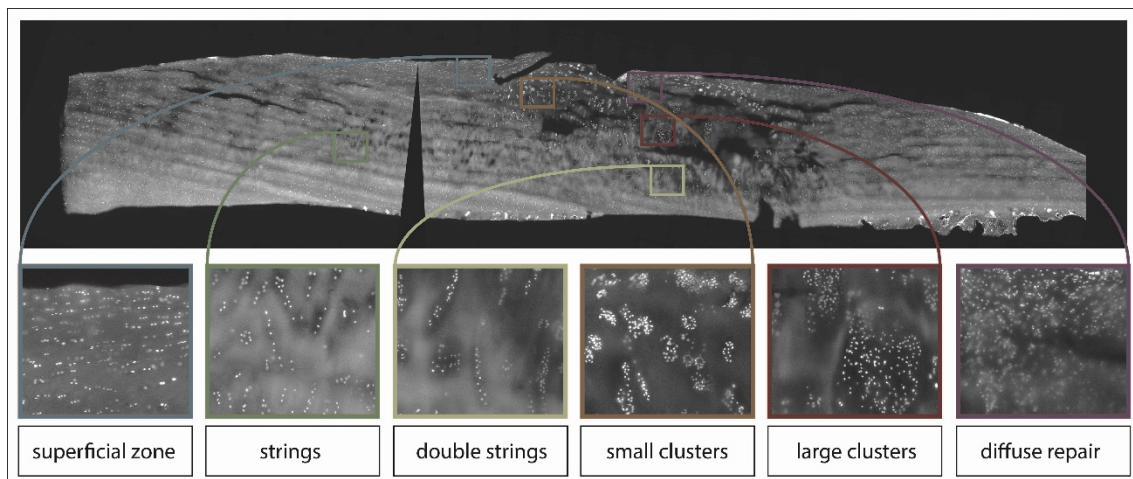


Abbildung 4: Arthrostadien im hyalinen Knorpel eines Kniegelenks. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags [33].

In der oberen mikroskopischen Abbildung ist der hyaline Knorpel im Querschnitt zu sehen. Die zum Gelenkinnenraum befindliche Seite ist oben in der Abbildung zu sehen. Zusätzlich sind im unteren Teil Vergrößerungen der Tangential-/Superficialzone und die verschiedenen Zellmusteranordnung abgebildet. Die hellen Punkte stellen Chondrozyten und ihre Anordnung dar.

1.4.4.2 Einfluss der Angiogenese bei degenerativen Veränderungen im Rahmen von Arthrose

Hinter der Entstehung neuer Blutgefäße steckt der grundlegende Mechanismus der Angiogenese. Angiogenese ist schon seit mehreren Jahren ein fester Bestandteil der Forschung in Bezug auf Arthrose-Entstehung. Angiogenese ist physiologisch an der Entwicklung von langen Röhrenknochen, als auch an der Frakturheilung beteiligt [34, 35]. In der sogenannten enchondralen Ossifikation (Entwicklung von Knorpel zu Knochen) ist die Angiogenese ein fester Bestandteil. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass in dem nicht vaskularisierten Knorpel der Gehalt an Angiogenesefaktoren niedriger ist als im arthrotisch veränderten Knorpel [36, 37]. Weiterhin ist Angiogenese ein mit Inflammation eng verbundener Prozess, in der die beiden Abläufe sich gegenseitig stimulieren, beziehungsweise verstärken können [38]. Durch dieses Zusammenspiel der zwei Vorgänge wird ihnen auch ein enger Zusammenhang mit der Schmerzentstehung nachgesagt [36, 38]. Zuletzt ist zu erwähnen, dass einige Angiogenesefaktoren eine Rolle bei der Entstehung von Osteophyten spielen. Der wohl am besten erforschte Angiogenesefaktor ist VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A). VEGF-A ist ein Protein, welches hauptsächlich für die Bildung neuer Gefäße zuständig ist [39]. Weitere Funktionen sind außerdem die Reifung und die Differenzierung von Endothelzellen [40]. Auch in der Knochenentwicklung, beziehungsweise der Knochenheilung und der Entstehung von Osteophyten ist VEGF-A involviert [38, 40]. Zudem stellt VEGF-A eine Schnittstelle der Angiogenese und der Inflammation dar.

Ein weiteres Protein, welchem bei der Angiogenese eine wichtige Rolle zukommt, ist PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule). Endothelzellen, sowie Leukozyten, die an entzündlichen Prozessen beteiligt sind, exprimieren das Protein auf ihrer Oberfläche [41]. Es ist beteiligt an den Zell-Zell-Kontakten, der Thrombozytenfunktion und auch an der Angiogenese [41-43].

1.4.4.3 Das Apoptoseverhalten der Chondrozyten bei Arthrose

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein grundlegender Mechanismus jeder Zelle. Hierbei können Zellen bei maligner Entartung, oxidativem oder anderweitigem intrinsischen Stress auf natürliche Weise eliminiert werden. In Bezug auf die Relevanz der Apoptose im Progress der Arthrose gibt es unterschiedliche Meinungen. Eine Arbeit kam zu dem Ergebnis, dass in gesundem Gewebe der Anteil an apoptotischen Chondrozyten bei 5-11% und im arthrotischen Gewebe ein Wert zwischen 21-55% liegt. Jedoch ist dieser Wert umstritten, da bei einer solch hohen Apoptoserate die Synthese der Matrix eingeschränkt wäre und es deutlich schneller zum Verlust von Gewebe kommen würde. Aigner et. al haben nach ihren Forschungen einen Wert von 0,1% (nicht publizierte Ergebnisse) vorgeschlagen [28].

In dieser Arbeit sollen die Proteine Annexin V und Caspase 3 im Hinblick auf Apoptose genauer untersucht werden.

Annexin V befindet sich bei gesunden Chondrozyten üblicherweise im Zytoplasma. Es übt verschiedene Funktionen, wie Anlagerung an Kollagen Typ X oder Inhibition der Proteinase K, aus [44, 45]. Auch lagert sich Annexin V an Phospholipide oder Calcium an [45]. Diese Funktion ist wichtig, da hierdurch Apoptose nachgewiesen werden kann. Annexin V lagert sich außerdem auch an Phosphatidylserin an, welches sich auf der Innenseite der Membran befindet. Bei dem programmierten Zelltod dreht das Phosphatidylserin sich nach außen und signalisiert dem Immunsystem, dass die Zelle verdaut, beziehungsweise abgetötet werden kann. Befindet sich also Annexin V auf der äußeren Seite der Zellmembran, ist das ein Hinweis für stattfindende Apoptose [45]. Die genaue Funktion von Annexin V ist jedoch noch nicht endgültig erforscht.

Caspase 3 (cysteinyl-aspartate specific protease) ist ein weiteres Protein, welches in die Signalkaskade der Apoptose eingeschaltet ist [46]. Es trägt seinen Namen, weil es einen Cysteinrest in seinem aktiven Zentrum enthält. Das Protein kann durch intrinsische oder extrinsische Faktoren aktiviert werden. Intrinsische Faktoren sind sogenannte Stressoren, welche über Mitochondrien den Stress in der Zelle vermitteln und auslösen können. Die Stressoren setzen das mitochondriale Protein Cytochrom C frei und lösen über Procaspase 9 und

Einleitung

folgend Caspase 3 Apoptose aus. Der extrinsische Weg beginnt über den Death-Rezeptor auf der Außenseite der Zellmembran. Dieser kann beispielsweise durch eine T-Killer-Zelle aktiviert werden. Nach Aktivierung von Caspase 8 wird auch Caspase 3 aktiviert. Somit wird bei jeder Einleitung der Apoptose-Kaskade Caspase 3 aktiviert. Dies wiederum macht das Protein zu einem guten Marker für Apoptose.

1.4.4.4 Gesteigerte Proliferation als Ausgleich der degenerativen Veränderungen bei Arthrose

Ein weiterer wichtiger Prozess bei der Regulation des Zellüberlebens ist die Zellproliferation. Der Forschungsstand im Hinblick auf diese Proliferation ist dabei weitaus größer als bei der Apoptose. Hierbei konnten Arbeiten zeigen, dass von einer gesteigerten Proliferation in arthrotischem Gewebe ausgegangen werden kann. Auch die Entdeckung der Cluster lässt vermuten, dass Chondrozyten sich im Verlauf der Schädigung vermehren. Im gesunden hyalinen Knorpel hingegen findet keine bemerkenswerte Proliferation statt [47, 48].

Um zusätzlich genauere Erkenntnisse über die Proliferation in arthrotischem Gewebe zu gewinnen, wurden in dieser Arbeit die Proteine PCNA und Ki-67 untersucht.

PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) ist ein im Zellkern befindliches Protein und ein wichtiger Co-Faktor der DNA-Replikation [49]. Es umgibt den Folge- und Leitstrang der aufgespalteten DNA und spielt eine Rolle bei der Reparatur [50]. Das Protein wirkt als Enzym auf die DNA-Polymerase, sorgt für eine hohe Prozessivität und hat eine katalytische Wirkung auf die DNA-Polymerase-Delta [50, 51]. PCNA umgibt in seiner ringförmigen Struktur die DNA und bewegt sich kreisförmig um den jeweiligen DNA-Strang [49].

Ein weiterer Marker für die Proliferation ist das Protein Ki-67. Es befindet sich während der Interphase im Zellkern [30, 52]. Sobald sich der Zellkern während der Mitose auflöst, lagert sich das Protein an die Chromosomen an [52]. In der G₀-Phase der Mitose, in der sich eine Zelle nicht mehr teilt, ist das Protein Ki-67

nicht mehr zu finden [52]. Hierdurch ist das Protein ein wichtiger Marker für die Proliferation [52].

1.4.4.5 Hypertrophe Differenzierung von Chondrozyten im Progress von Arthrose

Es konnte festgestellt werden, dass die Chondrozyten im Prozess der Arthrose unterschiedliche phänotypische Veränderungen durchlaufen können. Zum einen können die Chondrozyten sich in Richtung Fibroblasten-ähnlicher Synthese entwickeln (Dedifferenzierung), zum anderen auch in Richtung hypertropher Chondrozyten (Differenzierung). Durch Dedifferenzierung und Differenzierung sind Chondrozyten dazu befähigt, ihre phänotypische Modulation, als auch die Synthese verschiedener Produkte anzupassen. Bei der Dedifferenzierung produzieren sie überwiegend Kollagen I, III und V, wohingegen bei der Differenzierung Kollagen X das vorrangig synthetisierte Kollagen darstellt. Zusätzlich dazu gehört die Matrix-Metalloproteinase-13, welche für eine Degradation von beispielsweise Kollagen II befähigt ist, zu einem anerkannten Marker von hypertrophen Chondrozyten [53, 54]. Beim ausgewachsenen Knorpel ist Kollagen Typ II das vorherrschende Strukturprotein [28, 55]. Kommt es allerdings zu einer Schädigung oder Fissuren im Knorpel, differenzieren sich die Chondrozyten in Richtung hypertropher Chondrozyten und eine Degradation des hyalinen Knorpels wird eingeleitet.

Kollagen X ist ein Strukturprotein der EZM, welches aus einer heterogenen Gruppe von Proteinen besteht. Die Tertiärstruktur ist eine rechtsgängige Superhelix, die sehr eng verläuft [55, 56]. Dies sorgt für die charakteristische Zugfestigkeit der Kollagene [55]. Kollagen Typ X tritt außerdem vor allem bei der enchondralen Ossifikation auf [57].

Im Laufe der Jahre hat sich Kollagen X in der Forschung zu einem gut etablierten Marker für Arthrose entwickelt. Eine ausgeprägte Kollagen X Ausschüttung der Chondrozyten deutet hierbei oft auf eine fortgeschrittene Arthrose hin [58].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit und führt zu erheblichen Einschränkungen im Alltag der betroffenen Patienten. Bisherige Therapiemöglichkeiten, wie Schmerztherapie und operative Verfahren, stellen dabei keinen kurativen Ansatz dar und verhindern nicht die Progression der Erkrankung. Daher ist das Ziel der gegenwärtigen Forschung, den genauen Mechanismus hinter Arthrose besser zu verstehen, um gezieltere Therapieansätze etablieren zu können. Ziel dieser Arbeit ist daher, das Ausmaß der Veränderung verschiedener Proteine, welche eine essenzielle Rolle bei der Arthroseentstehung spielen, anhand der Einteilung von Arthrose nach Rollaufs et. al zu analysieren (siehe Abbildung 4). Aufgrund der visuell ersichtlichen Vermehrung der Chondrozyten zu Clustern, welche einen Hinweis auf gesteigerte Proliferation in arthrotischem Gewebe liefert, sollen zunächst die Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 untersucht werden.

Um das Verhalten der Chondrozyten bei der Entstehung einer Arthrose insgesamt besser nachvollziehen zu können, sollen außerdem die Apoptose, die Angiogenese und die Differenzierung genauer betrachtet werden.

Das Apoptoseverhalten soll dabei mittels der Proteine Annexin V, Caspase 3 analysiert werden, während die Angiogenese anhand der Expression von VEGF-A und PECAM-1 untersucht werden soll.

Anhand der Expression von Kollagen X, welches als Marker für hypertrophe Differenzierung und bereits des Öfteren mit Arthrose in Verbindung gebracht werden konnte, soll letztendlich arthrotisches Gewebe detektiert werden.

Um diesen Untersuchungen nachzugehen, sollen im ersten Schritt immunhistologische Bilder erstellt werden, welche unter dem Mikroskop ausgewertet werden und einen qualitativen Nachweis der Proteine darstellen. Um zusätzlich einen quantitativen Nachweis des Proteingehalts zu ermitteln, sollen bei erkennbaren Unterschieden in den Arthrostufen Folgeversuche mit ELISA's oder Western Blots durchgeführt werden.

Basierend auf Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe (unveröffentlichte Daten) wie auch Hinweisen in der Literatur, wurde erwartet, dass Kollagen X im Laufe der Degeneration zunimmt [59, 60]. Weiterhin wurde erwartet, dass sowohl

Einleitung

Proliferation wie auch Apoptose im Zuge der zellulären Musterveränderung zunehmen [30, 45, 61, 62]. Ein gleiches Ergebnis wurde ebenfalls für die Angiogenese angenommen [63-65].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Farbstoffe

Tabelle 1: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Hersteller
Calcein	Cayman/Biomol
Dapi (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)	Thermo Fischer Scientific
Propidiumiodid (Kat. Nr. BMS500PI)	Thermo Fischer Scientific

2.1.2 Primärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Annexin V (H-3) sc-74438 J2416 Mouse	Santa Cruz Biotechnology
Cleaved Caspase 3 D175 5A1E Rabbit	Cell Signaling Company
Ki-67 AB16667	Abcam Company
Kollagen X AB58632 Rabbit	Abcam Company
PCNA [PC10] Mouse mAB2586	Cell Signaling Company
PECAM-1 sc-376764	Santa Cruz Biotechnology
VEGF-A TK279656 P802	Thermofischer Invitrogen

2.1.3 Sekundärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594 AB150116	Abcam Company
Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594 AB150080	Abcam Company

2.1.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Tabelle 4: Verwendete ELISA-Kit's

ELISA	Hersteller
Kollagen X (Kat. Nr. E-EL-H0783)	Elabscience
PCNA: 1. (Kat. Nr. CSB- EL017621HU) 2. (Kat. Nr. OKCD02760)	1. Cusabio Biotech Co. 2. Aviva System Biology
VEGF-A (Kat. Nr. KHG0111)	ThermoFisher Invitrogen

2.1.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller/Bestandteile
70% Ethanol (Kat. Nr. ETO-5000-99- 1)	SAV-LIQUID Production GmbH
Bovines Serumalbumin (Kat. Nr. 6Y012791)	Appli Chem GmbH
Bradford-Färbemittel (Kat. Nr. 500- 0006)	Bio-Rad Laboratories GmbH

Material und Methoden

DMEM Dulbecco´s Modified Eagle Medium (Kat. Nr. 41966-029)	Life Technologies GmbH
DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX; Dulbecco´s Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (Kat. Nr. 31331-028)	Life Technologies GmbH
DPBS Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (Kat. Nr. 14190-094)	Life Technologies GmbH
ECL Substrat (Kat. Nr. PI-32109)	Thermo Scientific
Fluorescence Mounting Medium (Kat. Nr. S3023)	Dako Deutschland GmbH
Formaldehyd (Kat. Nr. 6332043)	Carl Roth GmbH&Co.KG
Fungizone Antimycotic (Kat. Nr. 15290-026)	Life Technologies GmbH
Glycerin (Kat. Nr. 1040921000)	Merck
Glycin (Kat. Nr. 0079)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Hyaluronidase (Kat. Nr. CAS37326-33-3)	Sigma Aldrich
Kollagenase (Kat. Nr. 10103578001)	Sigma Adlrich
Lyse Puffer (ELISA)	Siehe Tabelle 11
Milchpulver (Kat. Nr. T145.2)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Penicillin Streptomycin (Pen Strep) (Kat. Nr. 15140122)	Life Technologies GmbH
Sodium dodecyl sulfate; SDS (Kat. Nr. 20760)	SERVA Electrophoresis GmbH
Staurosporin	Abcam Company
Temed (Kat. Nr. 161-0801)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tinte schwarz (Kat. Nr. 201665)	Pelikan
Tissue-Tek (Kat. Nr. 4583)	Sakura
Tris Glycine SDS Sample Buffer (Kat. Nr. LC2676)	Life Technologies

Material und Methoden

Triton X100 (Kat. Nr. T9284)	Sigma Aldrich
Trypsin EDTA (Kat. Nr. T4174)	Sigma-Aldrich
Tween 20 (Kat. Nr. 9127.1)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Kat. Nr. BCBL6887V)	Sigma Aldrich

Elektrodenpuffer

- 250 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris)
- 2 M Glycin

Blotpuffer

- 1:10 Elektrodenpuffer
- 20% Methanol

Laufpuffer

- 1:10 Elektrodenpuffer
- 0,1% (m/v) SDS

Probenpuffer (2x)

- 125 mM Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid (Tris-HCl), pH 6,8
- 4% (w/v) SDS
- 20% (v/v) Glycerin
- 10% (v/v) beta-Mercaptoethanol
- Bromphenolblau

TBS

- 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 150 mM NaCl

TBS-T

- 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 150 mM NaCl
- 0,1% (v/v) Tween 20

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
8-Well Chamber Slide (Kat. Nr. 94.6140.802)	Sarstedt
96 well-cell culture plate, sterile with lid (Kat. Nr. 655160)	Greiner Bio-One GmbH
Amersham Hyperfilm ECL (Kat. Nr. 28-9068-37)	GE Healthcare Bio-Sciences
Biopsiestanze 4mm (Kat. Nr. 48601)	Pfm Medical AG
Cellstar Tube (Kat. Nr. 210-261)	Greiner Bio-One GmbH
Centrifugal Filter Units (Kat. Nr. UFC801024)	Merck Millipore
Chondrosarkomzellen (Kat. Nr. SW-1353)	Cell line service
Objektträger (Kat. Nr. 01-1818/1)	R. Lanbgenbrinck Labor- und Medizintechnik
Fibrosarkomzellen (Kat. Nr. HT-1080)	American Type Culture Collection
Desinfektionsmittel Descosept AF (Kat. Nr. 483611)	Dr. Schumacher GmbH
Eppendorf Research plus (10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl) (Kat. Nr. 3120 000.020/046/054/062)	Eppendorf AG
Eppendorf Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml) (Kat. Nr. 0030 121.023/086/094)	Eppendorf AG
Falcon Serological Pipet (5 ml; 10 ml; 25 ml) (Kat. Nr. 357543/ 357551/ 357525)	Corning Incorporated Life Sciences
Handschuhe (Kat. Nr. 942202)	Hartmann
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved

Material und Methoden

Objektträger (Kat. Nr. 03-0060)	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik
Petrischalen (Kat. Nr. 628102)	Greiner Bio-One GmbH
Rasierklinge (Kat. Nr. 7005115E)	Wilkinson
Schneideplatte	Selbst angefertigt
Skalpell (Kat. Nr. 5205052)	Feather Safety Razer
SurPhob Pipettenspitzen plus (10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl) (Kat. Nr. VT0210/VT0230/VT0240/VT0260)	Biozym Scientific GmbH
Transfer membrane Immobilon-p (Kat. Nr. IPVH00010)	Merck KGaA
Whatmannpapier	Carl Roth GmbH & Co.KG
Zellkulturflasche (Kat. Nr. 658170)	Greiner Bio-One GmbH

2.1.7 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Absorbance Reader (Kat. Nr. 237071)	BioTek Instruments
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -70°C	GFL Burgwedel
Gelektrophoresekammer (Agarose Gel)	Biometra
Gelektrophoresekammer (Mini PROTEAN Tetra Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gelgehäusestation (Mini PROTEAN Tetra Handcast system)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Horizontalschüttler (Kat. Nr. MTS4)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Inkubator	Multimed Wicker
Kryotom Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH

Material und Methoden

Kühlschrank (30/GT/N1201V)	Haier
Mikroskope: - (LSM 510 Meta) - (Axiophot) - (Flouvert fs) - (Leica DM IRBE)	- Carl Zeiss Microscopy GmbH - Carl Zeiss Microscopy GmbH - Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH - Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
Pipettierhilfe Pipetboy „Pipetus“ (Kat. Nr. 9907200)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Thermomixer	Eppendorf AG
Ultraschallbad (Transsonic 460)	Elma Ultrasonic
Vortexmischer REAXtop	Heidolph
Wasserbad W 12	Labortechnik Medingen
Westernblot Entwicklungsmaschine (Curix 60 Processor)	Agfa-Gevaert N.V.
Xplorer 12-Kanalpipette	Eppendorf AG
Zentrifugen: - (Kat. Nr. 5417R) - (Allegra 64R)	Eppendorf AG Beckmann Coulter

2.1.8 Softwares

Tabelle 8: Verwendete Softwares

Software	Hersteller
Axio Vision Rel. 4.8 Ink.	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Endnote X9	Alfasoft GmbH
Image J 1.53a	Wayne Rasband (NIH)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation
Microsoft Word	Microsoft Corporation
Power Point	Microsoft Corporation
SPSS	IBM

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Die Knorpelproben wurden von Patienten gewonnen, die eine Knie totalendoprothese (KTP) erhielten. Es wurden 14 Patientenproben für die immunhistologische Färbung und 87 Patientenproben für den Enzyme-linked Immunosorbent Assay verwendet. Die Operationen wurden in der CRONA Klinik in Tübingen und dem Winghofer Medicum in Rottenburg am Neckar durchgeführt. Vor jeder Operation wurden die Patienten über die Studienteilnahme aufgeklärt. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor (Nummer: 674/2016BO2).

Während des Transports ins Labor wurden die Knorpelproben in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) gelagert. Zur längeren Haltbarkeit des Knorpels wurden dem Medium 1,2% (v/v) Amphotericin und 2% (v/v) Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Bevor die Knochenstücke unter der Sterilbank bearbeitet wurden, wurde 15 Minuten das UV-Licht der Sterilbank aktiviert, um eine sterile Arbeitsfläche zu gewährleisten. Anschließend wurden die Knochenstücke in Petrischalen makroskopisch bewertet.

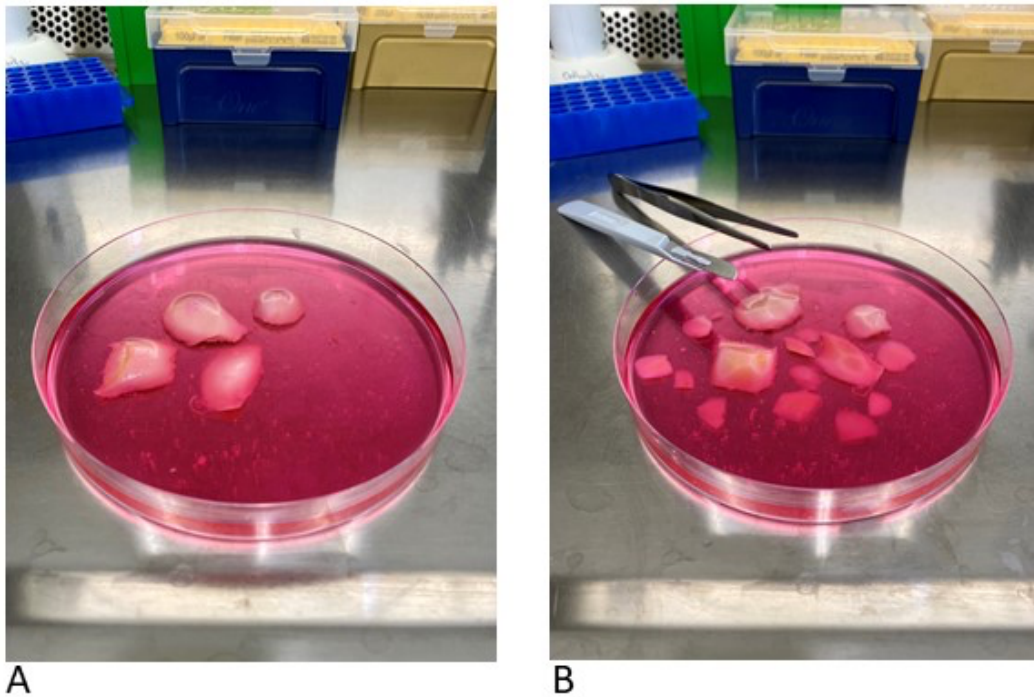


Abbildung 5: Präparation der Knorpelproben.

(A) Knochenstücke mit hyalinem Gelenkknorpel nach einer KTP. (B) Knorpelgewebe wurde mit Skalpell vom Knochen abgeschnitten.

Zunächst wurde der Knorpel mit einem Skalpell und einer Pinzette vom Knochen gelöst. Anschließend wurden die Knochenstücke entsorgt und die Knorpelschnitte entweder zur qualitativen Auswertung (immunhistologische Färbung), oder zur quantitativen Auswertung (ELISA und Western Blot) aufbereitet. Die Knorpelproben wurden für die Auswertungen unterschiedlich präpariert, worauf in den Kapiteln 2.2.2 und 2.2.3 näher eingegangen wird.

2.2.2 Immunhistologische Färbung

Für die immunhistologische Färbung wurden die Knorpelschnitte, deren Durchmesser ein bis zwei Zentimeter betrug, in Cellstar Tube mit DMEM gelegt. Für die qualitative Auswertung wurden die Knorpelschnitte an einem Kryotom in 35 Mikrometer (μm) dicke Scheiben geschnitten. Die Schnittrichtung lag dabei tangential zur Knorpeloberfläche. Dabei wurden maximal neun Schnitte pro

Material und Methoden

Knorpelstück erzeugt um zu gewährleisten, dass die obersten 300 µm und damit die Superficial Zone untersucht wurde.

Zuerst wurde dem Probenhalter des Kryotoms ein bereits gefrorenes Stück Tissue Tek aufgeklebt, welches als zusätzlicher Probenhalter fungierte (siehe A in Abbildung 6). Hiermit sollte gesichert werden, dass der Knorpel gut fixiert ist und sich nicht bewegt. Daraufhin wurde diese Halterung erneut mit Tissue Tek bedeckt und die Knorpelprobe mit Hilfe einer Pinzette direkt auf die Halterung gelegt (siehe B in Abbildung 6). Hierauf wurde zugewartet, bis der Tissue Tek angefroren war. Schließlich wurde der gesamten Knorpel mit Tissue Tek bedeckt, damit der Knorpel optimal fixiert war (siehe C in Abbildung 6).

