

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
An der Universität Tübingen

**Matrixmetalloproteasen 1, 2, 3, 9, 13 - und
Kollagen Typ VI - mRNA-Expression humaner
Chondrozyten in verschiedenen räumlichen
Organisationsformen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Egler, Andrea

2019

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. B. Rolauffs

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 16.04.2018

Für meine Eltern,
die mich immer in allem unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Abbildungsverzeichnis.....	10
Tabellenverzeichnis.....	18
1. Einleitung.....	22
1.1 Allgemeine Informationen zur Erkrankung der Arthrose.....	22
1.2 Physiologischer makro- und mikroskopischer Aufbau des Kniegelenks..	23
1.3 Pathologische Veränderungen im Knorpel bei OA	27
1.4 Matrixmetalloproteasen und ihre Bedeutung für den hyalinen Gelenkknorpel.....	31
1.4 Autofluoreszenz von Knorpelgewebe.....	34
1.5 Ziele der Arbeit.....	36
2. Material und Methoden.....	38
2.1. Materialliste	38
2.1.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien	38
2.1.2. Verwendete Reagenzien.....	39
2.1.3 Verwendete Geräte.....	42
2.1.4 Verwendete Software.....	43
2.2 Herstellung, Färbung und fluoreszenzmikroskopische Sortierung von Disks anhand ihrer räumlichen Organisation	44
2.2.1 Gewinnung von genormten Knorpelgewebeproben aus Knorpel-Knochenfragmenten, die bei der Implantation einer Knieendoprothese gewonnen wurden	44
2.2.2 Herstellung normierter Knorpelgewebstücke der superfiziellen Knorpelzone aus Gewebeproben von Knorpel-Knochenfragmenten	46
2.2.3 Färbung der Zellkerne der in den Knorpel „Disks“ enthaltenen CHs mit 4', 6'-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid (= DAPI)	47
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der, mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbten Disks.....	48

2.2.5 Probengeneration definierter Knorpelproben zur Analyse der relativen mRNA-Expression von bestimmten Zielgenen im Knorpelgewebe definierter OA Stadien	49
2.3. Gewinnung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (= cDNA) aus Knorpelgewebe zur Analyse der relative mRNA-Expression von definierten Zielgenen	52
2.3.1 Schockgefrierung definierter Knorpelgewebeproben mit flüssigem Stickstoff	52
2.3.2 Homogenisieren von schockgefrorenen definierten Knorpelgewebstücken zur Vorbereitung der mRNA-Extraktion.....	53
2.3.3 mRNA-Extraktion aus den generierten definierten Knorpelgewebeproben	54
2.3.4 Umschreiben der isolierten mRNA in cDNA zur Analyse mittels qRT-PCR	58
2.4 Analyse der relativen mRNA-Expression definierter Zielgene mittels quantitativer realtime PCR (= qRT-PCR)	59
2.4.1 Durchführung der qRT-PCR zur Messung der relativen mRNA-Expression definierter Zielgene definierter Knorpelproben	59
2.4.2 Primereffizienzbestimmung der, zur mRNA-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR verwendeten Primer	62
2.4.3 Gel-Elektrophorese zur Überprüfung auf die adäquate Amplifikation des qRT-PCR Produkts	63
2.4.4 Quantifizierung der relativen mRNA-Expression mittels qRT-PCR...	64
2.5 Auto- und Immunfluoreszenzmikroskopie humanen Knieknorpels des distalen Femurs der superfiziellen Knorpelschicht	66
2.5.1 Herstellung von Kryotomschnitten aus Disks zur Darstellung von Col6A3 mittels Antikörpermarkierung und Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop	66
2.5.2 Immunhistochemische Darstellung der PZM durch Markierung von Col6A3 mit Antikörpern	67
2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie nativer Kryotomschnitte von Knorpelgewebe und Schnitten mit fluoreszenzmarkiertem Kollagen Typ VI in der PZM	68
2.6 Statistische Auswertung der quantitativen Analyse mit qRT-PCR der relativen mRNA-Expression der definierten Knorpelproben.....	68

3. Ergebnisse	70
3.1 Probengeneration von humanem, superfiziellen Kniegelenksknorpel zur Analyse der relativen mRNA-Expression bestimmter Gene definierter Stadien der OA Entwicklung.....	70
3.1.1 Rekrutierung und Auswahl des Patientenkollektivs.....	70
3.1.2 Zuordnung der mikroskopischen Darstellung fluoreszenzmarkierter superfizieller CHs humaner Femurkondylen nach definierten unterschiedlichen räumlichen Organisationsformen	72
3.2. Quantifizierung der mRNA-Expression definierter MMPs und Col6A3 in unterschiedlicher räumlicher Organisation von superfiziellen CHs humaner Femurkondylen von OA Patienten	79
3.2.1 mRNA-Extraktion von definierten Proben unterschiedlicher räumlicher Organisation von superfiziellen CHs humaner Femurkondylen von OA Patienten.....	79
3.2.2 qRT-PCR definierter MMP und Col6A3 mRNA-Expression in unterschiedlicher räumlicher Organisation von superfiziellen CHs humaner Femurkondylen von OA Patienten	81
3.2.3 Analyse der Spezifität der, durch qRT-PCR amplifizierten, Genprodukte der untersuchten Gene	87
3.3 Quantitative Analyse der relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation	89
3.3.1 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten.....	89
3.4 Autofluoreszenzversuche und Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen durch Fluoreszenzmarkierung von Kollagen Typ VI $\alpha 3$ durch Antikörper.....	119
3.4.1 Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen durch grüne Fluoreszenzmarkierung von Kollagen Typ VI $\alpha 3$	119
3.4.2 Darstellung der PZM von CHs humaner Femurkondylen durch Fluoreszenz-markierung von Col6A3 in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen	124

4. Diskussion.....	128
5. Zusammenfassung.....	140
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	152
Danksagung.....	154

Abkürzungsverzeichnis

BC = Big Cluster

Bp = Basenpaare

BSA = Rinderalbumin

cDNA = komplementäre Desoxyribonucleinsäure, aus RNA synthetisiert

CH/CHs = Chondrozyt/Chondrozyten

Col6A3 = Kollagen Typ VI α 3-Kette

D = Diffus

DAPI = 4', 6'-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid

Disk = Eine Scheibe mit 4mm Durchmesser und 300 μ m Dicke der superfiziellen Knorpelschicht

DMEM = Dulbecco's modified Eagle Medium

DS = Double Strings

EZM = extrazelluläre Matrix

GAG = Gykosaminoglykan

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

IL-1 = Interleukin-1

IL-6 = Interleukin-6

MMP/MMPs = Matrix-Metalloprotease/Matrixmetalloproteasen

MMP-1 = Matrixmetalloprotease 1

MMP-13 = Matrixmetalloprotease 13

MMP-2 = Matrixmetalloprotease 2

MMP-3 = Matrixmetalloprotease 3

MMP-9 = Matrixmetalloprotease 9

mRNA = Boten (= messenger) Ribonucleinsäure

OA = Osteoarthrose

PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung

PG = Proteoglykan

PZM = perizelluläre Matrix

qRT-PCR = quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion

rcf = relative Zentrifugalbeschleunigung

RPL13A = 60S Ribosomales Protein L13a

rpm = Umdrehungen pro Sekunde

S = Strings

SC = Small Cluster

Stanze = eine genormte, 4mm im Durchmesser messende kreisförmige Scheibe der, mit einer Biopsiestanze abgetragenen Knorpeloberfläche

TCA = Trichloroacetat Säure

TIMP = Blocker des Gewebes der Matrixmetalloproteasen (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase)

TNF- α = Tumornekrosefaktor α

Tris-HCl = Trisaminomethan-gepufferte Salzsäure

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels wie in 1.2 beschrieben: Superfizielle Zone (1), Übergangszone (2), Radiärzone (3), Tidemark (4), kalzifizierte Zone (5) und subchondraler Knochen (6). Dazu Kollagenfaserverlauf (10), CHs mit Zellkern (7), PZM (8) und territorialer Matrix (9). Die Ansicht ist ein Schnitt senkrecht zur Oberfläche der superfiziellen Knorpelschicht (1) bis zum subchondralen Knochen (6) reichend. Eigene Abbildung 25

Abbildung 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Superfizienschicht humaner Femurkondylen in unterschiedlichen Stadien der OA. Die CHs sind dabei durch die Färbung der Zellkerne mit 4', 6'-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid (= DAPI) in Blau dargestellt. Das Kollagen Typ VI der PZM ist durch Markierung grün fluoreszierender Antikörperkomplexe dargestellt. Links im Bild ist intakter Knorpel mit der räumlichen Organisation Strings/Double Strings zu sehen, der eine PZM um die CHs herum aufweist. Die beiden Bilder rechts stellen eine geschädigte Knorpeloberfläche dar mit der Oberflächenorganisation Small Cluster/Big Cluster in der Mitte und Diffus rechts. Dabei ist kein Kollagen Typ VI in der PZM mehr vorhanden, welches durch die Antikörper optisch markiert werden kann. Das Bild wurde publiziert in [1] 28

Abbildung 3: Horizontale Ansicht auf die Oberfläche humanen Gelenkknorpels. Dabei stellen die CHs in der superfiziellen Schicht eine horizontale räumliche Organisation dar. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, durch Anfärbung der Zellkerne mit Propidium Iodid, Femurkondylen intakten Knorpels und mit OA, der nach Grad der Schädigung klassifiziert ist. Maßstabslinien 100µm; Collins 0: intakter Knorpel; Collins 1: kleine Oberflächenaufrauungen; Collins 2: Fibrillierung und Fissuren; Collins 3: komplette Defekte, die mehr als 30% der Gelenksoberfläche ausmachen. Bild wurde publiziert in [2]. 29

Abbildung 4: Darstellung der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen im Verlauf der Progression der OA beginnend bei gesundem Knorpel (S), fortschreitend zur kompletten Schädigung (D/End-stage). Bild entnommen aus [1]..... 30

Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der Herstellung normierter Knorpelstanzen (zur Übersicht ohne Bedeckung mit Medium). Man sieht ein Knorpel-Knochen-Fragment einer humanen Femurkondyle mit makroskopisch sichtbaren OA-Erosionen der Knorpeloberfläche, sowie einzelne makroskopisch defektfreie Bereiche. An einer markierten Stelle wurde mithilfe eines Skalpell

die Knorpeloberfläche abgetragen um daraus mit einer Biopsiestanze Gewebeproben genormter Größe zu erhalten. Eigene Aufnahme. 47

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Procedere des Homogenisationsprozess von Knorpelgewebe zur mRNA Isolierung. Wie in 2.2.2 beschrieben, wird vor und nach der Homogenisation jeder Probe der Homogenisatorkopf in der, hier dargestellten Reihenfolge, beginnend bie 1. H₂O dest., durchlaufen. Eigene Darstellung..... 54

Abbildung 7: Altersverteilung und Geschlechtsverteilung der in der mRNA-Analyse verwendeten Knorpelproben von Patienten. Blau dargestellt sind dabei männliche Patienten, während weibliche Patienten rosa dargestellt sind. Eigene Abbildung. 71

Abbildung 8: Verteilung von Geschlecht und Lokalisation der, aus den Kliniken in Tübingen und Rottenburg, erhaltenen Femurkondylen der Probanden. M = männlich und w = weiblich; L = links und r = rechts; ohne r/l = unbekannt. Eigene Abbildung. 72

Abbildung 9: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation S der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung. 73

Abbildung 10: Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation S dar. Eigene Abbildung. 73

Abbildung 11 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation DS der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung. 74

Abbildung 12 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung. 74

Abbildung 13 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation SC der superfiziellen

Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung. 75

Abbildung 14 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung. 75

Abbildung 15 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation BC der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung. 76

Abbildung 16 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung. 76

Abbildung 17 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation D der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung. 77

Abbildung 18 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung. 77

Abbildung 19: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Hier sind fast alle definierten, hier untersuchten räumlichen Organisationsformen der superfiziellen humanen CHs zu sehen (DS, SC, BC und D), wobei der fließende Übergang der Muster untereinander hier beispielhaft gezeigt werden kann. Im unteren Bildbereich rechts sind DS bis SC zu sehen, die nach links oben fortschreitend in die Organisationsform BC übergehen. Diese geht schließlich in der linken oberen Ecke in ein diffuses Stadium über (D). Eigene Abbildung. 78

Abbildung 20: Darstellung des mRNA-Gehalts und der mRNA-Reinheit aller definierten Proben nach mRNA-Extraktion, gemessen mit dem NanoDrop 1000

V. Boxplotdarstellung: Die Balken geben jeweils das 1. (unterer Balken) und 3. Quartil (oberer Balken) der Werteverteilung an. Dazwischen liegt der Median. Der Fehlerbalken gibt Minimum und Maximum exklusiv Extremwerte und Ausreißer an. Diese werden aus Gründen der Übersichtlichkeit von IBM SPSS Statistics 24 wie folgt definiert: Ausreißer = Werte, die zwischen 1,5 und 3 Interquartilweiten ausserhalb der Box liegen und Extremwerte = Werte, die mehr als 3 Interquartilweiten ausserhalb der Box liegen. Extremwerte werden als Kreise dargestellt und Ausreißer als Sterne. Eigene Abbildung..... 80

Abbildung 21: Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-3, MMP-13 und Col6A3 im Vergleich mit dem DNA-Ladder aus DNA-Bruchstücken der Länge 1000-100bp. Von links nach rechts: DNA-Ladder, MMP-3, MMP-13, Col6A3, DNA-Ladder (zeigt jeweils mit der unteren Bande 100bp an). Eigene Abbildung. 87

Abbildung 22: Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-2 und MMP-9 im Vergleich mit dem DNA-Ladder aus DNA-Bruchstücken der Länge 1000-100bp. Von Links nach rechts: Lasche 1 DNA-Ladder, Lasche 3 und 4: MMP2, Lasche 6 und 7: MMP9, Lasche 10: DNA-Ladder (zeigt jeweils mit der unteren Bande 100bp an). Andere Laschen sind mit anderen qRT-PCR Produkten beladen und hier nicht von Bedeutung. Eigene Abbildung. 88

Abbildung 23: Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-1 im Vergleich mit dem DNA-Ladder aus DNA-Bruchstücken der Länge 1000-100bp. Von links nach rechts: 1. Lasche: DNA-Ladder, 4. Lasche: MMP-1, 10. Lasche DNA-Ladder (zeigt jeweils mit der unteren Bande 100bp an). Andere Laschen sind mit anderen qRT-PCR Produkten beladen und hier nicht von Bedeutung. Eigene Abbildung. 89

Abbildung 24: Relative mRNA-Expression der gesamten superfiziellen Knorpelschicht OA Knorpels humaner Femurkondylen der Gene MMP-1, -2, -9, -13 und Col6A3. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. 92

Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20) 94

Abbildung 26: Relative mRNA-Expression von MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die

Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 96

Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 98

Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 100

Abbildung 29: Relative mRNA-Expression von MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 102

Abbildung 30: Relative mRNA-Expression von Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 104

Abbildung 31: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation S superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 107

Abbildung 32: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation DS superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). 109

Abbildung 33: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation SC superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Außreißer, die aus

Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20)..... 111

Abbildung 34: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation BC superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20)..... 113

Abbildung 35: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation D superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der Genexpression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20)..... 115

Abbildung 36: Relative mRNA-Expression superfizieller CHs humaner Femurkondylen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation der Gene MMP-1 (jeweils links; lila), MMP-2 (jeweils 2. von links; grün), MMP-3 (jeweils mittig links; oragne), MMP-9 (jeweils mittig rechts; rot), MMP-13 (jeweils 2. von rechts; gelb) und Col6A3 (jeweils rechts; blau). Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20)..... 117

Abbildung 37: Relative mRNA-Expression superfizieller CHs humaner Femurkondylen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation der Gene MMP-1 (jeweils links; lila), MMP-2 (jeweils 2. Von links; grün), MMP-9 (jeweils in der Mitte; rot), MMP-13 (jeweils 2. Von rechts; gelb) und Col6A3 (jeweils rechts; blau). Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. MMP-3 ist aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20)..... 118

Abbildung 38: Immunhistochemische Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen an Kryotomschnitten von 50µm Dicke, durch Markierung von Col6A3 mit rot fluoreszierenden Antikörperkomplexen. Eigene Abbildung. 119

Abbildung 39: Immunhistochemische Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen an Kryotomschnitten von 50µm Dicke, durch Markierung von Col6A3 mit grün fluoreszierenden Antikörperkomplexen. Linke Seite Positivkontrollen mit fluoreszierendem Antikörperkomplex – rechte Seite Negativkontrollen ohne selektiven Antikörper gegen Col6A3. Es handelt sich

jeweils um die gleiche Schnittserie, die in identischem Vorgang markiert wurde.
Eigene Abbildung. 120

Abbildung 40: Native Kryotomschnitte superfiziellen Gelenknorpels humaner Femurkondylen an Kryotomschnitten von 50µm Dicke, mit vorherigen Resten einer DAPI-Färbung der Zellkerne. Knorpelschnitte mit 4% Formaldehyd fixiert (links) und unfixiert nur in PBS gewaschen (rechts). Eigene Abbildung. 121

Abbildung 41: Mikroskopische Darstellung superfizieller humaner CHs von Femurkondylen an fixierten, nativen Kryotomschnitten von 50µm Dicke. Es ist jeweils der exakt gleiche Bildausschnitt mit Belichtung im grünen (470nm Wellenlänge) und blauen Spektralbereich (356nm Wellenlänge) zu sehen ohne Markierung einer PZM-Struktur durch fluoreszierende Antikörper. Einmal mit Aufnahme bei Belichtung mit einer Halogenlampe rechts oder einer LED Lichtquelle links, wobei die Belichtungszeit mit 2 jeweils gleich ist. Eigene Abbildung. 122

Abbildung 42: Markierung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen mittels grün fluoreszierendem Antikörperkomplex gegen Col6A3 an Kryotomschnitten von 50µm Dicke. Links: Zugabe der Antikörper gegen Col6A3 nach Blockade unspezifischer Bindungen mit 2% BSA – Rechts: ohne Blockade unspezifischer Bindungen im Prozess des Anfärbens durch Antikörperbindung. Eigene Abbildung. 123

Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Nativaufnahmen von Kryotomschnitten humanen Knorpelgewebes von 50µm Dicke der superfiziellen Zone von Femurkondylen, welche makroskopisch eine leichte Aufrauung der Oberfläche zeigen. Eine Aufnahme mit exakt gleicher Belichtung von 2s in den Lichtkanälen mit der Wellenlänge 365nm und 470nm. Links ist Gewebe mit Markierung von Kollagen Typ VI durch grün fluoreszierende Antikörperkomplexe zu sehen. Rechts zeigt natives Gewebe, an dem keine Markierung durch Antikörperkomplexe durchgeführt wurde. Beide Bilder zeigen blau fluoreszierende Zellkerne durch die Anfärbung mit DAPI zur besseren Darstellung der Lage der CHs. Eigene Abbildung. 124

Abbildung 44: Superfizielle CHs humaner Femurkondylen stellen die PZM durch Markierung mit Antikörpern gegen Col6A3 (rot) an Kryotomschnitten von 50µm Dicke dar. Rechts: Positivkontrolle mit rot fluoreszierendem Antikörperkomplex – links: Negativkontrolle ohne rot fluoreszierenden Antikörperkomplex. Eigene Abbildung. 125

Abbildung 45: Kryotomschnitte superfizieller CHs humaner Femurkondylen der Dicke 50µm in Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop. Eine Aufnahme mit exakt gleicher Belichtung von 2s in den Lichtkanälen mit der Wellenlänge

365nm, 470nm und 590nm. Rechts: PZM Markierung durch rot fluoreszierenden Antikörper gegen die Struktur Col6A3 und vorheriger Färbung der Nuclei mit DAPI. Links: native Aufnahme ohne jegliche Behandlung des Gewebsschnittes. Die Abbildungen in den unterschiedlichen Farben sind jeweils die selbe Stelle in exkt der selben Mikroskopeinstellung direkt nacheinander aufgenommen. Die Aufnahmen sind in den einzelnen Farbkanälen dargestellt ohne die Überlagerung mit anderen Spektralbereichen. Die Obere Reihe ist eine Aufnahme im Spektralbereich mit einer Exzitation von 590nm; die mittlere Reihe mit 470nm und die untere Reihe mit 365nm. Eigene Abbildung. 126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Angegeben sind jeweils Produktbezeichnung und Hersteller.	38
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien. Angegeben sind jeweils die Produktbezeichnung, Hersteller, Kompositionsdetails und die CAS- bzw. Referenznummer.....	39
Tabelle 3: Verwendete Geräte. Angegeben sind Gerätbezeichnung und Hersteller.....	42
Tabelle 4: Verwendete Software. Angegeben sind Produktbezeichnung und Hersteller.....	43
Tabelle 5: Liste der Patienten, deren Gewebe zur Generation der Proben für die quantitative realtime Polymerasekettenreaktion (= qRT-PCR) Analyse verwendet wurde.	45
Tabelle 6: Anzahl der Disks, die aus dem Gewebe des Patienten gewonnen werden konnten aufgeteilt nach ihrer räumlichen Organisation der superfiziellen Knorpelschicht.....	50
Tabelle 7: Probenanzahl, die in Abhängigkeit der räumlichen Organisation gewonnen werden konnte.	52
Tabelle 8: Reinheit und Gehalt der extrahierten mRNA aus den definierten Proben von Knorpelgewebe der superfiziellen Schicht humaner Femurkondylen	56
Tabelle 9: Primersequenzen, die zur Analyse der relativen mRNA-Expression mittels qRT-PCR verwendet wurden.	61
Tabelle 10: Primereffizienzen.....	63
Tabelle 11: Bp-Länge der amplifizierten qRT-PCR Produkte der Zielgene. Bp-Längen ermittelt mit NCBI Blast.	64

Tabelle 12: Durchschnittlicher mRNA-Gehalt mit Standardfehler und mittlere mRNA-Reinheit mit Standardfehler der auf die mRNA-Expression der bestimmten Zielgene untersuchten Proben nach mRNA-Extraktion.....	81
Tabelle 13: Auswertung von Vorhandensein einer mRNA-Expression in den definierten Proben der qRT-PCR Messung.....	82
Tabelle 14: Prozentuale Übereinstimmung einer gleichförmigen Expression von mRNA der einzelnen Proben bestimmter Gene.	83
Tabelle 15: Darstellung der statistischen Auswertung der Assoziationen zwischen den mRNA-Expressionsprofilen der untersuchten Gene.	85
Tabelle 16: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der Gene MMP1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.	91
Tabelle 17: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, -2, -3, -9, -13 und Col6A3 des gesamten Knorpelgewebes bei OA-Knorpelimplantaten nach Implantation eines künstlichen Kniegelenks.	93
Tabelle 18: Unterschiede der relativen mRNA-Expression der getesteten Zielgene im OA Knorpel der gesamten superfiziellen Zone humaner Femurkondylen.....	93
Tabelle 19: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.....	95
Tabelle 20: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	95
Tabelle 21: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.....	97
Tabelle 22: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	97

Tabelle 23: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.....	99
Tabelle 24: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	99
Tabelle 25: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.....	101
Tabelle 26: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	101
Tabelle 27: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.....	103
Tabelle 28: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	103
Tabelle 29: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.....	105
Tabelle 30: Unterschiede der mRNA-Expression von Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	105
Tabelle 31: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Strings.	107
Tabelle 32: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Strings superfizieller CHs humaner Femurkondylen.....	108
Tabelle 33: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Double Strings.	109

Tabelle 34: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Double Strings superfizieller CHs humaner Femurkondylen..... 110

Tabelle 35: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Small Clustern. 111

Tabelle 36: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Small Cluster superfizieller CHs humaner Femurkondylen..... 112

Tabelle 37: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Big Cluster. 113

Tabelle 38: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Big Cluster superfizieller CHs humaner Femurkondylen..... 114

Tabelle 39: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Diffus. 115

Tabelle 40: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Diffus superfizieller CHs humaner Femurkondylen..... 116

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Informationen zur Erkrankung der Arthrose

Arthrose (= Osteoarthritis/OA) ist eine bis heute noch nicht vollständig verstandene, degenerative Erkrankung, ausgehend vom Gelenkknorpel [3], die das gesamte Gelenk betrifft. Sie ist die häufigste Gelenkerkrankung des erwachsenen Menschen weltweit [4], die in ihrer Prävalenz zunehmend ist und damit hohe direkte, sowie indirekte Krankheitskosten verursacht [5]. In Deutschland zum Beispiel, rangiert die Gonarthrose (Arthrose des Kniegelenks) stets unter den Top 20 der häufigsten Operationen und Diagnosen für Klinik- und Rehabilitationsaufenthalte [6]. Des Weiteren geht die Erkrankung mit einer erheblichen Einschränkung im Alltag, Schmerzen und Funktionsstörungen einher, die zu einem großen Verlust an Lebensqualität führen [4]. Als wichtigster Risikofaktor gilt zunehmendes Alter. Daneben sind weitere Hauptrisikofaktoren das weibliche Geschlecht, genetische Veranlagung, Übergewicht und Über- bzw. Fehlbelastung [7]. In der Altersgruppe über 65 Jahren ist jede zweite Frau und jeder dritte Mann von Arthrose betroffen, dabei entfällt gut über die Hälfte der Fälle auf das Kniegelenk [4]. Damit ist abzusehen, dass bei einer stetig alternden Bevölkerung [8] und einem steigenden Anteil an übergewichtigen Personen unserer Gesellschaft [9], Arthrose eine immer bedeutendere Rolle spielen wird.

Zur Zeit ist Arthrose nicht heilbar und es stehen viele konservative Therapieoptionen zur Verfügung, die schlussendlich aber die Implantation eines künstlichen Gelenkersatzes als Ultimo Ratio hinauszögern sollen [7]. OA ist eine progressive Erkrankung des gesamten Gelenks, ausgehend vom Gelenkknorpel. Die Erkrankung ist charakterisiert durch einen progredienten Verlust an Knorpelgewebe, der mit der Entwicklung von weiteren periartikulären Komplikationen assoziiert ist [10]. Letztendlich resultiert alles im vollkommenen Verlust der Gelenkfunktion. Die einzige kausale Therapie besteht bisher im Gelenkersatz mittels Endoprothese [11].

Kausal-pharmakologische Therapiemöglichkeiten stehen derzeit nicht zur Verfügung. Dies ist vor allem auch auf der Tatsache begründet, dass man die Krankheit mit ihren Pathomechanismen noch nicht vollständig versteht. Man geht davon aus, dass frühe OA potentiell reversibel ist [12, 13]. Aus diesem Grund ist es essentiell die frühen Pathomechanismen besser zu verstehen, um in einem noch reversiblen Stadium der Krankheit intervenieren zu können [11]. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der pathologischen Prozesse bei OA liefern und neue Ansätze zur weiterführenden Untersuchung der Krankheit bieten. Dabei befasst sie sich speziell mit der Superfizialschicht des Knorpels distaler Femurkondylen des Kniegelenks. Diese Schicht ist im Krankheitsverlauf als erste von OA-typischen Veränderungen betroffen und stellt somit den ersten Ansatz zur Prävention der OA dar.

1.2 Physiologischer makro- und mikroskopischer Aufbau des Kniegelenks

Das Kniegelenk, eine Diarthrose, ist ein besonders beanspruchtes und komplexes Drehscharniergelenk des menschlichen Körpers, das zudem wenig muskulär gesichert und besonders anfällig für Verletzungen ist. Es besteht aus mehreren Teilgelenken, wobei man zwischen dem Femoropatellargelenk und dem Femorotibialgelenk unterscheidet, die sich eine gemeinsame Gelenkfläche und -kapsel teilen [14].

Zahlreiche Schleimbeutel ermöglichen einen reibungsfreien Bewegungsablauf der Weichteile untereinander. Die Synovialflüssigkeit, ein Gemisch aus Trans- und Exsudat der Synovialzellen, die die Gelenkkapsel innerhalb des Gelenks auskleiden, verhindert Reibung innerhalb des Gelenks, außerdem wirkt sie als Stoßdämpfer und ernährt den Knorpel [15].

Der Gelenkknorpel hat die Funktion eines Stoßdämpfers und ermöglicht ein reibungsfreies Gleiten der verschiedenen Gelenkteile untereinander. Knorpel ist ein avaskuläres, nicht innerviertes Gewebe, wobei man zwischen hyalinem, elastischen und Faserknorpel unterscheidet. Beim Gelenkknorpel handelt es

sich um ersteres. Das bedeutet, dass die Synovialflüssigkeit die einzige Möglichkeit ist, den Knorpel zu ernähren. Dies geschieht durch Diffusion und durch die zyklische Kompression und Dekompression bei Belastung, die den Knorpel wie einen Schwamm ausdrückt, sodass sich dieser daraufhin wieder voll mit neuer Synovialflüssigkeit saugen kann. Zudem besitzt der hyaline Gelenkknorpel kein Perichondrium, welches sonst eine äußere Schicht bildet, die das Gewebe vor Zugkräften schützt und eine innere Schicht, die Chondroblasten, (Vorläuferzellen) zur Erneuerung des Knorpels und Blutgefäße zur Versorgung enthält. Die Regenerationsfähigkeit ist somit limitiert [16].

Der hyaline Gelenkknorpel des Knies ist zudem der Dickste des menschlichen Körpers, mit 2-3mm Dicke im Femorotibialgelenk und stellenweisen Höchstwerten von bis zu 7mm [15]. Der Gelenkknorpel ist ein Gewebe mit einer sehr geringen Zelldichte [17].

Betrachtet man den Aufbau des Gelenkknorpels, so lässt sich eine oberflächliche Tangentialschicht erkennen, gefolgt von einer Übergangszone, die an die Radiärzone anschließt, welche durch eine Grenzlinie von der Kalzifizierten Zone getrennt ist. Die Kalzifizierte Zone geht schließlich in den subchondralen Knochen über (siehe Abbildung 1). Die Zonen oberhalb der Grenzlinie sind nach der Verlaufsrichtung der Kollagenfasern benannt: Man kann sie sich bogenförmig mit Verankerung in der Kalzifizierten Zone vorstellen. Sie verlaufen senkrecht zur Knorpeloberfläche in der Radiärzone, biegen dann um in der Übergangszone um schließlich an der Knorpeloberfläche parallel dazu zu verlaufen.

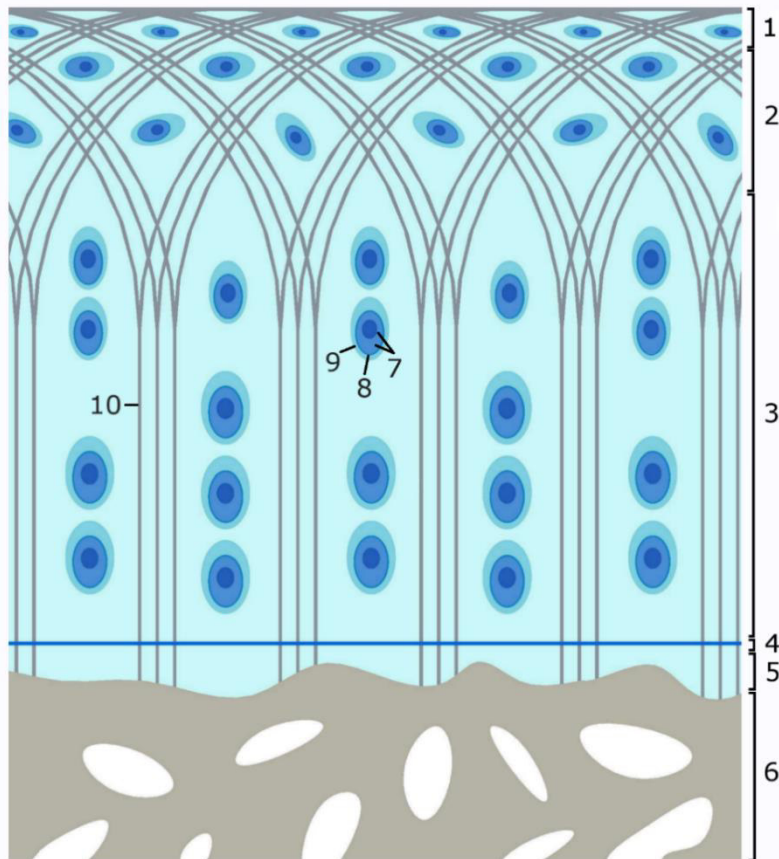


Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels wie in 1.2 beschrieben: Superfizielle Zone (1), Übergangszone (2), Radiärzone (3), Tidemark (4), kalzifizierte Zone (5) und subchondraler Knochen (6). Dazu Kollagenfaserverlauf (10), CHs mit Zellkern (7), PZM (8) und territorialer Matrix (9). Die Ansicht ist ein Schnitt senkrecht zur Oberfläche der superfiziellen Knorpelschicht (1) bis zum subchondralen Knochen (6) reichend. Eigene Abbildung

Die einzige vorkommende Zellart, der Chondrozyt (= CH) [16], ist dabei auf eine einzigartige Weise in die volumenreiche extrazelluläre Matrix (= EZM) integriert: Um jede Zelle herum, bei Zellgruppen auch miteinander verbunden, gibt es eine sogenannte perizelluläre Matrix (= PZM), die sich von der übrigen EZM unterscheidet [18]. Sie bildet eine schmale Schicht, die vor allem aus Kollagen Typ VI besteht, um die Zelle, an die sich die sogenannte territoriale Matrix, aus einem dichten Netzwerk von Kollagen Typ II, nach peripher anschließt, und bildet so das Chondron [16, 19, 20]. Die Chondrone sind dabei auf charakteristische Weise angeordnet in die EZM eingebettet [18, 21]. Die PZM bildet so eine schützende Hülle um die CHs, die die lokalisationsabhängig einwirkende Kraft des Gewebes beeinflussen und so bei der Verteilung der

mechanischen Belastung mitwirken und die Zellen vor biomechanischem Stress schützen [22]. Das Kollagen Typ VI spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz der Zellen vor mechanischem und biochemischem Stress [23, 24]: Die Interaktion von Kollagen Typ VI fördert die Zellvitalität [25], schützt vor Stress und Apoptose [26] und vermittelt mechanische Reize an die Zelle und spielt so eine maßgebliche Rolle bei der adäquaten Antwort auf osmotischem Stress [27]. Eine intakte PZM fördert die Matrixproduktion und korrekte -ansammlung [28]. Sie schützt vor osmotischem Stress und scheint ein wichtiger Modulator in der Weitergabe extrinsischer Signale an die Zellen zu sein [24, 29]. Sie dient der Signaltransduktion und -modifikation von Signalen von oder zu der Zelle [30]. Das wird vor allem deutlich, wenn man die PZM gesunden Knorpels mit dem von OA vergleicht: Die PZM verändert sich stark in ihren Eigenschaften [31] und ist so nicht mehr in der Lage, ihre ursprüngliche Funktion beizubehalten. Sie wird dünner und durchlässiger, womit die mechanische Belastung auf die CHs zunimmt, aber auch der biochemische Stoff- und Flüssigkeitstransport von und zu den Zellen verändert ist. [22, 32]. Die PZM beeinflusst somit die Mikroumgebung der Zellen maßgeblich [33] und Kollagen Typ VI als Hauptbestandteil der PZM [19], bedingt viele ihrer wesentlichen Eigenschaften.

Innerhalb der Zonen sind die CHs in ihren Chondronen angepasst an den Kollagenfaserverlauf ausgerichtet. Die Superfizielle Zone weist eine relativ hohe Zelldichte, mit parallel zur Oberfläche hin ausgerichtete und abgeplattete CHs in ihren Chondronen auf. Die Zellen der Übergangszone sind von unregelmäßiger, rundlicher Form. In der Radiärzone schließlich, sind die Zellen mit ihrem Längsdurchmesser ebenfalls entlang des Kollagenfaserverlaufs ausgerichtet und zeigen mit ihrer langen Achse senkrecht zur Oberfläche. Generell weisen die tieferen Zonen eine geringere Zelldichte, verglichen mit der superfiziellen Zone auf und zeichnen sich durch größere Chondrone aus [17, 20] .

