

Aus der
Orthopädischen Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen

**Stadienspezifische Charakterisierung der Angiogenese,
Apoptose, Inflammation sowie hypertrophen Differenzierung
im degenerierenden
Gelenkknorpel**

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

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

vorgelegt von

Grötzner, Lea Cathrine

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

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

2. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

3. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Ehnert

Tag der Disputation: 13.02.2024

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ANATOMIE DES HUMANEN KNIEGELENKS	1
1.2	DER HYALINE GELENKKNORPEL.....	2
1.2.1	<i>Aufbau der extrazellulären Matrix.....</i>	<i>3</i>
1.2.2	<i>Gliederung des Gelenkknorpels</i>	<i>4</i>
1.3	OSTEOARTHROSE	6
1.3.1	<i>Auswirkungen der Arthrose auf sämtliche Gelenkstrukturen</i>	<i>7</i>
1.3.2	<i>Veränderungen der Chondrozytenanordnung im Verlauf der Arthrose.....</i>	<i>9</i>
1.3.3	<i>Veränderungen auf molekularer Ebene.....</i>	<i>11</i>
1.3.3.1	Apoptose	11
1.3.3.2	Angiogenese	15
1.3.3.3	Inflammation	16
1.3.3.4	Differenzierung der Chondrozyten	18
1.4	DIAGNOSTIK DER OSTEOARTHROSE	20
1.5	THERAPIEMÖGLICHKEITEN DER OSTEOARTHROSE	21
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	22
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	MATERIAL.....	24
2.1.1	<i>Verwendete Reagenzien</i>	<i>24</i>
2.1.2	<i>Verwendete Enzyme</i>	<i>26</i>
2.1.3	<i>Verwendete ELISA Kits</i>	<i>26</i>
2.1.4	<i>Verwendete Antikörper</i>	<i>27</i>
2.1.5	<i>Verwendete Färbungen</i>	<i>29</i>
2.1.6	<i>Verwendete Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>29</i>
2.1.7	<i>Verwendete Geräte.....</i>	<i>32</i>
2.1.8	<i>Verwendete Software</i>	<i>34</i>
2.2	METHODEN	35
2.2.1	<i>Probengewinnung.....</i>	<i>35</i>
2.2.2	<i>Herstellung der Knorpeldiscs</i>	<i>35</i>
2.2.2.1	Knorpelaufbereitung	35
2.2.2.2	Färbung und Sortierung der Gewebeproben in verschiedene Stadien	36
2.2.3	<i>Immunfluoreszenzmikroskopie</i>	<i>37</i>
2.2.3.1	Herstellung von Kryotomschnitten.....	37
2.2.3.2	Immunfluoreszenz Färbung.....	37

2.2.3.3	Anfertigung einer Positivkontrolle für die Apoptosemarker	39
2.2.3.4	Mikroskopie der Präparate	40
2.2.4	<i>Quantitativer Proteinnachweis mittels ELISA</i>	40
2.2.4.1	Proteinisolation	40
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay	41
2.2.4.3	Durchführung der ELISAs	43
2.2.5	<i>Durchführung der Western Blots</i>	47
2.2.5.1	Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration	48
2.2.5.2	Herstellung der Gele	48
2.2.5.3	Vorbereitung der Proben und Start des Laufs	48
2.2.5.4	Blotting	49
2.2.5.5	Antikörperinkubation	50
2.2.5.6	Entwicklung	51
2.2.5.7	Gelbeladung zur Testung der Positivkontrolle	51
2.2.5.8	Gelbeladung zur Überprüfung der Apoptosemarker	52
3	ERGEBNISSE	54
3.1	DEMOGRAPHISCHE CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOLULATION	54
3.2	AUSWERTUNG DER APOPTOSEMARKER	55
3.2.1	<i>Überprüfung der Positivkontrolle im Western Blot</i>	55
3.2.2	<i>CASP3</i>	56
3.2.3	<i>CASP8</i>	58
3.2.4	<i>p53</i>	60
3.2.5	<i>Überprüfung der Antikörper gegen die Apoptosemarker</i>	61
3.3	AUSWERTUNG DER ANGIOGENESEMARKER	63
3.3.1	<i>VEGF</i>	63
3.3.2	<i>PECAM-1</i>	64
3.4	AUSWERTUNG DER INFLAMMATIONSMARKER	66
3.4.1	<i>Interleukin-1β</i>	66
3.4.2	<i>Interleukin-6</i>	68
3.5	AUSWERTUNG DES MARKERS DKK-1	70
3.6	AUSWERTUNG DES MARKERS FGF-23	72
3.7	AUSWERTUNG DER DIFFERENZIERUNGSMARKER	73
3.7.1	<i>OCN</i>	73
3.7.2	<i>OPN</i>	74
3.7.3	<i>Col10</i>	76
4	DISKUSSION	78

4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER STUDIE	78
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE IM HINBLICK AUF DIE ZELLULÄREN PROZESSE	78
4.2.1	<i>Apoptose</i>	79
4.2.2	<i>Angiogenese</i>	84
4.2.3	<i>Inflammation</i>	87
4.2.4	<i>Hypertrophe Differenzierung</i>	90
4.2.5	<i>DKK-1</i>	95
4.2.6	<i>FGF-23</i>	98
4.3	ZUSAMMENFASSUNG DER DISKUSSIONSERGEBNISSE	99
4.4	STUDIENLIMITIERENDE FAKTOREN.....	100
5	ZUSAMMENFASSUNG	102
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	104
7	TABELLENVERZEICHNIS	109
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	110
9	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	121
10	DANKSAGUNG	122

1 Einleitung

1.1 Anatomie des humanen Kniegelenks

Das humane Kniegelenk (*Articulatio genus*) (Abbildung 1) ermöglicht die Artikulation des distalen Femur mit der proximalen Tibia und der Patella in insgesamt zwei Gelenken: dem Femorotibialgelenk und dem Femoropatellargelenk [1]. Das Femorotibialgelenk (*Articulatio femorotibialis*) wird von der lateralen und medialen Femurkondyle (*Condylus medialis et lateralis femoris*) zusammen mit dem Tibiaplateau gebildet [2]. Aus funktioneller Perspektive ist es als Drehscharniergelenk (*Trochoginglymus*) zu bezeichnen, da es neben der, für ein einfaches Scharniergelenk üblichen, Extension und Flexion zusätzlich eine leichte Rotation erlaubt [3]. Im Femoropatellargelenk (*Articulatio femoropatellaris*) artikuliert die Gelenkfläche des Femurs (*Facies patellaris femoris*) mit der Dorsalseite der Patella (*Facies articularis patellae*). Die beiden Gelenke bilden eine funktionelle Einheit und werden von einer gemeinsamen Gelenkkapsel umschlossen [2].

Das Kniegelenk wird von einem komplex aufgebauten Bandapparat gesichert, zu dem beide Menisci, ventrale und dorsale Bänder, Kollateral- sowie Kreuzbänder gezählt werden. Die C-förmigen Menisci (*Meniscus medialis et Meniscus lateralis*) liegen dem Tibiaplateau auf und bilden zu den Femurkondylen kongruente Gelenkpfannen. Dadurch ermöglichen sie eine gleichmäßige Druckübertragung vom Femur auf die Tibia. Die beiden Kollateralbänder (*Ligamentum collaterale tibiale et Ligamentum collaterale fibulare*) verlaufen zwischen Femur und Tibia und stabilisieren das Gelenk medial und lateral. Sie verhindern ein Aufklappen des Kniegelenks bei Varus- oder Valgusstress und begrenzen die Rotation. Die beiden Kreuzbänder (*Ligamentum cruciatum anterius et Ligamentum cruciatum posterius*) liegen intrakapsulär. Das vordere Kreuzband zieht von der Innenseite der lateralen Femurkondyle zum vorderen Anteil der Tibia, während das hintere Kreuzband zwischen der Innenseite der medialen Femurkondyle und der hinteren Tibia gespannt ist. Die Relevanz der Kreuzbänder liegt überwiegend in der Stabilisierung des Kniegelenks in der Sagittalebene [2, 4].

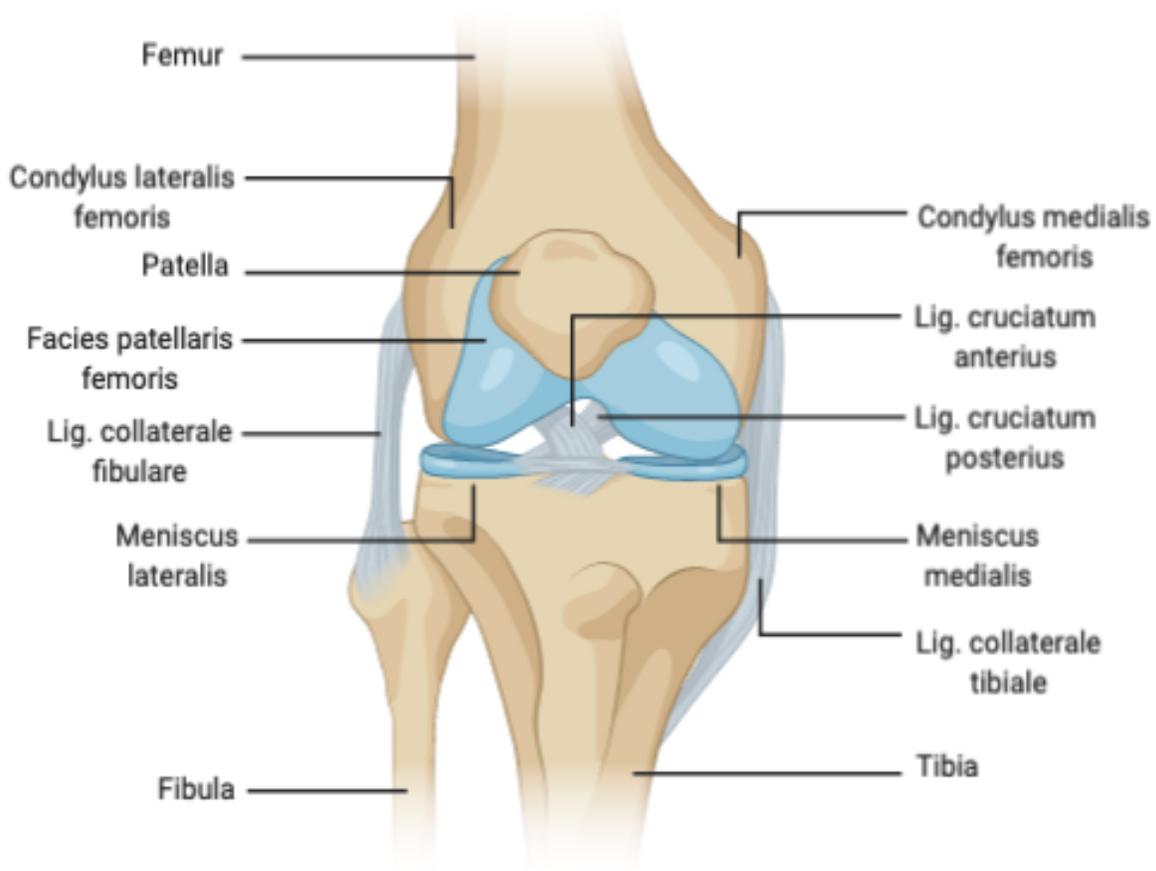


Abbildung 1: Das humane Kniegelenk. Dargestellt sind die wichtigsten anatomischen Strukturen des Kniegelenks. Ansicht von ventral. Ligamentum patellae zur besseren Übersicht entfernt. (Eigene Abbildung, erstellt in BioRender.com)

1.2 Der hyaline Gelenkknorpel

Hyaliner Gelenkknorpel (Abbildung 2) ist hochspezialisiertes Gewebe, das in diarthrotischen Gelenken vorkommt [5]. Er kleidet die Gelenkflächen aus und gestattet durch seine glatte Oberfläche eine gleichmäßige Kraftübertragung, sowie freie Bewegung des entsprechenden Gelenks bei minimaler Reibung [6]. Der hyaline Gelenkknorpel besteht aus zwei Hauptkomponenten: den Chondrozyten, welche die einzige physiologisch im Knorpel vorkommende Zellart darstellen, und der extrazellulären Matrix (EZM) [7]. Die Chondrozyten stammen von mesenchymalen Stammzellen ab und machen mit gerade einmal 2 % nur einen sehr geringen Anteil des gesamten Knorpelvolumen aus [8]. Sie sorgen für die Produktion und Aufrechterhaltung der EZM, die wiederum ursächlich für die biomechanischen und bioelektrischen Eigenschaften des Gelenkknorpels ist [9] und etwa 95 % des Gesamtvolumen des Knorpels stellt [8].

Der hyaline Knorpel ist avaskulär, zellarm und enthält weder Nerven noch Lymphgefäße [10]. Um, insbesondere trotz fehlender Blutgefäße, einen ausreichenden Metabolismus der Chondrozyten zu gewährleisten, erfolgt die Bereitstellung von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren per Diffusion aus der Synovialflüssigkeit [11]. Zudem besitzt Knorpelgewebe stark limitierte intrinsische Heilungskapazitäten, weshalb die Integrität der spezifischen Architektur des Knorpels und der Zusammensetzung der EZM wesentlich für einen Erhalt der Gelenkfunktion ist [12].

1.2.1 Aufbau der extrazellulären Matrix

Die EZM lässt sich, entsprechend ihrer räumlichen Distanz zu den Chondrozyten, in drei verschiedene Regionen einteilen (Abbildung 2B). Der Zelle direkt anliegend und diese vollständig umgebend befindet sich die perizelluläre Matrix (PZM). Ihr liegt die territoriale Matrix (TeM) an, der sich die peripher gelegene interterritoriale Matrix (ITM) anschließt. Die Einheit, aus einem Chondrozyten und der ihn umgebenden PZM, wird als Chondron bezeichnet [13]. Die EZM (Abbildung 2C) besteht aus Wasser und Makromolekülen, unter denen Kollagene, Proteoglykane, Glykosaminoglykane (GAG), insbesondere Hyaluronsäure, dominieren. Die verschiedenen Bestandteile der EZM bestimmen wesentlich die biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Gelenkknorpels mit [14]. Das Kollagennetzwerk ermöglicht in Kombination mit dem hohen Anteil an Proteoglykanen, ein osmotisches Ab- und Anschwellen des Knorpels unter Be- und Entlastung und damit die hohe Elastizität des Gelenkknorpels [14].

Unter den verschiedenen Kollagenarten im hyalinen Gelenkknorpel überwiegt Kollagen II, aber in geringeren Mengen ist auch ein Vorkommen von Kollagen I, IV, V, VI, IX, und XI physiologisch. Kollagene bestehen aus je drei Polypeptidketten, die einen hohen Anteil an den Aminosäuren Prolin und Glycin aufweisen [5]. Die drei Ketten winden sich umeinander und bilden so das Tropokollagen, eine Triple-Helix, das durch Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxyprolinen stabilisiert wird. Durch Quervernetzung mehrerer Tropokollagene entstehen die Kollagenfibrillen [5].

Proteoglykane tragen mit 12 % erheblich zum Gesamtgewicht des Knorpels bei [8]. Das mengenmäßig bedeutendste Proteoglykan des Knorpels heißt Aggrecan. Es besteht es aus einem zentralen Proteinfilament, sowie Seitenketten aus sulfatierten Glykosaminoglykanen (GAG), die kovalent an das Zentralprotein gebunden sind [15]. Im

hyalinen Gelenkknorpel kann Aggrecan über Verbindungsproteine (VP) nichtkovalente Bindungen mit Hyaluronsäure (HS) eingehen und so große Aggregate bilden [16]. Die wichtigsten Glykosaminoglykane der Seitenketten sind Chondroitinsulfat und Keratinsulfat, die aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten mit hohem Sulfatanteil aufgebaut sind [17]. Die vielen negativen Ladungen der Sulfate in den GAG-Seitenketten sind für die Druckelastizität des Gelenkknorpels von Bedeutung, da sie eine hohe intrinsische, reversible Wasserbindungskapazität besitzen [16]. Wasser wird durch osmotische Kräfte angezogen, sodass der Knorpel anschwillt, während zugleich eine maximale Expansion durch das zugfeste Netzwerk an Kollagenfasern verhindert wird [15]. Wird der Knorpel durch eine Druckbelastung komprimiert, so entweicht ein Teil des Wassers aus dem Gewebe und die EZM wird verdichtet [5]. Hierdurch kommt es zu einer Annäherung der negativen Ladungen der Seitenketten [18]. Mow et al. beschreiben, wie diese zunehmende elektrochemische Abstoßung die maximal mögliche Kompression beschränkt, sodass sich ein neues Gleichgewicht einstellt. Nach Entlastung strömt das Wasser zurück in den Knorpel, der sich dadurch wieder ausdehnt und seine ursprüngliche Form annimmt. Auf diese Art und Weise können Stöße effektiv abgefedert werden, was die Belastung des Knochens reduziert [19].

1.2.2 Gliederung des Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein sehr heterogenes Gewebe, innerhalb dessen sich vier Zonen, je nach Entfernung zum Gelenkspalt, klassifizieren lassen (Abbildung 2A). Direkt an der Gelenkoberfläche liegt die Superfizialzone, gefolgt von der intermediären, darauffolgend der radiären und zuletzt der mineralisierten Zone. Jede dieser Zonen weist eine charakteristische Zusammensetzung der EZM, sowie ein spezifisches phänotypisches Aussehen und Expressionsmuster der Chondrozyten auf [20].

In der superfiziellen Zone sind überwiegend flache Chondrozyten lokalisiert, sowie ein dichtes Netz an Kollagenfasern, die einen zur Gelenkfläche parallelen Verlauf aufweisen [5]. Zwischen den Bündeln an Kollagen II findet man hier auch Kollagen IX, was die Widerstandskraft gegenüber Scherkräften verbessert [8]. Da die Superfizienschicht aufgrund ihrer besonderen Architektur besonders resistent bezüglich Scher- und Zugkräften ist, ist ihre Integrität von besonderer Bedeutung, um die darunterliegenden Knorpelschichten zu schützen. Die sich anschließende Zone wird als

Intermediärzone bezeichnet. Die hier lokalisierten Chondrozyten haben eine rundliche Form und die Kollagenfasern sind schräg angeordnet, da in dieser Zone der Übergang von der Horizontalen in die Vertikale stattfindet [5]. In der radiären Zone, auch tiefe Zone genannt, befinden sich vergrößerte bzw. hypertrophe Chondrozyten, angeordnet in vertikalen Säulen [21]. Die Kollagenfasern verlaufen senkrecht in Richtung des subchondralen Knochens, weshalb diese Zone den größten Beitrag zur Resistenz des Knorpels gegenüber starken Kompressionen leistet [5]. Die sogenannte Tidemark trennt die Radiärzone von der mineralisierten Zone, welche der Verankerung der Kollagenfibrillen im subchondralen Knochen dient [5].

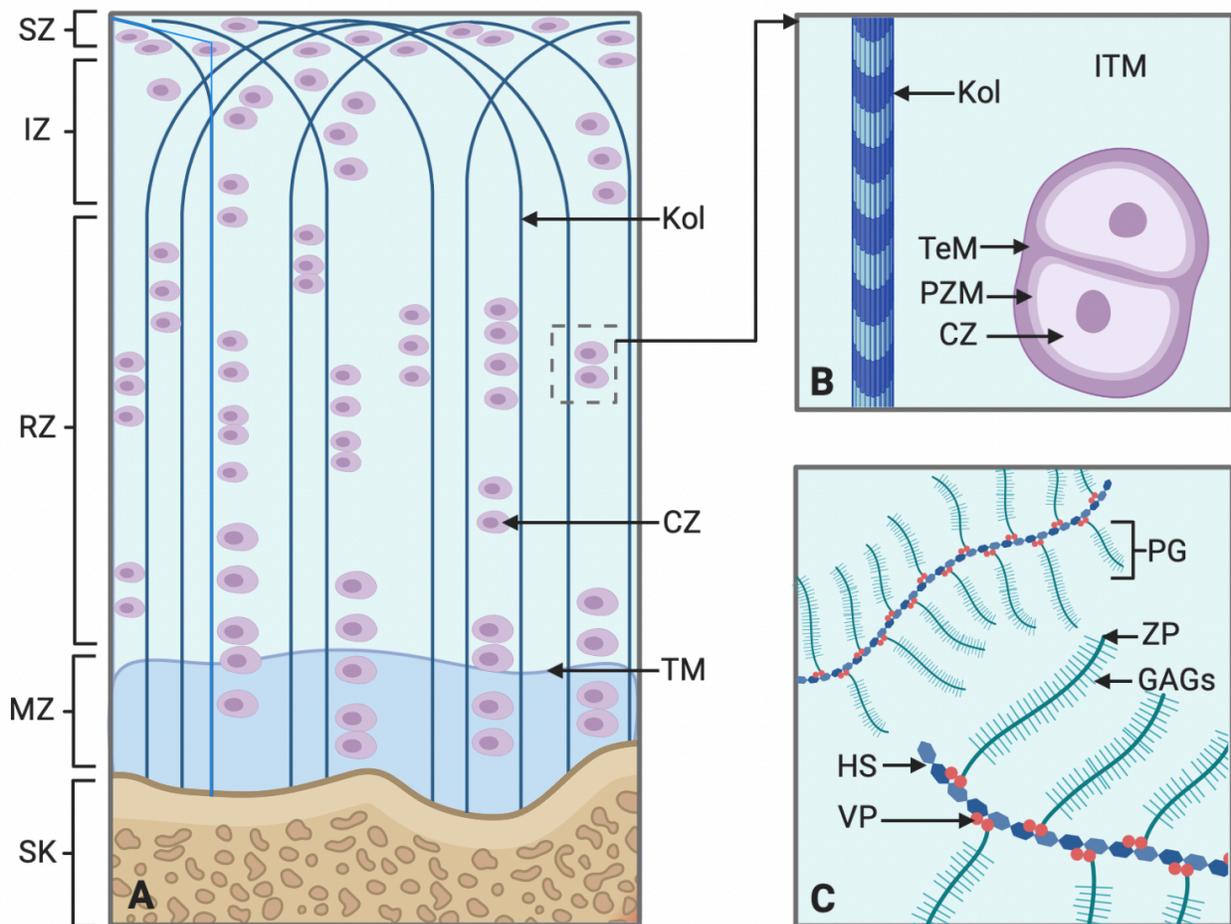


Abbildung 2: Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels. (A) Schematischer Querschnitt durch den Knorpel mit Untergliederung in Zonen: Superficialzone (SZ), Intermediärzone (IZ), Radiärzone (RZ), Mineralisierte Zone (MZ), Subchondraler Knochen (SK), Kollagen Typ II (Kol), Chondrozyt (CZ), Tidemark (TM). **(B)** Unterteilung der extrazellulären Matrix (EZM): Perizelluläre Matrix (PZM), Territoriale Matrix (TeM), Interterritoriale Matrix (ITM) **(C)** Aufbau der Proteoglykan-Aggregate: Hyaluronsäure (HS), Verbindungsprotein (VP), Zentralprotein (ZP), Glykosaminoglykane (GAGs), Aggrecan (PG). (Eigene Abbildung, erstellt in BioRender.com)

1.3 Osteoarthrose

Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes bezeichnet Arthrose als weltweit häufigste Erkrankung des erwachsenen Menschen und gibt das Lebenszeitrisko einer Erkrankung in Deutschland mit 17,9 % für Männer und 27,1 % für Frauen an (Stand 2010) [22]. An anderer Stelle wird das Lebenszeitrisko, an einer Gonarthrose zu erkranken mit 40 % für Männer und 47 % für Frauen angegeben, wobei die Zahlen für stark Übergewichtige deutlich höher liegen [23].

Litwic et al. beschreiben Osteoarthrose (OA) als eine degenerative Gelenkerkrankung, von der nicht nur der hyaline Gelenkknorpel, sondern auch benachbartes Gewebe betroffen ist. In der Regel zeigt sich ein langsam fortschreitender Krankheitsverlauf mit zunehmender Schädigung des Gelenks [24]. Das Resultat ist letztendlich eine ausgeprägter Gewebsdestruktion, die sich klinisch durch Immobilität, Verlust der Gelenkfunktion und starke Schmerzen des Individuums manifestiert [24, 25]. Besonders betroffen sind oft diejenigen Gelenke, die besonders viel Gewicht zu tragen haben, wie beispielsweise Knie- und Hüftgelenk. Chirurgische Interventionen in diesen Bereichen sind deshalb auffallend häufig [24]. Nicht unwesentlich ist, dass PatientInnen oft nicht nur physische Symptome zeigen, sondern auch mit enormen psychischen Belastungen zu kämpfen haben [26]. Hinzu kommt die zunehmende sozioökonomische Herausforderung, mit der die Gesellschaft und das Gesundheitssystem konfrontiert werden [27]. Ursächlich hierfür ist, dass OA eine Krankheit des alternden Menschen ist, weshalb die Prävalenz aufgrund des demografischen Wandels stetig steigt [28]. Auch der stetige Anstieg des Anteils stark Übergewichtiger an der Gesamtbevölkerung trägt zur wachsenden Prävalenz bei [23].

Es gibt verschiedene Ansätze, das Krankheitsbild der OA zu definieren. Dabei können radiologische oder klinische Aspekte, sowie eine subjektive Bewertung der Symptome im Fokus stehen [24]. Bemerkenswert ist, dass verschiedene Definitionen nicht unbedingt miteinander korrelieren. So können Patientinnen und Patienten mit ausgeprägten radiologischen Anzeichen einer OA asymptomatisch oder Patientinnen und Patienten mit starker subjektiver Belastung radiologisch unauffällig sein [29].

Eine ganze Reihe von Risikofaktoren können bei der Entwicklung einer klinisch manifesten Arthrose eine Rolle spielen, wobei Faktoren auf persönlicher Ebene von

solchen auf Ebene des Gelenks zu unterscheiden sind. Im Bereich persönlicher Risikofaktoren wurde insbesondere für Übergewicht [30] und fortgeschrittenes Alter [31] ein signifikant erhöhtes Risiko einer Erkrankung nachgewiesen. Darüber hinaus ist auch ein Zusammenhang mit genetischen Prädispositionen [32], weiblichem Geschlecht [33], Ernährung [34], Ethnie und Knochendichte [35] beschrieben worden. Auf Ebene des Gelenks können Muskelschwächen, insbesondere der Knieextensoren [36], Traumata [37], besondere Gelenkformen oder Achsenfehlstellungen [35], sowie die extremen Belastungen mancher Sportaktivitäten [38] negativen Einfluss auf die Entwicklung einer OA haben.

1.3.1 Auswirkungen der Arthrose auf sämtliche Gelenkstrukturen

Man unterscheidet im Allgemeinen eine primäre von einer sekundären Form der OA. Eine primäre Arthrose ist idiopathisch und tritt in zuvor gesunden Gelenken auf, ohne dass prädisponierende Faktoren oder ein auslösendes Ereignis erkennbar sind [39]. Als sekundäre Arthrose wird eine Gelenksdegeneration bezeichnet, die durch übermäßige mechanische Belastung, Traumata oder pathologische Knorpelanatomie, beispielsweise im Rahmen anderer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, verursacht werden [40].

Während OA früher als eine alleinige Erkrankung des Gelenkknorpels angesehen wurde, herrscht heute Einigkeit darüber, dass es sich sowohl bei der primären als auch bei der sekundären Arthrose um eine Erkrankung des gesamten Gelenks handelt [27]. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die verschiedenen Gewebearten auf zellulärer Ebene eng miteinander kommunizieren [41]. Von den holistischen Auswirkungen der OA auf das Gelenk (Abbildung 3) sind die Synovialis, die Gelenkkapsel, die Ligamente, die periartikuläre Muskulatur sowie der subchondrale Knochen betroffen. [24, 42]. Eine Inflammation der Synovialis kann durch Debris des degenerierten Knorpels und Knochens oder durch lösliche Makromoleküle, die aus der Knorpelmatrix in die Synovialflüssigkeit gelangen, ausgelöst werden [43]. Die daraus resultierende Synovialitis geht mit einer charakteristischen Hyperplasie der Synovialis sowie einer Lymphozyteninfiltration einher [44]. Zudem beginnen die Synovialzellen mit der Produktion proinflammatorischer Zytokine, was wiederum zu einer beschleunigten Zerstörung der Knorpelmatrix führt [45]. Erste Veränderungen der Synovialis können

sogar schon auftreten, bevor die ersten Anzeichen einer Knorpel Degeneration sichtbar werden [46]. Auch die Schwächung und Degeneration der Ligamente, insbesondere jener mit intraartikulärer Lage, scheint zumindest teilweise auf eine Inflammation des Gelenks zurückführbar [47]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass OA häufig mit einer signifikanten Schwächung der periartikulären Muskulatur einhergeht, was wiederum zu verstärkten Schmerzen und Einschränkungen führen kann [48]. Neben dem hyalinen Knorpel weist der subchondrale Knochen die eindeutigsten Veränderungen auf. Physiologisch findet im Knochen ein dauerhafter Umbau statt. Der Knochenabbau durch Osteoklasten sowie der Aufbau durch Osteoblasten halten sich hierbei die Waage. Dadurch besteht die Möglichkeit, Schäden zu reparieren oder die Knochenarchitektur an veränderte Belastung anzupassen, ohne dass sich die Gesamtmasse verändert [49]. Im Rahmen der OA kommt es jedoch zu diversen Veränderungen des subchondralen Knochens. Hierzu gehören eine progressive Dickenzunahme der subchondralen Knochenplatte, Veränderungen der Trabekelstruktur, Entstehung von Knochenzysten, Verschmälerung des Gelenkspalts sowie Osteophytenbildung [42, 50].

Für den Erhalt der Integrität des Gelenkknorpels und damit auch sämtlicher mechanischer Funktionen sind die Chondrozyten maßgeblich. Sie synthetisieren einerseits die kollagen- und proteoglykanreiche EZM und andererseits eine Reihe von anabolen und katabolen Faktoren, welche die Homöostase beeinflussen [51, 52]. In gesundem Knorpel findet ein Umsatz der extrazellulären Matrix durch die Chondrozyten nur in sehr beschränktem Ausmaß statt [41]. Dies ändert sich im Verlauf der Arthrose. Mit fortschreitender OA zeigt sich ein verändertes Expressionsmuster der Chondrozyten, die vermehrt Enzyme produzieren, welche die EZM abbauen [51]. Anfangs kann die gesteigerte Depletion der EZM ausgeglichen werden, indem gleichzeitig die Neusynthese der EZM hochgefahren wird. Allerdings besitzt die neue EZM eine veränderte Zusammensetzung im Vergleich zur EZM des gesunden Knorpels [53]. Mit Progression der OA kann der Matrixverlust nicht mehr durch gesteigerte Synthese kompensiert werden, wodurch es zu einer absoluten Abnahme der Knorpelmasse kommt. Insbesondere ein Verlust der, für die biomechanischen Eigenschaften des Knorpels besonders relevanten, Proteoglykane und Kollagen II kann beobachtet werden [54]. Zudem sorgt eine vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren für eine Inflammation und die Chondrozyten durchlaufen einen Prozess, der in einer hypertrophen

Dedifferenzierung mündet [51]. Aus diesen Prozessen resultiert im weiteren Verlauf der Erkrankung eine zunehmende Knorpelerosion. Die glatte Oberfläche, die eine reibungslose Bewegung ermöglicht geht verloren. Es treten vermehrt Risse und Fissuren in der Gelenkoberfläche auf, was bei ausgeprägtem Knorpelverlust zuletzt sogar in einer Freilegung des subchondralen Knochen enden kann [55].

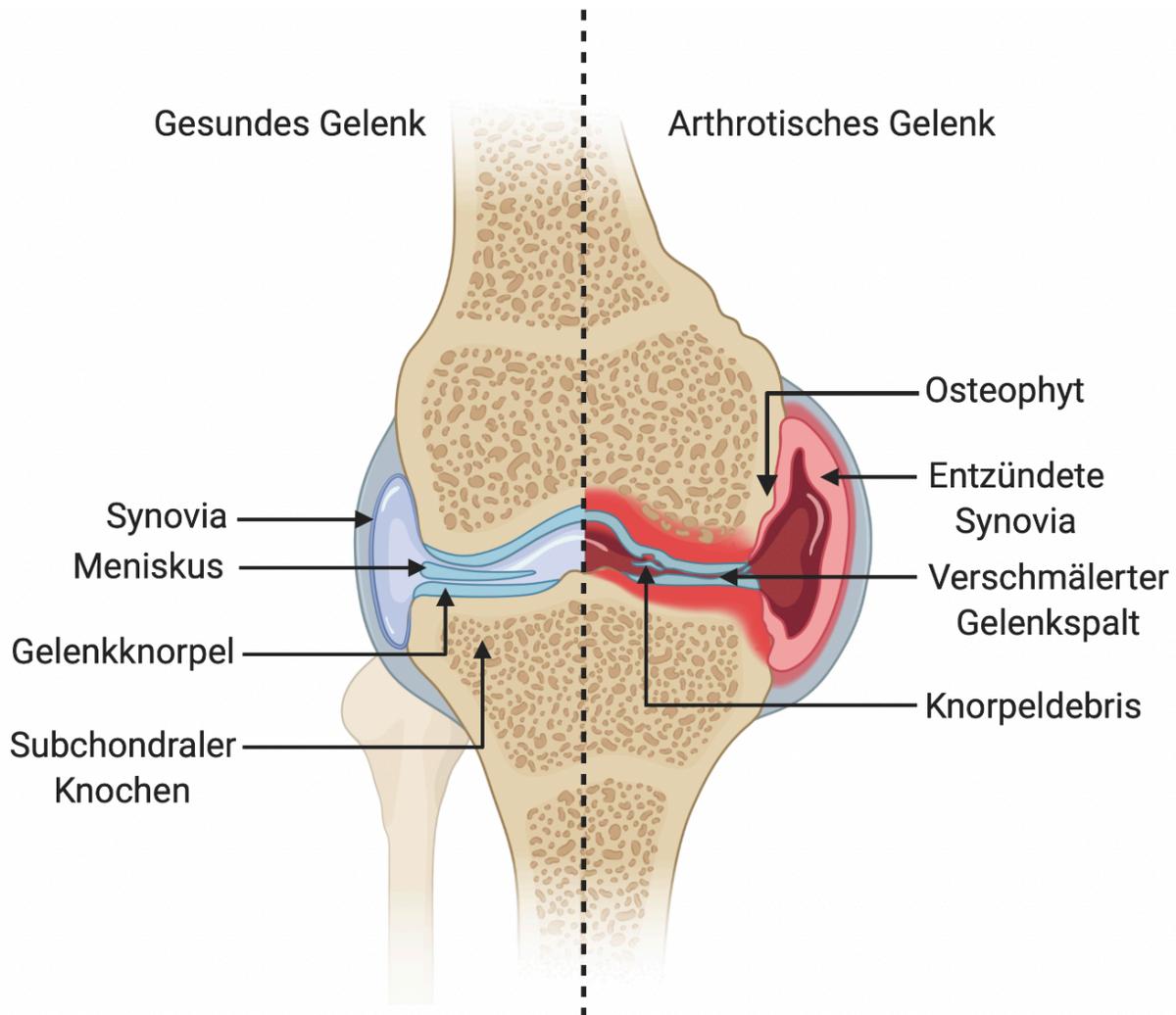


Abbildung 3: Synovialis des Gelenks im Rahmen der Arthrose. Schematische Darstellung eines gesunden (links) und eines arthrotischen Kniegelenks (rechts) im Frontalschnitt. (Eigene Abbildung, erstellt in BioRender.com)

1.3.2 Veränderungen der Chondrozytenanordnung im Verlauf der Arthrose

Eine fortschreitende OA geht auch mit Knorpelveränderungen auf zellulärer Ebene einher, wobei insbesondere eine veränderte räumliche Anordnung der Chondrozyten (Abbildung 4) imponiert [56]. Im Knorpel der großen Gelenke des menschlichen Körpers, wie beispielsweise Schulter, Ellbogen, Knie und Sprunggelenk, können Chondrozyten in

verschiedenen Formationen vorliegen, die für das jeweilige Gelenk charakteristisch sind [57]. Welche Anordnung vorherrscht, wird insbesondere durch die einwirkenden biomechanischen Kräfte beeinflusst [58]. Physiologisch sind im Kniegelenk perlschnurartig angeordnete einzelne Reihen an Chondrozyten (*Strings*), welche das an menschlichen Femurkondylen überwiegende Muster darstellen. Mit beginnender OA kann zunächst eine Neuordnung der *Strings* zu paarigen Reihen (*Double Strings*) beobachtet werden [59]. Diesem Prozess folgt ein zunehmendes Auftreten von kleinen Zellhaufen (*Small Cluster*) und mit weiterer Progression der Arthrose auch von großen Zellhaufen (*Big Cluster*) [60]. In endgradig degradiertem Knorpelgewebe findet sich zudem ein diffuses Zellmuster (*Diffuse*), welches sich keiner der anderen Anordnungen zuordnen lässt [56]. Teilweise wird die These vertreten, dass die *Small* und *Big Cluster* durch eine Proliferation der Chondrozyten entstehen [61]. Dafür spricht auch, dass Chondrozyten in Clustern aus degenerativ verändertem Knorpel nachweislich immunopositiv für die Proliferationsmarker PCNA und Ki-67 sind [62]. Neben struktureller Relevanz hat die Unterteilung des Knorpels in Chondrozytenmuster auch eine funktionelle Bedeutung. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass eine Knorpelregion mit Progression der Muster zunehmend an Steifigkeit verliert [56]. Da erste Änderungen der Chondrozytenmuster einer Gewebsdestruktion und klinischen Manifestation vorangehen, wird eine Analyse solcher Muster als frühdiagnostisches Mittel zur Erkennung einer präklinischen OA diskutiert [25].