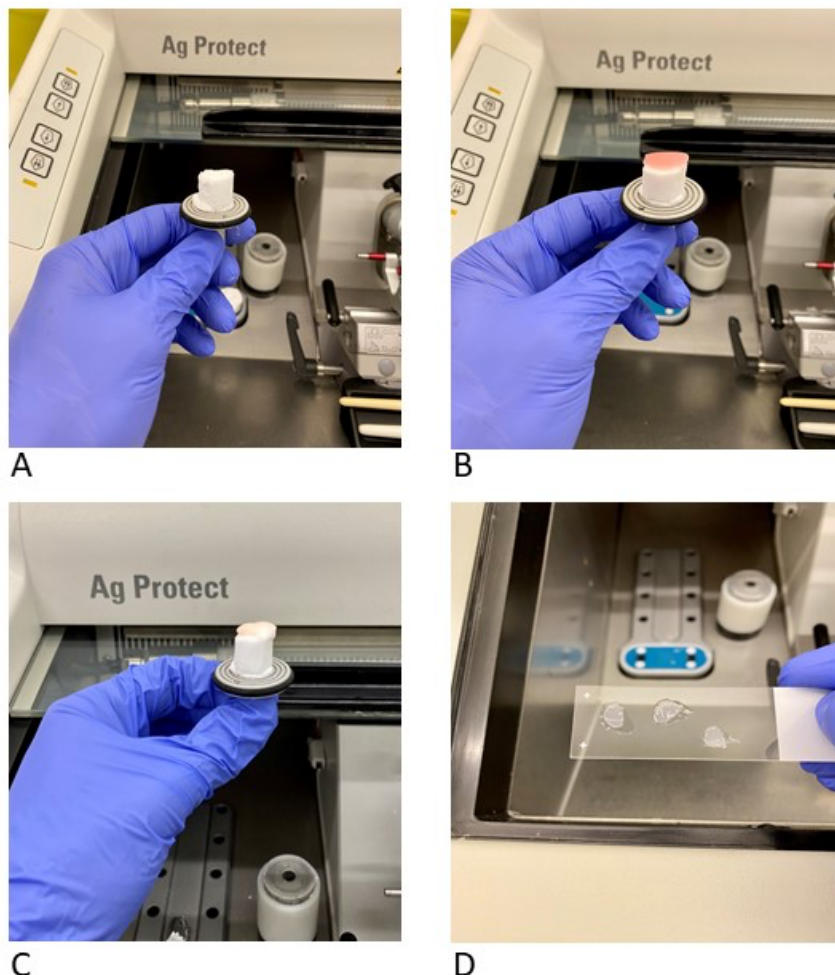


Abbildung 6: Zuschneiden von hyalinem Knorpel am Kryotom.

(A) Probenhalter mit zusätzlichem Tissue Tek Probenhalter; (B) Auflegen einer Knorpelprobe auf den Probenhalter; (C) Bedecken der gesamten Knorpelprobe mit Tissue Tek; (D) 35 Mikrometer Schnitte, die mit einem Objektträger aufgenommen wurden.

Material und Methoden

Ab diesem Schritt wurde der Knorpel mit dem Kryotom in 35 µm geschnitten (siehe D in Abbildung 6). Die Schnitte wurden mit Objektträger aufgenommen und in einer leeren Petrischale zwischengelagert. Sobald genügend Schnitte für die immunhistologische Färbung vorhanden waren, wurden die Objektträger mit den Knorpelschnitten in eine Petrischale gelegt und mit Phosphate Buffered Saline (PBS) übergossen. Daraufhin wurden die Knorpelschnitte mit einer Pinzette von dem Objektträger gelöst und vom Tissue Tek befreit. Die 35 µm dicken Knorpelschnitte befanden sich in der Petrischale und wurden mit einer Pinzette in ebenfalls mit PBS gefüllte 1,5 Milliliter (ml) Mikroreaktionsgefäße gelegt. In je einem Mikroreaktionsgefäß befanden sich zwischen sechs und zehn Schnitte. Die Mikroreaktionsgefäße wurden mit den Initialen des Patienten, der geplanten Färbung, sowie dem Datum beschriftet. Im Folgenden wird ein dreiteiliger Reinigungsprozess, der als Waschvorgang bezeichnet wird, beschrieben. Hierbei wurden die Mikroreaktionsgefäße für fünf Minuten im Thermomixer bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Nach jedem Durchlauf wurde das PBS aus den Mikroreaktionsgefäßen entnommen und durch neues PBS ersetzt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass die Knorpelschnitte von dem restlichen Tissue Tek befreit werden.

Nach dem ersten Waschvorgang wurde der Knorpel fixiert, indem die Mikroreaktionsgefäße mit Formaldehyd befüllt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Fixierung sollte die ursprüngliche Architektur der Oberfläche durch Vernetzung der Zellproteine möglichst natürlich erhalten. Nach der Fixierung wurde erneut ein Waschvorgang durchgeführt.

Als nächster Schritt folgte der Enzymverdau. Die Aufgabe des Enzymverdaus war es, zelluläre Bestandteile in seine Abbauprodukte zu spalten, ohne die grundlegende Architektur zu zerstören und die Antigene zu demaskieren. Dies gewährleistet eine gute Bindungsmöglichkeit der Primärantikörper an das jeweilige spezifische Protein. Es wurden hierfür zwei verschiedene Enzyme verwendet. Zum einen wurde eine Kollagenase eingesetzt, welche sich gegen Kollagen VI und Fibrillin richtet. Als zweites Enzym diente eine Hyaluronidase, welche Biglykan, Kollagen III und Perlecan verdaut. Beide Verdauungsenzyme

Material und Methoden

wurden in einer 1 mg/ml (gelöst in PBS) Lösung und bei 37°C im Thermomixer angewendet. Die Unterschiede der Dauer und der Reihenfolge des Enzymverdauens zwischen den verschiedenen Proteinen werden in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Gesuchte Proteine mit den verwendeten Enzymen und der durchgeführten Wirkdauer.

	Collagenase	Hyaluronidase
Kollagen X	-	60 Minuten
PCNA	-	60 Minuten
Ki-67	60 Minuten	60 Minuten
Caspase 3	60 Minuten	60 Minuten
VEGF-A	150 Minuten	-
PECAM-1	-	150 Minuten
Annexin V	60 Minuten	60 Minuten

Bei allen Verdauungsprozessen wurde anfänglich Collagenase in die Mikroreaktionsgefäße gefüllt. Lediglich für Annexin V wurde zuerst die Hyaluronidase verabreicht.

Nach jedem Verdauungsprozess folgte ein Waschvorgang und im Anschluss das Blocken der Knorpelschnitte. Durch diesen Schritt soll die unspezifische Bindung des ersten Antikörpers an antikörperunspezifische Stellen, wie Pectine in der Zellwand oder auch Stärke, unterbunden werden. Dies gelingt, indem die Bindungsmöglichkeiten durch Proteine besetzt werden. Die Blocklösung besteht aus Bovinem Serumalbumin (BSA), das zu 5% (v/v) in PBS gelöst ist. Weiterhin wird Triton X100 im Verhältnis 0,3% (v/v) hinzugefügt. Triton X100 hat dabei die Funktion, Membranproteine in ihrer natürlichen Konformation aus der Membran freizusetzen.

Nach einem weiteren Waschvorgang wurde im nächsten Schritt der erste Antikörper hinzugefügt. Eine Liste der verwendeten Antikörper wird in Tabelle 2 dargestellt. Zunächst wurde eine PBS-Lösung mit 2,5% (w/v) BSA unter Zugabe der jeweiligen Antikörper im Verhältnis 1:100 erstellt. Bei Kollagen X, PECAM-1 und VEGF-A wurden die Verhältnisse je nach Erfordernis für ein gutes Ergebnis

Material und Methoden

angepasst. Für Kollagen X wurde ein Verhältnis von 1:500 verwendet, wohingegen bei PECAM-1 und VEGF-A die Konzentration der Antikörper erhöht werden musste, um eine ausreichende Bindung zu gewährleisten. Dabei wurde für PECAM-1 ein Verhältnis von 1:20 und für VEGF-A eine Relation von 1:50 verwendet. Die Mikroreaktionsgefäße wurden über Nacht bei 4°C im Thermomixer inkubiert. Außerdem war zu beachten, dass für jedes Protein eine Positiv- und eine Negativprobe verwendet wurde. Bei der Positivprobe wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Negativprobe wurde anstatt mit dem ersten Antikörper mit reinem PBS vermischt und in den Thermomixer gestellt. Hiermit sollte am Ende überprüft werden, ob die Antikörper auch spezifisch an die Proteine gebunden hatten.

Am nächsten Tag wurde der Thermomixer gestoppt und ein weiterer Waschvorgang durchgeführt. Zu beachten ist, dass die folgenden Schritte unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt wurden. Ziel der folgenden Schritte war es, die Primärantikörper und die Zellkerne unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Der Sekundärantikörper bindet dabei an den Primärantikörper und hat mithilfe eines Fluorochroms die Möglichkeit, unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt zu werden. Die Zellkerne wurden mit Dapi angefärbt. Hierfür wurde der Sekundärantikörper im Verhältnis 1:100 und Dapi im Verhältnis 1:1000 in reinem PBS gelöst. Für Kollagen X, Caspase 3, Ki-67 und VEGF-A wurde Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594 als Sekundärantikörper verwendet. Bei PCNA, Annexin V und PECAM-1 hingegen wurde Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594 hinzugefügt.

Daraufhin wurden die Mikroreaktionsgefäße für 120 Minuten bei 21°C im Thermomixer inkubiert. Um, wie bereits erwähnt, auf lichtgeschützte Arbeitsbedingungen zu achten, wurden bei diesem Inkubationsvorgang die Mikroreaktionsgefäße zusätzlich mit Alufolie abgedeckt. Nach zwei Stunden folgte ein letztes Mal der dreifache Waschvorgang.

Nach der fertigen Anfärbung der Knorpelschnitte konnten sie schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Die Schnitte wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Mikroreaktionsgefäß entnommen und auf einen Objektträger aufgelegt. Hierbei musste darauf geachtet werden, den Knorpel

möglichst ohne Fältelung auf dem Objektträger zu platzieren. Es wurden zwei bis vier Schnitte auf einem Objektträger verteilt. Der Objektträger wurde mit Initialen, aktuellem Datum und der spezifischen Färbung beschriftet. Auf die Knorpelschnitte wurde jeweils ein Tropfen Fluorescent Mounting Medium aufgetragen und ein Deckglas darübergelegt. Dieses Medium sollte die Visualisierung der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop verbessern und ein frühzeitiges Ausbleichen der Proben verhindern. Um das Austrocknen möglichst lange zu unterbinden, wurden die Deckgläser auf den Objektträgern mit Nagellack abgedichtet.

Für die anschließende Auswertung der fertigen Schnitte wurde die Software Axio Vision Rel. 4.8 Ink. von Zeiss und ein Objektiv von Zeiss mit einer 10- sowie 40-fachen Vergrößerung verwendet. In den Mosaikaufnahmen (Objektiv mit einer 10-fachen Vergrößerung) wurden die Zellkerne und die Antikörperbindung in zwei unterschiedlichen Farbeinstellungen dargestellt, um die Beurteilung der Färbungen zu veranschaulichen. Nach dem Mikroskopieren wurden die Objektträger lichtgeschützt im Kühlschrank (4°C) gelagert.

2.2.3 Probenverarbeitung und Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Um den Knorpel zur quantitativen Auswertung aufzubereiten, wurde wie folgt verfahren. Der bereits vom Knochen gelöste Knorpel wurde mit einer 4 mm Stanze ausgestanzt. Diese ausgestanzten Knorpelstücke wurden in 2 ml großen Mikroreaktionsgefäßen mit DMEM gelagert. Da der Fokus dieser Arbeit auf den Chondrozyten aus der Tangentialzone liegt, war das Ziel, die oberen 300 µm des hyalinen Knorpels zu erhalten. Dafür wurde eine speziell für Arbeiten im Zellbiologischen Labor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen angefertigte Schneideplatte aus Metall benutzt.

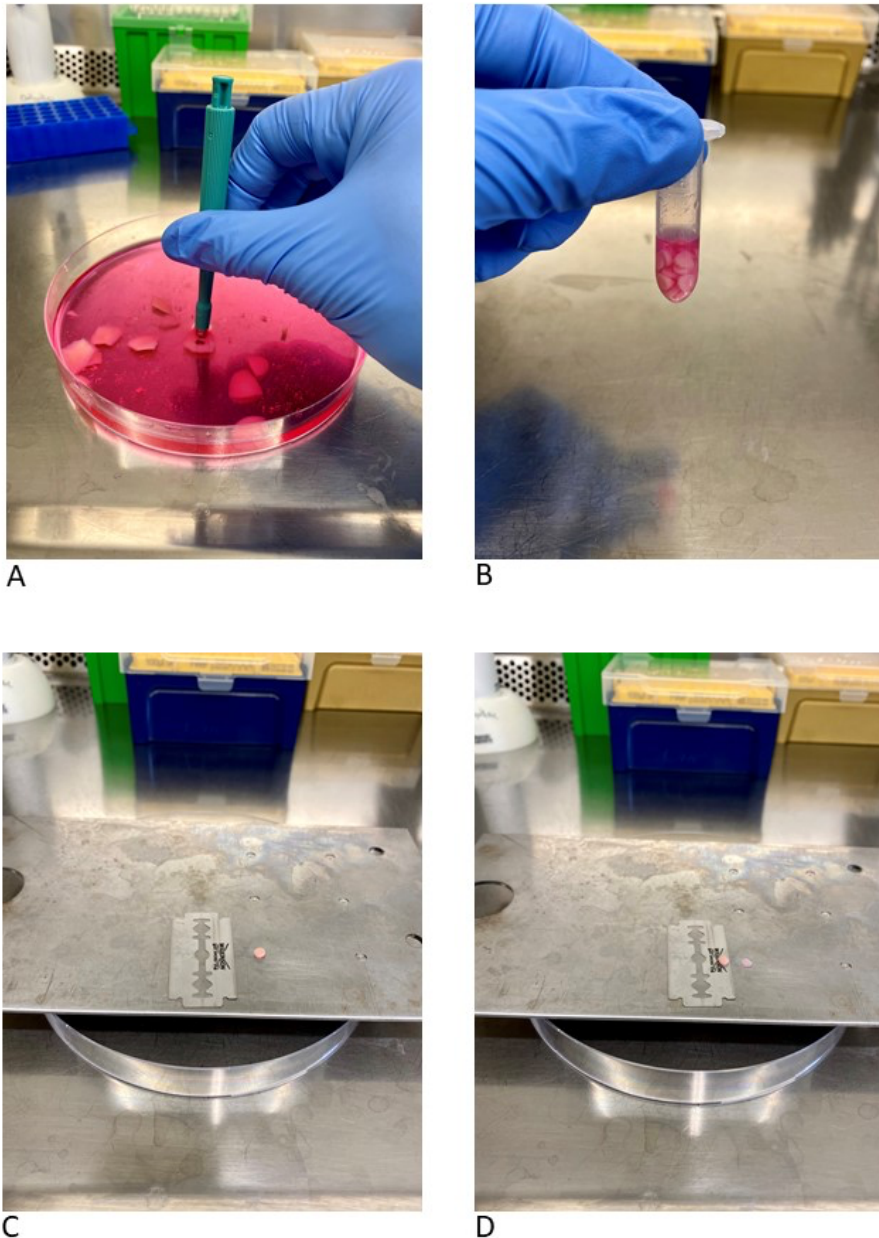


Abbildung 7: Knorpelstücke, die mit einer 4mm Stanze ausgestanzt wurden.

(A) Bearbeiten der Knorpelschnitte mit der Stanze. (B) Knorpeldiscs zwischengelagert in einem Mikroreaktionsgefäß. (C) Knorpeldisc in einem 300 µm tiefen Loch. (D) Nach parallelem durchschneiden mit einer Rasierklinge, damit ein 4mm breites und 300 µm hohes Stück Knorpel entsteht.

Die 4 mm breiten Knorpelstücke passten exakt in die vorgefrästen 300 µm tiefen Löcher der Metallplatte (siehe C in Abbildung 7). Die Knorpelstücke wurden mit ihrer zum Gelenkinnenraum gerichteten Seite in die Löcher platziert. Nun wurde das ausgestanzte Knorpelstück mit einer Pinzette in einem Loch fixiert und mit einer Rasierklinge parallel zur Schneideplatte abgeschnitten (siehe D in

Material und Methoden

Abbildung 7). Somit entstanden 4 mm breite und 300 µm hohe Knorpelschnitte. Auch diese Discs des Knorpels wurden wieder in 2 ml großen Mikroreaktionsgefäßen zwischengelagert.

Als nächstes wurde eine 96-Well-Platte mit DMEM befüllt. Zusätzlich zu DMEM wurde Calcein im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Hierbei wurde unter lichtgeschützten Bedingungen gearbeitet, da durch zu starke Lichtbelastung die Signalintensität unter dem Mikroskop vermindert wird. Calcein färbt lebende Zellen an und ermöglicht es, den Knorpelschnitt in Single Strings, Double Strings, Small Cluster und Big Cluster einzuteilen. In der Well-Platte wurden jeweils 130 Mikroliter (µl) von der Lösung in die einzelnen Behälter gegeben. In jeden der einzelnen Behälter wurde jeweils eine Knorpelscheibe gelegt. Anschließend wurde die Wellplatte für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Well-Platte mit den Schnitten unter dem Mikroskop untersucht. Die Knorpelschnitte wurden in Single Strings, Double Strings, Small Cluster, Big Cluster eingeordnet.

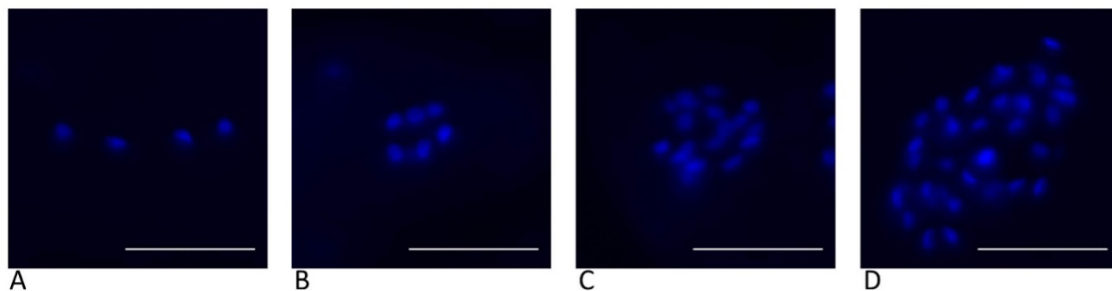


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung der Chondrozytenanordnung.

Die Zellkerne wurden mit Dapi blau dargestellt. Es wurde ein 40-faches Objektiv verwendet. (A) Single Strings, (B) Double Strings, (C) Small Cluster, (D) Big Cluster. Maßstab: 50 µm.

Die Knorpelschnitte wurden anhand ihrer Chondrozytenanordnung in Mikroreaktionsgefäße sortiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Mikroreaktionsgefäße wurden anschließend in einem Kühlschrank bei -75°C gelagert.

Das Sortieren der Knorpelschnitte wurde fortgeführt, bis drei Gruppen mit je 50 Single Strings, 50 Double Strings, 50 Small Cluster und 50 Big Clustern vorhanden waren. Diese Gruppen wurden mit der Abkürzung N1, N2 und N3 bezeichnet.

Tabelle 10: Verwendete Muster für jede Versuchsgruppe N.

			Summe	
Versuchsgruppen N1–N3:	N1	Muster	Single Strings	51
			Double Strings	51
			Small Cluster	49
			Big Cluster	49
	N2	Muster	Single Strings	46
			Double Strings	54
			Small Cluster	49
			Big Cluster	50
	N3	Muster	Single Strings	49
			Double Strings	50
			Small Cluster	49
			Big Cluster	55

2.2.3.1 Proteinextraktion

Das Ziel des nächsten Schrittes war es, die Proteine aus dem gesammelten Material zu isolieren. Hierbei sollten quantitativ mittels eines ELISA-Tests oder eines Western Blots spezifisch die gesuchten Proteine detektiert werden.

Zunächst wurden hierfür die Proben in einem Behälter mit Trockeneis zwischengelagert. Für jede Patientengruppe N wurden vier Mikroreaktionsgefäße verwendet, in denen sich jeweils die Single Strings, Double Strings, Small Cluster und Big Cluster befanden. Vorbereitend wurde ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff bereitgestellt und ein Lyse Puffer hergestellt, welcher die in Tabelle 11 aufgeführten Inhaltsstoffe umfasste.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Lyse Puffers. Sowie die jeweilige Firma und die Produktnummer der Bestandteile.

Bestandteile	Hersteller (Katalognummer)
25 mM Tris-HCl, pH 7,5	J.T. Baker (Kat. Nr. 4103-04)
100 mM NaCl	VWR International (Kat. Nr. BDH0286)
1% (V/V) IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich (Kat. Nr. I-3021)
NaOH pellets	J.T.Baker (Kat. Nr. 3722)

80 µM Aprotinin	Sigma-Aldrich (Kat. Nr. A1153-1MG)
2 mM Leupeptin	Sigma-Aldrich (Kat. Nr. L9783-5MG)
4 mM Benzamidine	Sigma-Aldrich (Kat. Nr. B6505-5G)

Es wurden vier weitere Mikroreaktionsgefäße vorbereitet, welche mit 200 µl des Lyse Puffer befüllt und mit Single Strings, Double Strings, Small Cluster und Big Cluster beschriftet wurden.

Als nächstes wurden die Proben der jeweiligen Patientengruppe in den flüssigen Stickstoff gelegt. Kurz darauf wurde ein Mikroreaktionsgefäß für eine Arthrosestufe aus dem Stickstoff geholt und die gefrorenen Knorpelstücke in einen Mörser geleert. Daraufhin wurde dem Mörser flüssiger Stickstoff beigemischt, so dass alle Knorpelschnitte bedeckt waren. Sobald der flüssige Stickstoff verdunstet war, wurden die Knorpelschnitte mit dem Stößel zerrieben. Diesen Vorgang wurde drei- bis viermal wiederholt, bis die Knorpelschnitte eine pulverartige Form angenommen hatten.

Die zerkleinerten Knorpelproben wurden mit einem Spatel in die vorbereiteten, Mikroreaktionsgefäße gefüllt. Dieser Prozess wiederholte sich für jede Arthrosestufe, bis vier Mikroreaktionsgefäße vorhanden waren, in denen sich 200 µl Lyse Puffer und die jeweiligen Knorpelproben befanden.

Der nächste Schritt führte zum Auflösen der Zellmembran und ermöglichte es, die intrazellulären Proteine freizusetzen. Hierzu wurden die Mikroreaktionsgefäße für 15 Sekunden in ein Ultraschallbad gelegt und für 30 Sekunden in Trockeneis zwischengelagert. Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt. Anschließend wurden die Mikroreaktionsgefäße bei 4°C, 138000 g und für 15 Minuten zentrifugiert. Somit entstand ein konzentrierter proteinhaltiger Überstand, welcher mit einer 200 Mikroliterpipette in eine „Centrifugal Filter Unit“ zur Weiterverarbeitung gefüllt wurde. Diese spezielle Zentrifugenfiltereinheit besitzt einen Filter, der beim Zentrifugieren nur Partikel durchlässt, die kleiner als 10 Kilodalton (kDA) sind. Somit wurde sichergestellt, dass nur gesuchte Proteine in dem Überstand verbleiben. Die Zentrifuge wurde hierbei auf 4°C, 7500 g und 15 Minuten eingestellt. Mit Hilfe einer 100 Mikroliterpipette wurde der Überstand in vier neu beschriftete Mikroreaktionsgefäße gefüllt.

2.2.3.2 Bradford-Test

Mittels des Bradford-Tests wurde photometrisch der Proteingehalt der Extraktionen aus 2.2.3.1 nachgewiesen. Somit konnten für die ELISA- und Western Blot-Versuche einheitliche und exakte Proteinkonzentrationen pipettiert werden.

Das Wirkprinzip des Bradford-Test beruht auf einer Bindung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G250. Die ungebundene, kationische Form hat sein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Nach der Komplexbildung mit den Proteinen entsteht eine blaue, anionische Form, die ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm hat. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch gemessen werden und gibt die Proteinkonzentration in der Lösung an. Die grüne Form von Coomassie G-250, die ein Elektron abgegeben hat, aber nicht an ein Protein gebunden ist, stört die Messung im Bradford-Assay nicht, da sie einen Absorptionsmaximum von 650 nm hat.

Außerdem wird eine Kalibrierungslösung benötigt, um eine genaue Konzentrationsbestimmung zu gewährleisten. Da in dieser Arbeit die Konzentration des Gesamtproteins aus dem Knorpel bestimmt wurde, konnte BSA als Standardprotein für die Kalibrierung verwendet werden. Die Konzentration der Standardlösung betrug 1,41 mg/ml. Dafür wurde BSA mit 0,9% (v/v) NaCl, 0,05% (v/v) NaN₃ zusammengebracht. Die Standardreihe bestand aus den in Tabelle 12 aufgeführten Werten.

Tabelle 12: Verwendete Standardkonzentrationen für eine Kalibrierung der photometrischen Proteinmessung.

Nullwert	0 µg/ml
Standard 1	5 µg/ml
Standard 2	10 µg/ml
Standard 3	20 µg/ml
Standard 4	40 µg/ml
Standard 5	60 µg/ml
Standard 6	80 µg/ml
Standard 7	100 µg/ml

Die Messungen werden in einer 96-Well Platte und in Triplikaten durchgeführt. Die Standards wurden mit destilliertem Wasser zubereitet und 1:100 verdünnt. Es wurden 80 µl der BSA-Lösung mit 20 µl eines Bradford-Färbemittels gemischt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit (bei RT) wurde die Extinktion bei 620 nm gemessen. In Tabelle 15 (siehe Anhang) sind die Werte der Messungen, der errechnete Mittelwert daraus, sowie der Nullwert dargestellt.

Um die Standardkurve zu erhalten, mussten zunächst alle Mittelwerte für den Extinktions-Nullwert und jede Konzentration der Standardreihe berechnet werden. Daraufhin wurde der gemittelte Nullwert von den gemittelten Werten der Standardreihe subtrahiert. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurde eine lineare Regression aus den ermittelten Werten berechnet. Nach Umstellung der entsprechenden Ausgleichsgeraden $y=mx+n$, ließen sich die Probenkonzentrationen von x bestimmen (Abbildung 9).

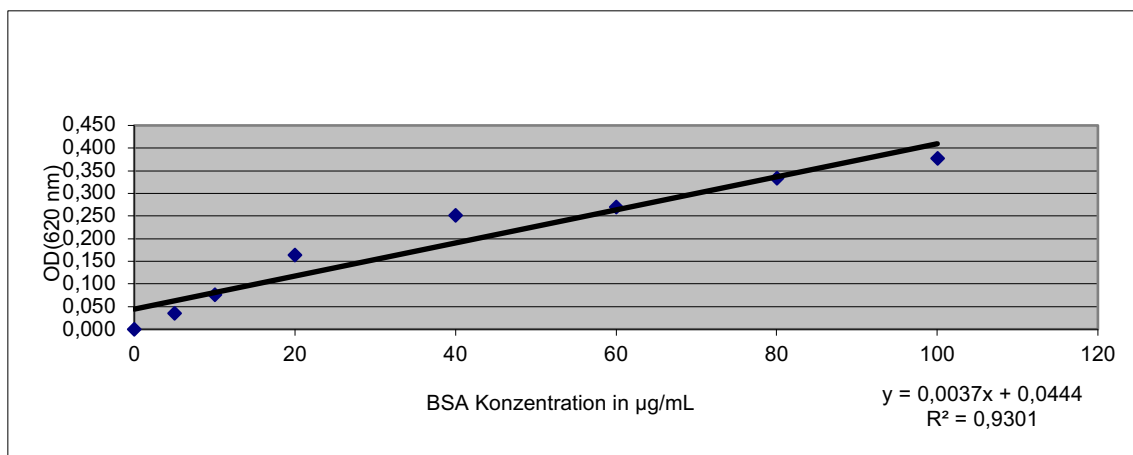


Abbildung 9: Standardkurve des Bradford-Test.

Die Y-Achse zeigt die gemessene optische Dichte (OD) bei 620 nm, in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten bovinen Serumalbumins (BSA), das auf der X-Achse zu sehen ist. Aus den acht Messwerten, die als Raute im Diagramm dargestellt sind, wurde die Ausgleichsgerade $y=0,0037x+0,0444$ berechnet. Das Gütemaß R^2 lag bei 0,9301. Umso näher der Wert von R^2 bei 1 liegt, desto besser ist die lineare Regression.

Die Konzentration der Proteinextrakte aus 2.2.3.1 wurden wie folgt erstellt und gemessen: Es wurden drei µl der proteinhaltigen Flüssigkeit mit 297 µl destilliertem Wasser in einem Mikroreaktionsgefäß gefüllt. Dieses Gemisch wurde mit Hilfe eines Vortex-Gerätes gemischt. Nun wurde eine 96-Well Platte mit jeweils 80 µl der proteinhaltigen Flüssigkeit in Duplikaten befüllt. Folgend

wurde unter lichtgeschützten Bedingungen gearbeitet. Es wurde in jedes Well-Feld 20 µl Bradford-Färbemittel hinzugefügt. Durch mehrmaliges Aspirieren mit einer 50 µl Pipette, wurden die Lösungen gemischt und direkt unter dem Absorbance Reader bei 620nm gemessen. Es wurden innerhalb von fünf Minuten drei Messungen durchgeführt, um Abweichungen oder spätere Reaktionen ausschließen zu können. Die proteinhaltige Flüssigkeit wurde im -20°C Tiefkühlfach zwischengelagert, bis die speziellen ELISA-Tests durchgeführt wurden. Der gesamte Prozess wurde für N1, N2 und N3 gleichermaßen durchgeführt.