Jede Schicht des Knorpels weist außerdem einen unterschiedlichen Aufbau der Zell- und Chondronmorphologie und der Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen (= GAGs), Kollagenen und Wasser der EZM auf [34, 35]. Auch die Genexpression variiert mit unterschiedlicher Gewebstiefe [36]. Dieser

eigene charakteristische Aufbau in der molekularen Zusammensetzung und dem räumlichen Aufbau der EZM und den Chondronen, ist für die Antwort der CHs auf Belastung maßgeblich [37]. Der zonal differenzielle Aufbau des Gewebes bedingt u. a. die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels, der sich durch Druck- und Zugfestigkeit auszeichnet und gebaut ist, um senkrechten Druck aufzunehmen und auf den gesamten Gelenkknorpel umzuverteilen [18].

Bemerkenswert an der oberflächlichen Zone ist, dass sie horizontal zur Oberfläche gelenksspezifische Muster der räumlichen CH-Organisation aufweist. In den fünf großen menschlichen Gelenken (Knie, Hüfte, Sprunggelenk, Schulter- und Ellenbogengelenk) zeigt jedes Gelenk ein solches, charakteristisches Muster. Dieses scheint in Beziehung zur Gelenksoberfläche und -funktion zu stehen, denn sie korreliert mit den unterschiedlichen Gelenkstypen. Auch wenn in jedem Gelenk prinzipiell alle Muster gefunden werden können, weist doch jedes ein charakteristisches, zahlenmäßig dominierendes Muster auf. In den gesunden humanen Gelenken dominieren dabei vier Hauptmuster: Strings, Cluster, Pair und Singles. Dabei definieren sich beispielsweise Cluster als ringförmig angeordnet und Strings bezeichnet die Organisation von CHs in einer Reihe, immer jeweils parallel zur Oberfläche des Knorpels. Das distale Femur zeichnet sich dabei durch die dominierende Organisation Strings aus [21].

1.3 Pathologische Veränderungen im Knorpel bei OA

Bei OA findet sich ein progressiver mikromechanischer Funktionsverlust der PZM [31, 32]. Dieser geht einher mit dem Verlust von Kollagen Typ VI [38, 39]. Auch zeigen Kollagen Typ VI Knockout-Mäuse zwar eine intakte Gewebs- und Chondronstruktur, aber eine weniger steife PZM und, neben Veränderungen des Bewegungsapparats, auch eine beschleunigte OA-Entwicklung [40, 41]. Diese Ergebnisse unterstreichen die funktionelle Bedeutung des Kollagen Typ VI für den Erhalt einer physiologischen Knorpel-Homöostase.

Zu Beginn der OA steht unter anderem die Schädigung der Superfizialschicht, welche einer mechanischen Belastung am stärksten ausgesetzt ist [23]. Sie ist als erstes von OA-Veränderungen betroffen [42]. Erst daraufhin erfolgt ein progressives Fortschreiten der OA in tiefere Schichten des Knorpelgewebes [42-44].

Die superfizielle Schicht weist dabei einen besonders vulnerablen Bau auf. Die CHs der Superfizialschicht haben die dünnste PZM, verglichen mit tieferen Schichten [37, 45] und auch eine geringere Kollagen Typ VI-Expression im Vergleich zu tiefergelegenen Schichten [39]. In der OA wird Kollagen Typ VI zusammen mit dem Verlust der PZM abgebaut [1, 39]. Wichtig ist hier, um eine Verwechslung mit Studien zu vermeiden, die einen Anstieg von Kollagen Typ VI bei OA verzeichnen [46], dass sich die PZM tiefer gelegener Schichten bei OA verbreitert und durch mehr, bzw. weiter verteiltes Kollagen Typ VI gekennzeichnet ist [31]. Die superfizielle Schicht weist dagegen einen Verlust an Kollagen Typ VI auf; die Bedeckung und Dicke der Kollagen Typ VI reichen PZM sinkt mit Progression der OA; siehe Abbildung 2 [1, 38, 39, 47].

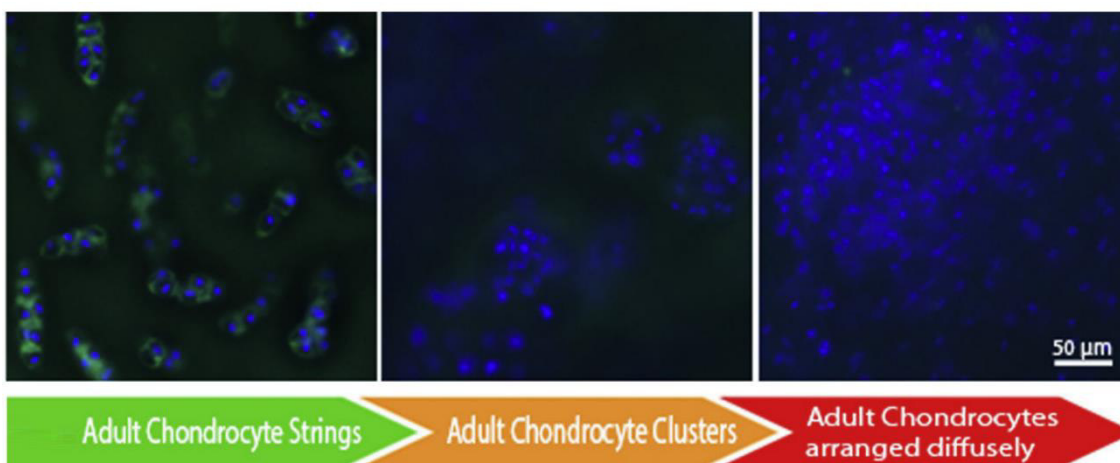


Abbildung 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Superfizialschicht humaner Femurkondylen in unterschiedlichen Stadien der OA. Die CHs sind dabei durch die Färbung der Zellkerne mit 4', 6'-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid (= DAPI) in Blau dargestellt. Das Kollagen Typ VI der PZM ist durch Markierung grün fluoreszierender Antikörperkomplexe dargestellt. Links im Bild ist intakter Knorpel mit der räumlichen Organisation Strings/Double Strings zu sehen, der eine PZM um die CHs herum aufweist. Die beiden Bilder rechts stellen eine geschädigte Knorpeloberfläche dar mit der Oberflächenorganisation Small Cluster/Big Cluster in der Mitte und Diffus rechts. Dabei ist kein Kollagen Typ VI in der PZM mehr vorhanden, welches durch die Antikörper optisch markiert werden kann. Das Bild wurde publiziert in [1]

Frühe Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der PZM. ggf. durch fehlendes Kollagen Typ VI, sind mit dem Fortschreiten der OA assoziiert [41] und beeinflussen die protektive Funktion der PZM [46, 48].

Zudem wurde gezeigt, dass die gelenksspezifischen räumlichen Zellanordnungen der CHs sich bei OA verändern und mit fortschreitender Progression andere räumliche Muster annehmen (siehe Abbildung 3) [49].

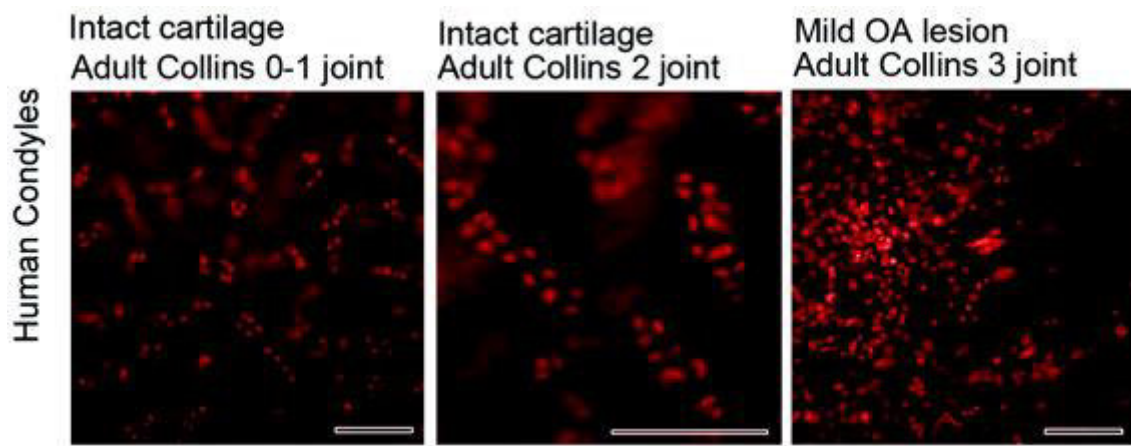


Abbildung 3: Horizontale Ansicht auf die Oberfläche humanen Gelenkknorpels. Dabei stellen die CHs in der superfizialen Schicht eine horizontale räumliche Organisation dar. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopaufnahmen zeigen, durch Anfärbung der Zellkerne mit Propidium Iodid, Femurkondylen intakten Knorpels und mit OA, der nach Grad der Schädigung klassifiziert ist. Maßstablinien 100µm; Collins 0: intakter Knorpel; Collins 1: kleine Oberflächenaufrauungen; Collins 2: Fibrillierung und Fissuren; Collins 3: komplette Defekte, die mehr als 30% der Gelenksoberfläche ausmachen. Bild wurde publiziert in [2].

Bekannt ist, dass sich CHs an Fissuren und Stellen der Verletzung des Knorpels zu großen Aggregaten zusammenlagern [45]. Im Detail sind die Veränderungen der räumlichen Organisation komplexer, dynamischer Natur: Die charakteristische Anordnung der Superfizialschicht durchläuft in der frühen OA eine Veränderung hin zu einem neuen Muster, bevor die OA-typische Clusterung auftritt und im OA-Endstadium ein völliger Verlust der CH-Organisation auftritt. Betrachtet man beispielsweise das distale Femur des Kniegelenks, ergibt sich in der Früh-OA eine neue räumliche Organisation der sogenannten „Double Strings“, welche durch zwei dicht

nebeneinanderliegenden, parallel angeordneten Strings gekennzeichnet ist und welche zunehmend das originäre Muster der Strings verdrängen. Diese Umorganisation ist charakteristisch für ein frühes Stadium der OA [49].

Untersucht man die vorherrschende Organisation unter OA-Progression, z. B. eingeteilt in Grade nach Collins [50], dominiert an der menschlichen Kondyle des Kniegelenks bei °0-1 das Muster „String“ (=S), bei °2 das Muster „Double Strings“ (=DS), bei °3 und bei °4 die Muster „Small Cluster“ (= SC) und „Big Cluster“ (= BC). Diese Muster werden im Endstadium der OA durch einen völligen Verlust jeglicher Organisation abgelöst (diffuse Verteilung = D) (siehe Abbildung 4 und Abbildung 3) [2]. In vitro Versuche zeigen, dass eine CH-Proliferation für diese Veränderung der Zellorganisation verantwortlich ist [1].

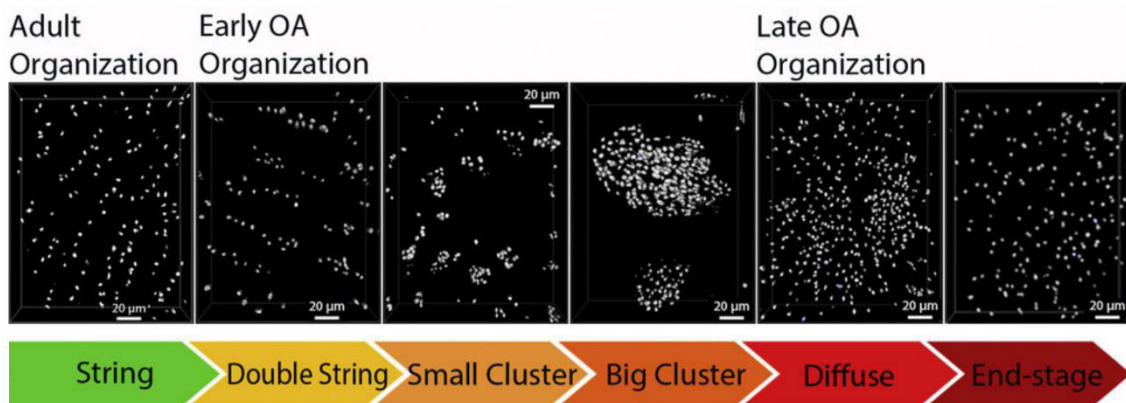


Abbildung 4: Darstellung der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen im Verlauf der Progression der OA beginnend bei gesundem Knorpel (S), fortschreitend zur kompletten Schädigung (D/End-stage). Bild entnommen aus [1].

Insgesamt ist hier relevant, dass sich Explantate des Knorpelgewebes anhand spezifischer oberflächlicher Zellorganisationen exakt in sehr fein differenzierte Stadien kategorisieren lassen. Mithilfe dieser mikroskopischen Einteilung lässt sich die Pathogenese der OA möglicherweise besser untersuchen als durch bisher übliche, makroskopische Einteilungen.

1.4 Matrixmetalloproteasen und ihre Bedeutung für den hyalinen Gelenkknorpel

Matrixmetalloproteasen (= MMPs) sind eine Familie von zinkabhängigen Proteasen, die den Großteil der Enzyme darstellen, deren Aufgabe es ist, EZM-Komponenten zu verdauen. Man unterteilt die Gruppe der MMPs weiter in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, und weitere. Diese Unterteilung richtet sich nach der Substratspezifität der Proteasen, wobei die genannten Gruppen in dieser Arbeit von Relevanz sind. MMPs werden ubiquitär im Körper exprimiert, wobei sie physiologischerweise in einem fragilen und komplexen Gleichgewicht mit ihren Inhibitoren stehen. Sie bauen EZM-Komponenten ab, inaktivieren oder aktivieren Entzündungsmediatoren und verschiedenste Enzyme und beeinflussen so das Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Zuständen [51, 52]. Bei pathologischen Zuständen kann meist eine veränderte Expression an unterschiedlichsten MMPs nachgewiesen werden. Meist zeigt sich eine vermehrte Aktivität der Enzyme [52-56], allerdings kann auch eine verminderte Aktivität pathologische Zustände hervorrufen [51].

Ebenso zeigt sich ein verändertes Expressionsmuster verschiedener MMPs im Gelenkknorpel, wenn dieser degenerativen Veränderungen unterworfen ist [57]. Betrachtet man die Relevanz der EZM und PZM für die Funktion des Gelenkknorpels, ist schnell ersichtlich, dass ein Ungleichgewicht an katabolen Enzymen wie MMPs weitreichende Folgen für deren Zusammensetzung haben kann, und somit für die Funktion des gesamten Gelenkknorpels.

Zahlreiche Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen OA und einer veränderten MMP-Expression, sowie den Verlust bestimmter Matrixkomponenten [58-62]. Bis heute sind eine Vielzahl von unterschiedlichen Substraten für jede MMP bekannt, die mit unterschiedlicher Effektivität abgebaut werden. Matrixmetalloprotease 1 (= MMP-1), auch Kollagenase 1 oder Interstitielle Kollagenase genannt, und Matrixmetalloprotease 13 (= MMP-13), auch bekannt als Kollagenase 3, gehören zur Gruppe der Kollagenasen. Ihrem Namen entsprechend, sind sie vor allem am Abbau nativer Kollagen beteiligt [52].

MMP-1 verdaut beispielsweise Kollagen Typ I, II, III und X [63], wobei besonders Kollagen Typ III bevorzugt abgebaut wird [53].

MMP-13 ist das wichtigste Enzym des Abbaus von Kollagen Typ II. Zudem baut es andere Kollagene, wie Typ I und III, und Gelatine um einiges schneller ab als MMP-1 und andere Kollagenasen. Zusätzlich baut es eine Reihe weiterer EZM-Komponenten ab, unter anderem Kollagen Typ IX und X, Aggrekan, Perlekan und weitere Matrixkomponenten, die auch im Knorpelgewebe vorkommen. Außerdem ist es an der Aktivierung von anderen MMPs beteiligt, beispielsweise Matrixmetalloprotease 2 (= MMP-2) und Matrixmetalloprotease 9 (= MMP-9) [53, 64].

Matrixmetalloprotease 3 (= MMP-3), gehört zur Familie der Stromelysine, auch genannt Stromelysin-1. Es besitzt ein relativ weites Substratspektrum und ist am Abbau von vielen Matrixkomponenten beteiligt [55]. MMP-3 ist in der Lage Aggrekan abzubauen [55] und als Hauptmediator am Abbau von Proteoglykanen (= PGs) im Knorpel beteiligt [65]. Zudem kann es andere MMPs, darunter MMP-13 [53] und MMP-9 [66] aktivieren und ist nach neueren Erkenntnissen auch zum Abbau der $\alpha 3$ -Kette des Kollagen Typ VI (= Col6A3) fähig [55].

MMP-2 und MMP-9 bilden die Gruppe der Gelatine. Gelatin ist das irreversible denaturierte Abbauprodukt von Kollagenen, das durch Gelatinasen abgebaut wird [67]. MMP-2, auch Gelatinase A genannt, baut eine Reihe von EZM-Komponenten ab. Besonders gut wird Gelatin verdaut, ebenso Kollagene [68], unter anderem auch Typ II [67] und IV [55, 69, 70]. MMP-2 ist außerdem in der Lage, Kollagen Typ VI zu verdauen, was bisher in der Leber und Kornea gezeigt wurde [69, 70].

MMP-9 besitzt ein ähnliches Spektrum an Substraten: Gelatin [67], Kollagen Typ IV [55, 71] und viele weitere. Es ist am Abbau zahlreicher Komponenten beteiligt, wie verschiedene Integrine, MMP-13, TIMPs (= Tissue-Inhibitor of Metalloproteinase) und weitere Moleküle, [71] die in der EZM allgemein und im Knorpel eine Rolle spielen.

Es ist anzunehmen, dass mehrere MMPs bei der Knorpelzerstörung der OA eine entscheidende Rolle spielen [72]. Viele Studien zeigen ein

charakteristisches Muster der MMP-Expression bei OA. Zudem wird die Expression einiger MMPs, durch Entzündungsmediatoren gesteigert, bzw. steigern MMPs deren Expression, wie beispielsweise MMP-9 [73], -13 [54] und MMP-3 [74]. Viele Untersuchungen zeigen ein unterschiedliches Bild an MMP-Expressionen, was darauf hindeutet, dass interindividuell Unterschiede zu finden sind.

Nach unserem heutigen Kenntnisstand sind folgende MMPs bei OA zu finden: MMP-1 ist generell im Knorpel zu finden, allerdings gibt es widersprüchliche Daten zur Expression. Es gibt einzelne Studien, die keine Expression des Enzyms nachweisen konnten [75], oder nur einen Anstieg im Alter bei Knorpel ohne OA [76]. Generell ist aber davon auszugehen, dass MMP-1 vermehrt bei beschädigtem Knorpel zu finden ist [77], dabei vor allem in der superfiziellen Schicht [78]. MMP-3 findet sich sowohl in gesundem Knorpel, als auch in steigender Expression vor allem in frühen Stadien der OA [59] und nimmt mit fortschreitender Krankheit wieder ab [75, 79]. Vor allem in der superfiziellen Zone ist MMP-3 bei OA zu finden [77]. MMP-13 scheint eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Progression von OA zu spielen. MMP-13-defiziente Mäuse zeigen wenig Pathologien, aber entwickeln eine OA und weisen PG-Verlust zusammen mit Kollagen Typ II Abbau auf [60]. Induziert man exogen eine OA im Tiermodell (Kaninchen), ergibt sich ebenfalls eine gesteigerte Expression von MMP-13 [44, 76]. Im humanen Knorpel verhält es sich ähnlich. In gesundem Gewebe ist wenig [80], hingegen im Kniegelenksknorpel mit zunehmendem Schädigungsgrad eine gesteigerte Expression von MMP-13 zu finden [75, 77, 81]. Die Expression von MMP-2 findet sich vor allem in späten Stadien der OA [75, 82]. Eine Expression von MMP-9 ist, auf einem niedrigen Niveau, in gesundem Knorpel der Superficialzone zu finden, jedoch steigt diese bei OA an [59, 77] und ist überall zu lokalisieren [83].

Diese Ergebnisse beruhen auf OA-Stadien nach makroskopischen Kriterien oder nach ‚früher‘ und ‚später‘ OA. Untersucht man die Superficialschicht des Knorpelgewebes nach Kriterien der räumlichen Organisationsmuster, lässt sich die MMP-Genexpression möglicherweise genauer untersuchen [84].

Der Gehalt an Kollagen Typ VI ist bei OA in der Superfizialschicht – im Gegensatz zu tiefer gelegenen Schichten – stark vermindert bis nicht existent [1, 39, 48]. Im starken Gegensatz dazu zeigen Genanalysen, dass die mRNA-Expression von Kollagen Typ VI mit dem Schweregrad der OA ansteigt [84]. Trotzdem kommt es in der Superfizialschicht zu einem Verlust der PZM, gemessen anhand von Kollagen Typ VI [1].

Da MMP-2 und -9 [55, 69] Kollagen Typ VI abbauen können ist es möglich, dass diese beim Abbau der Kollagen Typ VI-Komponente der PZM beteiligt sind und somit am beobachteten strukturellen Schaden der PZM [1] beteiligt sein könnten. Es ist auch möglich, dass MMP-3, welches Kollagen Typ VI auch prinzipiell abbauen kann [55], dabei beteiligt ist. Genauere Daten zu MMP-3 liegen aber nicht vor. Der strukturelle Schaden der PZM tritt im Rahmen der OA dann auf, wenn sich die räumliche Organisation superfizieller CHs mit OA-Progression von DS zu kleinen Clustern verändert [1]. Die erste Frage, die sich hier stellt, ist, ob MMP-2 und -9 in der Superfizialzone des humanen Knorpelgewebes im Stadium der DS und in nachfolgenden Stadien nachweisbar wäre.

1.4 Autofluoreszenz von Knorpelgewebe

Möchte man molekulare Prozesse am Knorpelgewebe untersuchen, eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie gut, um die Präsenz, Quantität und Lokalisation gewisser Moleküle nachzuweisen. Allerdings kann dies durch das Vorhandensein einer Autofluoreszenz mancher Verbindungen und Stoffe erschwert werden, die bei Exzitation eine charakteristische Frequenz emittieren. Im Unterschied zu Kollagen Typ II mit einer Emission von Licht mit ca. 400nm, zeigt stattdessen Kollagen Typ I bei 438nm einen Peak der Emission [85]. So zeigt auch der Gelenkknorpel in verschiedenen Knorpelabschnitten eine unterschiedliche Autofluoreszenz [86]. Dies ist wahrscheinlich auf lokale Unterschiede von Kollagentyp, -Verbindung und -Struktur sowie auf chemisch-physikalische Eigenschaften der EZM, Gewebsdicke und Belichtung

zurückzuführen [85, 87-89]. Das kann man sich auch zu Nutze machen, um die optischen Signale bei der Degeneration des Knorpels miteinander zu vergleichen, was vor allem durch die veränderte Zusammensetzung des Kollagen-Gehalts der EZM funktioniert. [86, 88, 90-92]. Gelenkknorpel zeigt eine Autofluoreszenz im Spektralbereich von ca. 400-430nm [85, 91]. Er enthält viele endogene Fluorophore in der EZM und der PZM: Diese stellen oft Strukturproteine, wie beispielsweise Kollagene, dar. Ebenso aromatische Aminosäuren und auch Verbindungen zwischen Aminosäuren sind Quellen einer Autofluoreszenz [89]. Auch intrazellulär finden sich Stoffe, die zur Autofluoreszenz fähig sind (Enzym Co-Faktoren wie NADPH), allerdings überwiegen die EZM-Komponenten durch ihre Menge [87]. Kollagenverbindungen lassen sich zwischen 330-370nm zur Emission von Licht der Wellenlänge 390-460nm anregen, wobei Kollagen Typ II bei einer Exzitation von 355nm eine Emission von 390-430nm aufweist. Besonders die Verbindungen zwischen den Kollagenfibrillen scheinen, mit einer Emission im Bereich von 390-460nm Quelle der endogenen Fluoreszenz zu sein [86, 90]. Kollagen Typ II zeigt also eine grüne Autofluoreszenz [93]. Als Hauptkomponente der EZM des Gelenkknorpels überschneidet sich Kollagen Typ II aber mit seiner Autofluoreszenz mit dem Spektrum von GAGs wie Chondroitinsulfat [92]. Letzteres zeigt allerdings eine deutlich schwächere Autofluoreszenz als Kollagen Typ II [92]. Aber auch Aggrekan scheint mit einer Emission von 450nm bei der Autofluoreszenz im Gelenkknorpel eine relevante Rolle zu spielen. Bei einer gesamten Autofluoreszenz des Knorpels von 430nm scheint die endogene Fluoreszenz ein Zusammenspiel der Emission von der Hauptkomponente Kollagen Typ II und GAGs mit dem Peak bei 400nm und Aggrekan mit der Peakemission bei 450nm zu sein; verschiedene weiteren, noch nicht genau in ihrer Autofluoreszenz identifizierte Substanzen könnten ebenfalls dazu beitragen. [86, 91]. Über die Autofluoreszenz der EZM und Kollagen Typ II ist schon einiges bekannt. Doch zur Fluoreszenz der PZM, die für die CHs eine so zentrale Funktion einnimmt, wurde unseres Wissens noch nicht berichtet. Doch gerade die Prozesse, die zur Zerstörung der PZM und

auch des Kollagen Typ VI beitragen, sind ein zentraler Bestandteil der OA-Forschung geworden.

Kenntnisse über die Autofluoreszenz von Knorpelgewebe, sowohl der EZM als auch der PZM sind wichtig für Versuche, die mit Immunhistologie und Fluoreszenzmikroskopie arbeiten. Will man eine bestimmte Struktur mittels fluoreszierender Antikörper markieren, sollte man beachten, dass falsch positive Ergebnisse vorliegen können, die durch eine endogene Fluoreszenz verursacht werden können. Diese Autofluoreszenz bietet aber auch völlig neue Möglichkeiten der Analyse der Gewebszusammensetzung, was wiederum detaillierte Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der OA zulassen könnte. Diese Arbeit beschäftigte sich zu einem kleinen Teil in diesem Sinne mit der Autofluoreszenz der PZM.

1.5 Ziele der Arbeit

Da MMP-2 und -9 Kollagen Typ VI prinzipiell abbauen können [55, 69], ist es möglich, dass diese durch einen Abbau der Kollagen Typ VI-Komponente der PZM beteiligt sind und somit am beobachteten strukturellen Schaden der PZM [1] beteiligt sein könnten. In diesem Kontext stellt sich als erstes die in der vorliegenden Arbeit bearbeitete Frage, ob eine MMP-2 und/oder MMP-9 mRNA-Expression im humanen hyalinen Knorpel nachzuweisen ist, und ob eine solche mRNA-Expression mit spezifischen Stadien der räumlichen Anordnung superfizieller CHs im hyalinen Gelenkknorpel assoziiert ist.

2. Material und Methoden

2.1. Materialliste

2.1.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Angegeben sind jeweils Produktbezeichnung und Hersteller.

Produktbezeichnung	Hersteller
96-Well-Platten, flach	Greiner bio-one, Deutschland
Biopsiestanze 4mm/8mm	Pfm Medical, Köln/D
Blue Caps 15 und 50ml	Greiner bio-one, Deutschland
Deckgläser 24x24mm	R. Langenbrinck, D
Eppendorf-Cups (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg/D
Light Cycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche, CH
Light Cycler® 480 Sealing foil	Roche, CH
Multi®-SafeSeal®Tubes, farblos	Carl Roth GmbH+Co. KG
Nitril-Handschuhe (Reha soft Nitrile)	Hartmann, HEidenheim, D
Objektträger 76x26mm	R. Langenbrinck, D
Petrischale 145mmx20mm	Greiner bio-one, Deutschland
Pipetten (10,100,200,1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg/D
Pipettenspitzen: Eppendorf Research plus (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg/D
Rasierklingen	Müller Drogerie, Wilkinson Sword
Rotilabo®-Magnetstäbchen, zylindrisch 1204.1	Carl Roth, D
Schraubenbecher 100ml, PP 75.562.105	Sarstedt, D
Serological Pipet (5, 10ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Skalpell	No. 21 FEATHER Safety Razor Co, Ltd/J

Spatel/Pinzetten (chirurgisch/anatomisch) | Fa. Aesculap, D

2.1.2. Verwendete Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien. Angegeben sind jeweils die Produktbezeichnung, Hersteller, Kompositionsdetails und die CAS- bzw. Referenznummer.

Produktbezeichnung	Hersteller	Kompositionsdetails	Referenznummer
4',6'-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Roche, CH		28718-90-3
6x Blue Loading Buffer	peqLab, D		98-0034
Advantage RT-PCR-Kit	Clontech, JP	Enthält: Reaction Buffer Random hexamer Primer Oligo dT Primer MMLV Reverse Transcriptase Recombinant RNase Inhibitor	639506
AnalaR NORMAPUR Ethanol absolut	VWR PROLABO CHEMICALS, IRL	Ethanol 100%	64-17-5
Anti-COL6A3 Antibody	Sigma Aldrich, D		HPA010080-100UL
Assays für MMP-1, -2, -3, -9, -13, Col6A3	Roche, CH		MMP-1: 103943 MMP-2: 103900 MMP-3: 103167 MMP-9: 139820 MMP-13: 140652 Col6A3: 103058
Bovine Serum Albumin (BSA) (Albumin Fraction V; pH7)	AppliChem GmbH, D		A1393,0050
Chloroform GR for analysis	Merck, D		1024421000

COL6A3 Antibody	Santa Cruz, US		Sc-131140
DMEM(1X) = Dulbecco's Modified Eagle Medium 500 ml	Gibco by lifetechnologies , US	Enthält: [+] 4,5 g/l D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate	41966-029
DNA Typing Grade 50x TAE Buffer	Gibco by lifetechnologies , US		24710-030
DNA-Leiter, 100 bp, peqGOLD	peqLab, D		25-2010
DNA-Stain G	SERVA Electrophoresis GmbH, D		39803.01
Donkey anti-goat IgG- FITC (mouse/human)	Santa Cruz, US		Sc2024
Doppelt destiliertes Wasser aufbereitet mit dem Milli Q System und autoklaviert	Merck Millipore, US		
Ethanol	SAV-Liquid Production, D	Ethanol 99%, vollständigvergällt	ETO-5000-99-1
Flächendesinfection Descosept AF	Dr. Schumacher, D		00-311-010
Fluorescent Mounting Medium	Dako, D		S3023
Formaldehyd-Lösung 4%	Otto Fischar GmbH & Co. KG, D		PZN 2653025
FungizoneAntimycotic	Gibco by lifetechnologies , US	Amphotericin B, 250 µg/ml	15290-026
Goat anti-rabbit IgG- PE (mouse/human)	Santa Cruz, US		Sc3739
Hyaluronidase from bovine testes, Type I- S	Sigma Aldrich, D	400-1000 units/mg	H3506-100MG
LightCycler® 480 Probes Master	Roche, CH		03315922001

PBS	Gibco by lifetechnologies , US		10010-056
PCR grade water	Roche, CH		03315932001
Penicillin-Streptomycin	Gibco by lifetechnologies , US	Enthält: [+] 10 000 U/ml [+] 10 000 µg/ml	15140-122
PeqGOLDTriFast	peqLab, D		30-2020
Primer für die qRT-PCR der Gene MMP-1, -2, -3, -9, -13, Col6A3, RPL13A und GAPDH	Eurofins Genomics, F		Primersequenzen siehe Tabelle 9
QiagenRNeasy Mini Kit (250)	QIAGEN, NL	Enthält: RPE-Puffer RW1- Puffer RLT-Puffer RDD-Puffer	74106
Rnase AWAY	Molecular Bio Products, Thermo Fisher Scientific, US		#7002
RNase-free DNase Set	QIAGEN, NL	Enthält: DNase RDD-Puffer RNase freies Wasser	79254
Salzsäure TitriPUR	Merck Millipore, US	c(HCl) = 1 mol/l (1N)	MC1090572500
SeaKem® LE Agarose	Lonza, US		0000378655
Stickstoff, flüssig	Westfalen, D		
Tissue-Tek® OCT Compound	Sakura, US		4583
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, D		A1086

Universal
ProbeLibrary, Probes

Roche, CH

Sonden für

MMP-1 (#26)
MMP-13 (#148)
Col6A3 (#3)
GAPDH (#60)
RPL13A (#157)

#60:
04688589001
#157:
04694449001
#3:
04685008001
#148:
04694341001
#26:
04687574001

2.1.3 Verwendete Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte. Angegeben sind Gerätbezeichnung und Hersteller.

Produktbezeichnung	Hersteller
Abzug	Prutscher, A
Analysewaage „handy“	Sartorius, GB
Autoklav HIKLAVEC HV-50	HMC, D
Biometra® standart power pack P25 (Netzgerät für Elektrophorese)	Biometra, D
ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (1708370)	Bio-Rad, US
Gefrierschrank - 24°C	Liebherr Premium, D
Gefrierschrank -72°C°	GFL, D
Gelelektrophoresekammer (Agarose-Gel)	Biometra, D
HomogenisatorMicra D8	Falc Instruments, I
Horizontalschüttler MTS 4	IKA®, D
Kryotom Leica Biosystems CM3050 S Research Cryostat	Leica Biosystems, D
Kühlschrank 4 C°	Liebherr, D
Kühlschrank 4 C°	Severin, D
Light Cycler® 480 II	Roche, CH
LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop mit ApoTome	Carl Zeiss GmbH, D

NanoDrop 1000 V	peqLab, Erlangen/D
pH-Meter (Five easy FE 20)	Mettler-Toledo, CH
Pipettierhilfepipetus®-Akku	HirschmannLaborgeräte, D
Schneideblock	Privatanfertigung
Sterilbank	BDK; Luft- und Raumtechnik GmbH, D
Thermocycler UNO II	Biometra, D
Thermomixer (Thermomixer Comfort 5355)	Eppendorf, D
UV-Geldokumentationssystem Diana (10000764)	Raytest, D
Vortexmischer (REAXtop)	Heidolph Instruments GmbH, D
Waage (0,05-4100g) 6J4 100-2M	Kern, D
Zentrifuge 5242 R	Eppendorf, D
Zentrifuge 5424	Eppendorf, D
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, D

2.1.4 Verwendete Software

Tabelle 4: Verwendete Software. Angegeben sind Produktbezeichnung und Hersteller.

Produktbezeichnung	Hersteller
Axio Vision 4.8.	Carl Zeiss GmbH, D
IBM SPSS Statistics 24	IBM Corporation, US
Light Cycler® 480 SW 1.5.1	Roche, CH
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, US
NanoDrop 1000 V 3.8.1	Thermo Fisher Scientific, US
PTC Creo Parametric Version 3.0 M070	PTC, US
SigmaStat 3.0	Systat Software Inc, US

2.2 Herstellung, Färbung und fluoreszenzmikroskopische Sortierung von Disks anhand ihrer räumlichen Organisation

2.2.1 Gewinnung von genormten Knorpelgewebssproben aus Knorpel-Knochenfragmenten, die bei der Implantation einer Knieendoprothese gewonnen wurden

Das Gewebe zur Gewinnung des untersuchten Oberflächenknorpels stammte aus Gewebsspenden von Arthrosepatienten, die eine Semi- oder Totalendoprothese des Kniegelenks erhielten. Diese Knorpel-Knochenproben wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethikkommission (713/2012BO2) und Einwilligung zur Gewebespende von Arthrosepatienten gewonnen, welche eine Endoprothese ihres Kniegelenks erhalten haben. Bei den Proben handelte es sich um mediale und laterale Femurkondylen und der zwischenliegenden Fossa intercondylaris. Ein Patientenkollektiv von 44 Patienten (davon 19 Männer und 25 Frauen; siehe Tabelle 5), wurde zur Gewinnung der (n = 109) Knorpelproben verwendet, die zur Probenherstellung und –Verarbeitung für eine anschließende mRNA-Expressionsanalyse der räumlichen Organisationsformen verwendet wurden.