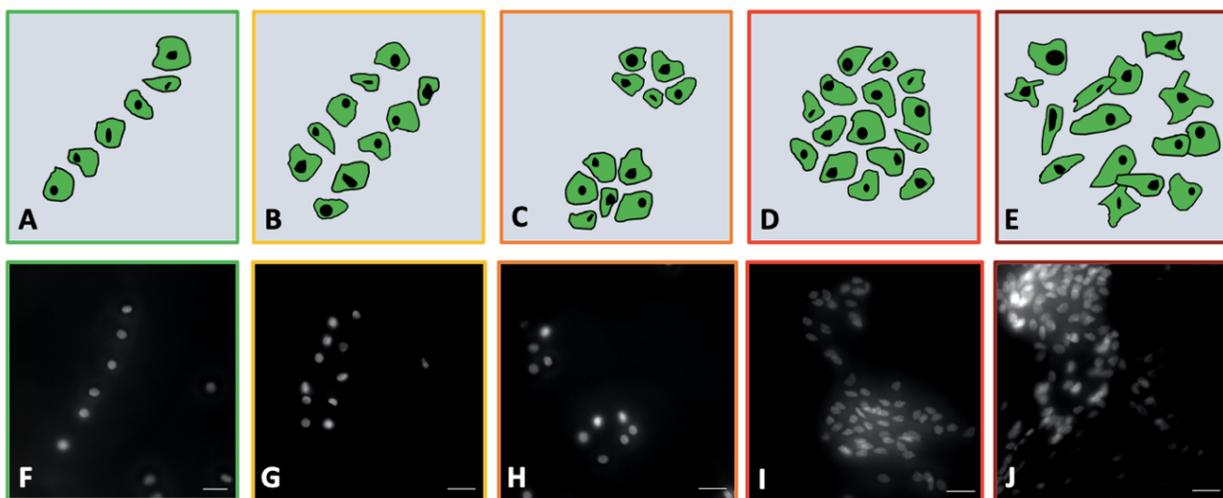


Abbildung 4: Chondrozytenanordnung im Gelenkknorpel. Schematische (A-E) und mikroskopische (F-J) Darstellung der Änderung der Chondrozytenanordnung während der Progression einer OA. String (A, F), Double String (B, G), Small Cluster (C, H), Big Cluster (D, I) und Diffuse (E, J). Zellkerne (weiß) angefärbt mit DAPI. Der Maßstab (unten re.) entspricht 20 µm. Eigene Abbildungen.

1.3.3 Veränderungen auf molekularer Ebene

Entgegen der früher verbreiteten Ansicht, OA könne durch Abnutzungserscheinungen hinreichend erklärt werden, geht man heute davon aus, dass an der Initiation und Progression der Krankheit verschiedene Zelltypen und Signalwege in einem komplexen Gesamtprozess interagieren [63]. Die genauen molekularen Mechanismen die an der Pathogenese der OA und der damit einhergehenden veränderten Chondrozytenmuster beteiligt sind, sind bisher jedoch allenfalls unvollständig verstanden [64].

Klar ist, dass diese Prozesse in einem zunehmenden Verlust der Integrität des Gelenkknorpels münden, hervorgerufen von einem Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Faktoren. Das Gleichgewicht ist hierbei zu Gunsten des Katabolismus verschoben [65]. Bekannt ist auch, dass auf molekularer Ebene ein zunehmender Abbau der EZM, sowie vermehrte Hypertrophie, Proliferation und Apoptose der Chondrozyten, zentrale Mechanismen sind [66-68]. Eine Relevanz wird aber auch den Prozessen der Osteogenese und der Neoangiogenese zugeschrieben [66]. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Ausschüttung von Inflammation begünstigenden Faktoren nachgewiesen [41].

Im Rahmen dieser Arbeit werden Biomarker aus dem Bereich der Apoptose, Inflammation sowie Angiogenese sowie Dedifferenzierung der Chondrozyten näher untersucht, weshalb diese Prozesse und ihre beteiligten Signalwege im Folgenden genauer erklärt werden. Der Fokus wird hierbei auf jene Marker gelegt, die auch im experimentellen Anteil betrachtet wurden, da eine vollständige Beschreibung sämtlicher Prozesse mit allen beteiligten Molekülen aufgrund des Umfangs nicht möglich ist.

1.3.3.1 Apoptose

Es wurde beschrieben, dass hyaliner Gelenkknorpel im Endstadium einer Arthrose hypozellulär ist und sich vermehrt leere Lakunen beobachten lassen, was apoptotische Vorgänge als Teil des Arthroseprozesses nahe legt [69]. Darüber hinaus wurde die zentrale Rolle der Apoptose am Krankheitsprozess der Arthrose bei in vivo und in vitro Versuchen nachgewiesen [70].

Wie Susan Elmore 2007 beschreibt, sind zwei Mechanismen der Apoptose bzw. des programmierten Zelltodes zu unterscheiden: Ein extrinsischer und ein intrinsischer Signalweg. Im Rahmen des extrinsischen Signalweges wird Apoptose durch Signale außerhalb der Zelle über sogenannte Todesrezeptoren verursacht, während beim

intrinsischen bzw. mitochondrialen Signalweg der Auslöser in der Zelle selbst liegt. Beide Mechanismen konvergieren, haben also eine gemeinsame Schlussstrecke, an deren Ende die Degradierung des Zytoskeletts, der Kernproteine und der DNA, sowie letzten Endes die Bildung von Apoptosekörperchen und deren Phagozytose stehen [71].

Im extrinsischen Signalweg übernehmen die Todesrezeptoren eine Schlüsselrolle. Sie gehören zur Familie der TNF Rezeptoren (tumor necrosis factor receptor), die sich durch den Besitz zytoplasmatischer Todesdomänen (death domains, DD) auszeichnen [69]. Wichtige Rezeptoren aus dieser Familie sind bspw. FasR (fatty acid synthetase receptor) und TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) [72]. Aktiviert werden können diese Rezeptoren durch sich strukturell ähnelnde Moleküle aus der TNF-Familie, wobei FasL (Fas-Ligand) und TNF- α (tumor necrosis factor alpha) von besonderer Bedeutung sind [69]. Binden diese Liganden an ihre zugehörigen Rezeptoren kommt es zur Rekrutierung der Adapterproteine FADD (Fas-associated protein with death domain), die über eigene Todesdomänen mit den Domänen der Rezeptoren interagieren können [71]. Hierdurch wird die Anlagerung der Initiatorcaspase Procaspase-8 ermöglicht, welche anschließend autokatalytisch zu Caspase-8 aktiviert wird. Der Komplex aus Rezeptor, Adapterproteinen und Procaspase-8 wird auch als DISC (death inducing signaling complex) bezeichnet [69, 71, 73].

Caspasen (cysteiny aspartate specific protease) gehören zu den Schlüsselmolekülen des programmierten Zelltodes. Sie werden als Zymogene synthetisiert und müssen bei Bedarf erst noch proteolytisch aktiviert werden [69]. In Säugetieren konnten bisher 14 verschiedene Caspasen identifiziert werden, wobei man zwischen Initiatorcaspasen (Caspase 2, 8, 9 und 10), Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) sowie inflammatorischen Caspasen (Caspase 1, 4, 5, 11, 12 und 13) unterscheidet [74]. Die aktivierte Initiatorcaspase ist in der Lage bestimmte Effektorcaspasen, insbesondere Caspase-3, zu aktivieren [75]. Damit beginnt die Endstrecke, die dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg gemein ist.

Der intrinsische Apoptosemechanismus wird durch intrazelluläre Signale ausgelöst. Dabei kann es sich entweder um die Abwesenheit antiapoptotischer und protektiver Faktoren wie bspw. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone handeln oder um vermehrtes Auftreten zellschädigender Faktoren wie Strahlung, Toxine, Radikale, extreme Temperaturen, Hypoxie und virale Infektionen [71, 76]. Die intrinsischen Stimuli

verursachen Veränderungen der Mitochondrienmembran. Normalerweise wird die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran durch proapoptotische und antiapoptotische Proteine der Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) Familie reguliert, die sich im Gleichgewicht befinden. Intrinsische Apoptosesignale können dieses empfindliche Gleichgewicht stören, indem sie zu einer Aktivierung der proapoptotischen Proteine Bax (BCL2-associated X protein), Bak (BCL2 antagonist killer) und Bid (BH3 interacting domain death agonist) führen [72, 77]. Dies resultiert in einer Permeabilitätssteigerung, die es zytotoxischen Proteinen ermöglicht, aus dem Intermembranraum in das Zytosol zu gelangen [78]. Zu diesen Proteinen gehören Cytochrom c, Smac/DIABLO und HtrA2/OMI, sowie Endonuklease G und AIF (apoptosis-inducing factor) [77].

Cytochrom c entfaltet seine apoptotische Wirkung, indem es zur Bildung eines sogenannten Apoptosoms führt, einem Proteinkomplex aus Cytochrom c, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) sowie den Cofaktoren ATP und dATP führt [77]. Die Initiatorcaspase Procaspase-9 wird durch dieses Apoptosom rekrutiert und anschließend durch Dimerisierung und Autokatalyse zu Caspase-9 aktiviert [79]. Die aktive Caspase-9 kann wiederum Caspase-3 und Caspase-7 aktivieren, die als Effektorcaspasen agieren, womit die gemeinsame Endstrecke mit dem extrinsischen Weg erreicht ist [80].

Smac/DIABLO und HtrA2/OMI binden nach ihrer Freisetzung an IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins). IAPs sind in freier, ungehemmter Form in der Lage, Caspasen zu hemmen und somit den Apoptoseprozess auszubremsen. Eine Bindung der mitochondrialen Proteine an IAPs verhindert deren Assoziation mit den Caspasen, wodurch diese ihre apoptotische Wirkung entfalten können [81]. Endonuklease G und AIF bewirken eine, von Caspasen unabhängige, Fragmentierung der DNA im Zellkern [77].

Mit der Aktivierung der Effektorcaspasen im extrinsischen und intrinsischen Signalweg beginnt die gemeinsame Endstrecke, an deren Ende der programmierte Tod der Zelle steht. Effektorcaspasen sind in der Lage, Endonukleasen und Proteasen zu aktivieren, welche eine Spaltung der DNA und einen Abbau relevanter Proteine des Zellkerns und Zytoskeletts bewirken [71]. Aktive Caspase 3 spaltet das Protein ICAD (inhibitor of caspase activated DNase) das im ungespaltenen Zustand die DNase CAD (caspase activated DNase) hemmt [82]. Fällt die Inhibition dieser DNase durch Spaltung des Proteins ICAD weg, kommt es zum Abbau der zellulären DNA [83]. Darüber hinaus

aktivieren Effektorcaspasen verschiedene Proteine, die als Modulatoren in das Zytoskelett der Zelle eingreifen, wodurch es zur Formierung sogenannter Apoptosekörperchen kommt. Wichtige Vertreter dieser Proteine sind Gelsolin, PAK2 (p21-activated kinase 2), sowie ROCK1 (rho-associated kinase I) [82].

Als Antwort auf die herbeigeführten DNA-Schäden kann eine Akkumulation von p53 beobachtet werden [84]. Das Protein p53 reguliert sowohl die Reparatur der zellulären DNA, als auch die Induktion der Apoptose, falls die Schädigung irreparabel ist [85]. Aus diesem Grund fungiert p53 als Tumorsuppressor und wird häufig auch als *Wächter des Genoms* bezeichnet. Um der Zelle die Möglichkeit zu Reparatur der DNA-Schäden zu geben, kann p53 den Zellzyklus zu verschiedenen Zeitpunkten arretieren. Dies kann in der G1-Phase geschehen, also bereits vor Replikation des Genoms in der S-Phase, oder alternativ in der sich anschließenden G2-Phase [86]. Sind die Defekte zu gravierend, kommt es zur Einleitung der Apoptose, die insbesondere durch gesteigerte Expression proapoptotischer Proteine, wie beispielsweise des Proteins Bax aus der Bcl-Familie, beeinflusst wird. Hier besteht also eine Verknüpfung mit dem intrinsischen, mitochondrialen Signalweg der Apoptoseinduktion [87].

Darüber, wie groß die Bedeutung der Apoptose für den Prozess der Gelenksarthrose tatsächlich ist, finden sich in der Literatur voneinander abweichende Angaben. Hashimoto et al. publizierten Ergebnisse, nach denen 22,3% der Chondrozyten in arthrotischen Gelenken und 4,8% der Chondrozyten in gesundem Knorpel apoptotisch seien [88]. Blanco et al. sprechen von deutlich höheren Apoptoseraten mit bis zu 51% in arthrotischem Knorpel gegenüber 11% in gesunden Kontrollproben [89]. Sandell und Aigner widersprechen derart hohen Angaben und argumentieren, dass selbst gesunder Knorpel bei so hohen Apoptoseraten eine, für den Erhalt der EZM ausreichende, Biosynthese nicht gewährleisten könnte. Sie bestätigen zwar, dass Apoptose in arthrotischem Knorpel vorkommt, jedoch nur zu einem sehr geringen Prozentsatz von 0,1% [90]. Uneinigkeit herrscht auch darüber, ob die Apoptose der Chondrozyten zu einem zunehmenden Verlust der EZM und zur Knorpeldegeneration führt, oder ob die Knorpeldegeneration ursächlich für den Apoptoseprozess der Chondrozyten ist. Möglicherweise handelt es sich auch um einen Teufelskreislauf, bei dem beide Prozesse die gegenseitige Progression vorantreiben [69].

1.3.3.2 Angiogenese

Physiologisch ist hyaliner Gelenkknorpel avaskuläres Gewebe. Eine Vaskularisierung des gesunden Knorpels wird durch die besondere Zusammensetzung der Matrix und antiangiogenetische Signalmoleküle wie Troponin-1 und Thrombospondin-1, die durch die Chondrozyten produziert werden, verhindert [91]. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es im Verlauf der Arthrose zu osteochondraler Angiogenese kommt [92]. Angiogenese bezeichnet dabei die Bildung neuer Blutgefäße, aus bereits existierenden Gefäßen [93]. Im Rahmen der OA dringen Blutgefäße über neu ausgebildete Kanäle aus dem subchondralen Knochen in den mineralisierten Knorpel ein. Anschließend durchbrechen sie die Tidemark, wodurch es zu einer Vaskularisierung der darüber liegenden Knorpelschichten kommt [92]. Blutgefäße werden in der Regel von unmyelinisierten Nervenfasern begleitet. Ein Teil der starken Schmerzen, die mit OA assoziiert sind, kann deshalb dadurch erklärt werden, dass mit den Blutgefäßen auch Nervenfasern in die Zone des Gelenkknorpels gelangen [94]. Darüber hinaus scheint eine zunehmende Vaskularisierung des Knorpels auch die Bildung von Osteophyten, eine Verbreiterung der subchondralen Knochenplatte sowie den Umbau weiterer Gelenkstrukturen zu fördern und somit auf verschiedenen Ebenen zur Progression der Krankheit beizutragen [95]. Neben der osteochondralen Angiogenese kommt es auch zu einer synovialen Angiogenese. Allerdings scheinen diese beiden Prozesse voneinander unabhängig zu sein und die synoviale Angiogenese ist eher auf inflammatorische Prozesse zurückzuführen [96].

Mapp und Walsh erläutern wie eine Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren in der EZM die Angiogenese im gesunden Knorpel engmaschig reguliert. In arthrotischem Knorpel geraten diese Prozesse durch vermehrte Produktion proangiogenetischer Faktoren durch die Chondrozyten aus dem Gleichgewicht. Zu den proangiogenetischen Faktoren gehören unter anderem Prostaglandine, Zytokine und Chemokine, Stickoxide, sowie verschiedene regulatorische Peptide und Wachstumsfaktoren [97]. Hervorzuheben sind hierbei insbesondere die VEGFs (vascular endothelial growth factor). Hierbei handelt es sich um eine Familie von Signalmolekülen, die ihre Wirkung über Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität entfalten. Aufgrund ihrer mitogenen und antiapoptotischen Wirkung auf Endothelzellen spielen VEGFs eine zentrale Rolle sowohl in physiologischen als auch in pathologischen

Angiogeneseprozessen [98]. Hypoxie und mechanischer Stress können die Expression von VEGF durch die Chondrozyten steigern, weshalb die Expression mit dem Fortschreiten der Arthrose korreliert [99]. PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) ist ein weiteres Protein, das für den Vorgang der Angiogenese von Relevanz ist. Es ist auch unter dem Namen CD31 (cluster of differentiation 31) bekannt. Als Oberflächenprotein von Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen sowie einiger T-Zellen hält man eine Beteiligung nicht nur an der Angiogenese sondern auch an der Leukozytenmigration sowie der Aktivierung von Integrinen für wahrscheinlich [100].

1.3.3.3 Inflammation

Arthrotische Prozesse gehen mit einer chronischen niedriggradigen Inflammation einher, die durch das angeborene Immunsystem vermittelt wird [101]. Vielfach konnte gezeigt werden, dass Inflammation ein zentraler Prozess ist, der sowohl durch progrediente Zerstörung des gesunden Knorpels als auch durch Generierung der charakteristischen Schmerzen die stete Progression einer OA vorantreibt [102]. Wie genau die inflammatorischen Prozesse initiiert werden ist noch weitgehend unbekannt. Es ist jedoch naheliegend, dass insbesondere mechanischer und oxidativer Gewebestress daran beteiligt sind [41].

Die Synovialflüssigkeit der Patientinnen und Patienten mit OA weist eine deutlich erhöhte Konzentration von Entzündungsmediatoren auf, für deren Produktion sowohl die Chondrozyten als auch die Synovialzellen verantwortlich sind [41]. Insbesondere können vermehrt Zytokine wie bspw. IL-6 [103], IL-1 β [101] und TNFs [104] nachgewiesen werden. Vermutlich tragen diese Entzündungsmarker synergistisch mit den veränderten mechanischen Bedingungen zu einer Aktivierung der Chondrozyten und Synovialzellen bei [54, 105]. Aus dieser Aktivierung resultiert einerseits eine Produktion kataboler Enzyme, Prostaglandine und weiterer Entzündungsmediatoren, sowie andererseits eine verringerte Synthese von Proteoglykanen und Kollagen II. Letztendlich haben diese Prozesse eine fortschreitende Zerstörung der Knorpelarchitektur zur Konsequenz [30].

Als katabole Enzyme werden solche bezeichnet, die zur Degeneration der Matrix beitragen. Hierzu zählen primär Enzyme aus der Familie der Matrix Metalloproteasen (MMP) sowie Aggrecanasen aus der Familie der ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) [106]. Insbesondere die Expression von

MMP-13 wird durch den Einfluss von Entzündungsmediatoren wesentlich hochreguliert [41]. Aber auch MMP-1, MMP-3, ADAMTS-4 und ADAMTS-5 werden von aktivierten Chondrozyten vermehrt produziert [30]. Für Matrix Metalloproteasen ist charakteristisch, dass es sich um Zink-abhängige Enzyme handelt, die in der Lage sind verschiedenste Proteinbestandteile der EZM zu verdauen [107]. Je nach bevorzugter Zielstruktur des jeweiligen Enzyms, lassen sich Matrix Metalloproteasen weiter in Kollagenasen, Gelatinasen und Matrix Lyasen kategorisieren [30]. MMP-13 im Spezifischen gehört zur Untergruppe der Kollagenasen und ist auch als Kollagenase-3 bekannt. Ihre Spezialisierung liegt darin, den Abbau von Kollagen II schneller und damit effektiver als andere Enzyme aus der Klasse der MMPs zu vollziehen [108].

Neben der Induktion kataboler Enzyme steigern einige Entzündungsmarker auch die Produktion weiterer inflammatorischer Zytokine, die synergetisch die katabole Antwort der Chondrozyten befördern. IL-1 β beispielsweise moduliert die Syntheseaktivität der Chondrozyten in der Art, dass diese vermehrt Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin E2 (PGE2) oder auch IL-6 produzieren [109]. Für NO wiederum wurde im Rahmen von in vitro Experimenten gezeigt, dass es in der Lage ist, Apoptose in kultivierten Chondrozyten zu induzieren [110]. Die Signalwege der Inflammation und Apoptose weisen demnach Querverbindungen auf.

Die Entzündungsmarker tragen zusätzlich zur Generierung der OA typischen Schmerzen bei. Insbesondere IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α und Prostaglandin E2 bewirken eine Sensibilisierung primär afferenter Nervenfasern für mechanische Stimuli und senken damit die Schwelle der Schmerzwahrnehmung [102].

Inflammatorische Mediatoren können zudem eine Aktivierung weiterer Signalwege, wie dem MAPK (mitogen-activated protein kinase) und dem NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) Signalweg, bewirken [41]. Diese Signalwege konvergieren wiederum auf einen gemeinsamen Prozess: Kollagenasen und Aggrecanasen, insbesondere MMP-13, werden hochreguliert und somit die Matrix Degeneration zusätzlich beschleunigt [41]. Der NF- κ B Signalweg führt über eine positive Rückkopplung zudem zu einer erneuten Aktivierung der Expression proinflammatorischer Mediatoren [111]. Auch die beim enzymatischen Abbau der EZM freigesetzten Matrixbestandteile kurbeln zusätzlich die Inflammation an [41]. Der Teufelskreislauf aus Inflammation, Zerstörung des hyalinen Gelenkknorpels, Freisetzung von

Matrixkomponenten durch katabole Enzyme und erneuter Inflammation wird somit weiter aggraviert.

Dass inflammatorische Zytokine auch an der Regulation des Wnt/ β -catenin Signalwegs beteiligt sind wird diskutiert, ist jedoch nicht sicher nachgewiesen [112]. Dennoch spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der OA, da er insbesondere den Umbau des Knorpels und des subchondralen Knochens beeinflusst [113]. Der Wnt/ β -catenin Signalweg kann wiederum durch Wnt Antagonisten inhibiert werden, weshalb man diesen Antagonisten protektive Eigenschaften zuschreibt. Zu solchen Inhibitoren zählt man Sclerosin, sFRP (secreted frizzled-related protein) sowie Proteine der DKK (Dickkopf) Familie, wobei insbesondere DKK-1 besondere Bedeutung beigemessen wird [114]. Über das Vorkommen von DKK-1 in arthrotischen Gelenken finden sich in der Literatur allerdings widersprüchliche Angaben. Teilweise ist von einer inversen Korrelation zwischen DKK-1 Konzentrationen und der Ausprägung einer OA die Rede [115]. An anderer Stelle wurde eine gesteigerte Produktion dieses Proteins in arthrotischen Gelenken beschrieben [114].

1.3.3.4 Differenzierung der Chondrozyten

Die Differenzierung zu Chondrozyten ist ein komplexer Prozess, auf den verschiedenste Faktoren Einfluss haben. Insbesondere für unterschiedliche bone morphogenic proteins (BMP) oder fibroblast growth factors (FGF) konnte ein solcher Effekt demonstriert werden [116]. Mit Progression der OA ändern sich nicht nur die Muster der Chondrozytenanordnung (vgl. 1.3.2), sondern es ändert sich auch deren Phänotyp [117]. Dies bezeichnet man auch als Prozess der Differenzierung bzw. teilweise auch als Dedifferenzierung. Beide Begriffe werden in der Literatur teils synonym verwendet, im Folgenden soll jedoch von Differenzierung gesprochen werden. Vielfach wurde beschrieben, dass die Differenzierung im Rahmen der OA in vielen Aspekten den Vorgängen ähnelt, die Chondrozyten im Verlauf der enchondralen Ossifikation durchlaufen [118].

Zu unterscheiden sind verschiedene Arten der Differenzierung, die jeweils mit einem individuell veränderten Expressionsmustern einhergehen. Durchlaufen Chondrozyten einen Prozess in Richtung eines hypertrophen Phänotyps, so spricht man von hypertropher Differenzierung [119]. Davon abzugrenzen ist die fibroblastische

Differenzierung bei der die Chondrozyten einen Phänotyp annehmen, welcher dem von Fibroblasten ähnelt [117].

Chondrozyten im gesunden Knorpel zeichnen sich physiologisch vor allem durch eine Produktion von Proteoglykanen und Kollagen II, sowie in geringeren Mengen von Kollagen IX und Kollagen XI, aus [120]. Hypertrophe Chondrozyten steigern hingegen die Expression von Kollagen X und MMP-13 (Matrix Metalloprotease 13), die für den Abbau des Kollagen II verantwortlich ist [117, 120]. OCN, Indian Hedgehog (IHH), CD36 und Alkalische Phosphatase gelten ebenfalls als validierte Marker einer hypertrophen Differenzierung und sind vermutlich an der zunehmenden Kalzifizierung der Knorpelmatrix beteiligt [120]. Auch Proteine der FGF (Fibroblast Growth Factor) Familie könnten eine Rolle in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung und Matrixkalzifizierung spielen [116]. FGF23 beeinflusst nachweislich die Osteoblastendifferenzierung und den Knochenmetabolismus über Regulation des Calcium- und Phosphathaushaltes [121]. Inwiefern dadurch auch Effekte auf den Gelenkknorpel vermittelt werden, ist bisher noch unklar.

Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OCN) sind zwei zentrale Proteine des Knochenstoffwechsels, zählen zu den organischen Komponenten der Knochensubstanz und werden physiologisch überwiegend von Osteoblasten synthetisiert [122]. Beide Proteine werden auch im Rahmen des Knochenwachstums über enchondrale Ossifikation von den hypertrophen Chondrozyten der Epiphysenfuge produziert. Im gesunden adulten Knorpel findet jedoch keine Expression der beiden Moleküle mehr statt [123]. In Knorpelproben von Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittener OA wurden jedoch erhöhte OPN- und OCN-Konzentrationen nachgewiesen [123, 124]. Dies würde die These stützen, dass hypertroph differenzierte Chondrozyten im arthrotischen Knorpel nicht nur hinsichtlich ihres Phänotyps, sondern auch bezüglich ihres Expressionsmusters, mit dem hypertrophen Stadium der Chondrozyten der enchondralen Ossifikation vergleichbar sind.

Für differenzierte Chondrozyten des fibroblastischen Phänotyps wurde eine Hochregulation der Kollagen I und Kollagen III Produktion, bei gleichzeitig verringerter Produktion von Kollagen II und Aggrecan beschrieben. Diese Verschiebung der prozentualen Anteile einzelner Kollagene gemessen an der Gesamtmasse, wirkt sich insbesondere auf die Stabilität der EZM aus. [117].

Die Initiation der Differenzierung der Chondrozyten ist nicht monokausal zu begründen, da eine Vielzahl von Stimuli hierbei eine Rolle spielt. Über verschiedene Signalwege können beispielsweise proinflammatorische Zytokine, insbesondere IL-1 β , einen Verlust des differenzierten Phänotyps bewirken [125]. Auch oxidativer Stress kann eine Differenzierung über erhöhte NO Konzentrationen triggern [126].

1.4 Diagnostik der Osteoarthritis

Um eine optimale und individuelle Therapie zu gewährleisten, ist es von Bedeutung Arthritis möglichst früh im Krankheitsprozess zu diagnostizieren. Für eine gesicherte Diagnose sollte dabei stets eine fundierte Anamnese mit einer klinischen Untersuchung, bildgebenden Verfahren sowie eventuell arthroskopischen und laborchemischen Befunden kombiniert werden [22].

Zur besseren Beurteilung der Funktionseinschränkung gibt es verschiedene etablierte Bewertungssysteme. Zur Einschätzung einer Knie- oder Hüftarthritis wird beispielsweise der Lesquesne Funktionsindex verwendet, in den die Kriterien Schmerz, Gehstrecke sowie Alltagsaktivität der Patientinnen und Patienten einfließen [127]. Der WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) ist ein weiterer häufig genutzter Index. Beurteilt werden dabei 24 Elemente aus drei Kategorien (5 Fragen zu Schmerz, 2 zu Steifigkeit sowie 17 zu Funktion des Gelenks) [128].

Im klinischen Alltag ist nach wie vor die Röntgenuntersuchung des betroffenen Gelenks in zwei Ebenen das Mittel der Wahl zur Diagnostik einer Arthritis. Da eine Diagnose auf diese Weise im Regelfall gestellt werden kann, sind weitere bildgebende Verfahren nur im Ausnahmefall sinnvoll. Typische Anzeichen einer Arthritis im Röntgenbild sind insbesondere eine Verschmälerung des Gelenkspalts, subchondrale Sklerosierung, Osteophyten und Geröllzyten [127].

Die Standardlaborwerte, inklusive der Entzündungswerte, im Blutserum von Patientinnen und Patienten mit OA sind in der Regel unauffällig. Ihre Bestimmung eignet sich demnach lediglich um differentialdiagnostisch andere Erkrankungen, wie beispielsweise eine rheumatoide Arthritis, auszuschließen [127].

Bisher ist es noch nicht gelungen, einen Biomarker als ausreichend genauen diagnostischen Marker zu validieren. Da solche Biomarker jedoch großes Potential bergen, wird daran mit großem Interesse geforscht. In Frage kommen insbesondere

Strukturmoleküle des Knorpels, Knochens oder der Synovia, Moleküle des Kollagen- und Proteoglykanmetabolismus, sowie Moleküle, die mit einer Inflammation oder Fibrosierung assoziiert werden [129]. Biomarker hätten den Vorteil, OA bereits im Frühstadium diagnostizierbar zu machen und zudem die Entwicklung der Erkrankung überwachbar oder sogar prognostische Aussagen möglich zu machen [130].

1.5 Therapiemöglichkeiten der Osteoarthritis

Zur Behandlung einer klinischen OA wird in der Regel auf eine Kombination pharmakologischer und nicht pharmakologischer Therapieansätze gesetzt [131]. Im Zentrum der Therapie steht eine effektive und möglichst nebenwirkungsarme Schmerzkontrolle, ein Erhalt bzw. eine Verbesserung der Gelenkfunktion und der Beweglichkeit, sowie die damit einhergehende Verbesserung der Lebensqualität [132]. Es ist notwendig, für jeden Patienten oder jede Patientin einen individuellen Therapieplan zu erstellen, in dem Aspekte wie Ausmaß der Arthrose, Schmerzen und Beeinträchtigung, Alter und Aktivität der Patientinnen und Patienten, sowie die Ursache der Arthrose zu berücksichtigen sind. Die Patientinnen und Patienten müssen ausreichend über die Krankheit und mögliche Therapieoptionen aufgeklärt werden, damit eine gemeinsame Entscheidungsfindung durch Ärztinnen und Ärzte und Patientinnen und Patienten möglich ist [133].

Die „S2k-Leitlinie Gonarthrose“ der Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie (DGOOC) fasst verschiedene Therapieoptionen zusammen. Begonnen wird in der Regel mit einer konservativen Therapie: Physiotherapie oder Bewegungstherapie kann positive Auswirkungen auf Kraft, Ausdauer und Beweglichkeit haben, während physikalische Therapie zur Reduktion von Schmerzen beitragen kann. Ergotherapie kann Patientinnen und Patienten auf verschiedenen Ebenen unterstützen. Hierzu gehören beispielsweise eine Ausstattung mit Hilfsmitteln, eine Anpassung von Wohn- und Arbeitsräumen, Training von Alltagssituationen sowie eine Sturzprophylaxe. Dies ermöglicht Patientinnen und Patienten eine größtmögliche Selbstständigkeit und erleichtert eine Wiedereingliederung in den privaten und beruflichen Alltag.

Die konservative Therapie kann bei Bedarf durch eine medikamentöse Therapie ergänzt werden. Dabei können NSAR sowohl topisch als auch oral verabreicht werden. Sind diese allein nicht ausreichend oder kontraindiziert, kann eine intraartikuläre Gabe

von Hyaluronsäure oder Corticosteroiden in Betracht gezogen werden. Reichen auch diese Maßnahmen nicht aus, kann der Einsatz von Opioiden erwogen werden. Allerdings sollten Opioide nur möglichst kurzfristig und in möglichst in niedriger Dosierung angewendet werden [133].

Bei Versagen der beschriebenen Therapieoptionen kann als Ultima Ratio eine Knie-TEP in Frage kommen. Eine Implantation einer Knie-TEP ist ein elektiver Eingriff, der nur unter bestimmten Voraussetzungen sinnvoll ist. Die „S2k-Leitlinie Indikation Knieendoprothese“ der DGOOC nennt verschiedene Kriterien der Indikationsstellung einer Prothesenimplantation. Demnach ist eine Operation dann sinnvoll, wenn die Patientinnen und Patienten mindestens 3-6 Monate unter Schmerzen leiden, ein Strukturschaden (Arthrose, Osteonekrose) vorliegt, konservative Therapiemaßnahmen versagt haben und der Patient oder die Patientin unter Einschränkungen leidet, welche die subjektive Lebensqualität relevant senken. Absolute Kontraindikationen sind beispielsweise Infektionen und akute kardiovaskuläre Ereignisse [134].

Da die Heilung einer Arthrose und Wiederherstellung der Gelenksintegrität konservativ und medikamentös nicht möglich ist, enden viele Krankheitsverläufe mit der Implantation einer Knie-TEP, was sich auch in den Operationszahlen widerspiegelt. Laut dem statistischen Bundesamt befand sich die „Implantation einer Endoprothese am Hüftgelenk“ (OPS 5-820) auf Platz 6 und die „Implantation einer Endoprothese am Kniegelenk“ (OPS 5-822) auf Platz 14 der im Jahr 2019 am häufigsten durchgeführten Operationen in Deutschland [135].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Chondrozyten durchlaufen mit progredienter OA verschiedenste Veränderungen. Die Anordnung der Knorpelzellen ändert sich von *Strings* über *Double Strings* und *Small Clusters* zu *Big Clusters*. Auch ein diffuses Zellmuster (*Diffuse*) lässt sich vermehrt beobachten. Phänotypisch imponiert sowohl eine hypertrophe als auch eine fibroblastische Dedifferenzierung der Chondrozyten mit spezifisch verändertem Expressionsprofil. Der zugrundeliegende zelluläre Mechanismus dieser Veränderungen ist bisher jedoch weitgehend unbekannt. Insbesondere wurden die Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene bisher vor allem in endgradig verändertem

Gelenkknorpel, nicht aber in den vorangehenden Arthrostadien untersucht. Diese Arbeit dient dem Ziel, die Veränderungen des arthrotischen Knorpels stadienspezifisch zu untersuchen, um so ein differenzierteres Bild der zellulären und molekularen Prozesse der OA zu erhalten. Die räumliche Anordnung der Chondrozyten zueinander wird hierbei verwendet, um vitale Chondrozyten bildmorphologisch in verschiedene Arthrostadien (*Strings, Double Strings, Small Clusters, Big Clusters, Diffuse*) zu klassifizieren. Die auf diese Weise gesammelten Proben der jeweiligen Stadien werden hinsichtlich 12 Biomarker untersucht, denen eine Rolle im Prozess der Pathogenese einer Arthrose zugeschrieben wird. Analysiert werden die Marker VEGF und PECAM-1 aus dem Bereich der Angiogenese, Aktivierte CASP3, Aktivierte CASP8 und p53 aus dem Bereich der Apoptose, IL-1 β und IL-6 aus dem Bereich der Inflammation, OCN, OPN und Col10 aus dem Bereich der Chondrozytendifferenzierung, sowie FGF23 und DKK-1, welche an verschiedenen molekularen Signalwegen beteiligt sind. Das Ziel war es, eine qualitative Betrachtung der Biomarker mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen einer quantitativen Auswertung mittels ELISAs (PECAM-1, IL-6, IL-1 β , OCN, OPN, FGF23, DKK-1) bzw. einer semiquantitativen Auswertung mittels Western Blots (CASP3, CASP8, p53) gegenüberzustellen, um ein möglichst detailliertes Bild zu generieren. Auf diese Weise möchte diese Arbeit ermöglichen, den pathophysiologischen Weg von den gesunden *Strings* bis zur Clusterbildung der Chondrozyten, sowie den Prozess der Differenzierung der Chondrozyten systematisch zu beschreiben und zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

Chemikalie	Kennzeichnung	Hersteller
Albumin (BSA) Fraktion V (pH 7,0)	A1391	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B	15290018	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke	10333412	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	60-24-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Ethanol 100%	A4094	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Fetal calf serum (FCS)	S0615	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Albuch, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium, Dako	S3023	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Formaldehyd methanolfrei 30 %	4235.2	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Gibco™ DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplement	10565018	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

Material und Methoden

Gibco™ DMEM, no glucose	11520416	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Gibco™ DPBS, no calcium, no magnesium	14190136	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Gibco™ RPMI 1640 Medium	11530586	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	87785	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	26616	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	P4333	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinase Inhibitor Cocktail Set III	539134-1ML	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	1185-53-1	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Triton X	T9284	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TWEEN® 20	P1379	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
UltraPure™ Glycerol	15514011	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

UltraPure™ 0.5M EDTA	15575020	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI	NC9524612	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
WesternSure® PREMIUM Chemiluminescent Substrate	926-95000	LI-COR, Lincoln, USA

2.1.2 Verwendete Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme

Enzym	Kennzeichnung	Hersteller
Collagenase A	10103578001	Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland
Hyaluronidase from bovine testes Type I-S CAS-Nr. 37326-33-3	H3506	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3 Verwendete ELISA Kits

Tabelle 3: Verwendete ELISA Kits

ELISA	Kennzeichnung	Hersteller
DKK1 Human ELISA Kit	EHDKK1	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Human CD31 ELISA Kit (PECAM)	ab190814	Abcam, Cambridge, England
Human FGF-23 ELISA Kit	EH189RB	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

Human Osteocalcin ELISA Kit	ab270202	Abcam, Cambridge, England
Human Osteopontin SimpleStep ELISA Kit	ab269374	Abcam, Cambridge, England
IL-1 beta Human ELISA Kit	BMS224-2	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
IL-6 Human ELISA Kit	KAC1216	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

2.1.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Zielstruktur	Kennzeichnung	Herkunft	Hersteller
Aktive Caspase-3	9664S	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Aktive Caspase-8	9496T	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Beta-Tubulin	2128S	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
DKK-1	ET-1610-63	Rabbit	HUABIO, Woburn, USA
FGF23	orb128058	Rabbit	Biorbyt, Cambridge, England
GAPDH	2118S	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

IL-1 β	ab2105	Rabbit	Abcam, Cambridge, England
IL-6	GTX110527	Rabbit	GeneTex, Irvine, USA
Kollagen X	ab58632	Rabbit	Abcam, Cambridge, England
Osteocalcin	ab93876	Rabbit	Abcam, Cambridge, England
Osteopontin	702184	Rabbit	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
PCNA	2586S	Mouse	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
PECAM-1	sc-376764	Mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
p53	9282T	Rabbit	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
VEGF	P802	Rabbit	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Kennzeichnung	Konjugation	Hersteller
Goat Anti Mouse IgG Alexa Fluor 594	ab150116	Alexa Fluor 594	Abcam, Cambridge, England

Goat Anti Rabbit IgG Alexa Fluor 594	ab150080	Alexa Fluor 594	Abcam, Cambridge, England
--------------------------------------	----------	-----------------	---------------------------

2.1.5 Verwendete Färbungen

Tabelle 6: Verwendete Färbungen

Farbstoff	Kennzeichnung	Hersteller
Calcein AM	C1430	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye	20279	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	D1306	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%	11538886	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Propium Iodide	P3566	ThermoFisher scientific, Waltham, USA

2.1.6 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Kennzeichnung	Hersteller
Adhäsions-Objektträger SuperFrost plus	03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland

Material und Methoden

Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten	Z648027	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anatomische Pinzette	BD023R	Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland
Chirurgische Pinzette	DB527R	Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland
Deckgläser mikroskopisch	01-2460/1	R. Langenbrinck GmbH, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Dosen, Weithals, mit Gewinde	215-2522	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einmalskalpell Feather No.21	200130021	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Eppendorf Research plus Pipetten 0,5 – 10 µL 10-100 µL 20-200 µL 100-1000 µL	3123000020 3123000047 3123000055 3123000063	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 mL 1,5 mL 2 mL	0030121023 0030120086 0030120094	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Falcon konische Zentrifugenröhrchen 50 ml 15 ml	10788561 11507411	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
FEATHER Microtome Blade S35	207500000	Pfm medical AG Köln, Deutschland
FEATHER Standardskalpell	200130021	Pfm medical AG Köln, Deutschland
Gel Blotting Papers Whatman® 3MM Thickness 0,34 mm, 13.3 x 10.2 cm	0043.1	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
MicroAmp™ EnduraPlate™ Optical 96- Well Clear Reaction Plates with Barcode	4483352	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System (8- well)	177402	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Nunc™ Serological Pipettes 5 mL 10 mL 25 mL	70355N 170356N 170357N	ThermoFisher scientific, Waltham, USA
Petrischale 145/20 mm, mit Nocken, steril	639161	Greiner Bio-One International GmbH

		Kremsmünster, Oberösterreich
Pipettenspitzen		
10 µl	690011	Biozym Scientific GmbH
100 µl	690101	Hessisch Oldendorf, Deutschland
200 µl	692069	
1250 µl	692089	
Vintage Classic Klingen für Rasierhobel	-	Wilkinson Sword, High Wycombe, England

2.1.7 Verwendete Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
C-Digit Blot Scanner	LI-COR, Lincoln, USA
Centrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ELISA Reader: EL800	BioTek Instruments, Winoosk, USA
Gefrierschrank Gram F200LE	GRAM Deutschland GmbH Sarstedt, Deutschland
Kryotom Leica CM3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, Deutschland

Kühlschrank KT 1644	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Mikroskop Leica DM IRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Carl Zeiss Axiophot Fluorescent	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskop Carl Zeiss Observer Z1 fluorescence microscope	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht "Assistent" GmbH
Pipettierhilfe pipetus® (Code-No. 9907200)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG Eberstadt, Deutschland
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad: Transsonic T460	Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Deutschland
Vortex-Schüttler REAXtop	Heidolph, Schwabach, Deutschland
VXR basic Vibrax	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland

2.1.8 Verwendete Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Software	Hersteller/Entwickler
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
BioRender	BioRender.com Toronto, Canada
EndNote X9	Thomas Reuters Corporation, New York, USA
GraphPad Prism Version 9.3.1	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband
Microsoft Excel für Mac Version 16.70	Microsoft Corporation Redmond, USA
Microsoft PowerPoint für Mac Version 16.43	Microsoft Corporation Redmond, USA
Microsoft Word für Mac Version 16.43	Microsoft Corporation Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Für die Studie lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission Tübingen vor (Projektnummer: 674/2016BO2). Von den Patientinnen und Patienten wurde präoperativ ein informiertes Einverständnis eingeholt. Bei den verwendeten Proben handelte es sich um Resektionsfragmente, die von Patientinnen und Patienten gewonnen wurden, die eine Kniegelenktotalendoprothese (Knie-TEP) erhielten. Verwendet wurden hierbei die mediale sowie laterale Femurkondyle und die dazwischenliegende Fossa intercondylaris. Die Operationen wurden in der Orthopädie der Universitätsklinik Tübingen, sowie im Winghofer Medicum Rottenburg durchgeführt. Postoperativ wurde das Material in sterilen Schraubbechern gelagert, die mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gefüllt waren. Das DMEM war zuvor mit dem Antibiotikum Penicillin-Streptomycin 1,2 % (v/v) sowie dem Fungizid Amphotericin B 2 % (v/v) versetzt worden, um einer Besiedelung mit Bakterien oder Pilzen vorzubeugen. Die Proben wurden innerhalb von 4 h aus der betreffenden Klinik abgeholt und bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert.