2.2.3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Zuletzt wurden die ELISA's durchgeführt. ELISA ist die Abkürzung für „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“. Mithilfe von Antikörper-Antigenbindung kann ein gezieltes Antigen detektiert und nachgewiesen werden. Der hier verwendete Wirkmechanismus wird auch „Sandwich-Elisa“ genannt. Ein Antikörper befindet sich am Boden einer 96-Well Platte und bindet an das gesuchte Antigen. Als nächstes wird ein Sekundärantikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit wird ein Enzym hinzugefügt, welches das im nächsten Schritt hinzugefügte Substrat in ein Produkt umwandelt, welches wiederum fluoresziert und photometrisch gemessen werden kann. Je mehr Antigene gebunden werden, desto höher ist der photometrisch gemessene Wert.

In dieser Arbeit wurden vier ELISA's durchgeführt. Die Beladung der ELISA's erfolgte anhand der ermittelten Werte aus den Bradford Versuchen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Durchgeführte ELISA-Kits mit der hinzugefügten Proteinextrakten in µg.

Kollagen X (Kat. Nr. E-EL-H0783)	20 µg
PCNA (Kat. Nr. CSB-EL017621HU)	40 µg
PCNA (Kat. Nr. OKCD02760)	40/60/100 µg
VEGF (Kat. Nr. KHG0111)	40 µg

Im Folgenden wird exemplarisch der ELISA von Kollagen X beschrieben, der sich zu den restlich durchgeführten ELISA's nur im Hinblick auf die Inkubationszeiten und der Anzahl der Waschvorgänge unterscheidet. Alle Reagenzien wurden bei Raumtemperatur verwendet. Der erste Schritt war eine Standardkurve für Kollagen X zu erstellen, welche dafür benötigt wird die Ergebnisse aus den Proben einordnen zu können. Als nächstes wurden 100 µl von den Proben N1, N2 und N3 in Duplikaten in die Well Platte pipettiert und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde die Flüssigkeit entfernt, der Sekundärantikörper (100 µl) hinzugefügt und erneut für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Jedes Well wurde dreimal mit einem beigefügten Waschpuffer gewaschen. Als nächstes wurde das HRP Konjugat (100 µl) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Waschvorgang fünfmal wiederholt. Nach Hinzufügen von 90 µl des TMB-Substrats, wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und unter lichtgeschützten Bedingungen gearbeitet. Als letztes wurde 50 µl der Stop-Lösung in jedes Well pipettiert und innerhalb der nächsten fünf Minuten photometrisch gemessen.

2.2.4 Positivkontrolle für die Proliferations- und Apoptoseantikörper

Die nächsten Schritte wurden unter einer Sterilbank mit einem Abzugssystem durchgeführt. Um genügend Zellen für die Versuche zu generieren, wurden eingefrorene Chondrosarkomzellen aufgetaut und zur Vermehrung in Zellkulturflaschen (200ml) angezchtet. Zu den Zellen wurde DMEM, das 1:1 mit F-12 Nutrient Mixture vermischt wurde, hinzugefügt. Das Medium enthielt zusätzlich GlutaMAX, welches ein Dipeptid, bestehend aus L-Alanin und L-Glutamin, darstellt. Diese zusätzlichen Aminosäuren sollen den Chondrosarkomzellen bei der Vermehrung ausreichend Energie zur Verfügung stellen. Es wurden 30 ml des Mediums entnommen und folgende Substanzen hinzugefügt: Ca. 42% fetales Kälberserum (25 ml), welches den anabolen Prozess unterstützt, als auch 8,3% Penicillin-Streptomycin-Gemisch (5 ml), welches ein fremderregerarmes Umfeld gewährleisten soll. Nach der Mischung

des Mediums (15 ml) mit den Zellen in der Zellkulturflasche, wurde der Ansatz in den Inkubator (37°C) gelegt.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop (mit einem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung) begutachtet. Mit der Neubauer-Zählkammer wurde überprüft, wie viele Zellen sich in der Zellkulturflasche zum jeweiligen Zeitpunkt befanden. Falls die Zellzahl zu gering war, wurden 7 ml des Mediums mit 7 ml „frischem“ Medium ersetzt und erneut für 24 Stunden inkubiert. Die Zellzahl sollte dabei zwischen $1,5 \times 10^4$ und 5×10^4 Zellen pro Well in einem 8-Well Chamber betragen. Nach dem Befüllen der Chamber (Füllvolumen 250 µl) mit Chondrosarkomzellen, wurden die 8-Well Chamber nochmals 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden zwei verschiedene Versuchsabläufe durchgeführt, die in den folgenden zwei Unterpunkten genauer erläutert werden.

2.2.4.1 Apoptoseantikörper

Nach den 24 Stunden wurden die 8-Well-Chamber beschriftet und für Caspase 3 und Annexin V wurden je ein positives und ein negatives Well vorbereitet.

Zuerst wurde das Medium aus allen Kammern entfernt und dreimal mit PBS gewaschen. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Waschen bezeichnet. Die Positivfelder wurden zunächst mit 1 µM (Mikromolar) Staurosporin, welches 1:1000 in PBS verdünnt wurde, befüllt. Staurosporin hemmt unspezifisch die Kinasen und induziert somit die Apoptose. Die Negativfelder wurden lediglich mit PBS befüllt. Das 8-Well Chamber wurde für vier bis sechs Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden alle Felder mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden 100% Methanol in jedes Feld gefüllt, um die Zellen zu fixieren. Das 8-Well Chamber wurde anschließend zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zehn Minuten wurde das Methanol entfernt und jedes Feld drei Mal gewaschen. Die Chondrosarkomzellen wurden daraufhin mit 400 µl 0,05%iger Triton X100 Lösung (in PBS) geblockt. Der befüllte 8-Well Chamber wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um ein Fehlbinden der Antikörper zu verhindern, wurde ein zweiter Blockprozess durchgeführt. Nach erneutem

dreimaligem Waschen wurden die Felder mit 500 µl 1% (w/v) BSA Lösung (in PBS) befüllt und für 30 Minuten inkubiert.

Nach erneutem Waschen wurden die ersten Antikörper hinzugefügt, welche in einem Verhältnis von 1:200 mit 2% (w/v) BSA in PBS Lösung verdünnt wurden. Es wurden hierfür die gleichen Antikörper für Caspase 3 und Annexin V verwendet, wie bei den immunhistologischen Färbungen. Anschließend wurde das 8-Well Chamber über Nacht in einen Kühlschrank (bei ca. 7°C) gelegt.

Am nächsten Tag wurden die Kammern drei Mal gewaschen. Der passende zweite Antikörper (siehe immunhistologische Färbung) wurde im Verhältnis 1:200 hinzugefügt. Außerdem wurde dem PBS Dapi (1:1000) hinzugefügt, um die Zellkerne im Mikroskop darzustellen. Die Lösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss gewaschen.

Als nächstes wurden die Kammern entfernt und der Objektträger mit Fluorescent Mounting Media bedeckt. Vorsichtig wurde ein Deckglas daraufgelegt und die Ränder mit Nagellack versiegelt. Nun konnten die Färbungen unter dem Mikroskop begutachtet werden oder im Kühlschrank (bei 4°C), für ein paar Tage zwischengelagert werden.

2.2.4.2 Proliferationsantikörper

Für Ki-67 wurde zum Großteil gleichermaßen wie bei 2.2.4.1 verfahren, wobei im Folgenden auf die einzelnen Unterschiede genauer eingegangen werden soll. Da die Proliferation untersucht werden sollte, erfolgte hier die Positivkontrolle mittels Chondrosarkomzellen, die nicht mit Staurosporin versetzt wurden. Die Chondrosarkomzellen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsaktivität und ein hohes Potential zu metastasieren aus. Es wurde keine Apoptose induziert, da lediglich die Chondrosarkomproliferation nachgewiesen werden sollte. Weiterhin ist zu erwähnen, dass der Primäantikörper nur der Positivkontrolle hinzugefügt wurde. Hiermit sollte erreicht werden, dass die Proliferation der Chondrosarkomzellen im Vergleich zu den Negativfeldern deutlich zu erkennen ist. Hierfür wurde der entsprechende Primär- und Sekundäantikörper für Ki-67

verwendet. Alle anderen Schritte wurden, wie in 2.2.4.1 bereits beschrieben, durchgeführt.

2.2.5 Western Blot

Mithilfe des Western Blot's kann die Menge spezifischer Proteine über Antikörper detektiert werden. Hierfür mussten die Proteine zuerst aus dem Knorpel isoliert und die Menge an Proteinen mittels Bradford Assay gemessen werden. Hierzu wurde dasselbe Verfahren angewendet, wie es in 2.2.3 bereits beschrieben wurde. Wiederholt wurden Proben für Single Strings, Double Strings, Small Cluster und Big Cluster erstellt.

Als nächstes wurden, mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page), die isolierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgeteilt. Das SDS sorgt dafür, dass die Proteine stark negativ geladen werden, sodass sie bei der Elektrophorese zur Anode wandern. Die Größe der Proteine entscheidet darüber, wie weit ein Protein auf dem Gel wandert. Je größer ein Protein, desto langsamer und kürzer wandert es. Umgekehrt wandern kleine Proteine schneller und weiter.

Folgend werden die Bestandteile der Polyacrylamid Gele dargestellt. Es wurde ein Trenngel und ein darüber geschichtetes Sammelgel benötigt. Letzteres besitzt Taschen zur Beladung. In Tabelle 14 sind die Bestandteile für zwei Polyacrylamid-Gele aufgelistet.

Tabelle 14: Zusammensetzung für zwei Acrylamidgele

Komponenten	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
ddH ₂ O	7,9 ml	5,5 ml
30% Acrylamid	6,7 ml	1,3 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 (Trenngelpuffer)	5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	-	1 ml
20% SDS	100 µl	40 µl
10% APS	200 µl	80 µl
Temed	8 µl	8 µl

Sobald die Gele auspolymerisiert waren, wurden sie in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Laufpuffer wurde in die Kammern gefüllt, Käbme gezogen und die Taschen mit Laufpuffer gespült.

Basierend auf den Ergebnissen aus der Bradfordmessung, wurden die Taschen mit jeweils 30 µg Proteinen befüllt. Dem errechneten Probevolumen wurde die gleiche Menge Probepuffer hinzugefügt. Anschließend wurde für fünf Minuten bei 95°C auf dem Thermomixer inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Danach wurde das gesamte Volumen in die entsprechende Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurden jeweils 7 µl Marker pro Gel hinzugefügt. Als nächstes wurde die Elektrophorese-Kammer geschlossen und bei konstanter Stromstärke (17 mA pro Gel), sowie maximaler Spannung so lange laufen gelassen, bis die blaue Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Die Elektrophorese wurde gestoppt und die Gele mittels Sandwich-Blot geblottet.

Er besteht aus zwei Schwämmchen, zwei Whatmanpapieren, einer Membran und dem SDS-Page-Gel (Abbildung 10).

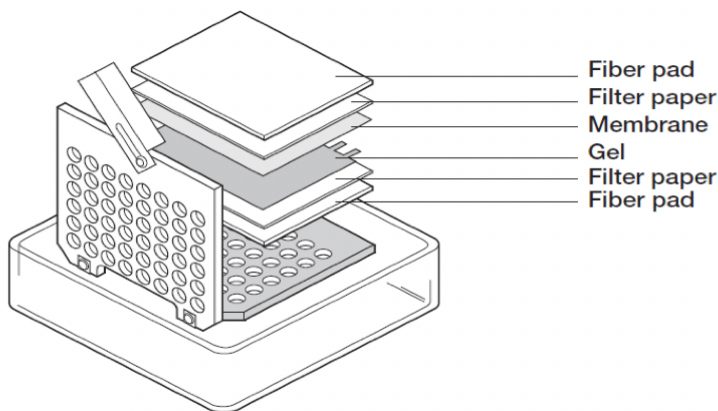


Abbildung 10: Aufbau eines Sandwich Blots.

Quelle: *Instruction Manual of Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer cell, Bio Rad.*

Vor dem Zusammensetzen des Sandwich-Blots wurden das Whatmanpapier und die Schwämmchen in Blotpuffer eingeweicht. Die Membran wurde für zehn Sekunden in 100% Methanol eingeweicht und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Erst dann wurde der Blot zusammengesetzt und in die mit Blotting-Puffer gefüllte Kammer gestellt. Über Nacht wurde bei konstanten 20 V geblottet.

Als nächstes wurde die Membran aus dem Sandwich-Blot genommen und mit 20 µl schwarzer Tinte in 20 ml TBS-T für 15 Minuten auf einer Schüttelplatte inkubiert. Um ein unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern, wurde anschließend für 30 Minuten mit 5% (w/v) Milchpuffer in 20 ml TBS-T erneut auf der Schüttelplatte gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern, welche im Verhältnis 1:1000 in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T verdünnt wurden, über Nacht bei 4°C auf dem Rollschüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal mit TBS-T für 15 Minuten auf der Schüttelplatte bei Raumtemperatur gewaschen. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern, welche im Verhältnis 1:1000 in 10% (w/v) Milchpulver mit TBS verdünnt wurden, für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem Waschen konnte nun mit der Entwicklung fortgefahren werden.

Hierfür wurde die ECL-Lösung 1:1 gemischt und auf die Membran pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation wurde die Membran in Folie verpackt und alle Luftblasen entfernt. Schlussendlich wurden in der Dunkelkammer die Filme mit einer Minute Kontaktzeit zu der Membran in der Entwicklermaschine entwickelt und anschließend mit Image J visuell dargestellt.

Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle benötigt, um zu zeigen, wie sich das gesuchte Protein im Western Blot darstellt. Als Positivkontrolle wurden Fibrosarkomzellen (HT-1080) verwendet, die in 200 ml Zellkulturflaschen angezüchtet wurden. Die beigefügten 15 ml Medium bestanden aus DMEM und GlutaMAX (1:1) mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch. Sobald die Fibrosarkomzellen eine Dichtigkeit von ungefähr 80-90% unter dem Mikroskop erreicht hatten, konnten sie für die Versuche verwendet werden. Im ersten Waschvorgang wurde das Medium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Nach Absaugen des PBS wurden 2 ml Trypsin EDTA hinzugefügt, um die Zellen von der Zellkulturflasche zu lösen. Dieser Vorgang wurde durch eine Inkubation bei 37 °C für maximal zwei Minuten beschleunigt. Anschließend wurden erneut 8 ml des am Anfang zur Kultivierung beigefügten Mediums hinzugefügt und mit einer 100 µl Pipette resuspendiert und vermischt. Die Zellsuspension wurde in eine 15 ml Blue Cap umgefüllt und im nächsten Schritt

bei 1500 g für sieben Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, konnten dem Zellpellet 200 µl des Lysepuffers aus Tabelle 11 hinzugefügt werden. Als letzter Schritt wurde die gleiche Proteinextraktion wie in 2.2.3.1 durchgeführt und als Positivkontrolle verwendet.

2.2.6 Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Die Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung dient dazu, lebende und tote Chondrozyten mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen. Hierfür wurden Propidiumiodid und Calcein-Acetoxy-methylester verwendet. Propidiumiodid ermöglicht die Detektion von toten Chondrozyten, indem es nur perforierte Membranen durchdringen kann, wie sie bei den toten Chondrozyten vorzufinden sind. Dabei wirkt Propidiumiodid als Nukleinsäureinterkalator. Calcein-Acetoxy-methylester hingegen färbt lebende Zellen an, da es in der Lage dazu ist intakte Membranen zu durchdringen und anschließend mit der intrazellulär gelegenen Esterase zu reagieren. Dadurch entsteht Calcein, welches unter Fluoreszenzlicht leuchtet.

Zunächst wurde eine Lösung mit DMEM vorbereitet. Propidiumiodid (2 µM) und Calcein-Acetoxy-methylester (4 µM) wurden jeweils im Verhältnis 1:1000 unter lichtgeschützten Bedingungen zu DMEM hinzugefügt. Daraufhin wurden 4 mm breite und 300 µm hohe Discs aus Knorpel hergestellt, wie aus Abbildung 7 zu entnehmen ist. Die Discs wurden einzeln in eine 96-Well Platte gelegt, welche jeweils mit 130 µl der vorbereiteten Lösung befüllt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden die einzelnen Discs unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es folgte die Anfertigung von Mosaikbildern, aus denen $25 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ große Bereiche entnommen wurden. In jedem definierten Bereich sollte eine Arthrosetufe überwiegend vorkommen. Für jede Arthrosetufe wurde hierbei fünfmal die Anzahl der lebenden und toten Chondrozyten ermittelt und anschließend mit Hilfe von SPSS ausgewertet.

2.2.7 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse, sowie der daraus resultierenden Abbildungen, wurde das Programm SPSS verwendet. Die deskriptive Darstellung der Daten erfolgte anhand des Medians (Minimum-Maximum) sowie von Säulendiagrammen und Boxplots. Zuletzt wurden die Muster in der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung mittels Interferenzanalyse betrachtet. Dabei wurde eine nicht-parametrische Auswertung gewählt mittels Kruskal-Wallis Test und als post-hoc Analyse mittels Mann-Whitney U Test. Die durchgeführten Tests waren dabei zweiseitig mit einem alpha von 0,05.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

Um einen Überblick über die verwendeten Gewebeproben der Patienten zu bekommen, wurden sie folgend in Hinblick auf Geschlecht, Operationsalter und Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen N1 – N3 dargestellt.

Insgesamt wurden 101 Gewebeproben von Patienten gesammelt und für die immunhistologischen Bilder, sowie für die durchgeführten ELISA- und Western-Blot-Versuche verwendet.

Im Folgenden sind die Patientengruppen nach Geschlecht (siehe Abbildung 11) und Alter (siehe Abbildung 12) dargestellt. In Bezug auf das Geschlecht ist zu erkennen, dass die Frauen im höheren Alter öfters eine KTP erhielten als männliche Patienten.

Ergebnisse

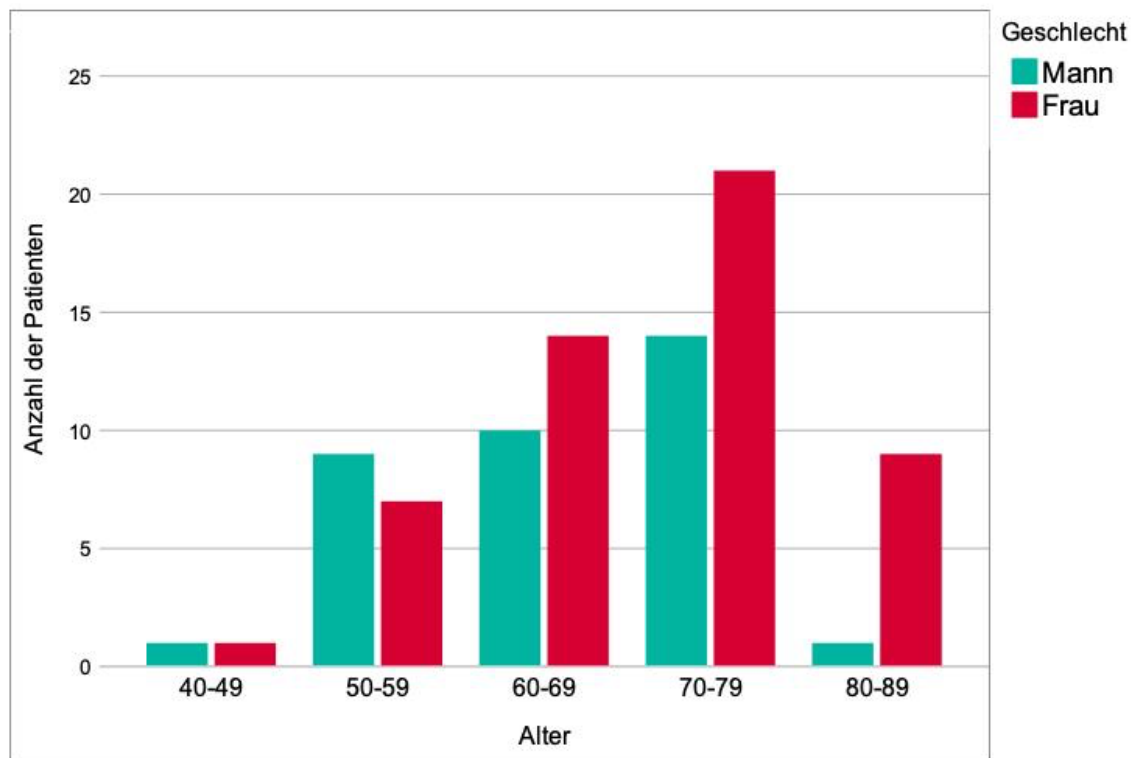


Abbildung 11: Patientenverteilung von Frauen und Männern in Bezug auf das Operationsalter bei einer KTP.

Die ausgewerteten Patientendaten entsprachen dem Kontingenz, dass für die ELISA und Western Blot Versuche verwendet wurde ($n=87$).

Das Alter in den Versuchsgruppen N1 – N3, lag im Median bei 70 Jahren.

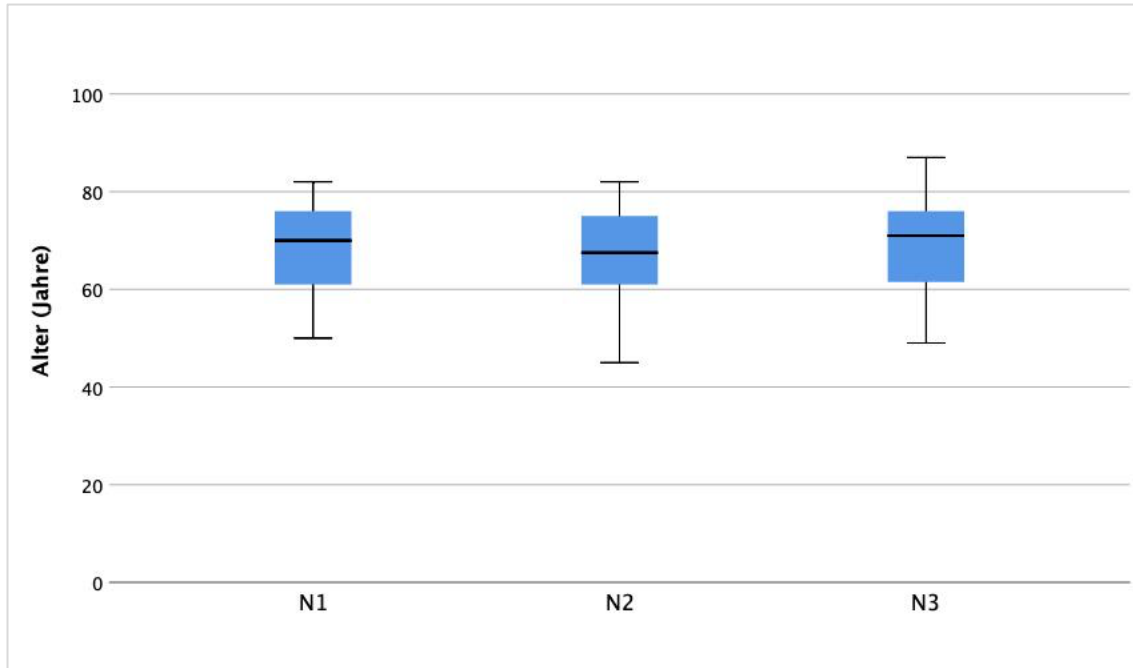


Abbildung 12: Die Patientengruppen verglichen in Bezug auf das Alter zum Zeitpunkt der KTP-Operation in einem Boxplot dargestellt.

Die ausgewerteten Patientendaten entsprachen dem Kontingenz, dass für die ELISA und Western Blot Versuche verwendet wurde ($n=87$). Minimum=45; Maximum=87.

3.2 Immunhistologische Färbung und Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die folgenden Abbildungen stellen Proben der Patienten dar, welche dem Stichprobenkontingenz N1 – N3 der Proben der ELISA's entsprechen.

Die Zielsetzung für die immunhistologischen Bilder war es, eine qualitative Darstellung der Proteine in den vier Arthrostufen darzustellen.

Bei sichtbaren Unterschieden der Proteinfärbung zwischen den Arthrostufen, wurde zusätzlich ein ELISA oder ein Western Blot durchgeführt, um die Ergebnisse zu quantifizieren. Die Ergebnisse wurden in Säulendiagrammen dargestellt und anschließend bewertet.

3.2.1 Kollagen X

Kollagen X ist ein Strukturprotein und wird zunehmend als wichtiger Faktor bei der enchondralen Ossifikation diskutiert [57]. Der derzeitige Forschungsstand rückte Kollagen X zunehmend als Arthrosemarker in der Vordergrund, da man bei Arthroseentstehung eine stark zunehmende Kollagen X Ausschüttung durch die Chondrozyten beobachten konnte, obwohl dieses physiologisch im Knorpel nur gering vorhanden ist [58]. In der folgenden Abbildung 13 konnten wir diese Erkenntnis ebenfalls beobachten.

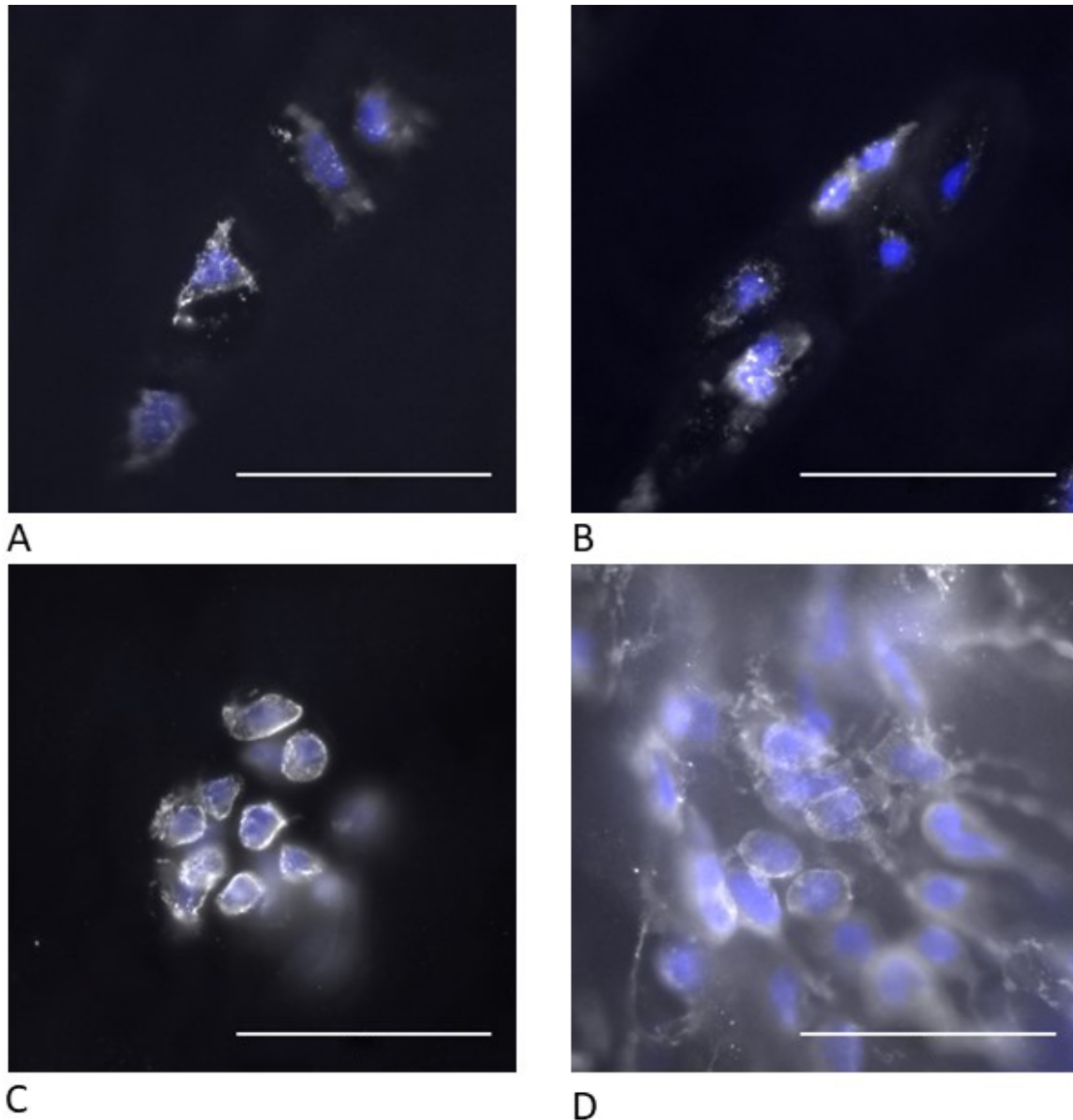


Abbildung 13: Immunhistologische Bilder von Kollagen X.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt Kollagen X dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

Die Abbildung zeigt, dass Kollagen X um die Single Strings und Double Strings eine geordnete, scharf begrenzte Struktur im Intrazellularraum behält. Bei den Small Clustern lässt sich erkennen, dass Kollagen X beginnt seine scharfe Begrenzung aufzulösen und sich zudem im perizellulären Raum zu verteilen. Eine orientierungslose, räumliche Verteilung ist bei den Big Clustern zu sehen. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich Kollagen X im Verlauf der

Ergebnisse

Arthrose vermehrt und seine Ordnung im intrazellulären Raum verliert. Bei den Big Clustern ist außerdem die Verbindung von Kollagen X zwischen den Chondrozyten auffallend, welche in den restlichen untersuchten Arthrotestufen nicht zu beobachten ist.