In Kooperation der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen und der chirurgischen Fachklinik Winghofer Medicum aus Rottenburg, wurden operativ resezierte Femurkondylen steril entnommen und in 100ml Probenbechern in Dulbecos's modified Eagle Medium (= DMEM Medium), versetzt mit 6ml Fungizone Antimycotic und 10ml Penicillin-Streptomycin, abholbereit bei 4°C gelagert.

Tabelle 5: Liste der Patienten, deren Gewebe zur Generation der Proben für die quantitative realtime Polymerasekettenreaktion (= qRT-PCR) Analyse verwendet wurde.

Patient	Alter	Ge- schlecht	Seite	Patient	Alter	Ge- schlecht	Seite
Patient #1	58	w	r	Patient #23	71	w	x
Patient #2	64	w	r	Patient #24	74	w	x
Patient #3	69	w	r	Patient #25	75	w	x
Patient #4	74	w	r	Patient #26	65	m	r
Patient #5	74	w	r	Patient #27	67	m	r
Patient #6	77	w	r	Patient #28	71	m	r
Patient #7	79	w	r	Patient #29	73	m	r
Patient #8	83	w	r	Patient #30	79	m	r
Patient #9	87	w	r	Patient #31	52	m	l
Patient #10	58	w	l	Patient #32	58	m	l
Patient #11	62	w	l	Patient #33	58	m	l
Patient #12	67	w	l	Patient #34	62	m	l
Patient #13	68	w	l	Patient #35	65	m	l
Patient #14	72	w	l	Patient #36	66	m	l
Patient #15	73	w	l	Patient #37	70	m	l
Patient #16	74	w	l	Patient #38	72	m	l
Patient #17	77	w	l	Patient #39	76	m	l
Patient #18	57	w	x	Patient #40	79	m	l
Patient #19	66	w	x	Patient #41	53	m	x
Patient #20	68	w	x	Patient #42	68	m	x
Patient #21	69	w	x	Patient #43	74	m	x
Patient #22	70	w	x	Patient #44	77	m	x

Legende 1: Die Patienten sind anonymisiert durchnummeriert mit Angabe des Alters zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme, des Geschlechts (w = weiblich und m = männlich) und der Seite, der das Gewebe entnommen wurde (r = rechts, l = links und x = unbekannt).

2.2.2 Herstellung normierter Knorpelgewebstücke der superfiziellen Knorpelzone aus Gewebeproben von Knorpel-Knochenfragmenten

In jedem Schritt wurden Instrumente verwendet, die bei 120°C autoklaviert wurden. Alle Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, bis zur Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und Platzierung in einer Well-Platte. Zu jeder Zeit wurde darauf geachtet, das Knorpelgewebe immer mit DMEM Medium bedeckt zu halten.

In einer Petrischale mit DMEM Medium wurden die Knochen-Knorpel-Fragmente der Kondylen mit einem Skalpell bearbeitet und so die Knorpeloberfläche in Stücken abgetragen. Mittels einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von 4mm, wurden aus den Knorpelstücken runde „Stanzen“ gewonnen und in 2ml Eppendorfcups mit 1ml DMEM-Medium mindestens zehn Minuten gewaschen. Abbildung 5 stellt beispielhaft Knorpel-Knochenfragmente mit zum Teil abgetragener Knorpeloberfläche und daraus, mithilfe einer Biopsiestanze gefertigte Stanzen dar.

Die Stanzen wurden einzeln mit einem Spatel begutachtet, um die Superfizielle Zone zu identifizieren. Die Unterscheidung zwischen superfizieller und tieferen Zonen ist aufgrund der leichten Rosafärbung der oberen Schicht durch die Farbe des Mediums und die etwas rauere Oberfläche verglichen mit der, durch das Skalpell glatt abgetrennten Unterfläche, möglich.

Die Stanzen wurden mit der nach unten gerichteten Oberfläche auf den Schneideblock aus Edelstahl, mit einer 300µm tiefen und 4mm im Durchmesser messenden Vertiefung gelegt. Dann wurden sie mit einem Spatel unter leichtem Druck fixiert und mit einer Rasierklinge parallel zur superfiziellen Zone durchtrennt. Es ergaben sich so 300µm dicke Scheibne der Knorpeloberfläche, sogenannte „Disks“. Diese Disks stellen die Superfizialschicht des Knorpels dar. Das restliche Gewebe wurde nicht verwendet und fachgerecht entsorgt. Die Disks wurden erneut in 2ml Eppendorfcups mit 1ml DMEM Medium für mindestens zehn Minuten gewaschen.

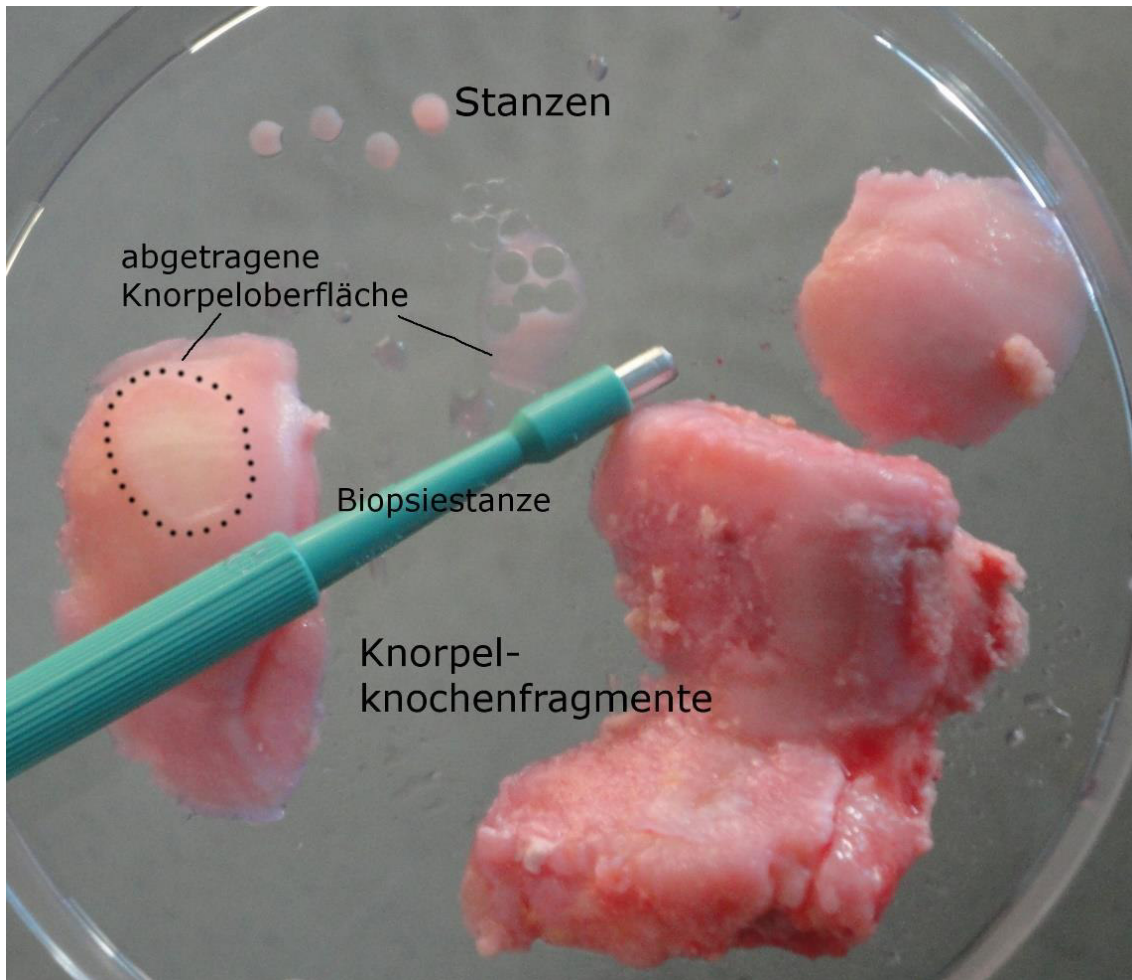


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der Herstellung normierter Knorpelstanzen (zur Übersicht ohne Bedeckung mit Medium). Man sieht ein Knorpel-Knochen-Fragment einer humanen Femurkondyle mit makroskopisch sichtbaren OA-Erosionen der Knorpeloberfläche, sowie einzelne makroskopisch defektfreie Bereiche. An einer markierten Stelle wurde mithilfe eines Skalpells die Knorpeloberfläche abgetragen um daraus mit einer Biopsiestanze Gewebeproben genormter Größe zu erhalten. Eigene Aufnahme.

2.2.3 Färbung der Zellkerne der in den Knorpel „Disks“ enthaltenen CHs mit 4', 6'-Diamidin-2'-Phenylindoldihydrochlorid (= DAPI)

Das Arbeiten mit DAPI oder DAPI-enthaltende Medien erfolgte grundsätzlich mit ausgeschalteter Beleuchtung und fand immer unter der Sterilbank statt.

Die Lösung zur DAPI-Färbung setzte sich zusammen aus DMEM Medium und DAPI im Verhältnis 1000:1. Zur Färbung und Mikroskopie wurde eine 96er Wellplatte mit flachem Boden verwendet. Dabei wurde jedes Well zuerst mit

150µl Färbelösung und anschließend einer Disk befüllt. Die Disks waren dabei zu jedem Zeitpunkt von Färbemedium bedeckt. Anschließend wurde die befüllte Wellplatte 10min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der, mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbten Disks

Mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Wellplatten, mit den DAPI-gefärbten Disks, im Lichtkanal DAPI in 10-fach Vergrößerung betrachtet. Dabei blickte man senkrecht auf die ursprüngliche Gelenkfläche, die einen genormten Ausschnitt („Disk“) der Superfizialschicht darstellte, welche parallel zur Gelenksoberfläche verläuft (siehe Abbildung 1).

Über das Eyepiece des Mikroskops wurde jede Disk hinsichtlich ihrer Musteranordnung der Zellen sortiert. Diese Muster sind wie folgt definiert: Strings (S) als drei bis mehrere Zellen in einer Reihe. Double Strings (DS) als zwei parallel, direkt nebeneinanderliegende Reihen von drei oder mehreren Zellen. Small Cluster (SC) als drei oder mehr Zellen, die eine Ellipse oder einen Kreis bilden. Big Cluster (BC) sind mehr als zwanzig Zellen, die kreisähnlich oder haufenförmig angeordnet sind und Diffus (D) bezeichnet den völligen Verlust jeglicher räumlichen Organisation, wobei die Chondrozyten in der senkrechten Aufsicht zur Knorpeloberfläche wie zufällig verteilt sind [1]. Diese Einteilung erfolgte dabei nach visuellen Kriterien.

Es war dabei zu beachten, dass mindestens 90% der CHs einer genormten Disk eine gleiche, definierte räumliche Organisation aufzuweisen haben, damit sie eindeutig als S, DS, SC, BC oder D kategorisiert werden konnten. Nicht eindeutig einem Muster zugeordnete Disks wurden nicht verwendet. Zusätzlich wurden beispielhafte Mosaikaufnahmen und Schnappschüsse einzelner Disks angefertigt (siehe Abbildung 9 bis Abbildung 18). Schnappschüsse sind Abbildungen des aktuell eingestellten Bildausschnitts. Mosaikaufnahmen dagegen bilden eine komplette Disk ab. Sie bestehen aus unterschiedlich vielen einzelnen, aneinandergrenzenden Rechtecken, die sich zu einem Bild zusammensetzen. Jedes dieser Rechtecke wurde einzeln aufgenommen, mit

einer individuell für jeden Ausschnitt eingestellten Tiefenschärfe. Die Belichtungszeit und -intensität war bei allen Bildern gleich und betrug 2,0s. Das war nötig, um eine komplette Disk scharf abzubilden, da diese nicht in allen Ebenen exakt gleich dick war, bzw. im Färbemedium nicht im gleichen Abstand zum Objektiv lag.

2.2.5 Probengeneration definierter Knorpelproben zur Analyse der relativen mRNA-Expression von bestimmten Zielgenen im Knorpelgewebe definierter OA Stadien

Nach dem im Labor etablierten Protokoll ergeben jeweils 15 +/- 3 gepoolte Disks des gleichen Musters eine sogenannte „Probe“. Die Disks einer Probe wurden zusammen weiterverarbeitet, um ihre mRNA zu extrahieren und zu analysieren. Eine Probe ergab dabei für jedes untersuchte Gen jeweils einen gewerteten Messwert bei der mRNA-Analyse mittels quantitativer Realtime Polymerasekettenreaktion (= qRT-PCR). Dabei wurde darauf geachtet, möglichst homogene, das heißt, aus dem Gewebe eines Patienten bestehende, Proben zu generieren. Wenn dies nicht möglich war, weil nicht genügend Disks eines Musters desselben Patienten vorhanden sind, wurden Disk mehrerer Patienten zusammengenommen als eine Probe definiert. Nicht eindeutig einem der 5 Muster zuordenbare Disks wurden nicht zur Probengeneration verwendet. Tabelle 6 zeigt die genaue Anzahl der Disks, die von den Patienten jeweils pro Muster gewonnen werden konnte. Dabei ist dies anhand der ersten 27 untersuchten Patienten aufgeführt, da ab Patient 28 Disks selektiv nach fehlendem Gewebe mit bestimmten räumlichen Organisationsformen gesucht wurden.

Tabelle 6: Anzahl der Disks, die aus dem Gewebe des Patienten gewonnen werden konnten aufgeteilt nach ihrer räumlichen Organisation der superfiziellen Knorpelschicht.

Patient	S	DS	SC	BC	D	Gesamt
OA1	6 (6%)	2 (2%)	8 (9%)	48 (52%)	29 (31%)	93
RW1	5 (23%)	2 (9%)	0 (0%)	15 (68%)	0 (0%)	22
SR1	1 (6%)	1 (6%)	4 (22%)	2 (11%)	10 (56%)	18
HA1	1 (6%)	1 (6%)	5 (28%)	7 (39%)	4 (22%)	18
KN1	1 (3%)	0 (0%)	13 (37%)	13 (37%)	8 (23%)	35
RJ1	1 (3%)	1 (3%)	18 (53%)	7 (21%)	7 (21%)	34
GR1	2 (7%)	11 (38%)	7 (24%)	4 (14%)	5 (17%)	29
WM1	13 (24%)	14 (25%)	13 (24%)	0 (0%)	15 (27%)	55
WP1	0 (0%)	26 (46%)	8 (14%)	15 (26%)	8 (14%)	57
FD1	8 (22%)	20 (54%)	6 (16%)	3 (8%)	0 (0%)	37
LH1	1 (1%)	19 (25%)	17 (23%)	19 (25%)	19 (25%)	75
KC1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	12
ME1	0 (0%)	47 (32%)	39 (27%)	48 (33%)	12 (8%)	146
RG1	0 (0%)	2 (4%)	8 (16%)	26 (51%)	15 (29%)	51
SJ1	4 (6%)	6 (9%)	8 (12%)	12 (18%)	36 (55%)	66
NC1	9 (14%)	17 (26%)	15 (23%)	12 (18%)	12 (18%)	65
HM1	20 (24%)	12 (15%)	2 (2%)	9 (11%)	39 (48%)	82
MK1	5 (6%)	18 (21%)	26 (31%)	22 (26%)	13 (15%)	84
HA2	12 (16%)	7 (9%)	8 (10%)	33 (43%)	17 (22%)	77
MH1	11 (22%)	11 (22%)	17 (34%)	7 (14%)	4 (8%)	50
SH1	4 (36%)	0 (0%)	6 (55%)	1 (9%)	0 (0%)	11
NK1	3 (23%)	2 (15%)	2 (15%)	4 (31%)	2 (15%)	13
KC2	24 (45%)	15 (28%)	1 (2%)	4 (8%)	9 (17%)	53
HI1	32 (48%)	14 (21%)	17 (26%)	1 (2%)	2 (3%)	66

VM1	14 (30%)	5 (11%)	12 (26%)	7 (15%)	8 (17%)	46
KG1	3 (13%)	5 (21%)	11 (46%)	3 (13%)	2 (8%)	24
BV1	31 (24%)	21 (16%)	42 (32%)	26 (20%)	10 (8%)	130

Legende 2: Anzahl der gewonnenen Disks pro Patient, die eindeutig einer Oberflächenorganisation (S, DS, SC, BC, D) zuzuordnen waren mit prozentualem Anteil dieser Disks an der Gesamtzahl der, zur Probengeneration verwendeten Disks. Beispielhafte Darstellung der ersten 27 untersuchten Patienten. Die Patienten sind als anonymisiertes Buchstaben-Zahlen-Kürzel dargestellt.

Insgesamt ergaben sich so aus den einzelnen Disks sogenannte Proben, die entweder aus dem Gewebe eines Patienten bestanden, oder aus dem Mehrerer zusammensetzt wurden. Tabelle 7 zeigt die gesamte Probenanzahl in Abhängigkeit der räumlichen Organisation und ihrer Zusammensetzung. Dabei wird zusätzlich die Anzahl der Proben, die gepoolt wurden oder aus einem einzelnen Patienten zusammengesetzt sind, aufgeführt.

Es ergab sich eine gesamte Probenanzahl von n=109. Davon ergaben sich 18 Proben der räumlichen Organisation S; 24 DS-Proben, 22 SC Proben, 25 BC Proben und 20 D Proben. 50% oder mehr der Proben wurden aus Gewebe eines Patienten zusammengesetzt; die restlichen 50% oder weniger bestanden aus Knorpel mehrerer Patienten.

Tabelle 7: Probenanzahl, die in Abhängigkeit der räumlichen Organisation gewonnen werden konnte.

Räumliche Organisation	S	DS	SC	BC	D	Gesamt
Probenanzahl gesamt	18	24	22	25	20	109
Probenanzahl mit Zusammensetzung aus einem Patienten	9	12	13	17	11	62
Probenanzahl mit gepoolter Zusammensetzung aus mehreren Patienten	9	12	9	8	9	47

Legende 3: Diese Proben setzen sich, wie in 2.1.5 beschrieben entweder aus Gewebe eines Patienten, oder gepoolt aus dem mehrerer Patienten zusammen. Dabei ist die Gesamtzahl aller Proben, unabhängig von ihrer Zusammensetzung angegeben, die zur Messung der mRNA-Expression definierter Gene verwendet wurde. Ebenso ist davon die Anzahl derjenigen Proben angegeben, die sich entweder aus einem oder mehreren Patienten zusammensetzen. Diese beiden Gruppen bilden das Gesamtkollektiv an Proben und sind alle in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller GHs zusammengestellt worden.

2.3. Gewinnung von komplementärer Desoxyribonukleinsäure (= cDNA) aus Knorpelgewebe zur Analyse der relative mRNA-Expression von definierten Zielgenen

2.3.1 Schockgefrierung definierter Knorpelgewebeproben mit flüssigem Stickstoff

Die Disks wurden jeweils in ca 250µl TriFast™ in einem 2ml Eppendorfcup mit flachem Boden in handabgefülltem, flüssigen Stickstoff schockgefroren. Dies wurde direkt nach dem Mikroskopieren, innerhalb von 48 Stunden nach der Gewebentnahme beim Patienten durchgeführt. Alle Disks wurden bei -70°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

2.3.2 Homogenisieren von schockgefrorenen definierten Knorpelgewebstücken zur Vorbereitung der mRNA-Extraktion

Der komplette Homogenisationsprozess fand unter dem Abzug statt. Der Homogenisatoraufsatz, der das Probenmaterial zerkleinerte, wurde, wenn nicht im Betrieb, in 99% Ethanol gelagert. Zur Gewebehomogenisation wurden Disks verwendet, die zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen und bei -70 gelagert wurden. Nach dem Auftauen und während der gesamten Prozedur des Homogenisierens, soweit möglich, wurden alle Disks auf Eis gelagert. Die Proben wurden für ca. 40s durch die Rotation eines Messers aus Edelstahl in einem Rotationskopf homogenisiert. Direkt im Anschluss der Homogenisation wurde der Homogenisatorkopf mit ca. 300µl TriFast™ einige Sekunden nachgewaschen, um Gewebsreste vom Rotationskopf zu entfernen. Diese Waschlösung wurde zur Probe hinzugegeben, um eventuell verbliebene Reste wieder zurückzuführen. Zwischen der Homogenisation unterschiedlicher Proben, sowie zu Beginn und am Ende, wurde der Homogenisatorkopf immer mit einem standardisierten Spülvorgang gereinigt. Der Spülvorgang lief wie folgt ab: Der Homogenisatorkopf wurde jeweils für 2-5s viermal gespült. Als Spüllösungen standen in je 50ml Bluecaps zweimal doppelt destilliertes Wasser und einmal 99% Ethanol, sowie einmal RNasefreies Wasser in einem 2ml Eppendorfcup bereit. Zuerst wurde in destilliertem Wasser, dann in 99% Ethanol, darauf in RNasefreiem Wasser und zum Schluss wieder in doppelt destilliertem Wasser gereinigt (siehe Abbildung 6).

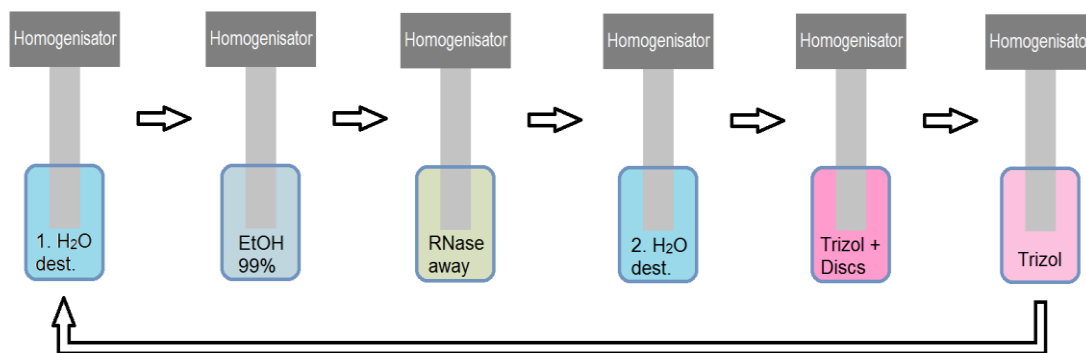


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Procedere des Homogenisationsprozess von Knorpelgewebe zur mRNA Isolierung. Wie in 2.2.2 beschrieben, wird vor und nach der Homogenisation jeder Probe der Homogenisatorkopf in der, hier dargestellten Reihenfolge, beginnend bei 1. H₂O dest., durchlaufen. Eigene Darstellung

Wenn eine Probe, wie oben beschrieben gepoolt werden musste und aus separat in Eppendorfcups eingefrorenen Disks zusammengesetzt wurde, wurden die Disks alle nach dem Auftauen in eines der Eppendorfcups gegeben. Das restliche verbleibende TriFast™ wurde als Waschlösung verwendet, und dann auch zur homogenisierten Probe gegeben. Setzten sich die Proben aus mehr als zwei eingefrorenen Eppendorfcups mit Disks zusammen, wurde das verbleibende TriFast™ der übrigen Proben auch zur homogenisierten Probe dazugegeben, um eventuell darin verbliebene mRNA-Reste nicht zu verlieren und den mRNA-Verlust zu minimieren. Anschließend wurden die Proben direkt zur mRNA-Extraktion verwendet, oder bei -70°C gelagert.

2.3.3 mRNA-Extraktion aus den generierten definierten Knorpelgewebeproben

Die homogenisierten Proben wurden auf 1ml Volumen mit TriFast™ aufgefüllt und 1-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10min bei 4°C mit 12 000 rcf (= relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5ml Eppendorfcup überführt. Dazu wurde 200µl Chloroform gegeben, gevortext und 10min bei 4°C inkubiert. Nun wurde alles mit bei 4°C mit 12 000 rcf für 15min zentrifugiert. Durch das Chloroform entstand so eine Phasentrennung, die die Proteine als leicht

gelblich-rosa, durchsichtige Schicht am Boden zeigt, eine rosafarbene Schicht DNA in der Mitte und als Überstand eine durchsichtige Schicht, die die mRNA enthält. Diese wurde vorsichtig durch Abpipettieren abgenommen und in ein frisches 1,5ml Eppendorfcup überführt. Schließlich wurden 300µl 100% Ethanol dazugegeben und für ca. 1s gevortext, um nun zur Säulchenextraktion mit dem QiagenRNeasy Mini Kit 250 überzugehen.

Die Hälfte des Inhalts, der mit 100% Ethanol vermischten Probe, wurde auf die Säulchen des RNeasy Mini Kits gegeben, für 30s bei 4°C mit 10 000 Umdrehungen pro Minute (= rpm) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Mit dem restlichen Proben-Ethanolgemisch wurde dieser Schritt wiederholt, bis die gesamte Probe in der Säule war. Nun wurden 350µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und 30s bei 4°C mit 10 000 rpm zentrifugiert. Jetzt wurde die Säule mit 80µl DNase-Lösung (= DNase 1:7 im Verhältnis mit RDD Puffer) 15-20min inkubiert. Erneut wurden 350µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, 30s bei 4°C mit 10 000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten weitere Waschschrirte, bei denen 500µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben wurde, 30s bei 4°C mit 10 000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen wurde. Erneut wurden jetzt 500µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, 2min bei 4°C mit 15 000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Noch einmal wurde 30s bei 4°C mit 15 000 rpm zentrifugiert und die Säule auf ein frisches Eppendorfcup umgesetzt. Zum Schluss wurde 30µl RNasefreies Wasser auf die Säule gegeben und 1min inkubiert. Nach 1min Zentrifugieren bei 4°C mit 10 000rpm wurde die Säule verworfen und die gelöste mRNA verbleibt im Eppendorfcup. Die Proben wurden zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert oder direkt auf Eis zur Messung des mRNA-Gehalts gebracht.

Die Messung des mRNA-Gehalts wurde mit dem Gerät und Programm NanoDrop 1000 V durchgeführt. Nach Kalibrierung mit 1µl RNasefreiem Wasser wurde immer in Doppelbestimmung der mRNA-Gehalt und die Reinheit von je 1µl der isolierten mRNA Lösung bestimmt. Dies wurde durchgeführt, um den Erfolg der mRNA Isolierung nachzuweisen und einen Mindestgehalt an mRNA ($\geq 1,5\text{ng}/\mu\text{l}$) und eine genügend hohe Reinheit ($>>1$, mit Optimum von 2 im Verhältnis der Emissionspeaks 260/280nm) der Proben zu gewährleisten, um

nachfolgende Prozeduren, wie das Umschreiben in cDNA und die qRT-PCR nicht störend zu beeinflussen.

Tabelle 8: Reinheit und Gehalt der extrahierten mRNA aus den definierten Proben von Knorpelgewebe der superfiziellen Schicht humaner Femurkondylen

Probe	mRNA Gehalt in ng/µl	mRNA Reinheit in 260/280nm	Probe	mRNA Gehalt in ng/µl	mRNA Reinheit in 260/280nm
S2	7,92	1,82	SC15	6,70	1,78
S3	25,0	1,45	SC16	4,38	1,45
S4	4,19	1,74	SC17	5,57	1,42
S5	2,44	1,34	SC18	5,42	1,54
S6	3,13	1,13	SC19	20,3	1,65
S7	9,95	1,57	SC20	5,06	1,47
S8	3,44	1,36	SC21	5,88	1,43
S9	4,38	1,37	SC22	5,40	1,59
S10	29,0	1,67	SC23	22,5	1,52
S11	3,91	1,50	BC1	14,5	1,42
S12	5,89	1,94	BC2	15,4	1,16
S13	7,28	1,83	BC3	10,8	1,37
S14	4,59	1,38	BC4	10,1	1,41
S15	4,65	1,28	BC5	15,4	1,37
S16	7,67	2,00	BC6	9,44	1,78
S17	4,59	2,07	BC8	12,3	1,68
S18	5,05	2,14	BC9	14,5	1,50
S19	36,8	1,62	BC10	2,26	2,47
DS2	3,67	1,93	BC11	5,37	1,91
DS3	3,92	2,34	BC12	2,05	2,43

DS4	3,65	3,58	BC13	10,9	1,74
DS5	6,76	1,59	BC14	25,2	1,43
DS6	10,8	1,72	BC15	10,7	1,48
DS7	3,15	3,53	BC16	3,37	1,49
DS8	3,79	1,95	BC17	4,50	1,69
DS9	36,2	1,57	BC18	6,13	1,33
DS10	3,49	1,87	BC19	4,94	1,56
DS11	2,32	1,16	BC20	1,79	1,28
DS12	6,26	1,51	BC21	6,49	1,92
DS13	3,56	1,14	BC22	9,93	1,68
DS14	2,44	1,64	BC23	5,01	1,34
DS15	8,23	1,59	BC24	4,94	1,40
DS16	5,90	1,33	BC25	4,95	1,40
DS17	12,21	1,71	BC26	10,75	1,61
DS18	5,91	1,58	D1	10,6	1,40
DS19	5,30	1,57	D2	3,76	2,27
DS20	5,37	2,07	D3	14,5	1,47
DS21	6,63	1,98	D4	9,92	1,32
DS22	12,7	1,72	D5	6,91	1,43
DS23	7,54	1,99	D6	6,73	2,43
DS24	8,82	2,06	D7	4,76	2,37
DS25	7,45	1,20	D8	26,7	1,62
SC1	12,1	1,57	D9	8,87	1,57
SC3	5,02	2,47	D10	14,5	1,41
SC4	6,97	1,71	D11	15,0	1,44
SC5	2,89	1,53	D12	7,23	1,69
SC6	4,67	2,55	D13	5,86	1,58

SC7	6,00	2,67	D14	6,96	1,79
SC8	3,38	2,18	D16	5,34	1,70
SC9	2,90	2,93	D17	11,5	1,68
SC10	10,8	1,60	D18	6,72	1,63
SC11	7,66	2,00	D19	5,07	1,69
SC12	26,3	1,70	D20	9,62	1,33
SC13	5,03	1,50	D21	6,75	1,81
SC14	4,39	1,45			

Legende 4: Die Proben sind je nach räumlicher Organisation S, DS, SC; BC oder D bezeichnet und innerhalb dieser Untergruppen durchnummeriert.

2.3.4 Umschreiben der isolierten mRNA in cDNA zur Analyse mittels qRT-PCR

Zum Umschreiben von mRNA in cDNA mittels reverser Transkriptase wurde das Advantage RT-for-PCR Kit der Firma Clontech verwendet. Während der Vorbereitung wurden stets alle Reagenzien und Proben auf Eis gelagert. Nach dem Protokoll des Umschreibekits der Firma, wurde in ein 0,5µl Eppendorfcup jeweils 11,5µl einer mRNA-Probe, 1µl Oligo d(T)-Primer und 1 µl Random Hexamer Primer gegeben. Dieses Gemisch mit einer µl-Pipette gut durchmischt und anschließend in den Thermocycler gestellt. Dieser verfügt über verschiedene Programme, welche für eine bestimmte Zeitdauer auf eine einprogrammierte Temperatur erhitzen bzw. abkühlen. Für das Annealing der Primer wurde das Programm 22 abgespielt. Dieses Programm heizt für 2 Minuten auf 70°C auf, damit die optimalen Bedingungen zum Annealing der Primer gegeben sind. Nach Ende von Programm 22 wurden die Proben sofort auf Eis gelagert. Nun wurde pro Probe 6,5µl des Mastermix je Eppendorfcup hinzugegeben. Dieser Mastermix setzte sich zusammen aus je 4,0 µl 5X Reaction Buffer + 1,0 µl dNTP Mix + 0,5 µl Recombinante RNase Inhibitor und 1,0 µl MMLV Reverse Transkriptase.

Das Reaktionsgemisch wurde ebenfalls gut durchmischt und dann bei Programm 23 im Thermocycler zur Reaktion gebracht. Dieses Programm heizt für eine Stunde auf 42°C auf. Währenddessen konnte die Reverse Transkriptase unter idealen Bedingungen mithilfe der zugegebenen Nukleotide aus der mRNA cDNA synthetisieren. Am Ende wurde die Temperatur für 5 Minuten auf 94°C erhöht, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gelagert und weiter für die qRT-PCR verwendet oder bei -20°C oder -70°C zur Lagerung eingefroren

2.4 Analyse der relativen mRNA-Expression definierter Zielgene mittels quantitativer realtime PCR (= qRT-PCR)

2.4.1 Durchführung der qRT-PCR zur Messung der relativen mRNA-Expression definierter Zielgene definierter Knorpelproben

Die qRT-PCR wurde mit dem Light Cycler® 480 II von Roche durchgeführt. Die Reagenzien und die Light Cycler® 480 Multiwell Platte 96 wurden bei der Vorbereitung zur qRT-PCR-Analyse immer auf Eis gelagert. Zur Messung des relativen cDNA Gehalts, wurden die Proben zusammen mit einem Reaktionsgemisch in eine spezielle Wellplatte pipettiert. Pro Well-Vertiefung wurde eine Probe gemessen. Dafür wurden 2µl der zu messenden cDNA und ein Mastermix von 18µl benötigt, der sich aus 10µl Taq Man Master, 7µl PCR grade Water und 1µl Assay des jeweiligen Gens, das zu bestimmen war zusammensetzt. Beziehungsweise, wenn Sonden und Primer als getrennte Reagenzien vorlagen (im Assay ist beides schon gemischt) beinhalteten die 18µl Master mix 10µl Taq Man Master, 5,5 µl PCR grade Water, jeweils 1µl des 3'-5' forward und 1µl des 5'-3' backward Primer, des zu bestimmenden Genabschnitts der cDNA, und 0,5µl der dazu passenden Sonde.

Der Mastermix wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und in die Well-Vertiefungen pipettiert. Anschließend wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren die cDNA dazu gemischt. Für jedes Gen, das man

bestimmen wollte, war ein eigener Mastermix nötig. Alle Proben wurden zudem immer in Doppelbestimmung auf der gleichen Platte gemessen mit jeweils doppelt bestimmter Negativ- und Positivkontrolle dazu. Die Negativkontrolle bestand aus 2µl PCR grade Water. Die Positivkontrolle war eine aus mehreren Patienten gepoolte cDNA. Dafür wurden jeweils nur Disks der räumlichen Organisation S verwendet. Insgesamt wurde eine größere Menge an cDNA hergestellt, die aus dem Gewebe von 60 String-Disks gewonnen wurde. Damit erhielt man genug cDNA, um bei jeder qRT-PCR-Messung die gleiche Positivkontrolle verwenden zu können. Trotzdem waren aus Mengengründen zwei Positivkontrollen nötig: k+ und UF. Es wurde k+ in UF umgerechnet, sodass alle Proben auf UF genormt waren. Die Umrechnung war dadurch möglich, dass beide Positivkontrollen jeweils für jedes Gen auf einer Wellplatte gemessen wurden. So konnte ihre mRNA-Expression unter exakt denselben Bedingungen gemessen werden und das Verhältnis daraus ergab einen repräsentativen Umrechnungsfaktor (siehe Kapitel 2.3.4). Es wurde immer 2µl der Positivkontrolle verwendet.

Außerdem wurden die Referenzgene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (= GAPDH) und 60S Ribosomales Protein L13a (= RPL13A) für jede Probe beide zusammen auf der gleichen Wellplatte gemessen, damit sich eine zuverlässige Relation berechnen ließ und nicht Fehler durch Unterschiede zwischen den gemessenen Platten zu finden waren. Referenzgene sind Gene, deren mRNA immer in relativ konstantem Maß exprimiert wurden. Sie ermöglichten so eine Umrechnung des relativen mRNA-Gehalts der untersuchten Zielgene, ohne den Fehler unterschiedlicher mRNA-Mengen durch eine, in dem Proben unterschiedlich enthaltene Zellanzahl zu machen. Damit konnte einen Rückschluss auf die relative Menge der Expression der gemessenen Gene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 gezogen werden. Wenn alles pipettiert war, wurde die Verschlussfolie auf der Wellplatte mit einem Spatel gut festgedrückt und die gesamte Wellplatte für eine Minute bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde sie direkt in den Light Cycler gelegt und analysiert. Die Analyse mit dem Light Cycler® 480 II erfolgte mit dem Programm „Monocolour Hydrolysis Probe – UPL Probe 96 II“.