2.2.2 Herstellung der Knorpeldiscs

2.2.2.1 Knorpelaufbereitung

Ziel der Knorpelpräparation war es, normierte Knorpeldiscs mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Höhe von 300 µm für die anschließende Färbung und Sortierung herzustellen (Abbildung 5). Dazu wurden die Fragmente unter der Sterilbank in eine Petrischale überführt (Abbildung 5A). Im ersten Schnitt wurde der Knorpel mit einem Skalpell durch horizontale Schnitfführung vom subchondralen Knochen getrennt (Abbildung 5B-C). Es wurde darauf geachtet, keinen zweiten Schnitt an gleicher Stelle zu setzen, damit jeder Schnitt ausschließlich die oberflächlichste Zellschicht beinhaltete. In einem zweiten Schritt wurden mit einem Biopsiestanzer Knorpelzylinder von 4 mm Durchmesser ausgestanzt und in einem mit DMEM gefüllten Eppendorf Tube gesammelt (Abbildung 5D-E). Anschließend wurde jeweils die zum Gelenkraum gewandte Schicht des Zylinders identifiziert und der Zylinder mit dieser Schicht nach unten in die 300 µm tiefe Vertiefungen auf eine eigens hierfür angefertigte Metallplatte gelegt. Die Knorpelzylinder wurden mit einem Spatel fixiert, sodass mit einer Rasierklinge durch

einen Schnitt parallel zur Metallplatte der Überstand abgeschnitten werden konnte (Abbildung 5F). In den Vertiefungen der Metallplatte verblieb somit eine 300 µm dicke Disc, bei welcher es sich um die oberflächlichste Schicht des Gelenkknorpels handelte. (Abbildung 5) Die Discs wurden in einem zweiten Eppendorf Tube in DMEM gesammelt.

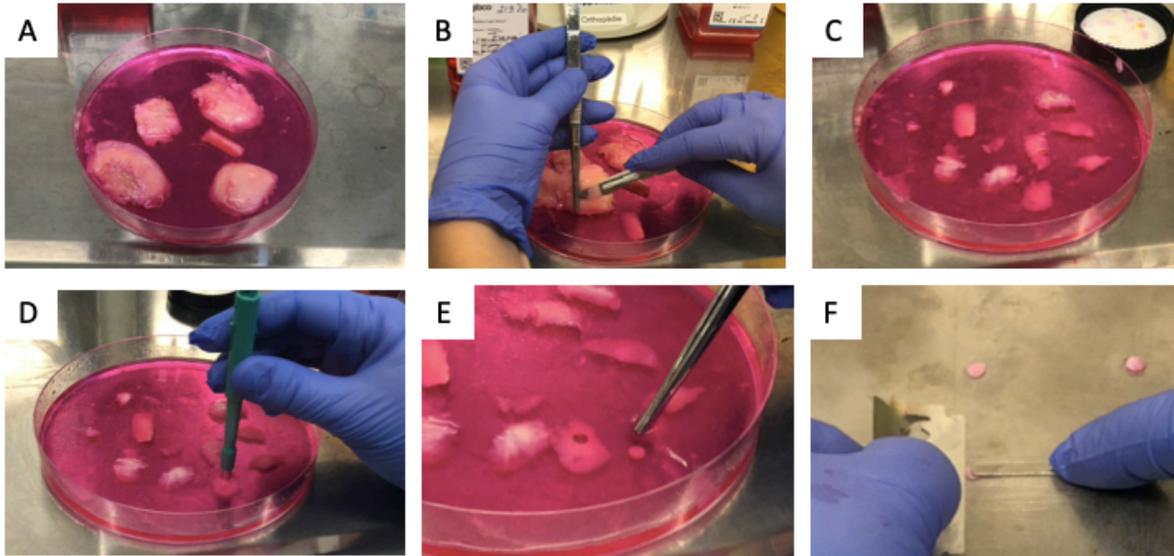


Abbildung 5: Knorpelpräparation für die anschließende Weiterverarbeitung (A-F). Der Knorpel wird in eine Petrischale umgebettet (A) und vom subchondralen Knochen separiert (B-C). Es werden Zylinder mit einem Durchmesser von 4 mm ausgestanzt (D-E), von denen die oberflächlichsten 300 µm mit einer Rasierklinge und einer maßgefertigten Lochplatte gewonnen werden (F).

2.2.2.2 Färbung und Sortierung der Gewebeproben in verschiedene Stadien

Zur Färbung der Knorpeldiscs wurde Calceinlösung mit DMEM im Verhältnis 1:1000 verdünnt. In eine 96-Mikrotiterplatte wurden je 100 µL der Färbelösung in jedes Well pipettiert und jeweils eine Knorpelscheibe darin platziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 30 Minuten. Die Klassifikation der einzelnen Knorpelscheiben nach ihrer vorherrschenden räumlichen Struktur erfolgte an einem Leica Polarisationsmikroskop. Hierbei wurden die Kategorien *Strings* (S), *Double Strings* (DS), *Small Clusters* (SC), *Big Clusters* (BC) und *Diffuse* (Dif) unterschieden. In Mikroreaktionsgefäßen wurden jeweils die Discs mit gleichem Strukturmuster gesammelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden diese bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Das Einfrieren erfolgte innerhalb von maximal 36 h nach der Probenentnahme im Operationssaal.

2.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.3.1 Herstellung von Kryotomschnitten

Zur Anfertigung von Kryotomschnitten wurden Knorpelscheiben von etwa 1 x 1 cm Größe zurechtgeschnitten. Diese wurden jeweils auf einer dafür vorgesehenen Platte in Tissue Tek eingebettet und dann bei -21 °C im Kryotom ausgehärtet. Die Platte wurde in der dafür vorgesehenen Halterung fixiert. In Vorversuchen hatte sich eine Schnittdicke von 35 µm bewährt, weshalb diese Schnittdicke beibehalten wurde. Mit der Mikrotomklinge wurden 35 µm dicke Schnitte mittels manuellem Kurbeln erzeugt. Geeignete Schnitte wurden auf einem Objektträger gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung in einer Petrischale, gefüllt mit Dulbecco's PBS (DPBS), gelagert. Hierdurch lösten sich die Schnitte aus dem Einbettungsmedium und einem Austrocknen wurde vorgebeugt.

2.2.3.2 Immunfluoreszenz Färbung

In 1,5 ml Eppendorf Tubes wurden je drei Kryotomschnitte gegeben, und dreimal für je fünf Minuten in 500 µl DPBS gewaschen. Um eine Autolyse der Probe zu verhindern, wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in je 500 µl Formalin 4 % (v/v) in DPBS fixiert. Nach einer erneuten Waschung von dreimal je fünf Minuten in DPBS erfolgte der Enzymverdau mit dem Ziel der Antigen-Demaskierung. Hierzu wurden die Proben für 60 Minuten mit 300 µl Hyaluronidase oder Collagenase (jeweils 1 mg/ml gelöst in PBS) bei einer Temperatur von 37 °C behandelt. Es wurde erneut nach bekanntem Schema gewaschen. Anschließend wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Bovinem Serumalbumin (BSA) 5 % (w/v) sowie Triton X 0,3 % (v/v) in PBS geblockt, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Der Primärantikörper wurden mit BSA 2,5 % (w/v) im Verhältnis 1:100 verdünnt und zur Positivkontrolle pipettiert, während zur Negativkontrolle, die für alle Immunfluoreszenzen mitgeführt wurde, lediglich DPBS hinzugegeben wurde. Es wurden Primärantikörper gegen VEGF, PECAM-1, CASP3, CASP8, p53, IL-1 β , IL-6, OCN, OPN, Col10, DKK-1 und FGF23 verwendet, die das jeweilige Epitop spezifisch binden (Tabelle 10). Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss an drei weitere Waschvorgänge wurde zu beiden Proben die Zellkernfärbung DAPI (1:1000), sowie der passende Sekundärantikörper (1:100) in DPBS verdünnt zugegeben. Da die Fluorophore, die zur späteren Detektion an die Sekundärantikörper gekoppelt sind, lichtempfindlich sind,

wurden dieser und alle folgenden Schritte unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden für zwei Stunden bei 21 °C inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Zur Konservierung wurden die Schnitte anschließend mit einer Pipette auf einem Objektträger entfaltet und mit einem Tropfen Fluorescent Mounting Medium bedeckt. Zuletzt wurde ein Deckglas aufgebracht und die Präparate bei 4 °C lichtgeschützt in einer Mappe im Kühlschrank gelagert.

Tabelle 10: Zuordnung von Zielstruktur, Primär- und Sekundärantikörper

Zielstruktur	Primärantikörper	Sekundärantikörper
VEGF	Anti-VEGF Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
PECAM-1	Anti-PECAM-1 Antibody, Mouse	Goat anti Mouse IgG, Alexa Fluor 594
Aktive Caspase-3	Anti-Cleaved Caspase-3 Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
Aktive Caspase-8	Anti-Cleaved Caspase-8 Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
p53	Anti-p53 Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
IL-1 β	Anti-IL-1-beta Antibody, Rabbit,	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
IL-6	Anti-IL-6 Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
DKK-1	Anti-DKK-1 Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
FGF23	Anti-FGF-23 Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594
Osteocalcin	Anti-Osteocalcin Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594

Osteopontin	Anti-Osteopontin Antibody, Mouse	Goat anti Mouse IgG, Alexa Fluor 594
Kollagen X	Anti-Collagen X Antibody, Rabbit	Goat anti Rabbit IgG, Alexa Fluor 594

2.2.3.3 Anfertigung einer Positivkontrolle für die Apoptosemarker

Da für die Apoptosemarker CASP8, CASP3 sowie p53 trotz wiederholter Durchführung der Färbung kein Signal erzielt werden konnte, bestand die Notwendigkeit einer Positivkontrolle. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit Melanomzellen (A375 cell line ATCC) verwendet. Diese wurde mit Tryptan-Blau-Lösung versetzt und die entsprechende Zellzahl pro 1 µl mit einer Neubauerzählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit Gibco Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 auf eine Konzentration von 6×10^4 Zellen pro Milliliter verdünnt. Anschließend wurden je 500 µl der Lösung in jede Kammer einer 8-well Chamber Slide pipettiert, sodass sich 3×10^4 Zellen pro Kammer befanden. Auf eine Inkubation bei 37 °C über Nacht im Inkubator folgte eine Behandlung der vier unteren Kammern mit Staurosporin, was in den Zellen der entsprechenden Kammer Apoptose induzierte. Das Chamber Slide wurde weiterhin bei 37 °C inkubiert, wobei stündlich unter dem Mikroskop überprüft wurde, ob die Apoptose bereits begonnen hatte. Sobald ein Beginn des Apoptoseprozesses festgestellt werden konnte, wurde die Lösung aus den Kammern abgezogen und die Zellen wurden für 15 Minuten in 2 % Formaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für insgesamt 10 Minuten in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Zellen für 5 Minuten auf Eis mit 0,2 % (v/v) TritonX-100 / 1 % (w/v) BSA in PBS inkubiert und im Anschluss 5 Minuten mit 1 % (w/v) BSA in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur in 3 % (w/v) BSA in PBS geblockt. Die jeweiligen Primärantikörper wurden 1:100 in 1 % (w/v) BSA / 0,5 % (v/v) Tween20 in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit den Proben inkubiert. Es wurden Primärantikörper gegen CASP3, CASP8 und p53 verwendet, wobei pro Antikörper eine zuvor mit Staurosporin behandelte Kammer und eine unbehandelte Kammer verwendet wurde. Zudem wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, in die kein Primärantikörper gegeben wurde. Das Pipettierschema ist nachfolgend abgebildet (Abbildung 6).

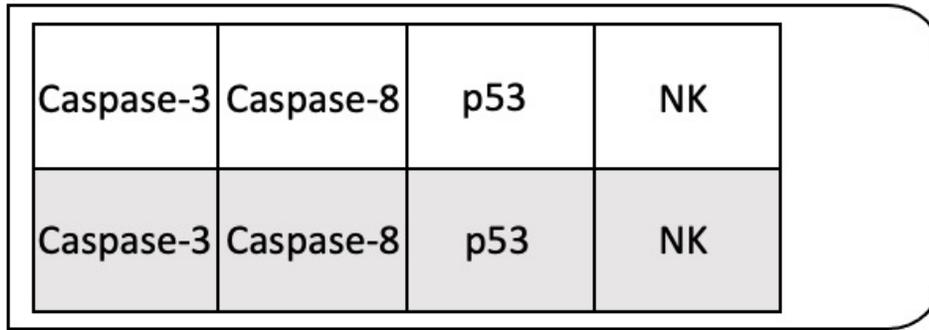


Abbildung 6: Schemazeichnung eines 8-well Chamber Slides. Grau hinterlegte Kammern wurden mit Staurosporin behandelt. Eingetragen sind die jeweiligen Marker, gegen die Primärantikörper eingesetzt wurden. Eine Negativkontrolle (NK) wurde mitgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal für je 10 Minuten mit 1 % (w/v) BSA / 0,5 % (v/v) Tween20 in PBS gewaschen. Nachfolgend erfolgte eine Inkubation für 2 h mit dem 1:100 in PBS verdünnten Sekundärantikörper (Goat anti Rabbit, Alexa Fluor 594). Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in Vectashield Antifade Mounting Medium (mit DAPI) eingedeckt.

2.2.3.4 Mikroskopie der Präparate

Die Fluoreszenzmikroskopie und anschließende Bildaufnahme wurden sowohl mit einem Carl Zeiss Observer Z1 Mikroskop als auch mit einem Carl Zeiss Axiophot Fluorescent Mikroskop durchgeführt. Die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers und die der DAPI Zellkernfärbung wurden in einem gemeinsamen Bild dargestellt. Hierzu wurde zunächst der Sekundärantikörper „Alexa 594“ mit einer LED-Lampe bei 590 nm angeregt. Anschließend wurde dieses mit der DAPI Zellkernfärbung bei 365 nm durchgeführt. Es wurde eine Mehrkanalaufnahme erstellt, wobei das Präparat nacheinander mit der jeweiligen Wellenlänge beleuchtet und die beiden Bilder anschließend übereinandergelegt wurden.

2.2.4 Quantitativer Proteinnachweis mittels ELISA

2.2.4.1 Proteinisolation

Vor Beginn der Proteinisolation musste zunächst der Lyse-Puffer (40 mM Tris-HCL pH7,4, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA, 20 % (v/v) Glycerol, 2 % (v/v) TritonX100) hergestellt werden. Direkt vor der Probenverarbeitung wurden zusätzlich 10 µl industriell hergestellten Proteaseinhibitors pro 1 ml Stocklösung hinzugegeben, sodass eine Verdünnung von

1:100 vorlag. Zwischen den verschiedenen Arbeitsschritten wurden die Proben konsequent auf Eis gelagert.

Für die Isolierung der Proteine wurden jeweils 50 Discs des gleichen Zellmusters von verschiedenen Patientinnen und Patienten gepoolt und zusammen weiterverarbeitet. Im ersten Schritt wurden die Discs mit einem Mörser unter Zugabe von Flüssigstickstoff zu einem feinen Pulver verarbeitet. Das gewonnene Pulver wurde in ein mit 200 µl Lysepuffer gefülltes Eppendorfgefäß überführt. Nun folgten 5 Behandlungszyklen in einem Ultraschallbad, wobei das Eppendorfgefäß jeweils für 15 s im Ultraschallbad beschallt und anschließend für 30 s auf Eis gelagert wurde. Dem schloss sich eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 13800 g an, während der eine Auftrennung in zwei Phasen erfolgte. Die obere wässrige Phase enthielt die Proteine und wurde deshalb in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Um eine höhere Konzentration des Proteinlysats zu erzielen, wurde dieses in eine Amicon Ultra-4 Zentrifugeneinheit pipettiert und für 15 Minuten bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Da die Filtereinheit nur für Proteine <10 kDa durchlässig ist wurden diese abfiltriert. Sämtliche für die weiterführenden Experimente relevanten Proteine verblieben im Gefäß, da sie die Größe von 10 kDa überschritten. Nach der Proteinisolation aller Discs wurden jeweils alle isolierten Proteine des gleichen Musters zusammengeführt, sodass eine einzige Probe pro Chondrozytenmuster entstand. Individuelle Unterschiede der Patientinnen und Patienten konnten somit so gut wie möglich ausgeglichen, und die Proben standardisiert werden.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Vor der Durchführung der ELISAs musste die Konzentration des gewonnenen Proteinlysats bestimmt werden. Hierzu wurde sich der photometrischen Bestimmung mittels eines Bradford-Assays bedient. Die quantitative Bestimmung erfolgt dabei mit Hilfe eines anionischen Farbstoffs (Coomassie-Brilliant-Blau G-250) der in der Lage ist an kationische, hydrophobe und aromatische Aminosäuren zu binden. Geht der Farbstoff einen solchen Komplex mit den Proteinen ein, wird er von seiner roten Form in eine stabilere blaue Form überführt. Da die Blaufärbung der Lösung mit der enthaltenen Proteinkonzentration zunimmt ist es möglich, die Menge der enthaltenen Proteine photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm zu messen.

Zu Beginn musste eine Standardreihe (Std) mit BSA als Referenzprotein angefertigt werden. Hierzu wurde mit destilliertem Wasser eine Verdünnungsreihe mit festgelegten Proteinkonzentrationen angefertigt: 100 µg/ml (StdA), 80 µg/ml (StdB), 60 µg/ml (StdC), 40 µg/ml (StdD), 20 µg/ml (StdE), 10 µg/ml (StdF), 5 µg/ml (StdG), 0 µg/ml (StdH bzw. Nullwert). Die jeweiligen aus Knorpeldiscs isolierten Proben wurden 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Für die sich anschließenden Messungen wurden jeweils 80 µl der Standardreihe bzw. der verdünnten Proben pro Well einer 96-Well Platte eingesetzt. Der gesamte Test wurde in Triplikaten durchgeführt (Abbildung 7), um die Errechnung von Mittelwerten zu ermöglichen. Zu jedem Well wurden anschließend 20 µl des Farbstoffs hinzupipettiert und mehrmals resuspendiert. Das ganze Well wurde dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zuletzt die Extinktion bei 620 nm im Photometer gemessen.

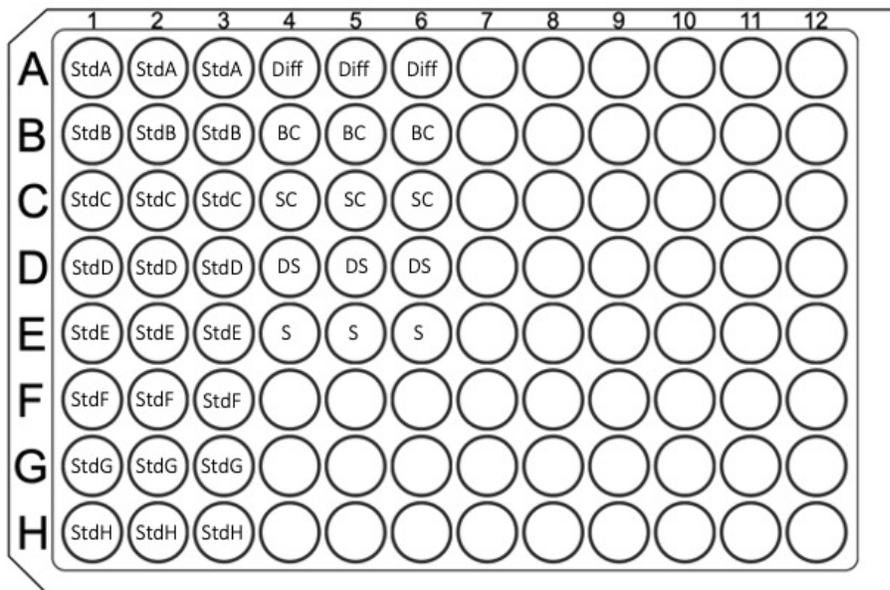


Abbildung 7: Pipettierschema des Bradford Assays. Abgebildet sind als Triplikate die Standardreihe (StdA-H), sowie die Proben Diffuse (Diff), Big Cluster (BC), Small Cluster (SC), Double String (DS) und String (S).

Für die abschließende Berechnung der Proteinkonzentration aus den Extinktionswerten wurden zuerst die Mittelwerte des Nullwerts und der Standardreihe ermittelt. Der Mittelwert des Nullwerts wurde von den gemittelten Werten der Standardreihe subtrahiert. In Microsoft Excel konnte nun eine lineare Regression errechnet werden. Die Gleichung der Ausgleichsgeraden ($y = mx + n$) konnte nach x aufgelöst werden. Da x der

Proteinkonzentration entsprach, konnte nun die enthaltene Menge an Protein für jede Probe bestimmt werden.

2.2.4.3 Durchführung der ELISAs

Bei ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) handelt es sich um einen quantitativen Nachweis spezifischer Zielstrukturen. Für die hier nachzuweisenden Proteine wurden Sandwich ELISA Kits verschiedener Hersteller verwendet, die dem gleichen Grundprinzip folgen aber sich im Detail der Durchführung unterscheiden. Jeder ELISA wurde nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Zur Vereinfachung soll im Folgenden zunächst das allgemeine Grundprinzip erläutert werden (Abbildung 8). Anschließend werden die Einzelschritte der verschiedenen Kits der Übersicht halber tabellarisch zusammengefasst.

Beim klassischen Sandwich ELISA werden Mikrotiterplatten mit 96 Wells verwendet. Diese weisen eine Beschichtung mit Antikörpern (Erstantikörper) auf, die spezifisch an ein Epitop des gesuchten Antigens binden können. Die Probe, welche das gesuchte Antigen enthält, wird für eine bestimmte Zeit in den Wells inkubiert, sodass die Bindung zwischen Erstantikörper und Antigen stattfinden kann (Abbildung 8A). Anschließend wird die Platte gewaschen, wodurch alle übrigen, nicht gebundenen Bestandteile entfernt werden. Daraufhin wird ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper hinzugegeben, welcher ein zweites Epitop desselben Antigens bindet (Abbildung 8B). Nach erneutem Waschen der Platte kann HRP-konjugiertes Streptavidin, also Streptavidin-Proteine mit kovalent gebundener Meerrettichperoxidase (HRP), hinzugefügt werden (Abbildung 8C). Durch Hinzufügen des Farbstoffs Tetramethylbenzidin (TMB), kann dieser von der Meerrettichperoxidase gespalten werden. Hierdurch wird eine Farbreaktion katalysiert und der Inhalt der Wells nimmt eine blaue Färbung an, die umso intensiver ist, je mehr Antigen in der Probe enthalten war (Abbildung 8D). Durch Zugabe eines Stop Reagenz nach einem definierten Zeitraum wird die katalysierte Reaktion gestoppt und die Farbe ändert sich von blau zu gelb (Abbildung 8E). Die Intensität dieses Gelbtönen kann nun ermittelt werden, in dem eine Extinktion bei 450 nm gemessen wird.

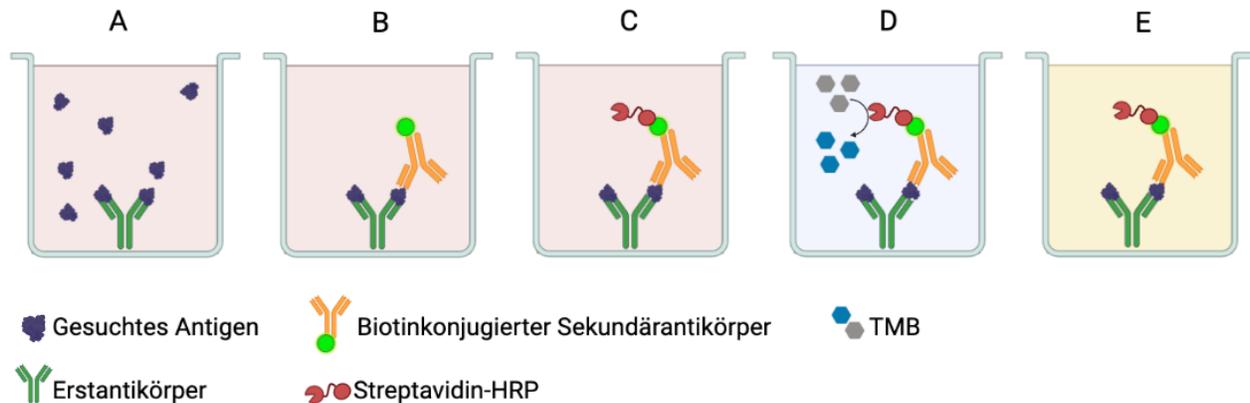


Abbildung 8: Schemazeichnung eines Sandwich ELISAs. Bindung des Antigen an den Primärantikörper (A), Bindung des biotinkonjugierten Sekundärantikörpers an das Antigen (B), Bindung des Streptavidin-HRP an Biotin (C), Katalyse des Farbumschlags (D) sowie Stop der Farbreaktion (E). Abkürzungen: Tetramethylbenzidin (TMB), Meerrettichperoxidase (HRP). (Eigene Abbildung, erstellt in BioRender.com)

Um eine Quantifizierung des enthaltenen Proteins zu ermöglichen, wird eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen mitgeführt, aus deren Ergebnissen eine Kalibrierungskurve erstellt wird. Durch Vergleich des gemessenen Signals der Proben mit der Kalibrierungskurve des Standards kann die enthaltene Antigenkonzentration der Proben bestimmt werden. Die Standardverdünnungsreihen sowie die daraus ermittelten Standardkurven wurden jeweils nach dem Herstellerprotokoll angefertigt und sind für das zugehörige ELISA spezifisch. Extinktionen und Konzentrationen sind deshalb nur innerhalb desselben ELISAs miteinander vergleichbar. Somit ist es möglich, zu beschreiben, ob sich die Konzentrationen eines Markers in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster verändern. Die Konzentrationen zweier verschiedener Marker bezüglich des gleichen Musters zu vergleichen ist hingegen nicht möglich, da sich zwei getrennter ELISAs mit eigenen Standardkurven bedient wird.

Alle Messungen wurden mit dem gepoolten Knorpelmaterial durchgeführt. Das bedeutet, sämtliche Knorpeldiscs des gleichen Musters aller Patientinnen und Patienten wurden in einem Pool gesammelt, um individuelle Unterschiede der einzelnen Patientinnen und Patienten auszugleichen. Eine besondere Gruppe bildet die Gruppe der *Strings*, da hierbei ein prozentual größerer Teil des Pools aus der Probe des 14-Jährigen Osteosarkom Patienten stammt. Dies war dem geringen Vorkommen von *Strings* in Knorpelproben der OA Patientinnen und Patienten geschuldet.

Sowohl der Standard als auch die Proben wurden in Duplikaten gemessen. Es wurden isolierte Proteine der Muster *Strings*, *Double Strings*, *Small Clusters*, *Big Clusters*

und *Diffuse* auf den enthaltenen Anteil des jeweiligen Antigens getestet. Dies wurde für die Antigene IL-6, IL1- β , OCN, OPN, DKK-1, PECAM-1 sowie FGF-23 durchgeführt. Ein ELISA zu Col10 wurde im Zellbiologischen Forschungslabor der Orthopädie bereits von Frau Dr. Marina Danalache durchgeführt. Ein ELISA zu VEGF, wurde von Herrn Sascha Hemayatkar-Fink vorgenommen [136]. Aufgrund der begrenzt verfügbaren Probenmenge wurden diese beiden ELISAs nicht nochmals wiederholt. Einbezogen in die Auswertung wurden alle Ergebnisse, die innerhalb der Nachweisgrenze lagen. Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze werden im Folgenden mit *nicht nachweisbar (NN)* gekennzeichnet. Aus Extinktionswerten der Einzelmessungen wurde, mit Hilfe der verwendeten Standardreihen, eine Konzentration des jeweiligen Proteins in pg/ml berechnet. Aus den Einzelwerten der Duplikate wurde anschließend der Mittelwert gebildet. Zudem wurde für die Messungen der Duplikate ein Variationskoeffizient (CV) als Streuungsmaß berechnet und angegeben.

Im Folgenden erfolgt die tabellarische Aufschlüsselung der einzelnen Arbeitsschritte nach ELISA Kit (Tabelle 11).

Tabelle 11: ELISA Kurzprotokolle der Marker DKK1, FGF-23 und IL-1 β

DKK1	FGF-23	Interleukin-1 β
100 μ l Standard bzw. Probe pro Well pipettieren	100 μ l Standard bzw. Probe pro Well pipettieren	100 μ l Standard bzw. Probe pro Well pipettieren
Inkubation bei 4°C über Nacht	Inkubation bei 4°C über Nacht	50 μ l Biotinkonjugat zugeben
4x Waschen mit je 300 μ l Waschpuffer	4x Waschen mit je 300 μ l Waschpuffer	Inkubation für 2h bei RT
100 μ l Biotinkonjugat zugeben	100 μ l Biotinkonjugat zugeben	3x Waschen mit je 400 μ l Waschpuffer
Inkubation für 1 h bei RT	Inkubation für 1 h bei RT	100 μ l Streptavidin-HRP zugeben
4x Waschen mit je 300 μ l Waschpuffer	4x Waschen mit je 300 μ l Waschpuffer	Inkubation für 1h bei RT

100 µl Streptavidin-HRP zugeben	100 µl Streptavidin-HRP zugeben	3x Waschen mit je 400 µl Waschpuffer
Inkubation für 45 min bei RT	Inkubation für 45 min bei RT	100 µl TMB zugeben
4x Waschen mit je 300 µl Waschpuffer	4x Waschen mit je 300 µl Waschpuffer	Inkubation für 10 min im Dunkeln
100 µl TMB zugeben	100 µl TMB zugeben	100 µl Stop Lösung zugeben
Inkubation für 30 min im Dunkeln	Inkubation für 30 min im Dunkeln	Lesen der Extinktion bei 450 nm
100 µl Stop Lösung zugeben	100 µl Stop Lösung zugeben	
Lesen der Extinktion bei 450 nm	Lesen der Extinktion bei 450 nm	

Tabelle 12: ELISA Kurzprotokolle der Marker PECAM-1, OPN, OCN und IL-6.

PECAM-1, Osteopontin und Osteocalcin	Interleukin-6
50 µl Standard bzw. Probe pro Well pipettieren	100 µl Standard bzw. Probe pro Well pipettieren
50 µl Antikörper Cocktail zugeben	Inkubation für 1h bei RT
Inkubation für 1h bei RT	3x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer
3x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer	100 µl Anti-IL-6-Konjugat zugeben
100 µl TMB zugeben	50 µl Solution A zugeben
Inkubation für 10 min im Dunkeln	Inkubation für 1h bei RT

100 µl Stop Lösung zugeben	3x Waschen mit je 350 µl Waschpuffer
Lesen der Extinktion bei 450 nm	200 µl TMB zugeben
	Inkubation für 15 min im Dunkeln
	100 µl Stop Lösung zugeben
	Lesen der Extinktion bei 450 nm

ELISAs für die Marker Col10 sowie VEGF wurden in der Arbeitsgruppe bereits von Herrn Sascha Hemayatkar-Fink durchgeführt [136]. Aufgrund des enormen Aufwands der Probengewinnung wurden diese Experimente nicht wiederholt. Dank der freundlichen Genehmigung von Herrn Hemayatkar-Fink können die Ergebnisse dennoch an entsprechender Stelle im Sinne der Vollständigkeit des hier präsentierten Projektes dargestellt und diskutiert werden. Im Unterschied zu dieser Arbeit wurden bei Herrn Hemayatkar-Fink jeweils drei Proben jedes Musters jeweils in Duplikaten bestimmt. Die Mittelwerte und Variationskoeffizienten wurden anschließend aus den sechs Einzelwerten bestimmt und im Ergebnisteil graphisch und tabellarisch dargestellt. Diese Ergebnisse sind in der abgeschlossenen Promotionsschrift von Herrn Hemayatkar-Fink ebenfalls aufgeführt.

2.2.5 Durchführung der Western Blots

Für die drei untersuchten Apoptosemarker wurden Western Blots durchgeführt, da hier die Immunfluoreszenzen schwach ausfielen, sodass unklar schien, ob überhaupt von einem Vorkommen in arthrotischem Gelenkknorpel ausgegangen werden konnte. Zudem wird für Western Blots erfahrungsgemäß weniger Gesamtprotein benötigt, was angesichts der geringen verfügbaren Proteinmenge einen Vorteil darstellte.

Western Blots ermöglichen eine semiquantitative Auswertung über die Intensität der jeweiligen Bande. Die Housekeeping Proteine dienen hierbei als Referenz und zur

Überprüfung, ob die Taschen mit ausreichender Proteinmenge befüllt waren sowie damit Fehler der technischen Durchführung ausgeschlossen werden können.

2.2.5.1 Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinisolation für die Durchführung der Western Blots wurde wie in 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration schloss sich wie in 2.2.4.2. ausgeführt an.