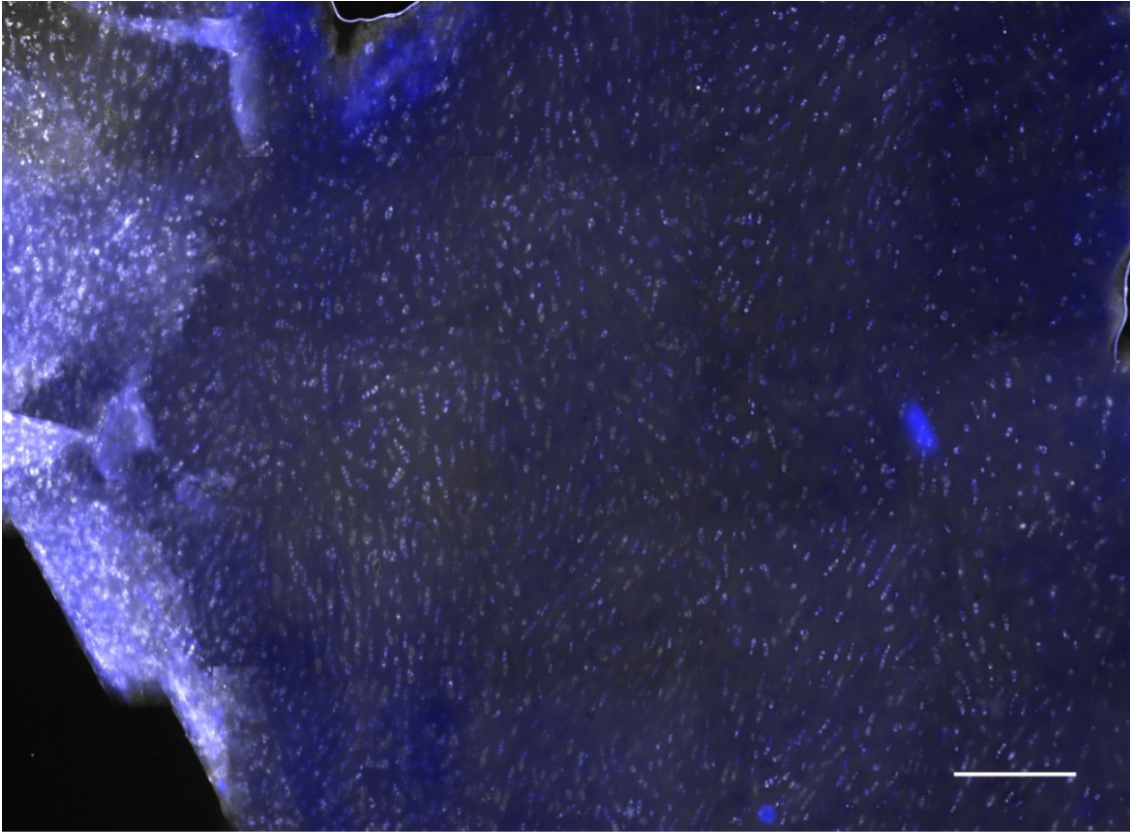


Abbildung 14: Mosaikaufnahme von Kollagen X.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. Kollagen X ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 µm.

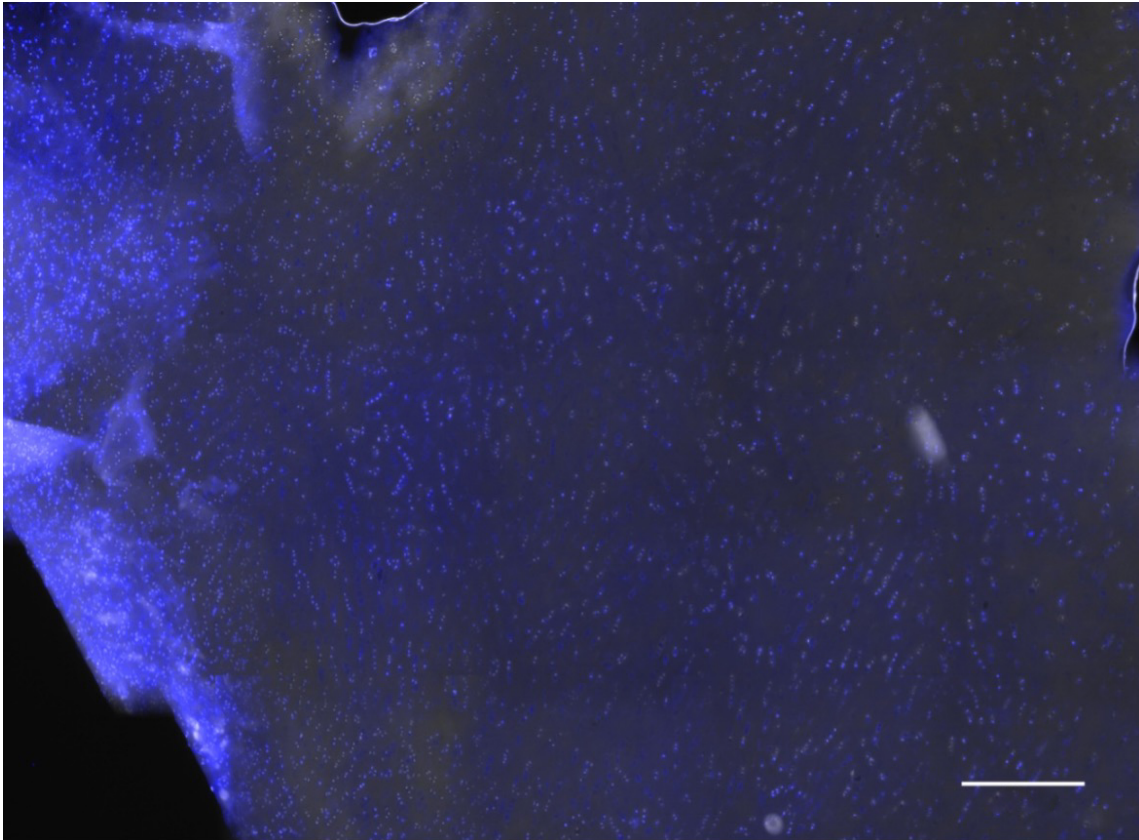


Abbildung 15: Mosaikaufnahme von Kollagen X.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. Kollagen X ist blau dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

Die Mosaikaufnahme bekräftigt die Ergebnisse aus Abbildung 13. Single Strings und Double Strings besitzen eine noch geordnete, räumliche Anordnung von Kollagen X. Bereits bei den Small Clustern beginnt sich die räumliche Orientierung aufzulösen, welche bei Big Clustern in einer unkontrollierten Vermehrung von Kollagen X resultiert. Letzteres konnte in den Mosaikaufnahmen (Abbildung 14 und Abbildung 15) am linken Bildrand erkannt werden, da hier durch eine gesteigerte Intensität der Färbung von Clustern ausgegangen werden kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein ELISA für Kollagen X durchgeführt.

Ergebnisse

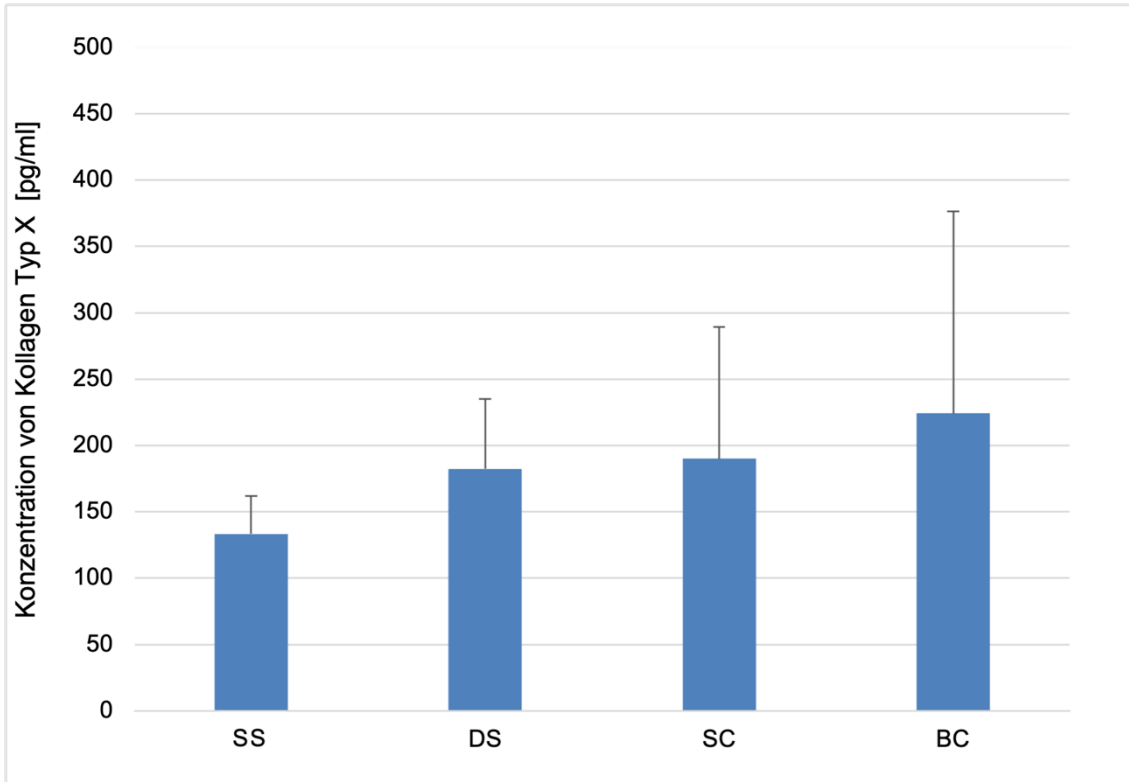


Abbildung 16: Quantitativer Gehalt von Kollagen X (pg/ml) in den verschiedenen Arthrosestufen.

Der ELISA wurde für N1 – N3 durchgeführt. Abgebildet sind Säulendiagramme, die die Messergebnisse gemittelt darstellen. Die Fehlerbalken stellen die Streuung der Ergebnisse dar. SS=Single Strings; DS=Double Strings; SC=Small Cluster; BC=Big Cluster.

Dabei konnte im Verlauf der Entwicklung von Single Strings zu Big Clustern einen kontinuierlichen Anstieg des Proteingehalts im Knorpel beobachtet werden. Dies bestätigte erneut die Vermutung, dass der Gehalt an Kollagen X im hyalinen Knorpel bei Arthrose steigt.

3.2.2 Annexin V

Annexin V gehört zu den Apoptosefaktoren und besitzt die Funktion sich an Phosphatidylserin anzulagern. Die Expression von Annexin V an der Außenmembran ist ein Hinweis für das Immunsystem, dass bei einer eingeleiteten Apoptose die Zelle verdaut, beziehungsweise abgetötet werden kann [45]. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Antikörperfärbung für Annexin V in den verschiedenen Arthrosetufen.

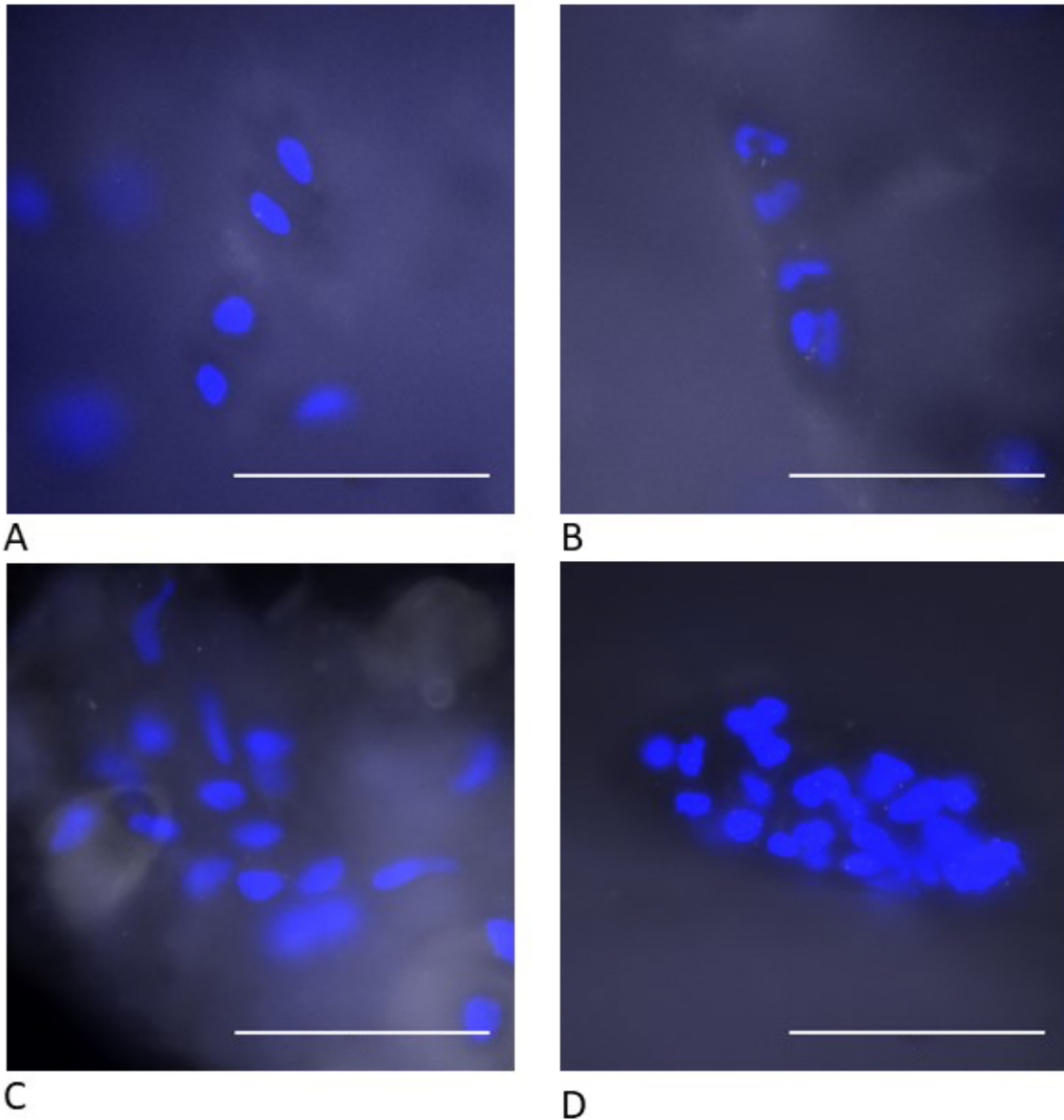


Abbildung 17: Immunhistologische Bilder von Annexin V.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt Annexin V dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

Die immunhistochemische Auswertung von Annexin V (Abbildung 17) zeigte bei den Small Clustern (Abbildung 17 C) und Big Clustern (Abbildung 17 D) keine Antikörperfärbung. Es kann lediglich in den Single Strings (Abbildung 17 A) und Double Strings (Abbildung 17 B) ein geringes Signal perizellulär erahnt werden, was in dieser Signalstärke jedoch eher als Hintergrundleuchten bei Autofluoreszenz der Kollagen VI Fasern der PCM zu verstehen ist.

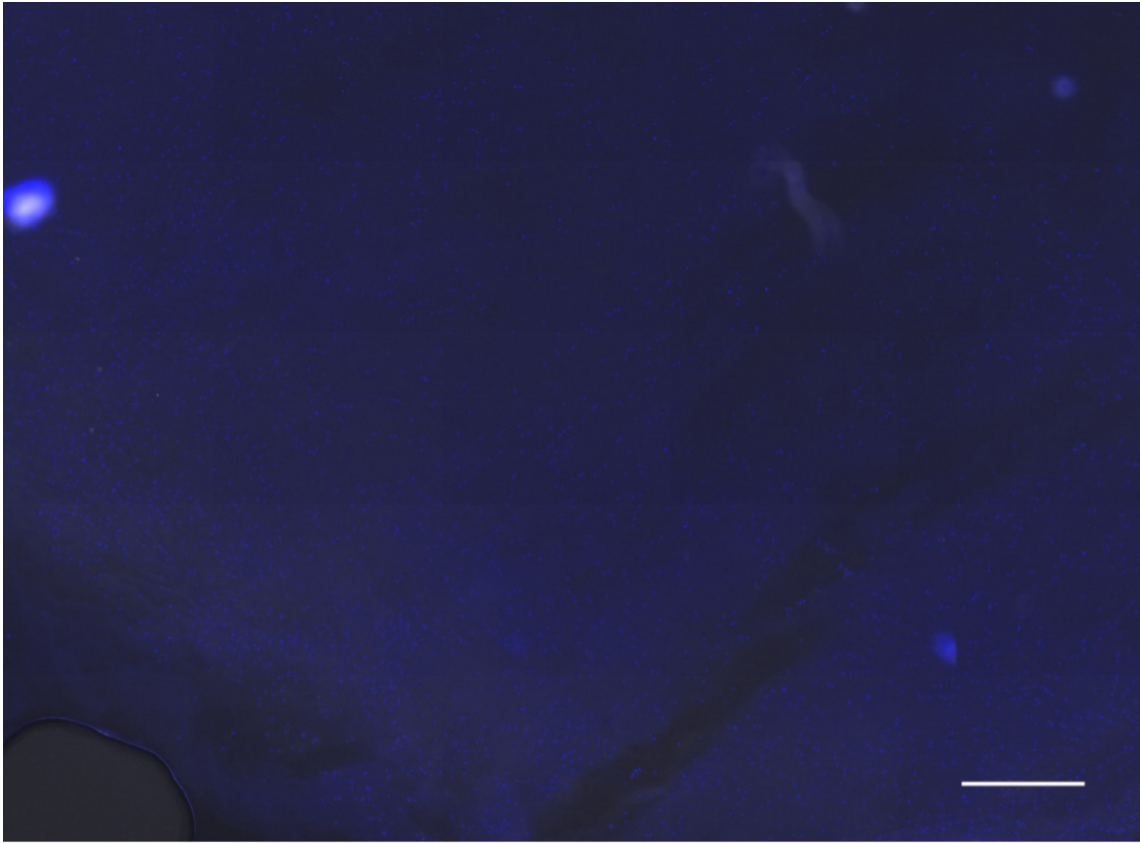


Abbildung 18: Mosaikaufnahme von Annexin V.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. Annexin V ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 μm .



Abbildung 19: Mosaikaufnahme von Annexin V.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. Annexin V ist blau dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

Die Ergebnisse der Mosaikbilder zeigen ebenfalls keine auffällige Färbung für Annexin V. Um die Bindungsqualität des Antikörpers von Annexin V zu überprüfen, wurde noch eine Positivkontrolle für Apoptose durchgeführt (Abbildung 20). Es wurde verfahren wie in 2.2.4.1 beschrieben.

Ergebnisse

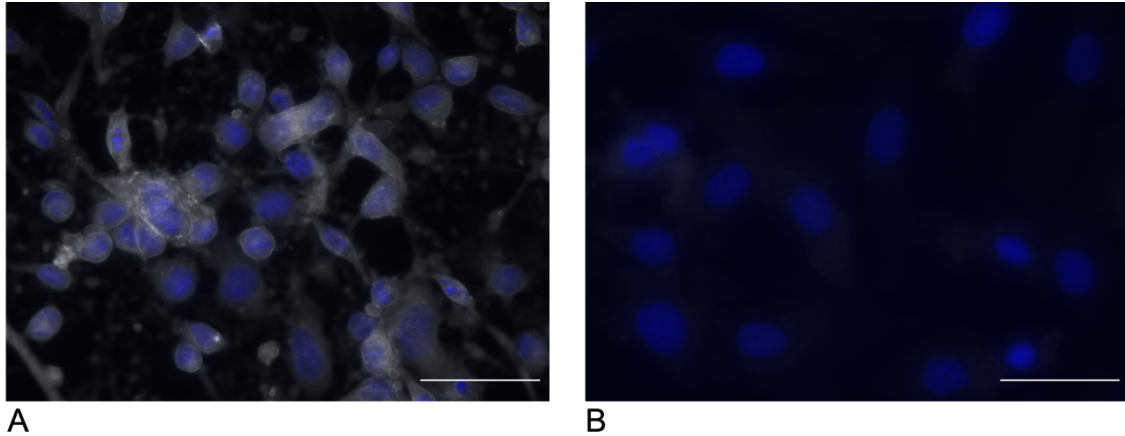


Abbildung 20: Positivkontrolle für den Annexin V-Antikörper.

Zellkerne wurden mit Dapi blau angefärbt. Der Annexinantikörper wurde weiß dargestellt. (A) Chondrosarkomzellen, bei denen mithilfe von Staurosporin eine Apoptose induziert wurde. (B) Chondrosarkomzellen ohne induzierte Apoptose. Maßstab: 50 μ m.

Dabei zeigt sich in der Positivkontrolle ein deutliches Signal des Annexinantikörpers, welches sich vor allem intrazellulär befindet. In der Negativkontrolle (Abbildung 20 B) hingegen ist kein Signal des Annexinantikörpers festzustellen.

3.2.3 Caspase 3

Caspase 3 gilt ebenfalls als Marker für die Apoptose. Als Apoptose-Antikörper kann Caspase 3 sowohl durch intrinsisch wie auch durch extrinsische Signalkaskaden aktiviert werden. Da die Annexin V Färbung zunächst nur Hinweise für eine vermehrte Apoptose bei der Arthrose lieferte, sollten anhand der Caspase 3 Expression mit dem folgenden Ergebnis weitere Erkenntnisse über das Apoptoseverhalten der Chondrozyten bei der Arthrose gewonnen werden.

Ergebnisse

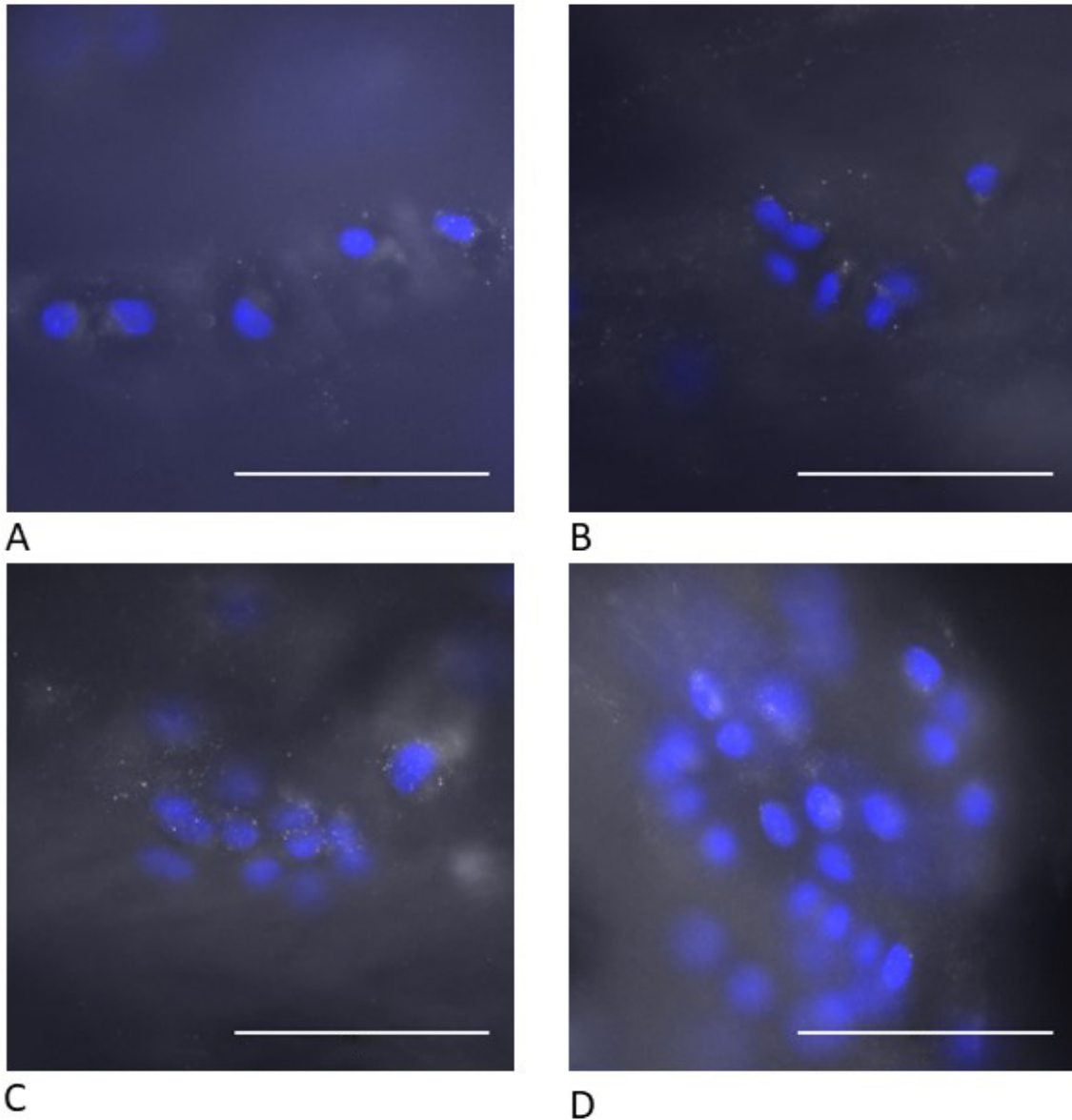


Abbildung 21: Immunhistologische Bilder von Caspase 3.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt Caspase 3 dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

Dabei war tatsächlich eine deutlich stärkere Signalintensität vorzufinden als bei Annexin V (Abbildung 21). Es hat hierbei den Anschein, dass die Färbung sich größtenteils im Intrazellulärraum befindet. Jedoch kann keine Zunahme oder Abnahme des Signals für Caspase 3 bei den verschiedenen Chondrozytenmustern erkannt werden.