Als erstes erfolgte die Pre-Inkubation für 10 Minuten bei 95°C. Anschließend wurde bei der Amplifizierung 40-mal derselbe Zyklus durchlaufen: 10 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung der DNA. So können sich die Doppel- in Einzelstränge trennen, damit sich im 2. Reaktionsschritt, der Annealingphase (30s bei 60°C), die Primer anlagern können. Anschließend wurde in der Elongationsphase für 10s auf 72°C erwärmt, damit die Taq-Polymerase unter optimalen Bedingungen den, durch die Primer vorgegebenen Abschnitt, amplifizieren konnte. Zum Abschluss wurde in 30 Sekunden auf 40°C abgekühlt, um die Reaktion zum Erliegen zu bringen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Primersequenzen, die zur Analyse der relativen mRNA-Expression mittels qRT-PCR verwendet wurden.

Gen	Primersequenz 5'-3'
GAPDH	f: CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC r: ACGACCAAATCCGTTGACT
RPL13A	f: CTGGACCGTCTCAAGGTGTT r: GCCCCAGATAGGCAAACCT
MMP-1	f: CAGAGATGAAGTCCGGTTTTTC r: GGGGTATCCGTGTAGCACAT
MMP-2	f: CTTCCGTCTGTCCCAGGAT r: GCCAAGGTCAATGTCAGGAG
MMP-3	f: CTCCAACCGTGAGGAAAATC r: CATGGAATTTCTCTTCATCAAA
MMP-9	f: ATCCGGCACCTCTATGGTC r: CAGACCGTCGGGGGAG
MMP-13	f: CAGACAAATGTGACCCTTCCT r: CAACCTGCTGAGGATGCAG
Col6A3	f: GCCTCTTTCTCTCAGGCTTTC r: CCGCACCATTTTTGACATCT

2.4.2 Primereffizienzbestimmung der, zur mRNA-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR verwendeten Primer

Die Effizienzbestimmung der Primer war nötig, um die Quantifizierung der mRNA-Expression zu berechnen. Die Effizienz gibt an, wie effektiv der Primer an die zu amplifizierenden DNA-Stellen bindet. Aus einer Genprobe wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe mit Standard 1 (unverdünnte Probe) bis Standard 5 (Probe 1:10 000 verdünnt) hergestellt. Alle Standards wurden nun wie in Punkt 2.3.1 auf die jeweils zu testenden Gene analysiert. Die Effizienz wurde nun vom Programm des Light Cycler® 480 II berechnet. Die Standards wurden im Subset Editor benannt und die Konzentration für Standard 1 mit 1 000 000, Standard 2 mit 100 000 usw. angegeben, damit die Relation der Konzentration von 1:10 der Standards untereinander festgelegt wurde. Im Teil Analysis wurde mit der Rechenoperation Absolute Quantification Analysis dann die Effizienz berechnet. Diese Effizienz einer qRT-PCR-Messung des jeweiligen Gens wurde vom Programm zur Berechnung der relativen mRNA-Expression benötigt. Deshalb wurde die Effizienz, die den Median nach 3 Wiederholungen der Primereffizienztestung darstellt, als Effizienz des jeweiligen Gens für weitere Messungen verwendet. Die Effizienzen der Gene GAPDH und RPL13A waren im Labor bereits vorliegend. Alle Effizienzen sind in Tabelle 10 zu sehen.

Tabelle 10: Primereffizienzen.

Gen	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3
GAPDH		1,981	
RPL13A		1,957	
MMP-1	2,089	1,925	1,897
MMP-2	1,876	1,992	1,980
MMP-3	1,979	1,905	1,970
MMP-9	1,850	2,017	1,835
MMP-13	2,061	1,947	1,821
Col6A3	1,997	1,980	1,941

Legende 5: Die, zur Analyse der relative mRNA-Expression definierter Gene der Knorpelgewebeproben mittels qRT-PCR, verwendete Effizienz ist der Median aller bestimmten Effizienzen (fett gedruckt). Diese Effizienz wird vom Computerprogramm zur Errechnung der relative mRNA Menge verwendet und beschreibt wie spezifisch der Primer bindet.

2.4.3 Gel-Elektrophorese zur Überprüfung auf die adäquate Amplifikation des qRT-PCR Produkts

Um zu testen, ob die Primer auch die Amplifikation der gewünschten Sequenzen bedingen, wurde eine Gel-Elektrophorese des qRT-PCR-Produkts der Gene MMP-1, -2, -3, -13 und Col6A3 gemacht. Die Primer der Gene GAPDH und RPL13A sind im Labor schon positiv auf die Amplifikation der gewünschten qRT-PCR Produkte getestet worden und sind etabliert.

Die amplifizierte DNA-Sequenzen der untersuchten Zielgene sollten alle eine Länge von +/-100 Basenpaaren (= bp) haben, deswegen wurde zum Vergleich eine Standardprobe von DNA mit verschiedenen langen Sequenzen (1000-100bp) genommen. Die genauen bp-Längen der qRT-PCR Produkte sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Bp-Länge der amplifizierten qRT-PCR Produkte der Zielgene. Bp-Längen ermittelt mit NCBI Blast.

Gen	Basenpaarlänge
MMP-1	76 [94]
MMP-2	73 [95]
MMP-3	77 [96]
MMP-9	89 [97]
MMP-13	108 [98]
Col6A3	69 [99]

Das Gel bestand aus 1g Agarose-Pulver in 50ml Trichloroacetat Säure (= TCA), das durch Erhitzen des Gemischs aufgelöst wurde. Anschließend wurde 1µl DNA-Stain dazu gemischt, das Gel in die Elektrophorese-Kammer gegossen und 2-3h bei Zimmertemperatur auskühlen und erhärten gelassen. Nach Aushärten des Gels wurde es mit TAC übergossen, sodass es komplett bedeckt war. Jeweils 20µl des zu überprüfenden qRT-PCR-Produkts wurde der Wellplatte entnommen und mit je 1µl Ladepuffer vermischt. Jeweils 21µl jeder Mischung wurde nun in die Gellaschen pipetiert. Die erste und letzte Lasche wurde mit 6µl DNA-Ladder Lösung befüllt. Diese setzte sich zusammen aus 40µl DNA-Leiter, 10µl Ladepuffer (6x), und 40µl RNase freiem Wasser. Fertig befüllt, wurde die Elektrophoresekammer bei 65V für ca 30 Minuten an das Netzgerät angeschlossen. Das Gel wurde anschließend entnommen und mithilfe des UV-Geldokumentationssystems Diana (Abbildung 22 und Abbildung 23) oder dem ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Abbildung 21) die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.4.4 Quantifizierung der relativen mRNA-Expression mittels qRT-PCR

Die Auswertung der quantitativen mRNA-Expression erfolgte mit dem Programm Light Cycler® 480 SW 1.5.1. Dazu wurden im Subset Editor in der Option Relative Quantification Analysis des Programms, alle Proben benannt,

die Eigenschaft Target (für Zielgene) bzw. Reference (für Referenzgene) in der Einstellung relative Quantification festgelegt und die Doppelbestimmung jeder Probe als Replicates deklariert. Die relative mRNA-Expression wurde in Analysis berechnet, mit der Option Abs Quant/2nd Deriv Max. Diese hatte die Einstellungen Abs Quant Type: Abs Quant/2nd Deriv Max: High Confidence, Subordinate Abs Quant Type Analysis: Create by Target Name, Reference Analysis: Select External, wobei der gespeicherte Run der passenden Referenzgene ausgewählt wurde, Pairing Rule: All To Mean und Default Standard Curve Settings: allow external standards with matching Target Name. Durch die mRNA-Expression der Referenzgene GAPDH und RPL13A, die immer in ungefähr konstantem Maße exprimiert wurden, konnte errechnet werden wie stark die Genprobe die zu bestimmenden mRNA der Zielgene exprimiert. Dieses war der Target/Ref Wert. Es wurden nur Targen/Ref Werte vom Programm errechnet, die in der Doppelbestimmung bei jeder Messung einen Datenwert aufwiesen. So wurde das Mittel beider Messungen der selben Probe zur Analyse verwendet. Wertepaare, bei denen nur einer eine Amplifikation zeigte, wurden als ungültig gewertet. Solche Messungen mit einer positiven und einer negativen Messung einer Probe wurden wiederholt. Auch Messungen mit extrem stark abweichenden Werten von der üblichen mRNA-Expression wurden wiederholt und erneut als Doppelbestimmung gemessen, um Pipettierfehler oder falsch positive Messungen auszuschließen.

Die verwendete Positivkontrolle k_+ bzw. UF war für jede gemessene Probe immer dieselbe. Die Unterschiede der Messwerte zwischen den Runs, die durch Umgebungsfaktoren entstehen konnten, wurden durch die Verwendung der Positivkontrolle berücksichtigt. Zunächst wurde ein Run mit beiden Positivkontrollen UF und k_+ pro Gen auf einer Platte gemessen und k_{+1} wurde auf UF_1 normalisiert. Schließlich wurden alle Positivkontrollen auf die Positivkontrolle UF_1 von Col6A3 normalisiert, d.h. der Wert der Positivkontrolle UF_1 von Col6A3 ($UF_{1Col6A3}$) wurde = 1 gesetzt und die anderen Positivkontrollen (k_{+n} oder UF_n) im Verhältnis dazu berechnet. Für diese Normalisierung wurde das Verhältnis der Positivkontrollen mit dem Wert des Referenzruns der Positivkontrolle $UF_{1Col6A3}$ multipliziert: $UF_{1Col6A3} * \left(\frac{k_{+n}}{k_{+1}}\right)$ bzw. $UF_{1Col6A3} * \left(\frac{UF_n}{UF_1}\right)$.

Für jede weitere Messung wurde pro Gen das Verhältnis der Positivkontrollen zwischen dem neuen Run und dem Indexrun berechnet und zur Normalisierung des neuen Runs verwendet. Diese Vorgehensweise wurde für jede Genexpression separat durchgeführt, da sich die Positivkontrollen für jedes Gen in ihrem Wert der relativen mRNA-Expression unterschieden.

Insgesamt wurde so eine Relativierung der mRNA-Expression der einzelnen CHs im Verhältnis zur in den Proben enthaltenen cDNA Menge erreicht. Außerdem wurden Unterschiede der Einzelmessungen durch veränderte Umgebungsbedingungen vermieden, indem die Positivkontrollen normalisiert wurden. Zusätzlich wurde ein relativer Nullpunkt zur Auswertung der relativen mRNA-Expression geschaffen. So konnte die Auswertung einer repräsentativen mRNA-Expression erfolgen.

2.5 Auto- und Immunfluoreszenzmikroskopie humanen Knieknorpels des distalen Femurs der superfiziellen Knorpelschicht

2.5.1 Herstellung von Kryotomschnitten aus Disks zur Darstellung von Col6A3 mittels Antikörpermarkierung und Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop

Die hergestellten Knorpeldisks wurden auf einem gefrorenen Tissue Tek Block mithilfe noch flüssigen Tissue Teks aufgebracht. Der Block mit den Proben wurde im Kryotom bei -20°C solange gelagert, bis die Disks darauf festgefroren waren. Mit dem Kryotom wurden nun 50µm dicke Schnitte der Superfizienschicht des Knorpelgewebes horizontal zur Oberfläche angefertigt, die mit einem Objektträger vom Gerät aufgenommen werden konnten. So wurde das Gewebe, welches früher die obersten Lagen des Gelenkknorpels gebildet hatte, abgetragen. Die, am Objektträger durch das Tissue Tek haftenden Schnitte, wurden mit 70% Ethanol geflutet und gewaschen, bis sie sich ohne anhaftende

Tissue Tek Reste vom Objektträger lösen. Die angefertigten Kryotomschnitte wurden in 4% Formaldehyd fixiert.

2.5.2 Immunhistochemische Darstellung der PZM durch Markierung von Col6A3 mit Antikörpern

Die Darstellung der PZM durch die Markierung von Col6A3 mit Antikörpern wurde mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern durchgeführt. Der eine Primärantikörper (= Primärantikörper I; von Sigma Aldrich) eignet sich für eine Bindung durch einen rot fluoreszierenden Sekundärantikörper. Der andere Primärantikörper (= Primärantikörper II; von Santa Cruz) konnte durch einen grün fluoreszierenden Sekundärantikörper gebunden werden. Die angefertigten Kryotomschnitte in 4% Formaldehyd wurden mit jeweils 200µl phosphatgepufferten Salzlösung (= PBS) dreimal, für je 5min, unter ständigem Schütteln, gewaschen. Jeder Waschgang und jede Inkubation erfolgte unter konstantem Schütteln mit dem Schüttler oder Thermoshaker. Die Schnitte wurden mit dem Enzym Hyaluronidase, der Menge 4mg/ml in 0,1M Trisaminomethan-gepufferter Salzsäure (= Tris-HCl), pH 5,7, bei 37°C im Thermoshaker für 2 Stunden inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschgang mit PBS; jeweils dreimal für je 5 Minuten. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C mit 100µl des Primär-Antikörper I gegen die Struktur Col6A3 in der Konzentration 1:100 bzw. des Primärantikörper II in der Konzentration 1:50 in PBS. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut gewaschen (dreimal für je 5 min in PBS) und im Dunkeln für 2h bei Raumtemperatur mit 100µl der Konzentration 1:100 des Sekundärantikörpers IgG-PE für den Primärantikörper I oder IgG-FITC für den Primärantikörper II inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden ausnahmslos im Dunkeln aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Sekundärantikörpers durchgeführt. Nach einem erneuten Waschgang (dreimal für je 5min in PBS) wurden die Schnitte mit Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert und konnten mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Blockade unspezifischer Bindungen wurde mit Inkubation für 2h in 2% Rinderalbumin (= BSA) in PBS durchgeführt. Die Negativkontrollen wurden

ohne jegliche Behandlung, nur mit Primär- oder nur mit Sekundärantikörper untersucht.

2.5.3 Fluoreszenzmikroskopie nativer Kryotomschnitte von Knorpelgewebe und Schnitten mit fluoreszenzmarkiertem Kollagen Typ VI in der PZM

Die angefertigten Kryotomschnitte, bzw. die mit Antikörpern gegen Col6A3 gefärbten Schnitte, wurden mit Mounting Medium auf dem Objektträger fixiert. Das Mikroskop wurde mit LED Licht betrieben, wobei die Kanäle DAPI mit 365nm und 25% Intensität, GFP mit 470nm und 25% Intensität und DsRed mit 590nm Wellenlänge und 95% Intensität einzeln oder in Kombination verwendet wurden. Auch Bilder mit der Halogenlampe wurden unter gleicher Belichtungszeit (2,0s) aufgenommen. Es wurden Mosaikaufnahmen eines Bildausschnitts mit ähnlicher Belichtungszeit und -Intensität angefertigt.

2.6 Statistische Auswertung der quantitativen Analyse mit qRT-PCR der relativen mRNA-Expression der definierten Knorpelproben

Die normalisierten Werte der mRNA-Expression wurden mit dem Programm Sigma Plot ausgewertet. Zur Testung wurden die Messwerte der relative mRNA-Expression der untersuchten Gene logarithmiert, um eine Normalverteilung zu erreichen. Dies ist gängiger Standard bei mRNA-Expressionsanalysen, um eine normalverteilte Wertemenge darzustellen. Zur Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede wurde zunächst die Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnoff-Test überprüft. ANOVA on Ranks mit dem Dunn's post hoc Test wurde angewandt, um nicht normalverteilte Wertemengen untereinander auf Signifikanzen ($p < 0,05$) zu testen; ANOVA wurde für normalverteilte Daten verwendet. Dabei wurde als post-hoc Tests zum Vergleich mehrerer Wertemengen mit unterschiedlicher

Probenanzahl pro Bedingung, die Holm-Sidak Methode für den Vergleich unterschiedlicher mRNA-Expressionen in verschiedenen räumlichen Organisationen und der Dunn's Test für alle weiteren Auswertungen angewendet.

Um zu berücksichtigen, dass einige untersuchte Gene wie MMP-1, -13 und Col6A3 in einigen Proben keine mRNA-Expression zeigten, wurde zusätzlich ein Codesystem mit 0 und 1 angewendet. Dabei steht 0 für „keine mRNA-Expression detektierbar“ und 1 für „detektierbare mRNA-Expression“. Der Exakte Test nach Fisher wurde hier angewendet.

3. Ergebnisse

3.1 Probengeneration von humanem, superfiziellen Kniegelenksknorpel zur Analyse der relativen mRNA-Expression bestimmter Gene definierter Stadien der OA Entwicklung

3.1.1 Rekrutierung und Auswahl des Patientenkollektivs

Wie in Material und Methoden beschrieben wurde mit Einwilligung aufgeklärter Patienten, die aufgrund der Erkrankung an einer Gonarthrose eine Knieendoprothese erhalten haben, humaner Kniegelenksknorpel gewonnen. Dies diente dem Ziel, die relative mRNA-Expression von definierten MMPs und Col6A3 in der Superfizialschicht von Kniegelenksknorpel in unterschiedlichen Stadien von OA zu untersuchen. Daraus wurden insgesamt 109 Proben mit einer definierten, räumlichen Organisationsform der Superfizialschicht von Knorpel humaner Kniegelenke generiert. Das hierfür untersuchte Patientenkollektiv setzte sich aus 44 Patienten zusammen, wobei 43% davon männlich und 57% weiblich waren. Eine graphische Darstellung der Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten ist Abbildung 7 zu sehen.

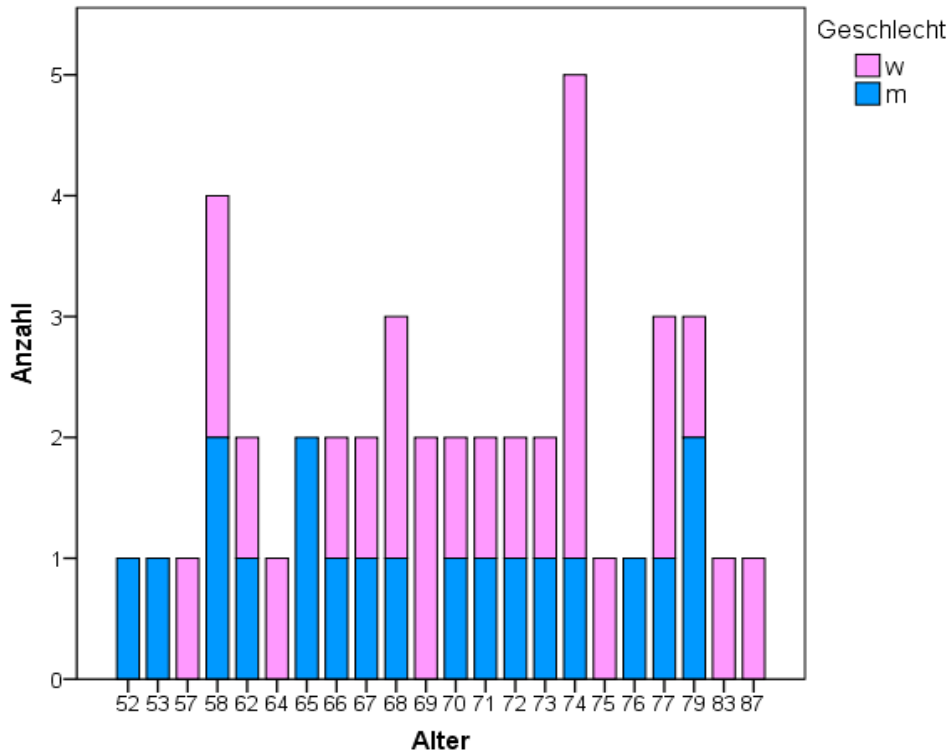


Abbildung 7: Altersverteilung und Geschlechtsverteilung der in der mRNA-Analyse verwendeten Knorpelproben von Patienten. Blau dargestellt sind dabei männliche Patienten, während weibliche Patienten rosa dargestellt sind. Eigene Abbildung.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, war der jüngste Patient 52 Jahre alt und der Ältteste 87, wodurch die Spannweite der Altersverteilung 35 Jahre betrug. Der Altersdurchschnitt lag bei 70 Jahren und der Anteil weiblicher Patienten überwog mit 57%. Betrachtet man die Seitenverteilung der Kniegelenke, so ergibt sich ein Verhältnis untersuchten Gelenkknorpels von insgesamt 44% rechte Femurkondylen und 56% linke Kondylen. In Abbildung 8 ist die Verteilung von Geschlecht und Lokalisation der, wie in Material und Methoden beschrieben, erhaltenen Femurkondylen der Probanden dargestellt. Mit Berücksichtigung des Geschlechts ergab sich bei Frauen ein Anteil von 53% des rechten und 47% des linken Kniegelenks. Bei Männern lag der Anteil von linken Femurkondylen bei 67%, während 33% der rechten Seite entstammten (siehe Abbildung 8).

Das auf die relative mRNA-Expression von definierten MMPs und Col6A3 untersuchte Patientenkollektiv mit OA des Kniegelenks kann somit nach

Kriterien des Alters, des Geschlechts und der Seitenverteilung als repräsentativ betrachtet werden.

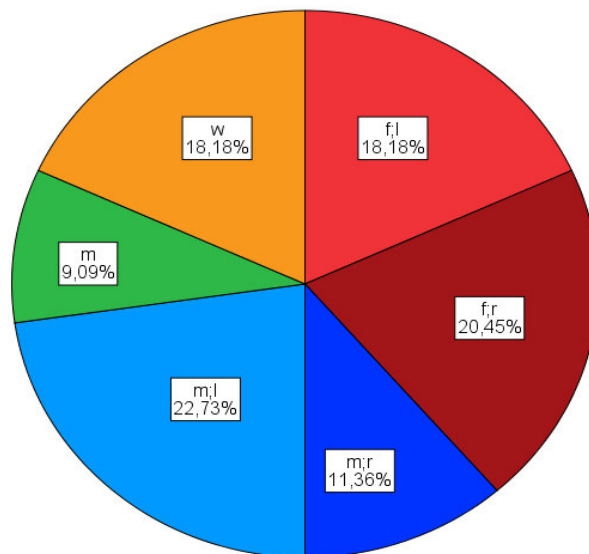


Abbildung 8: Verteilung von Geschlecht und Lokalisation der, aus den Kliniken in Tübingen und Rottenburg, erhaltenen Femurkondylen der Probanden. M = männlich und w = weiblich; L = links und r = rechts; ohne r/l = unbekannt. Eigene Abbildung.

3.1.2 Zuordnung der mikroskopischen Darstellung fluoreszenzmarkierter superfizieller CHs humaner Femurkondylen nach definierten unterschiedlichen räumlichen Organisationsformen

Zur Analyse der mRNA-Expression von CHs in spezifischen, durch ihre räumliche Organisation definierten Stadien, wurden die, wie in Material und Methoden beschrieben, hergestellten „Disks“ nach optischen Kriterien in die Kategorien S, DS, SC, BC und D eingeteilt. Um die Disks nach der räumlichen Anordnung ihrer CHs sortieren zu können, wurden diese mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die dabei durch DAPI angefärbten Zellkerne können, wie in Material und Methoden beschrieben, nach optischen Kriterien entweder eindeutig einem der fünf Organisationsformen zugeordnet werden oder wurden, wenn dies nicht der Fall war, aussortiert. In Abbildung 9 - Abbildung 17 sind beispielhaft die räumlichen Organisationsmuster S, DS, SC, BC und D zu sehen, die repräsentativ für ihre Kategorie sind.

Abbildung 9 zeigt eine Disk und Abbildung 10 einen Ausschnitt in höherer Vergrößerung der räumlichen Organisation S, die durch drei oder mehrere CHs in einer Reihe definiert ist [21].

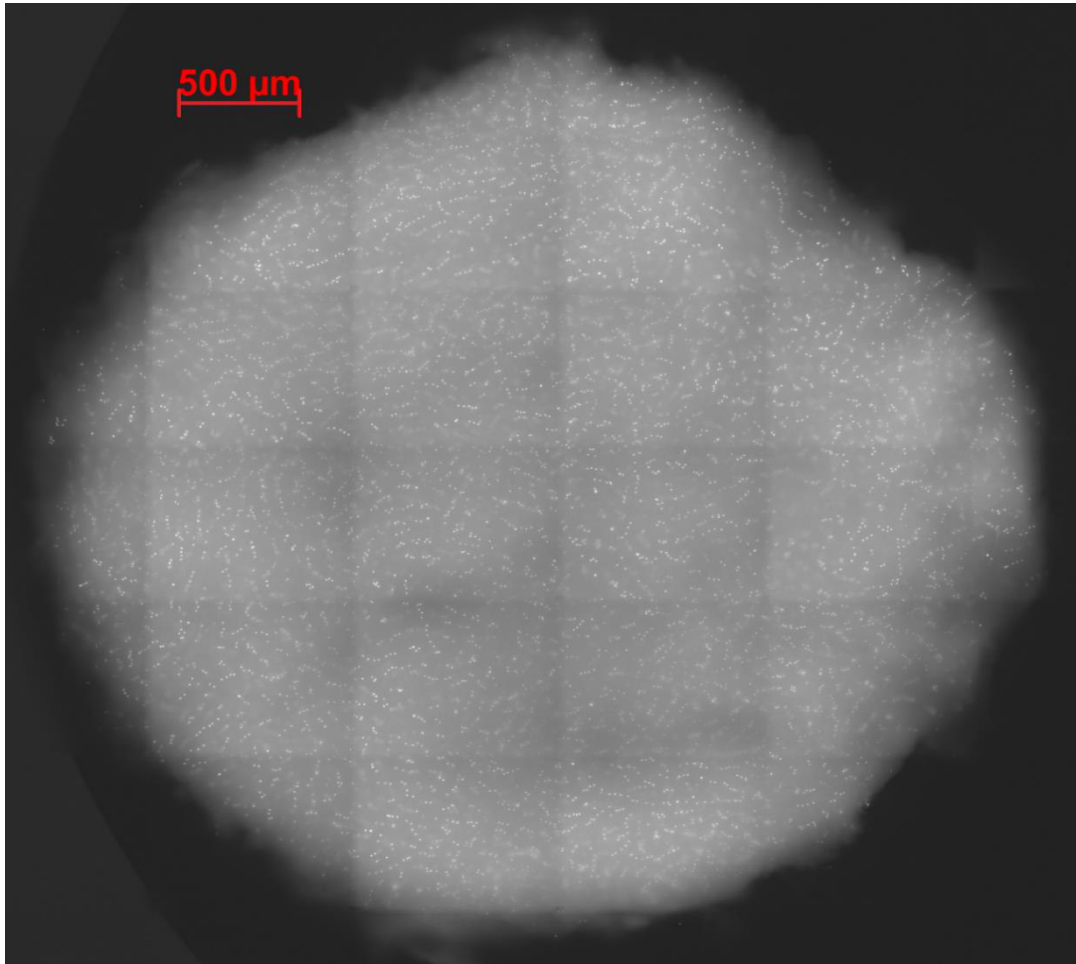


Abbildung 9: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation S der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung.

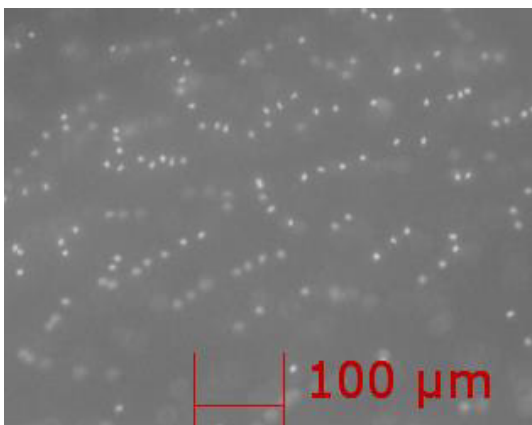


Abbildung 10: Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopischen Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation S dar. Eigene Abbildung.

Abbildung 11 zeigt eine Disk und Abbildung 12 einen vergrößerten Ausschnitt der räumliche Organisation DS, die durch drei oder mehrere CHs in zwei, parallel, dicht nebeneinander verlaufenden Reihen definiert ist [49].

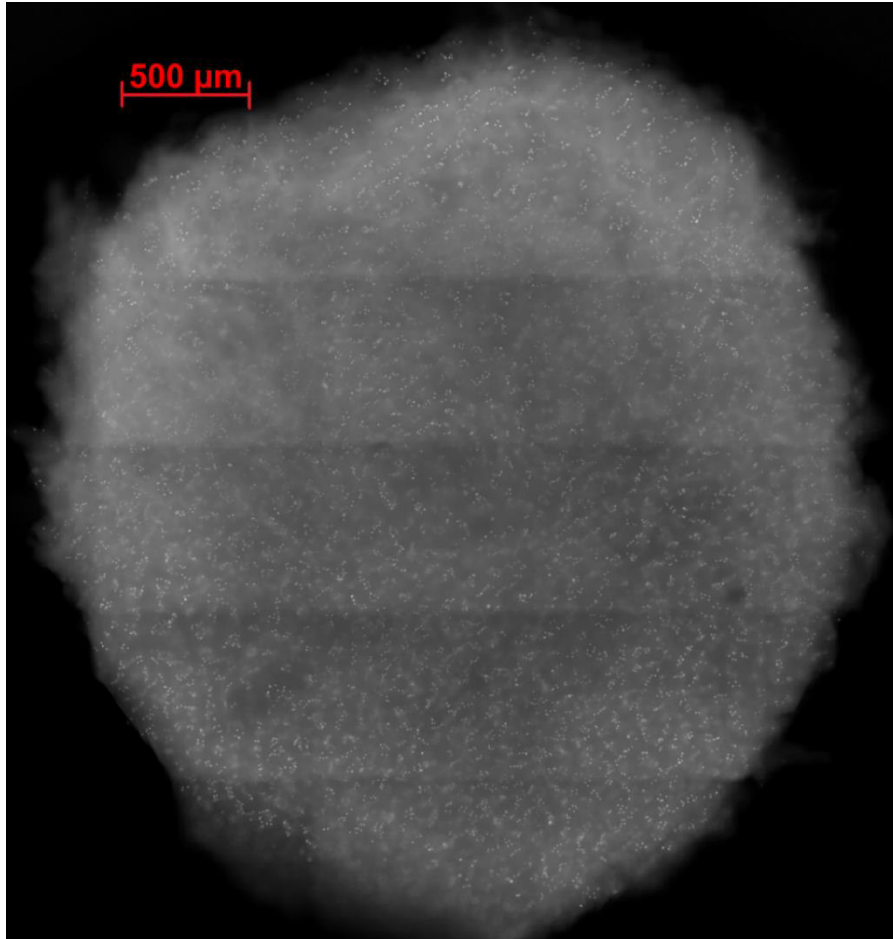


Abbildung 11 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation DS der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung.

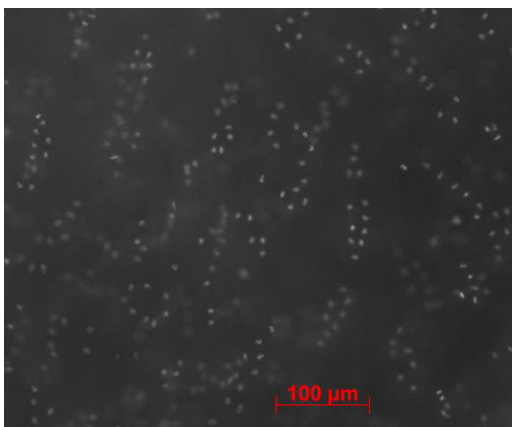


Abbildung 12 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung.

Abbildung 13 zeigt eine Disk und Abbildung 14 einen vergrößerten Ausschnitt der räumlichen Organisation SC, die durch drei oder mehr CHs, die ring- oder ellipsenförmig angeordnet sind definiert ist [2].

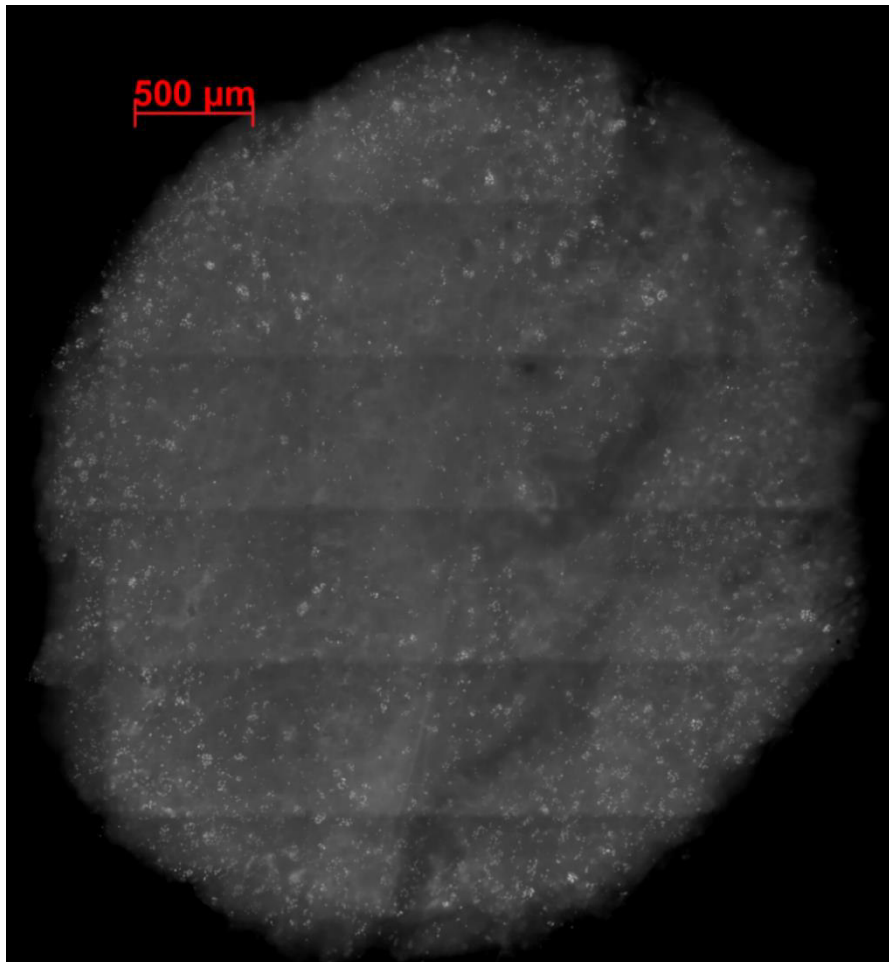


Abbildung 13 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation SC der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung.

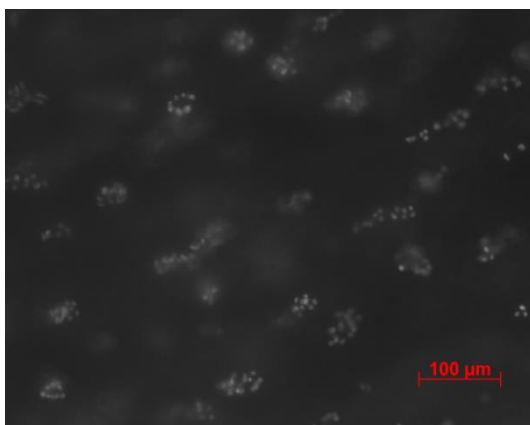


Abbildung 14 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopischen Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung.

Abbildung 15 zeigt eine Disk und Abbildung 16 einen vergrößerten Ausschnitt der räumlichen Organisation BC, die durch mehr als zwanzig CHS, die kreisähnlich oder haufenförmig angeordnet sind definiert ist [2].