2.2.5.2 Herstellung der Gele

Ein Gel bestand aus je einem Trenngel und einem Sammelgel. Zunächst wurden die Trenngele (10 %) hergestellt, wobei jeweils zwei Gele gleichzeitig gegossen wurden. Dafür wurden 7,9 ml ddH₂O, 6,7 ml 30% (v/v) Acrylamid, 5 ml 1,5 M Tris/HCL (Trenngelpuffer, pH 8,8) sowie 100 µl 20 % (v/v) SDS in einem Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurden 200 µl 10 % (v/v) APS sowie 8 µl TEMED hinzugefügt, was zu einem Start der Auspolymerisierung führte. Die Trenngele wurden in eigens dafür vorgesehene Gelstationen zwischen zwei Glasplatten gegossen. Um Luftblasen an der Oberkante zu vermeiden wurden 300 µl Isopropanol aufpipettiert. Der Rest des Trenngels wurde im Reaktionsgefäß belassen und regelmäßig darauf überprüft, ob eine vollständige Auspolymerisation stattgefunden hatte.

Sobald die Trenngele eine ausreichende Festigkeit erreicht hatten, wurde das Isopropanol abgegossen und mit der Herstellung des Sammelgels (5%) begonnen. Für zwei Gele wurden 5,5 ml ddH₂O, 1,3 ml 30 % (v/v) Acrylamid, 1 ml 1 M Tris/HCl (Sammelgelpuffer, pH 6,8) sowie 40 µl 20 % (v/v) SDS miteinander vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 µl 10 % (v/v) APS und 8 µl TEMED gestartet. Die Sammelgele wurden oben auf die Trenngele gegossen und die Kämme zur Formung der Taschen eingelegt. Anschließend wurde gewartet, bis die Sammelgele vollständig auspolymerisiert waren. Die fertigen Gele wurden entweder direkt weiterverwendet oder bis zum nächsten Tag in feuchte Tücher gewickelt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.5.3 Vorbereitung der Proben und Start des Laufs

Um die Geltaschen mit den jeweiligen Proben zu befüllen, wurde zunächst die Biorad-Station vorbereitet. Hierzu wurde diese mit Laufpuffer aufgefüllt und die Gele in die dafür

vorgesehene Halterung eingespannt. Nach dem Herausziehen des Kammes wurden die Taschen des Gels einzeln mit einer Kanüle und Laufpuffer gespült, um Gelreste aus den Taschen zu entfernen, da diese den Lauf behindern würden.

Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden jeweils 30 µg Protein der Chondrozytenmuster (S, DS, SC, BC, Dif) bzw. der Positivkontrolle (PK) entnommen, in Eppendorfgefäße überführt und mit Probenpuffer auf 20 µl aufgefüllt. Der Probenpuffer bestand aus 1,25 ml Tris/HCl (pH 6,8), 2 ml SDS (4 % (v/v)), 2 ml Glycerin (20 % (v/v)), 1 ml β-Mercaptoethanol (10 % (v/v)) sowie einigen Krümeln Bromphenolblau (0,05 % (w/v)). Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Nach kurzer Abzentrifugation wurde das gesamte Volumen einer Probe nach einem vorher festgelegten Pipettierschema (sh. 2.2.5.8) in die dafür vorgesehene Tasche des Gels pipettiert. Zudem wurden pro Gel in je zwei Taschen der Komigrationsstandard pipettiert, der beim späteren Schneiden der Membranen als Orientierung diente. In je zwei weitere Taschen wurde der Magic Marker gegeben, der erst nach Entwicklung sichtbar wurde und dann der Zuordnung der Banden diente. An die Station wurden pro Gel 17 mA bei maximaler Spannung angelegt, wodurch der Lauf der Proteine gestartet wurde. Der Lauf wurde beendet, wenn die jeweilige Lauffront beinahe aus dem Gel herausgelaufen war und somit eine größtmögliche Auftrennung der Proteine erreicht war, was nach etwa 2 h der Fall war.

2.2.5.4 Blotting

Für den Prozess des Blotting wurden zunächst die benötigten Puffer hergestellt. Für den Elektrodenpuffer wurden 150,14 g Glycin (2 M) und 30,285 g Tris (250 mM) mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Der Blotpuffer hingegen bestand aus 100 ml Elektrodenpuffer, 200 ml Methanol und 700 ml ddH₂O. Zur Vorbereitung wurden anschließend die Schwämme und das Whatmanpapier in dem Blotpuffer eingeweicht. Die Membran wurde erst für 10 s in 100 % (v/v) Methanol getaucht, anschließend mit ddH₂O gewaschen und bis zum Blotting zum Feuchthalten in den Blotpuffer gelegt. Nun wurde das Gel freigelegt und vorsichtig das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt. Der Aufbau eines Blots folgte nachfolgendem Schema: Ein Schwamm wurde als Basis in den Blotpuffer gelegt. Darauf wurde ein angefeuchtetes Whatmanpapier gegeben. Dem folgte die Membran, auf die die Proteine geblottet werden sollten, sowie ein Gel. Auf das Gel

wurde ein weiteres Whatmanpapier sowie abschließend ein Schwamm gelegt. Es wurde darauf geachtet, die noch enthaltene Luft vollständig herauszustreichen, bevor das Blotsandwich vorsichtig verschlossen wurde. Dieses Blotsandwich wurde nun in die Blotkammer überführt, die mit Blotpuffer aufgefüllt wurde. Das Blotting geschah über Nacht bei einer Spannung von 20 V.

2.2.5.5 Antikörperinkubation

Am nächsten Tag wurde zunächst eine TBS-T Lösung hergestellt. Hierfür wurden 75 ml 1M NaCl mit 2,5 ml 20 % (v/v) Tween sowie 50 ml 1MTris/HCl (pH 7,5) gemischt und mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 20 µl Tinte in 20 ml der TBS-T Lösung verdünnt, die Membranen aus dem Blotpuffer geholt und für 15 Minuten auf einem Rüttler mit der Tintenlösung inkubiert, um eine erfolgreiche Proteinbindung nachzuweisen. Dem folgte ein Blockschritt für 30 Minuten in 5 % (w/v) Milchpuffer verdünnt in TBS-T. Anschließend wurde die Membran bei Bedarf anhand des sichtbaren Protein-Komigrationsstandard in die entsprechenden Abschnitte geschnitten, sodass jeder Abschnitt einzeln mit den passenden Antikörpern behandelt werden konnte. Als nächstes folgte die Verdünnung der Primärantikörper, wobei jeder Antikörper eine spezifische Verdünnung benötigte, die im Folgenden tabellarisch dargestellt ist (Tabelle 13).

Tabelle 13: Verdünnungen der Primärantikörper für die Western Blots

Primärantikörper	Konzentration	Verdünnt in	Tier
Aktive Caspase-3	1:500	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T	Rabbit
Aktive Caspase-8	1:250	5% (w/v) BSA in TBS-T	Rabbit
p53	1:500	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T	Rabbit

PCNA	1:2000	5% (w/v) Milchpulver in TBS-T	Mouse
β -Tubulin	1:2000	5% (w/v) BSA in TBS-T	Rabbit
GAPDH	1:1000	5% (w/v) BSA in TBS-T	Rabbit

Die Membranen wurden in die zugehörige Antikörperverdünnung gegeben und auf einem Rollschüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen zunächst dreimal für je 15 Minuten auf einem Schüttler in TBS-T gewaschen. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde dieser 1:10000 in 10 % (w/v) Milchpuffer mit TBS-T verdünnt. Anschließend wurden die Membranen für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler inkubiert. Daraufhin wurde der dreimalige Waschschrift wiederholt und die Membranen bis zur Entwicklung in TBS-T belassen, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.2.5.6 Entwicklung

Für die Entwicklung der Membranen wurden die ECL-Lösungen im Verhältnis 1:1 auf die Membran pipettiert. Die Membran wurde mit Folie bedeckt, die Flüssigkeit herausgedrückt und darauf geachtet, dass keine Luftblasen mehr enthalten waren. Abschließend folgte die automatische Entwicklung für 12 Minuten mit einem Blot Scanner (C-Digit, Licor).

2.2.5.7 Gelbeladung zur Testung der Positivkontrolle

Da für jeden Marker (CASP3, CASP8 und p53) eine Positivkontrolle (PK) benötigt wird, musste vor der Durchführung der Experimente zunächst eine PK hergestellt überprüft werden. Hierzu wurde wie in 2.2.3.3. beschrieben, mittels Staurosporin gezielt Apoptose in Melanomzellen induziert. Anschließend wurden daraus wie in 2.2.5.1. aufgezeigt die Proteine isoliert, die somit auch Apoptosemarker enthalten sollten. Nach bekanntem Ablauf (sh. 2.2.5.2 – 2.2.5.6) wurde dann ein Western Blot durchgeführt, in dem das

isolierte Protein daraufhin überprüft wurde, ob es die Apoptosemarker CASP3, CASP8, und p53 in hinreichenden Mengen beinhaltet.

Nachfolgend ist eine schematische Zeichnung der Membranbeladung, das Schneiden der Membran sowie Antikörperbehandlung abgebildet (Abbildung 9). Neben der drei Apoptosemarker wurden die beiden Housekeeping Proteine β -Tubulin und PCNA mitgetestet, um technische Fehler auszuschließen.

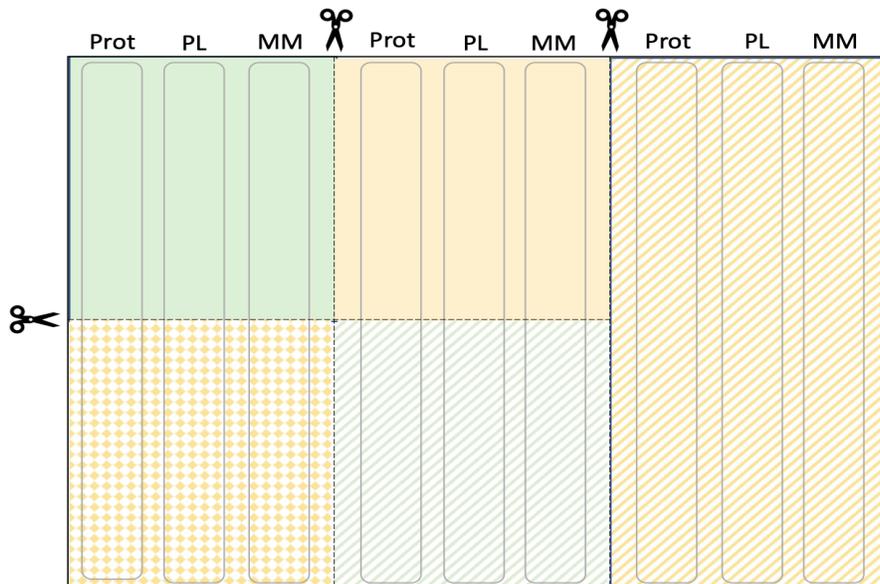


Abbildung 9: Western Blot Beladung und Antikörperanwendung. Abkürzungen: Magic Marker (MM), Protein Ladder (PL)(Komigrationsstandard), aus apoptotischen Zellen isoliertes Protein (Prot). Die hinterlegten Farben verweisen auf das jeweilige Protein, gegen das der spezifische Primärantikörper gerichtet war. Die Apoptosemarker sind hierbei in Gelb, die Housekeeping Proteine in grün dargestellt: CASP3 (gelb kariert), p53 (flächig gelb), CASP8 (gelb gestreift), β -Tubulin (flächig grün), PCNA (grün gestreift). Die gestrichelten Linien sowie die Scheren Piktogramme indizieren die Stellen, an denen die Membran vor der Zugabe des jeweiligen Antikörpers geschnitten wurde. Es wurde für jeden Membranteil ein eigener MM sowie eine eigene PL verwendet.

2.2.5.8 Gelbeladung zur Überprüfung der Apoptosemarker

Um die Chondrozytenmuster (S, DS, SC, BC und Dif) auf die drei Apoptosemarker (CASP3, CASP8 und p53) zu testen, wurde für jeden Marker je eine Membran verwendet. Das Beladungsschema für alle drei Gele war identisch. Im Folgenden ist deshalb exemplarisch die Membran 1 für CASP3 abgebildet (Abbildung 10). Das Schema kann analog auf die beiden anderen Membranen bzw. Proteine übertragen werden kann.

Da die Banden der Proteine CASP3 und CASP8 zu nahe an der Bande des Housekeeping Proteins GAPDH (36 kDa) lagen, mussten das gesuchte Protein und das Housekeeping Protein nacheinander nachgewiesen werden. Hierzu wurde zuerst die entsprechende

Antikörperfärbung des Apoptosemarkers durchgeführt und entwickelt. Anschließend wurde die Membran gestrippt und der Prozess für GAPDH wiederholt. Nachfolgend sind für diese Membranen beide Gene deshalb auf getrennten Bildern dargestellt. Bei Membran 3, die für p53 vorgesehen war, konnte eine andere Methode verwendet werden. Aufgrund des ausreichenden Abstands der Banden wurde die Membran zwischen den Bereichen 36 kDa (GAPDH) und 53 kDa (p53) geschnitten, eine getrennte Antikörperfärbung durchgeführt und die beiden Teile abschließend gemeinsam entwickelt. Auf den Bildern dieser Membran werden nachfolgend deshalb GAPDH und p53 zusammen abgebildet.

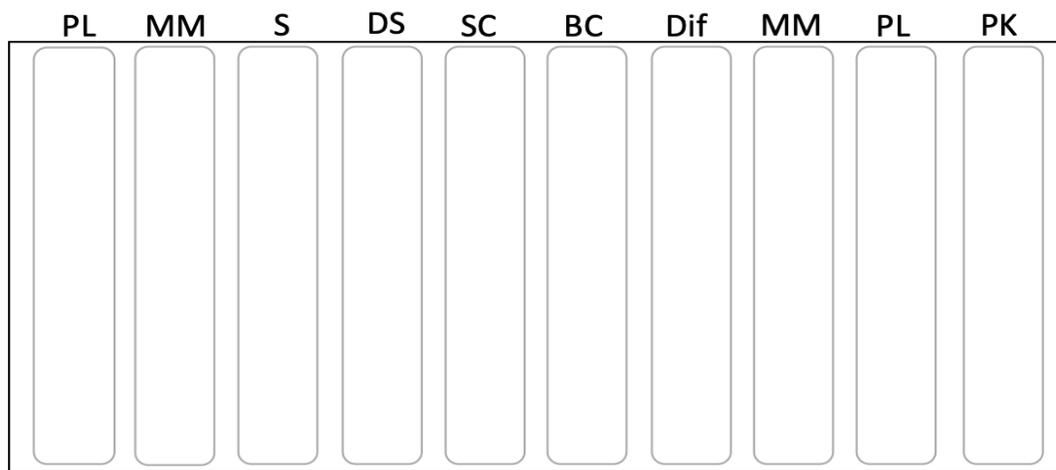


Abbildung 10: Beladungsschema der 1. Membran zum Nachweis von CASP3. Das Schema ist übertragbar auf Membran 2 (CASP8) und Membran 3 (p53). Es wurden jeweils zwei Taschen mit der Protein Ladder und zwei dem Magic Marker befüllt. Die eingesetzte Proteinmenge betrug in jeder Tasche 30 µg. Abkürzungen: Protein Ladder (PL), Magic Marker (MM), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif) Positivkontrolle (PK).

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Charakteristika der Studienpopulation

Knorpelproben von insgesamt 92 Patientinnen und Patienten, die sich einer Operation zur Implantation einer Knie-TEP unterzogen, wurden bei den Experimenten verwendet. Aufgrund des Mangels an Discs des Musters *Strings* in den Proben dieser Patientinnen und Patienten wurde zudem eine größere Knorpelmenge eines 14-jährigen Osteosarkompatienten miteinbezogen, dessen Femurkondylen nicht vom Osteosarkom betroffen waren.

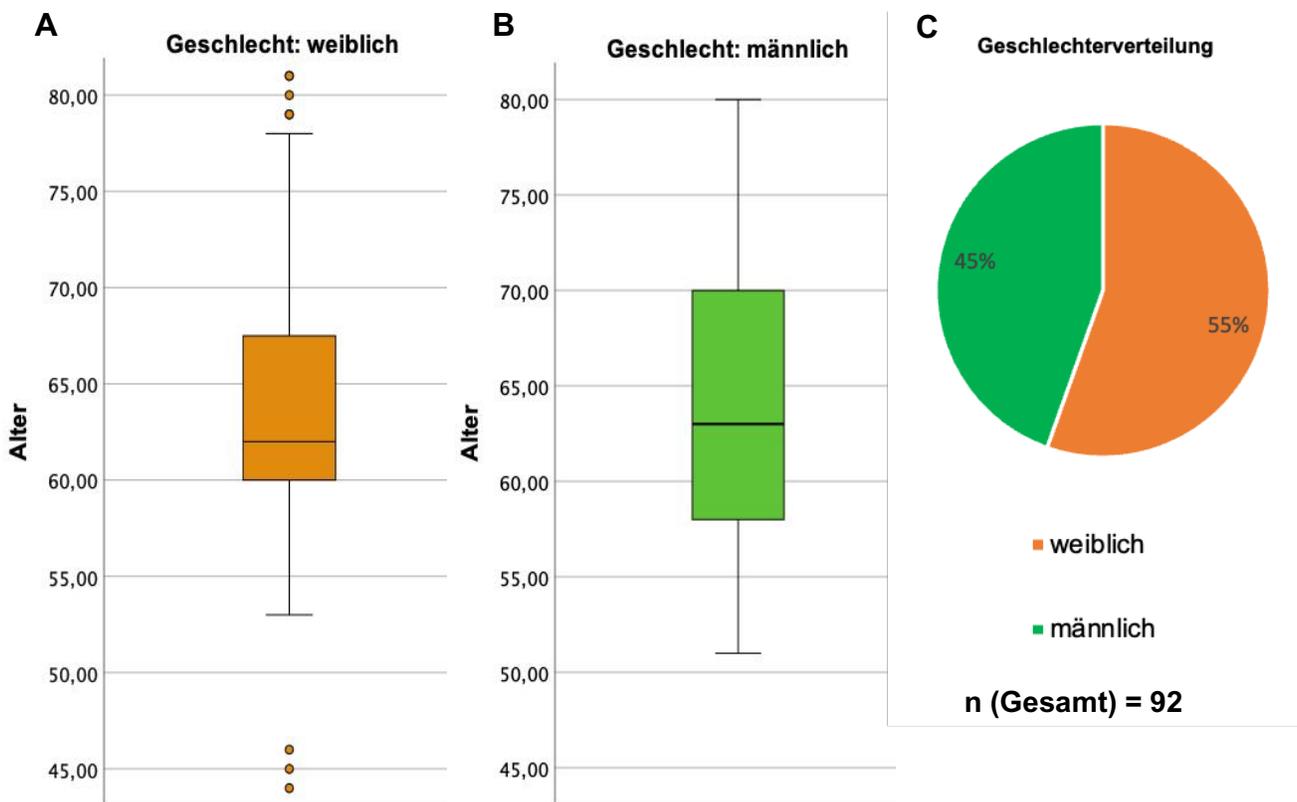


Abbildung 11: Alters- und Geschlechtsverteilung der Studienpopulation. Abgebildet ist die Verteilung aller Patientinnen und Patienten denen eine Knie-TEP aufgrund der Osteoarthritis implantiert wurde. Der 14-jährige Osteosarkom-Patient ist somit nicht abgebildet. Das Alter der Frauen bei Operation (A) lag zwischen 44 und 81 Jahren mit einem Median von 63,9 Jahren. Die Männer (B) waren zum OP-Zeitpunkt zwischen 51 und 80 Jahren alt, sowie im Median 64,1 Jahre. Von den insgesamt 92 Patientinnen und Patienten waren 51 Personen weiblichen und 41 männlichen Geschlechts (C).

Mit 63,9 Jahren war das mediane Alter (Abbildung 11A) der Frauen bei Operation vergleichbar mit dem der Männer (Abbildung 11B), die zum Operationszeitpunkt im

Median 64,1 Jahre alt waren. Der Anteil der Patientinnen lag mit 55% etwas über dem der Patienten (Abbildung 11C).

3.2 Auswertung der Apoptosemarker

3.2.1 Überprüfung der Positivkontrolle im Western Blot

Um mittels Western Blots stichhaltige Aussagen über das Vorkommen der Marker CASP3, CASP8 und p53 zu machen, wurde die angefertigte Positivkontrolle auf ihre Funktion überprüft.

Sowohl die Housekeeping Proteine als auch die getestete Apoptosemarker konnten an den jeweils vom Hersteller angegebenen Stellen nachgewiesen werden (Abbildung 12). Bei den Housekeeping Proteinen entsprach dies 55 kDa für β -Tubulin und 36 kDa für PCNA. Bei den Apoptosemarkern wiederum 17 & 35 kDa für CASP3, 53 kDa für p53 und 18, 41 & 43 kDa für CASP8. Es war somit davon auszugehen, dass eine funktionierende Positivkontrolle hergestellt wurde, in der die Apoptosemarker CASP3, CASP8 sowie p53 in ausreichender Menge enthalten waren. Die hergestellte Probe konnte somit in den Folgeexperimenten als Positivkontrolle eingesetzt werden.

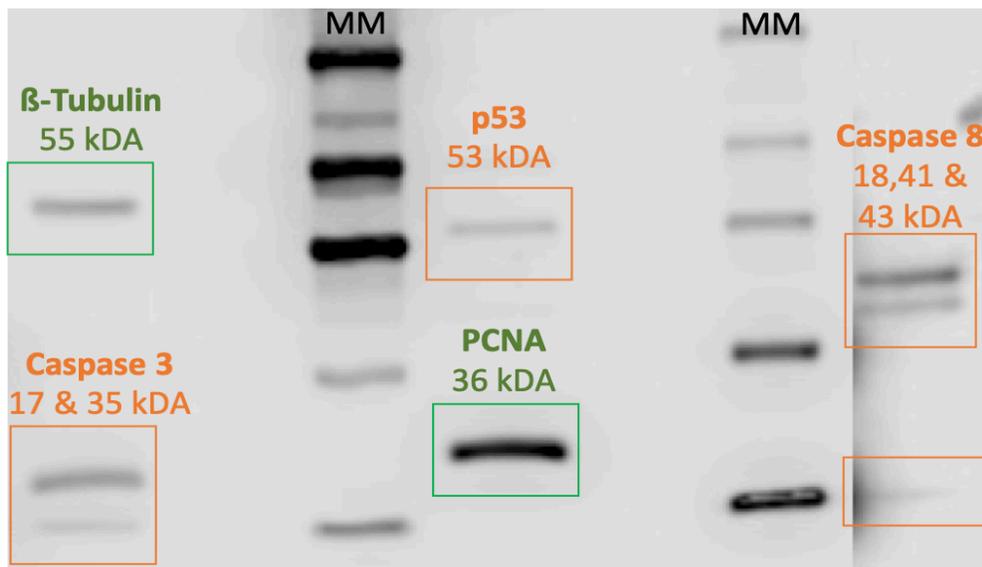


Abbildung 12: Nachweis der Apoptosemarker in der Positivkontrolle mittels Western Blot. Die Housekeeping Proteine sind in grün dargestellt, die drei Apoptosemarker sind orange markiert. Die kDa Angaben laut Herstellerprotokoll sind für jeden Marker aufgeführt. Es zeigt sich eine entsprechende Bande für die Housekeeping Proteine β -Tubulin bei 55 kDa und PCNA bei 36 kDa, sowie für die Marker CASP3 bei 17 und 35 kDa, p53 bei 53 kDa sowie CASP8 bei 18, 41 und 43 kDa. Abkürzungen: Magic Marker (MM), Kilodalton (kDa).

3.2.2 CASP3

In der Immunfluoreszenzfärbung des Apoptosemarkers CASP3 war nur ein geringes Vorkommen des Biomarkers nachzuweisen (Abbildung 13). Lediglich um einige Zellen konnte ein schmaler Randsaum des Signals wahrgenommen werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Chondrozytenmustern (S, DS, SC, BC, Dif) war nicht nachweisbar.

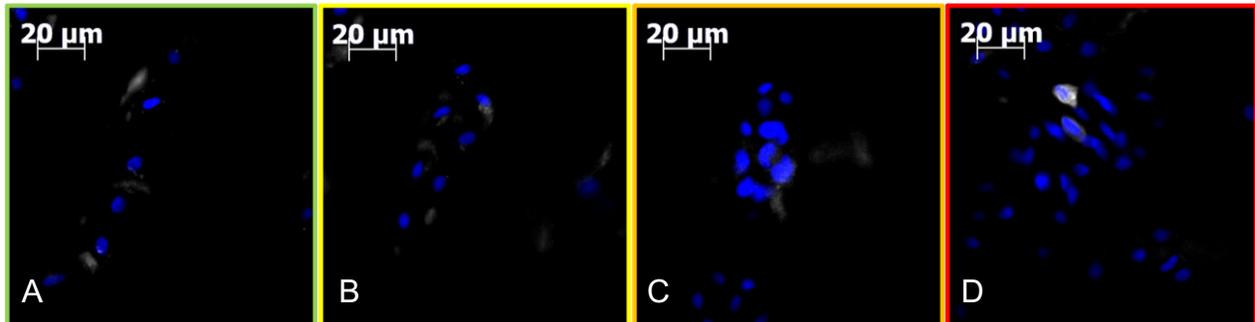
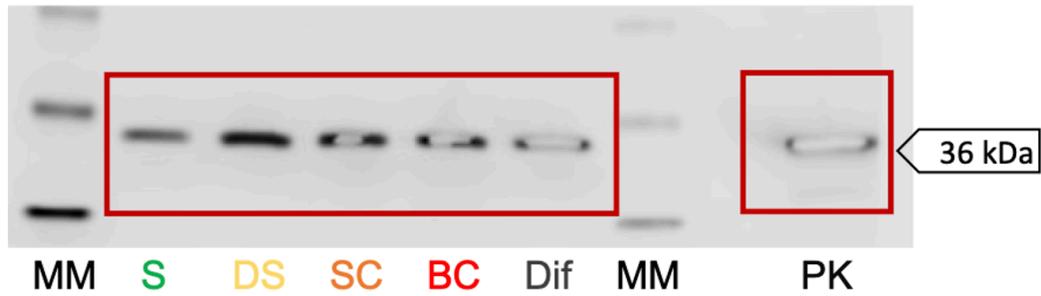


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der CASP3 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Lediglich um einige wenige Zellen zeigt sich ein Fluoreszenzsignal, das ein Vorkommen von CASP3 nachweist. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die entwickelten Western Blots zeigten eine eindeutige Bande bei 36 kDa (Abbildung 14A), was einem Nachweis des Housekeeping Proteins GAPDH in allen Mustern sowie der Positivkontrolle entspricht. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass in allen Proben ausreichend Gesamtprotein enthalten war. Auffallend ist, dass die Intensität der Banden von links nach rechts also von den *Strings* bis zu dem *diffusen Knorpel* und der Positivkontrolle zunimmt. Auch die weißen Stellen innerhalb der Banden, die durch sehr starkes Signal entstehen, verstärkten sich von links nach rechts.

Die Banden in der Positivkontrolle bei 35 kDa und 17 kDa entsprechen dem Vorkommen des Apoptosemarkers CASP3 (Abbildung 14B). Im Bereich der Strings waren solche Banden nicht nachweisbar, was gegen ein Vorkommen des Apoptosemarkers spricht. Von den Proben der *Double Strings* über die *Small Cluster* und *Big Cluster* bis hin zum *diffusen Knorpel* sind entsprechende Banden nachweisbar, wobei diese von links nach rechts an Intensität gewinnen.

(A) GAPDH (Housekeeping Protein)



(B) CASP3 (Apoptosemarker)

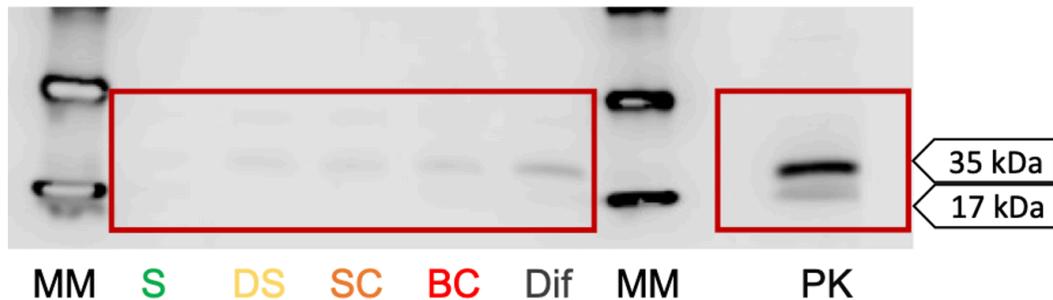


Abbildung 14: Nachweis von CASP3 und GAPDH mittels Western Blot. (A) Nachweis des Housekeeping Proteins GAPDH bei 36 kDa in allen Chondrozytenmustern und der Positivkontrolle mit steigender Intensität von links nach rechts. **(B)** Nachweis von CASP3 bei 35 kDa und 17 kDa in der Positivkontrolle sowie in den Mustern DS, SC, BC, Dif mit zunehmender Intensität von links nach rechts. Im Bereich der S sind keine Banden an entsprechender Stelle sichtbar. Abkürzungen: Magic Marker (MM), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif), Positivkontrolle (PK), Kilodalton (kDa).

3.2.3 CASP8

In der indirekten Immunfluoreszenz des Apoptosemarkers CASP8 ergab sich in keinem der Chondrozytenmuster ein Signalnachweis (Abbildung 15). Dies spricht gegen ein Vorkommen dieses Biomarkers in den jeweiligen Proben in höheren Konzentrationen bzw. dafür, dass das Epitop unvollständig demaskiert oder zerstört wurde.

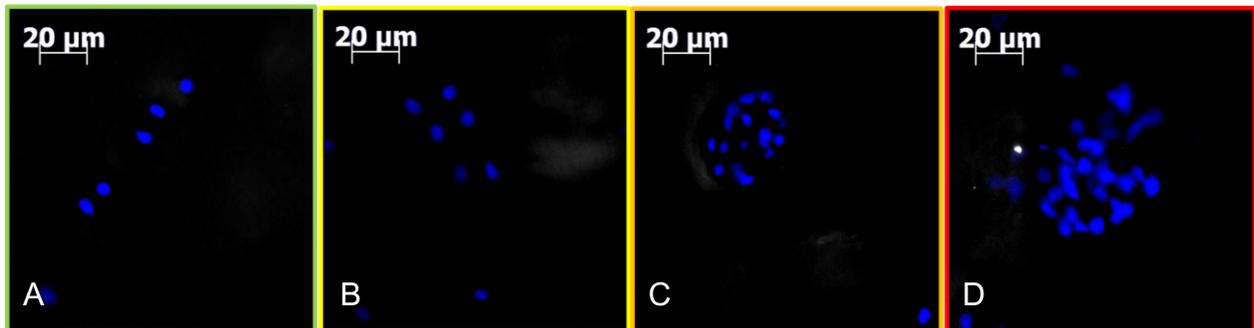


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der CASP8 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Es lässt sich kein Fluoreszenzsignal entsprechend CASP8 nachweisen. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Nach Entwicklung der Western Blots war eine deutliche Bande bei 36 kDa zu sehen (Abbildung 16A), was einem Vorkommen des Housekeeping Proteins GAPDH in allen Chondrozytenmustern und der Positivkontrolle entspricht. Damit kann festgehalten werden, dass in allen Proben ausreichend Gesamtprotein enthalten war, um ein Ergebnis zu erzielen und der Western Blot technisch korrekt durchgeführt wurde. Auch hierbei lässt sich eine leicht steigende Intensität der Banden von links nach rechts beobachten.

In Abbildung 16B ist zu sehen, dass die Positivkontrolle zwei Banden bei 43 kDa und 41 kDa aufweist, sowie eine dritte, eher schwach ausgeprägte Bande bei 18 kDa. Dies entspricht den Banden, die bei einem Vorkommen des Enzyms CASP8 zu erwarten sind. Die Positivkontrolle spricht also für ein korrektes Durchführen des Experiments. Es zeigte sich, dass für alle weiteren Chondrozytenmuster (S, DS, SC, BC, Dif) die 41 kDa und 43 kDa Banden fehlen, welche in der Positivkontrolle die stärker ausgeprägten Banden sind. Im Bereich der 18 kDa Bande lässt sich das Ergebnis nicht eindeutig beurteilen, da sich eine leichte Verschattung aber keine eindeutige Bande im Bereich der BC und Dif zeigt. Allerdings wäre im Bereich von 18 kDa eher eine schwächere Ausprägung der Banden als bei 43 kDa und 41 kDa zu erwarten, wie dies in der Positivkontrolle der Fall ist. Deshalb

ist eher davon auszugehen, dass der Apoptosemarker aktive CASP8 in den getesteten Chondrozytenmustern nicht in ausreichenden Konzentrationen enthalten war.

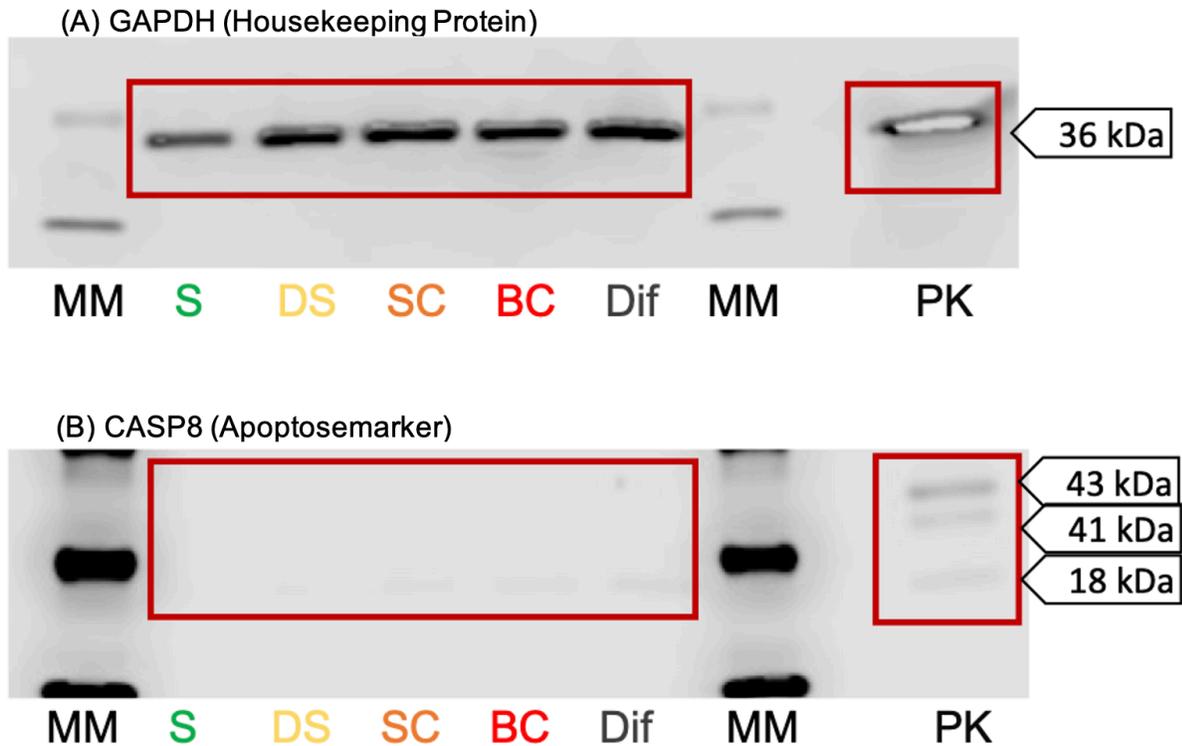


Abbildung 16: Nachweis von CASP8 und GAPDH mittels Western Blot. (A) Nachweis des Housekeeping Proteins GAPDH bei 36 kDa in allen Chondrozytenmustern und der Positivkontrolle mit zunehmender Intensität von links nach rechts. **(B)** Nachweis von CASP8 in der Positivkontrolle bei 18, 41 und 43 kDa. Fehlende Banden für CASP8 in den Chondrozytenmustern S, DS, SC, BC, Dif. Abkürzungen: Magic Marker (MM), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif), Positivkontrolle (PK), Kilodalton (kDa).

3.2.4 p53

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte kein Signal bei der Anfärbung des Apoptosemarkers festgestellt werden (Abbildung 17). Es ist somit davon auszugehen, dass der Biomarker in den Präparaten für diese Nachweistechnik nicht in ausreichenden Konzentrationen vorkam oder das Epitop während des Färbeprozesses zerstört oder nur unvollständig demaskiert wurde.

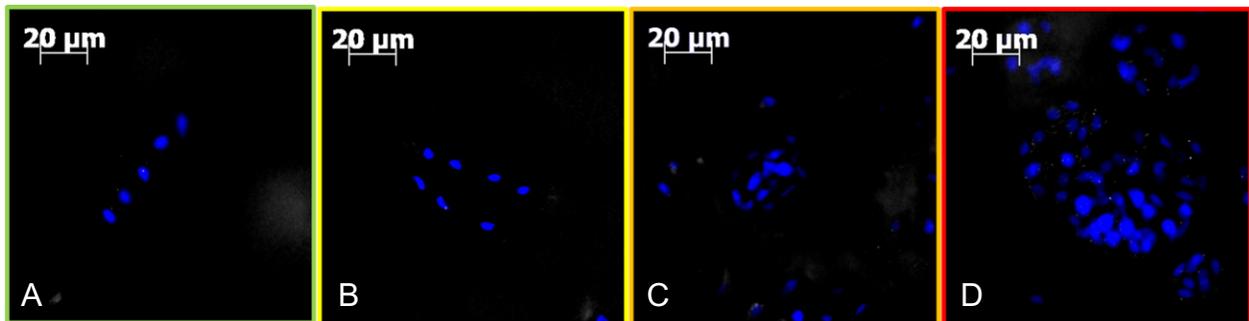
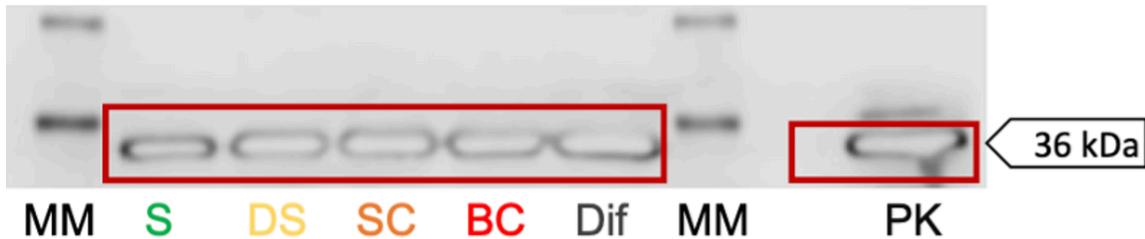


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung von p53 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: Strings (A), Double Strings (B), Small Clusters (C), Big Clusters (D). Für p53 ist kein Fluoreszenzsignal nachweisbar. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Das Ergebnis des Western Blots (Abbildung 18A) zeigt die für GAPDH charakteristische Bande bei 36 kDa in allen Chondrozytenmustern sowie der verwendeten Positivkontrolle. Es wurde demnach eine ausreichende Menge an Gesamtprotein verwendet. Es zeigt sich eine leichte Zunahme der Bandenintensität von links nach rechts.