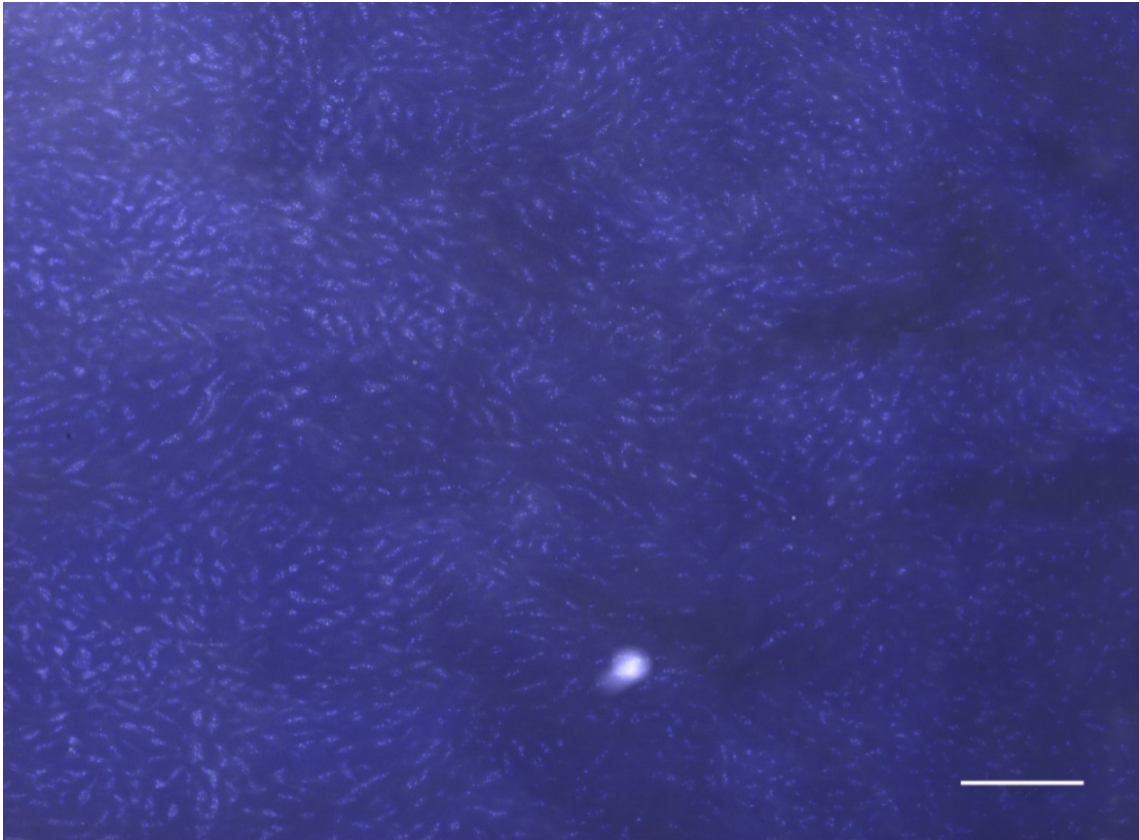


Abbildung 22: Mosaikaufnahme von Caspase 3.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. Caspase 3 ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

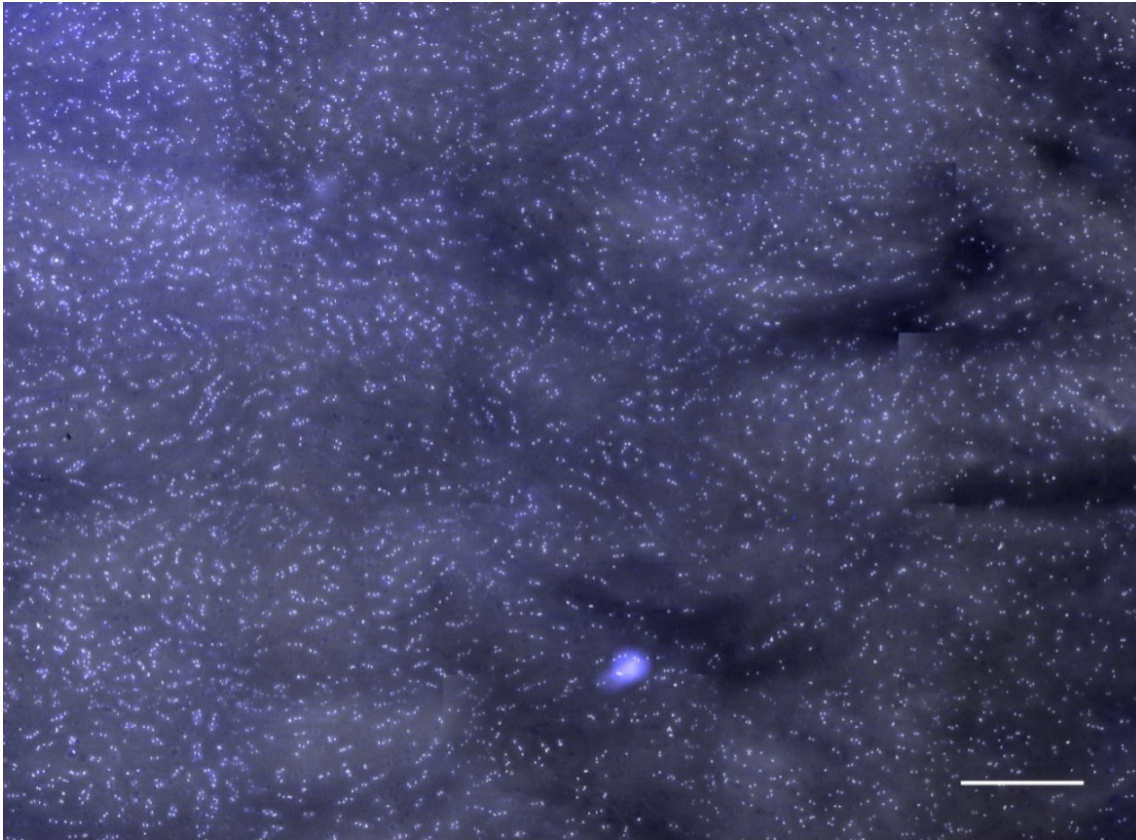


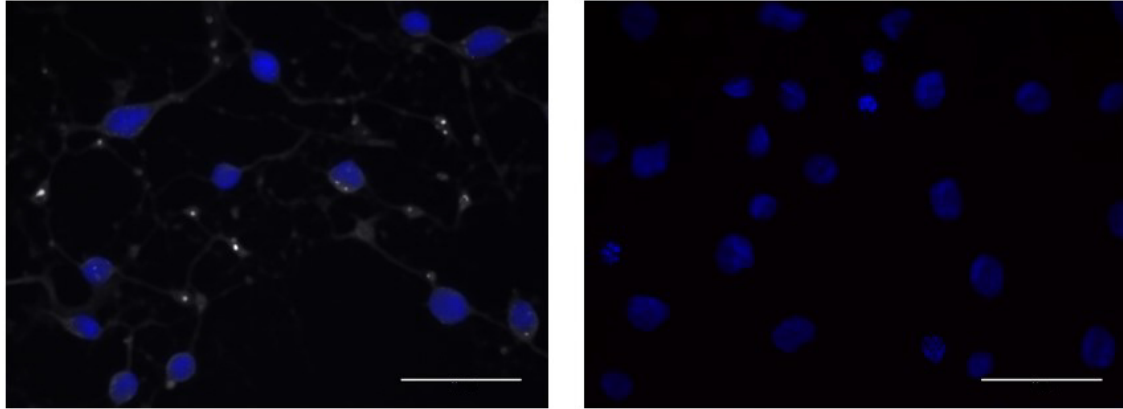
Abbildung 23: Mosaikaufnahme von Caspase 3.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. Caspase 3 ist blau dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

Die Vermutung, dass Caspase 3 auch unabhängig von der Arthrosetufe eine Grundpräsenz besitzt, lässt sich auch in den Mosaikbildern beobachten. Hierbei ist in jeder Stufe der Arthrose eine Präsenz von Caspase 3 erkennbar, wobei zwischen den unterschiedlichen Stufen kein deutlicher Unterschied erfasst werden kann.

Als Positivkontrolle für den Antikörper diente ein Versuch mit Chondrosarkomzellen. Die genaue Durchführung der Versuche lässt sich aus dem Kapitel 2.2.4.1 entnehmen.

Ergebnisse



A

B

Abbildung 24: Positivkontrolle für den Caspase 3-Antikörper.

Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die Caspaseantikörper wurden weiß dargestellt. (A) Chondrosarkomzellen, bei denen mithilfe von Staurosporin eine Apoptose induziert wurde. (B) Chondrosarkomzellen ohne induzierte Apoptose. Maßstab: 50 μ m.

Durch die induzierte Apoptose (Abbildung 24 A) lässt sich ein Signal von Caspase 3 nachweisen, welches sich erneut überwiegend intrazellulär befindet. Wenn keine Apoptose induziert wurde, findet sich kein Signal von Caspase 3 (Abbildung 24 B).

3.2.4 Ki-67

Ki-67 gilt als etablierter Marker für das Maß der Proliferation, weil es lediglich bei sich in Mitose befindlichen Zellen nachgewiesen werden konnte. In Zellen in der G 0-Phase konnte Ki-67 dagegen bisher nicht nachgewiesen werden [52]. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse des intrazellulär gelegenen Antikörpers Ki-67.

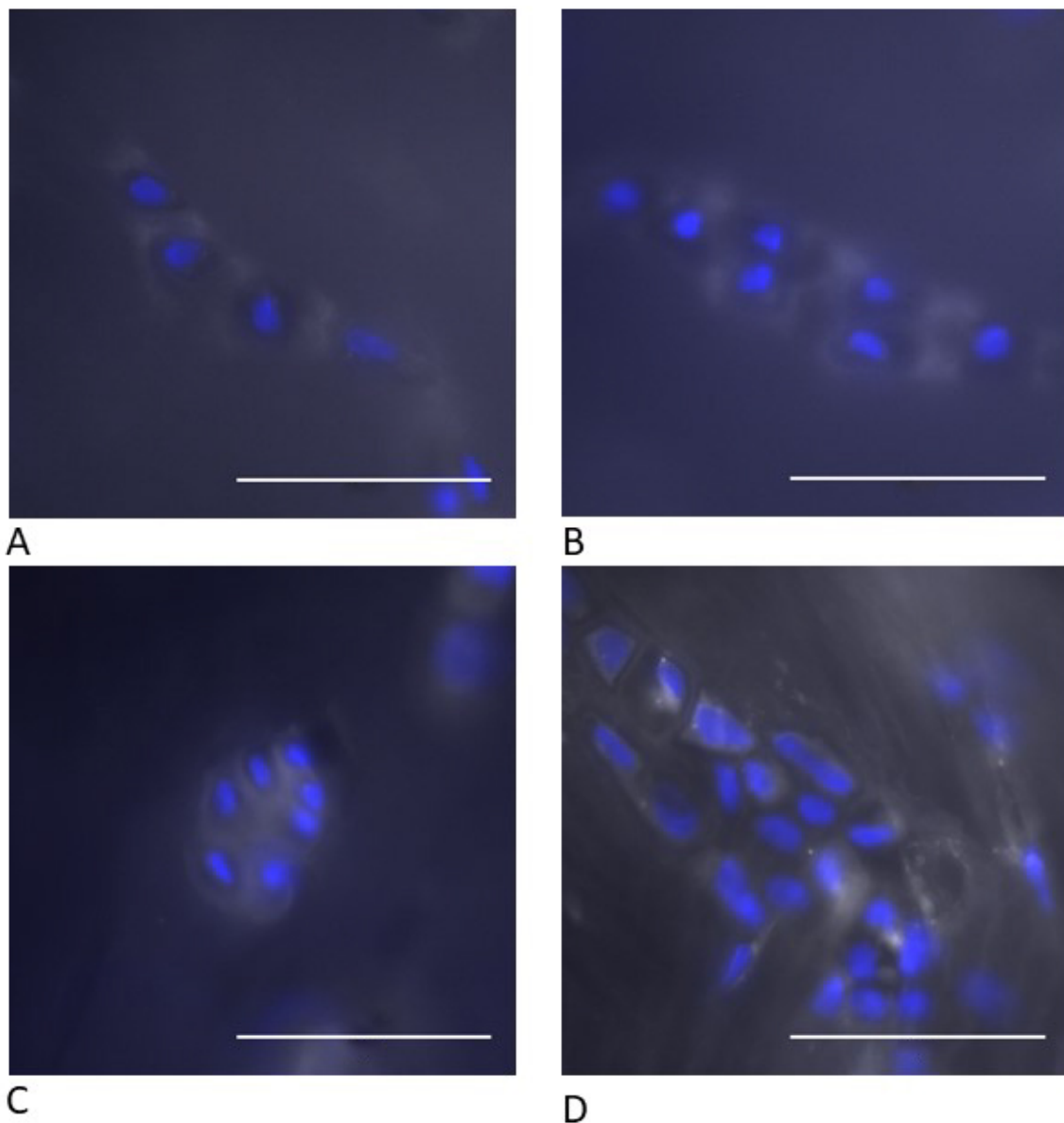


Abbildung 25: Immunhistologische Bilder von Ki-67.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt Ki-67 dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

Ergebnisse

In der immunhistologischen Abbildung kann lediglich in den Big Clustern eine Grundpräsenz von Ki-67 vermutet werden (Abbildung 25 D). In den anderen Stufen ist hingegen keine intrazelluläre Färbung erkennbar (Abbildung 25-27).

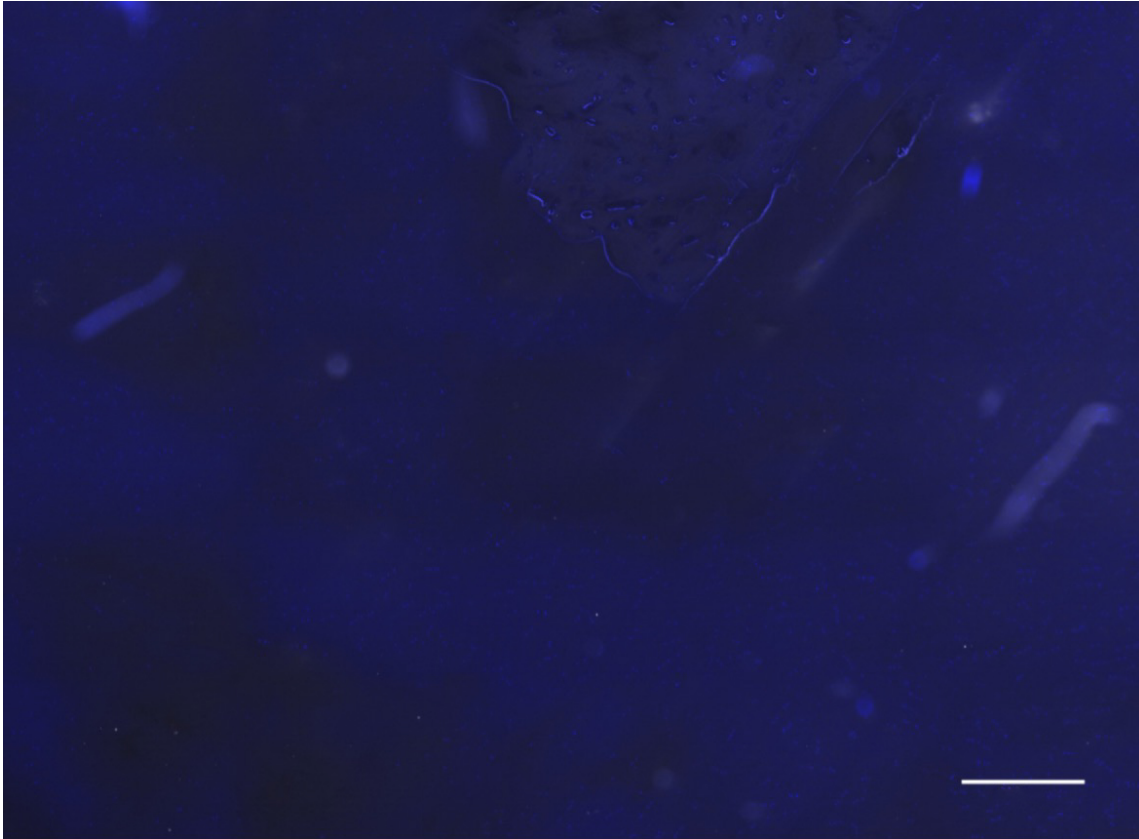


Abbildung 26: Mosaikaufnahme von Ki-67.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. Ki-67 ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

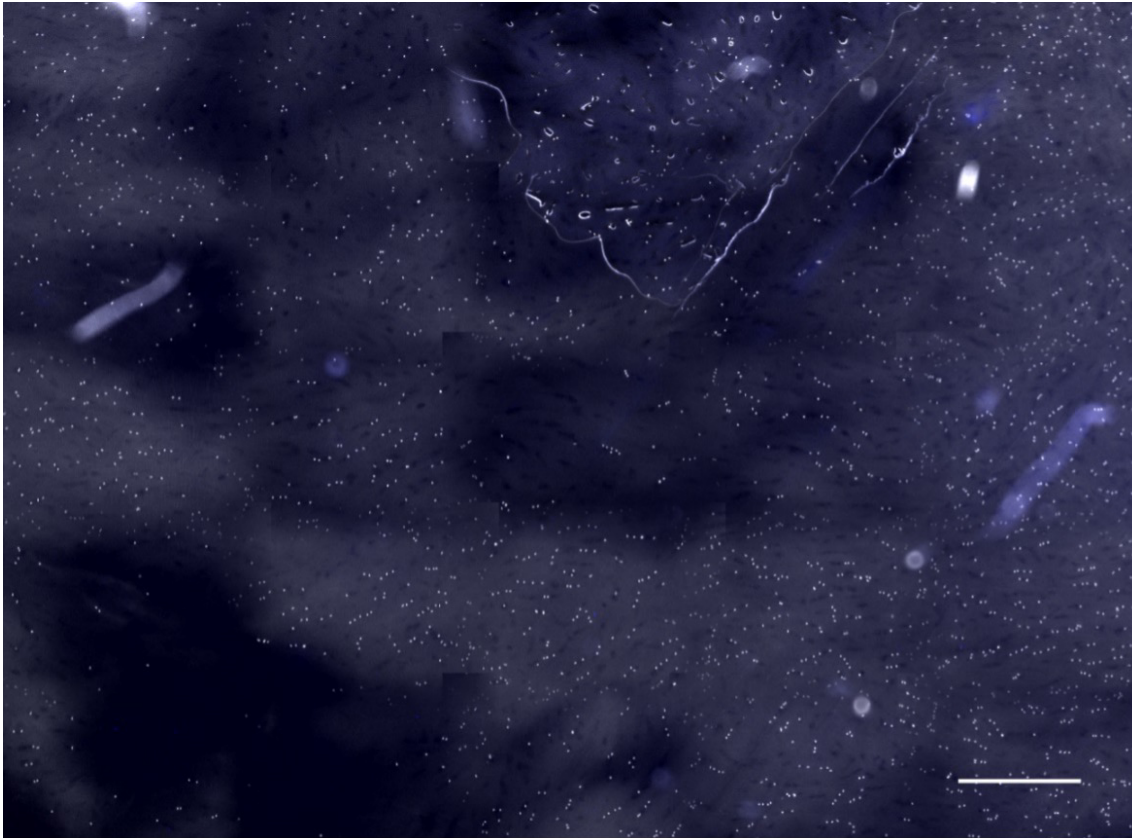


Abbildung 27: Mosaikaufnahme von Ki-67.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. Ki-67 ist blau dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

Als Positivkontrolle, wurden Versuche mit Chondrosarkomzellen durchgeführt. Der Versuchsablauf kann aus dem Kapitel 2.2.4.2 entnommen werden.

Ergebnisse

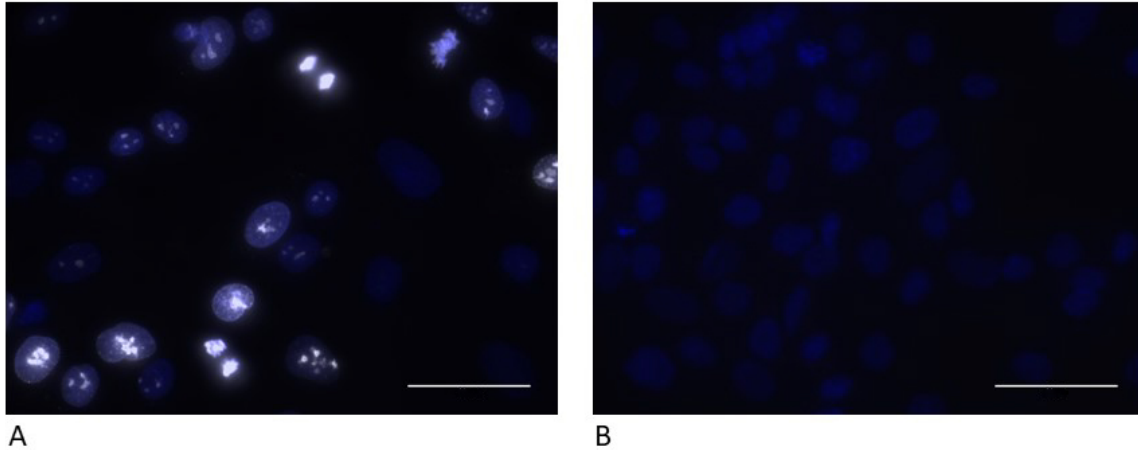


Abbildung 28: Positivkontrolle für den Ki-67-Antikörper.

Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die Ki-67-Antikörper wurden weiß dargestellt. (A) Chondrosarkomzellen mit Ki-67-Antikörper. (B) Chondrosarkomzellen ohne Ki-67-Antikörper. Maßstab: 50 μ m.

Dabei kann in der Positivkontrolle A ein deutliches Signal von Ki-67 gesehen werden (Abbildung 28). Dies ist der hohen Proliferationsrate der Chondrosarkomzellen geschuldet. Bei der Negativkontrolle (Abbildung 28 B) lässt sich hingegen keine Bindung von Ki-67 feststellen. Lediglich die lebenden Zellen konnten mit Dapi blau dargestellt werden.

3.2.5 PCNA

Der im Zellkern befindliche Proliferationsfaktor PCNA ist ein wichtiger Co-Faktor bei der DNA-Replikation und übt zudem Reparatur- und katalytische Funktionen aus [49-51]. Nach der geringen Intensität der Antikörperfärbung für Ki-67 (Abbildung 25-27), konnte in folgender Abbildung ein stärkeres Signal für PCNA beobachtet werden.

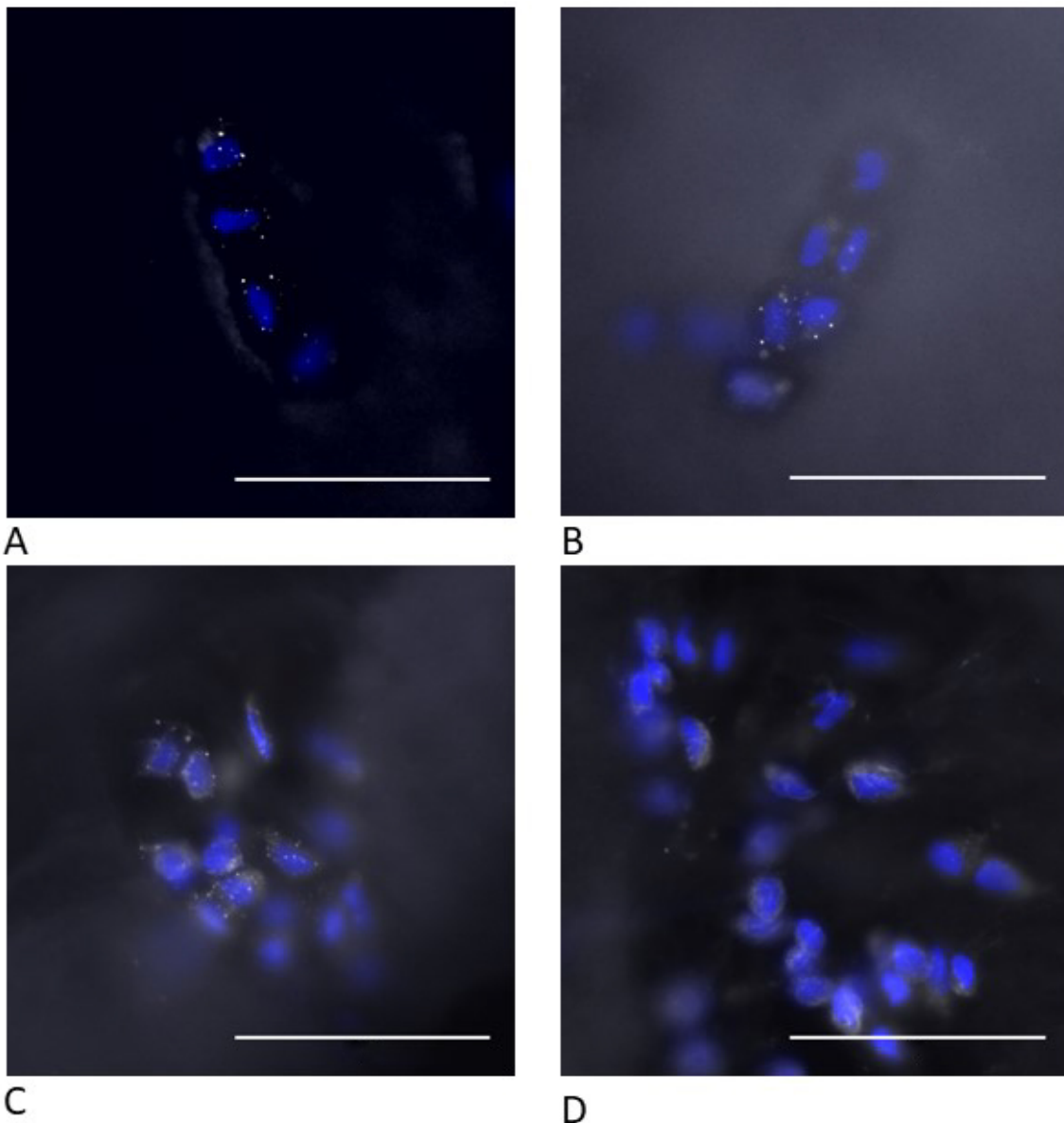


Abbildung 29: Immunhistologische Bilder von PCNA.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt PCNA dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

Ergebnisse

Bei der Färbung für PCNA ist eine stetige Zunahme der Signalintensität von der Entwicklung von Single Strings zu Big Clustern zu erkennen. Auch hier sind die Signale vor allem intrazellulär vorzufinden, wobei die Färbung bei den ersten drei Stufen etwas definierter ist. Anfangs tritt die Färbung vereinzelt und punktförmig auf, zum Ende der Arthrosestufen konfluieren die Punkte und ergeben eine räumlich erscheinende Färbung (Abbildung 29-31).

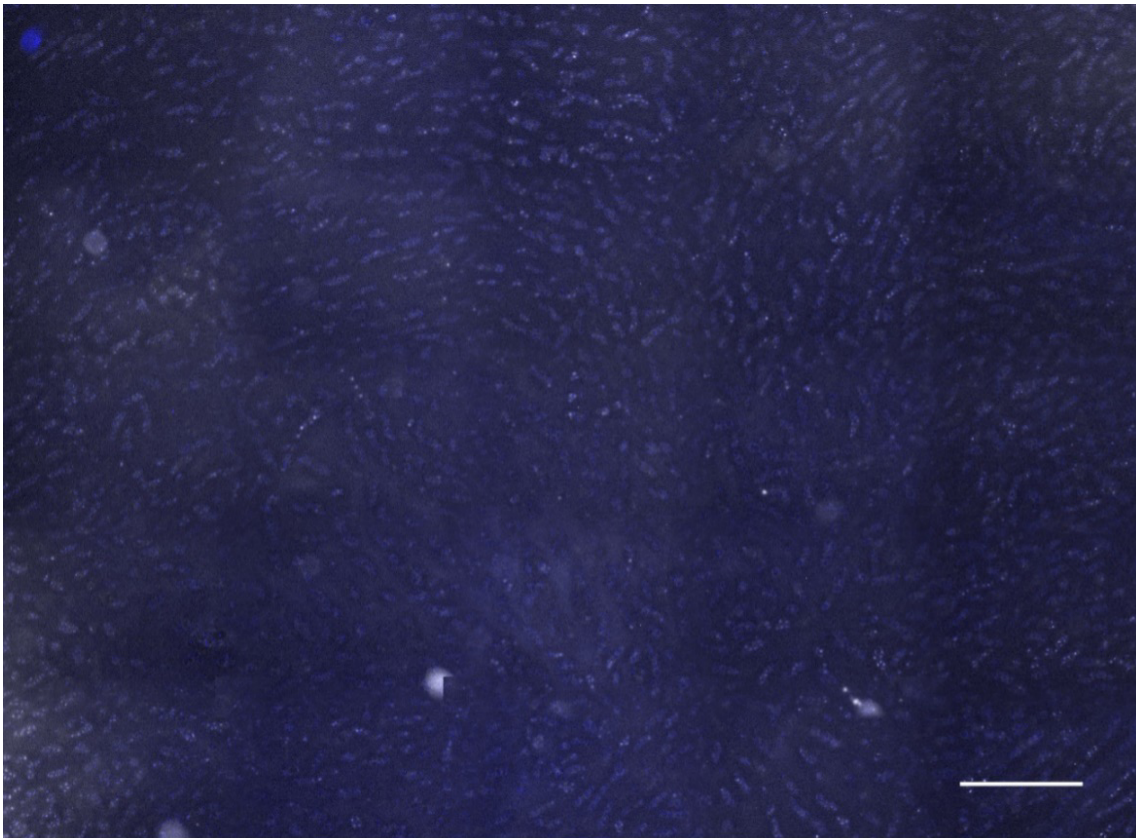


Abbildung 30: Mosaikaufnahme von PCNA.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. PCNA ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 µm.