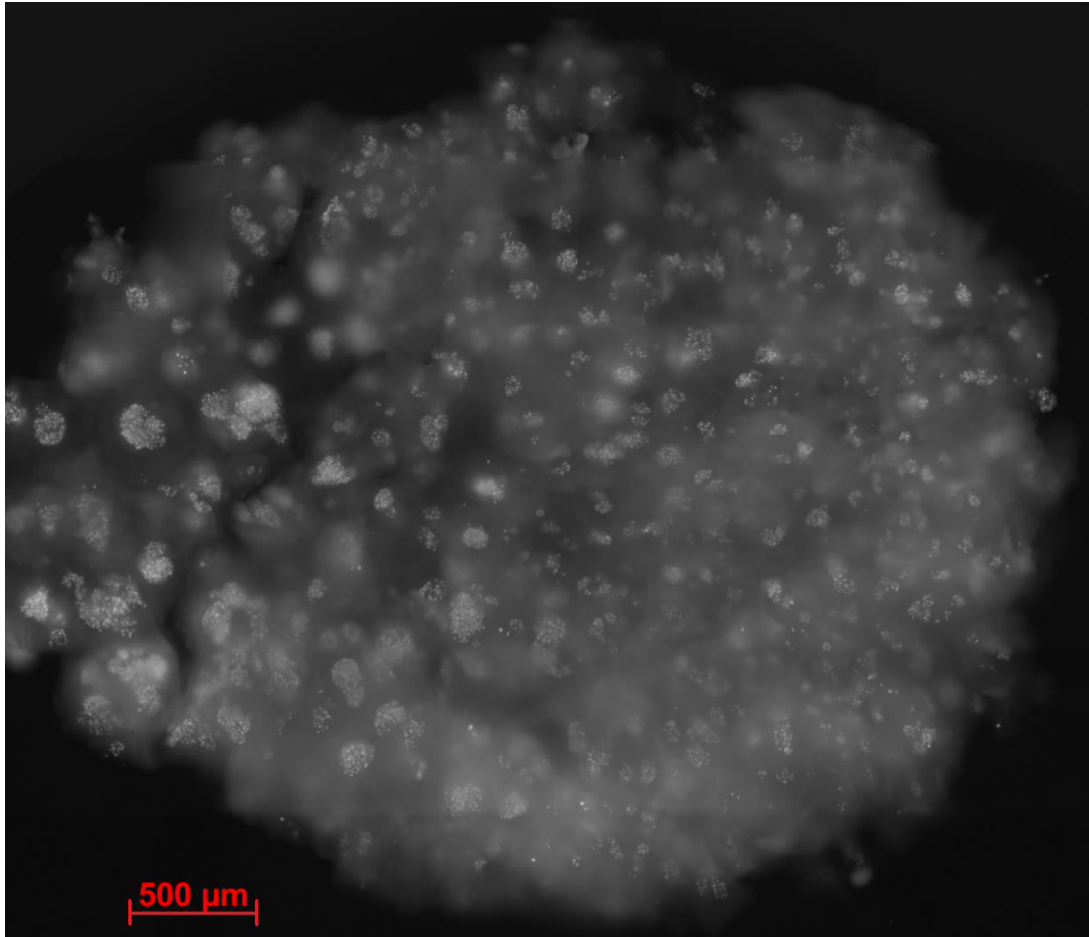


Abbildung 15 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation BC der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung.

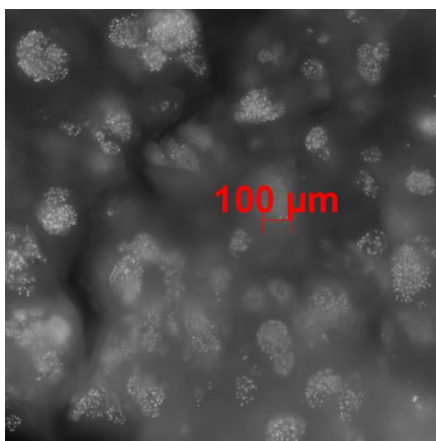


Abbildung 16 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopischen Mosaikaufnahme CHS der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHS stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung.

Abbildung 17 zeigt eine Disk und Abbildung 18 einen vergrößerten Ausschnitt der räumlichen Organisation D, die durch den völligen Verlust jeglicher räumlicher CH Organisation definiert ist [2].

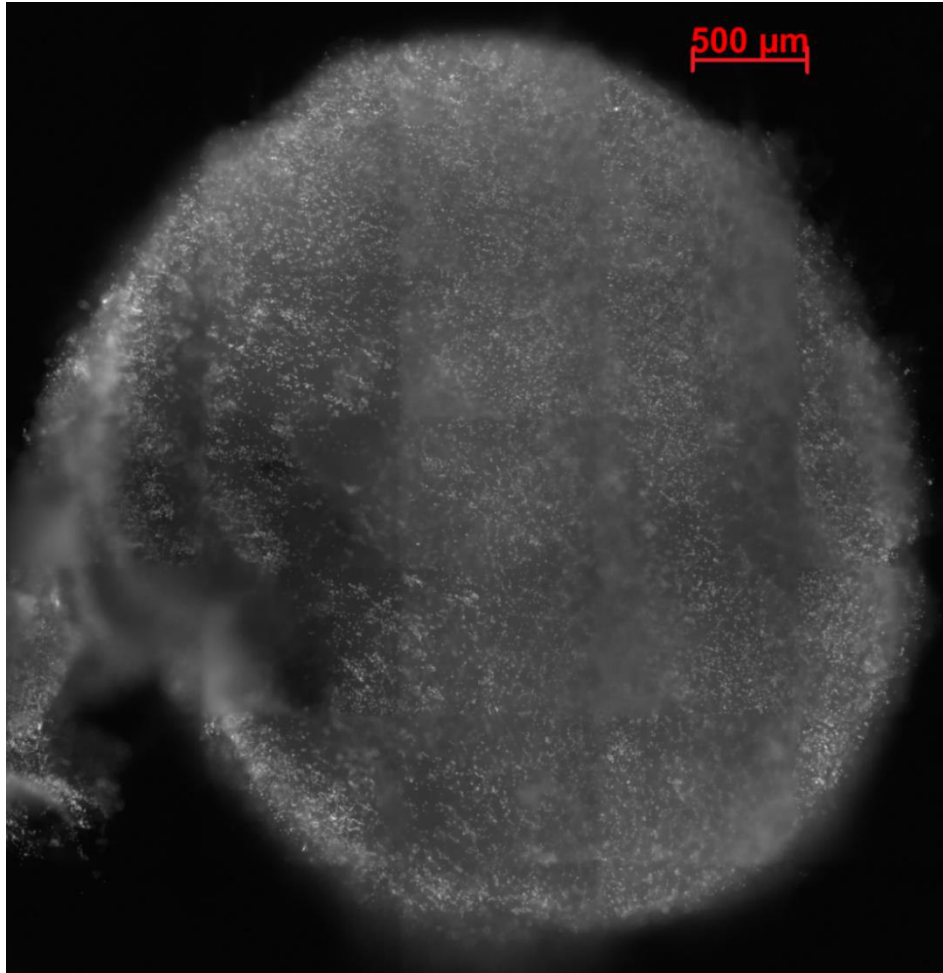


Abbildung 17 (oben): Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk mit räumlicher Organisation D der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Eigene Abbildung.

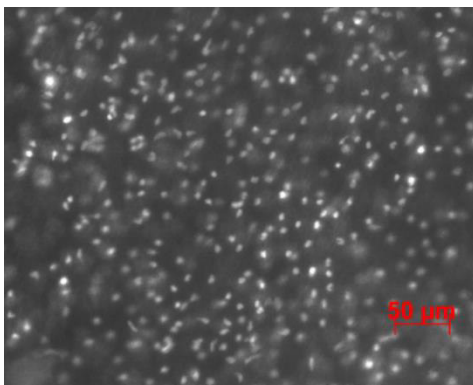


Abbildung 18 (unten): Ausschnitt einer beispielhaften fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme CHs der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Die CHs stellen die räumliche Organisation DS dar. Eigene Abbildung.

Abbildung 19 zeigt alle definierten räumlichen Organisationsformen (S, DS, SC, BC und D) der superfiziellen humanen CHs, wobei der fließende Übergang der Muster untereinander hier beispielhaft gezeigt werden kann. Dies zeigt den dynamischen Prozess der Umorganisation der räumlichen Anordnung superfizieller CHs. Eine solche Disk wurde allerdings nicht zur Generation der Proben zur Analyse mittels qRT-PCR verwendet, da sie nicht eindeutig einem der fünf definierten räumlichen Organisation zugeordnet werden kann.

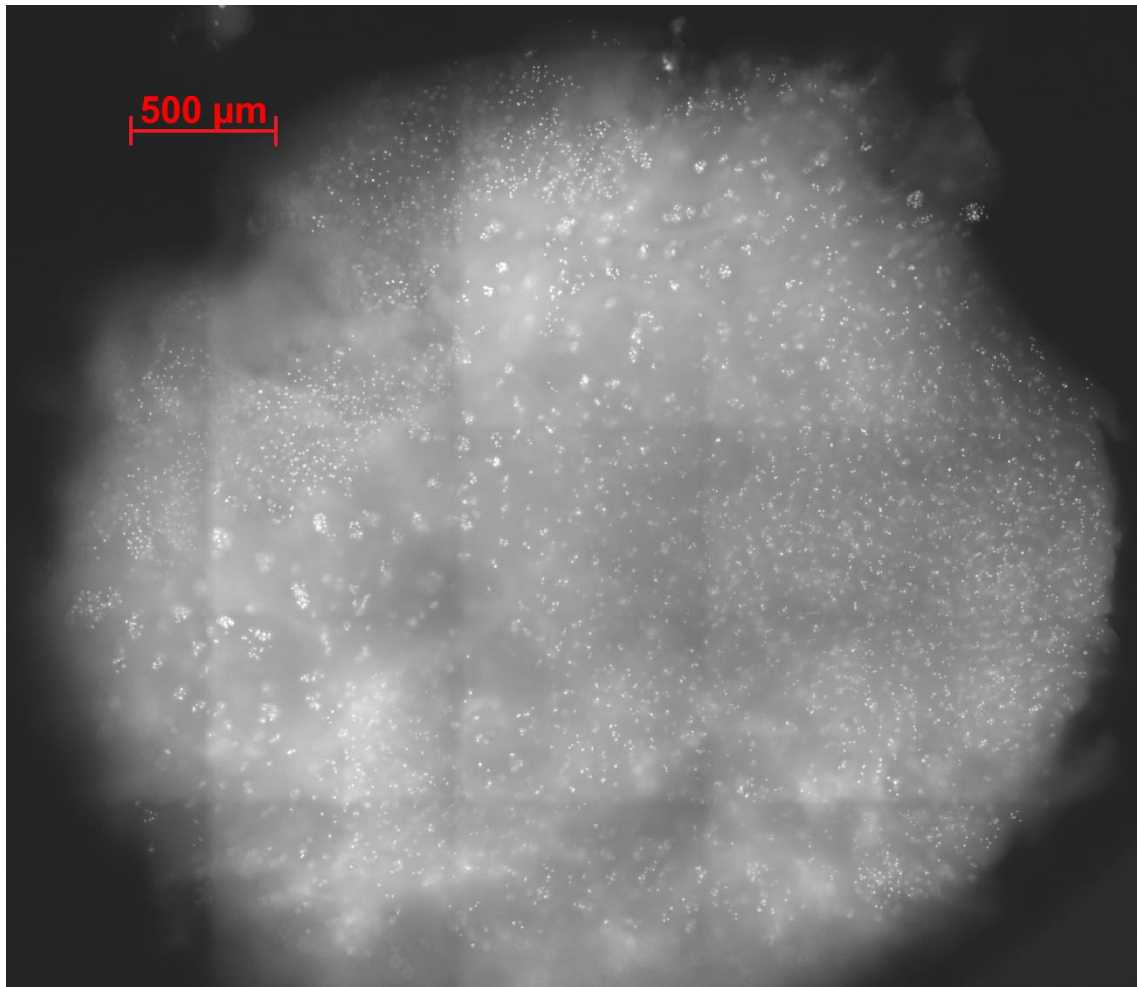


Abbildung 19: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Mosaikaufnahme einer Disk der superfiziellen Schicht humanen Gelenkknorpels des distalen Femurs mit Anfärbung der Zellkerne durch DAPI. Hier sind fast alle definierten, hier untersuchten räumlichen Organisationsformen der superfiziellen humanen CHs zu sehen (DS, SC, BC und D), wobei der fließende Übergang der Muster untereinander hier beispielhaft gezeigt werden kann. Im unteren Bildbereich rechts sind DS bis SC zu sehen, die nach links oben fortschreitend in die Organisationsform BC übergehen. Diese geht schließlich in der linken oberen Ecke in ein diffuses Stadium über (D). Eigene Abbildung.

Das Einteilen der Disks nach den eben gezeigten Kriterien diene der Herstellung von Proben der jeweiligen definierten räumlichen Organisationsmustern superfiziellen Kniegelenkknorpels. Diese Organisationsformen spiegeln verschiedene morphologische Stadien der OA wieder.

3.2. Quantifizierung der mRNA-Expression definierter MMPs und Col6A3 in unterschiedlicher räumlicher Organisation von superfiziellen CHs humaner Femurkondylen von OA Patienten

Die Quantifizierung von MMP und Col6A3 mRNA-Expression in unterschiedlichen räumlichen Organisationen humanen Kniegelenkknorpels von OA Patienten wurde durchgeführt, um die Expressionsprofile dieser Gene in Abhängigkeit der CH-Organisation zu untersuchen.

3.2.1 mRNA-Extraktion von definierten Proben unterschiedlicher räumlicher Organisation von superfiziellen CHs humaner Femurkondylen von OA Patienten

Um die Analyse der relativen mRNA-Expression definierter Gene humaner CHs des superfiziellen Kniegelenkknorpels bestimmen zu können, wurde nach der Herstellung definierter Proben, wie in Material und Methoden beschrieben, die mRNA aus dem Gewebe dieser Proben isoliert. Um eine ausreichende Reinheit und mRNA-Menge für die Messung mittels qRT-PCR zu gewährleisten, wurde der mRNA-Gehalt und die mRNA-Reinheit mit Nano-Drop gemessen.

Der mRNA-Gehalt wird mit ng/μl angegeben und sollte in einem Bereich von $\geq 1,5$ ng/μl liegen, um in ausreichender Menge für die qRT-PCR verwendet werden zu können. Der RNA-Gehalt der insgesamt 109 gemessenen Proben betrug durchschnittlich 8,60 ng/μl (Standardfehler 0,650), wobei keine Probe einen Wert von 1,79 mg/μl unterschritt.

Die Reinheit sollte in einem Verhältnis von $> 1,00$ 260/280nm liegen, bei einem Optimum von 2,00. Der Emissionspeak bei 260nm entspricht dabei der mRNA. Die durchschnittliche mRNA-Reinheit betrug 1,71 260/280nm (Standardfehler 0,0411), wobei 1,13 260/280nm nicht unterschritten wurde. Aufgeteilt in Kategorien der räumlichen Organisationsform sind Reinheit und mRNA Gehalt in Tabelle 12 dargestellt. Man sieht, dass die Proben isolierter mRNA mit wenig Abweichung der Reinheit und des mRNA Gehalts hergestellt wurden. Die räumliche Organisation der superfi ziellen CHs spielte dabei keine Rolle. Insgesamt enthielten alle Proben isolierte mRNA in genügender Menge und Reinheit für die weitere Verarbeitung.

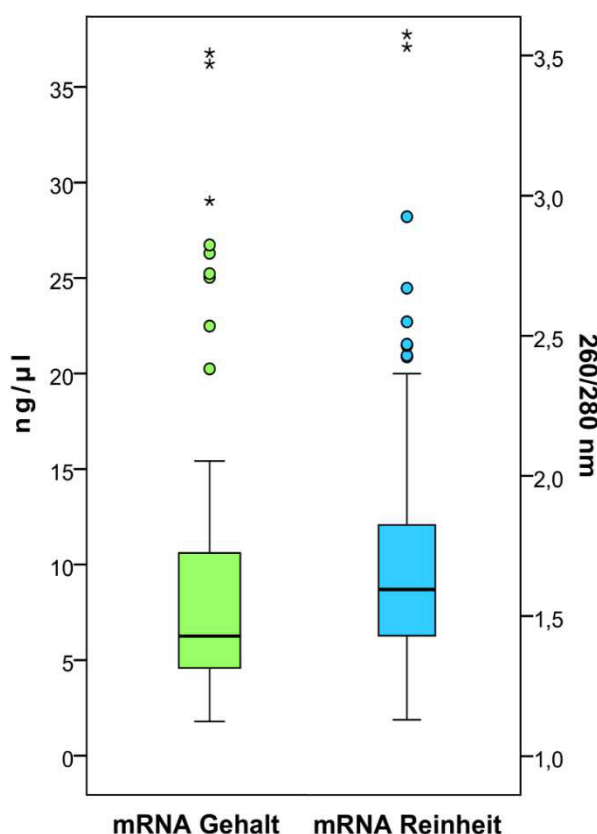


Abbildung 20: Darstellung des mRNA-Gehalts und der mRNA-Reinheit aller definierten Proben nach mRNA-Extraktion, gemessen mit dem NanoDrop 1000 V. Boxplotdarstellung: Die Balken geben jeweils das 1. (unterer Balken) und 3. Quartil (oberer Balken) der Werteverteilung an. Dazwischen liegt der Median. Der Fehlerbalken gibt Minimum und Maximum exklusiv Extremwerte und Ausreißer an. Diese werden aus Gründen der Übersichtlichkeit von IBM SPSS Statistics 24 wie folgt definiert: Ausreißer = Werte, die zwischen 1,5 und 3 Interquartilweiten ausserhalb der Box liegen und Extremwerte = Werte, die mehr als 3 Interquartilweiten ausserhalb der Box liegen. Extremwerte werden als Kreise dargestellt und Ausreißer als Sterne. Eigene Abbildung

Tabelle 12: Durchschnittlicher mRNA-Gehalt mit Standardfehler und mittlere mRNA-Reinheit mit Standardfehler der auf die mRNA-Expression der bestimmten Zielgene untersuchten Proben nach mRNA-Extraktion.

	Räumliche Organisation	S	DS	SC	BC	D	Gesamt
mRNA-Gehalt in ng/µl	Mittelwert	9,44	7,33	7,96	8,87	9,36	8,57
	Standardfehler	2,35	1,39	2,13	1,10	1,18	0,649
mRNA-Reinheit in 269/280nm	Mittelwert	1,62	1,84	1,81	1,59	1,68	1,71
	Standardfehler	0,0697	0,124	0,0989	0,0641	0,0727	0,411

Legende 6: Die Proben sind in den räumlichen Organisationen S, DS, SC; BC und D als Gruppen zusammengefasst, sowie alle 109 untersuchten Proben zusammen in „Gesamt“. Messwerte gemessen mit NanoDrop 1000 V.

3.2.2 qRT-PCR definierter MMP und Col6A3 mRNA-Expression in unterschiedlicher räumlicher Organisation von superfiziellen CHs humaner Femurkondylen von OA Patienten

Für die indirekte Messung der relativen mRNA-Expression superfizieller CHs des Kniegelenks von OA Patienten wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese entspricht 1:1 der genetischen Information der ursprünglichen mRNA. So kann indirekt, durch Messung des cDNA-Gehalts mittels qRT-PCR die exprimierte mRNA gemessen werden. Es wurden insgesamt 18 S-, 24 DS-, 22 SC-, 25 BC- und 20 D-Proben bestehend aus einer definierten Anzahl Organisations-charakterisierter Disks mit der qRT-PCR auf den relativen mRNA-Gehalt der Gene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 untersucht. Um den gemessenen mRNA-Gehalt zu relativieren, wurden die absoluten Messwerte mit den detektierten cDNA-Werten der Referenzgene GAPDH und RPL13A normalisiert. So wurde sichergestellt, dass die mRNA-Expression verschiedener Gene vergleichbar war. Weiterhin wurden die relativierten Werte noch mit einer Positivkontrolle normalisiert (siehe Material und Methoden).

Ausnahmslos alle gemessenen Proben zeigten eine Expression der mRNA der Referenzgene GAPDH und RPL13A, was zeigte, dass in allen Proben cDNA in

genügender Menge zur Messung enthalten war. Nicht alle gemessenen Zielgene (MMPs und Col6A3) waren in jeder Probe zu detektieren, und aus diesem Grunde ergaben sich unterschiedliche Werte für die mRNA-Expression per Organisationsmuster, wie in Tabelle 13 aufgeführt ist.

Tabelle 13: Auswertung von Vorhandensein einer mRNA-Expression in den definierten Proben der qRT-PCR Messung.

Räumliche Organisation mit gesamter Probenanzahl	S 18 Proben	DS 24 Proben	SC 22 Proben	BC 25 Proben	D 20 Proben	Gesamt 109 Proben
MMP-1	13 (72%)	16 (67%)	15 (68%)	13 (52%)	16 (80%)	73 (67%)
MMP-2	18 (100%)	23 (96%)	21 (95%)	23 (92%)	18 (90%)	103 (94%)
MMP-3	18 (100%)	24 (100%)	21 (95%)	23 (92%)	17 (85%)	103 (94%)
MMP-9	17 (94%)	18 (75%)	20 (91%)	21 (84%)	20 (100%)	96 (88%)
MMP-13	14 (78%)	17 (71%)	12 (55%)	14 (56%)	18 (90%)	74 (68%)
Col6A3	15 (83%)	14 (58%)	15 (68%)	17 (68%)	18 (90%)	78 (72%)

Legende 7: Anzahl der Proben, die einen messbaren Wert der mRNA-Expression aufwiesen in Abhängigkeit des Gens und räumlicher Organisation, sowie die gesamte mRNA-Expression der einzelnen gemessenen Gene. Daneben der Prozentsatz von den gemessenen Werten der mRNA-Expression der vorhandenen Proben.

Auffällig war, dass die mRNA-Expression von MMP-2, -3 und -9 fast immer nachzuweisen war, was nicht für MMP-1 und -13 oder Col6A3 galt. Die Proben ohne nachweisbare mRNA-Expression von MMP 2, 3 und 9 waren zufällig verteilt. Die mRNA-Expression von MMP-1, -13 und Col6A3 waren in etwa 2/3 aller Proben nachzuweisen. Weiterhin fiel auf, dass in der gleichen Probe die mRNA verschiedener MMPs und Col6A3 zu einem gewissen Prozentsatz gemeinsam nachweisbar war; diese Werte sind in Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Prozentuale Übereinstimmung einer gleichförmigen Expression von mRNA der einzelnen Proben bestimmter Gene.

Räumliche Organisation	S	DS	SC	BC	D	Gesamt
MMP-2 mit MMP-3	100%**	96% ²	95%	88%	90%	94%
MMP-9 mit MMP-3	94% ²	75% ²	95%	76%	90% ²	86%
MMP-9 mit MMP-2	94% ²	71%	95%	88%	90% ²	88%
Col6A3 mit MMP-2	83% ²	63%	73%	72%	90%	76%
Col6A3 mit MMP-3	83% ²	58% ²	73%	76%	100%**	78%
Col6A3 mit MMP-9	83% ²	67% ²	64%	68%	90% ²	74%
MMP-13 mit MMP-2	78% ²	75%	68%	52%	90%	73%
MMP-13 mit MMP-3	78% ²	71% ²	59%	64%	100%**	74%
MMP-13 mit MMP-9	83%	63%	59%	64%	90% ²	72%
MMP-1 mit MMP-9	67%	71%	64%	52%	80% ²	67%
MMP-1 mit MMP-3	72% ²	67% ²	64%	60%	80%	69%
MMP-1 mit MMP-2	72% ²	71%	73%	56%	80%	70%
MMP-1 mit MMP13	72%	71%	68%	64%	80%	71%
MMP-1 mit Col6A3	67%	83%**	73% ^{1*}	76%*	80%	76%
MMP-13 mit Col6A3	83%	71%	73%	72% ^{1*}	100%**	80%
MMP-1 mit MMP13 und Col6A3	61%	67%	59%	56%	80%	65%

Legende 8: Gleiches Verhalten bedeutet: Entweder zeigen beide/alle eine messbare mRNA-Expression, oder beide/alle zeigen keine in der jeweils gleichen Probe. Dieses gleiche Verhalten wird prozentual im Vergleich mit jeweils einem oder mehreren anderer gemessener mRNA-Expression wiedergegeben. Folgende Kombinationen waren nach Durchführung des Exakten Tests nach Fisher signifikant: ** = signifikant ($p < 0,01$); * = signifikant ($p < 0,05$); 1* = einseitige Signifikanz ($p < 0,05$) deutet auf eine hohe Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Zusammenhangs hin. Bei besonderen Konstellationen konnte der Exakte Test nach Fisher nicht durchgeführt werden, da sich kein 4x4 Quadrat ergibt. Diese sind folgendermaßen markiert: 2 = eines der Gene zeigt für jede Probe eine mRNA-Expression, somit ergibt sich nur eine 2x1 Tafel und der Exakte Test nach Fisher ist nicht durchführbar.

Alle gemessenen Gene waren in ihrer mRNA-Expression in ähnlicher Häufigkeit in den verschiedenen Organisationsstadien nachzuweisen. Eine Ausnahme bildete die räumliche Organisation D. Hier wurde der höchste Anteil einer parallelen mRNA-Expression verschiedener Gene nachgewiesen. Um zu überprüfen, ob diese Beobachtungen signifikant zusammenhingen und eine Assoziation der Gene untereinander gefunden werden konnte, wurden die Daten mit dem Exakten Test nach Fisher untersucht. Dabei zeigte sich für die räumliche Organisation S keine signifikante Assoziation zwischen den mRNA-Expressionsprofilen der untersuchten Gene. Allerdings wiesen MMP-2 und MMP-3 bei jeder Probe eine messbare mRNA-Expression auf, weshalb der Exakte Test nach Fisher damit nicht durchführbar war. Das gleiche Problem ergab sich für MMP-3 in der räumlichen Organisation DS, sowie für MMP-9 in der räumlichen Organisation D. Wenn die mRNA-Expression zu 100% übereinstimmt, kann man aufgrund der Datenlage aber von gleichem Verhalten ausgehen. Aufgrund der Datenlage kann weiterhin trotzdem gesagt werden, dass bei DS eine positive MMP-2 mRNA-Expression mit einer positiven MMP-3 mRNA-Expression assoziiert war (>95% deckungsgleich), und ein solche bei S zwischen MMP-2 bzw. MMP-3 und MMP-9 sehr naheliegt (94,4%). Für die restlichen Kombinationen dieses Sonderfalls ist alleine aus der Datenlage heraus keine Assoziation der mRNA-Expression anzunehmen.

Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Darstellung der statistischen Auswertung der Assoziationen zwischen den mRNA-Expressionsprofilen der untersuchten Gene.

Gene	MMP-2	MMP-3	Col6A3	MMP-9	MMP-13
MMP-1	S: *	S: *	S: -	S: -	S: -
	DS: -	DS: *	DS: p<0,01	DS: -	DS: -
	SC: -	SC: -	SC: (p<0,05)	SC: -	SC: -
	BC: -	BC: -	BC: p<0,05	BC: -	BC: -
	D: -	D: -	D: -	D: *	D: -
MMP-2		S: 100%	S: *	S: *	S: *
	x	DS: *	DS: -	DS: -	DS: -
		SC: -	SC: -	SC: -	SC: -
		BC: -	BC: -	BC: -	BC: -
		D: -	D: -	D: *	D: -
MMP-3			S: *	S: *	S: *
	x	x	DS: *	DS: *	DS: *
			SC: -	SC: -	SC: -
			BC: -	BC: -	BC: -
			D: 100%	D: *	D: 100%
Col6A3				S: -	S: -
	x	x	x	DS: -	DS: -
				SC: -	SC: -
				BC: -	BC: (p<0,05)
				D: *	D: 100%
MMP-9					S: -
	x	x	x	x	DS: -
					SC: -
					BC: -
					D: *

Legende 9: Gleiches Verhalten bedeutet: Entweder zeigen beide/alle eine messbare mRNA-Expression, oder beide/alle zeigen keine in der jeweils gleichen Probe. Dieses wurde in folgenden Kombinationen mit der Durchführung des Exakten Tests nach Fisher auf signifikante Gemeinsamkeiten überprüft. Die Zielgene sind gegeneinander aufgetragen. Dabei wird jeweils noch weiter unterteilt in die räumliche Organisation. Die jeweiligen Kombinationen sind mit dem Ergebnis -, *, 100% und einem p-Wert gekennzeichnet. Ein p-Wert ohne Klammern (grün) bedeutet signifikant mit dem jeweiligen Wert. Ein p-Wert in Klammern (gelb) bedeutet einseitige Signifikanz ($p < 0,05$), was auf eine hohe Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Zusammenhangs hinweist, aber mathematisch nicht signifikant ist. Bei besonderen Konstellationen konnte der Exakte Test nach Fisher nicht durchgeführt werden, da sich kein 4x4 Quadrat ergibt, wenn eine der beiden Variablen in allen Proben eine mRNA-Expression zeigen (somit ergibt sich nur eine 2x1 Tafel und der Exakte Test nach Fisher ist nicht durchführbar). Diese sind mit * (grau) markiert. Keine signifikante Assoziation ist mit – gekennzeichnet. Eine komplette Übereinstimmung des Vorhandenseins einer mRNA-Expression ist mit 100% (grün) markiert.

Die räumliche Organisation DS, sowie BC allerdings wiesen eine signifikante Assoziation ($p < 0,01$ für DS und $p < 0,05$ für BC) der mRNA-Expression zwischen Col6A3 und MMP-1 auf. Einen Hinweis auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Zusammenhangs, aber mathematisch nicht signifikant, zeigt die einseitige Signifikanz. Sie ist mit $p < 0,05$ im Vergleich der räumlichen Organisation BC und der mRNA-Expression zwischen Col6A3 und MMP-13, sowie in der räumlichen Organisation SC zwischen der mRNA-Expression zwischen MMP-1 und Col6A3 nachzuweisen. Die räumliche Organisation D zeigte eine signifikante Assoziation der mRNA-Expression ($p < 0,01$) zwischen MMP-13 und Col6A3, ebenso zwischen MMP-3 und MMP-13 bzw. MMP-3 und Col6A3. Diese Kombinationen stimmten jeweils zu 100% überein im Vorhandensein einer mRNA-Expression in den verschiedenen Proben.

Ob die Proben aus Knorpelgewebe mehrerer Patienten gepoolt waren oder nicht, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Assoziation der mRNA-Expression unterschiedlicher Gene, sowie auf die Höhe oder das Vorhandensein der mRNA-Expression der jeweiligen getesteten Gene.

3.2.3 Analyse der Spezifität der, durch qRT-PCR amplifizierten, Genprodukte der untersuchten Gene

Um zu prüfen, ob das durch die qRT-PCR amplifizierte Genprodukt dem gesuchten Genabschnitt entsprach, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurde getestet, ob die Länge des amplifizierten Genabschnitts der Länge des zu amplifizierenden Teilabschnitts des Zielgenes entspricht, der durch die Primer markiert wird. Zum Vergleich wurden Referenzen von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Basenpaarlänge von 100bp in 100er-Schritten bis 1000bp verwendet.

Abbildung 21 zeigt die Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-3, 13 und Col6A3. Der amplifizierte Teil von MMP-3 soll eine Länge von 77bp [96] haben und die Gelelektrophorese zeigte hier auch ein qRT-PCR Produkt von etwas weniger als 100bp Länge. Der amplifizierte Teil von MMP-13 soll eine Länge von 108bp [98] haben und die Gelelektrophorese zeigte hier auch ein qRT-PCR Produkt von fast genau 100bp Länge. Der amplifizierte Teil von Col6A3 soll eine Länge von 69bp [99] haben und die Gelelektrophorese zeigte hier auch ein qRT-PCR Produkt von ca. der gleichen bp Länge wie die Bande des qRT-PCR Produkts von MMP-3.

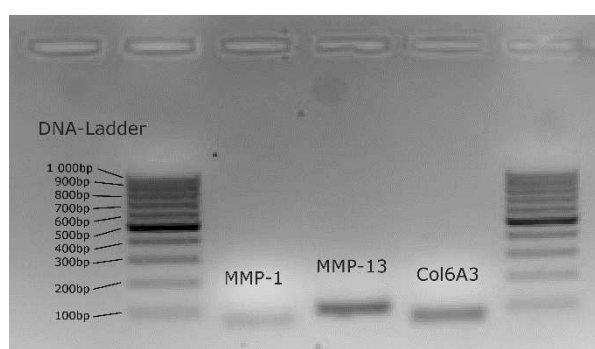


Abbildung 21: Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-3, MMP-13 und Col6A3 im Vergleich mit dem DNA-Ladder aus DNA-Bruchstücken der Länge 1000-100bp. Von links nach rechts: DNA-Ladder, MMP-3, MMP-13, Col6A3, DNA-Ladder (zeigt jeweils mit der unteren Bande 100bp an). Eigene Abbildung.

Abbildung 22 zeigt die Gelelektrophorese mit dem qRT-PCR Produkt der Gene MMP-2 und -9. Der amplifizierte Teil von MMP-2 soll eine Länge von 73bp [95] haben und die Gelelektrophorese zeigt hier auch ein qRT-PCR Produkt von

etwas weniger als 100 bp Länge. Der amplifizierte Teil von MMP-9 soll eine Länge von 89bp [97] haben und die Gelelektrophorese zeigt hier auch ein qRT-PCR Produkt von etwas weniger als 100 bp Länge, allerdings mit einer etwas größeren Länge als das von MMP-2.

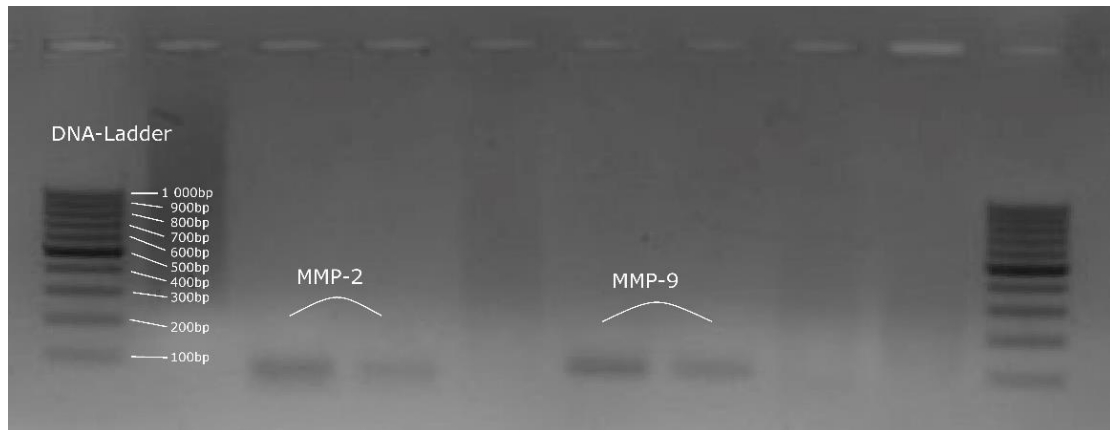


Abbildung 22: Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-2 und MMP-9 im Vergleich mit dem DNA-Ladder aus DNA-Bruchstücken der Länge 1000-100bp. Von Links nach rechts: Lasche 1 DNA-Ladder, Lasche 3 und 4: MMP2, Lasche 6 und 7: MMP9, Lasche 10: DNA-Ladder (zeigt jeweils mit der unteren Bande 100bp an). Andere Laschen sind mit anderen qRT-PCR Produkten beladen und hier nicht von Bedeutung. Eigene Abbildung.