Aus Abbildung 18B wird deutlich, dass die Positivkontrolle eine Bande bei 53 kDa aufweist. Dies entspricht der Bande des Apoptosemarkers p53, der somit nachgewiesen wurde. Entsprechend der Positivkontrolle ist also von einem Funktionieren des Western Blots auszugehen. Weiterhin zeigte sich, dass keine Bande bei 53 kDa in den übrigen Chondrozytenmustern (S, DS, SC, BC, Dif) erschien. Daraus ist zu folgern, dass das Enzym p53 in keinem der Chondrozytenmuster in hinreichender Menge vorhanden war.

(A) GAPDH (Housekeeping Gen)



(B) p53 (Apoptosemarker)

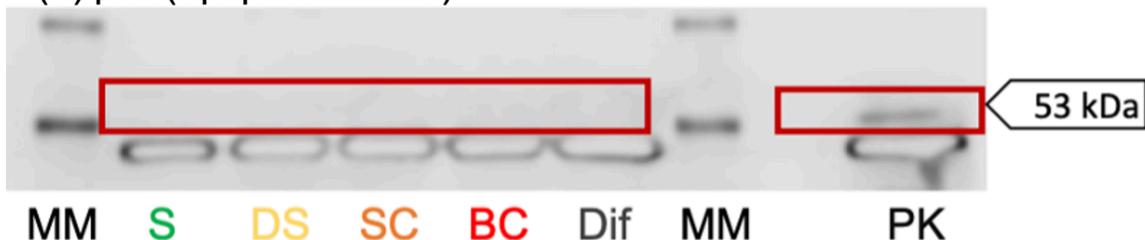


Abbildung 18 Nachweis von p53 und GAPDH mittels Western Blot. (A) Nachweis des Housekeeping Proteins bei 36 kDa in allen Chondrozytenmustern und der Positivkontrolle mit Zunahme der Intensität von links nach rechts. (B) Nachweis von p53 in der Positivkontrolle. Keine nachweisbaren Banden in den Chondrozytenmustern S, DS, SC, BC, Dif. Abkürzungen: Magic Marker (MM), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif), Positivkontrolle (PK), Kilodalton (kDa).

3.2.5 Überprüfung der Antikörper gegen die Apoptosemarker

Da die Immunfluoreszenzergebnisse der drei Apoptosemarker CASP3, CASP8 und p53 negativ oder lediglich schwach ausfielen, wurde ein Kontrollexperiment zur Überprüfung der verwendeten Antikörper durchgeführt. Die Überprüfung erfolgte durch Anwendung der Antikörper an Melanomzellen, in denen zuvor mittels Staurosporin Apoptose induziert worden war. Ein hinreichendes Signal der Antikörper an den apoptotischen Zellen war somit bei funktionierendem Antikörper zu erwarten.

Lebend fixierte Zellen, die nicht mit Staurosporin behandelt worden waren, wiesen im Ergebnis kein Signal auf (Abbildung 19A-C). Es hatte somit keine Antikörperbindung an den vitalen Zellen stattgefunden. Unsauberes Arbeiten, eine unspezifische Antikörperbindung oder ein Ausfallen der Antikörper konnte damit ausgeschlossen werden.

Staurosporin löste in den behandelten Zellen apoptotische Prozesse aus. In der Fluoreszenzmikroskopie ist zu sehen, dass bei diesen Zellen eine Antikörperbindung stattfand (Abbildung 19D-F) und somit die Zielproteine CASP3 (Abbildung 19D), p53

(Abbildung 19E), sowie CASP8 (Abbildung 19F) vorhanden waren. Die spezifischen Proteine befanden sich vor allem im Zellkern der Zellen, wo das weiße Signal am stärksten sichtbar ist. Das kräftigste Signal wurde hierbei für den Biomarker p53 erzielt, aber auch für die beiden Caspasen ist ein deutliches Signal sichtbar. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Antikörper spezifisch ihr Antigen binden. Das fehlende Signal in den vorangegangenen Färbungen der Knorpelpräparate war somit nicht auf fehlerhafte Antikörper zurückzuführen.

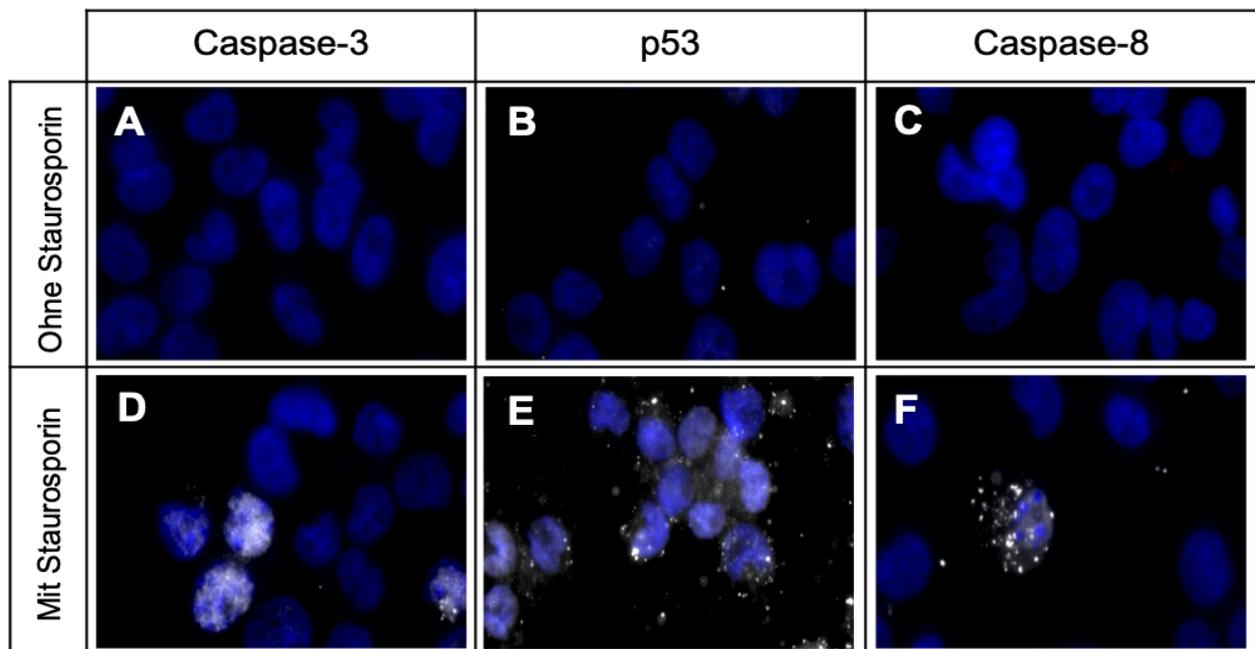


Abbildung 19: Überprüfung der Antikörper gegen die Apoptosemarker. Obere Reihe (A-C) ohne Zugabe von Staurosporin, untere Reihe (D-F) nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin. Es wurden Primärantikörper für die drei Apoptosemarker aktive CASP3 (A, D), p53 (B, E), sowie aktive CASP8 (C, F) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Es war kein Nachweis der Apoptosemarker in den unbehandelten Zellen (A-C) möglich. Für die mit Staurosporin behandelten Kammern lassen sich die Apoptosemarker durch Immunfluoreszenz nachweisen (D-F).

3.3 Auswertung der Angiogenesemarker

3.3.1 VEGF

Ein Nachweis des proangiogenetischen Faktors VEGF mittels Immunfluoreszenz war in allen Mustern in einem schmalen Randsaum um die Zellen möglich (Abbildung 20). Für eine wesentliche Veränderung im Verlauf der Entwicklung von den *Strings* bis hin zu den *Big Clusters* gab es fluoreszenzmikroskopisch keine Anzeichen. Auch ein Anstieg des Signals in der EZM war nicht zu beobachten.

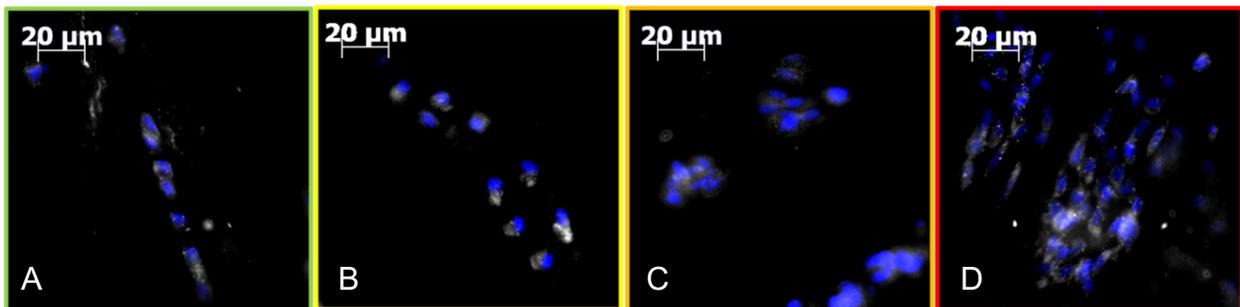


Abbildung 20: Exemplarische Darstellung von VEGF mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist in weiß dargestellt. Von links nach rechts: Strings (A), Double Strings (B), Small Clusters (C), Big Clusters (D). **VEGF war mittels Immunfluoreszenz in allen Mustern nachweisbar. Eine einheitlich steigende oder sinkende Tendenz zeigte sich nicht.** Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Das von Sascha Hemayatkar-Fink im Zuge seiner Promotion durchgeführte ELISA (Abbildung 21, Tabelle 14) ergab, dass die geringste Konzentration des Markers VEGF im Bereich der *Strings* lag. In den Mustern DS, SC und BC konnten erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei das Maximum für die *Double Strings* ermittelt wurde [136]. Allerdings wies dieses Muster zugleich die größte Streuung der Ergebnisse auf.

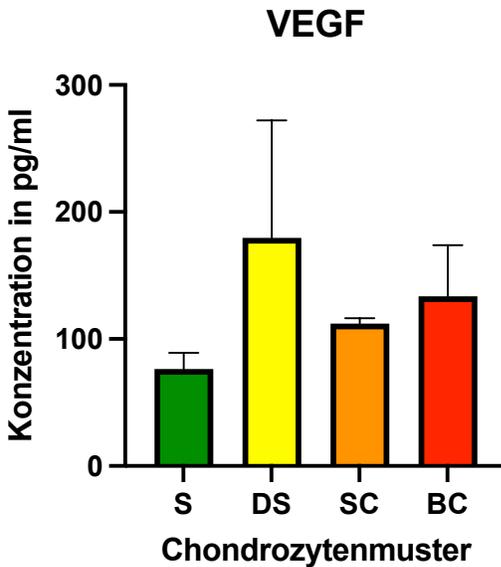


Abbildung 21: Quantitativer Nachweis von VEGF mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Mit freundlicher Genehmigung wurden die Daten von Sascha Hemayatkar-Fink verwendet. Deutlich wird, dass die geringste Proteinkonzentrationen für VEGF im Bereich der Strings lag. Ein Maximum wurde für das Muster der Double Strings ermittelt. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC).

	S		DS		SC		BC	
	\bar{x} pg/ml	(CV)						
VEGF	76,278	(0,169)	179,713	(0,514)	112,068	(0,039)	133,695	(0,301)

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers VEGF. Mit freundlicher Genehmigung wurden die Daten von Sascha Hemayatkar-Fink verwendet. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus allen sechs Messungen in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Tabellarisch ergibt sich die geringste gemessene VEGF-Konzentration mit 76,278 pg/ml für das Muster der Strings. Für die Kategorien DS, SC, BC konnten erhöhte Konzentrationen ermittelt werden, wobei die DS mit 179,713 den höchsten Mittelwert aufweisen. Die Variationskoeffizienten lagen für alle Chondrozytenmuster <1. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC).

3.3.2 PECAM-1

Der proangiogenetische Faktor PECAM-1 konnte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz in allen Stadien der Chondrozytenanordnung nachgewiesen werden (Abbildung 22). Relevante Veränderungen lassen sich im Verlauf der Musterprogression optisch nicht feststellen. In allen Stadien beschränkt sich die Lokalisation des Markers auf ein nukleäres Vorkommen sowie auf einen schmalen Hof, der jeden Chondrozyten direkt umgibt. Das scheinbar vermehrte Signal bei Aufnahme der Cluster rührt in diesem Fall

von der höheren fotografierten Zellzahl her. Ein Anstieg von PECAM-1 in der EZM lässt sich nicht beobachten.

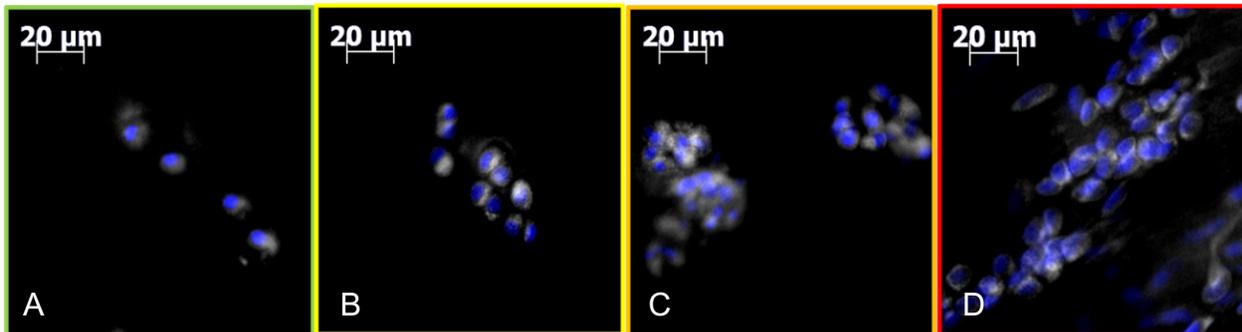


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung von PECAM-1 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). PECAM-1 ließ sich in allen Mustern nachweisen, jedoch ohne nennenswerte Variation zwischen den verschiedenen Chondrozytenmustern. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Auch die Auswertung des ELISAs ergab einen deutlichen Nachweis des Proteins in allen Chondrozytenmustern (Abbildung 23, Tabelle 15). Das mittlere Maximum lag mit 1477,56 pg/ml im Muster der SC, während das Minimum mit 900,58 pg/ml für die DS gemessen wurde. Eine Tendenz in auf- oder absteigender Richtung mit Progression der Zellformation war nicht festzustellen. Die ermittelten Variationskoeffizienten lagen <1.

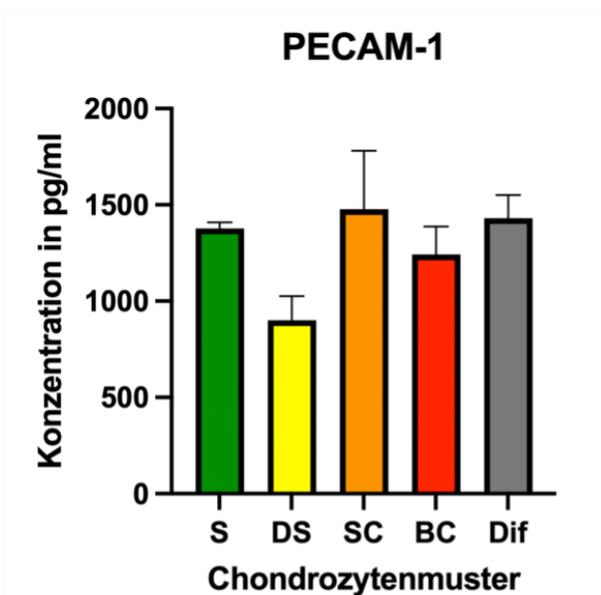


Abbildung 23: Quantitativer Nachweis von PECAM-1 mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Das mittlere Maximum weisen die SC auf, das mittlere Minimum die DS. Eine einheitliche Tendenz ist nicht erkennbar. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif).

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)								
PECAM-1	1377,32	(0,024)	900,58	(0,139)	1477,56	(0,205)	1243,13	(0,116)	1430,32	(0,084)

Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers PECAM-1. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus den Messungen der Duplikate in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Das mittlere Maximum weisen die SC auf, das mittlere Minimum die DS. Sämtliche Variationskoeffizienten lagen deutlich <1 . Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC) und Diffuse (Dif).

3.4 Auswertung der Inflammationsmarker

3.4.1 Interleukin-1 β

Die Anfärbung des Biomarkers IL-1 β zeigt sich im Fluoreszenzmikroskop in allen Mustern eher schwach ausgeprägt (Abbildung 24). Grundsätzlich zeigte sich jedoch in der Immunfluoreszenz eine zunehmende Signalintensität in Abhängigkeit des Chondrozytenmusters von den *Strings* zu den *Big Cluster*. In den Mustern S und DS blieb das Signal auf einen Saum um die einzelnen Chondrozyten begrenzt. Mit Veränderung des Chondrozytenmusters zu SC und BC ließ sich hingegen ein deutlicher Signalzuwachs, insbesondere im Bereich der EZM verzeichnen.

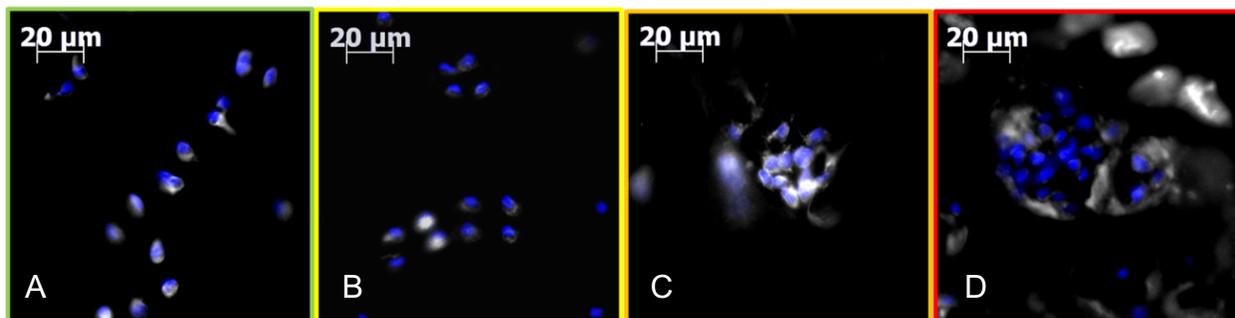


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung von IL-1 β mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). IL-1 β war in allen Mustern nachweisbar und wies eine leicht steigende Tendenz von S zu BC auf, die sich insbesondere in der EZM zeigte. Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Diese Beobachtung wird gestützt durch die Ergebnisse des zugehörigen ELISAs (Abbildung 25, Tabelle 16). Von den *Strings* zu den *Big Cluster* lässt sich ein Anstieg der IL-1 β Konzentration um über 300 % beobachten. Das gemittelte Maximum der Proteinkonzentration lag demnach mit 2,012 pg/ml im Muster BC. Für die weiteren Chondrozytenmuster ist keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Von BC zu Dif zeigte sich

ein starker Abfall der Proteinkonzentration auf das gemessene Minimum von 0,077 pg/ml. Alle Variationskoeffizienten lagen, mit Ausnahme des *diffusen Knorpels*, deutlich <1.

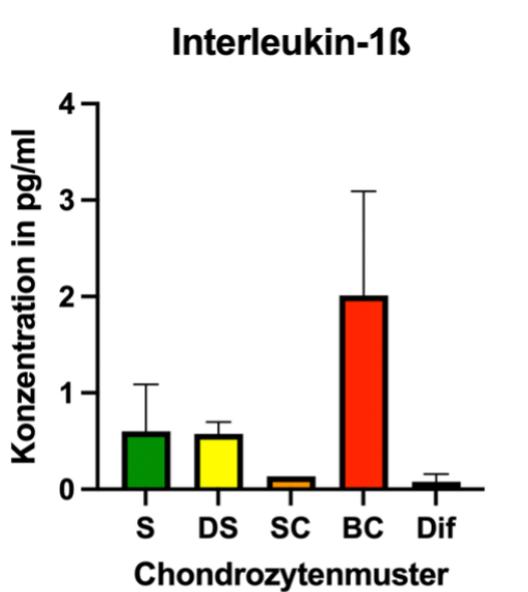


Abbildung 25: Quantitativer Nachweis von IL-1β mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Das mittlere Maximum liegt im Bereich der BC. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif).

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
IL-1β	0,602	(0,810)	0,5574	(0,215)	0,135	(0)	2,012	(0,536)	0,077	(1,053)

Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers IL1-β. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus den Messungen der Duplikate in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Das mittlere Maximum liegt im Bereich der BC. Die Variationskoeffizienten lagen, außer für den diffusen Knorpel, bei <1. Abkürzungen: String (S), Double String (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC) und Diffuse (Dif).

3.4.2 Interleukin-6

In den Immunfluoreszenzen lässt sich ein Signal des Biomarkers IL-6 in allen Mustern nachweisen (Abbildung 26). In den *Strings* und *Double Strings* scheint dieses auf einen schmalen Hof um die Chondrozyten begrenzt zu sein. In den großen Clustern ist ein deutlicher Signalzuwachs sowohl nukleär als auch in der EZM zu erkennen.

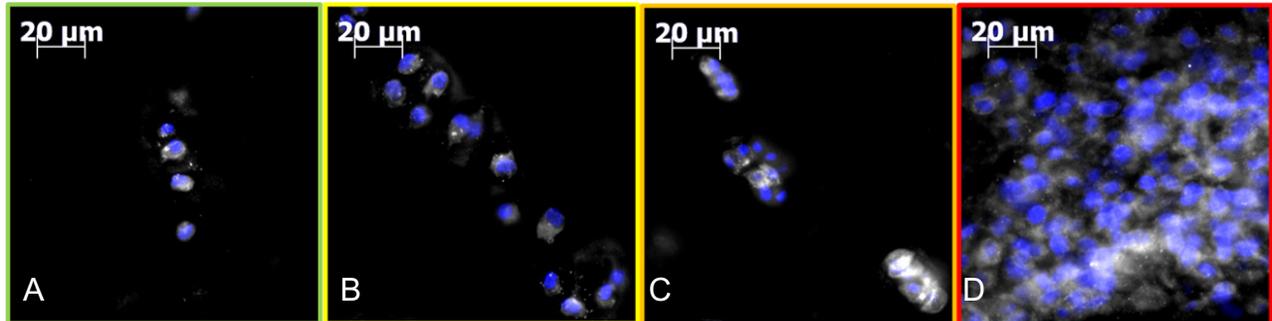


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von IL-6 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Es lässt sich ein Signal in allen Mustern nachweisen, jedoch weist insbesondere im Bereich der BC auch die EZM ein gesteigertes Fluoreszenzsignal auf. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Das IL-6 ELISA (Abbildung 27, Tabelle 17) ergab einen Nachweis des Inflammationsmarkers IL-6 in den *Strings*, *Double Strings*, *Big Cluster* sowie *im diffusen Knorpel*. Die maximale mittlere Konzentration ergab sich hierbei innerhalb des Musters der *Big Cluster* mit 820,43 pg/ml im Mittel. Diese Konzentration sank mit Progression zum *diffusen Knorpel* um etwa 40 % auf (509,93 pg/ml) ab. Eine ähnliche Konzentration wiesen die *Strings* (488,22 pg/ml) auf. Die geringste Proteinmenge wurde mit 3,934 pg/ml für die *Small Cluster* gemessen. Die Variationskoeffizienten lagen für die Muster S, DS, BC, Dif deutlich <1. Für die SC konnte nur in einem der Duplikate eine Konzentration über der Nachweisgrenze gemessen werden. Das zweite Duplikat verblieb ohne nachweisbare IL-6 Konzentration (NN). Daher ergibt sich für dieses Muster ein sehr hoher CV-Wert von 141,421.

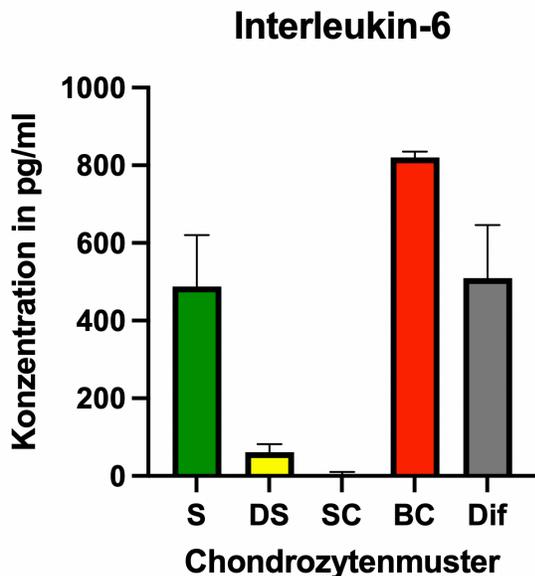


Abbildung 27: Quantitativer Nachweis von IL-6 mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Hohe Konzentrationen sind für die S, BC und Dif nachweisbar. Niedrige Konzentrationen hingegen für DS und SC. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif).

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
IL-6	488,222	(0,271)	61,081	(0,347)	3,934	(141,421)	820,433	(0,018)	509,933	(0,268)

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers IL-6. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus den Messungen der Duplikate in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. S, BC und Dif weisen hohe Proteinkonzentrationen auf, wobei das Maximum mit 820,433 pg/ml im Bereich der BC liegt. DS und SC enthalten nur geringe IL-6 Konzentrationen und das Minimum liegt mit 3,934 pg/ml bei den SC. Die Variationskoeffizienten liegen für S, DS, BC und Dif <1 sowie für SC bei 141,421 da eines der Duplikate ohne Proteinnachweis (NN) verblieb. Abkürzungen: String (S), Double String (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC) und Diffuse (Dif).

3.5 Auswertung des Markers DKK-1

Fluoreszenzmikroskopisch lässt sich der Marker DKK-1 mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung in allen Chondrozytenmustern nachweisen (Abbildung 28). Grundsätzlich ist die Anfärbung eher diffuser Art, die sich zwar auf die Matrixanteile in Chondrozytennähe beschränkt, jedoch keinen eindeutig abzugrenzenden Hof um diese bildet, wie dies bei der Anfärbung anderer Marker der Fall ist. Eine verstärkte Signalausprägung kann im Muster der *Big Cluster* sowohl in direkter Chondrozytennähe als auch im Bereich der EZM wahrgenommen werden.

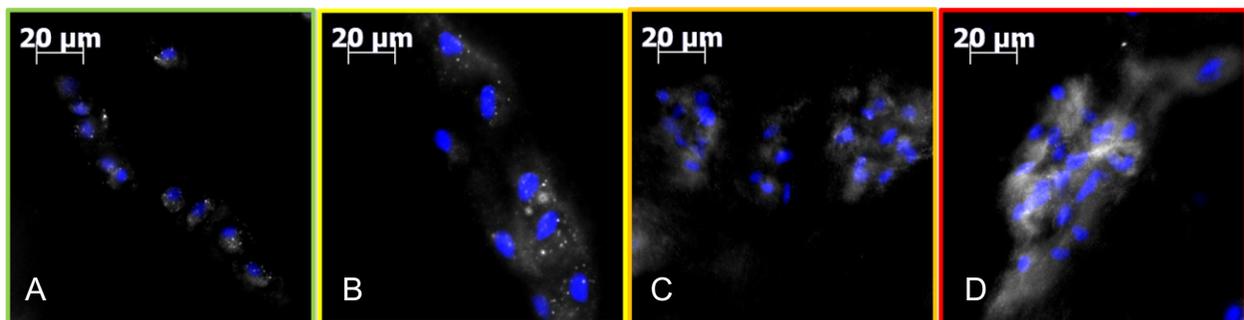


Abbildung 28: Exemplarische Darstellung von DKK-1 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Das Fluoreszenzsignal zeigt sich in allen Mustern eher diffus und weist die stärkste Ausprägung im Bereich der BC auf. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Mit Ausnahme der *Small Cluster* zeigt sich die Tendenz von den *Strings* zu den *Double Strings* bis hin zu den *Big Cluster* leicht steigend (Abbildung 29, Tabelle 18). Die gemessene Konzentration der *Big Cluster* liegt mit mittleren 793,844 pg/ml etwa 70% über der mittleren Konzentration der *Strings* mit 467,823 pg/ml. Im *diffusen Knorpel* wurde mit 285,706 pg/ml die geringste Konzentration nachgewiesen. Es wurden Variationskoeffizienten <1 (S, DS) sowie >1 (BC, Dif) ermittelt. Für die SC konnte nur in einem der Duplikate eine DKK-1 Konzentration über der Nachweisgrenze gemessen werden, das andere Duplikat lag unter der Nachweisgrenze (NN). Daher ergibt sich für die SC der sehr hohe CV-Wert von 141,421.

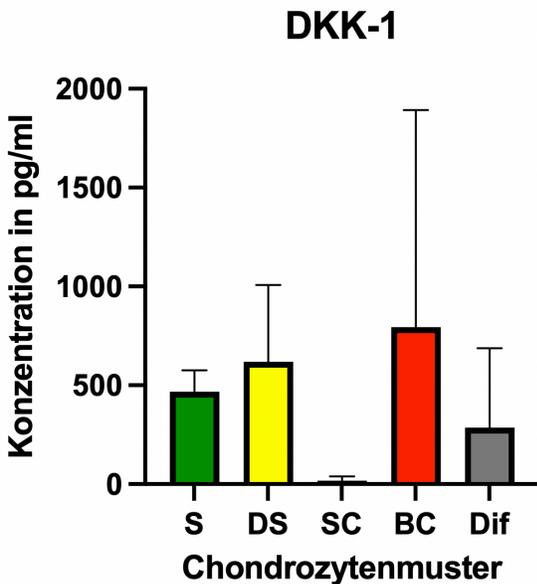


Abbildung 29: Quantitativer Nachweis von DKK-1 mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Die maximale DKK-1 Konzentration lässt sich für die BC nachweisen, die geringste DKK-1 Konzentration hingegen für die SC. Mit Ausnahme der SC ist die Tendenz von S zu BC steigend. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif).

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)	\bar{x} pg/ml	(CV)
DKK-1	467,823	(0,230)	619,404	(0,627)	31,317	(141,421)	793,844	(1,383)	285,706	(1,405)

Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers DKK-1. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus den Messungen der Duplikate in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Die größte DKK-1 Konzentration lässt sich mit 793,844 pg/ml für die BC nachweisen, während die geringste DKK-1 Konzentration mit 31,317 pg/ml bei den SC liegt. Die Variationskoeffizienten liegen für S, DS <1 sowie für SC, BC und Dif >1. Der besonders hohe CV für SC ergibt sich daraus, dass eines der Duplikate ohne Proteinnachweis (NN) verblieb. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC) und Diffuse (Dif).

3.6 Auswertung des Markers FGF-23

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern zeigt sich eine unregelmäßige, nur schwach ausgeprägte Anfärbung des Biomarkers FGF-23 (Abbildung 30). In weiten Teilen der Präparate war kein Nachweis von FGF-23 möglich. In den Bereichen in denen FGF-23 fluoreszenzmikroskopisch zu sehen war, konzentrierte sich das Signal auf den Bereich der *Small* und *Big Cluster*.

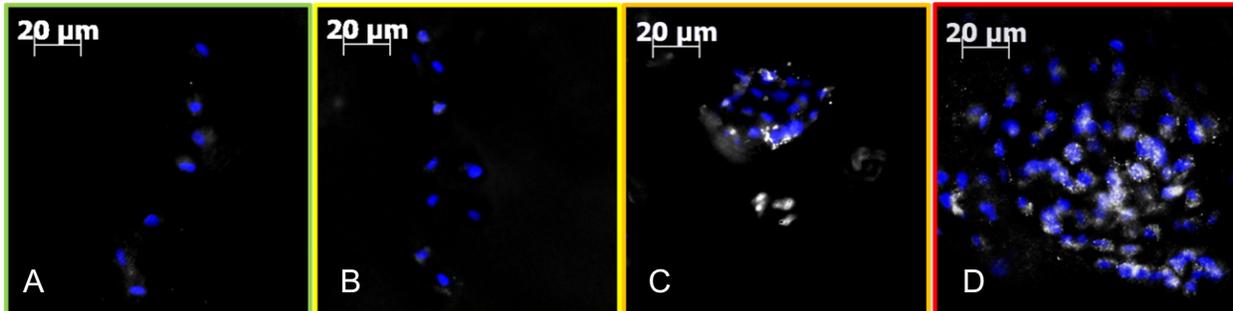


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von FGF-23 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Das Fluoreszenzsignal zeigte sich grundsätzlich schwach ausgeprägt. In den Bereichen in denen ein Nachweis gelang, konzentrierte sich dieser auf die SC und BC. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Trotz des Einsatzes maximal möglicher Gesamteproteinkonzentration lag die Konzentration des Proteins FGF-23 in allen Mustern unterhalb der Nachweisgrenze (NN) (Tabelle 19). Ein Mittelwert oder Variationskoeffizient konnte dementsprechend nicht bestimmt werden.

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)								
FGF-23	NN	(-)								

Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers FGF-23. Die Tabelle zeigt, dass in keinem der Muster ein Vorliegen des Biomarkers nachweisbar war (NN). Ein Mittelwert (\bar{x}) oder Variationswert (CV) konnte deshalb nicht angegeben werden. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC) und Diffuse (Dif).

3.7 Auswertung der Differenzierungsmarker

3.7.1 OCN

In den Immunfluoreszenzaufnahmen zeigt sich, dass OCN in allen Chondrozytenmustern nachweisbar war (Abbildung 31). Während sich die Färbung in den *Strings* und *Double Strings* jedoch auf den jeweiligen Hof direkt um die Chondrozyten begrenzt hielt, lässt sich mit Progression zu den Clustern auch ein vermehrter diffuser Nachweis in der EZM beobachten. Grundsätzlich ist eine ansteigende Tendenz der Signalintensität von den *Strings* zu den *Big Cluster* zu sehen.

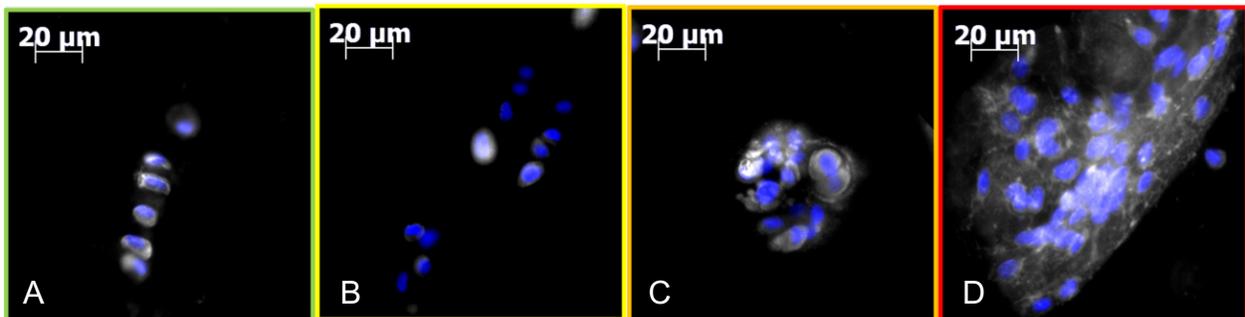


Abbildung 31: Exemplarische Darstellung von OCN mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Ein OCN Nachweis war in allen Mustern möglich. Es zeigt sich eine steigende Tendenz von S zu BC sowie ein verstärktes Signal in der EZM im Bereich der SC und BC. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Quantitativ ist mittels ELISA ein steter Anstieg der OCN-Konzentration von einem Minimum (313,307 pg/ml) im Muster der *Strings* bis hin zum gemessenen Maximum (2831,987 pg/ml) im Muster der *Big Cluster* zu beobachten (Abbildung 32, Tabelle 20). Die Konzentration des Biomarkers stieg von den *Strings* bis zu den *Big Cluster* somit um etwa 900 % an. Im *diffusen Knorpel* fiel die OCN-Konzentration hingegen wieder auf 348,250 pg/ml ab, was etwa dem Ausgangswert der *Strings* entspricht. Durchgehend wurden Variationskoeffizienten von deutlich <1 ermittelt.

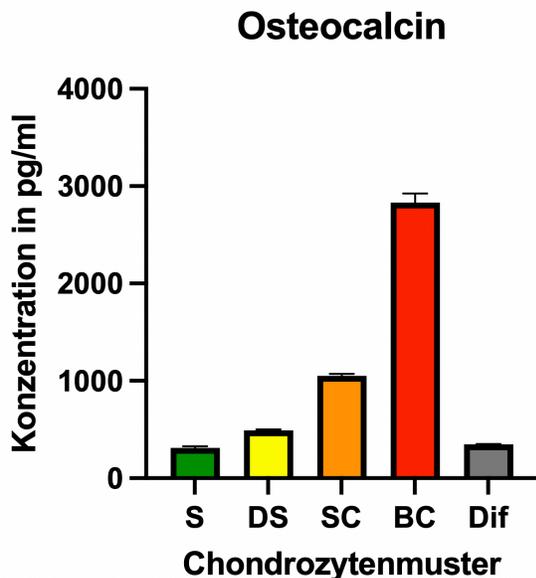


Abbildung 32: Quantitativer Nachweis von OCN mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Es wird eine steigende Tendenz von S bis zu BC deutlich, sowie ein erneuter Abfall der Konzentration im diffusen Knorpel. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif).