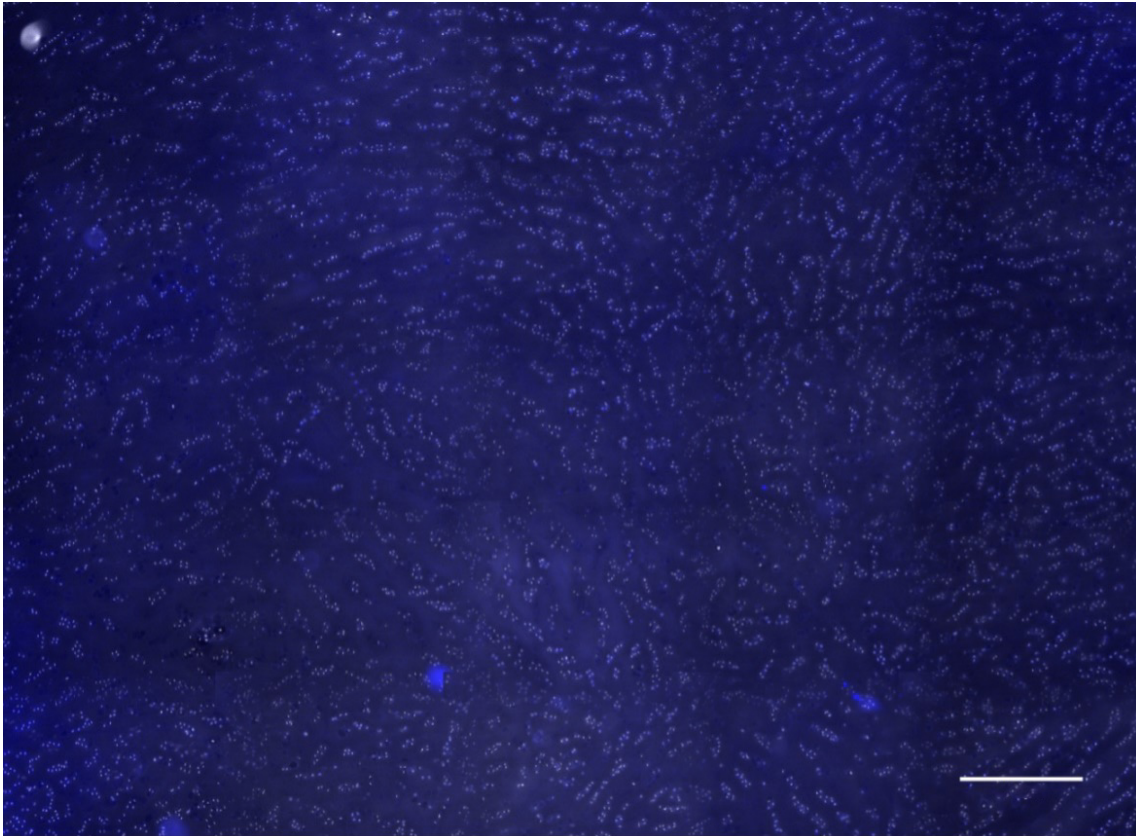


Abbildung 31: Mosaikaufnahme von PCNA.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. PCNA ist blau dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

Um den deutlich erkennbaren Unterschied zu verifizieren, wurde zusätzlich ein ELISA für PCNA durchgeführt. Die hierfür durchgeführten ELISA's führten jedoch zu keinem quantitativ verwertbaren Ergebnis, weshalb noch zusätzlich ein Western Blot durchgeführt wurde (siehe 3.3).

3.2.6 VEGF-A

Der Angiogenesefaktor VEGF-A ist sowohl an der Bildung neuer Blutgefäße als auch an der Knochenentstehung und -heilung beteiligt [38-40]. Weiterhin stellt VEGF-A eine potenzielle Schnittstelle zwischen Angiogenese und Inflammation dar. In der immunhistologischen Auswertung der verschiedenen Muster für VEGF-A zeigte sich in allen vier Mustern ein Signal (Abbildung 32-34).

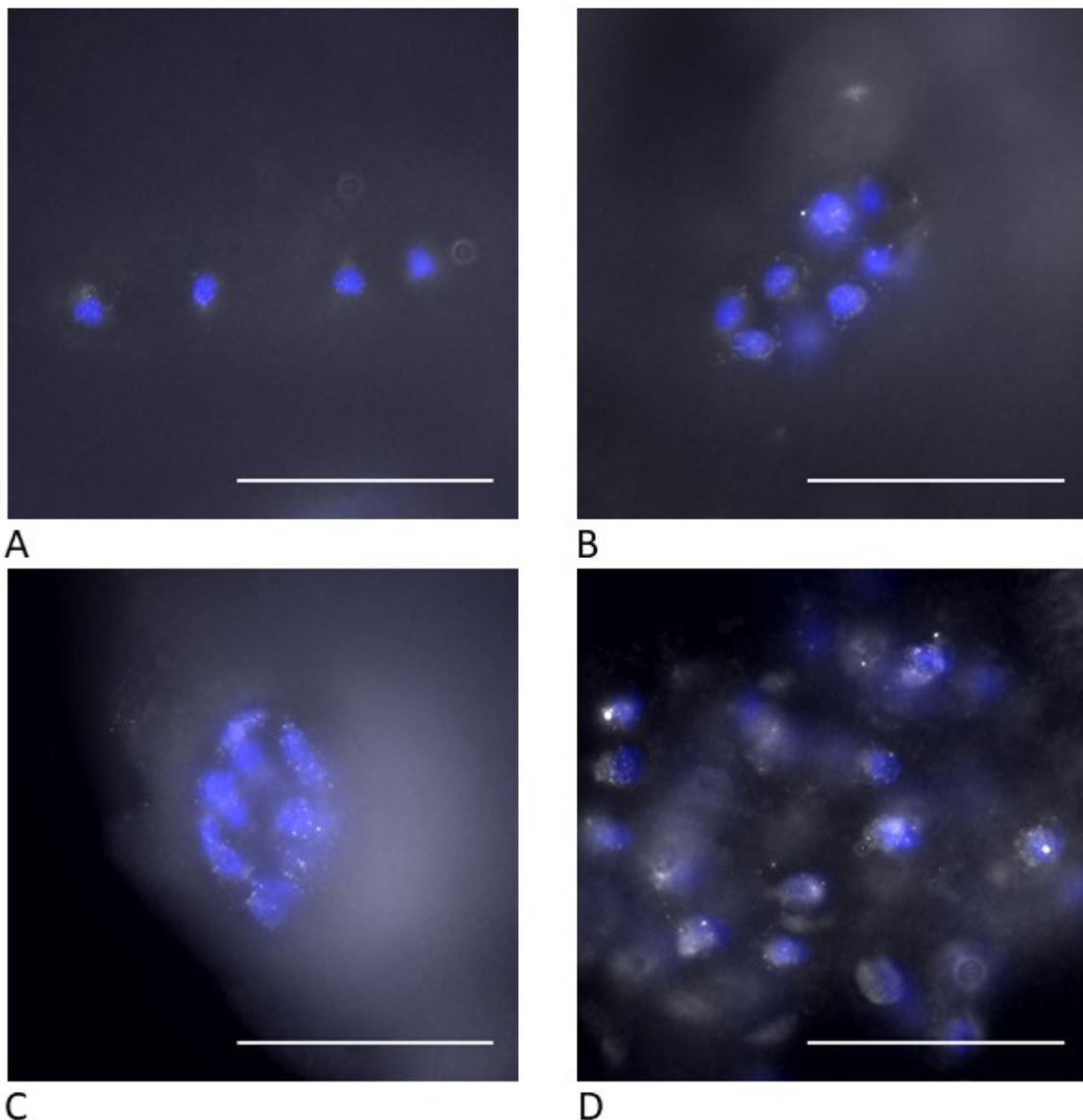


Abbildung 32: Immunhistologische Bilder von VEGF-A.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt VEGF-A dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

Ergebnisse

Bei den Single Strings ist nur eine geringere Farbintensität zu sehen, die im Verlauf jedoch zunimmt. Die Färbung befindet sich größtenteils intrazellulär. Somit kann angenommen werden, dass eine Steigerung der Intensität mit einer Zunahme der Bindung des Antikörpers einhergeht.

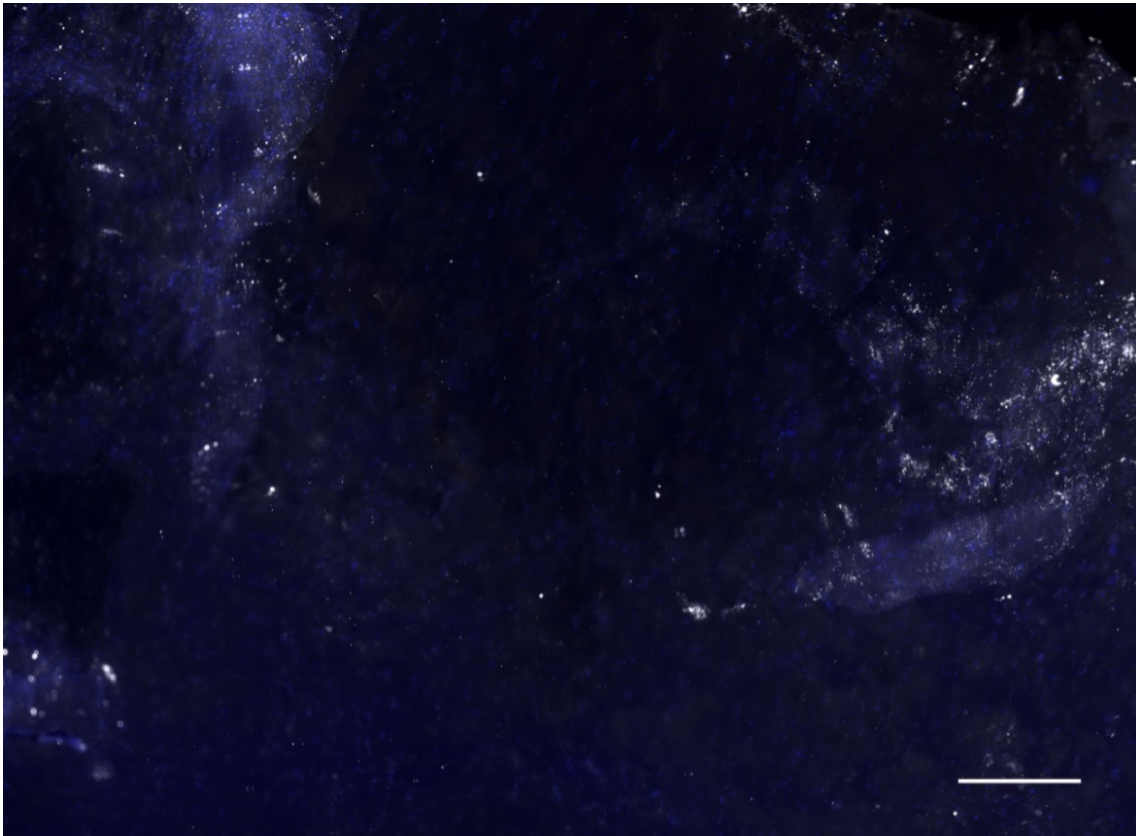


Abbildung 33: Mosaikaufnahme von VEGF-A.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. VEGF-A ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 µm.

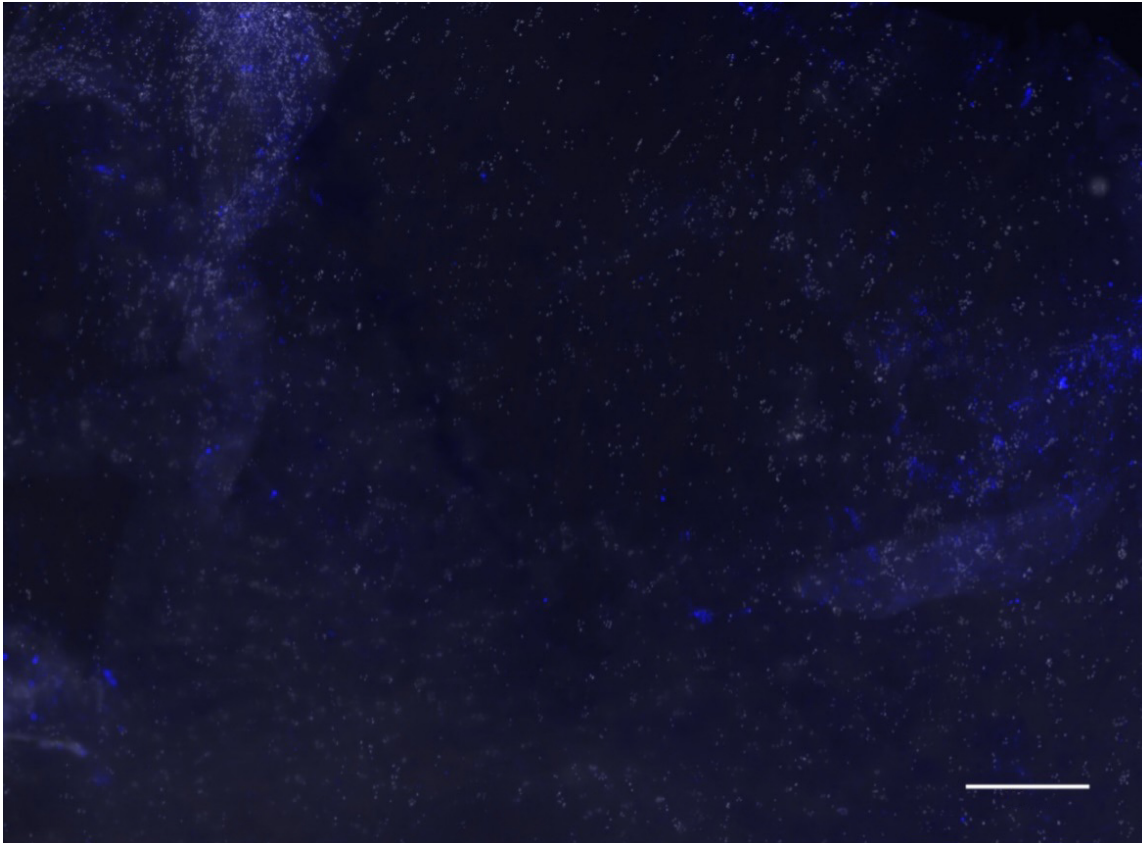


Abbildung 34: Mosaikaufnahme von VEGF-A.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. VEGF-A ist blau dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

Aufgrund des visuell ersichtlichen Unterschieds der Färbung im Progress der Arthrostufen wurde als nächstes ein ELISA durchgeführt (Abbildung 35).

Ergebnisse

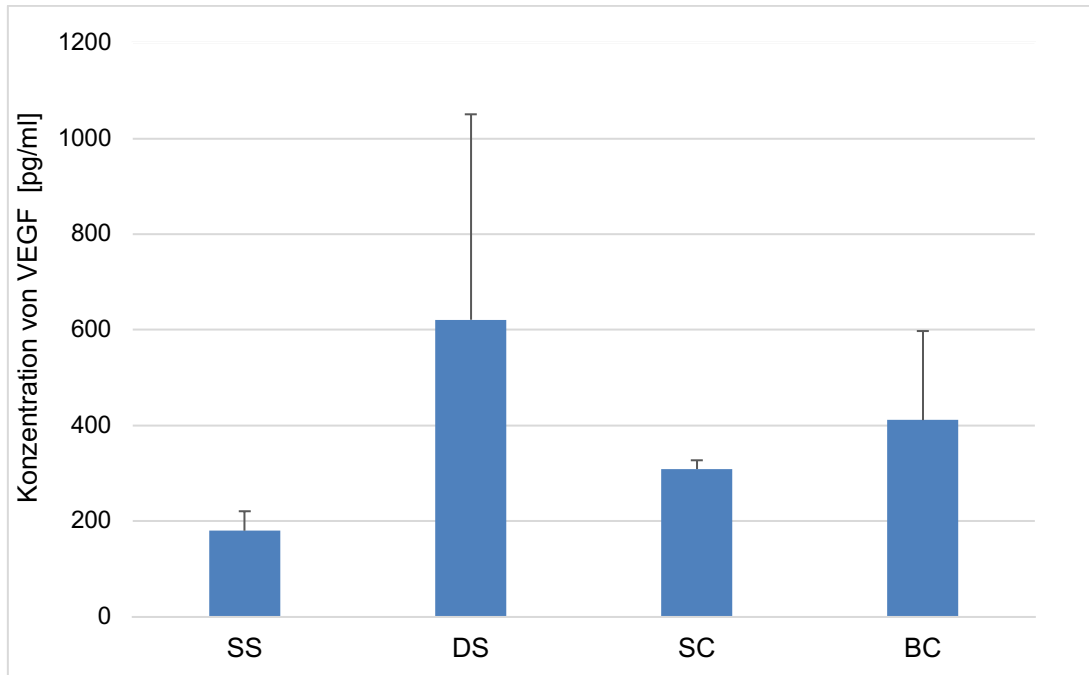


Abbildung 35: Quantitativer Gehalt von VEGF-A (pg/ml) in den verschiedenen Arthrosestufen.

Der ELISA wurde für N1 – N3 durchgeführt. Abgebildet sind Säulendiagramme, die die Messergebnisse gemittelt darstellen. Die Fehlerbalken stellen die Streuung der Ergebnisse dar. SS=Single Strings; DS=Double Strings; SC=Small Cluster; BC=Big Cluster.

Dabei fällt vor allem auf, dass der VEGF-A Gehalt seinen niedrigsten Wert in Single Strings hat. In den anderen drei Stufen sind die Werte deutlich höher, wobei hier keine klare Korrelation mit dem Schweregrad der Muster erkennbar ist. Der höchste Wert ist bei den Double Strings zu entnehmen. Jedoch ist der Fehlerbalken bei den Double Strings am größten, was für eine größere Streuung der Ergebnisse spricht.

3.2.7 PECAM-1

Um weitere Hinweise über die Angiogenese im hyalinen Knorpel bei der Arthroseentstehung zu erlangen, wurde als nächstes der Angiogenesefaktor PECAM-1 untersucht. Dieser liefert neben Aussagen zur Angiogenese zusätzlich Hinweise auf Inflammation [41].

In den folgenden Abbildungen lässt sich eine Zunahme der Intensität von PECAM-1 feststellen. Weiterhin entsteht der Eindruck, dass PECAM-1 ausschließlich intrazellulär lokalisiert ist.

Ergebnisse

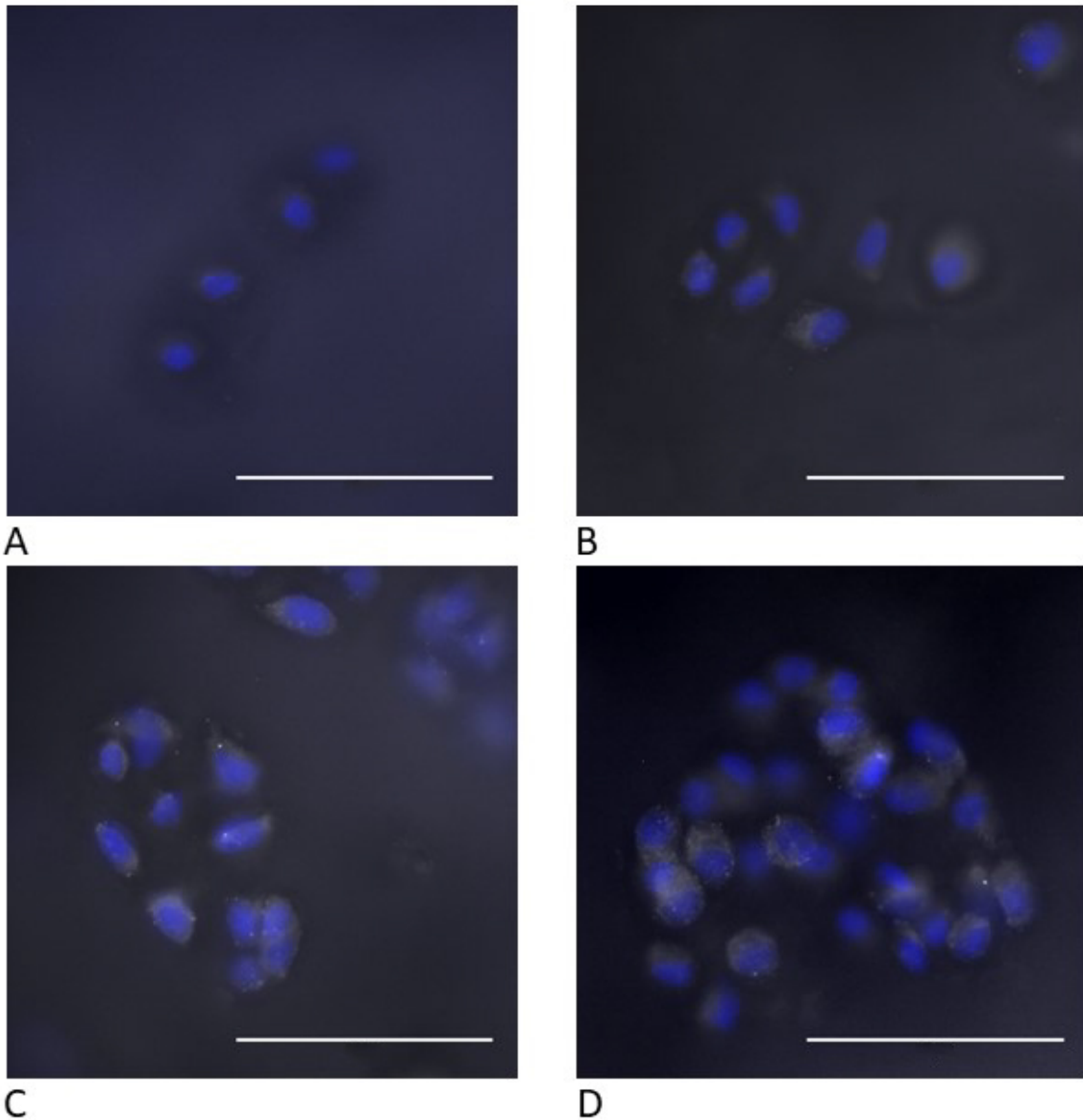


Abbildung 36: Immunhistologische Bilder von PECAM-1.

Für die immunhistologischen Bilder wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenknorpels verwendet. Zellkerne wurden mit Dapi blau abgebildet. Die weiße Färbung stellt PECAM-1 dar. (A) Single Strings (B) Double Strings (C) Small Cluster (D) Big Cluster. Maßstab: 50 μ m.

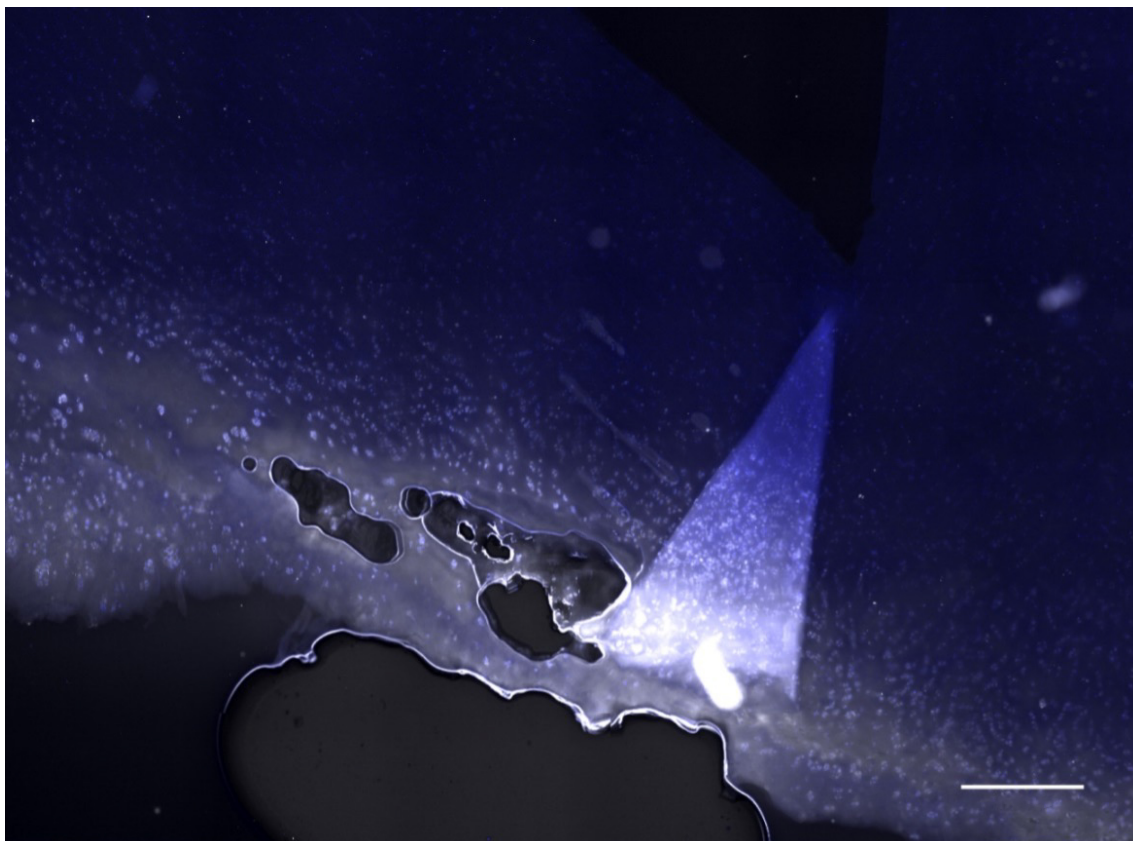


Abbildung 37: Mosaikaufnahme von PECAM-1.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi blau abgebildet. PECAM-1 ist weiß dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

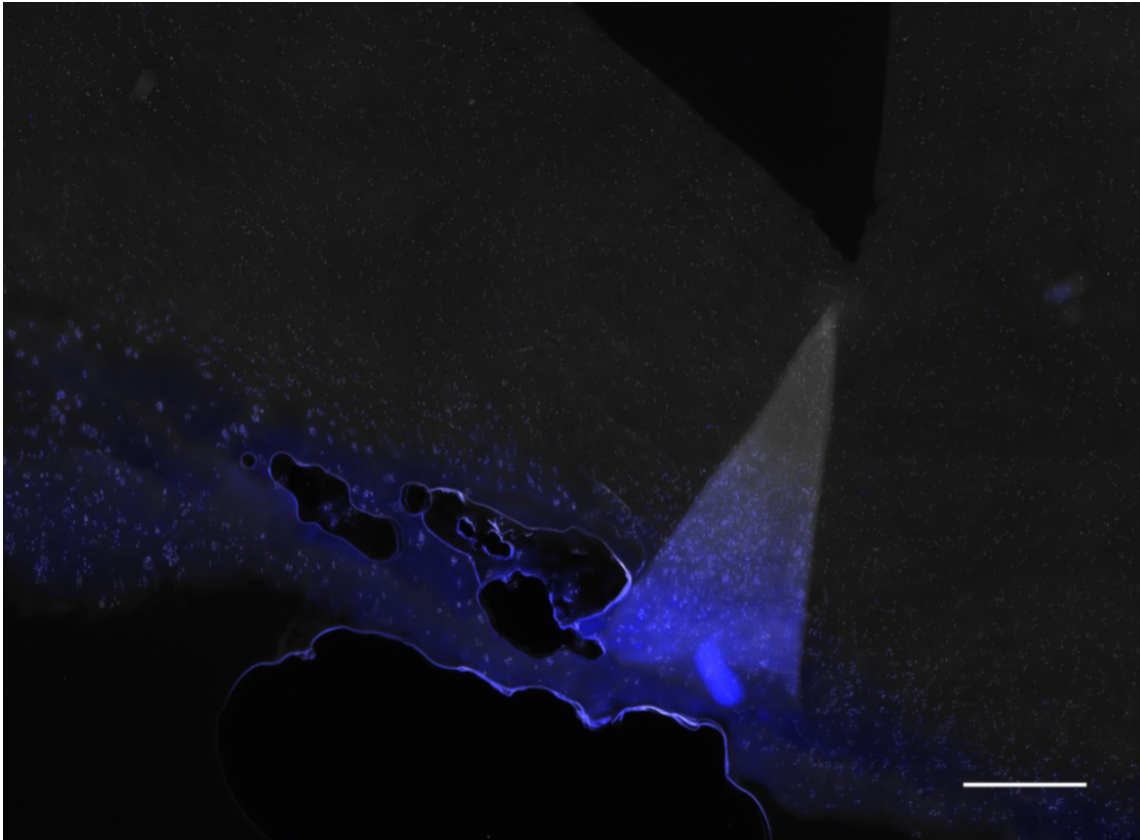


Abbildung 38: Mosaikaufnahme von PECAM-1.

Für das immunhistologische Bild wurde die Superficial Zone des hyalinen Kniegelenkknorpels verwendet. Zellkerne sind mit Dapi weiß abgebildet. PECAM-1 ist blau dargestellt. Maßstab: 100 µm.

Trotz eines sichtbaren Anstiegs von PECAM-1 wurde kein ELISA durchgeführt. In dieser Arbeit wurde aufgrund mangelnden Materials nur ein quantitativer Nachweis für lediglich einen Angiogenesefaktor (VEGF-A) durchgeführt. Dieser wurde repräsentativ für beide Angiogenesefaktoren betrachtet.