Abbildung 23 zeigt unter anderem die Gelelektrophorese des qRT-PCR Produkts von MMP-1. Der amplifizierte Teil von MMP-1 soll eine Länge von 76bp [94] haben und die Gelelektrophorese zeigt hier auch ein qRT-PCR Produkt von etwas weniger als 100 bp Länge.

Insgesamt zeigte jede Bahn der qRT-PCR-Produkte der untersuchten Zielgene in der Gelelektrophorese eine eindeutige Bande ohne verschmierte Spuren. Das zeigt, dass genau ein qRT-PCR Produkt mit spezifischer bp-Länge amplifiziert wurde und nicht zusätzlich noch unspezifische andere cDNA Sequenzen. Das Ergebnis zeigte auch, dass das amplifizierte qRT-PCR Produkt wie erwartet im Größenbereich von +/- 100bp lagen. Diese entsprach jeweils, je nach getestetem Zielgen, der erwarteten Länge des Genprodukts der qRT-PCR (siehe Abbildung 21 bis Abbildung 23) und war spezifisch für jeweils ein amplifiziertes qRT-PCR Produkt. Demnach ist davon auszugehen, dass die Zielsequenz der jeweiligen Gene, die durch die qRT-PCR amplifiziert worden

ist, der gesuchten Sequenz entspricht und demnach die quantitative Messung der mRNA-Expression adäquat nachgewiesen wurde.

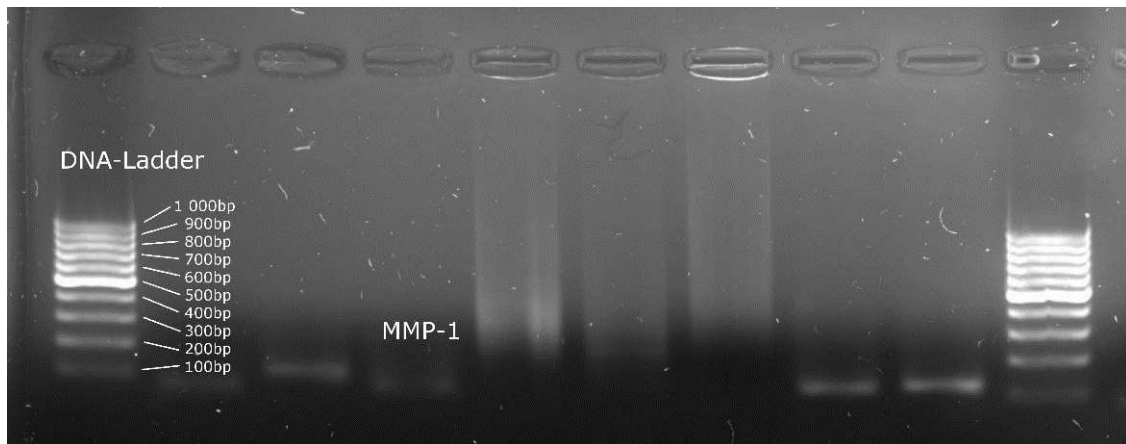


Abbildung 23: Gelelektrophorese der qRT-PCR Produkte von MMP-1 im Vergleich mit dem DNA-Ladder aus DNA-Bruchstücken der Länge 1000-100bp. Von links nach rechts: 1. Lasche: DNA-Ladder, 4. Lasche: MMP-1, 10. Lasche DNA-Ladder (zeigt jeweils mit der unteren Bande 100bp an). Andere Laschen sind mit anderen qRT-PCR Produkten beladen und hier nicht von Bedeutung. Eigene Abbildung.

3.3 Quantitative Analyse der relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation

3.3.1 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Zur Überprüfung, ob die gemessene relative mRNA-Expression der untersuchten Zielgene signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen räumlichen Organisationsformen oder innerhalb derselben räumlichen Organisation zwischen den verschiedenen Zielgenen aufwies, wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) getestet. Zusätzlich wurden die Werte der relativen mRNA-Expression jedes getesteten Gens unabhängig von der Organisationsform als „globale“ Expression des gesamten Knieknorpels

analysiert, also indem alle Proben mathematisch gepoolt wurden und auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen mRNA-Expressionen getestet.

Um die Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede mit dem richtigen Test durchführen zu können, wurde geprüft, ob eine Normalverteilung vorliegt. Der Großteil der erhobenen Daten stammten nicht aus einer Normalverteilung, aber einzelne Wertemengen (MMP-9 bei S, Col6A3 bei DS und SC) hingegen ergaben eine Normalverteilung. Deshalb konnten die erhobenen Daten insgesamt durch den Median und Quantile suffizient beschrieben werden. Zum Nachweis auf signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurde nach ANOVA-on-Ranks deshalb der Dunn's post-hoc-Test verwendet. Da Expressionsanalysen in der Regel alleine durch die geringe Anzahl an Messwerten nicht mathematisch einer normalverteilten Datenmenge entsprechen, können nach gängiger wissenschaftlicher Praxis diese Wertemenge normalverteilt werden, indem der natürliche Logarithmus jedes Messwerts berechnet wird und mit diesem die statistische Analyse durchgeführt wird. Dies wurde hier zusätzlich, wie in Material und Methoden beschrieben, getestet und es ergaben sich praktisch keine Abweichungen zum ANOVA-on-Ranks mit Dunn's post-hoc-Test Ergebnis ohne Normalverteilung.

Im Folgenden werden die einzelnen statistischen Auswertungen genauer aufgeführt. Die graphische Darstellung der Messwerte ist im Verlauf des Kapitels aufgeführt, zusammen mit den Tabellen zur Auswertung von signifikanten Unterschieden der relativen mRNA-Expression. Die Medianwerte und der Interquartilabstand (IQR) sind in Tabelle 16 aufgeführt und werden im Weiteren noch genauer beschrieben.

Zu beachten ist die zum Teil große Streuung der gemessenen mRNA-Werte. Trotzdem sammelten sich die meisten Messwerte in einem ähnlichen Zahlenbereich und es zeigten sich signifikante Unterschiede der mRNA-Expression in unterschiedlichen räumlichen Organisationen und zwischen verschiedenen Genen. Diese sind im Weiteren aufgeführt.

Tabelle 16: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der Gene MMP1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	Strings	Double Strings	Small Cluster	Big Cluster	Diffus	Global
MMP-1	Median	0,288	0,103	0,886	0,277	0,820	0,393
	IQR	1,01	3,64	3,96	0,355	5,78	2,35
MMP-2	Median	0,00827	0,00714	0,00800	0,00456	1,65	0,0167
	IQR	0,650	0,101	0,0774	0,0169	18,8	0,227
MMP-3	Median	684	920	2790	2570	1840	2110
	IQR	2860	4630	4350	6990	1630	3940
MMP-9	Median	4,89	9,03	1,39	18,5	3,76	6,05
	IQR	6,26	25,5	5,73	56,3	7,37	13,1
MMP-13	Median	3,37	18,7	22,1	5,90	20,5	11,6
	IQR	3,71	47,0	33,9	16,7	37,0	27,0
Col6A3	Median	0,657	4,46	7,44	24,5	67,1	6,84
	IQR	4,10	11,0	6,71	31,7	132	23,3

3.3.1.1 Statistische Analyse der globalen relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene von OA-Knorpel superfizieller Chondrozyten

Betrachtet man die globale mRNA-Expression im OA-Knorpel ohne Berücksichtigung der Organisationsstadien, also indem alle Proben zusammen genommen wurden, so ergab sich eine relative mRNA-Expression, wie in Tabelle 16 unter „Global“ aufgeführt. Abbildung 24 stellt diese „globale“ mRNA-Expression, welche die Expression des gesamten Kniegelenkknorpels unabhängig von einzelnen Organisationsformen zeigt, graphisch dar.

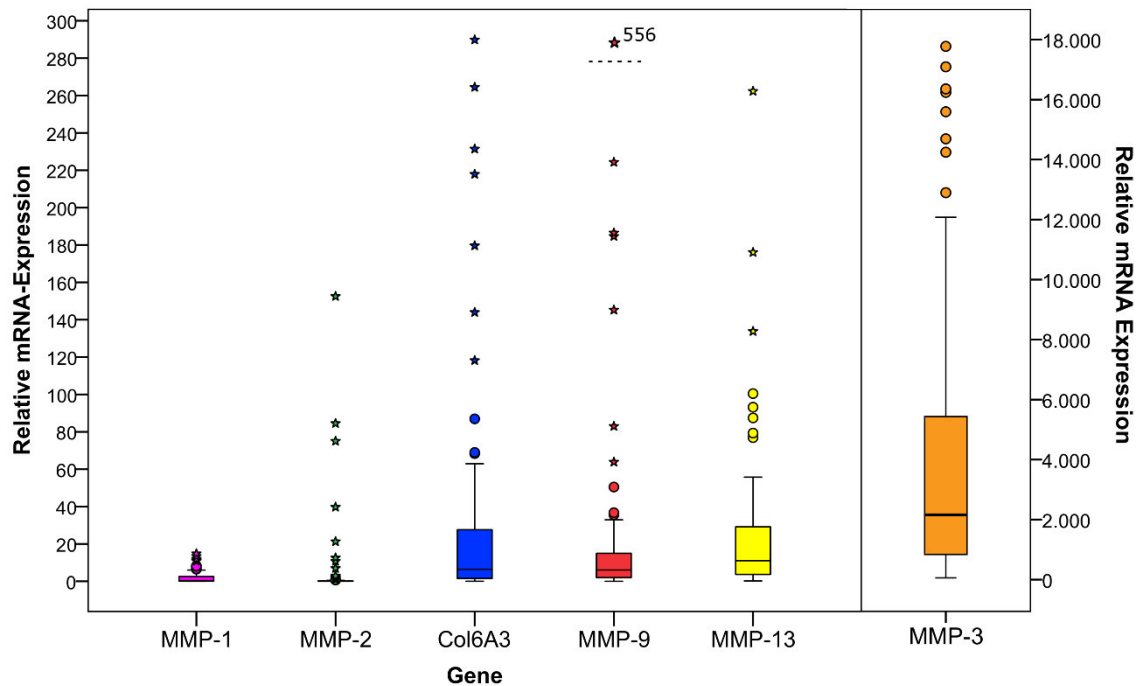


Abbildung 24: Relative mRNA-Expression der gesamten superfiziellen Knorpelschicht OA Knorpels humaner Femurkondylen der Gene MMP-1, -2, -9, -13 und Col6A3. (Boxplot Details siehe Abbildung 20). Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung.

Dabei war ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der relativen mRNA-Expression zwischen MMP-1 und der mRNA-Expression aller anderen getesteten Gene außer MMP-2 zu finden. Ebenso war die relative mRNA-Expression von MMP-2 zu allen anderen getesteten Genen außer MMP-1 signifikant ($p < 0,05$) geringer. Auch die relative mRNA-Expression von MMP-3 zu allen anderen getesteten Genen war signifikant ($p < 0,05$) erhöht (siehe Tabelle 18). Der große Interquartilsabstand zeigt die große Streubreite der mRNA-Expression (siehe Tabelle 17).

Insgesamt zeigt sich eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte mRNA-Expression von MMP-3 im Vergleich zu allen anderen getesteten Genen und eine signifikant ($p < 0,05$) geringere mRNA-Expression von MMP-1 und -2 im Vergleich zu allen anderen untersuchten Genen. In Anbetracht der Tatsache, dass die relative mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation stark variierten, werden diese im Folgenden gesondert betrachtet.

Tabelle 17: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, -2, -3, -9, -13 und Col6A3 des gesamten Knorpelgewebes bei OA-Knorpelimplantaten nach Implantation eines künstlichen Kniegelenks.

Gen	Statistischer Kennwert	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
Gesamt	Median	0,393	0,0167	2110	6,05	11,6	6,84
	IQR	2,35	0,227	3940	13,1	27,0	23,3
	Mittelwert	2,44	4,08	3800	24,5	27,9	30,7
	Standardfehler	0,468	1,85	423	6,83	4,80	6,83

Tabelle 18: Unterschiede der relativen mRNA-Expression der getesteten Zielgene im OA Knorpel der gesamten superfiziellen Zone humaner Femurkondylen.

Unterschiede der mRNA-Expressionen definierter Gene bei **OA Knorpel**

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
MMP-1		p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-2	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-3	x	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-9	x	x	x		
MMP-13	x	x	x	x	

Legende 10: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.2 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression von MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Betrachtet man die relative mRNA-Expression von MMP-1 in unterschiedlichen räumlichen CH-Organisationsformen, so ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, ebensowenig wenn man die räumlichen Organisationen SC und BC zu „Cluster“ zusammenfasste (siehe Tabelle 20). Es war aber ein nicht signifikanter Trend zum Anstieg der gemessenen relativen mRNA-Expression bei der Organisation D und SC zu beachten, die einen mehr als dreimal so

hohen Median aufwiesen; auch DS zeigte ein gleichwertiges großes 3. Quartil. Der Median war in der räumlichen Organisation SC am größten und bei DS am kleinsten (vergleiche Tabelle 19 und Abbildung 25).

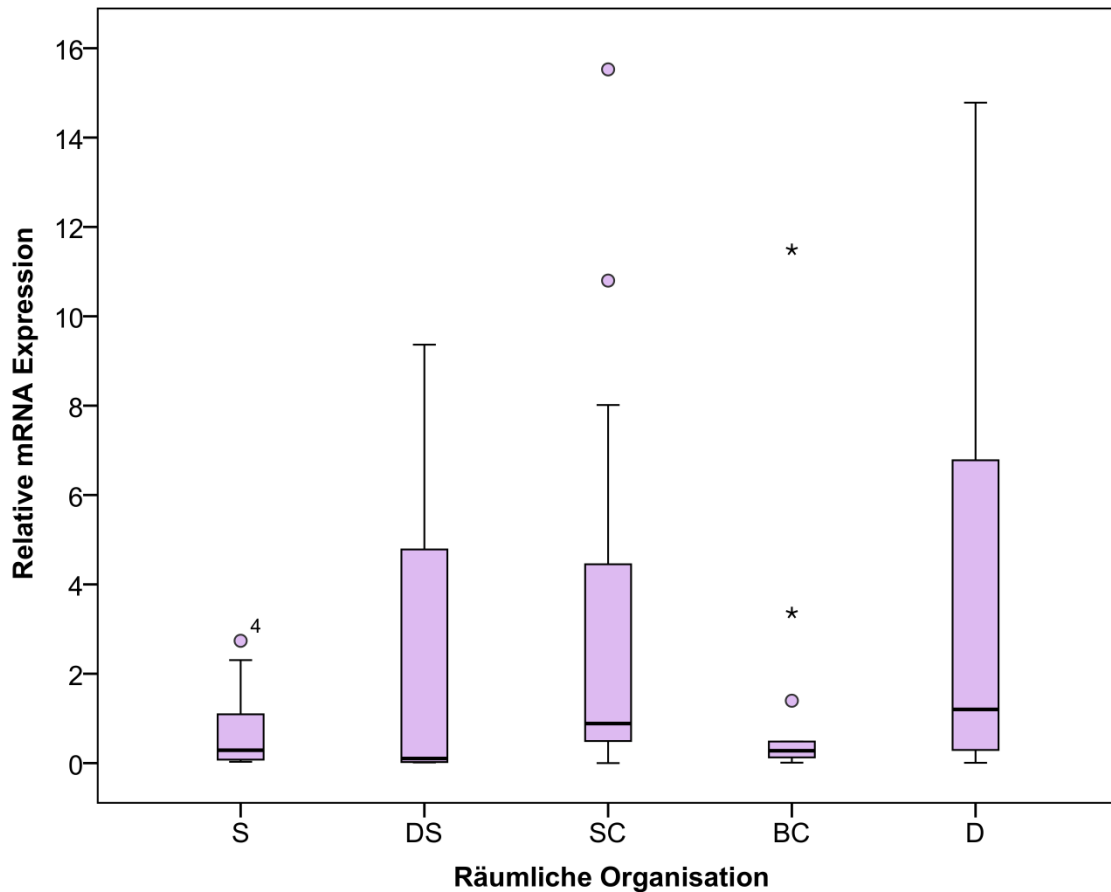


Abbildung 25: Relative mRNA-Expression von MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20)

Tabelle 19: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	S	DS	SC	BC	D	Global
MMP-1	Median	0,288	0,103	0,886	0,277	0,820	0,393
	IQR	1,01	3,64	3,96	0,355	5,78	2,35
	Mittelwert	0,721	2,30	3,33	1,41	3,96	2,44
	Standardfehler	0,249	0,897	1,22	0,878	1,31	0,468

Tabelle 20: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-1 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede der relativen mRNA-Expression von **MMP-1** bei unterschiedlicher räumlicher Organisation

	DS	SC	BC	D	Cluster (= SC+BC)
S					
DS	x				
SC	x	x			
BC	x	x	x		
D	x	x	x	x	

Legende 11: Rot = kein signifikanter Unterschied.

3.3.1.3 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression von MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Die mRNA-Expression von MMP-2 war in den Stadien S, DS, SC und BC gering, aber im diffusen Stadium signifikant höher ($p < 0,05$) als in allen anderen Organisationsformen zu finden. Verglichen mit dem Durchschnitt der Mediane der Muster S, DS, SC und BC entspricht das, trotz geringer relativer mRNA-Expression, einem enormen prozentualen Anstieg des Medians um das 294-

Fache (vergleiche Tabelle 21: relative mRNA-Expression 0,0056 versus 1,65). In der räumlichen Organisation DS war der Median dagegen am kleinsten. Fasste man SC und BC als „Cluster“ zusammen, so zeigten diese eine signifikant ($p < 0,05$) geringere mRNA-Expression als D (vergleiche Tabelle 22 und Abbildung 26).

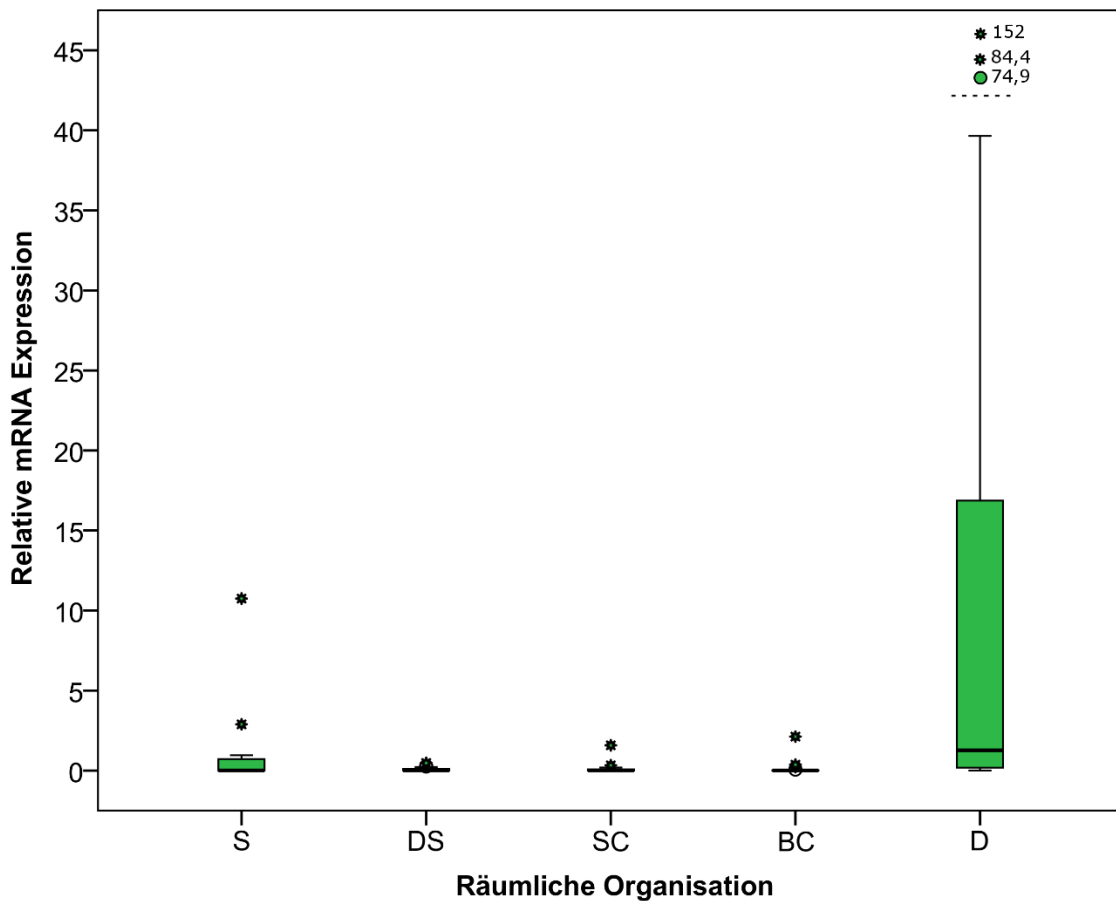


Abbildung 26: Relative mRNA-Expression von MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 21: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	S	DS	SC	BC	D	Global
MMP-2	Median	0,00827	0,00714	0,00800	0,00456	1,65	0,0167
	IQR	0,650	0,101	0,0774	0,0169	18,8	0,227
	Mittelwert	0,929	0,0875	0,127	0,121	22,2	4,08
	Standardfehler	0,601	0,0311	0,0748	0,0887	9,78	1,85

Tabelle 22: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-2 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede der relativen mRNA-Expression von **MMP-2** bei unterschiedlicher räumlicher Organisation

	DS	SC	BC	D	Cluster (= SC+BC)
S	Rot			p<0,05	Rot
DS	x	Rot		p<0,05	Rot
SC	x	x	Rot	p<0,05	x
BC	x	x	x	p<0,05	x
D	x	x	x	x	p<0,05

Legende 12: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.4 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression von MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Die mRNA-Expression von MMP-3 war im Vergleich der unterschiedlichen räumlichen Organisationsformen nicht signifikant unterschiedlich. Mit zunehmender Progression der OA gab es einen nicht signifikanten Trend zum Anstieg der mRNA-Expression, bis sie drei- bis viermal höheren Medianwerten

bei den beiden Organisationsformen der Cluster (SC und BC) annahm, verglichen mit nicht-OA Knorpel (S). Der Median war hier in der räumlichen Organisation S am kleinsten, während er bei SC am größten war. Im Zustand des komplett degenerativ veränderten Knorpels (D) gab es einen nicht signifikanten Trend zum Abfall der mRNA-Expression von MMP-3, der Median halbierte sich grob gesehen. Fasste man die räumlichen Organisationsformen SC und BC als „Cluster“ zusammen, ergab sich allerdings ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der verstärkten mRNA-Expression der Cluster und der räumlichen Organisation S und zwischen Clustern und DS (vergleiche Tabelle 23, Tabelle 25 und Abbildung 27).

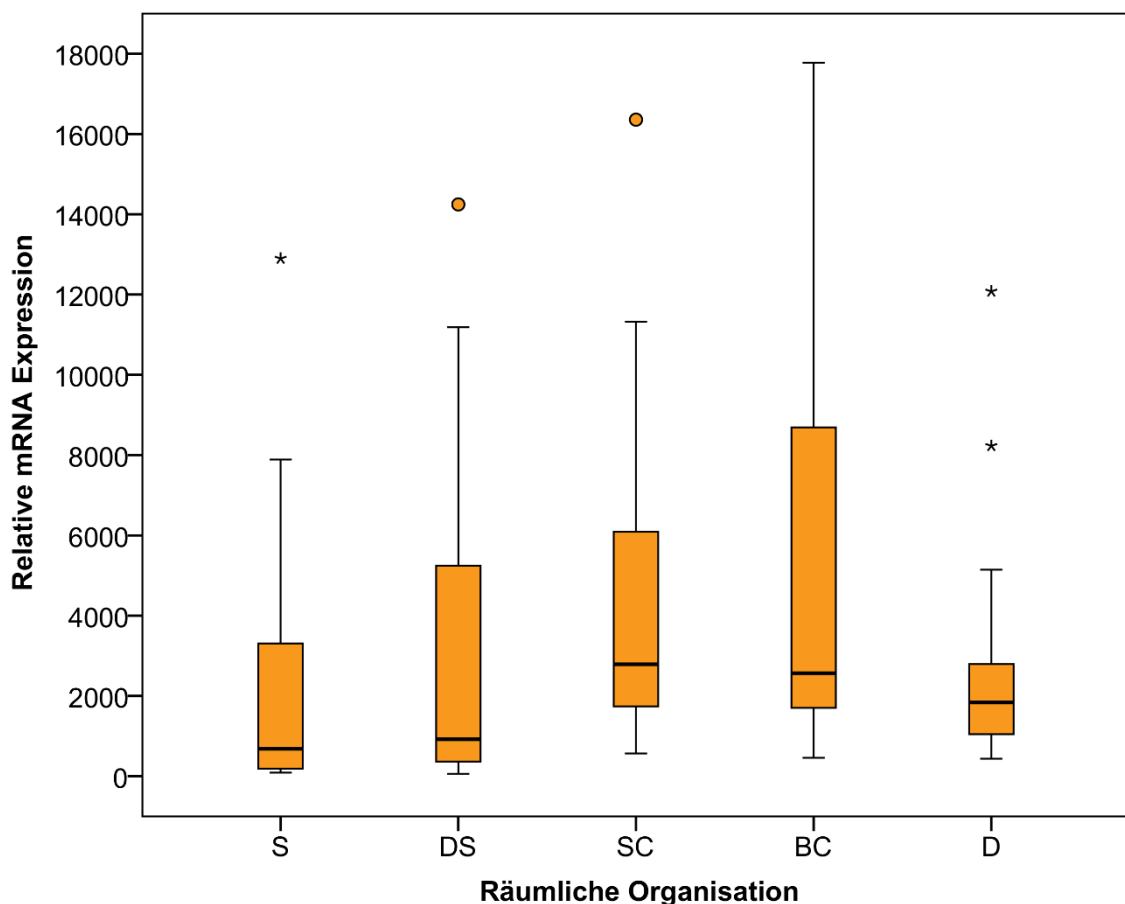


Abbildung 27: Relative mRNA-Expression von MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 23: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	S	DS	SC	BC	D	Global
MMP-3	Median	684	920	2790	2570	1840	2110
	IQR	2860	4630	4350	6990	1630	3940
	Mittelwert	2410	3010	4340	5490	2870	3700
	Standardfehler	835	802	871	1210	697	423

Tabelle 24: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede der relativen mRNA-Expression von **MMP-3** bei unterschiedlicher räumlicher Organisation

	DS	SC	BC	D	Cluster (= SC+BC)
S					p<0,05
DS	x				p<0,05
SC	x	x			x
BC	x	x	x		
D	x	x	x	x	

Legende 13: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.5 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression von MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Die relative mRNA-Expression von MMP-9 war bei S, SC und D signifikant (p<0,05) niedriger als bei der räumlichen Organisation BC. Hier war der Median am größten, wohingegen er bei der räumlichen Organisation SC am geringsten war. Weiterhin war der Unterschied der mRNA-Expression von MMP-9 in der

räumlichen Anordnung SC im Vergleich zu DS signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Fasste man SC und BC zusammen, so ergab sich kein signifikanter Unterschied (siehe Tabelle 25, Tabelle 26 und Abbildung 28).

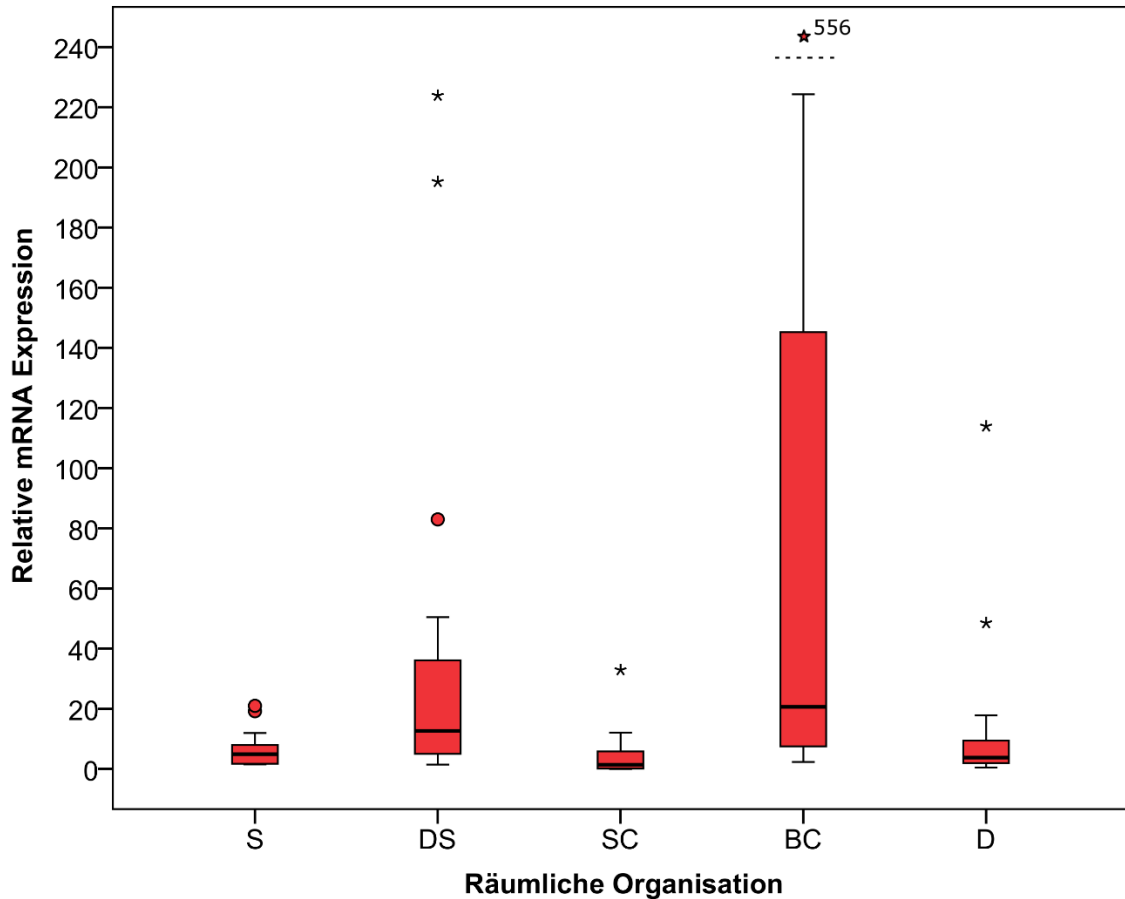


Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 25: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	S	DS	SC	BC	D	Global
MMP-9	Median	4,89	9,03	1,39	18,5	3,76	6,05
	IQR	6,26	25,5	5,73	56,3	7,37	13,1
	Mittelwert	6,56	19,1	4,37	75,5	12,4	24,5
	Standardfehler	1,47	5,03	1,64	28,4	5,85	6,83

Tabelle 26: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-9 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede der relativen mRNA-Expression von **MMP-9** bei unterschiedlicher räumlicher Organisation

	DS	SC	BC	D	Cluster (= SC+BC)
S			p<0,05		
DS	x	p<0,05			
SC	x	x	p<0,05		x
BC	x	x	x	p<0,05	x
D	x	x	x	x	

Legende 14: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.6 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression von MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Die mRNA-Expression von MMP-13 ergab signifikante Unterschiede (p<0,05) zwischen der räumlichen Organisation S und DS, SC und D. Dabei war vom Median der räumlichen Organisation S zu dem der Formen DS, SC und D ein relativer Anstieg um ca. das fünfzehnfache zu verzeichnen. Der Median der

mRNA-Expression war bei der räumlichen Organisation S am kleinsten, während er bei SC am größten war. Das Muster BC zeigte keinen signifikanten Unterschied der mRNA-Expression zu anderen Organisationsformen. Fasste man SC und BC als Cluster zusammen, war die mRNA-Expression signifikant ($p < 0,05$) höher als bei S (vergleiche Abbildung 29, Tabelle 28 und Tabelle 27).

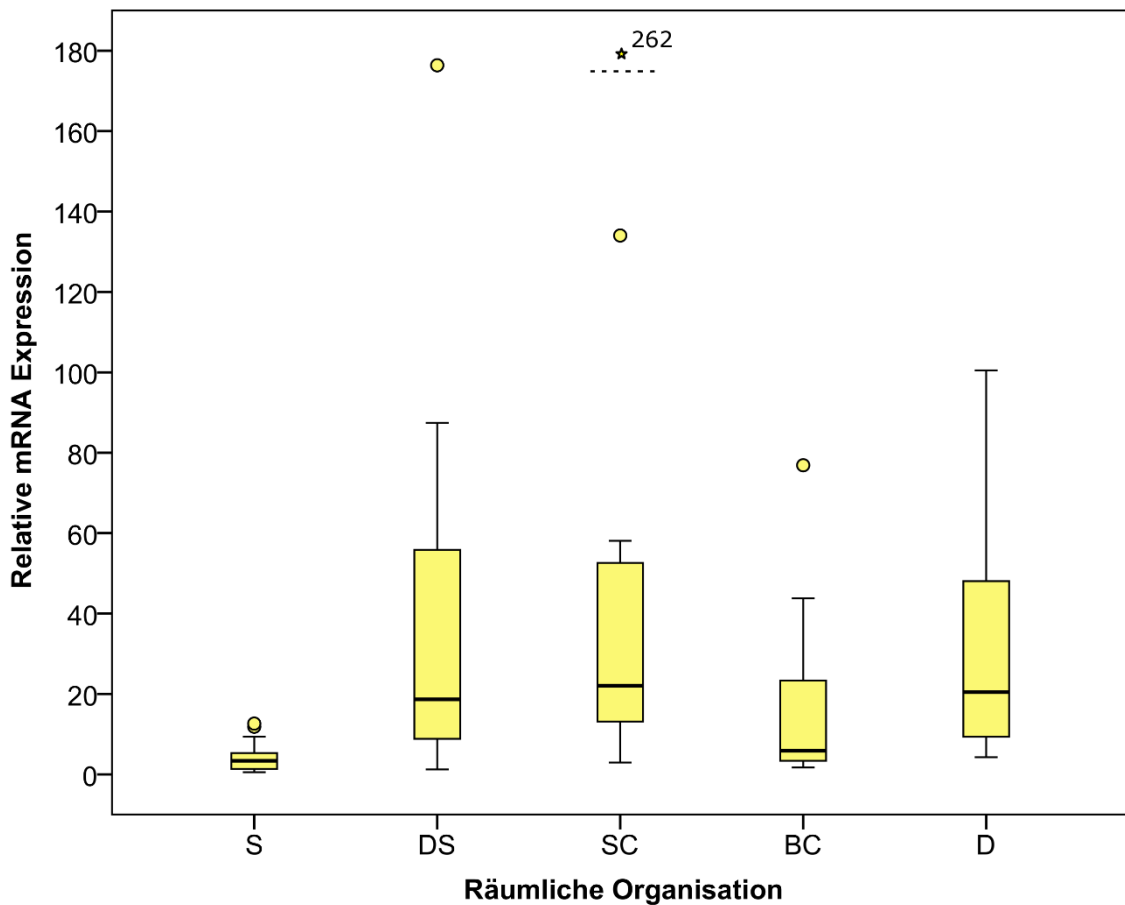


Abbildung 29: Relative mRNA-Expression von MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Außerer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 27: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	S	DS	SC	BC	D	Global
MMP-13	Median	3,37	18,7	22,1	5,90	20,5	11,6
	IQR	3,71	47,0	33,9	16,7	37,0	27,0
	Mittelwert	4,58	34,8	48,1	16,9	32,3	27,9
	Standardfehler	1,07	10,7	18,8	5,97	7,33	4,80

Tabelle 28: Unterschiede der mRNA-Expression von MMP-13 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede der relativen mRNA-Expression von **MMP-13** bei unterschiedlicher räumlicher Organisation

	DS	SC	BC	D	Cluster (= SC+BC)
S	p<0,05	p<0,05		p<0,05	p<0,05
DS	x				
SC	x	x			x
BC	x	x	x		x
D	x	x	x	x	

Legende 15: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.7 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression von Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Die Organisationsform S zeigte die geringste relative mRNA-Expression der α 3-Kette von Kollagen Typ VI, während D die Höchste aufwies. Diese Unterschiede der relativen mRNA-Expression zwischen S und BC waren signifikant (p<0,05), mit einem fast 40-fach höhere Medianwert von BC im

Vergleich zu S. Ebenso zeigte S zu D mit einem fast 125-fach höheren Median einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied. Fasste man SC und BC als Cluster zusammen, so hatten auch sie im Vergleich zu S eine signifikant ($p < 0,05$) höhere mRNA-Expression. Dabei zeigte auch DS jeweils zu S und zu D bei der Auswertung der normalisierten Datenwerte einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied, sowie D zu SC und BC als Cluster zusammengefasst. Diese Unterschiede waren bei der Auswertung mit den Rohwerten nicht zu finden. Obwohl die räumliche Organisation D mit dem größten Median, einen Trend zur wesentlich höheren relative mRNA-Expression aufwies als DS, SC oder BC ließ sich kein signifikanter Unterschied dazu finden. Ebenso nicht signifikant verhielten sich die Unterschiede zwischen der Organisation BC zu der tendenziell geringeren relativen mRNA-Expression von DS und SC (vergleiche Abbildung 30, Tabelle 29 und Tabelle 30).