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)								
OCN	313,307	(0,049)	490,777	(0,024)	1050,295	(0,022)	2831,987	(0,032)	348,250	(0,010)

Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers OCN. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus den Messungen der Duplikate in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Von den S mit mittleren 313,307 pg/ml zeigt sich eine Progression der OCN-Konzentration bis hin zu den BC mit 2831,987 pg/ml. Anschließend fällt die Konzentration im diffusen Knorpel auf gemittelte 348,250 pg/ml ab. Der Variationskoeffizient liegt für alle Muster bei deutlich <1. Abkürzungen: Osteocalcin (OCN), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC) und Diffuse (Dif).

3.7.2 OPN

Fluoreszenzmikroskopisch ist OPN in allen Mustern nur schwach nachweisbar (Abbildung 33). Die geringste Signalintensität zeigt sich im Muster der *Strings*. Ansonsten ist eine wesentliche Veränderung im Verlauf der verschiedenen Chondrozytenanordnung optisch nicht zu beobachten. Eine veränderte Verteilung des Signals zwischen Chondrozyten und EZM war ebenfalls nicht zu sehen.

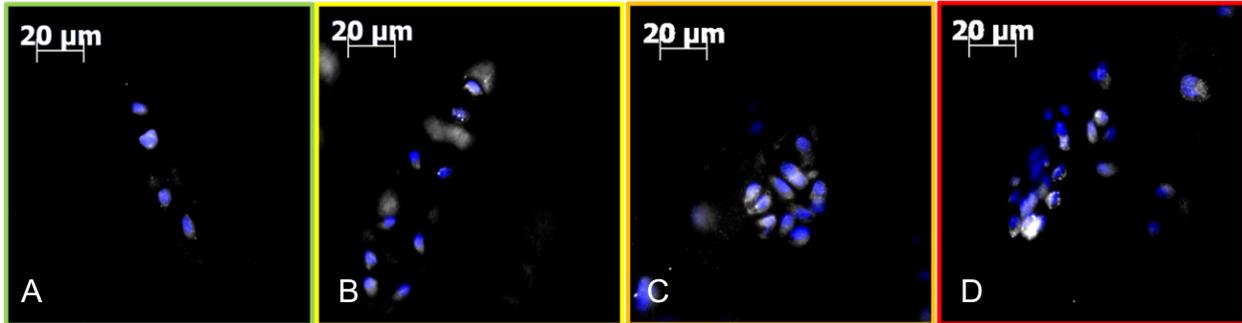


Abbildung 33: Exemplarische Darstellung von OPN mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster (C), Big Cluster (D). Ein Fluoreszenzsignal ist in allen Mustern nur schwach nachweisbar und zeigt keine eindeutig steigende oder fallende Tendenz. Maßstab Balken entspricht 20 µm.

Im quantitativen Nachweis mittels ELISA zeigte sich ein Anstieg der OPN-Konzentration von 470,177 pg/ml im Muster der *Strings*, über die *Double Strings* bis zu den *Small Clustern* um etwa 350 %, was einer Konzentration von 1648,818 pg/ml entsprach (Abbildung 34, Tabelle 21). Anschließend zeigte die Konzentration mit 1507,876 pg/ml im Bereich der *Big Cluster* und 1709,328 pg/ml in den Proben des *diffusen Knorpels* lediglich leichte Schwankungen. Die ermittelten Variationskoeffizienten lagen für alle Chondrozytenmuster deutlich <1.

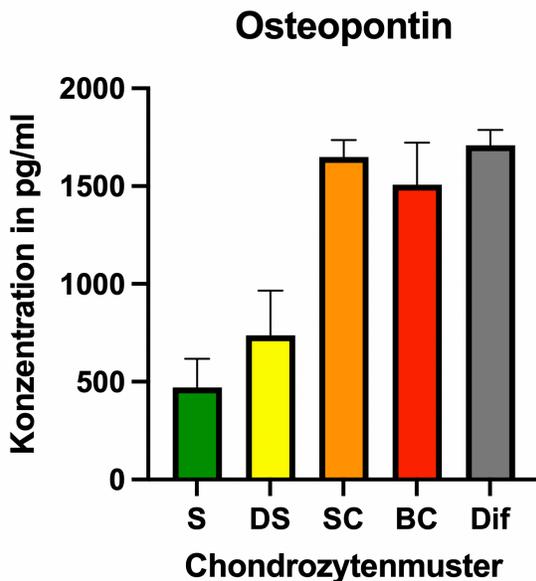


Abbildung 34: Quantitativer Nachweis von OPN mittels ELISA. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Die Proteinkonzentrationen für OPN weisen eine von S zu SC steigende Tendenz auf, um dann für BC und Dif auf etwa diesem Niveau zu bleiben. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC), Diffuse (Dif).

	S		DS		SC		BC		Dif	
	\bar{x} pg/ml	(CV)								
OPN	470,177	(0,314)	736,865	(0,311)	1648,818	(0,053)	1507,876	(0,142)	1709,328	(0,046)

Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers OPN. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus den Messungen der Duplikate in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Tabellarisch zeigt sich eine steigende OPN-Konzentration von 470,177 pg/ml im Muster der Strings bis zu den Small Clustern mit 1648,818 pg/ml. Die Konzentrationen im Bereich der Big Cluster und des diffusen Knorpels blieben auf ähnlichem Niveau. Die Variationskoeffizienten lagen für alle Chondrozytenmuster <1. Abkürzungen: Osteopontin (OPN), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC) und Diffuse (Dif).

3.7.3 Col10

Col10 lässt sich mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in allen Mustern eindeutig nachweisen (Abbildung 35). Ein Anstieg im Verlauf der Arthroseprogression ist sichtbar und scheint sich optisch vor allem im Bereich der EZM abzuspielen. Während sich das Signal im Muster der *Strings* und *Double Strings* auf einen schmalen Saum um die Chondrozyten begrenzt zeigt, findet sich mit Progression zu den *Small Clusters* ein deutlicher Signalzuwachs insbesondere in der EZM. Dieser verstärkt sich in den *Big Clusters* und fällt in diesem Muster auch durch die fibrilläre Form in der EZM auf.

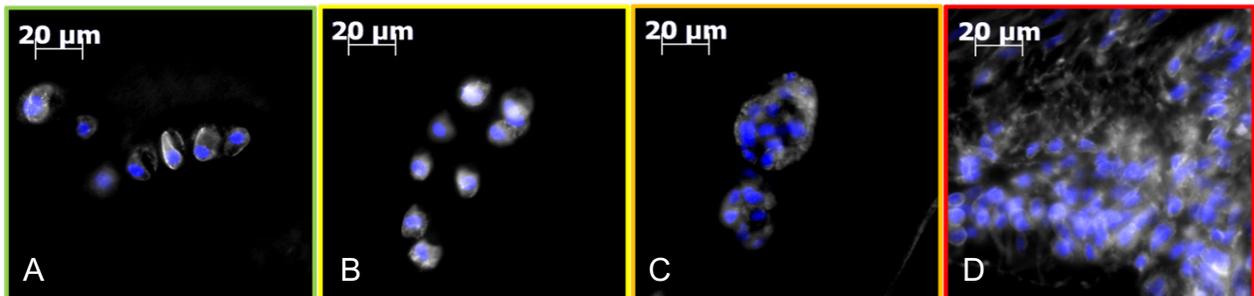


Abbildung 35: Exemplarische Darstellung von Col10 mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und erscheinen blau, das Antikörpersignal ist hier in weiß dargestellt. Von links nach rechts: String (A), Double String (B), Small Cluster, (C) Big Cluster (D). Col10 war für alle Muster mittels Immunfluoreszenz nachweisbar und zeigte dabei von den S zu BC einen deutlichen Signalzuwachs, insbesondere im Bereich der EZM. Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Das ELISA, welches von Sascha Hemayatkar-Fink [136] durchgeführt und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurde, ergab, dass in allen Musterkategorien eine messbare Konzentration Col10 enthalten war (Abbildung 36, Tabelle 22). Wie auch schon für die Immunfluoreszenzen zeigte sich hierbei ein kontinuierlicher Anstieg der

Konzentration von den *Strings* bis zu den *Big Clusters*. Der Col10 Gehalt korrelierte somit mit der Progression der Arthrose.

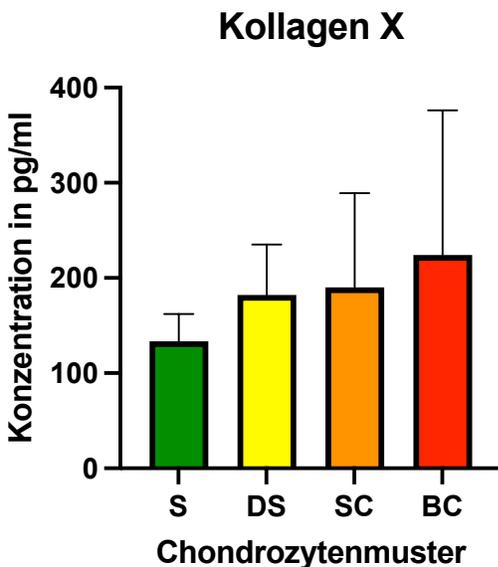


Abbildung 36: Quantitativer Nachweis von Col10 mittels ELISA. Mit freundlicher Genehmigung wurden die Daten von Sascha Hemayatkar-Fink verwendet. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentrationen in pg/ml in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster, bei identischer Gesamtproteinmenge pro Probe. Die Proteinkonzentration für Col10 stieg von den Strings bis zu den Big Clusters kontinuierlich an. Abkürzungen: Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC).

	S		DS		SC		BC	
	\bar{x} pg/ml	(CV)						
COL10	133,427	(0,215)	182,331	(0,290)	190,085	(0,522)	224,252	(0,678)

Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers Col10. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (\bar{x}) aus allen sechs Messungen in pg/ml. Zudem ist der zugehörige Variationskoeffizient (CV) daneben in Klammern angegeben. Tabellarisch zeigt sich eine steigende Col10 Konzentration von 133,427 pg/ml im Muster der Strings bis zu den Big Clusters, welche eine mittlere Konzentration von 224,252 pg/ml aufweisen. Die Variationskoeffizienten lagen für alle Chondrozytenmuster <1. Abkürzungen: Kollagen X (Col10), Strings (S), Double Strings (DS), Small Clusters (SC), Big Clusters (BC).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Studie

Ziel der Studie war es, 12 Biomarker in verschiedenen Stadien der Arthroseprogression zu untersuchen. Hierfür wurde die etablierte Einteilung in Arthrostadien anhand der vorliegenden Chondrozytenmuster (S, DS, SC, BC, Dif) verwendet. Die 12 dazu verwendeten Biomarker wurden aus den Bereichen Apoptose, Angiogenese, Inflammation und hypertrophe Differenzierung ausgewählt, da für diese Prozesse eine Relevanz bei der Entstehung und Progression der OA beschrieben wurde.

Zu diesem Zweck wurden Knorpelproben von 92 Patientinnen und Patienten mit OA, zu standardisierten Discs verarbeitet, mit Calcein gefärbt und mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops in die jeweilige Musterkategorie zugeordnet. Mit den daraus isolierten Proteinen wurden ELISAs (PECAM-1, IL-6, IL-1 β , OCN, OPN, FGF23, DKK-1) durchgeführt, die eine quantitative Analyse der Konzentration des jeweiligen Biomarkers für jedes Muster ermöglichten. Zwei Proteine (Col10, VEGF) waren in der Arbeitsgruppe bereits von Sascha Hemayatkar-Fink [136] mittels ELISA bestimmt worden, wobei die Ergebnisse in der Auswertung berücksichtigt wurden. Das Vorkommen der drei ausgewählten Apoptosemarker (CASP3, CASP8, p53) wurde mittels Western Blots bestimmt. Für alle Marker wurden zudem Immunfluoreszenzen mit musterspezifischen Aufnahmen angefertigt. Im Folgenden sollen die erzielten Ergebnisse analysiert, diskutiert und mit dem in der Literatur vertretenen Forschungsstand verglichen werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf die zellulären Prozesse

Nachfolgend werden die Ergebnisse unter dem Blickwinkel der jeweils zugrundeliegenden zellulären Prozesse (Apoptose, Angiogenese, Inflammation und hypertrophe Differenzierung) diskutiert. Nicht immer ließ sich ein Biomarker eindeutig einer Kategorie zuordnen, da die einzelnen Proteine oft an verschiedensten Signalwegen beteiligt sind und auch die Signalwege untereinander eng miteinander verknüpft sind. Die Biomarker werden deshalb jeweils unter dem Aspekt behandelt, dem sie am ehesten zugeordnet werden können, auch wenn diese Zuordnung keinesfalls als absolut anzusehen ist. DKK-1 und FGF-23 werden separiert behandelt, da beide Biomarker in besonders vielen

Prozessen wesentlich involviert sind und eine Zuordnung zu einer einzelnen Kategorie den anderen Bereichen nicht gerecht werden würde.

4.2.1 Apoptose

Zu welchem Ausmaß Apoptose an der Entstehung und Progression der OA beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert. Fest steht, dass die Integrität der EZM und damit die Eigenschaften des Knorpels existentiell vom Überleben der Chondrozyten abhängt, welche die einzigen in Gelenkknorpel vorhandenen Zellen darstellen. Bei gesteigerter Apoptose wäre deshalb von einem negativen Einfluss auf die Zusammensetzung des Knorpels auszugehen [69]. Wie bereits beschrieben, finden sich in der Literatur auch sehr widersprüchliche Angaben darüber, wie hoch der Prozentsatz der apoptotischen Chondrozyten in arthrotischem Gelenkknorpel ist (0,1 % – 51 %), doch sind sich die Studien in der Regel einig, dass der Anteil bei OA höher ist als in gesundem Knorpel [88-90]. Im Rahmen dieser Studie wurden die drei Apoptosemarker (p53, CASP8 und CASP3) in OA Knorpel mittels Western Blots und Immunfluoreszenz untersucht.

Das Protein **p53** ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Expression durch DNA-Schäden induziert wird und welches dann die DNA Reparatur fördert oder, falls eine Reparatur nicht möglich ist, die Apoptose einleitet [137]. Es gilt als einer der wichtigsten Marker für den programmierten Zelltod.

In einer Studie von Zhu et al. war die p53 mRNA-Expression bei Kniegelenks-OA signifikant höher als bei gesunden Kontrollen [138]. Dem gegenüber stehen Ergebnisse einer Publikation bei der die intrazelluläre p53 Expression bei maximaler Arthroseausprägung deutlich geringer war (25,5 % der Chondrozyten) als bei leichter Arthroseausprägung (37 %) oder gesundem Gewebe (41,5 %) [139]. Die Autoren dieser Studie schlagen vor, die reduzierte p53 Expression als Versuch zu betrachten, durch eine gesteigerte Synthese der Chondrozyten eine Wiederherstellung der zunehmend degradierten EZM zu bewirken [139]. Eine Publikation beschreibt, dass die p53 Konzentrationen im Synovialgewebe bei OA deutlich geringer sind als bei anderen Erkrankungen, die das Gelenk betreffen, wie beispielsweise rheumatoider Arthritis [140]. Allerdings wurde an anderer Stelle beschrieben, dass die p53 Expression der Synovialzellen sich bei rheumatoider Arthritis und OA nicht signifikant unterscheidet [141]. Es gibt also widersprüchliche Angaben darüber, ob p53 in Knorpel- und Synovialgewebe

im Rahmen einer OA, verglichen mit gesundem Knorpel und sonstigen Gelenkerkrankungen, erhöht oder erniedrigt ist. Denkbar wäre, dass die zunehmend veränderte Homöostase vermehrt zur Apoptose der Zellen mit konsekutiver p53 Erhöhung führt. Alternativ wäre eine Herunterregulation des p53 Gens in Betracht zu ziehen, um den Syntheseprozess der Chondrozyten und die Regeneration der EZM anzukurbeln.

Wie beschrieben konnten einige Studien erhöhte Apoptoseraten in arthrotischem Knorpel nachweisen. Zu beachten ist jedoch, dass dies nicht bedeuten muss, dass auch p53 vermehrt vorkommt. Schließlich könnte der Zelltod der Chondrozyten auch auf extrinsischem Apoptoseweg verursacht werden, beispielsweise durch die veränderte Zusammensetzung der EZM, wofür keine gesteigerte p53 Expression notwendig wäre.

In den Versuchen dieser Arbeit konnte p53 weder in den Immunfluoreszenzen noch mit Hilfe der Western Blots in irgendeinem Muster nachgewiesen werden. Bei den Immunfluoreszenzen wurden Fehler der Durchführung durch Herstellung einer Positivkontrolle und Mitführung einer Negativkontrolle ausgeschlossen. Die Vermutung liegt somit nahe, dass tatsächlich keine in relevanten Mengen p53 exprimierenden Chondrozyten in den Immunfluoreszenzen zu sehen waren. Fehler bei der Durchführung der Western Blots wurden durch Mitführung einer Positivkontrolle ebenfalls ausgeschlossen. Auch in den isolierten Proteinproben der Chondrozytenmuster die mittels Western Blots auf p53 getestet wurden, war der Biomarker somit nicht nachweisbar. Da p53 insbesondere ein zentraler Marker des intrinsischem Apoptosewegs ist stützt diese Studie die These, dass keine vermehrte intrinsische Apoptose im arthrotischen Knorpel stattfindet. Dies schließt ein Vorliegen erhöhter extrinsischer Apoptose oder sogar Nekrose jedoch nicht aus, da hierfür andere Biomarker in Betracht gezogen werden müssen. Der extrinsische Apoptoseweg wurde daher gezielt separat untersucht:

Caspase-8 (CASP8) gilt als Initiatorcaspase von zentraler Bedeutung im Signalweg der extrinsischen Apoptose [75, 142].

Tierexperimente, in denen die Auswirkung von Caspase-Inhibitoren auf operativ induzierte OA untersucht wurde, zeigten eine signifikant verminderte Knorpeldegeneration bei Einsatz eines pan-Caspase Inhibitors, was dafür spricht, dass Caspasen grundsätzlich an der Knorpeldegeneration beteiligt sind [143]. Eine Injektion eines spezifischen Inhibitors der CASP8 hatte hingegen keine signifikanten Auswirkungen

auf den arthrotischen Knorpel, was eher dafür spricht, dass CASP8 im Spezifischen keine zentrale Rolle in Arthroseprozessen spielt [143]. Knorpelproben von Kaninchen mit induzierter OA zeigten eine signifikant erhöhte RNA-Expression der CASP8 Gene was auf eine Hochregulation der CASP8 und damit auch der Apoptose im Rahmen der OA hindeutet. [144, 145].

In dieser Studie konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blots keine eindeutige CASP8 Konzentrationen über der Nachweisgrenze gemessen werden. Das Ergebnis der Western Blots zeigte sich hierbei jedoch schwer zu beurteilen. Fehler der Durchführung konnten durch die Testung der Antikörper sowie die Mitführung von Positiv- bzw. Negativkontrollen ausgeschlossen werden was nahelegt, dass CASP8 nicht in größerem Ausmaß vorkam. Derzeit fehlt es an Studien, die CASP8 Konzentrationen in humanem, arthrotischem Gelenkknorpel bestimmt haben. Vergleichende Aussagen diesbezüglich zu treffen ist deshalb zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Weitere Studien in diesem Bereich könnten für mehr Klarheit sorgen, ob CASP8 eine Rolle bei der Entstehung und Progression der OA spielt und in arthrotischen Gelenken vermehrt vorkommt.

Caspase-3 (CASP3) ist ein wichtiger Mediator in sowohl nekrotischen als auch apoptotischen Prozessen des Zelltodes [146]. CASP3 wird spät in der Kaskade von anderen Caspasen aktiviert und fungiert dann als Effektorcaspase [147]. Damit ist CASP3 ein Schlüsselenzym sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Signalweges und für diverse morphologische und biochemische Veränderungen der apoptotischen Zelle kausal verantwortlich [71].

In Tierstudien war ein signifikant erhöhtes Vorkommen von CASP3 in Knorpelproben von Tieren, bei denen eine OA induziert worden war, mittels Immunhistochemie nachweisbar [148]. Eine andere Studie untersuchte die CASP3 Expression in humanem, arthrotischem Knorpel und verglich diese mit gesunden Kontrollen. Dies führte zu dem Ergebnis, dass die Expression von CASP3 signifikant mit der Anzahl apoptotischer Chondrozyten, die mittels der TUNEL Methode identifiziert wurden, korrelierte. Die CASP3 Expression und die Anzahl apoptotischer Zellen in arthrotischem Knorpel war dabei etwa zwei- bis vierfach höher als in den gesunden Kontrollen, während die Zelldichte in OA Proben deutlich vermindert war [149]. An anderer Stelle konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass die Anzahl apoptotischer und CASP3 exprimierender Zellen mit dem OA Grad

korreliert, wobei insbesondere die superfiziellen Chondrozyten, die in Clustern angeordneten Zellen und die tiefgelegenen Chondrozyten betroffen waren [150]. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der Literatur also deutlich für ein erhöhtes Vorkommen apoptotischer Chondrozyten in OA-Knorpel gegenüber gesunden Kontrollen. CASP3 scheint dabei als wichtiger Biomarker für Apoptose einsetzbar zu sein, da das Vorkommen des Enzyms mit der Apoptoserate korreliert und in arthrotischen Knorpelproben vermehrt vorkommt.

In dieser Studie konnte ein Vorkommen von CASP3 mittels Western Blot in allen Mustern außer den *Strings* nachgewiesen werden. Die Intensität der Bande nahm dabei in Beladungsreihenfolge von links nach rechts (DS, SC, BC, Dif, PK) zu. Anzumerken ist jedoch, dass auch die Intensität der Bande bei 36 kDa, also die Bande des Housekeeping Proteins GAPDH, im Verlauf der Chondrozytenmuster von links nach rechts an Intensität gewann. Da GAPDH ein konstant exprimiertes Housekeeping Protein ist, sollte eine veränderte Bandenintensität in einem korrekt durchgeführten Western Blot nicht vorkommen. Allerdings ist bei diesen Western Blots zu berücksichtigen, dass die eingesetzten Proteine nicht aus Zellkultur, sondern aus vollständigem Knorpelgewebe gewonnen wurden. Für die Western Blots wurden zwar pro Probe bzw. Muster die identische Proteinmenge eingesetzt, aber unklar bleibt, wie sich der prozentuale Anteil der zellulären Proteine in Relation zu den Proteinen der EZM bemisst. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund relevant, dass die Anzahl an Zellen pro Volumen Knorpelgewebe je nach vorliegendem Muster unterschiedlich ist. Dadurch könnte es zu unterschiedlichen GAPDH Konzentrationen bei gleichbleibender Gesamtproteinmenge führen, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Intensitäten der GAPDH Bande darstellt. Die ansteigende Intensität der Western Blot Bande für CASP3 muss also mit Vorsicht beurteilt werden. Diese spricht stark für eine Verschiebung der Proteinverhältnisse des Gesamtprotein zu Gunsten von CASP3, lässt aber keine Aussagen über CASP3 Konzentrationen pro Zelle zu.

In den Immunfluoreszenzen ließ sich lediglich für einen Teil der Zellen eine CASP3 Expression nachweisen, wobei keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mustern auffielen. Dies würde eher für eine gleichbleibende Konzentration der CASP3 im Musterverlauf sprechen. Festzuhalten ist dennoch, dass eine CASP3 Expression im arthrotischen Knorpel eindeutig nachweisbar war.

Die Ergebnisse bestätigen somit die Literatur insofern, dass im arthrotischen Gelenkknorpel CASP3 als Anzeichen apoptotischer Prozesse vorzukommen scheint. Dass eine Western Blot Bande bereits ab den *Double Strings* nachzuweisen war, würde für ein frühzeitig erhöhtes Vorkommen von CASP3 und damit von apoptotischen Prozessen ab Beginn arthrotischer Veränderungen sprechen.

Hengartner bezeichnet Effektorcaspasen, wie bspw. CASP3, als *Arbeitspferd* der Caspasenfamilie, da diese aktiver und häufiger vorkommen als Initiatorcaspasen wie CASP8, von denen bereits wenige Initiatorcaspasen ausreichen, um eine hohe Anzahl an Effektorcaspasen zu aktivieren. [147]. Dass in dieser Studie CASP3 im Gegensatz zu CASP8 eindeutig nachgewiesen werden konnte, könnte somit daran liegen, dass CASP3 für apoptotische Prozesse in höheren Konzentrationen als CASP8 benötigt wird und demzufolge in größeren Mengen vorliegt.

Übereinstimmend sprechen sich Autoren dafür aus, dass Apoptose in arthrotischem Knorpel vermehrt vorkommt, auch wenn die relativen Angaben darüber, wie viele Chondrozyten prozentual apoptotisch seien, stark variieren. Die hohe Diskrepanz der Apoptoseraten, die Autoren verschiedener Studien angeben, könnte laut Sharif et al. daran liegen, dass verschiedene Nachweismethoden und verschiedene Kits verwendet wurden und die Knorpelproben aus verschiedenen topografischen Regionen des Gelenks entnommen wurden [149]. Die niedrigeren Angaben erscheinen jedoch für in-vivo realistischer, da aufgrund der Zellarmut des Gelenkknorpels dieser bei höheren Apoptoseraten schnell azellulär würde, wodurch der Erhalt der EZM nicht mehr möglich wäre [151]. Bei der Interpretation der Apoptoseraten ist zudem zu beachten, dass auch die variierenden Gewebepräparationstechniken zu unterschiedlich starker Schädigung des Gewebes führen können. Eigene nicht veröffentlichte Arbeiten zeigten, dass Chondrozyten sehr empfindlich in Bezug auf die Gewebeentnahme und die anschließende Kultur reagieren. Suboptimale Bedingungen führen so sehr rasch zu einer massiven Zunahme an Apoptose.

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der Literatur teilweise reproduziert werden. Der Nachweis von CASP3 ab dem Muster der *Double Strings* deckt sich mit der Literatur. CASP3 scheint somit bereits in Frühstadien des Arthroseprozesses von funktioneller Relevanz zu sein. Ein erwarteter Nachweis von CASP8 ließ sich nicht eindeutig nachweisen. Allerdings scheint CASP8 auch grundsätzlich in geringeren Konzentrationen

vorzukommen als CASP3, da bereits wenige CASP8 Moleküle ausreichen, um die Kaskade in Gang zu setzen. Auch ist die Literatur bezüglich eines erhöhten Vorkommens von CASP8 im Rahmen von OA weniger eindeutig als dies bei CASP3 der Fall ist. Mistry et al. konnten Proteinkonzentrationen für CASP3 messen, während für CASP8 nur das mRNA-Transkript nachweisbar war, jedoch keine Proteinkonzentration gemessen werden konnte [152]. Daher diskutieren sie, dass die CASP8 Protein Konzentrationen einerseits sehr gering sein könnten und andererseits möglicherweise die Halbwertszeit sehr kurz ist. Das Molekül p53 konnte im Rahmen dieser Studie weder mittels Immunfluoreszenz noch mittels Western Blot in hinreichenden Mengen nachgewiesen werden. Allerdings herrschen auch in der Literatur Kontroversen darüber, ob und in welchem Ausmaß p53 bei OA vermehrt vorkommt. Anknüpfend an diese Arbeit wäre zu untersuchen, ob die Konzentrationen für CASP8 und p53 bei Anwendung anderer Techniken innerhalb des quantifizierbaren Bereichs liegen.

4.2.2 Angiogenese

Der Prozess der Angiogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße oder deren Aussprossung aus bereits bestehenden Gefäßen [93]. Gesunder Knorpel ist avaskuläres Gewebe, doch im Verlauf einer OA kommt es zur vermehrten Einsprossung von Blutgefäßen, überwiegend aus dem subchondralen Knochen [92]. Die Begleitung dieser Blutgefäße durch Nervenfasern trägt zu vermehrter Schmerzwahrnehmung der Patientinnen und Patienten bei [153]. Den Ergebnissen einer Studie zufolge haben in 60 % der Patientinnen und Patienten mit OA bereits Blutgefäße die Tidemark durchbrochen und somit zu einer Vaskularisierung des Gelenkknorpels geführt. Vergleichbare Phänomene konnten nur in 20 % der vermeintlich gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Die Vaskularisierung des Knorpels korrelierte in dieser Studie zudem mit dem klinischen Bild des Patienten oder der Patientin [96]. Auch eine synoviale Angiogenese konnte im Rahmen der Studie nachgewiesen werden, allerdings korrelierte diese mit der Ausprägung der Synovialitis und nicht mit der Vaskularisierung des Knorpels [96].

Auch wenn der Prozess der Angiogenese noch nicht vollständig verstanden ist, so weiß man doch, dass einige proangiogenetische Faktoren die Bildung und Aussprossung von Blutgefäßen begünstigen können. Im Rahmen der Studie wurden die zwei

proangiogenetischen Faktoren VEGF und PECAM-1 (CD31) in den verschiedenen Chondrozytenmustern genauer untersucht.

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) ist als Oberflächenmolekül verschiedenster Zellarten, beispielsweise Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und neutrophiler Granulozyten, an der Angiogenese beteiligt. Studien haben gezeigt, dass im Rahmen einer bestehenden OA auch eine vermehrte Proliferation der Synovialis stattfindet. Insbesondere die Synovialzellen der Superfizialschicht weisen hierbei ein deutlich erhöhtes Vorkommen des proangiogenetischen PECAM-1 Adhäsionsmoleküls auf [100]. Auch die Plasmakonzentrationen des Glykoproteins waren in Proben von OA-Patientinnen und Patienten nachweislich erhöht [154].

Die Signalmoleküle der **VEGF**-Familie (Vascular Endothelial Growth Factor) haben eine zentrale Bedeutung sowohl bei der Induktion angiogenetischer Prozesse als auch bei Umbaumechanismen des Knochens. Auf Knorpel Ebene ergaben Untersuchungen einen signifikanten Anstieg der mRNA Level in arthrotischem Knorpel im Vergleich zu gesunden Kontrollen [155]. Eine Studie zeigte auch, dass verschiedene VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2 und NRP-1) sogar ausschließlich in arthrotischem Knorpel vorkommen und in gesunden Proben nicht vorhanden sind [156]. Der Gelenkknorpel ist jedoch nicht das einzige Gewebe das erhöhte VEGF-Konzentrationen aufweist. Nachweisbar exprimieren auch Synovialozyten in von OA betroffenen Gelenken verstärkt VEGF [157]. An anderer Stelle wurde nachgewiesen, dass sowohl eine erhöhte VEGF-Konzentration im Plasma, als auch in der Synovialflüssigkeit, mit der Schwere einer OA positiv korrelieren [158]. Selbst die Osteoblasten des subchondralen Knochen zeigten bei Vorliegen einer OA eine gesteigerte Expression von VEGF, was insbesondere die These stützt, VEGF beeinflusse neben der Angiogenese auch das Remodeling des Knochens im Krankheitsprozess [159].

Die Konsultation der Literatur spricht demnach dafür, dass Angiogenese und proangiogenetische Moleküle wie VEGF und PECAM-1 eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der OA spielen. Diese Biomarker sind deshalb in verschiedenen Geweben des arthrotischen Gelenks erhöht.

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Angiogenesemarker in allen Stadien der Arthrose mittels ELISA nachweisbar waren. Die Resultate des VEGF ELISAs weisen die niedrigste Konzentration im Muster der *Strings* nach. Für die Muster

DS, SC und BC zeigten sich erhöhte Konzentrationen, wenn auch ohne eindeutige Tendenz. Dies spricht eher für ein geringes Vorkommen im gesunden Knorpel und ein vermehrtes Vorkommen mit Progression der Arthrose. PECAM-1 hingegen zeigte im ELISA Konzentrationen auf etwa gleichbleibendem Niveau in allen Mustern. Denkbar ist deshalb auch, dass der Prozess der gesteigerten Angiogenese bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Gelenksdegeneration einsetzt, an dem auch die Änderung der Chondrozytenmuster gerade erst beginnt, und anschließend langsam und konstant voranschreitet. Dies würde sich mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzen decken, die ebenfalls einen Signalnachweis beider proangiogenetischen Faktoren in allen Musterkategorien ermöglichten. Diese ergaben keine eindeutige Zu- oder Abnahme der Intensität mit Änderung der Chondrozytenmuster. Insofern muss entweder von einer sehr früh im Krankheitsprozess beginnenden Produktion der Faktoren ausgegangen werden, oder aber von einer unveränderten Konzentration im Verlauf der Arthrose.

Zu berücksichtigen sind bei der Interpretation dieser Ergebnisse jedoch verschiedene Faktoren. Das Vorkommen der Biomarker im Knorpel ist nicht allein auf die gesteigerte Expression von Chondrozyten zurückzuführen, sondern kann auch in Zellen anderer Gewebe seinen Ursprung haben. Möglich wäre, dass proangiogenetische Faktoren vermehrt von den Synovialozyten produziert werden, was sich auch mit den Ergebnissen der Literatur deckt. Damit wäre zudem erklärbar, warum die Synovialis im Rahmen von Erkrankungen wie OA und rheumatoider Arthritis eine Tendenz zur Hypertrophie hat. Nach Abgabe der proangiogenetischen Faktoren an die Synovialflüssigkeit könnte der hyaline Gelenkknorpel die dort zirkulierenden Proteine aufnehmen. Durch Diffusion können diese sich im Gelenkknorpel verteilen und somit ihre proangiogenetische Wirkung entfalten. Der beschriebene Prozess der Neubildung von Blutgefäßen in arthrotischem Knorpel wäre dann nicht nur durch gesteigerte Expression der Chondrozyten, sondern auch durch die der Synovialozyten erklärbar. In dem Fall würde jedoch keine Abhängigkeit der VEGF und PECAM-1 Konzentration im Knorpel von dem vorliegenden Chondrozytenmuster bestehen, da die Moleküle frei in der EZM diffundieren können. Vielmehr wäre deren vermehrtes Vorkommen auf die überschießende Produktion der Synovialozyten zurückzuführen.

Zu bedenken ist auch, dass die meisten Studien stets nur den von OA betroffenen Knorpel mit gesunden Kontrollen verglichen haben. Eine Differenzierung in verschiedene

Stadien der Arthrose und der Vergleich untereinander, wie in dieser Studie, findet hingegen nur selten statt. Denkbar wäre somit, dass es zwar einen Anstieg proangiogenetischer Faktoren in arthrotischem Knorpel gegenüber gesundem Knorpel gibt, im Verlauf der Arthrose die Konzentration jedoch in etwa gleichbleibt und nicht weiter ansteigt. Schließlich handelt es sich bei VEGF und PECAM-1 um Signalmoleküle, die produziert und verbraucht werden und damit konstant den Prozess der Angiogenese befeuern. Sie sind jedoch keine Strukturproteine wie beispielsweise Col10 und OCN die zunehmend eingelagert werden und damit das Proteinverhältnis verändern.

4.2.3 Inflammation

Dass der Prozess der Inflammation zur Genese der OA beiträgt, ist wiederholt beschrieben worden. Die Entzündungsreaktion ist hierbei einer chronischen und eher niedriggradigen Art [101]. Diese chronische Inflammation trägt auf verschiedenen Ebenen dazu bei, den gesamten OA-Prozess zu verstärken. Inflammationsmarker fördern die Produktion kataboler Enzyme, wodurch der Knorpel destruiert wird [160]. Zudem sind sie an einer Sensibilisierung der Nervenfasern beteiligt, was die klinischen Beschwerden der Patientinnen und Patienten zusätzlich verstärkt [102]. Da inflammatorische Signalmoleküle die Produktion weiterer Inflammationsmarker anregen, entsteht ein Teufelskreis an dessen Ende das Bild einer schweren OA steht [109].

Im Rahmen dieser Studie wurden insbesondere die beiden Inflammationsmarker IL-6 und IL-1 β hinsichtlich ihres Vorkommens in den verschiedenen Chondrozytenmustern untersucht. Hintergrund ist, dass sich in der Literatur eindeutige Hinweise darauf finden, dass diese Marker als Teil des Osteoarthroseprozesses zu sehen sind und ihre Konzentrationen bei OA dementsprechend erhöht sind.

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Entzündungsmarker für den aufgrund seiner verschiedenen Signalwege sowohl katabole als auch protektive Effekte nachgewiesen wurden [161]. Die Beteiligung des Biomarkers an der Genese der OA ist deshalb komplex und noch nicht vollständig verstanden. Studien zeigen, dass IL-6 zwar sowohl in der Synovialflüssigkeit arthrotischer als auch gesunder Gelenke nachweisbar ist, die Konzentrationen bei Vorliegen einer OA jedoch deutlich erhöht sind. Während gesunde Patientinnen und Patienten im Median $4,8 \pm 0$ pg/ml IL-6 in der Synovialflüssigkeit aufwiesen, lag die Konzentration bei OA Patientinnen und Patienten im Median bei 135,8

± 224,6 pg/ml an [162]. Zudem wurde gezeigt, dass erhöhte IL-6 Serum Werte mit dem Vorliegen radiologischer Osteoarthrosezeichen positiv korrelieren [163]. Diese erhöhten IL-6 Werte entstehen durch die gesteigerte Produktion verschiedener Gewebearten. In vitro Experimente zeigen, dass Synovialozyten Ursprung der gesteigerten IL-6 Produktion im Rahmen von OA und anderen Arthropathien sein können [164]. Immunhistochemische Analysen identifizierten auch Plasmazellen, die sich innerhalb der Synovialis befanden, als IL-6-Produzenten im Rahmen einer Arthroseerkrankung [165]. Selbst die Adipozyten des infrapatellaren Fettkörpers sind in der Lage IL-6 und andere proinflammatorische Zytokine zu produzieren [166]. Es ist somit wahrscheinlich, dass verschiedene Zellen zu den erhöhten IL-6 Konzentrationen der Synovialflüssigkeit beitragen. Inwiefern auch die Chondrozyten selbst bei fortschreitender Erkrankung vermehrt IL-6 produzieren, ist weniger gut erforscht als die Expression der Synovialzellen. Aber auch hier gibt es Hinweise darauf, dass Chondrozyten, stimuliert durch andere proinflammatorische Mediatoren, vermehrt IL-6 produzieren [167]. Ob eine Therapie der Arthrose möglich wäre, die spezifisch auf den IL-6 Signalweg abzielt, wird rege diskutiert [161]. In der Therapie verschiedener rheumatischer Erkrankungen finden diese bereits mit Erfolg Anwendung [168].