3.3 Western Blot

Aufgrund der negativen Ergebnisse aus den PCNA-ELISA's wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt. Die Entwicklungszeit betrug eine Minute und es wurden zwei Testdurchläufe gemacht. Vergleichend wurde der Gehalt an PCNA in den verschiedenen Mustern aus Single Strings, Double Strings, Small Clustern und Big Clustern untersucht (Abbildung 39).

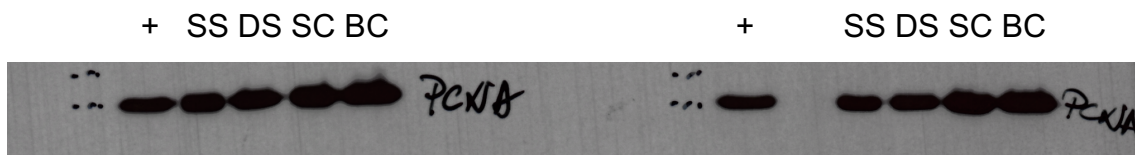


Abbildung 39: Western Blot für PCNA nach einer Minute.

Es wurden zwei Testdurchläufe gemacht und 30 µg Proteinmaterial verwendet. Der dargestellte Bereich liegt bei ungefähr 36 kDa. Zu sehen sind Banden von Positivkontrollen (+), Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Clustern (SC) und Big Clustern (BC).

Dabei zeigt sich, dass in jeder Arthrosestufe, von Single Strings zu Big Cluster, der Gehalt an PCNA steigt und somit von einer allgemeinen Zunahme des Proteins in der Arthrose ausgegangen werden kann (Abbildung 40).

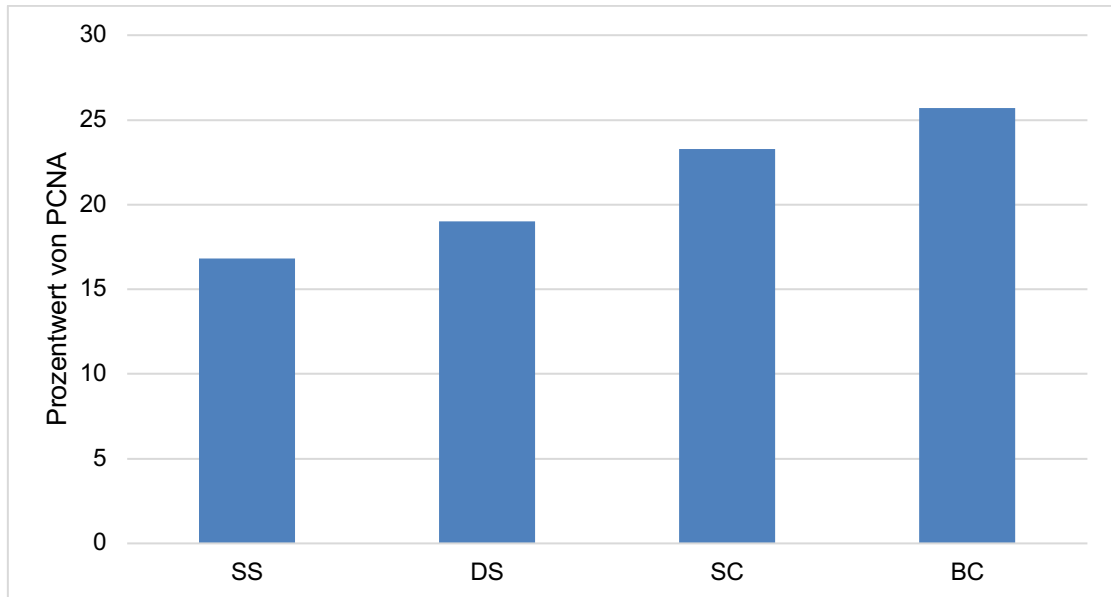


Abbildung 40: Säulendiagramm des Western Blot für PCNA.

Säulendiagramm der gemittelten zwei Testdurchläufe und Vergleich des Signals der verschiedenen Arthrostufen: Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Cluster (SC) und Big Cluster (BC).

3.4 Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Aufgrund der nur eingeschränkten Aussagekraft der bisher durchgeführten Experimente zur Apoptose, erfolgte noch eine Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung. Dabei lässt sich erkennen, dass der Anteil an toten Chondrozyten in Bezug auf die Gesamtchondrozytenzahl im Verlauf der Arthrose signifikant steigt (Abbildung 41). Dieser signifikante Anstieg besteht zwischen den Single Strings zu den Big Clustern ($p=0,004$), sowie zwischen den Double Strings zu den Big Clustern ($p=0,016$).

Ergebnisse

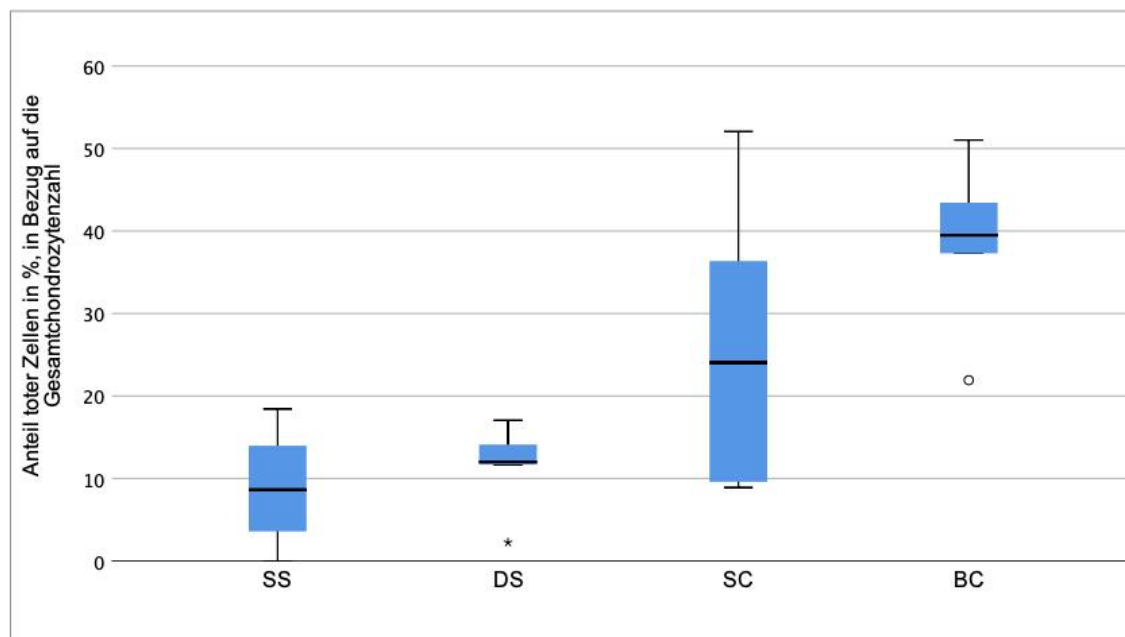


Abbildung 41: Einfacher Boxplot der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung-Ergebnisse.

Der Boxplot zeigt den Anteil toter Chondrozyten im Vergleich zu der Gesamtzellzahl, sowie vergleichend zwischen den verschiedenen Arthrosestufen: Single Strings (SS), Double Strings (DS), Small Cluster (SC) und Big Cluster (BC). Sternchen verdeutlichen extreme Ausreißer. Kreise verdeutlichen milde Ausreißer.

4 Diskussion

Die Pathophysiologie der Arthrose im hyalinen Knorpel ist bisher unzureichend verstanden. Mikroskopisch können bei Arthrose mehrere räumliche Chondrozytenmuster beobachtet werden, anhand derer man auch den Grad der lokalen Gewebeschädigung zuweisen kann [66]. Anhand einer solchen einfachen bildmorphologischen Einteilung für lokale Gewebedegeneration ist es möglich gegebenenfalls Unterschiede zwischen solchen Stadien zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf sieben Proteine im hyalinen Gelenkknorpel gelegt, welche eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Arthrose spielen. Es wurden hierfür folgende vier Zellprozesse der Chondrozyten in den Fokus genommen: Differenzierung (Kollagen X), Apoptose (Annexin V und Caspase 3), Proliferation (Ki-67 und PCNA) und Angiogenese (VEGF-A und PECAM-1).

4.1 Erhöhter Gehalt von Kollagen X und die damit verbundene Umstrukturierung der EZM

Parallel zur räumlichen Umstrukturierung der Chondrozyten stieg der Gehalt an Kollagen X in den immunhistologischen Bildern im Prozess der Arthrose (Abbildung 13). Ab den Small Clustern verliert Kollagen X seine intrazelluläre Anordnung und beginnt sich im perizellulären Raum zu verteilen. Bei den Big Clustern reicht die Färbung bis in die EZM. Der durchgeführte ELISA bekräftigte die Vermutung, dass der Gehalt an Kollagen X von Strings zu Big Clustern in jeder Stufe zunimmt (Abbildung 16).

Insgesamt stellt der hyaline Knorpel ein phänotypisch konstantes Konstrukt dar. Die gesunden Chondrozyten besitzen eine geordnete Struktur und produzieren im physiologischen Zustand wenig Kollagen X [67]. Im Verlauf der Arthrose beginnen sie jedoch die Kollagen X Produktion zu steigern und zeigen bereits in frühen Stadien eine Hypertrophie-ähnliche Veränderung [59, 60]. Weiterhin zählt Kollagen X bereits zu einem etablierten Biomarker für hypertrophe Chondrozyten

[56, 58, 68]. Hypertrophe Chondrozyten spielen eine essenzielle Rolle bei der enchondralen Ossifikation, welche wiederum einen grundlegenden Bestandteil der Knochenheilung bildet. Somit könnte die Hypertrophie-ähnliche Anpassung, beziehungsweise die Differenzierung der Chondrozyten, ein Versuch sein, den entstandenen Knorpelschaden kompensatorisch zu reparieren.

Felka et al. konnten zusätzlich nachweisen, dass ab den Small Clustern die PZM ihre Struktur verliert [69]. Dies wird durch die Ergebnisse in Abbildung 13 bestätigt. Durch den potenziellen Umbau der Struktur hin von Kollagen II zu Kollagen X ist anzunehmen, dass der Knorpel seine ursprüngliche Funktion nicht mehr in der gleichen Art und Weise erfüllen kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Kollagen X ein häufig gefundener Marker für Arthrose ist und die Ergebnisse dieser Arbeit die Beobachtungen aus anderen Arbeiten bestätigen konnten.

4.2 Annexin V und seine Bedeutung bei der Entwicklung der Arthrose

Aufgrund der noch nicht vollständig erforschten Funktion von Annexin V wurde in dieser Arbeit lediglich die Funktion als Apoptosefaktor betrachtet. In den immunhistologischen Färbungen lässt sich ausschließlich in den Anfangsstadien der Arthrose ein Signal vermuten (Abbildung 17). In den späteren Stadien und den Mosaikbildern konnte hingegen kein Signal von Annexin V nachgewiesen werden (Abbildung 17-19). In anderen Arbeiten wiederum konnte mittels immunhistologischer Färbung eine Signalsteigerung von Annexin V im arthrotischen Knorpel festgestellt werden [45, 70]. Um eine Fehlerkomponente dieser Arbeit in der immunhistologischen Färbung auszuschließen, wurde ergänzend ein Apoptoseversuch durchgeführt (Abbildung 20). Hiermit konnte gezeigt werden, dass im Falle von induzierter Apoptose, tatsächlich der Antikörper effektiv bindet. Der größte potenzielle Unterschied in der Methodik der immunhistologischen Färbungen war, dass in anderen Studien die Versuche mit Paraffinfixierung durchgeführt wurden [45, 70]. Die Paraffinfixierung ermöglicht einen besseren Erhalt der Struktur und könnte somit den entscheidenden

Unterschied zu einem unzureichenden Erfolg in der immunhistologischen Färbung geführt haben. Zusätzlich wurde in der Arbeit von Kirsch et al. ein Zusammenhang zwischen Annexin V und hypertrophen Chondrozyten beschrieben [70]. Dies bekräftigt die Ergebnisse dieser Arbeit mit Kollagen X darin, dass eine Hypertrophie der Chondrozyten im Prozess der Arthrose stattfindet. Jedoch zeigten andere Arbeiten, dass Annexin V zusätzlich mit Kollagen II interagieren kann [44, 71].

Trotz der negativen Ergebnisse in dieser Arbeit ist durch den bisherigen Forschungsstand anzunehmen, dass Annexin V sich im Prozess der Arthrose vermehrt.

4.3 Caspase 3 als Indikator einer gesteigerten Apoptose bei der Arthrose

Der zweite untersuchte Apoptosefaktor Caspase 3 konnte hingegen in jeder Arthrostufe angefärbt werden (Abbildung 21). Hierbei waren keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Stufen feststellbar. Andere Arbeiten erkannten einen deutlichen Anstieg von Caspase 3 in der Superficial Zone bei arthrotischem Knorpel [61, 72]. Dabei wurden zwei mögliche Ursachen für den höheren Anstieg von Caspase 3 in der Superficial Zone im Vergleich zu den anderen Schichten des hyalinen Knorpels vermutet. Als eine Möglichkeit wird angenommen, dass die oberste Schicht einer höheren Belastung ausgesetzt ist und den Druck für die unteren Schichten abdämpft [72]. Die zweite Vermutung wird auf den unterschiedlichen Verlauf der Kollagenfasern zurückgeführt [72, 73]. Erstgenanntes könnte einen vermeintlichen Fehler dieser Arbeit darstellen. Bei der Aufbereitung des Knorpels wurden die obersten 300 µm verwendet. Jedoch konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Superficial Zone noch erhalten ist oder ob sie durch die fortgeschrittene Arthrose eines Patienten bereits abgenutzt war. Um solch einen Fehler zu vermeiden, könnte der Knorpel als Ganzes präpariert und immunhistologisch aufbereitet werden. Somit könnten alle Schichten dargestellt und analysiert werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorher genannten Arbeiten eine Steigerung der Caspasekaskade in der Superficial Zone. In zukünftigen Experimenten sollte zusätzlich geprüft werden, ob der intrinsische oder der extrinsische Aktivierungsweg der Caspasekaskade dominiert.

Aufgrund der nicht eindeutigen immunhistologischen Ergebnisse wurde in Bezug auf Apoptose noch eine Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt, um Unterschiede der Apoptose in den jeweiligen Arthrosetufen darzustellen. Dabei konnte beobachtet werden, dass ein Anstieg der Apoptose im Verhältnis zur Gesamtzellzahl stattfindet (Abbildung 41). Signifikante Anstiege konnten zwischen den Single Strings zu den Big Clustern, sowie von den Double Strings zu den Big Clustern festgestellt werden.

Zusammenfassend weisen sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit, als auch anderer Forschungsgruppen auf eine wichtige Rolle der Apoptose bei der Entstehung der Arthrose hin [61, 72, 74, 75]. Da Caspase 3 eine Schnittstelle des extrinsischen und intrinsischen Wegs der Apoptose darstellt, könnte eine Inhibition von Caspase 3 einen potenziellen Therapieansatz der Arthrose darstellen. Lee et al. konnten hierzu bereits zeigen, dass eine Inhibition von Caspase 3 in vitro die Apoptose von Chondrozyten herunterreguliert [76].

4.4 Gesteigerte Konzentration des Proliferationsmarkers Ki-67

Ki-67 ist ein klinisch etablierter Proliferationsmarker und kann bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten zum Malignitätsgrading verwendet werden [52, 77]. Auch in dieser Arbeit sollte mittels Expressionsanalyse von Ki-67 die Proliferation in arthrotischem Gewebe genauer untersucht werden. Die immunhistologischen Färbungen lieferten hierbei den Hinweis auf gesteigerte Signale von Ki-67 hauptsächlich in der letzten Stufe der Arthrose (Abbildung 25). Die Ergebnisse von Hoshiyama et. al zeigen ebenfalls eine höhere Proliferationsrate der Chondrozyten in den Clustern als in den vorherigen Stufen, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt [30]. Um den Hinweis einer vermehrten Präsenz von Ki-67 bekräftigen zu können, wurde zusätzlich eine

korrekte Bindungsqualität des Antikörpers mittels Chondrosarkomzellen überprüft (Abbildung 28).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass bei Arthrose-Entstehung vermehrte Proliferation vor allem ab der Clusterbildung stattfindet. Da die Clusterbildung ein fortgeschrittenes Stadium der Arthrose darstellt, wäre die Inhibition von Ki-67 als denkbarer therapeutischer Ansatz möglicherweise nicht gut geeignet die Progression der Erkrankung frühzeitig zu verhindern.

4.5 Erhöhte PCNA-Konzentration als weiterer Hinweis gesteigerter Proliferation

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit liegt die Vermutung nahe, dass die Proliferation in arthrotischem Gewebe gesteigert ist. Um weitere Hinweise zu erlangen, wurde als nächstes ein weiterer Proliferationsfaktor PCNA untersucht. Tatsächlich ist in den immunhistologischen Bildern ebenfalls ein Signal von PCNA zu sehen, die in den jeweiligen Stufen der Arthrose zunimmt (Abbildung 29).

Da mit den bisherigen Ergebnissen ausschließlich qualitative Aussagen getroffen werden konnten, wurde anschließend ein ELISA durchgeführt. Hier gelang jedoch kein quantifizierbares Ergebnis, weswegen bei noch höherer Sensitivität ergänzend ein Western Blot erfolgte. Hierin bestätigte sich die Vermutung aus den immunhistologischen Bildern (Abbildung 39). Insbesondere zeigt sich ein signifikanter Anstieg von Single Strings zu Big Clustern und von Double Strings zu Big Clustern (Abbildung 40). Verglichen mit anderen Studien, die immunhistologische Färbungen durchführten, konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Pfander et. al berichtete beispielsweise, dass PCNA in leichtgradig geschädigtem, oberflächlichem Knorpel und in Clustern vorzufinden ist [78]. Außerdem kamen sie zu dem Schluss, dass in der Arthrose ein ähnlicher Prozess wie bei der enchondralen Ossifikation mit Proliferation und Hypertrophie stattfindet [78]. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit. Eine weitere Arbeit verglich zusätzlich die Expression von PCNA in Arthrose und rheumatoider Arthritis. In beiden Erkrankungen findet sich sowohl eine

Fibroblasten-ähnliche Konfiguration der synovialen Zellen als auch eine hohe Expression von PCNA. Des Weiteren trägt PCNA zur Pannusbildung bei, wodurch ein größerer Schnittpunkt zur Rheumatoider Arthritis entsteht [79].

Auf mögliche Fehlerquellen der ELISA Versuche, die zu nicht verwertbaren Ergebnissen führten, soll im Folgenden eingegangen werden. Eine mögliche Ursache könnte eine falsche Gensequenz der Herstellerfirma sein. Des Weiteren könnte auch die höhere Sensitivität nicht ausreichend genug gewesen sein, um den niedrigen Gehalt an PCNA in den Proben zu detektieren. Außerdem könnte ein zu häufiges Auf- und Abtauen der Proben zu einem Verlust der Strukturen geführt haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proliferation eine wichtige Rolle in der Entstehung der Arthrose spielt. Dies wird besonders in der Formierung der Cluster deutlich, die in der Einteilung nach Rollaufs et al. für eine fortgeschrittene Arthrose stehen [31]. Wichtig zu erwähnen sind zusätzlich mögliche Schnittstellen zur enchondralen Ossifikation und zur rheumatoiden Arthritis.

4.6 VEGF-A als potenzieller Marker für aktivierte Arthrose

In dieser Arbeit war ein deutlicher qualitativer und quantitativer Anstieg von VEGF-A in arthrotischem Gewebe zu erkennen. Anhand der immunhistologischen Bilder konnte ein konstanter Anstieg in jeder Stufe angenommen werden (Abbildung 32). Bei dem durchgeführten ELISA hingegen lag der höchste Gehalt an VEGF-A bei den Double Strings (Abbildung 35). Dennoch war er bei den Single Strings, im Vergleich zu den anderen Stufen, am niedrigsten. Im Gesamten betrachtet konnte somit von einem Anstieg von VEGF-A im Verlauf der Arthrose ausgegangen werden.

Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen Studien, die bezüglich VEGF-A und Arthrose durchgeführt wurden. Eine Meta-Analyse verglich mehrere Studien, die sowohl ELISA's, als auch immunhistologische Bilder von hyalinen Knorpel in die Auswertung integrierten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das VEGF-Level im Verlauf der Arthrose ansteigt und vermutlich eine starke Korrelation zwischen der Pathogenese der Arthrose und der Expression von VEGF besteht [40]. Auch

andere Studien schlussfolgerten einen höheren Gehalt an VEGF in arthrotischem als in gesundem Knorpel [63-65].

Der Höchstwert von VEGF-A (Abbildung 35) bei den Double Strings könnte auf eine Verschmutzung des Well-Feldes zurückgeführt werden.

Als weiterer wichtiger Punkt ist die Expression von VEGF in hypertrophen Chondrozyten mit der daraus resultierenden Bedeutung für die enchondrale Ossifikation zu nennen [80]. Dies könnte auf eine Schnittstelle mit den Ergebnissen des Kollagen X hindeuten, welches ebenfalls durch hypertrophe Chondrozyten produziert wird. Weiterhin wird VEGF bei stattfindender Inflammation eine Rolle zugesprochen [64]. Je nach Stadium der Arthrose – aktivierte Arthrose oder fehlende erhöhte Entzündungswerte – kann somit vermutlich der VEGF-Gehalt variieren. Zusätzlich dazu wird VEGF-A als wichtige Komponente bei der Schmerzempfindung bei Arthrose deklariert. Eine Arbeit zeigte hierzu, dass eine Anti-VEGF-Therapie eine mögliche Schmerzreduktion und Verlangsamung der Arthroseprogression ermöglichen könnte [81].

Zusammengefasst decken sich die Ergebnisse für VEGF-A dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Studien und VEGF-A könnte ein potenzieller Marker für aktivierte Arthrose sein.

4.7 PECAM-1 als möglich wichtige Komponente bei einer Inflammation

Der zweite Angiogenesefaktor PECAM-1 ließ in den Ergebnissen ebenfalls einen Anstieg im Verlauf der Arthrose vermuten. Die immunhistologischen Bilder zeigten sowohl in den Nah-, als auch in den Mosaikaufnahmen eine Zunahme der PECAM-1-Präsenz (siehe Abbildung 36-38). Ein ELISA wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt, da VEGF-A bereits repräsentativ für die Quantität der Angiogenese untersucht wurde.

Die Studienlage in Bezug auf PECAM-1 und Arthrose ist sehr gering, besonders betreffend den Gehalt als Angiogenesefaktor im hyalinen Gelenkknorpel.

Zu erwähnen ist jedoch ein Anstieg von PECAM-1 bei Arthrose im Plasma, den Mabey et al. herausfinden konnten [82]. Melinte et al. verglichen den Gehalt von

PECAM-1 in den Zellen der Membrana synovialis. Sie zeigten, dass der Gehalt von PECAM-1 im Vergleich zu gesunden Proben erhöht ist [83]. Interessant ist, dass die zweite Studie vergleichend rheumatoide Arthritis und Arthrose als Inflammationsgewebe begutachtete. Hierdurch wurde das Augenmerk auf die Inflammationsfunktion von PECAM-1 gelenkt und dem Protein somit insgesamt mehr Gewichtung in Hinblick auf die Inflammation gegeben. Schlussendlich wurde somit der Vergleich der Arthrose mit der rheumatoiden Arthritis als chronisch-entzündliche Erkrankung näher in den Fokus der Forschung gerückt.

4.8 Erkenntnisse der Arthroseforschung im Vergleich zu anderen Entitäten

Rückblickend entstehen, nach Beendigung der Experimente dieser Arbeit und dem Vergleich mit anderen Studien, einige mögliche Verbindungen zu weiteren Entitäten und Pathologien. Besonders die Ergebnisse aus den Angiogenese- und Proliferationsversuchen lassen einen großen Zusammenhang mit der Tumorgenese vermuten. Hanahan et al. stellte hierzu zehn allgemeingültige Merkmale der Tumorentstehung aufgestellt – unter anderem eine gesteigerte Proliferation, sowie eine ausgeprägte Angiogenese [84]. Die gesteigerte Proliferation kann durch eine Vielzahl von Möglichkeiten auf molekularer Ebene erklärt werden. Eines der bekanntesten Beispiele stellt den Defekt des p53 Gens dar, welches bei irreparablen Mutationen der DNA zur Apoptose führt. Bei ungefähr 50% der invasiven Tumore liegt ein Defekt des p53 Gens vor [85]. Nach Erörtern eigener Ergebnisse, weiterer Studien und nach mikroskopischer Beurteilung ist von einer gesteigerten Proliferation im hyalinen Knorpel bei Arthrose-Entstehung auszugehen. Anhand weiterer Experimente sollte zukünftig das Forschungsspektrum auf die pathophysiologischen Veränderungen der Proliferation in der Tumorgenese erweitert werden.

Zusätzlich zur gesteigerten Proliferation ist anhand der vorliegenden Ergebnisse und weiterer Studien von einer zunehmenden Konzentration von Angiogenesefaktoren im hyalinen Knorpel auszugehen [63-65]. Besonders VEGF-A konnte mithilfe immunhistologischer Färbung und ELISA vermehrt im

arthrotischen Knorpel nachgewiesen werden. Außerdem ist VEGF-A ein essenzieller Faktor bei der Angiogenese von Tumoren. Einige Tumorzellen sind sogar dazu in der Lage, einen VEGF-Rezeptor zu exprimieren und somit autokrin und parakrin auf VEGF-Signale zu reagieren [86]. Bei der Arthrose bleibt die Angiogenese bisher wenig beachtet. In zukünftigen Experimenten könnten aber mithilfe des Vergleichs zur Tumorangiogenese weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Hinsichtlich der Therapiemöglichkeit wäre es interessant die Beteiligung des Immunsystems bei Arthrose zu betrachten, da bei der Tumorthherapie bereits große Erfolge durch Checkpoint-Inhibitoren erzielt wurden [87].

Über den Weg der Inflammation und Destruktion des Gelenkknorpels entsteht zudem eine Verbindung zur rheumatoiden Arthritis. Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung unklarer Genese, bei der es ebenfalls zur Destruktion des Knorpels kommen kann. In dieser Arbeit konnte eine Umstrukturierung des hyalinen Knorpels durch Bildung von Kollagen X festgehalten und durch die Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt werden. Im Bereich der Inflammation lieferten besonders VEGF-A und PECAM-1 eine positive Korrelation zur rheumatoiden Arthritis.

Die Destruktion des Knorpels bei Arthrose läuft über eine phänotypische Modulation der Chondrozyten und Produktion von Kollagen X als neues Syntheseprodukt ab. Bei der rheumatoiden Arthritis hingegen liegt im Regelfall eine höhere Inflammation vor als bei der Arthrose. Somit sorgen Entzündungsfaktoren, Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen für eine schnelle Progredienz des Knorpelverlustes. Besonders Matrix-Metalloproteasen wird ein großer Teil der Umstrukturierung des hyalinen Knorpels bei der rheumatoiden Arthritis und bei der Arthrose nachgesagt [88].

Ein weiterer denkbarer Kontaktpunkt der beiden Erkrankungen stellt die Inflammation dar. Nicht nur in dieser Arbeit, sondern auch in weiteren Studien zeigten die Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen Arthrostadium und einem höheren Gehalt an VEGF-A und PECAM-1 [40, 63-65, 82, 83]. Darüber hinaus verglich eine Metaanalyse Blut- und Plasmawerte von Rheumapatienten und konnte eine deutlich erhöhte VEGF Konzentration bei Rheumapatienten, die mit der Schwere der Krankheitsaktivität einhergeht, feststellen [89]. Zusätzlich

haben weitere Versuche mit Anti-VEGF-Therapien bereits zu einer Schmerzreduktion und Verlangsamung im Prozess der Arthrose führen können [81]. Vergleichend dazu konnten Dasgupta et al. zeigen, dass eine Blockierung von PECAM-1 in einer verminderten Inflammation und einem geringeren Knorpelverlust bei der rheumatoiden Arthritis resultieren kann [90]. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls auf eine Möglichkeit zur Therapierbarkeit der Arthrose hoffen und liefern neue Perspektiven in der Arthroseforschung.

Im Gesamten betrachtet entstehen somit mehrere Forschungsschwerpunkte, die zukünftig in der Pathogenese der Arthrose berücksichtigt und mit einbezogen werden sollten. Eine Option stellt die Erweiterung der Forschung auf andere Pathologien beziehungsweise Entitäten dar, um Prozesse leichter und schneller zu verstehen und nachvollziehen zu können. Des Weiteren könnte der Knorpel als Ganzes untersucht werden, um potenzielle Fehlerquellen zu minimieren. Außerdem sollten zukünftig neben dem hyalinen Gelenkknorpel weitere Gewebe untersucht werden, um den Prozess als Ganzes bewerten zu können. Mithilfe der mikroskopischen Einteilung der Arthrostadien könnte zusätzlich ein optimaler Zeitpunkt für ein Therapiebeginn gefunden werden. Letztlich lässt sich festhalten, dass die Arthrose deutlich weitgreifender untersucht werden muss, um den Pathomechanismus besser zu verstehen und mögliche Therapieoptionen etablieren zu können.