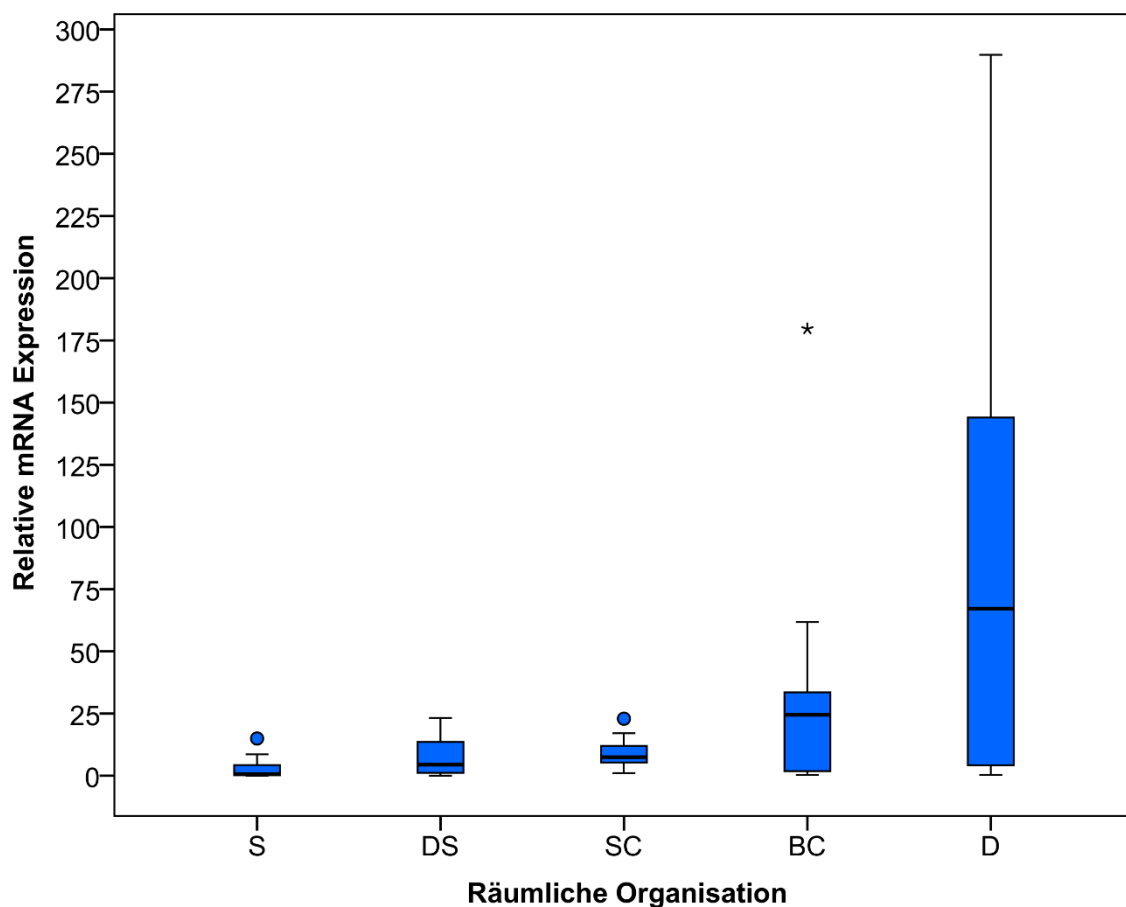


Abbildung 30: Relative mRNA-Expression von Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation von Chondrozyten superfiziellen Gelenkknorpels aus humanen Femurkondylen. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 29: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression des Gens Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation.

Gen	Statistischer Kennwert	S	DS	SC	BC	D	Global
Col6A3	Median	0,657	4,46	7,44	24,5	67,1	6,84
	IQR	4,10	11,0	6,71	31,7	132	23,3
	Mittelwert	2,78	7,19	8,84	30,3	90,6	30,7
	Standardfehler	1,08	2,07	1,50	10,6	23,2	6,83

Tabelle 30: Unterschiede der mRNA-Expression von Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede der relativen mRNA-Expression von **Col6A3** bei unterschiedlicher räumlicher Organisation

	DS	SC	BC	D	Cluster (= SC+BC)
S	p<0,05		p<0,05	p<0,05	p<0,05
DS	x			p<0,05	
SC	x	x			x
BC	x	x	x		x
D	x	x	x	x	p<0,05

Legende 16: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05), Blau = signifikanter Unterschied (p<0,05) nur für normalisierte Datenwerte bei der Auswertung mit SC und BC als Cluster zusammengefasst.

Bis hierhin wurde nur jeweils ein bestimmtes Gen auf das Verhalten seiner mRNA-Expression zwischen den verschiedenen räumlichen Organisationen verglichen, welche die aufeinanderfolgenden Schritte der OA-Progression darstellen. Im Folgenden wird nun jede Organisationsform für sich auf signifikante Unterschiede der mRNA-Expression aller gemessenen Zielgene untersucht. Generell war die mRNA von MMP-3 so stark in jeder

Organisationsform exprimiert, dass es die anderen Gene bei Weitem überragte. Es ergaben sich Werte im Bereich 102-104. Aus diesen Gründen ist dieses Gen in den folgenden Abbildungen graphisch mit eigener Y-Achse als separater Teil des Diagramms dargestellt, da die Werte der anderen untersuchten Gene sonst kaum optisch zu erkennen wären.

3.3.1.8 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene der räumlichen Organisation S superfizieller Chondrozyten

In der räumlichen Organisation S wurde die mRNA von MMP-3 signifikant höher ($p < 0,05$) als die aller anderen untersuchten Gene exprimiert. Auch MMP-9, mit dem zweitgrößten Medianwert, wies eine relativ hohe mRNA-Expression auf, welche signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zu MMP-2 und MMP-1 war. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der relativen mRNA-Expression von MMP13 und MMP-2 ($p < 0,05$). MMP-2 zeigte die geringste mRNA-Expression der räumlichen Organisation S. Die mRNA-Expression von Col6A3 war nicht signifikant unterschiedlich zu der mRNA-Expression anderer Gene (Tabelle 31, Tabelle 32 und Abbildung 31).

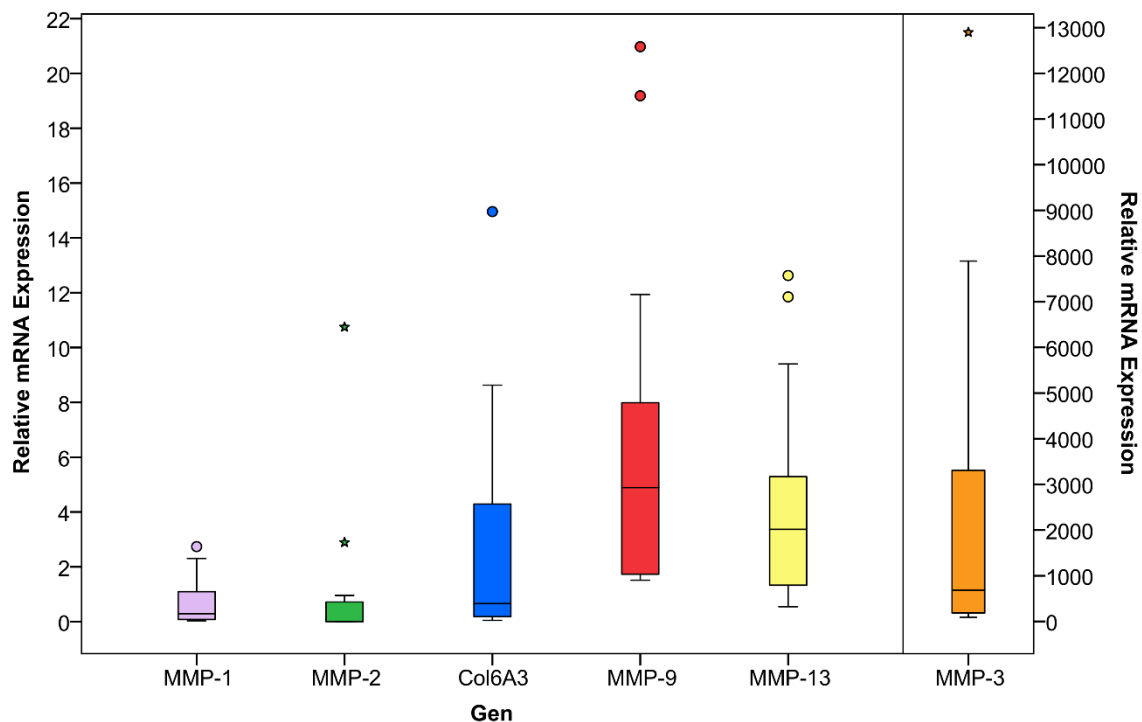


Abbildung 31: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation S superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 31: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Strings.

Gen	Statistischer Kennwert	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
S	Median	0,288	0,00827	684	4,89	3,37	0,657
	IQR	1,01	0,650	2860	6,26	3,71	4,10
	Mittelwert	0,721	0,929	2410	6,56	4,58	2,78
	Standardfehler	0,249	0,601	835	1,47	1,07	1,08

Tabelle 32: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Strings superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede verschiedener relativer mRNA-Expressionen beim räumlichen Organisationsmuster **S**

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
MMP-1		p<0,05	p<0,05		
MMP-2	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05	
MMP-3	x	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-9	x	x	x		
MMP-13	x	x	x	x	

Legende 17: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.9 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene der räumlichen Organisation DS superfizieller Chondrozyten

In der räumlichen Organisation DS wurde die mRNA von MMP-3 signifikant höher (p<0,05) als die aller anderen untersuchten Gene exprimiert. MMP-9 zeigte die zweitgrößte mRNA-Expression der räumlichen Organisation DS, während MMP-2 die Geringste aufwies.

Die räumliche Organisation DS zeigte außerdem eine signifikant (p<0,05) verstärkte mRNA-Expression von MMP-9, -13 und Col6A3 im Vergleich zu MMP-2. MMP-1 wies auch eine geringe relative mRNA-Expression auf, zeigte jedoch nur zu MMP-13 einen signifikanten (p<0,05) Unterschied (siehe Tabelle 33, Tabelle 34 und Abbildung 32).

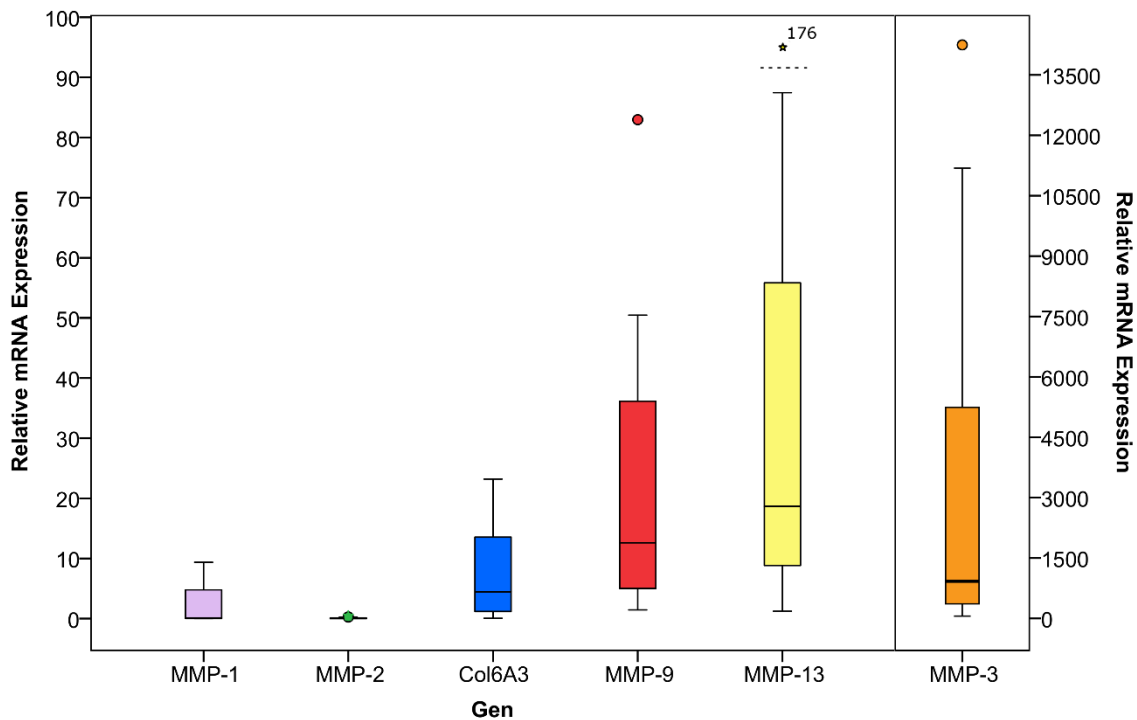


Abbildung 32: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation DS superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 33: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Double Strings.

Gen	Statistischer Kennwert	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
DS	Median	0,103	0,00714	920	9,03	18,7	4,46
	IQR	3,64	0,101	4630	25,5	47,0	11,0
	Mittelwert	2,30	0,0875	3010	19,1	34,8	7,19
	Standardfehler	0,897	0,0311	802	5,03	10,7	2,07

Tabelle 34: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Double Strings superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede verschiedener relativer mRNA-Expressionen beim räumlichen Organisationsmuster **DS**

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
MMP-1		p<0,05		p<0,05	
MMP-2	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-3	x	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-9	x	x	x		
MMP-13	x	x	x	x	

Legende 18: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.10 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene der räumlichen Organisation SC superfizieller Chondrozyten

In der räumlichen Organisation SC wurde die mRNA von MMP-3 signifikant höher (p<0,05) als die aller anderen untersuchten Gene außer MMP-13 exprimiert, welche nach MMP-3 die höchste mRNA-Expression zeigt. Die MMP-13 mRNA-Expression war signifikant (p<0,05) höher als die von MMP-2 und -9. Die mRNA-Expression von MMP-2 war die niedrigste mRNA-Expression und war im Vergleich zu MMP-3, -13 und Col6A3 signifikant (p<0,05) unterschiedlich (siehe Tabelle 35, Tabelle 36 und Abbildung 33).

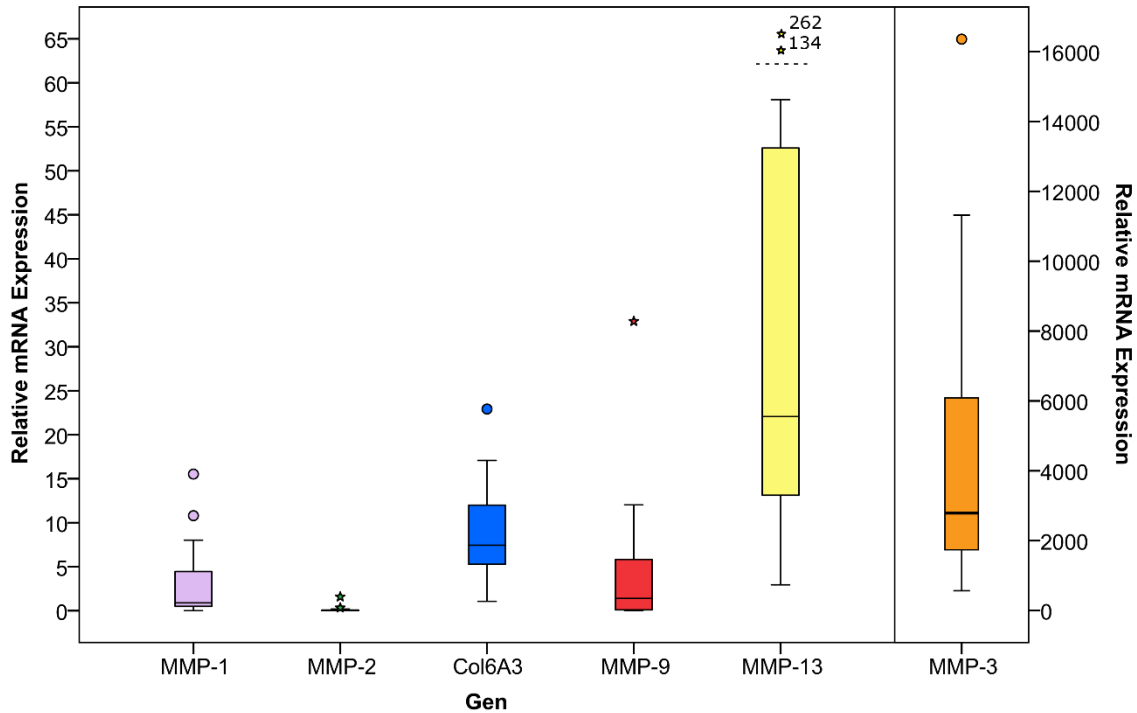


Abbildung 33: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation SC superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen -eparat rechts mit eigener Y-Achse. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 35: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Small Clustern.

Gen	Statistischer Kennwert	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
SC	Median	0,886	0,00800	2790	1,39	22,1	7,44
	IQR	3,96	0,0774	4350	5,73	33,9	6,71
	Mittelwert	3,33	0,127	4340	4,37	48,1	8,84
	Standardfehler	1,22	0,0748	871	1,64	18,8	1,50

Tabelle 36: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Small Cluster superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede verschiedener relativer mRNA-Expressionen beim räumlichen Organisationsmuster **SC**

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
MMP-1		p<0,05			
MMP-2	x	p<0,05		p<0,05	p<0,05
MMP-3	x	x	p<0,05		p<0,05
MMP-9	x	x	x	p<0,05	
MMP-13	x	x	x	x	

Legende 19: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.11 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene der räumlichen Organisation BC superfizieller Chondrozyten

In der räumlichen Organisation BC wurde die mRNA von MMP-3 signifikant höher (p<0,05) als die aller anderen untersuchten Gene exprimiert. MMP-9 zeigte die zweigrößte mRNA-Expression, während MMP-2 die Geringste aufwies. Es zeigte sich eine signifikant (p<0,05) höhere mRNA-Expression von MMP-9 als von MMP-2 und MMP-1. Weiterhin war die relative mRNA-Expression von MMP-13 und Col6A3 signifikant (p<0,05) höher als die von MMP-2 (siehe Abbildung 34, Tabelle 37 und Tabelle 38).

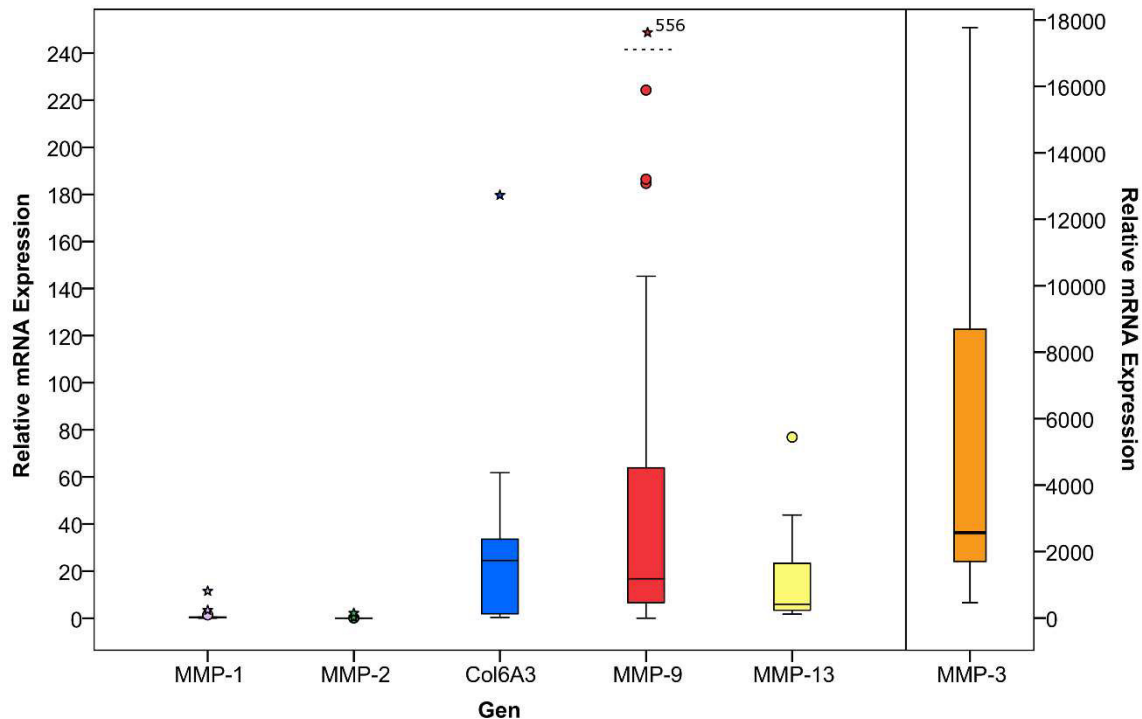


Abbildung 34: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation BC superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der mRNA-Expression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Außreißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 37: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Big Cluster.

Gen	Statistischer Kennwert	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
BC	Median	0,277	0,00456	2570	18,5	5,90	24,5
	IQR	0,355	0,0169	6990	56,3	16,7	31,7
	Mittelwert	1,41	0,121	5490	75,5	16,9	30,3
	Standardfehler	0,878	0,0887	1210	28,4	5,97	10,5

Tabelle 38: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Big Cluster superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede verschiedener relativer mRNA-Expressionen beim räumlichen Organisationsmuster **BC**

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
MMP-1		p<0,05	p<0,05		
MMP-2	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-3	x	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-9	x	x	x		
MMP-13	x	x	x	x	

Legende 20: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.12 Statistische Analyse der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene der räumlichen Organisation D superfizieller Chondrozyten

In der räumlichen Organisation D wurde die mRNA von MMP-3 signifikant höher (p<0,05) als die aller anderen untersuchten Gene exprimiert. Die geringste mRNA-Expression zeigte MMP-1, welche signifikant (p<0,05) geringer war zu der mRNA-Expression von MMP-3, MMP-13 und Col6A3. Letztere zeigte die zweithöchste mRNA-Expression nach MMP-3 (vergleiche Tabelle 40, Tabelle 39 und Abbildung 35).

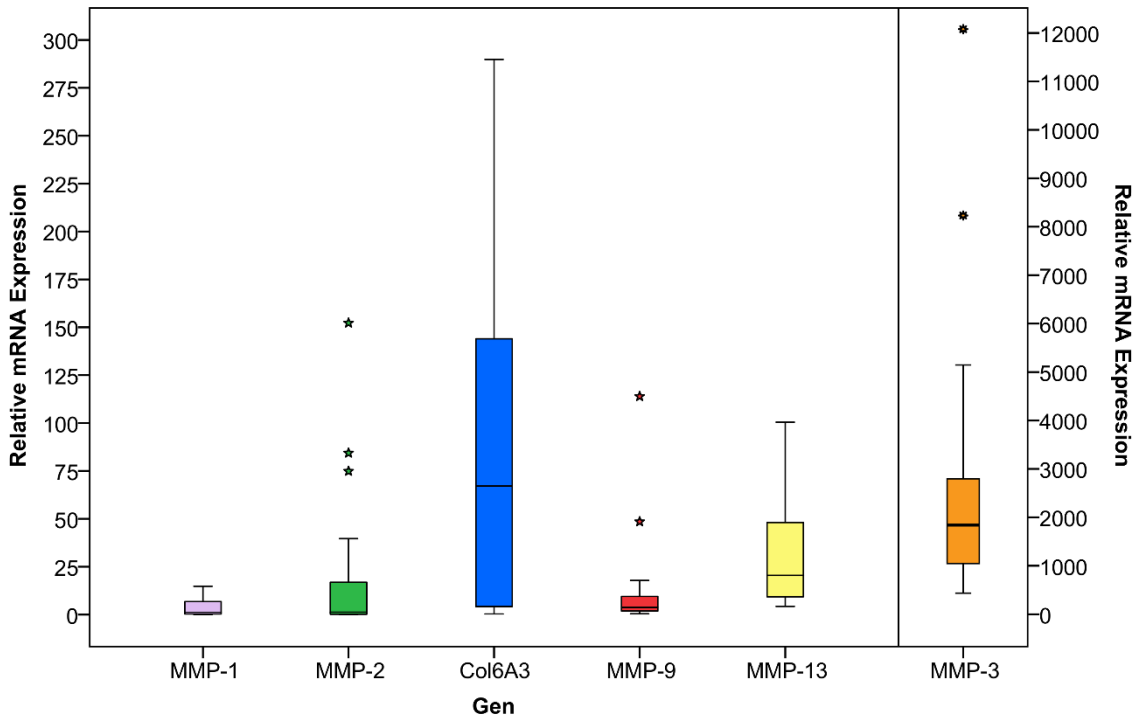


Abbildung 35: Relative mRNA-Expression der räumlichen Organisation D superfizieller CHs in humanen Femurkondylen in Abhängigkeit der Genexpression von MMP-1, -2, -9, -13, Col6A3 und MMP-3. Letzteres der Übersicht wegen separat rechts mit eigener Y-Achse. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Tabelle 39: Median und IQR, als Eigenschaften der statistischen Beschreibung, der normalisierten Werte der Messungen zur relativen mRNA-Expression der bestimmten Zielgene in der räumlichen Organisation Diffus.

Gen	Statistischer Kennwert	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
D	Median	0,820	1,65	1840	3,76	20,5	67,1
	IQR	5,78	18,8	1630	7,37	37,0	132
	Mittelwert	3,96	22,26	2870	12,4	32,3	90,6
	Standardfehler	1,31	9,78	697	5,85	7,33	23,2

Tabelle 40: Unterschiede der mRNA-Expression der untersuchten Gene im der räumlichen Organisationsform Diffus superfizieller CHs humaner Femurkondylen.

Unterschiede verschiedener relativer mRNA-Expressionen beim räumlichen Organisationsmuster **D**

	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13	Col6A3
MMP-1		p<0,05		p<0,05	p<0,05
MMP-2	x	p<0,05			
MMP-3	x	x	p<0,05	p<0,05	p<0,05
MMP-9	x	x	x		
MMP-13	x	x	x	x	

Legende 21: Rot = kein signifikanter Unterschied; Grün = signifikanter Unterschied (p<0,05).

3.3.1.13 Gesamtübersicht im Vergleich der relativen mRNA-Expression der Gene MMP-1, -2, -3, -9, -13 und Col6A3 in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten

Betrachtet man jede räumliche Organisation als definiertes morphologisches Stadium der OA, ergaben sich signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression der verschiedenen getesteten Gene zwischen den unterschiedlichen Organisationsstadien und somit zwischen definierten morphologischen Stadien der OA. Es zeichnete sich allerdings kein Bild einiger stetigen Zu- oder Abnahme der Expression der unterschiedlichen MMPs ab – anders als Col6A3 – sondern charakteristische Expressionsmuster in den einzelnen Stadien. Es wurde besonders MMP-13 in einem frühen Organisationsstadium vermehrt exprimiert, zusammen mit MMP-9. Die mRNA-Expression von MMP-2 ist im Vergleich zu den anderen getesteten MMPs die geringste. Zur Übersicht der relativen mRNA-Expression der untersuchten Zielgene in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen siehe Abbildung 36.

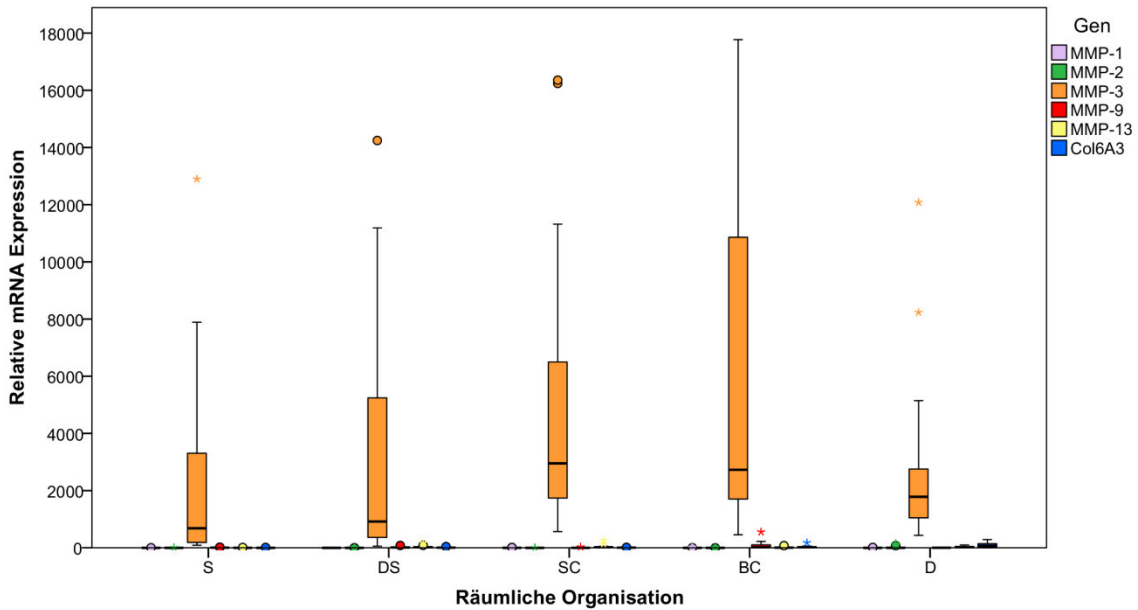


Abbildung 36: Relative mRNA-Expression superfizieller CHs humaner Femurkondylen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation der Gene MMP-1 (jeweils links; lila), MMP-2 (jeweils 2. von links; grün), MMP-3 (jeweils mittig links; orange), MMP-9 (jeweils mittig rechts; rot), MMP-13 (jeweils 2. von rechts; gelb) und Col6A3 (jeweils rechts; blau). Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

Die mRNA-Expression von MMP-3 war dabei stets fast immer signifikant ($p < 0,05$) in deutlich größerem Umfang zu detektieren, wie die aller anderen gemessenen Gene (siehe siehe 3.3.1.1 - 3.3.1.12). Die relative mRNA-Expression von MMP-3 lag im Tausenderbereich, während die der anderen Gene meist im Zahlenbereich < 100 lag (vergleiche Abbildung 36).

Im Allgemeinen war die relativ gemessene mRNA-Expression von MMP-1 gesamt gesehen deutlich und zum Teil signifikant ($p < 0,05$) geringer als alle anderen gemessenen Gene. Sie lag mit wenigen Ausreißern im Zahlenbereich < 1 (siehe 3.3.1.1 - 3.3.1.12). Ähnlich verhielt sich die mRNA-Expression von MMP-2, welche sich bei den räumlichen Organisationen S, DS; SC; und BC i.d.R im Zahlenbereich $< 0,01$ bewegte und damit gesamt gesehen deutlich und meist signifikant ($p < 0,05$) geringer war, als die aller anderen gemessenen Gene (siehe 3.3.1.1 - 3.3.1.12).

Die mRNA-Expression von Col6A3 nahm als einzige mit fortschreitender Progression der OA stetig im Wert signifikant ($p < 0,05$) zu (siehe 3.3.1.1 - 3.3.1.12).

Die mRNA-Expression von MMP-13 war signifikant ($p < 0,05$) am geringsten bei der räumlichen Organisation S zu finden, auch die mRNA-Expression von MMP-9 war hier signifikant ($p < 0,05$) gering ausgeprägt. Während die mRNA-Expression von MMP-13 bei den verbleibenden räumlichen Organisationsformen DS, SC und D signifikant ($p < 0,05$) erhöht war, zeigte MMP-9 zwar bei DS eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der mRNA-Expression, nicht aber bei SC und D. Bei BC hingegen waren signifikant ($p < 0,05$) große Mengen an MMP-9 mRNA zu finden, während MMP-13 eine Tendenz zur geringeren mRNA-Expression zeigte.

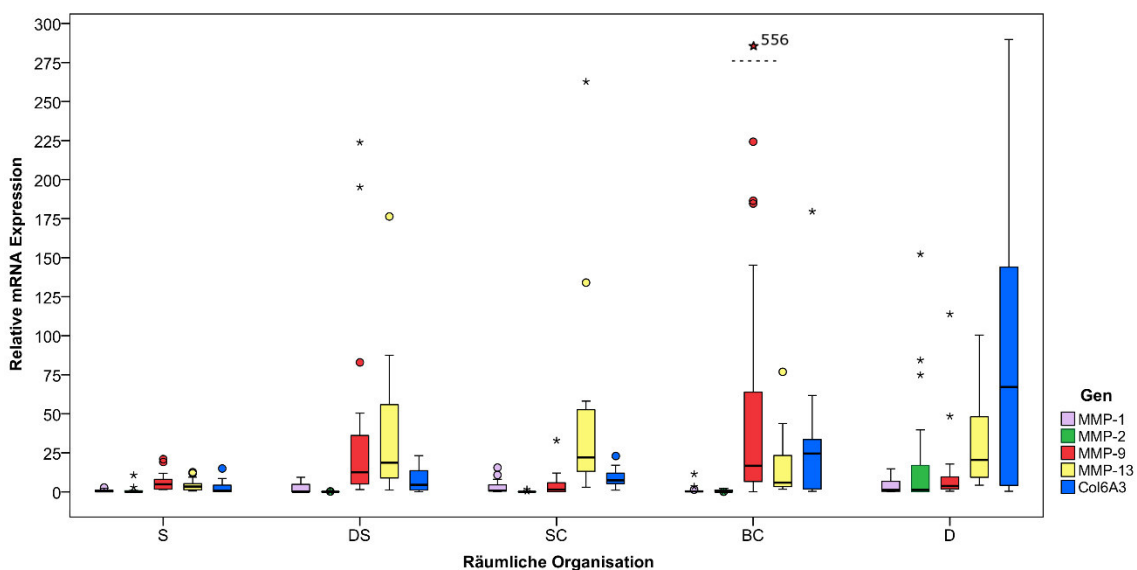


Abbildung 37: Relative mRNA-Expression superfizieller CHs humaner Femurkondylen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation der Gene MMP-1 (jeweils links; lila), MMP-2 (jeweils 2. Von links; grün), MMP-9 (jeweils in der Mitte; rot), MMP-13 (jeweils 2. Von rechts; gelb) und Col6A3 (jeweils rechts; blau). Außereißer, die aus Übersichtsgründen nicht in die Abbildung passen, sind mit ihrem Zahlenwert oberhalb einer gestrichelten Linie dargestellt. MMP-3 ist aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. Eigene Abbildung. (Boxplot Details siehe Abbildung 20).