In der Literatur wird vor allem auf ein erhöhtes Vorkommen von IL-6 in der Synovialflüssigkeit verwiesen. In dieser Studie wurde jedoch auch beobachtet, dass die Fluoreszenzsignale im Bereich der Chondrozyten-Cluster erhöht waren. Auch die Quantifizierung mittels ELISA zeigte im Bereich der großen Cluster, die vor allem in stark degeneriertem Knorpel vorkommen, eine erhöhte IL-6 Konzentration. In der direkten Vorstufe, den *Small Clustern*, blieb eine Messung des Duplikats ohne Proteinnachweis (NN) und auch die zweite Messung des Duplikats zeigte lediglich sehr geringe IL-6 Konzentrationen. Dies würde darauf hinweisen, dass die Inflammation vor allem in späteren Stadien der Knorpeldegeneration von Bedeutung ist. Dies kann mit Hilfe der Literatur schlecht überprüft werden, da meist nur arthrotische Proben mit gesunden Kontrollen verglichen werden und verschiedene Stadien der Arthrose nicht miteinander ins Verhältnis gesetzt werden. Überraschend ist, dass auch im Bereich der *Strings* ein deutlicher Nachweis des Interleukins nachweisbar war. Da die *Strings* eigentlich dem gesunden Knorpel entsprechen sollten, ist dies zunächst überraschend. Bei der Interpretation aller Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass auch die Knorpelproben der

Strings aus von endgradiger Arthrose betroffenen Gelenken entnommen waren und Interleukine zum Teil auch durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit in solche noch ansonsten relativ gesunden Gelenkbereiche gelangt sein könnten. Letztendlich wären Analysen der zellulären Transkription wie beispielsweise eine qRT-PCR erforderlich, um hier belastbarere und spezifischere Aussagen zu treffen.

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist verantwortlich für die gesteigerte Produktion verschiedener anderer proinflammatorischer Mediatoren, beispielsweise IL-6, und kataboler Enzyme [169]. Damit trägt es wesentlich zur weiteren Inflammation des Gelenks und Degradierung des hyalinen Knorpels bei. Aigner et al. zeigten durch in vitro Modelle, dass eine Stimulation von Chondrozyten mit IL-1 β zu einer massiv gesteigerten Expression insbesondere der Matrix-Metalloprotease-1, -3, und -13 führte [160]. Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung des Interleukins an anderen Signalwegen diskutiert. Beispielsweise scheint IL-1 β auch wesentlich am Prozess der Differenzierung der Chondrozyten mit einer Veränderung der Morphologie in Richtung eines fibroblastenähnlichen Aussehens teilzuhaben [117]. Bei der Diskussion der Ergebnisse muss somit beachtet werden, diese nicht ausschließlich hinsichtlich inflammatorischer Prozesse zu führen.

Die Konzentrationen von IL-1 β in verschiedenen Geweben sind bei Vorliegen einer OA im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht [170, 171]. Beispielsweise können erhöhte Interleukinkonzentration in der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. In einer Studie lag bei gesunden Patientinnen und Patienten die Konzentration im Median bei 0 ± 1.5 pg/ml. Waren die Patientinnen und Patienten an einer OA erkrankt, lag die Konzentration hingegen bei 4.8 ± 11.9 pg/ml [162]. Saha et al. konnten zudem nachweisen, dass sowohl die Konzentrationen von IL-1 β als auch von interleukin-1beta-converting enzyme (ICE), das für dessen Aktivierung zuständig ist, in arthrotischem Gelenkknorpel erhöht ist. Insbesondere in der oberflächlichen sowie der oberen Mittelschicht des Gelenkknorpels konnten die beiden Moleküle in dieser Studie verstärkt gemessen werden [172]. Ob eine gezielte Therapie der Arthrose durch Eingreifen in den Signalweg von IL-1 β möglich ist, wird derzeit bereits in verschiedenen Studien untersucht [173, 174]. Einen breiten Einsatz solcher Therapie gibt es bei OA Patientinnen und Patienten bisher nicht.

In der Literatur wird wiederholt beschrieben, dass IL-1 β an verschiedenen Osteoarthroseprozessen beteiligt ist und in betroffenen Gelenken vermehrt vorkommt.

Dies bestätigt sich auch in dieser Studie. Die Immunfluoreszenzen zeigen das eindeutigste Signal im Bereich der *Big Cluster*, die von den Arthroseprozessen besonders stark betroffen sind. Auch die ELISAs zeigen eine maximale Konzentration an IL-1 β im Bereich der *Big Cluster* und eine geringe Ausprägung in den anderen Mustern. IL-1 β scheint somit insbesondere in stark von Arthrose betroffenen Gelenken eine Rolle zu spielen und gleich an mehreren Signalwegen beteiligt zu sein. Da allerdings auch eine Beteiligung von IL-1 β an der Differenzierung in Richtung einer fibroblastischen Morphologie beschrieben wird, würde eine erhöhte Konzentration dieses Markers im Muster des *diffusen Knorpels* Sinn machen und darauf hindeuten, dass es sich bei diesen Zellen um fibroblastisch differenzierte Chondrozyten handelt. Allerdings fällt für beide Inflamationsmarker (IL-6 und IL-1 β) auf, dass mit dem Übergang von den *Big Cluster* zum *diffusen Knorpel* die Konzentration des jeweiligen Interleukins wieder abfällt. Dies verschärft die Frage, ob der *diffuse Knorpel* durch Progression der Arthrose aus den *Big Cluster* entsteht. Wäre der *diffuse Knorpel* die nächste Degenerationsstufe nach den Clustern, so würde man einen Anstieg oder zumindest ein Gleichbleiben der Inflamationsmarker im Vergleich zu den Clustern erwarten. Dass die Konzentration im *diffusen Knorpel* unter der Konzentration der Cluster liegt, stützt eher die These, dass es sich bei den diffusen Zellen nicht um Chondrozyten, sondern um eine eigene Entität handelt. Das fibrozytenähnliche Aussehen der Zellen legt beispielsweise nahe, dass es sich um eingewanderte Fibrozyten aus der Synovialis handeln könnte, die im Rahmen der OA nachgewiesen zur Hypertrophie neigt.

4.2.4 Hypertrophe Differenzierung

Im Verlauf der OA kann sich der Phänotyp der Chondrozyten verändern, man spricht dann von Differenzierung. Insbesondere ein Wechsel zu einem hypertrophen Phänotyp mit entsprechend verändertem Expressionsmuster lässt sich mit fortschreitender Arthrose beobachten [120]. Hypertrophierte Chondrozyten produzieren vermehrt Col10 und MMP13 [175]. Auch VEGF und Indian Hedgehog (IHH) [176] sowie OCN [123] und OPN [177] werden von hypertrophen Chondrozyten vermehrt exprimiert. Das veränderte Expressionsmuster der Chondrozyten trägt mit der Zeit zu einer veränderten Zusammensetzung der EZM bei und somit zu einem Fortschreiten der Arthrose. Das veränderte Expressionsmuster, aber auch die zunehmende Mineralisation der Matrix,

indizieren, dass die Chondrozyten, während sie hypertrophieren und ihr Expressionsmuster ändern, einen Prozess durchlaufen, welcher der enchondralen Ossifikation ähnelt [178]. In dieser Studie wurden insbesondere das Vorkommen von Osteocalcin (OCN), Osteopontin (OPN) und Kollagen X (Col10) in Bezug auf die verschiedenen Chondrozytenmuster analysiert.

Kollagen X (Col10) ist ein Protein das inzwischen als spezifischer Marker der hypertrophen Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation und verschiedener Skelett-Erkrankungen identifiziert wurde [179]. Mausmodelle zeigten ein vermehrtes Vorkommen von Col10 in arthrotischem Knorpel an Stellen mit Osteophytenformation, Knorpelläsionen oder Oberflächenfibrillation [180]. Immunhistologische Färbungen zeigten auch, dass in arthrotischem Knorpel insbesondere die hypertrophen, in Clustern formierten Chondrozyten Kollagen exprimierten [181]. Mittels eines spezifischen Assays konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Serum Konzentrationen für Col10 der Patientinnen und Patienten mit radiologischen Arthrosezeichen signifikant höher waren als bei gesunden Patientinnen und Patienten [182].

Die stadienspezifischen Ergebnisse dieser Studie ergänzen die Bilanz der endpunktorientierten Studien der Literaturrecherche sinnvoll. Die Immunfluoreszenzen zeigen im Bereich des weitgehend intakten Knorpels allenfalls einen schmalen Saum um die einzelnen Chondrozyten. Mit Progression zu den Clustern hingegen zeigt sich ein deutlicher Signalzuwachs. Man sieht auch, dass sich die Verteilung des Col10 in den Clustern anders darstellt. Die EZM der *Strings* und *Double Strings* ist frei von Col10. In den Clustern hingegen ist die gesamte Matrix von Col10 durchsetzt, was dafür spricht, dass das veränderte Expressionsmuster der Chondrozyten zu Gunsten des Col10 wesentlich die Zusammensetzung der EZM verändert. Diese Bilder bestätigen auch die Ergebnisse der Studien, die ebenfalls eine Zunahme an Col10 in Bereichen mit vielen Chondrozytenclustern beschrieben. Das ELISA von Sascha Hemayatkar-Fink zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Col10 Konzentrationen mit Progression der Arthrose bzw. Musterkategorie, was die Resultate der Immunfluoreszenzen bekräftigt [136]. Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie die Konsultation der Literatur sprechen somit dafür, dass Col10 sowohl ein zentraler Biomarker für die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten als auch für den Osteoarthroseprozess an sich ist.

Osteocalcin (OCN) ist ein Peptidhormon, das von Osteoblasten, Odontoblasten sowie hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsplatte produziert wird und durch Bindung an Calcium und Hydroxyapatit regulatorisch in die Mineralisation von Geweben eingreift [183, 184]. Chondrozyten des arthrotischen Knorpels exprimieren nachweislich Strukturproteine, die insbesondere auch von den hypertrophen Chondrozyten im Rahmen der enchondralen Ossifikation produziert werden, wie beispielsweise Col10 [185]. Die Vermutung liegt also nahe, dass die hypertroph differenzierten Chondrozyten des arthrotischen Knorpels ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, wie die Chondrozyten der enchondralen Ossifikation. Dazu würde auch die Expression von OCN gehören [123]. Tatsächlich wies eine Studie von Pullig et al. mittels in situ Hybridisierungen eine erhöhte Expression von OCN mRNA bei Vorliegen einer moderaten oder schweren OA nach. Die Autoren derselben Studie vermerken auch, dass insbesondere Chondrozyten, die in Clustern organisiert waren, was sie als ein Zeichen der Proliferation deuten, besonders gut mittels OCN-spezifischer Färbungen dargestellt werden konnten [123]. Auch die OCN-Konzentrationen der Synovialflüssigkeit sind bei Patientinnen und Patienten mit einer Arthrose erhöht. Patientinnen und Patienten mit radiologischen Anzeichen einer Kniearthrose wiesen um 47 % erhöhte OCN-Konzentrationen der Synovialflüssigkeit auf [186]. Vieles deutet somit darauf hin, dass Chondrozyten im Rahmen einer Arthroseerkrankung hypertrophieren und ihr Expressionsmuster, dem der enchondralen Ossifikation angleichen und damit auch vermehrt OCN produzieren.

Die hier präsentierte Arbeit lässt sich mit den Ergebnissen der Literatur in Einklang bringen. Die Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte ein deutlich vermehrtes OCN-Signal im Bereich der *Small* und *Big Cluster*. In den *Big Cluster* zeigte sich insbesondere eine Anreicherung des Biomarkers in der EZM, was dafür spricht, dass OCN an deren Mineralisierung beteiligt ist. Auch die ELISAs zeigen einen steten Anstieg von den *Strings* bis zu den *Big Cluster*. Dies deckt sich mit den Literaturergebnissen, die ein vermehrtes Vorkommen des Peptidhormons in arthrotischem Knorpel beschreiben. Es passt insbesondere auch zu der beschriebenen erhöhten Konzentration der OCN mRNA im Bereich von Chondrozytenclustern die Pullig et al. beschrieben haben. Das Expressionsmuster der Cluster scheint somit tatsächlich große Ähnlichkeit mit den hypertrophierten Chondrozyten des Wachstumsprozesses zu haben. Zu berücksichtigen

ist hierbei dennoch, dass im Rahmen der OA mit der Zeit die oberen Knorpelschichten abgerieben werden. Die erhöhten OCN-Konzentrationen können somit zumindest teilweise daher rühren, dass die Chondrozyten der tieferen Knorpelschichten freigelegt werden, die mehr OCN zu produzieren scheinen [123]. Erwähnenswert ist zudem der starke Abfall der OCN-Konzentration im ELISA vom Muster der *Big Cluster* zum *diffusen Knorpel*. OCN scheint ein Marker zu sein, der für die hypertrophen Chondrozyten charakteristisch ist, welche sich vor allem im Bereich großer und kleiner Cluster finden. Der *diffuse Knorpel* weist keine hypertrophen Chondrozyten auf, sondern differenziert in Richtung eines fibroblastischen Phänotyps. Dies dürfte der Grund dafür sein, dass diese Knorpelbereiche kaum OCN beinhalten. Dies stärkt die These, dass der *diffuse Knorpel* eine eigene Entität an Zellen darstellt und nicht aus den hypertrophierten Chondrozyten der Cluster hervorgeht.

Osteopontin (OPN) ist ein Phosphoprotein der EZM, welches auch unter dem Namen Bone Sialoprotein (BSP) bekannt ist. Es wird unter anderem von Osteoblasten, Chondrozyten, Synoviozyten sowie T-Zellen produziert [187]. OPN wurde als Marker der Chondrozyten-Hypertrophie bei OA beschrieben [188]. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass OPN inflammatorische Prozesse modulieren kann und Einfluss auf die zellvermittelte Immunantwort hat [189]. Verschiedene Studien veranschaulichen die Bedeutung des Biomarkers im Rahmen der OA. Honsawek et al. zeigten, dass die OPN-Konzentration in Synovialflüssigkeit und Plasma signifikant erhöht war, wenn Patientinnen und Patienten radiologische Anzeichen einer Arthrose aufwiesen. Plasmakonzentrationen stiegen von 67.2 ± 7.7 ng/mL auf 168.8 ± 15.6 ng/mL an während die Konzentrationen der Synovialflüssigkeit von 168.8 ± 15.6 ng/mL auf 272.1 ± 15.0 ng/mL stiegen, wobei hohe Synovialkonzentrationen zusätzlich mit der Schwere der Erkrankung korrelierten [190]. Weitere Studien bestätigen die erhöhten Konzentrationen in Synovialflüssigkeit und/oder dem Plasma [191, 192]. Gao et al. zeigten, dass neben der Konzentration der Synovialflüssigkeit auch die Konzentrationen in arthrotischem Knorpelmaterial mit 0.6 ± 0.06 pg/ml gegenüber den gesunden Kontrollen mit 0.43 ± 0.07 pg/ml erhöht waren [191]. Obwohl also viele Studien darauf hindeuten, dass OPN an der Genese der Arthrose beteiligt ist und bei Arthrosepatientinnen und -patienten deshalb erhöht vorliegt, ist der genaue Pathomechanismus bisher nicht geklärt. Denkbar wäre, dass die abnorm erhöhte mechanische Belastung im Rahmen der Arthrose zur Veränderung des

Expressions-musters der Chondrozyten zu Gunsten des OPN verändert [124]. Hohe OPN-Konzentrationen können wiederum sowohl matrixdegenerierende Enzyme wie MMP-13 induzieren als auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine anregen und damit zu einer Manifestation eines Circulus vitiosus führen [124, 193].

Die Ergebnisse zeigen, dass die endpunktorientierten Resultate der Literaturrecherche, durch die stadienbezogene Auswertung in dieser Arbeit komplementiert werden. In den Immunfluoreszenzen zeigte sich ein eher schwaches Signal in allen Mustern. In den Ergebnissen des ELISAs hingegen ist ein deutlicher Anstieg der OPN-Konzentration von den *Strings* bis zu den *Small Cluster* zu beobachten. Mit Progression zu den *Big Cluster* ist eine beinahe gleichbleibende Konzentration zu sehen. Dies spricht dafür, dass im Bereich der Cluster, also dem endgradig geschädigten, arthrotischen Knorpel, eine wesentlich erhöhte OPN-Konzentration vorliegt. Dies deckt sich mit der Literatur, die eine erhöhte Konzentration des Biomarkers im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschreibt. Unklar bleibt, warum auch der *diffuse Knorpel* eine OPN-Konzentration auf dem Niveau der Cluster nachweist, während andere Differenzierungsmarker wie z.B. OCN mit dem *diffusen Knorpel* wieder abfallen. Endgültig kann diese Frage nicht beantwortet werden. Zu diskutieren wäre jedoch, ob dies für die These spricht, dass es sich beim *diffusen Knorpel* um eingewanderte Synovialozyten handelt, die nachweislich auch zu den Produzenten des OPN zählen. Dies könnte möglicherweise erklären, warum auch der *diffuse Knorpel* erhöhte OPN-Konzentrationen aufweist. Unklar bleibt darüber hinaus, warum die Immunfluoreszenzfärbungen für OPN eher schwach ausfielen und keine eindeutig steigende Tendenz in Richtung der Cluster zeigten. Zu bedenken ist hier jedoch auch die Möglichkeit, dass das Protokoll oder der verwendete Antikörper nicht optimal für den Nachweis des OPN waren in Knorpelgewebe waren.

Dennoch kann zusammengefasst werden, dass sowohl die veröffentlichte Literatur als auch die eigenen Studienergebnisse dafürsprechen, dass OPN als Marker der hypertrophierten Chondrozyten eine Rolle im Arthroseprozess spielt.

Zusammenfassend gibt es deutliche Anzeichen dafür, dass die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten ein wichtiger Prozess in der Progression einer OA ist und mit einer vermehrten Expression der spezifischen Biomarker (Col10, OCN, OPN) einhergeht. Medikamente die in der Lage sind, gezielt in den Signalweg der hypertrophe

Differenzierung einzugreifen, können somit als zukünftige Therapieansätze in Betracht gezogen werden [182].

4.2.5 DKK-1

Die eindeutige Zuordnung des Glykoproteins **DKK-1** (Dickkopf-related protein1) in den Prozess der OA fällt schwer, da eine Teilhabe an allen vier Prozessen (Differenzierung, Angiogenese, Apoptose und Inflammation) beschrieben wird. Aus diesem Grund wird DKK-1 separiert diskutiert. Auch ob DKK-1 protektiv wirkt oder doch eher ein Risikofaktor für OA ist, bleibt umstritten.

Als Inhibitor der Wnt/ β -catenin-Signalwegs ist DKK-1 an verschiedensten Signalwegen beteiligt. Der Wnt/ β -catenin-Signalweg induziert beispielsweise eine Ausreifung mesenchymaler Stammzellen zu reifen Osteoblasten und trägt somit zur Bildung des Knochenmaterials bei [194]. In vitro Experimente zeigten auch eine Beteiligung des Signalwegs an der Reifung und Hypertrophie der Chondrozyten, der Vaskularisierung und der Formierung des perichondralen Knochens im Rahmen der enchondralen Ossifikation [195]. Die Supplementation von inhibitorischen Proteinen wie DKK-1 führte in Experimenten zu einer Unterdrückung des Wnt Signalwegs und nachfolgend zu einer verringerten hypertrophen Differenzierung der Zellen [196]. Unter diesem Aspekt besitzt DKK-1 als Inhibitor des Wnt/ β -catenin-Signalwegs demnach eine protektive Wirkung auf den Gelenkknorpel durch Verhindern der hypertrophen Differenzierung. DKK-1 senkt nachweislich auch die Produktion von VEGF durch die Osteoblasten womit es sich zusätzlich mildernd auf den Prozess der Angiogenese auswirkt [194]. Tatsächlich konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass eine selektive Inhibition des Wnt Signalwegs durch DKK-1-Überexpression die Ausprägung der OA senkt, ein DKK-1 Mangel scheint hingegen mit erhöhtem OA Risiko verknüpft zu sein [194]. Honsawek et al. wiesen nach, dass niedrige DKK-1 Konzentrationen in Plasma und Synovialflüssigkeit mit einer radiologisch schwereren OA assoziiert sind. OA-Patientinnen und Patienten dieser Studie wiesen Plasmakonzentrationen von 396.0 ± 258.8 pg/ml und eine Konzentration der Synovialflüssigkeit von 58.6 ± 31.8 pg/ml auf. Die Konzentrationen der gesunden Patientinnen und Patienten lagen mit 2348.8 ± 2051 pg/ml im Plasma und 396.0 ± 258.8 pg/ml in der Synovialflüssigkeit deutlich höher [115]. All diese Ergebnisse belegen einen

protektiven Einfluss des Markers DKK-1 über eine Inhibition des Wnt/ β -catenin Signalwegs.

Entgegen diesen Ergebnissen weisen andere Studien eher darauf hin, dass DKK-1 ein Protein ist, dass zur Entstehung einer Arthrose beiträgt. In einer Studie von Weng et al. führte eine gesteigerte Expression von DKK-1 in Synovialzellen zu einem Anstieg der Produktion proangiogenetischer Faktoren sowie der katabolen Enzyme ADAMTS-5 und MMP-3 [197]. Demzufolge hätte DKK-1 einen negativen Einfluss auf den Gelenkknorpel durch Förderung der Angiogenese und Knorpeldegeneration. Einer anderen Studie zufolge wiesen Chondrozyten mit erhöhter DKK-1 Produktion auch eine gesteigerte Expression der Inflammationsmarker IL-1 β und TNF- α , sowie des Apoptosemarkers CASP3 auf [198]. In derselben Studie wurde zudem auch ein kausaler Zusammenhang zwischen der Behandlung von Zellen mit IL-1 β und DKK-1 sowie daraus folgend erhöhter Cleaved CASP3 Konzentration sowie gesteigerter Chondrozytenapoptose beobachtet [198]. Es gibt auch Studien die erhöhte DKK-1 Konzentrationen der Synovialflüssigkeit bei OA Patientinnen und Patienten gemessen haben. Eine Studie ermittelte eine DKK-1 Konzentration in der Synovialflüssigkeit von 180 ± 182 pg/ml bei Vorliegen einer Arthrose gegenüber 128 ± 330 pg/ml bei gesunden Kontrollen. Es gibt somit auch Hinweise darauf, dass erhöhte DKK-1 Konzentrationen eine Arthrose verschlimmern können [199].

Die Ergebnisse verschiedener Studien stehen also in direktem Gegensatz zueinander. In Anbetracht dieser widersprüchlichen Ergebnisse der Literaturrecherche ist es am wahrscheinlichsten, dass der Wnt/ β -catenin-Signalweg in einem sensiblen Gleichgewicht steht. Kovács et al. beschreiben, dass sowohl eine exzessive als auch eine zu geringe Aktivierung des Signalwegs arthrotische Veränderungen im Knorpel induzieren können [200]. Somit ist eine regulierte Aktivität des Signalwegs in einem engen Rahmen wichtig für ein gesundes Gelenk. Eine abweichende Konzentration der Signalmoleküle oder ihrer Inhibitoren, wie DKK-1, nach oben oder unten führt zu einer Störung des sensiblen Gleichgewichts und einer Schädigung des Knorpels.

In dieser Studie wurde DKK-1 mittels ELISA in den Mustern S, DS, BC, Dif in beiden Messungen nachgewiesen. Für das Muster SC lag die Konzentration in einer Messung des Duplikats unterhalb der Nachweisgrenze (NN) und fiel auch in der zweiten Messung des Duplikats sehr gering aus. Dies könnte jedoch auch auf Fehler bei der

Durchführung oder Messung zurückzuführen sein. Der Wnt/ β -catenin Signalweg ist im Knorpel ubiquitär, da er an verschiedensten Prozessen beteiligt ist. Sinn machen würde demnach eigentlich nur, wenn das Protein auch überall zumindest nachweisbar ist, zumal sich DKK-1 mit einer indirekten Immunfluoreszenz in allen Mustern, auch den *Small Cluster*, anfärben lässt. Lässt man die *Small Cluster* einmal außen vor, so lässt sich ein Anstieg der Konzentration von den *Strings* über die *Double Strings* zu den *Big Cluster* mit anschließendem Abfall im *diffusen Knorpel* beobachten. Dies deckt sich mit denjenigen Ergebnissen der Literatur, die erhöhte Konzentrationen bei Arthrosepatientinnen und -patienten beschreiben. Den Studien die ein Absinken der DKK-1 Konzentration bei OA festgestellt haben, widersprechen die Ergebnisse eher. Unklar bleibt der Grund für die steigende Konzentration des Markers. Unter den Gesichtspunkten, dass DKK-1 protektiven Einfluss auf den Knorpel haben kann, könnte die steigende Konzentration eine Gegenregulation des Knorpels bedeuten. Die Produktion könnte gesteigert werden um den Wnt/ β -catenin Signalweg mit seinen negativen Auswirkungen zu inhibieren. Konzentriert man sich auf die Studien, welche eine Förderung arthrotischer Prozesse durch DKK-1 beschreiben, so würde es eher Sinn machen, die steigende Konzentration als Ursache zu betrachten. Die erhöhten DKK-1 Konzentrationen könnten dann zur Verursachung der OA beitragen.

Es zeigt sich somit, dass die gespaltenen Ansichten über die Rolle des DKK-1 Proteins in der Wissenschaft dazu führt, dass stets mehrere, teils diametrale, Interpretationsmöglichkeiten infrage kommen. Da das Protein zudem an verschiedenen Prozessen auf zellulärer Ebene beteiligt ist, wäre es auch denkbar, dass es protektive und schädigende Einflüsse zugleich hat. Beispielsweise könnte es zwar den Prozess der hypertrophen Differenzierung verhindern und gleichzeitig die Inflammation verstärken.

Auffallend ist in dieser Studie auch, dass von den *Big Cluster* zu *Diffuse* ein deutlicher Konzentrationsabfall des Biomarkers zu sehen ist. Dies scheint die These zu stärken, dass es sich bei dem *diffusen* Knorpelzellen um eine eigenständige Zellentität handelt. Wäre der *diffuse Knorpel* die Folgestufe der Cluster, so wäre eher mit einer Kontinuität des Trends zu rechnen.

4.2.6 FGF-23

Verschiedene Moleküle der **FGF** (fibroblast growth factor) Familie spielen eine Rolle bei der Homöostase des Knorpels [201]. Beispielsweise wirkt FGF-2 der Produktion zweier wichtiger Strukturproteine des Knorpels, Decorin und Kollagen II, entgegen [202]. FGF-8 induziert nachweislich die Produktion von MMP-3 und Prostaglandin E₂ und trägt damit zur Degradierung der EZM des Knorpels bei [203]. FGF-9 ist im Rahmen der Osteogenese an der Hypertrophie der Chondrozyten, sowie der Vaskularisierung der Wachstumsplatte beteiligt [204].

Über die Rolle des Moleküls FGF-23 im Rahmen der Arthrose ist bisher wenig bekannt. Allerdings weiß man, dass FGF-23 den Phosphatstoffwechsel des Körpers durch Steigerung der Phosphatausscheidung beeinflussen kann und ein Überschuss an FGF-23 verschiedene Hypophosphatämiesyndrome mitverursachen kann [205, 206]. Somit wäre auch eine Beteiligung an der Kalzifizierung der Knorpelmatrix denkbar. Tatsächlich lag in einer Studie die Expression von FGF-23 durch die Chondrozyten des arthrotischen Knorpels über der Expression gesunder Zellen [116]. Zudem weiß man, dass die Erkrankung der X-chromosomale Hypophosphatämie, die ebenfalls eine OA zur Folge haben kann, mit deutlich erhöhten FGF-23 Werten einhergeht [207].

In dieser Studie lag die Konzentration des Moleküls FGF-23 in allen Chondrozytenmustern unterhalb der Nachweisgrenze. Auch die Immunfluoreszenzen zeigten ein sehr geringes oder stellenweise gar kein Signal. Somit kann davon ausgegangen werden, dass FGF-23 in gesundem und in arthrotischen Knorpel nur in geringen Mengen vorkommt. Es gibt in dieser Arbeit somit keine Anzeichen darauf, dass das Molekül FGF-23 eine zentrale Rolle im Prozess der OA-Formen spielt, die durch Altersprozesse und Belastung des Gelenkknorpels entstehen. Wahrscheinlich ist, dass FGF-23 eher in Arthrosen besonderer Genese, beispielsweise ausgelöst durch eine X-chromosomale Hypophosphatämie, von Bedeutung ist. Da solche Sonderformen der Arthrose andere Ursachen haben, könnten hierbei auch andere Moleküle zu ihrer Entstehung beitragen. Möglicherweise konnte FGF-23 nicht nachgewiesen werden, da die Patientinnen und Patienten dieser Studie mit nicht unter solchen Sonderformen der OA litten.

4.3 Zusammenfassung der Diskussionsergebnisse

Aus den Ergebnissen der Literaturrecherche und den Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wird deutlich, dass OA multifaktoriellen Ursprungs ist und verschiedene Prozesse zur Progression beitragen.

Autoren sind sich weitgehend einig, dass arthrotischer Knorpel vermehrt apoptotische Chondrozyten aufweist, auch wenn die publizierten Zahlen stark variieren. Welche Biomarker bezüglich Apoptose im Rahmen der OA erhöht sind wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Für CASP8 und p53 sind die Literaturergebnisse diesbezüglich nicht eindeutig und in dieser Arbeit waren beide Moleküle nicht eindeutig nachweisbar. Für die Effektorcaspase CASP3 werden in der Literatur einheitlich erhöhte Werte beschrieben und auch in dieser Studie war CASP3 ab Beginn arthrotischer Veränderungen nachweisbar. Apoptose scheint somit ein wichtiger Prozess der OA zu sein, auch wenn das Ausmaß und die vorkommenden Biomarker umstritten sind.

Darüber, dass eine vermehrte Vaskularisierung des Gelenkknorpels mit der Entstehung einer OA einhergeht, herrscht in der Literatur Einigkeit. Auch, dass sowohl PECAM-1 als auch VEGF in verschiedenen Gelenkkompartimenten im Rahmen der OA vermehrt vorkommen wird einheitlich beschrieben. Diese Ergebnisse zeigen ein definitives Vorkommen beider Marker in allen Musterkategorien. Zu Bedenken ist somit die Möglichkeit, dass der Prozess der Angiogenese bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Knorpeldegeneration vermehrt eingeleitet wird.

Eine OA geht stets mit einer chronischen Inflammation des Gelenks einher. In der Literatur findet man demnach auch Angaben, dass Inflammationsmarker wie IL-6 und IL-1 β von verschiedenen Zellarten des arthrotischen Gelenks vermehrt exprimiert werden. Auch diese Studie konnte ein vermehrtes Vorkommen dieser Marker nachweisen, wobei die maximale Konzentration im stark degradierten Knorpel der Cluster lag. Der inflammatorische Prozess scheint sich somit mit progredienter OA zu aggravieren.

Chondrozyten des arthrotischen Knorpels machen eine Differenzierung in Richtung eines hypertrophen Phänotyps durch. Damit verbunden ist auch ein verändertes Expressionsmuster der Zellen. Dazu gehört auch die vermehrte Expression der Biomarker Col10, OCN und OPN, die in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse dieser Studie decken sich mit der Literatur, da ein vermehrtes Vorkommen der Biomarker im Bereich der *Small Cluster* und *Big Cluster* belegt werden konnte. Im

Rahmen einer OA findet somit nachweislich ein Prozess statt, bei dem die Chondrozyten Veränderungen durchlaufen, die der hypertrophen Differenzierung, während der enchondralen Ossifikation ähnelt.

Im Rahmen dieser Studie wurden die ausgewählten Biomarker unter dem Blickwinkel der verschiedenen Chondrozytenmuster untersucht, die zur Einteilung in verschiedene Schweregrade der OA verwendet wurden. Diese bildmorphologische Einteilung in verschiedene Stadien bewährte sich auch im Rahmen dieser Arbeit. Allerdings gilt ein besonderes Augenmerk dem *diffusen Knorpel*, der manchmal als nächste Progressionsstufe nach den *Big Cluster* beschrieben wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen hingegen dafür, den *diffusen Knorpel* als eigene Entität zu betrachten. Der fibroblastisch anmutende Phänotyp unterscheidet sich bereits optisch deutlich von den eher hypertrophen Chondrozyten der *Big Cluster*. Zudem lässt sich bei diversen Biomarkern (IL1 β , IL6, OCN, DKK-1) nach zuvor steigender Tendenz ein Abfall von den *Big Cluster* hin zum *diffusen Knorpel* beobachten. Dies spricht ebenfalls gegen die These, dass sich der *diffuse Knorpel* aus den *Big Cluster* entwickelt. Zu diskutieren und weitergehend zu untersuchen wäre stattdessen, ob es sich beim *diffusen Knorpel* um eine eigenständige Entität anderen Ursprungs handelt, bspw. um eingewanderte Synovialozyten im Rahmen einer hypertrophierenden Synovia.

4.4 Studienlimitierende Faktoren

Ein stark einschränkender Faktor war die äußerst aufwendige Probengewinnung. Es war notwendig die Proben der 93 Patientinnen und Patienten zu poolen, um ausreichend Gesamtprotein für die Durchführung der ELISAs und Western Blots zu gewinnen. In den Probedurchläufen der ELISAs zeigte sich zudem, dass für viele der untersuchten Biomarker teilweise sehr große Menge an Gesamtprotein benötigt wurden. Es war deshalb lediglich möglich, die ELISA Messungen in Duplikaten durchzuführen, nicht aber die Messungen unabhängig voneinander zu wiederholen. Die tatsächliche Stichprobengröße der ELISA-Messungen beträgt somit eins ($n=1$). Dies macht eine komplexere statistische Auswertung unmöglich, weshalb sich auf eine rein deskriptive Statistik beschränkt werden musste.

Für die Apoptosemarker (p53, CASP3, CASP8) wurden Western Blots durchgeführt, da hierfür eine geringere Menge Gesamtprotein benötigt wurde. Allerdings erlaubt diese

Methode lediglich eine semiquantitative Auswertung bzw. Aussagen darüber, ob das gesuchte Protein überhaupt in der Probe vorhanden war.

Weiterhin ist anzumerken, dass die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen qualitativer Art ist. Hierdurch ist es möglich, zu beurteilen, ob sich die Lokalisation und Intensität des Signals mit Progression der Arthrose verändert. Beispielsweise lässt sich eine Verschiebung der Biomarker von der PZM in Richtung EZM darstellen. Quantitativ Messen kann man diese Phänomene und die absoluten Konzentrationen der Biomarker jedoch nicht.

5 Zusammenfassung

Knorpelproben aus unterschiedlichen Arthrostadien zu untersuchen bietet die Möglichkeit, detailliertere Einblicke in die pathologischen Prozesse auf zellulärer Ebene zu erhalten, die bei Osteoarthrose von Relevanz sind. Das dominierende Chondrozytenmuster kann dabei zur stadienspezifischen Einteilung der Knorpelproben genutzt werden.

In dieser Arbeit wurden 12 verschiedenen Biomarker untersucht, denen eine Relevanz für die Prozesse Apoptose, Angiogenese, Inflammation und hypertrophe Differenzierung im Rahmen einer Osteoarthrose zugeschrieben wird. Es erfolgte ein Vergleich dieser Biomarker mittels qualitativer Immunfluoreszenzen und quantitativer ELISAs oder semiquantitativer Western Blots. Für die Immunfluoreszenzen wurden Schnitte der superfiziellen Gelenkknorpelschicht gewonnen und mittels spezifischer Antikörper gefärbt. Die Analyse mittels ELISA und Western Blot erfolgte aus isoliertem Protein der Stadien *Strings*, *Double Strings*, *Small Cluster*, *Big Cluster* und *Diffuse* des Gelenkknorpels von 93 Patientinnen und Patienten.

Die Ergebnisse und der Literaturvergleich zeichnen ein widersprüchliches Bild bezüglich der Apoptosemarker CASP8 und p53. CASP3 hingegen konnte bereits in den frühen Stadien des arthrotischen Knorpels nachgewiesen werden. Die Literatur erklärt Angiogenese einheitlich zu einem der zentralen Prozesse der Osteoarthrose. Die proangiogenetischen Faktoren PECAM-1 und VEGF waren in dieser Arbeit in allen Stadien der Osteoarthrose nachweisbar vorhanden. Möglicherweise findet die Initiierung der Angiogenese somit schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Krankheit statt. Auch die Inflammation wird in der Literatur als bedeutender Aspekt der Osteoarthrose beschrieben. In dieser Studie bestätigte sich, dass Inflammationsmarker IL-6 und IL-1 β insbesondere im stark arthrotischen Knorpel der *Big Cluster* erhöht waren. Auch zentrale Marker der hypertrophen Differenzierung wie Col10, OCN und OPN kamen in den Clustern in deutlich erhöhten Konzentrationen vor, was sich mit den Ergebnissen der Literatur deckt. Die Ergebnisse sprechen zudem dafür, den *diffusen Knorpel*, der bei hochgradiger Osteoarthrose vermehrt vorkommt, als eigenständige Entität zu betrachten, da zentrale Biomarker (insbesondere IL1 β , IL6, OCN, DKK-1) keine fortführende Tendenz von den *Big Cluster* zum *diffusen Knorpel* zeigten.