5 Zusammenfassung

Durch die immense volkswirtschaftliche Rolle der Arthrose und den zusätzlich weltweiten demographischen Wandel gewinnt die Forschung einer kausalen Therapie von Arthrose weiter an Bedeutung. Die Theorie des reinen Verschleißes des hyalinen Gelenkknorpels wurde bereits abgelegt und ersetzt durch eine bisher nur geringfügig verstandene multifaktorielle Pathophysiologie. Mikroskopisch konnten bei Arthrose-Entstehung bereits veränderte räumliche Anordnungen der Chondrozyten im hyalinen Knorpel festgestellt werden. Dies ermöglicht es, Arthrose einfach bildmorphologisch in verschiedenen Stadien einzuteilen und sie hinsichtlich pathophysiologischer Veränderungen vergleichend zu untersuchen. Diese Arbeit untersuchte die Expression von sieben Proteinen in verschiedenen mikroskopischen Stadien der Arthrose. Es wurden qualitative und quantitative Veränderungen bei der Angiogenese, Apoptose, Proliferation und hypertrophen Differenzierung nachgewiesen. Qualitative Beobachtungen wurden mittels immunhistologischer Färbungen durchgeführt und anschließend anhand quantitativer Versuche mit ELISA's oder einem Western Blot genauer betrachtet.

Eine gesteigerte Expression konnte besonders bei der hypertrophen Differenzierung, der Angiogenese und der Proliferation beobachtet werden. Einige dieser Ergebnisse konnten zudem unter Einbeziehen weiterer Forschungsergebnisse bestätigt werden. Besonders die phänotypische Modulation der Chondrozyten nach Schädigung des hyalinen Gelenkknorpels entspricht den Ergebnissen weiterer Studien. Dagegen zeigten die Resultate aus den Versuchen der Apoptose verglichen mit weiteren Forschungsergebnissen eine gewisse Kontroversität auf, bei der in dieser Arbeit ein Hinweis auf eine gesteigerte Apoptose bei Arthrose vermutet wird.

Zukünftig könnten Vergleiche mit anderen Entitäten, wie der rheumatoiden Arthritis oder der Tumorgenese, von großem Nutzen für das weitere Verständnis der Pathophysiologie hinter der Arthrose-Entstehung sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

% *Prozent*

°C *Grad Celsius*

APS *Ammoniumperoxodisulfat*

BMI *Body-Mass-Index*

BSA *Bovines Serumalbumin*

Caspase 3 *CysteinyI-aspartate specific protease*

Dapi *4',6-Diamidin-2-phenylindol*

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EZM *Extrazellulärmatrix*

g *Fallbeschleunigung*

HRP *Horseradish Peroxidase*

KTP *Knietotalendoprothese*

mA *Milliampere*

mg *Milligramm, Milligramm*

ml *Milliliter*

mm *Millimeter, Millimeter*

mM *Millimolar*

N *Patientengruppe*

NaCl *Natriumchlorid*

NaOH *Natriumhydroxid*

nm *Nanometer*

NSAR *Nichtsteroidale Antirheumatika*

OD *Optische Dichte*

PBS *Phosphate Buffered Saline*

PCNA *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*

PECAM-1 *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

PZM *Perizellulärmatrix*

RT *Raumtemperatur*

SDS *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-Page *Natriumdodecylsulfat-Polyacryamid-Gelelektrophorese*

SPSS *Statistical Package for the Social Sciences*

TNF *Tumornekrosefaktor*

Tris *Trishydroxymethylaminomethan*

Tris-HCl *Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid*

V *Volt*

VEGF-A *Vascular Endothelial Growth Factor-A*

μg *Mikrogramm*

μl *Mikroliter*

μm *Mikrometer*

μM *Mikromolar*

μm^2 *Quadratmikrometer*

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Chondrozyten und Kollagenfasern im hyalinen Gelenknorpel.....	8
Abbildung 2: Das Kniegelenk in einer schematischen Darstellung mit den wichtigsten Komponenten.	10
Abbildung 3: Therapiestufenschema der Gonarthrose modifiziert nach [24].	13
Abbildung 4: Arthrostadien im hyalinen Knorpel eines Kniegelenks. Mit freundlicher Genehmigung des Springer Nature Verlags [33].	16
Abbildung 5: Präparation der Knorpelproben.....	31
Abbildung 6: Zuschneiden von hyalinem Knorpel am Kryotom.....	32
Abbildung 7: Knorpelstücke, die mit einer 4mm Stanze ausgestanzt wurden.	37
Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung der Chondrozytenzellanordnung.....	38
Abbildung 9: Standardkurve des Bradford-Test.	42
Abbildung 10: Aufbau eines Sandwich Blots.	48
Abbildung 11: Patientenverteilung von Frauen und Männern in Bezug auf das Operationsalter bei einer KTP.	53
Abbildung 12: Die Patientengruppen verglichen in Bezug auf das Alter zum Zeitpunkt der KTP-Operation in einem Boxplot dargestellt.	54
Abbildung 13: Immunhistologische Bilder von Kollagen X.....	56
Abbildung 14: Mosaikaufnahme von Kollagen X.....	57
Abbildung 15: Mosaikaufnahme von Kollagen X.....	58
Abbildung 16: Quantitativer Gehalt von Kollagen X (pg/ml) in den verschiedenen Arthrostufen.	59
Abbildung 17: Immunhistologische Bilder von Annexin V.....	61
Abbildung 18: Mosaikaufnahme von Annexin V.....	62
Abbildung 19: Mosaikaufnahme von Annexin V.....	63
Abbildung 20: Positivkontrolle für den Annexin V-Antikörper.	64
Abbildung 21: Immunhistologische Bilder von Caspase 3.....	66
Abbildung 22: Mosaikaufnahme von Caspase 3.....	67
Abbildung 23: Mosaikaufnahme von Caspase 3.....	68
Abbildung 24: Positivkontrolle für den Caspase 3-Antikörper.	69

Abbildung 25: Immunhistologische Bilder von Ki-67.....	70
Abbildung 26: Mosaikaufnahme von Ki-67.....	71
Abbildung 27: Mosaikaufnahme von Ki-67.....	72
Abbildung 28: Positivkontrolle für den Ki-67-Antikörper.....	73
Abbildung 29: Immunhistologische Bilder von PCNA.....	74
Abbildung 30: Mosaikaufnahme von PCNA.....	75
Abbildung 31: Mosaikaufnahme von PCNA.....	76
Abbildung 32: Immunhistologische Bilder von VEGF-A.....	77
Abbildung 33: Mosaikaufnahme von VEGF-A.....	78
Abbildung 34: Mosaikaufnahme von VEGF-A.....	79
Abbildung 35: Quantitativer Gehalt von VEGF-A (pg/ml) in den verschiedenen Arthrosestufen.....	80
Abbildung 36: Immunhistologische Bilder von PECAM-1.....	82
Abbildung 37: Mosaikaufnahme von PECAM-1.....	83
Abbildung 38: Mosaikaufnahme von PECAM-1.....	84
Abbildung 39: Western Blot für PCNA nach einer Minute.....	85
Abbildung 40: Säulendiagramm des Western Blot für PCNA.....	86
Abbildung 41: Einfacher Boxplot der Vital-Fluoreszenz-Doppelfärbung-Ergebnisse.....	87

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	23
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper.....	23
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper.....	24
Tabelle 4: Verwendete ELISA-Kit's.....	24
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer.....	24
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 7: Verwendete Geräte.....	28
Tabelle 8: Verwendete Softwares.....	29
Tabelle 9: Gesuchte Proteine mit den verwendeten Enzymen und der durchgeführten Wirkdauer.....	34
Tabelle 10: Verwendete Muster für jede Versuchsgruppe N.....	39

Tabelle 11: Zusammensetzung des Lyse Puffers. Sowie die jeweilige Firma und die Produktnummer der Bestandteile.	39
Tabelle 12: Verwendete Standardkonzentrationen für eine Kalibrierung der photometrischen Proteinmessung.	41
Tabelle 13: Durchgeführte ELISA-Kits mit der hinzugefügten Proteinextrakten in µg.	43
Tabelle 14: Zusammensetzung für zwei Acrylamidgele	47
Tabelle 15: Ergebnisse aus 3-mal wiederholter, photometrischer Messung der Standardwerte (in einer 96-Well Platte). Errechneter Mittelwert und der Nullwert.	110

8 Literaturverzeichnis

1. Klusmann, A., H. Gebhardt, M. Nübling, F. Liebers, E. Quirós Perea, W. Cordier, L.V. von Engelhardt, M. Schubert, A. Dávid, B. Bouillon, and M.A. Rieger, *Individual and occupational risk factors for knee osteoarthritis: results of a case-control study in Germany*. Arthritis research & therapy, 2010. **12**(3): p. R88-R88.
2. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports health, 2009. **1**(6): p. 461-468.
3. James, C.B. and T.L. Uhl, *A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate*. Journal of athletic training, 2001. **36**(4): p. 413-419.
4. He, R., B. Wang, M. Cui, Z. Xiong, H. Lin, L. Zhao, Z. Li, Z. Wang, S. Peggrem, Z. Xia, and Z. Shao, *Link Protein N-Terminal Peptide as a Potential Stimulating Factor for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration*. Stem cells international, 2018. **2018**: p. 3217895-3217895.
5. Aicher, W.K. and B. Rolauffs, *The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2014. **73**(4): p. 645.
6. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options*. The American Journal of Sports Medicine, 2005. **33**(2): p. 295-306.
7. Gao, Y., S. Liu, J. Huang, W. Guo, J. Chen, L. Zhang, B. Zhao, J. Peng, A. Wang, Y. Wang, W. Xu, S. Lu, M. Yuan, and Q. Guo, *The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 8.
8. Ge, Z., Y. Hu, B.C. Heng, Z. Yang, H. Ouyang, E.H. Lee, and T. Cao, *Osteoarthritis and therapy*. Arthritis Care & Research, 2006. **55**(3): p. 493-500.
9. Jia, H., X. Ma, W. Tong, B. Doyran, Z. Sun, L. Wang, X. Zhang, Y. Zhou, F. Badar, A. Chandra, X.L. Lu, Y. Xia, L. Han, M. Enomoto-Iwamoto, and L. Qin, *EGFR signaling is critical for maintaining the superficial layer of articular cartilage and preventing osteoarthritis initiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(50): p. 14360-14365.
10. Goldring, M.B., *Articular cartilage degradation in osteoarthritis*. HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery, 2012. **8**(1): p. 7-9.
11. Wilusz, R.E., J. Sanchez-Adams, and F. Guilak, *The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2014. **39**: p. 25-32.
12. Abulhasan, F.J. and J.M. Grey, *Anatomy and Physiology of Knee Stability*. Journal of Functional Morphology and Kinesiology, 2017. **2**(4).
13. Orozco, G.A., P. Tanska, M.E. Mononen, K.S. Halonen, and R.K. Korhonen, *The effect of constitutive representations and structural constituents of ligaments on knee joint mechanics*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 2323-2323.
14. Julkunen, P., W. Wilson, H. Isaksson, J.S. Jurvelin, W. Herzog, and R.K. Korhonen, *A review of the combination of experimental measurements and fibril-reinforced modeling for investigation of articular cartilage and chondrocyte response to loading*. Computational and mathematical methods in medicine, 2013. **2013**: p. 326150-326150.
15. Hunter, D.J. and D.T. Felson, *Osteoarthritis*. BMJ (Clinical research ed.), 2006. **332**(7542): p. 639-642.

16. Michael, J.W.P., K.U. Schlüter-Brust, and P. Eysel, *The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee*. Deutsches Arzteblatt international, 2010. **107**(9): p. 152-162.
17. Rabenberg, M. *Arthrose*. 2013. 32.
18. Hackenbroch, M.H., *Arthrosen: Basiswissen zu Klinik, Diagnostik und Therapie; 44 Tabellen*. 2002: Thieme.
19. van Tunen, J.A.C., A. Dell'Isola, C. Juhl, J. Dekker, M. Steultjens, J.B. Thorlund, and H. Lund, *Association of malalignment, muscular dysfunction, proprioception, laxity and abnormal joint loading with tibiofemoral knee osteoarthritis - a systematic review and meta-analysis*. BMC musculoskeletal disorders, 2018. **19**(1): p. 273-273.
20. Scanzello, C.R. and S.R. Goldring, *The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis*. Bone, 2012. **51**(2): p. 249-257.
21. Lespasio, M.J., N.S. Piuizzi, M.E. Husni, G.F. Muschler, A. Guarino, and M.A. Mont, *Knee Osteoarthritis: A Primer*. The Permanente journal, 2017. **21**: p. 16-183.
22. Jones, G., *What's new in osteoarthritis pathogenesis?* Internal Medicine Journal, 2016. **46**(2): p. 229-236.
23. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthrosis*. Annals of the rheumatic diseases, 1957. **16**(4): p. 494-502.
24. AWMF online. *Langfassung der Leitlinie "Gonarthrose"*. 09.09.2020; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/033-004l_S2k_Gonarthrose_2018-01_1-verlaengert.pdf.
25. Belluzzi, E., H. El Hadi, M. Granzotto, M. Rossato, R. Ramonda, V. Macchi, R. De Caro, R. Vettor, and M. Favero, *Systemic and Local Adipose Tissue in Knee Osteoarthritis*. Journal of Cellular Physiology, 2016. **232**(8): p. 1971-1978.
26. Zhang, Y., Z. Lei, Y. Qi, T. Di, G. Li, W. Zhang, and W. Yan, *Adipose-derived stem cell sheet encapsulated construct of micro-porous decellularized cartilage debris and hydrogel for cartilage defect repair*. Medical Hypotheses, 2017. **109**: p. 111-113.
27. Scanzello, C.R., *Role of low-grade inflammation in osteoarthritis*. Current opinion in rheumatology, 2017. **29**(1): p. 79-85.
28. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2001. **3**(2): p. 107.
29. Shepard, J.B., J.-W. Jeong, N.J. Maihle, S. O'Brien, and C.N. Dealy, *Transient anabolic effects accompany epidermal growth factor receptor signal activation in articular cartilage in vivo*. Arthritis research & therapy, 2013. **15**(3): p. R60-R60.
30. Hoshiyama, Y., S. Otsuki, S. Oda, Y. Kurokawa, M. Nakajima, T. Jotoku, R. Tamura, Y. Okamoto, M.K. Lotz, and M. Neo, *Chondrocyte clusters adjacent to sites of cartilage degeneration have characteristics of progenitor cells*. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 2015. **33**(4): p. 548-555.
31. Rolauffs, B., M. Rothdiener, C. Bahrs, A. Badke, K. Weise, K.E. Kuettner, B. Kurz, M. Aurich, A.J. Grodzinsky, and W.K. Aicher, *Onset of preclinical osteoarthritis: The angular spatial organization permits early diagnosis*. Arthritis & Rheumatism, 2011. **63**(6): p. 1637-1647.
32. Danalache, M., *two-dimensional top-down view microscopy in human osteoarthritic cartilage with changes in the spatial chondrocyte organisation* 2019.
33. Danalache, M., K.R. Beutler, B. Rolauffs, J.M. Wolfgart, F.C. Bonnaire, S. Fischer, I. Greving, and U.K. Hofmann, *Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging*. Scientific reports, 2021. **11**(1): p. 9783-9783.

34. Filipowska, J., K.A. Tomaszewski, Ł. Niedźwiedzki, J.A. Walocha, and T. Niedźwiedzki, *The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning*. *Angiogenesis*, 2017. **20**(3): p. 291-302.
35. Hankenson, K.D., M. Dishowitz, C. Gray, and M. Schenker, *Angiogenesis in bone regeneration*. *Injury*, 2011. **42**(6): p. 556-561.
36. Ashraf, S. and D.A. Walsh, *Angiogenesis in osteoarthritis*. *Current Opinion in Rheumatology*, 2008. **20**(5).
37. Henrotin, Y., L. Pesesse, and C. Lambert, *Targeting the synovial angiogenesis as a novel treatment approach to osteoarthritis*. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2013. **6**(1): p. 20-34.
38. Bonnet, C.S. and D.A. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. *Rheumatology*, 2005. **44**(1): p. 7-16.
39. Wikipedia. *Vascular Endothelial Growth Factor --- Wikipedia; Die freie Enzyklopädie*. 2018; Available from: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Vascular_Endothelial_Growth_Factor&oldid=173681202.
40. Yuan, Q., L. Sun, J.-J. Li, and C.-H. An, *Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis*. *BMC musculoskeletal disorders*, 2014. **15**: p. 437-437.
41. Privratsky, J.R. and P.J. Newman, *PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity*. *Cell and tissue research*, 2014. **355**(3): p. 607-619.
42. Lertkiatmongkol, P., D. Liao, H. Mei, Y. Hu, and P.J. Newman, *Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)*. *Current opinion in hematology*, 2016. **23**(3): p. 253-259.
43. Wikipedia. *CD31 --- Wikipedia; Die freie Enzyklopädie*. 2017; Available from: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=CD31&oldid=171615608>.
44. Kim, H.J. and T. Kirsch, *Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization*. *The Journal of biological chemistry*, 2008. **283**(16): p. 10310-10317.
45. Mollenhauer, J., M.T. Mok, K.B. King, M. Gupta, S. Chubinskaya, H. Koepp, and A.A. Cole, *Expression of Anchorin CII (Cartilage Annexin V) in Human Young, Normal Adult, and Osteoarthritic Cartilage*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999. **47**(2): p. 209-220.
46. Rosenthal, A.K., C.M. Gohr, E. Mitton-Fitzgerald, R. Grewal, J. Ninomiya, C.B. Coyne, and W.T. Jackson, *Autophagy modulates articular cartilage vesicle formation in primary articular chondrocytes*. *The Journal of biological chemistry*, 2015. **290**(21): p. 13028-13038.
47. Rothwell, A. and G. Bentley, *Chondrocyte multiplication in osteoarthritic articular cartilage*. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 1973. **55**: p. 588-94.
48. Meachim, G. and D.H. Collins, *Cell counts of normal and osteoarthritic articular cartilage in relation to the uptake of sulphate (³⁵SO₄) in vitro*. *Annals of the rheumatic diseases*, 1962. **21**(1): p. 45-50.
49. Boehm, E.M., M.S. Goldenberg, and M.T. Washington, *The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication*. *The Enzymes*, 2016. **39**: p. 231-254.
50. Strzalka, W. and A. Ziemienowicz, *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation*. *Annals of botany*, 2011. **107**(7): p. 1127-1140.
51. Stodola, J.L. and P.M. Burgers, *Resolving individual steps of Okazaki-fragment maturation at a millisecond timescale*. *Nature structural & molecular biology*, 2016. **23**(5): p. 402-408.
52. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: From the known and the unknown*. *Journal of Cellular Physiology*, 2000. **182**(3): p. 311-322.

53. Dreier, R., *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*. Arthritis research & therapy, 2010. **12**(5): p. 216-216.
54. Wan, Y., W. Li, Z. Liao, M. Yan, X. Chen, and Z. Tang, *Selective MMP-13 Inhibitors: Promising Agents for the Therapy of Osteoarthritis*. Current Medicinal Chemistry, 2020. **27**(22): p. 3753-3769.
55. Wikipedia. *Kollagene* --- Wikipedia; Die freie Enzyklopädie. 2019; Available from: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Kollagene&oldid=186074127>.
56. Shen, G., *The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage*. Orthodontics & Craniofacial Research, 2005. **8**(1): p. 11-17.
57. Luckman, S.P., E. Rees, and A.P.L. Kwan, *Partial characterization of cell-type X collagen interactions*. The Biochemical journal, 2003. **372**(Pt 2): p. 485-493.
58. He, Y., T. Manon-Jensen, L. Arendt-Nielsen, K.K. Petersen, T. Christiansen, J. Samuels, S. Abramson, M.A. Karsdal, M. Attur, and A.C. Bay-Jensen, *Potential diagnostic value of a type X collagen neo-epitope biomarker for knee osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2019. **27**(4): p. 611-620.
59. van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg, *Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration?* Osteoarthritis and Cartilage, 2012. **20**(3): p. 223-232.
60. Aigner, T., E. Reichenberger, W. Bertling, T. Kirsch, H. Stöß, and K. von der Mark, *Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage*. Virchows Archiv B, 1993. **63**(1): p. 205.
61. Matsuo, M., K. Nishida, A. Yoshida, T. Murakami, and H. Inoue, *Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage*. Acta Med Okayama, 2001. **55**(6): p. 333-40.
62. Pfander, D., D. Körtje, G. Weseloh, and B. Swoboda, *Zellproliferation im humanen arthrotischen Gelenkknorpel*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2001. **139**(05): p. 375-381.
63. Pfander, D., D. Körtje, R. Zimmermann, G. Weseloh, T. Kirsch, M. Gesslein, T. Cramer, and B. Swoboda, *Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints*. Annals of the rheumatic diseases, 2001. **60**(11): p. 1070-1073.
64. Pufe, T., W. Petersen, B. Tillmann, and R. Mentlein, *The splice variants VEGF121 and VEGF189 of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor are expressed in osteoarthritic cartilage*. Arthritis & Rheumatism, 2001. **44**(5): p. 1082-1088.
65. Enomoto, H., I. Inoki, K. Komiyama, T. Shiomi, E. Ikeda, K.-i. Obata, H. Matsumoto, Y. Toyama, and Y. Okada, *Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Their Receptors Are Expressed in Human Osteoarthritic Cartilage*. The American Journal of Pathology, 2003. **162**(1): p. 171-181.
66. Rolaufts, B., J.M. Williams, M. Aurich, A.J. Grodzinsky, K.E. Kuettner, and A.A. Cole, *Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism, 2010. **62**(2): p. 489-498.
67. Von Der Mark, K., T. Kirsch, A. Nerlich, A. Kuss, G. Weseloh, K. Glückert, and H. Stöß, *Type x collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. indication of chondrocyte hypertrophy*. Arthritis & Rheumatism, 1992. **35**(7): p. 806-811.
68. Nah, H.-D., B. Swoboda, D.E. Birk, and T. Kirsch, *Type IIA procollagen: Expression in developing chicken limb cartilage and human osteoarthritic articular cartilage*. Developmental Dynamics, 2001. **220**(4): p. 307-322.
69. 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. Cucchiarini, H. Madry, B. Kurz, and B. Rolaufts, *Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2016. **24**(7): p. 1200-1209.
70. Kirsch, T., B. Swoboda, and H.D. Nah, *Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2000. **8**(4): p. 294-302.
 71. von der Mark, K. and J. Mollenhauer, *Annexin V interactions with collagen*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 1997. **53**(6): p. 539-545.
 72. Sharif, M., A. Whitehouse, P. Sharman, M. Perry, and M. Adams, *Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3*. *Arthritis & Rheumatism*, 2004. **50**(2): p. 507-515.
 73. Clements, K.M., Z.C. Bee, G.V. Crossingham, M.A. Adams, and M. Sharif, *How severe must repetitive loading be to kill chondrocytes in articular cartilage?* *Osteoarthritis and Cartilage*, 2001. **9**(5): p. 499-507.
 74. Zhou, J., Y. Wang, Y. Liu, H. Zeng, H. Xu, and F. Lian, *Adipose derived mesenchymal stem cells alleviated osteoarthritis and chondrocyte apoptosis through autophagy inducing*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019. **120**(2): p. 2198-2212.
 75. Musumeci, G., P. Castrogiovanni, F.M. Trovato, A.M. Weinberg, M.K. Al-Wasiyah, M.H. Alqahtani, and A. Mobasher, *Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis*. *International journal of molecular sciences*, 2015. **16**(9): p. 20560-20575.
 76. Lee, D., S.A. Long, J.H. Murray, J.L. Adams, M.E. Nuttall, D.P. Nadeau, K. Kikly, J.D. Winkler, C.-M. Sung, M.D. Ryan, M.A. Levy, P.M. Keller, and W.E. DeWolf, *Potent and Selective Nonpeptide Inhibitors of Caspases 3 and 7*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001. **44**(12): p. 2015-2026.
 77. Sun, X. and P.D. Kaufman, *Ki-67: more than a proliferation marker*. *Chromosoma*, 2018. **127**(2): p. 175-186.
 78. Pfander, D., B. Swoboda, and T. Kirsch, *Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes*. *The American journal of pathology*, 2001. **159**(5): p. 1777-1783.
 79. Nagaoka, A., N. Takizawa, R. Takeuchi, Y. Inaba, I. Saito, Y. Nagashima, T. Saito, and I. Aoki, *Possible involvement of peptidylprolyl isomerase Pin1 in rheumatoid arthritis*. *Pathology International*, 2011. **61**(2): p. 59-66.
 80. Zelzer, E. and B.R. Olsen, *Multiple Roles of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Skeletal Development, Growth, and Repair*, in *Current Topics in Developmental Biology*. 2004, Academic Press. p. 169-187.
 81. Nagai, T., M. Sato, M. Kobayashi, M. Yokoyama, Y. Tani, and J. Mochida, *Bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, inhibits osteoarthritis*. *Arthritis research & therapy*, 2014. **16**(5): p. 427-427.
 82. Mabey, T., S. Honsawek, N. Saetan, Y. Poovorawan, A. Tanavalee, and P. Yuktanandana, *Angiogenic cytokine expression profiles in plasma and synovial fluid of primary knee osteoarthritis*. *International Orthopaedics*, 2014. **38**(9): p. 1885-1892.
 83. Melinte, R., I. Jung, L. Georgescu, and S. Gurzu, *VEGF and CD31 expression in arthritic synovium and cartilage of human knee joints*. *Rom J Morphol Embryol*, 2012. **53**(4): p. 911-5.
 84. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-674.
 85. Duffy, M.J., N.C. Synnott, and J. Crown, *Mutant p53 as a target for cancer treatment*. *European Journal of Cancer*, 2017. **83**: p. 258-265.

86. Goel, H.L. and A.M. Mercurio, *VEGF targets the tumour cell*. Nature reviews. Cancer, 2013. **13**(12): p. 871-882.
87. Bagchi, S., R. Yuan, and E.G. Engleman, *Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2021. **16**(1): p. 223-249.
88. Martel-Pelletier, J., D.J. Welsch, and J.-P. Pelletier, *Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2001. **15**(5): p. 805-829.
89. Lee, Y.H. and S.-C. Bae, *Correlation between circulating VEGF levels and disease activity in rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2018. **77**(3): p. 240-248.
90. Dasgupta, B., T. Chew, A. deRoche, and W.A. Muller, *Blocking platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM) inhibits disease progression and prevents joint erosion in established collagen antibody-induced arthritis*. Experimental and molecular pathology, 2010. **88**(1): p. 210-215.

9 Anhang

Tabelle 15: Ergebnisse aus 3-mal wiederholter, photometrischer Messung der Standardwerte (in einer 96-Well Platte). Errechneter Mittelwert und der Nullwert.

Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Mittelwert	Nullwert
100	0,519	0,524	0,546	0,530	0,377
80	0,491	0,52	0,445	0,485	0,333
60	0,423	0,45	0,391	0,421	0,269
40	0,399	0,403	0,41	0,404	0,252
20	0,321	0,328	0,299	0,316	0,164
10	0,231	0,221	0,234	0,229	0,076
5	0,186	0,188	0,187	0,187	0,035
0	0,152	0,151	0,154	0,152	0,000

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädischen Klinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Ulf Krister Hofmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulf Krister Hofmann, Doktorvater und PhD MSc Marina Danalache, Betreuerin.

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

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. Ulf Krister Hofmann durch mich.

Die Abbildungen 1 und 2 wurden durch freundliche Genehmigung von Julius Michael Wolfgart zur Verfügung gestellt.

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

Tübingen, den 19.04.2022

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Besonders danken möchte ich apl. Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann, der diese Arbeit von Seiten der Orthopädischen Universitätsklinik ermöglicht und unterstützt hat. Vor allem danke ich PhD MSc Marina Danalache für die hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Auch möchte ich Rosa Riester meinen Dank aussprechen, die mich im Rahmen der Promotionszeit mit Rat, Anregungen, produktiven Gesprächen und lieben Worten begleitet hat.

Desweiteren möchte ich Dr. med. Isabel Kloos, Carl-Alexander Schönfeld und Julius Michael Wolfgart Danke sagen, die meine Arbeit durch ihre Unterstützungen und Bemühungen ebenfalls geprägt haben.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und Freunden für ihre Ermutigungen und guten Zusprüche während der Arbeit an dieser Dissertation.