Grundsätzlich sprechen die Ergebnisse dafür, weitere stadienspezifische Untersuchungen des arthrotischen Knorpels anzuschließen, um den neu gewonnenen Blickwinkel zu komplementieren.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AIF	apoptosis inducing factor
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
APS	ammonium persulfate
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	BCL2 antagonist killer
Bax	BCL2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BMP	bone morphogenic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	caspase activated DNase
CASP3	Caspase-3
CASP8	Caspase-8
CASP9	Caspase-9
CD31	cluster of differentiation 31
Col10	Kollagen X
CV	Variationskoeffizient
CZ	Chondrozyt
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain
ddH ₂ O	double-distilled water
DGOOC	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie
DISC	death inducing signaling complex
DKK	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FADD	fas associated protein with death domain
FasR	fatty acid synthetase receptor
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	fibroblast growth factor

Abkürzungsverzeichnis

g.....	Erdbeschleunigung, Gramm
GAG.....	Glycosaminoglykane
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h.....	Stunde
HS.....	Hyaluronsäure
ICAD.....	inhibitor of caspase activated DNase
IgG.....	Immunglobulin G
IHH.....	Indian Hedgehog
IL-17.....	Interleukin-17
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6.....	Interleukin-6
ITM.....	Interterritoriale Matrix
IZ.....	Intermediärzone
kDa.....	Kilodalton
Knie-TEP.....	Kniegelenktotalendoprothese
M.....	molar
mA.....	Milliampere
MAPK.....	mitogen-activated protein kinase
min.....	Minute
mL.....	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM.....	Millimolar
MM.....	Magic Marker
MMP.....	Matrix Metalloprotease
mRNA.....	messenger ribonecleic acid
MZ.....	Mineralisierte Zone
NF- κ B.....	nuklear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK.....	Negativkontrolle
nm.....	Nanometer
NN.....	nicht nachweisbar
NO.....	Stickstoffmonoxid
NSAR.....	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OA.....	Osteoarthrose
OCN.....	Osteocalcin
OPN.....	Osteopontin
PAK2.....	p21-activated kinase 2
PCNA.....	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PECAM-1.....	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
pg.....	Pikogramm
PGE2.....	Prostaglandin E2

PK.....	Positivkontrolle
PL.....	Protein Ladder
PZM.....	Perizelluläre Matrix
ROCK1.....	rho-associated kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT.....	Raumtemperatur
RZ.....	Radiärzone
s.....	Sekunde
SDS.....	sodium dodecyl sulfate
sFRP	secreted frizzled related protein
SK.....	Subchondraler Knochen
Std.....	Standard
SZ.....	Superficialzone
TBS-T.....	Tris-buffered saline with Tween20
TeM.....	Territoriale Matrix
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEP	Totalendoprothese
TM.....	Tidemark
TMB	3,3',5,5'Tetramethylbenzidin
TNF.....	tumor necrosis factor
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
V.....	Volt
v/v.....	Volumenprozent
VEGF	vascular endothelial growth factor
VP.....	Verbindungsprotein
WOMAC.....	Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index
\bar{x}	Mittelwert
ZP	Zentralprotein
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das humane Kniegelenk.	2
Abbildung 2: Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels.	5
Abbildung 3: Synovialis des Gelenks im Rahmen der Arthrose.	9
Abbildung 4: Chondrozytenanordnung im Gelenkknorpel.	10
Abbildung 5: Knorpelpräparation für die anschließende Weiterverarbeitung (A-F).	36
Abbildung 6: Schemazeichnung eines 8-well Chamber Slides.	40
Abbildung 7: Pipettierschema des Bradford Assays.	42
Abbildung 8: Schemazeichnung eines Sandwich ELISAs.	44
Abbildung 9: Western Blot Beladung und Antikörperanwendung.	52
Abbildung 10: Beladungsschema der 1. Membran zum Nachweis von CASP3.	53
Abbildung 11: Alters- und Geschlechtsverteilung der Studienpopulation.	54
Abbildung 12: Nachweis der Apoptosemarker in der Positivkontrolle mittels Western Blot.	55
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der CASP3 mittels Immunfluoreszenz.	56
Abbildung 14: Nachweis von CASP3 und GAPDH mittels Western Blot.	57
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der CASP8 mittels Immunfluoreszenz.	58
Abbildung 16: Nachweis von CASP8 und GAPDH mittels Western Blot.	59
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung von p53 mittels Immunfluoreszenz.	60
Abbildung 18 Nachweis von p53 und GAPDH mittels Western Blot.	61
Abbildung 19: Überprüfung der Antikörper gegen die Apoptosemarker.	62
Abbildung 20: Exemplarische Darstellung von VEGF mittels Immunfluoreszenz.	63
Abbildung 21: Quantitativer Nachweis von VEGF mittels ELISA.	64
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung von PECAM-1 mittels Immunfluoreszenz. ...	65
Abbildung 23: Quantitativer Nachweis von PECAM-1 mittels ELISA.	65
Abbildung 24: Exemplarische Darstellung von IL-1 β mittels Immunfluoreszenz.	66
Abbildung 25: Quantitativer Nachweis von IL-1 β mittels ELISA.	67
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von IL-6 mittels Immunfluoreszenz.	68
Abbildung 27: Quantitativer Nachweis von IL-6 mittels ELISA.	69
Abbildung 28: Exemplarische Darstellung von DKK-1 mittels Immunfluoreszenz.	70
Abbildung 29: Quantitativer Nachweis von DKK-1 mittels ELISA.	71
Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von FGF-23 mittels Immunfluoreszenz.	72

<i>Abbildung 31: Exemplarische Darstellung von OCN mittels Immunfluoreszenz.</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 32: Quantitativer Nachweis von OCN mittels ELISA.</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 33: Exemplarische Darstellung von OPN mittels Immunfluoreszenz.</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 34: Quantitativer Nachweis von OPN mittels ELISA.</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 35: Exemplarische Darstellung von Col10 mittels Immunfluoreszenz.</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 36: Quantitativer Nachweis von Col10 mittels ELISA.</i>	<i>77</i>

7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Reagenzien</i>	24
<i>Tabelle 2: Verwendete Enzyme.....</i>	26
<i>Tabelle 3: Verwendete ELISA Kits</i>	26
<i>Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper</i>	27
<i>Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper</i>	28
<i>Tabelle 6: Verwendete Färbungen</i>	29
<i>Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....</i>	29
<i>Tabelle 8: Verwendete Geräte.....</i>	32
<i>Tabelle 9: Verwendete Software</i>	34
<i>Tabelle 10: Zuordnung von Zielstruktur, Primär- und Sekundärantikörper.....</i>	38
<i>Tabelle 11: ELISA Kurzprotokolle der Marker DKK1, FGF-23 und IL-1β</i>	45
<i>Tabelle 12: ELISA Kurzprotokolle der Marker PECAM-1, OPN, OCN und IL-6.</i>	46
<i>Tabelle 13: Verdünnungen der Primärantikörper für die Western Blots</i>	50
<i>Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers VEGF.....</i>	64
<i>Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers PECAM-1.</i>	66
<i>Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers IL1-β.</i>	67
<i>Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers IL-6.</i>	69
<i>Tabelle 18: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers DKK-1.....</i>	71
<i>Tabelle 19: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers FGF-23.....</i>	72
<i>Tabelle 20: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers OCN.</i>	74
<i>Tabelle 21: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers OPN.....</i>	76
<i>Tabelle 22: Tabellarische Darstellung der ELISA Messung des Markers Col10.....</i>	77

8 Literaturverzeichnis

1. Vaienti, E., et al., *Understanding the human knee and its relationship to total knee replacement*. Acta Biomed, 2017. **88**(2s): p. 6-16.
2. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *PROMETHEUS Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 4 ed. 2014, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
3. Kochhal, N., R. Thakur, and V. Gawande, *Incidence of anterior cruciate ligament injury in a rural tertiary care hospital*. J Family Med Prim Care, 2019. **8**(12): p. 4032-4035.
4. Schmidt, W., et al., *Allgemeine Anatomie*, in *Duale Reihe Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2020, Georg Thieme Verlag.
5. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. **1**(6): p. 461-8.
6. Houard, X., M.B. Goldring, and F. Berenbaum, *Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2013. **15**(11): p. 375.
7. Aicher, W.K. and B. Rolaufts, *The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(4): p. 645-53.
8. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. Am J Sports Med, 2005. **33**(2): p. 295-306.
9. Wilusz, R., 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**.
10. Krishnan, Y. and A.J. Grodzinsky, *Cartilage diseases*. Matrix Biol, 2018. **71-72**: p. 51-69.
11. Levick, J.R., *Microvascular architecture and exchange in synovial joints*. Microcirculation, 1995. **2**(3): p. 217-33.
12. Tuan, R.S., A.F. Chen, and B.A. Klatt, *Cartilage regeneration*. The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2013. **21**(5): p. 303-311.
13. Youn, I., et al., *Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy*. Osteoarthritis and Cartilage, 2006. **14**(9): p. 889-897.
14. Gentili, C. and R. Cancedda, *Cartilage and bone extracellular matrix*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(12): p. 1334-48.
15. Mörgelin, M., et al., *The cartilage proteoglycan aggregate: assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions*. Biophys Chem, 1994. **50**(1-2): p. 113-28.
16. Roughley, P.J., *The structure and function of cartilage proteoglycans*. Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 92-101.
17. Ulrich-Vinther, M., et al., *Articular Cartilage Biology*. JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2003. **11**(6): p. 421-430.
18. Han, E.H., et al., *Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage*. Biophys J, 2011. **101**(4): p. 916-24.
19. Mow, V.C., M.H. Holmes, and W. Michael Lai, *Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review*. Journal of Biomechanics, 1984. **17**(5): p. 377-394.

20. Mahjoub, M., F. Berenbaum, and X. Houard, *Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis*. Osteoporosis International, 2012. **23**(8): p. 841-846.
21. Klein, T.J., et al., *Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones*. Tissue Eng Part B Rev, 2009. **15**(2): p. 143-57.
22. Rabenberg, M., *Arthrose*, in *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2013, Robert Koch-Institut: Berlin. p. 10.
23. Johnson, V.L. and D.J. Hunter, *The epidemiology of osteoarthritis*. Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2014. **28**(1): p. 5-15.
24. Litwic, A., et al., *Epidemiology and burden of osteoarthritis*. Br Med Bull, 2013. **105**: p. 185-99.
25. Rolauffs, B., et al., *Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(6): p. 1637-47.
26. Busija, L., R. Buchbinder, and R.H. Osborne, *A grounded patient-centered approach generated the personal and societal burden of osteoarthritis model*. J Clin Epidemiol, 2013. **66**(9): p. 994-1005.
27. Martel-Pelletier, J., et al., *Osteoarthritis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16072.
28. Palazzo, C., et al., *Risk factors and burden of osteoarthritis*. Ann Phys Rehabil Med, 2016. **59**(3): p. 134-138.
29. Hannan, M.T., D.T. Felson, and T. Pincus, *Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee*. J Rheumatol, 2000. **27**(6): p. 1513-7.
30. Wang, T. and C. He, *Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2018. **44**: p. 38-50.
31. O'Brien, M.S. and J.J. McDougall, *Age and frailty as risk factors for the development of osteoarthritis*. Mech Ageing Dev, 2019. **180**: p. 21-28.
32. Warner, S.C. and A.M. Valdes, *Genetic association studies in osteoarthritis: is it fairytale?* Curr Opin Rheumatol, 2017. **29**(1): p. 103-109.
33. Hussain, S.M., et al., *Female hormonal factors and osteoarthritis of the knee, hip and hand: a narrative review*. Climacteric, 2018. **21**(2): p. 132-139.
34. Thomas, S., et al., *What is the evidence for a role for diet and nutrition in osteoarthritis?* Rheumatology (Oxford), 2018. **57**(suppl_4): p. iv61-iv74.
35. Vina, E.R. and C.K. Kwoh, *Epidemiology of osteoarthritis: literature update*. Curr Opin Rheumatol, 2018. **30**(2): p. 160-167.
36. Øiestad, B.E., et al., *Knee extensor muscle weakness is a risk factor for development of knee osteoarthritis. A systematic review and meta-analysis*. Osteoarthritis Cartilage, 2015. **23**(2): p. 171-7.
37. Thomas, A.C., et al., *Epidemiology of Posttraumatic Osteoarthritis*. J Athl Train, 2017. **52**(6): p. 491-496.
38. Papalia, R., et al., *Sport activity as risk factor for early knee osteoarthritis*. J Biol Regul Homeost Agents, 2019. **33**(2 Suppl. 1): p. 29-37.
39. Taruc-Uy, R.L. and S.A. Lynch, *Diagnosis and treatment of osteoarthritis*. Prim Care, 2013. **40**(4): p. 821-36, vii.
40. Hsu, H. and R.M. Siwiec, *Knee Osteoarthritis*, in *StatPearls*. 2020, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).
41. Goldring, M.B. and M. Otero, *Inflammation in osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2011. **23**(5): p. 471-8.

42. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1192**: p. 230-7.
43. Hayashi, D., et al., *Imaging of synovitis in osteoarthritis: current status and outlook*. Semin Arthritis Rheum, 2011. **41**(2): p. 116-30.
44. Madry, H., F.P. Luyten, and A. Facchini, *Biological aspects of early osteoarthritis*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2012. **20**(3): p. 407-22.
45. Orita, S., et al., *Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee*. BMC Musculoskelet Disord, 2011. **12**: p. 144.
46. Mathiessen, A. and P.G. Conaghan, *Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 18.
47. Schulze-Tanzil, G., *Intraarticular Ligament Degeneration Is Interrelated with Cartilage and Bone Destruction in Osteoarthritis*. Cells, 2019. **8**(9).
48. O'Reilly, S., A. Jones, and M. Doherty, *Muscle weakness in osteoarthritis*. Curr Opin Rheumatol, 1997. **9**(3): p. 259-62.
49. Hadjidakis, D.J. and Androulakis, II, *Bone remodeling*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 385-96.
50. Buckland-Wright, C., *Subchondral bone changes in hand and knee osteoarthritis detected by radiography*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12 Suppl A**: p. S10-9.
51. Meo Burt, P., L. Xiao, and M.M. Hurley, *FGF23 Regulates Wnt/ β -Catenin Signaling-Mediated Osteoarthritis in Mice Overexpressing High-Molecular-Weight FGF2*. Endocrinology, 2018. **159**(6): p. 2386-2396.
52. Hashimoto, M., et al., *Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis*. Med Res Rev, 2008. **28**(3): p. 464-81.
53. Lotz, M.K., et al., *Cartilage cell clusters*. Arthritis and rheumatism, 2010. **62**(8): p. 2206-2218.
54. Goldring, M.B., et al., *Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis*. Eur Cell Mater, 2011. **21**: p. 202-20.
55. Fenwick, S.A., P.J. Gregg, and P. Rooney, *Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular*. Osteoarthritis and Cartilage, 1999. **7**(5): p. 441-452.
56. Danalache, M., et al., *Changes in stiffness and biochemical composition of the pericellular matrix as a function of spatial chondrocyte organisation in osteoarthritic cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2019. **27**(5): p. 823-832.
57. Rolauffs, B., et al., *Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints*. Journal of Structural Biology, 2008. **162**(2): p. 335-344.
58. 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. 645-653.
59. Rolauffs, B., et al., *Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 489-98.
60. Felka, T., et al., *Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology*. Osteoarthritis Cartilage, 2016. **24**(7): p. 1200-9.

61. Rötzer, A. and W. Mohr, *[3H-thymidine incorporation into chondrocytes of arthritic cartilage]*. Z Rheumatol, 1992. **51**(4): p. 172-6.
62. Johnson, W.E., S.M. Eisenstein, and S. Roberts, *Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation*. Connect Tissue Res, 2001. **42**(3): p. 197-207.
63. Wang, M., et al., *Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1240**: p. 61-69.
64. Dreier, R., *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*. Arthritis Research & Therapy, 2010. **12**(5): p. 216.
65. Buckwalter, J.A., J. Martin, and H.J. Mankin, *Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis*. Instr Course Lect, 2000. **49**: p. 481-9.
66. Xiao, Z.-f., et al., *Cartilage degradation in osteoarthritis: A process of osteochondral remodeling resembles the endochondral ossification in growth plate? Medical Hypotheses*, 2018. **121**: p. 183-187.
67. Héraud, F., A. Héraud, and M.F. Harmand, *Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(12): p. 959-65.
68. Pfander, D., et al., *Zellproliferation im humanen arthrotischen Gelenkknorpel*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2001. **139**(5): p. 375-81.
69. Hwang, H.S. and H.A. Kim, *Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 26035-54.
70. Kim, H.A. and F.J. Blanco, *Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(2): p. 333-45.
71. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicologic pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
72. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Signaling through death receptors in cancer therapy*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 327-32.
73. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. Embo j, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
74. Li, J. and J. Yuan, *Caspases in apoptosis and beyond*. Oncogene, 2008. **27**(48): p. 6194-206.
75. Tummers, B. and D.R. Green, *Caspase-8: regulating life and death*. Immunol Rev, 2017. **277**(1): p. 76-89.
76. Kiraz, Y., et al., *Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis*. Tumour Biol, 2016. **37**(7): p. 8471-86.
77. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2861-2874.
78. Zamzami, N. and G. Kroemer, *Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization--the (w)hole story?* Curr Biol, 2003. **13**(2): p. R71-3.
79. Li, P., et al., *Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application*. Oncotarget, 2017. **8**(14): p. 23996-24008.
80. Brentnall, M., et al., *Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis*. BMC Cell Biol, 2013. **14**: p. 32.
81. Schimmer, A.D., *Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice*. Cancer Research, 2004. **64**(20): p. 7183-7190.

82. Green, D.R. and F. Llambi, *Cell Death Signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(12).
83. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
84. Hashimoto, S., et al., *Role of p53 in human chondrocyte apoptosis in response to shear strain*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2340-9.
85. Wawryk-Gawda, E., et al., *P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells*. Protoplasma, 2014. **251**(3): p. 525-33.
86. Chen, J., *The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2016. **6**(3): p. a026104-a026104.
87. Schuler, M. and D.R. Green, *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 684-8.
88. Hashimoto, S., et al., *Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(9): p. 1632-8.
89. Blanco, F.J., et al., *Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(2): p. 284-9.
90. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. Arthritis Res, 2001. **3**(2): p. 107-13.
91. Suri, S. and D.A. Walsh, *Osteochondral alterations in osteoarthritis*. Bone, 2012. **51**(2): p. 204-211.
92. Suri, S., et al., *Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis*. Annals of the rheumatic diseases, 2007. **66**(11): p. 1423-1428.
93. Ramjiawan, R.R., A.W. Griffioen, and D.G. Duda, *Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy?* Angiogenesis, 2017. **20**(2): p. 185-204.
94. Walsh, D.A., et al., *Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford, England), 2010. **49**(10): p. 1852-1861.
95. Brown, R.A. and J.B. Weiss, *Neovascularisation and its role in the osteoarthritic process*. Annals of the rheumatic diseases, 1988. **47**(11): p. 881-885.
96. Walsh, D.A., et al., *Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(7): p. 743-51.
97. Mapp, P.I. and D.A. Walsh, *Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis*. Nature Reviews Rheumatology, 2012. **8**(7): p. 390-398.
98. Melincovici, C.S., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(2): p. 455-467.
99. Beckmann, R., et al., *Mechanical forces induce changes in VEGF and VEGFR-1/sFlt-1 expression in human chondrocytes*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 15456-74.
100. Melinte, R., et al., *VEGF and CD31 expression in arthritic synovium and cartilage of human knee joints*. Rom J Morphol Embryol, 2012. **53**(4): p. 911-5.
101. Robinson, W.H., et al., *Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(10): p. 580-92.
102. Lee, A.S., et al., *A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain*. Gene, 2013. **527**(2): p. 440-7.

103. Guerne, P.A., D.A. Carson, and M. Lotz, *IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro*. J Immunol, 1990. **144**(2): p. 499-505.
104. Kapoor, M., et al., *Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(1): p. 33-42.
105. Scanzello, C.R., *Chemokines and inflammation in osteoarthritis: Insights from patients and animal models*. J Orthop Res, 2017. **35**(4): p. 735-739.
106. Li, H., et al., *New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 248.
107. Knäuper, V., et al., *The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7608-16.
108. Mitchell, P.G., et al., *Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage*. J Clin Invest, 1996. **97**(3): p. 761-8.
109. Attur, M.G., et al., *Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8*. Proc Assoc Am Physicians, 1998. **110**(1): p. 65-72.
110. Blanco, F.J., et al., *Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 75-85.
111. Marcu, K.B., et al., *NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(5): p. 599-613.
112. Zhou, Y., et al., *Wnt/ β -catenin Signaling in Osteoarthritis and in Other Forms of Arthritis*. Curr Rheumatol Rep, 2017. **19**(9): p. 53.
113. Deshmukh, V., et al., *A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee*. Osteoarthritis Cartilage, 2018. **26**(1): p. 18-27.
114. Oh, H., C.H. Chun, and J.S. Chun, *Dkk-1 expression in chondrocytes inhibits experimental osteoarthritic cartilage destruction in mice*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2568-78.
115. Honsawek, S., et al., *Dickkopf-1 (Dkk-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients*. BMC Musculoskelet Disord, 2010. **11**: p. 257.
116. Orfanidou, T., et al., *Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 regulation in osteoarthritic chondrocytes*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9b): p. 3186-94.
117. Speichert, S., et al., *Role of Norepinephrine in IL-1 β -Induced Chondrocyte Dedifferentiation under Physioxia*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(5).
118. Ripmeester, E.G.J., et al., *Recent Insights into the Contribution of the Changing Hypertrophic Chondrocyte Phenotype in the Development and Progression of Osteoarthritis*. Front Bioeng Biotechnol, 2018. **6**: p. 18.
119. Filip, A., et al., *A simple two dimensional culture method to study the hypertrophic differentiation of rat articular chondrocytes*. Biomed Mater Eng, 2015. **25**(1 Suppl): p. 87-102.
120. Charlier, E., et al., *Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)*. Biochem Pharmacol, 2019. **165**: p. 49-65.
121. Wang, J., et al., *The role of the fibroblast growth factor family in bone-related diseases*. Chemical Biology & Drug Design, 2019. **94**(4): p. 1740-1749.

122. Henry, J.P. and B. Bordoni, *Histology, Osteoblasts*, in *StatPearls*. 2020, StatPearls Publishing: Treasure Island (FL).
123. Pullig, O., et al., *Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone*. *Calcif Tissue Int*, 2000. **67**(3): p. 230-40.
124. Cheng, C., S. Gao, and G. Lei, *Association of osteopontin with osteoarthritis*. *Rheumatol Int*, 2014. **34**(12): p. 1627-31.
125. Hwang, S.G., et al., *c-Jun/activator protein-1 mediates interleukin-1beta-induced dedifferentiation but not cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(33): p. 29780-7.
126. Kim, S.J., et al., *p38 kinase-dependent and -independent Inhibition of protein kinase C zeta and -alpha regulates nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 30375-81.
127. Zacher, J. and A. Gursche, *Diagnostik der Arthrose*. *Der Orthopäde*, 2001. **30**(11): p. 841-847.
128. Copsey, B., et al., *Problems persist in reporting of methods and results for the WOMAC measure in hip and knee osteoarthritis trials*. *Qual Life Res*, 2019. **28**(2): p. 335-343.
129. Madry, H., et al., *Early osteoarthritis of the knee*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016. **24**(6): p. 1753-62.
130. Lotz, M., et al., *Republished: Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives*. *Postgrad Med J*, 2014. **90**(1061): p. 171-8.
131. Altman, R.D., *Early management of osteoarthritis*. *Am J Manag Care*, 2010. **16 Suppl Management**: p. S41-7.
132. Pereira, D., E. Ramos, and J. Branco, *Osteoarthritis*. *Acta Med Port*, 2015. **28**(1): p. 99-106.
133. Stöve, J., *S2k Leitlinie Gonarthrose*. 2018, Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC). p. 19-50.
134. Toni, L., J. Schmitt, K.P. Günther, C. Kopkow, J. Lützner, *Langfassung:S2k-LL: Indikation Knieendoprothese*. 2018, Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie e.V. (DGOOC).
135. Bundesamt, S., *Die 20 häufigsten Operationen insgesamt (OPS5)*. 2020, Statistisches Bundesamt (Destatis): Wiesbaden.
136. Hemayatkar-Fink, S., *Chondrozytendifferenzierung in der altersbedingten Knorpeldegeneration als eine Funktion der räumlichen Chondrozytenanordnung, in Universitätsklinik für Orthopädie*. 2023, Eberhard Karls Universität Tübingen: Tübingen.
137. Firestein, G.S., et al., *Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium*. *Am J Pathol*, 1996. **149**(6): p. 2143-51.
138. Zhu, X., et al., *Roles of Cell Cycle Regulators Cyclin D1, CDK4, and p53 in Knee Osteoarthritis*. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2016. **20**(9): p. 529-34.
139. Iannone, F., et al., *Increased Bcl-2/p53 ratio in human osteoarthritic cartilage: a possible role in regulation of chondrocyte metabolism*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(2): p. 217-21.
140. Tak, P.P., et al., *p53 overexpression in synovial tissue from patients with early and longstanding rheumatoid arthritis compared with patients with reactive arthritis and osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(5): p. 948-53.

141. Lee, Y.H., et al., *Expression of p53 protein in rheumatoid arthritis synovium. An immunohistochemical analysis.* Korean J Intern Med, 1999. **14**(1): p. 59-65.
142. Fritsch, M., et al., *Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis.* Nature, 2019. **575**(7784): p. 683-687.
143. D'Lima, D., et al., *Caspase inhibitors reduce severity of cartilage lesions in experimental osteoarthritis.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(6): p. 1814-21.
144. Robertson, C.M., et al., *Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits.* Osteoarthritis and Cartilage, 2006. **14**(5): p. 471-476.
145. Pennock, A.T., et al., *Role of apoptotic and matrix-degrading genes in articular cartilage and meniscus of mature and aged rabbits during development of osteoarthritis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(5): p. 1529-36.
146. Mazumder, S., D. Plesca, and A. Almasan, *Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis.* Methods Mol Biol, 2008. **414**: p. 13-21.
147. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
148. Yassin, A.M., et al., *COL2A1 and Caspase-3 as Promising Biomarkers for Osteoarthritis Prognosis in an Equus asinus Model.* Biomolecules, 2020. **10**(3).
149. Sharif, M., et al., *Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 507-15.
150. Matsuo, M., et al., *Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage.* Acta Med Okayama, 2001. **55**(6): p. 333-40.
151. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis.* Arthritis research, 2001. **3**(2): p. 107-113.
152. Mistry, D., M.G. Chambers, and R.M. Mason, *The role of adenosine in chondrocyte death in murine osteoarthritis and in a murine chondrocyte cell line.* Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(5): p. 486-95.
153. Hu, Y., et al., *Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain.* Bone Res, 2021. **9**(1): p. 20.
154. Mabey, T., et al., *Angiogenic cytokine expression profiles in plasma and synovial fluid of primary knee osteoarthritis.* Int Orthop, 2014. **38**(9): p. 1885-92.
155. Pfander, D., et al., *Vascular endothelial growth factor in articular cartilage of healthy and osteoarthritic human knee joints.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2001. **60**(11): p. 1070-1073.
156. Enomoto, H., et al., *Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage.* Am J Pathol, 2003. **162**(1): p. 171-81.
157. Jackson, J.R., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in synovial fibroblasts is induced by hypoxia and interleukin 1beta.* J Rheumatol, 1997. **24**(7): p. 1253-9.
158. Saetan, N., et al., *Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis.* Int Orthop, 2014. **38**(5): p. 1099-104.

159. Corrado, A., A. Neve, and F.P. Cantatore, *Expression of vascular endothelial growth factor in normal, osteoarthritic and osteoporotic osteoblasts*. Clin Exp Med, 2013. **13**(1): p. 81-4.
160. Aigner, T., et al., *Gene expression profiling of serum- and interleukin-1 beta-stimulated primary human adult articular chondrocytes--a molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor*. Cytokine, 2005. **31**(3): p. 227-40.
161. Wiegertjes, R., F.A.J. van de Loo, and E.N. Blaney Davidson, *A roadmap to target interleukin-6 in osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2020. **59**(10): p. 2681-2694.
162. Beekhuizen, M., et al., *An explorative study comparing levels of soluble mediators in control and osteoarthritic synovial fluid*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. **21**(7): p. 918-22.
163. Stannus, O., et al., *Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(11): p. 1441-7.
164. Guerne, P.A., et al., *Synovium as a source of interleukin 6 in vitro. Contribution to local and systemic manifestations of arthritis*. J Clin Invest, 1989. **83**(2): p. 585-92.
165. Doss, F., et al., *Elevated IL-6 levels in the synovial fluid of osteoarthritis patients stem from plasma cells*. Scand J Rheumatol, 2007. **36**(2): p. 136-9.
166. Clockaerts, S., et al., *The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(7): p. 876-82.
167. Rahmati, M., A. Mobasheri, and M. Mozafari, *Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges*. Bone, 2016. **85**: p. 81-90.
168. Kang, S., et al., *Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 1007-1023.
169. Jenei-Lanzl, Z., A. Meurer, and F. Zaucke, *Interleukin-1 β signaling in osteoarthritis - chondrocytes in focus*. Cell Signal, 2019. **53**: p. 212-223.
170. Panina, S.B., et al., *Circulating levels of proinflammatory mediators as potential biomarkers of post-traumatic knee osteoarthritis development*. J Orthop Traumatol, 2017. **18**(4): p. 349-357.
171. McNulty, A.L., et al., *Synovial fluid concentrations and relative potency of interleukin-1 alpha and beta in cartilage and meniscus degradation*. J Orthop Res, 2013. **31**(7): p. 1039-45.
172. Saha, N., et al., *Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(8): p. 1577-87.
173. Fleischmann, R.M., et al., *A Phase II Trial of Lutikizumab, an Anti-Interleukin-1 α / β Dual Variable Domain Immunoglobulin, in Knee Osteoarthritis Patients With Synovitis*. Arthritis Rheumatol, 2019. **71**(7): p. 1056-1069.
174. Kloppenburg, M., et al., *Phase IIa, placebo-controlled, randomised study of lutikizumab, an anti-interleukin-1 α and anti-interleukin-1 β dual variable domain immunoglobulin, in patients with erosive hand osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2019. **78**(3): p. 413-420.
175. Hall, A.C., *The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype-Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering*. Curr Rheumatol Rep, 2019. **21**(8): p. 38.

176. Rim, Y.A., Y. Nam, and J.H. Ju, *The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(7).
177. Pullig, O., et al., *Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage*. Matrix Biol, 2000. **19**(3): p. 245-55.
178. He, Y., et al., *Potential diagnostic value of a type X collagen neo-epitope biomarker for knee osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2019. **27**(4): p. 611-620.
179. Gu, J., et al., *Identification and characterization of the novel Col10a1 regulatory mechanism during chondrocyte hypertrophic differentiation*. Cell Death Dis, 2014. **5**(10): p. e1469.
180. Eerola, I., et al., *Type X collagen, a natural component of mouse articular cartilage: association with growth, aging, and osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(7): p. 1287-95.
181. Girkontaite, I., et al., *Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies*. Matrix Biol, 1996. **15**(4): p. 231-8.
182. He, Y., et al., *Type X collagen levels are elevated in serum from human osteoarthritis patients and associated with biomarkers of cartilage degradation and inflammation*. BMC Musculoskelet Disord, 2014. **15**: p. 309.
183. Lombardi, G., et al., *A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles*. Endocrine, 2015. **48**(2): p. 394-404.
184. Goyal, N., et al., *Immunohistochemical analysis of ageing and osteoarthritic articular cartilage*. J Mol Histol, 2010. **41**(4-5): p. 193-7.
185. von der Mark, K., et al., *Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(7): p. 806-11.
186. Sharif, M., E. George, and P.A. Dieppe, *Correlation between synovial fluid markers of cartilage and bone turnover and scintigraphic scan abnormalities in osteoarthritis of the knee*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 78-81.
187. Yamaga, M., et al., *Osteopontin level in synovial fluid is associated with the severity of joint pain and cartilage degradation after anterior cruciate ligament rupture*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49014.
188. Pesesse, L., et al., *Consequences of chondrocyte hypertrophy on osteoarthritic cartilage: potential effect on angiogenesis*. Osteoarthritis Cartilage, 2013. **21**(12): p. 1913-23.
189. Wang, K.X. and D.T. Denhardt, *Osteopontin: role in immune regulation and stress responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(5-6): p. 333-45.
190. Honsawek, S., et al., *Correlation of plasma and synovial fluid osteopontin with disease severity in knee osteoarthritis*. Clin Biochem, 2009. **42**(9): p. 808-12.
191. Gao, S.G., et al., *Elevated osteopontin level of synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis patients*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(1): p. 82-7.
192. Mohammed, F.I., M.I. Abd El-Azeem, and A.M. KamalEIDin, *Plasma and synovial fluid osteopontin levels in patients with knee osteoarthritis: Relation to radiological grade*. The Egyptian Rheumatologist, 2012. **34**(3): p. 131-136.
193. Xu, M., et al., *Phosphorylation of osteopontin in osteoarthritis degenerative cartilage and its effect on matrix metalloprotease 13*. Rheumatol Int, 2013. **33**(5): p. 1313-9.

194. Funck-Brentano, T., et al., *Dkk-1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone ameliorates osteoarthritis in mice*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(11): p. 3028-39.
195. Dao, D.Y., et al., *Cartilage-specific β -catenin signaling regulates chondrocyte maturation, generation of ossification centers, and perichondrial bone formation during skeletal development*. J Bone Miner Res, 2012. **27**(8): p. 1680-94.
196. Leijten, J.C., et al., *Gremlin 1, frizzled-related protein, and Dkk-1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(10): p. 3302-12.
197. Weng, L.H., et al., *Dkk-1 promotes angiogenic responses and cartilage matrix proteinase secretion in synovial fibroblasts from osteoarthritic joints*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(10): p. 3267-77.
198. Weng, L.H., et al., *Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint*. Osteoarthritis Cartilage, 2009. **17**(7): p. 933-43.
199. Theologis, T., et al., *Association between serum and synovial fluid Dickkopf-1 levels with radiographic severity in primary knee osteoarthritis patients*. Clin Rheumatol, 2017. **36**(8): p. 1865-1872.
200. Kovács, B., E. Vajda, and E.E. Nagy, *Regulatory Effects and Interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK Signaling at the Bone-Cartilage Interface in Osteoarthritis*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(18).
201. Xie, Y., et al., *Fibroblast growth factor signalling in osteoarthritis and cartilage repair*. Nat Rev Rheumatol, 2020. **16**(10): p. 547-564.
202. Sonal, D., *Prevention of IGF-1 and TGFbeta stimulated type II collagen and decorin expression by bFGF and identification of IGF-1 mRNA transcripts in articular chondrocytes*. Matrix Biol, 2001. **20**(4): p. 233-42.
203. Uchii, M., et al., *Role of fibroblast growth factor 8 (FGF8) in animal models of osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R90.
204. Hung, I.H., et al., *FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod*. Dev Biol, 2007. **307**(2): p. 300-13.
205. Lecoq, A.L., et al., *Management of X-linked hypophosphatemia in adults*. Metabolism, 2020. **103s**: p. 154049.
206. Carpenter, T.O., *The expanding family of hypophosphatemic syndromes*. J Bone Miner Metab, 2012. **30**(1): p. 1-9.
207. Beck-Nielsen, S.S., et al., *FGF23 and its role in X-linked hypophosphatemia-related morbidity*. Orphanet J Rare Dis, 2019. **14**(1): p. 58.

9 Erklärung zum Eigenanteil

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

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

Die ELISAs der Marker Kollagen X sowie VEGF wurden von Herrn Sascha Hemayatkar-Fink durchgeführt. Mit freundlicher Genehmigung werden die Ergebnisse in dieser Arbeit beschrieben und diskutiert.

Sämtliche weitere Versuche wurden von mir eigenständig (mit Unterstützung durch Frau PhD M.Sc. Marina Danalache und Frau Rosa Riester) durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auch für ein Manuskript verwendet, welches derzeit zur Veröffentlichung eingereicht, aber bisher unveröffentlicht ist.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 20.02.2023

Lea Cathrine Grötzner

10 Danksagung

Während aller Stadien dieser Arbeit wurde ich durch eine Reihe von Personen unterstützt, denen ich hiermit meinen tiefsten Dank aussprechen möchte:

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Ulf Krister Hofmann für die Konzeption dieser Arbeit und die zuverlässigen Hilfestellungen bei inhaltlichen Fragen. Danke für die vielen Stunden des intensiven Austauschs und die unermüdliche Unterstützung bei sämtlichen aufkommenden Schwierigkeiten sowie die umfassende Begleitung während des Schreib- und Korrekturprozesses dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des Zellforschungslabor der Orthopädie in Tübingen, die meine Zeit dort fachlich und persönlich bereichert haben. Allen voran möchte ich hierbei meiner Betreuerin PhD M.Sc. Marina Danalache danken, die mir mit ihren fachlichen Kenntnissen aber auch ihrer aufbauenden und empathischen Art eine enorme Stütze war. Zudem danke ich Frau Rosa Riester, auf deren umfangreiche Laborerfahrung und Motivationskünste ich stets zählen konnte.

Ein Dankeschön gilt auch dem Interdisziplinären Zentrum für klinische Forschung (IZKF) für die finanzielle und ideelle Förderung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern, Barbara und Wolfgang Grötzner, deren Rückhalt unerschöpflich und deren Ohren und Arme immer offen waren. Meinen Schwestern, Sophia und Cara Grötzner, weil mit ihnen alles ein wenig leichter und bunter erscheint. Zuletzt meiner Großmutter, Helga Grötzner, weil jeder Mensch eine starke Frau zum Vorbild braucht.