3.4 Autofluoreszenzversuche und Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen durch Fluoreszenzmarkierung von Kollagen Typ VI α 3 durch Antikörper

3.4.1 Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen durch grüne Fluoreszenzmarkierung von Kollagen Typ VI α 3

Um einen Zusammenhang der mRNA-Expression der hier untersuchten, MMPs mit dem Vorhandensein von Kollagen Typ VI in der PZM überprüfen zu können, wurden Versuche zur Darstellung der PZM durch die Markierung von Kollagen Typ VI mittels fluoreszierender Antikörper durchgeführt. Hierbei erkennt man die PZM als einen dünnen Saum um jede Zelle (siehe Abbildung 38).

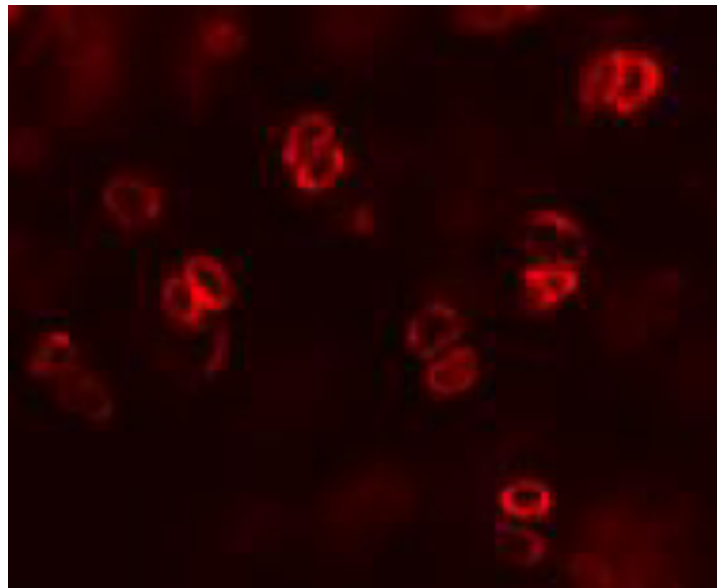


Abbildung 38: Immunhistochemische Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen an Kryotomschnitten von 50 μ m Dicke, durch Markierung von Col6A3 mit rot fluoreszierenden Antikörperkomplexen. Eigene Abbildung.

Beim Versuch Col6A3 immunhistochemisch mit grüner Fluoreszenz darzustellen fiel auf, dass die Negativkontrolle oft ähnlich aussah wie das durch grün fluoreszierende Antikörper markierte Gewebe. Es ließ sich bei einigen

Negativkontrollen und auch Nativaufnahmen eine Struktur darstellen, die von der durch Col6A3 markierten PZM nicht zu unterscheiden war (vergleiche Abbildung 39 -Abbildung 42).

Es wiesen allerdings nicht alle Kryotomschnitte ein solches Phänomen auf. Betrachtete man die Schnitte derselben Disk, d. h. das Gewebe eines Patienten derselben Lokalisation in unterschiedlicher Schichttiefe, zeigte sich i. d. R. bei einigen Schnitten eine Autofluoreszenz, bei anderen allerdings nicht. Auch die durch Antikörper markierte PZM zeigte nicht in jedem Schnitt ein gleiches Signal.

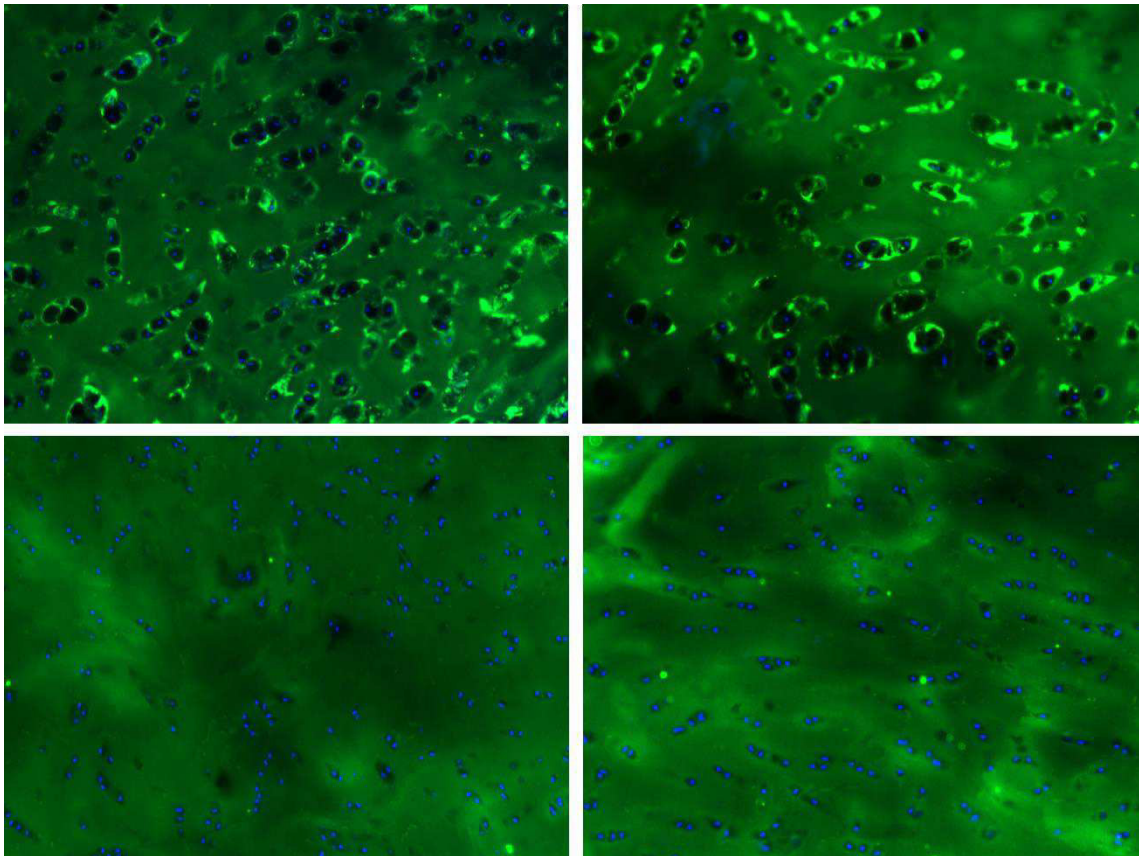


Abbildung 39: Immunhistochemische Darstellung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen an Kryotomschnitten von 50µm Dicke, durch Markierung von Col6A3 mit grün fluoreszierenden Antikörperkomplexen. Linke Seite Positivkontrollen mit fluoreszierendem Antikörperkomplex – rechte Seite Negativkontrollen ohne selektiven Antikörper gegen Col6A3. Es handelt sich jeweils um die gleiche Schnittserie, die in identischem Vorgang markiert wurde. Eigene Abbildung.

Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden verschiedene mögliche Einflussfaktoren auf eine Autofluoreszenz genauer betrachtet. Die Fixierung in

Formaldehyd als mögliche Ursache für autofluoreszierende, unspezifische Querverbindungen wurde im Vergleich mit unfixiertem Gewebe betrachtet. Dabei wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, Kryotomschnitte angefertigt, allerdings wurde bei der Hälfte der Schnitte der Schritt der Fixierung in 4% Formaldehyd ausgelassen, und die Kryotomschnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Beispielhafte Bilder sind in Abbildung 40 dargestellt. Man erkennt in beiden Fällen eine grün fluoreszierende PZM-ähnliche Struktur, obwohl in beiden Fällen keine Markierung vom Col6A3 der PZM mit fluoreszierenden Antikörperkomplexen vorgenommen wurde. Deshalb kann man annehmen, dass die Fixierung keinen wesentlichen Einfluss auf das Phänomen der endogenen Fluoreszenz ausübt (Siehe Abbildung 40).

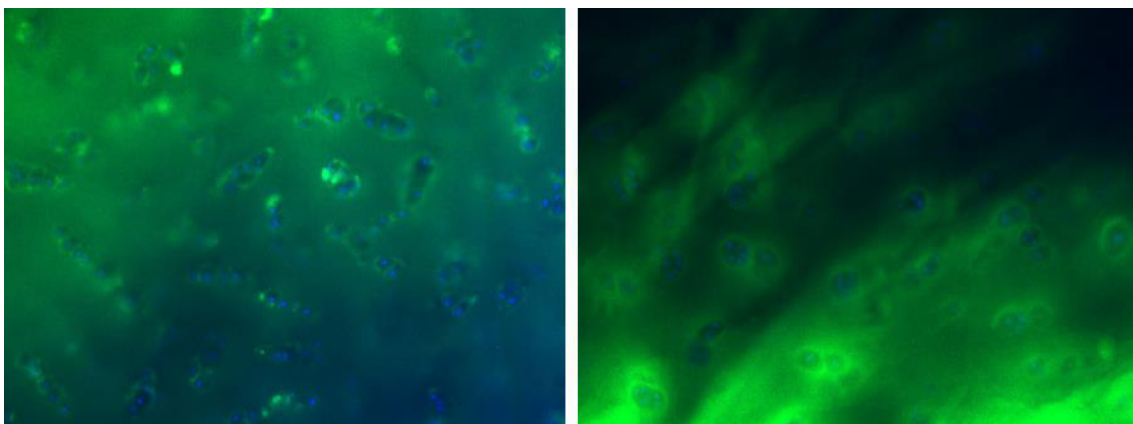


Abbildung 40: Native Kryotomschnitte superfiziellen Gelenkknorpels humaner Femurkondylen an Kryotomschnitten von 50 μ m Dicke, mit vorherigen Resten einer DAPI-Färbung der Zellkerne. Knorpelschnitte mit 4% Formaldehyd fixiert (links) und unfixiert nur in PBS gewaschen (rechts). Eigene Abbildung.

Um einen Einfluss der Lichtquelle auf das beobachtete Phänomen auszuschließen, wurden Kryotomschnitte, wie in Material und Methoden beschrieben, mit unterschiedlichen Lichtquellen untersucht. Dies ist in Abbildung 41 dargestellt. Man sieht den gleichen Gewebssausschnitt einmal mit einer LED und einmal mit einer Halogenlampe aufgenommen. Die Bilder unterscheiden sich nur durch die Signalintensität der Strukturen. Es ist zu berücksichtigen, dass die LED-Lampe grundsätzlich eine größere Lichtintensität aufweist als die Halogenlampe. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die

Lichtquelle (LED oder Halogen) keinen Effekt auf das Phänomen der Autofluoreszenz hatte.

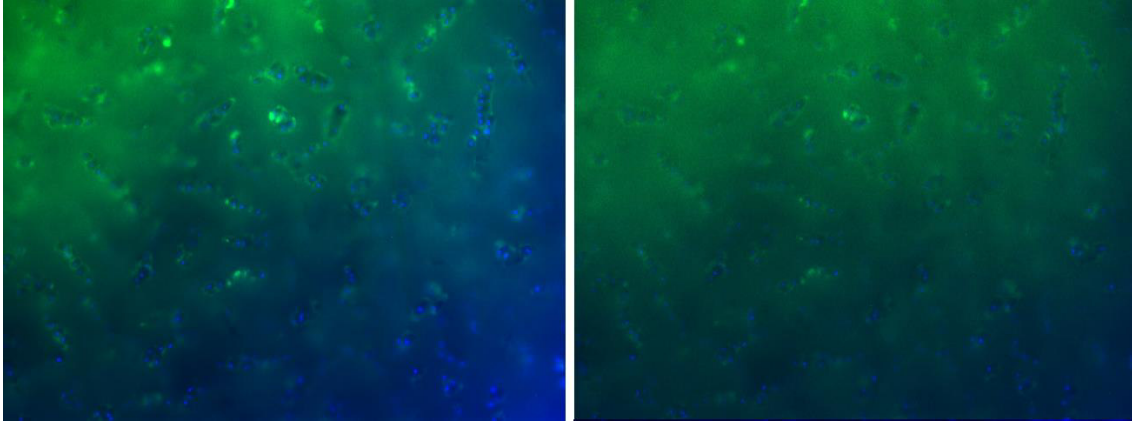


Abbildung 41: Mikroskopische Darstellung superfizieller humaner CHs von Femurkondylen an fixierten, nativen Kryotomschnitten von 50 μ m Dicke. Es ist jeweils der exakt gleiche Bildausschnitt mit Belichtung im grünen (470nm Wellenlänge) und blauen Spektralbereich (356nm Wellenlänge) zu sehen ohne Markierung einer PZM-Struktur durch fluoreszierende Antikörper. Einmal mit Aufnahme bei Belichtung mit einer Halogenlampe rechts oder einer LED Lichtquelle links, wobei die Belichtungszeit mit 2 jeweils gleich ist. Eigene Abbildung.

Anschließend wurden bei der Darstellung von Col6A3 mittels fluoreszierenden Antikörperkomplexen mit BSA unspezifische Bindungen blockiert, um eine mögliche unspezifische Signalwiedergabe zu vermeiden. Hier war das gleiche Phänomen der zum Teil vorhandenen Autofluoreszenz einer PZM-artigen Struktur zu sehen, die sich unabhängig vom Versuchsaufbau und der Blockade mit BSA zeigte (siehe Abbildung 42). Die Blockade unspezifischer Bindungen mit BSA hatte demnach keinen relevanten Effekt auf die Autofluoreszenz; ein unspezifisches Binden von fluoreszierenden Antikörperkomplexen lässt sich wahrscheinlich ausschließen.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass weder die Fixierung mit Formaldehyd, eine Blockierung unspezifischer Bindungen von Antikörperkomplexen, noch die Wahl der Lichtquelle einen ausschlaggebenden Effekt auf die Autofluoreszenz des Knorpelgewebes hat und somit grün-fluoreszierende Farbstoffe nicht verwendet werden sollten.

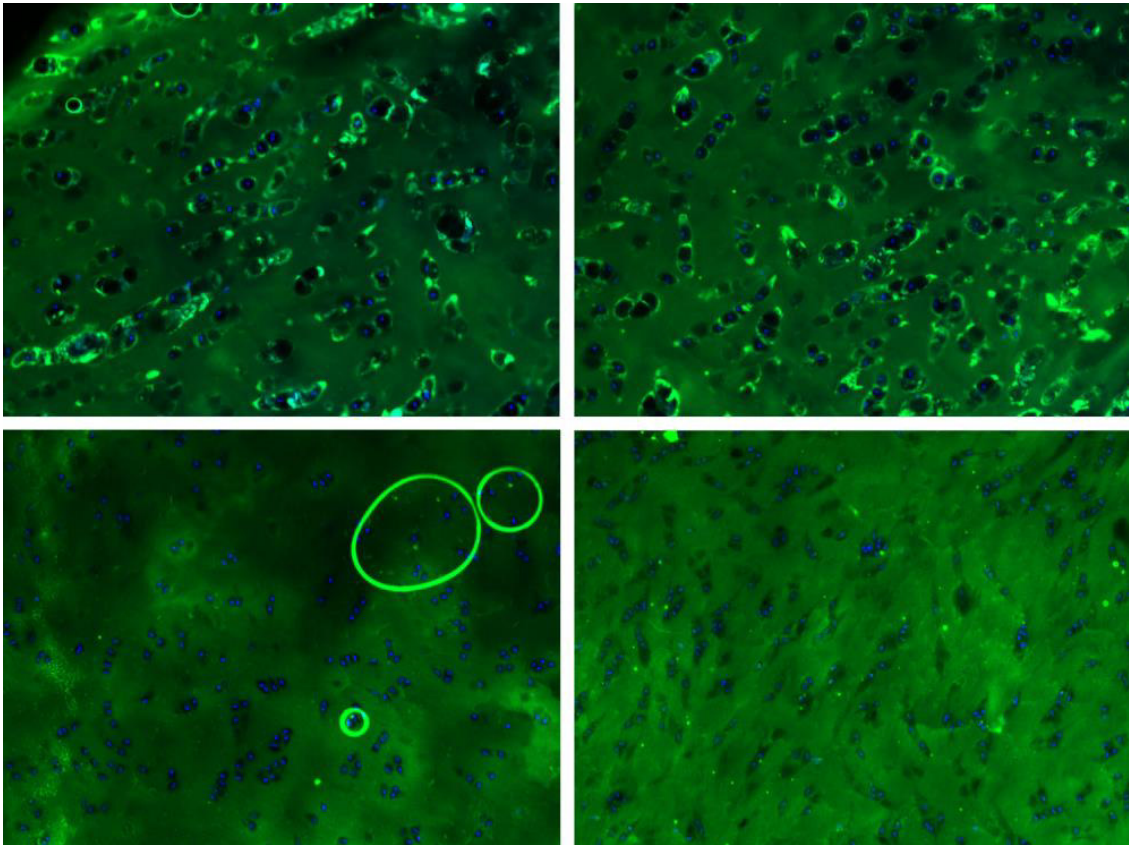


Abbildung 42: Markierung der PZM superfizieller CHs humaner Femurkondylen mittels grün fluoreszierendem Antikörperkomplex gegen Col6A3 an Kryotomschnitten von 50µm Dicke. Links: Zugabe der Antikörper gegen Col6A3 nach Blockade unspezifischer Bindungen mit 2% BSA – Rechts: ohne Blockade unspezifischer Bindungen im Prozess des Anfärbens durch Antikörperbindung. Eigene Abbildung.

Weiterhin ließ sich feststellen, dass der endogen grün fluoreszierende Stoff einen Teil der PZM bildet und sich ähnlich wie Kollagen Typ VI in fortschreitender OA verhält (vergleiche Abbildung 43). In Abbildung 43 sind die Zellkerne stets mit DAPI markiert, das rechte Bild stellt dabei aber eine Negativkontrolle und das linke Bild die Darstellung der PZM durch grün fluoreszierenden Antikörper gegen die Struktur Col6A3 dar. Betrachtete man Knorpelgewebe im Stadium der Clusterbildung, ließ sich erkennen, dass die grüne Autofluoreszenz sehr wahrscheinlich durch einen, in der PZM enthaltenen Stoff verursacht werden muss, welcher sich mit fortschreitender OA und Clusterbildung ähnlich zu Kollagen Typ VI umverteilt und abgebaut wird (siehe Abbildung 43).

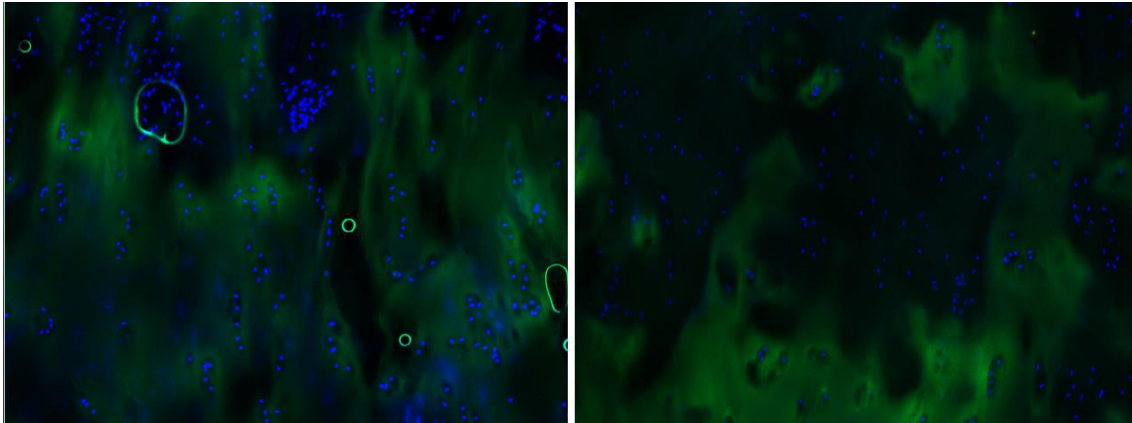


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Nativaufnahmen von Kryotomschnitten humanen Knorpelgewebes von 50nm Dicke der superfiziellen Zone von Femurkondylen, welche makroskopisch eine leichte Aufrauung der Oberfläche zeigen. Eine Aufnahme mit exakt gleicher Belichtung von 2s in den Lichtkanälen mit der Wellenlänge 365nm und 470nm. Links ist Gewebe mit Markierung von Kollagen Typ VI durch grün fluoreszierende Antikörperkomplexe zu sehen. Rechts zeigt natives Gewebe, an dem keine Markierung durch Antikörperkomplexe durchgeführt wurde. Beide Bilder zeigen blau fluoreszierende Zellkerne durch die Anfärbung mit DAPI zur besseren Darstellung der Lage der CHs. Eigene Abbildung.

3.4.2 Darstellung der PZM von CHs humaner Femurkondylen durch Fluoreszenz-markierung von Col6A3 in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen

Das in Punkt 3.4.1 beschriebene Phänomen der endogenen Fluoreszenz wurde im grünen Spektralbereich beobachtet. Es stellt sich nun die Frage, ob auch andere Spektralbereiche dieses Phänomen aufweisen. Deshalb wurden, wie in Material und Methoden beschriebene Kryotomschnitte hergestellt und mit rot fluoreszierenden Antikörpern gegen Col6A3 markiert. Im Vergleich dazu wurden Kryotomschnitte ohne Antikörperfärbung als native Kryotomschnitte betrachtet, wie in Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 44 dargestellt. Dort ist deutlich zu erkennen, dass das Phänomen der Autofluoreszenz nur im grünen Wellenlängenbereich, hier 470nm, sichtbar war (vergleiche Abbildung 39 - Abbildung 43). Verwendete man den roten Spektralbereich mit 590nm ließ sich durch eine Autofluoreszenz keine PZM-ähnliche Struktur darstellen, es sei denn, sie wurde mit einem rot fluoreszierenden Antikörperkomplex gegen Col6A3 markiert (vergleiche Abbildung 44).

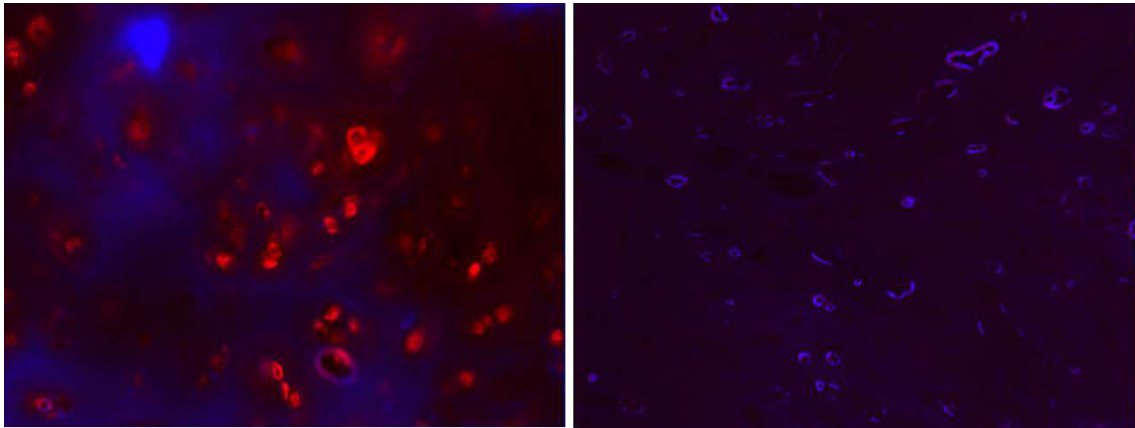


Abbildung 44: Superfizielle CHs humaner Femurkondylen stellen die PZM durch Markierung mit Antikörpern gegen Col6A3 (rot) an Kryotomschnitten von 50µm Dicke dar. Rechts: Positivkontrolle mit rot fluoreszierendem Antikörperkomplex – links: Negativkontrolle ohne rot fluoreszierenden Antikörperkomplex. Eigene Abbildung.

Betrachtete man natives, unbehandeltes Gewebe im Vergleich zur PZM-Markierung durch rot fluoreszierend markiertes Col6A3 im 365nm, 470nm und 590nm Wellenlängenbereich, ergab sich ein Bild wie in Abbildung 45 dargestellt. Im roten Spektralbereich ergab sich nur bei Markierung mit rot fluoreszierenden Antikörpern ein PZM-Nachweis; in nichtmarkiertem Gewebe waren keine Strukturen sichtbar. Im blauen Spektralbereich zeigt sich im linken Bild eine DAPI-Anfärbung der Zellkerne, rechts – ohne Antikörperfärbung - zeigt sich ebenfalls eine homogene Fluoreszenz der EZM mit signalarmen „Flecken“ (CHs) und Strukturen, die eine PZM vortäuschen können. Betrachtete man beide Schnitte im grünen Spektralbereich, sah man sowohl im Gewebe mit PZM-Markierung als auch ohne PZM-Markierung eine PZM ähnliche Struktur. Zusammenfassend ließ sich im grünen und schwächer im blauen, jedoch nicht im roten Lichtspektrum eine Autofluoreszenz des Knorpelgewebes feststellen, was eine fluoreszenz-basierte Analyse der PZM erschweren kann. Daher wird hier nur der rote Farbkanal für die PZM-Analyse empfohlen.

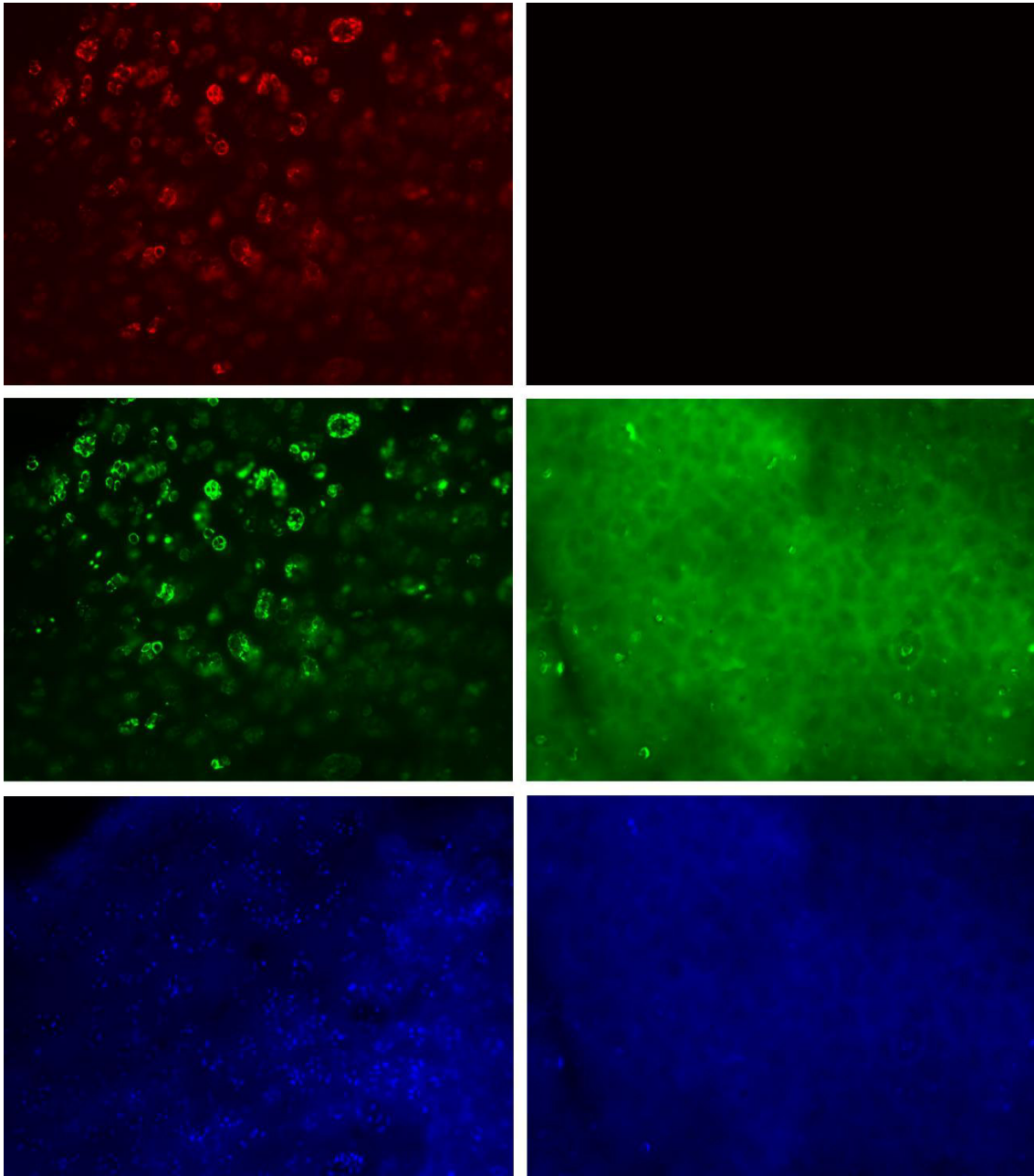


Abbildung 45: Kryotomschnitte superfiizieller CHs humaner Femurkondylen der Dicke 50 μ m in Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop. Eine Aufnahme mit exakt gleicher Belichtung von 2s in den Lichtkanälen mit der Wellenlänge 365nm, 470nm und 590nm. Rechts: PZM Markierung durch rot fluoreszierenden Antikörper gegen die Struktur Col6A3 und vorheriger Färbung der Nuclei mit DAPI. Links: native Aufnahme ohne jegliche Behandlung des Gewebsschnittes. Die Abbildungen in den unterschiedlichen Farben sind jeweils die selbe Stelle in exkt der selben Mikroskopeinstellung direkt nacheinander aufgenommen. Die Aufnahmen sind in den einzelnen Farbkanälen dargestellt ohne die Überlagerung mit anderen Spektralbereichen. Die Obere Reihe ist eine Aufnahme im Spektralbereich mit einer Exzitation von 590nm; die mittlere Reihe mit 470nm und die untere Reihe mit 365nm. Eigene Abbildung.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression von MMP-1, -3, -2, -9, -13, sowie die α 3-Kette des Kollagen Typ VI, der Hauptkomponente der PZM [39], untersucht. Dabei wurde hier zum ersten Mal die mRNA-Expression dieser Zielgene in der superfiziellen Knorpelschicht in verschiedenen Stadien der OA betrachtet, die sich als unterschiedliche räumliche Anordnung der CHs widerspiegeln [2]. Diese Studie zeigte zum ersten Mal, dass MMP-1, -3, -2, -9, -13, sowie Col6A3 stadienspezifisch exprimiert wurden, und dass die mRNA-Expression von Kollagen Typ VI mit zunehmender Veränderung der räumlichen Ordnung in steigendem Maße hochreguliert wird [84]. Das Patientenkollektiv bestand aus 44 Gewebespendern, davon 19 männliche und 25 weibliche Patienten, und repräsentiert somit die höhere Inzidenz von Gonarthrose bei Frauen. Auch das Alter der Gewebespende und die Verteilung von linken und rechten Kniegelenken spiegeln repräsentativ die von der Gonarthrose betroffene Bevölkerung wider [100, 101].

Eine differenzierte Untersuchung der OA nach mikroskopischen Kriterien ist sinnvoll, um das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Enzyme und Proteine in der OA-Anfangsphase besser verstehen zu können. Hierzu wurden oft verschiedene histologische Scores wie der OARSI- oder Mankin-Score [102, 103] verwendet. In der vorliegenden Studie wurde die superfizielle Zone des humanen Knorpels anhand der räumlichen Organisation der Chondrozyten vorgenommen, um die Frage zu beantworten, ob die einzelnen, in [1] definierten Stadien, mit einer stadientypischen MMP-Expression einhergehen. Hierzu wurden MMP-1, -3, -2, -9, -13 sowie Kollagen Typ VI als Hauptkomponente der PZM untersucht. Die vorliegende Studie zeigte, dass CH-Strings aus OA-Gelenken im Vergleich zu den übrigen Organisationsmustern DS, SC, BC und D eine geringere mRNA-Expression zeigten, aber dass von den untersuchten Genen hauptsächlich MMP-9 MMP-13 exprimiert wurden. Dies galt auch für CH-DS, aber die relative mRNA-Expression der beiden MMPs war deutlich erhöht. In SCs dominierte die MMP-13 und Col6A3-Expression, in BCs die MMP-9 und Col6A3-Expression, und in

Die MMP-13 und Col6A3-Expression. Somit ist festzuhalten, dass die mRNA-Expression der verschiedenen Organisationsformen im Rahmen der untersuchten Gene von MMP-9, -13 und Col6A3 dominiert wird, dass das Zusammenspiel dieser drei Zielgene die Expression der einzelnen Organisationsstadien definiert, und dass bei zunehmender Veränderung der CH-Organisation von S zu DS, SC, BC und D ein stetiger Anstieg der Col6A3 mRNA-Expression auftritt. Somit wurde hier erstmals aufgezeigt, dass verschiedene Stadien der CH-Organisation in der superfiziellen Schicht des humanen Knorpelgewebes von einer definierten MMP- und Kollagen Typ VI-Expression gekennzeichnet sind. Dies zeigt auch, wie sehr die mRNA-Expression der untersuchten MMPs lokal unterschiedlich ist und - wenn die einzelnen Organisationsformen als ein dynamischer Prozess der OA-Progression angesehen werden [1] – wie sich das Expressionsprofil stadienspezifisch im Verlauf der OA-Progression verändert.

Die frühe OA ist durch einen Kollagen Typ II Abbau gekennzeichnet [75, 104]. Ebenso nimmt man das Vorhandensein früher metabolischer Veränderungen und niederschwelliger Inflammation an, lange bevor die Fibrillierung des Gewebes als frühe OA sichtbar ist [105]. Es wird allgemein angenommen, dass die Entstehung der OA schon sehr früh durch metabolische und zellphänotypische Veränderungen gekennzeichnet ist [105]. Mit diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie die superfizielle Zone des humanen Knorpels anhand der räumlichen Organisation der Chondrozyten kategorisiert, um die Frage zu beantworten, ob die einzelnen, in [1] definierten Stadien der räumlichen Organisation mit einer stadientypischen MMP-Expression einhergehen. Generell waren nicht alle Zielgene in allen Proben als mRNA nachzuweisen, jedoch war bei der überwiegenden Anzahl der Proben eine mRNA-Expression dieser Zielgene zu messen. Die Expression der Housekeepinggene war ausnahmslos immer in allen Proben unabhängig von ihrer CH-Organisation nachzuweisen, was zeigte, dass jede Probe cDNA in genügender Menge enthielt. Die nicht immer nachweisbare mRNA-Expression verschiedener Zielgene könnte an interindividuellen Unterschieden der mRNA-Expression [58, 75] oder ggf. an verschiedenen anderen Einflussfaktoren

liegen, die den Krankheitsprozess der OA charakterisieren. Bei ca. 1/3 der OA Patienten lässt sich eine Entzündungskomponente feststellen, während andere nur ein sehr geringes Entzündungsniveau oder praktisch keine nachweisbare Entzündung zeigen [11, 106]. Dies könnte einen Effekt auf die unterschiedliche Expression der untersuchten Zielgene haben, da Entzündungsmediatoren z.B. Effekte auf die MMP-13-Expression haben [107]. Die mRNA von MMP-1 und MMP-13 zeigten, neben Col6A3, eine nicht immer konstante mRNA-Expression in den einzelnen Proben. MMP-2 und -3, aber auch MMP-9 waren praktisch immer nachzuweisen. Analysen mittels des Exakten Test nach Fisher ergaben einige signifikante Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer mRNA-Expression von MMP-1, MMP-13 und Col6A3 in den Proben der räumlichen Organisationsformen DS, SC und BC. Dies könnte darauf hindeuten, dass die mRNA-Expression dieser Gene evtl. durch verwandte Regulierungsmechanismen beeinflusst werden könnten. Dabei könnte z. B. der variable Grad an Inflammation eine unterschiedliche mRNA-Expression hervorrufen. Typische Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 (= IL-1), Interleukin-6 (= IL-6) und Tumornekrosefaktor α (= TNF- α) können die mRNA-Expression von MMP-1 und MMP-13 induzieren bzw. verstärken [53, 77, 108, 109]. Zusätzlich zeigte Col6A3 bei DS, SC und BC eine signifikante Assoziation der mRNA-Expression mit MMP-1 oder MMP-13, allerdings ergab sich für die Assoziation der mRNA-Expression von MMP-1 mit MMP-13 keine Signifikanz. Auch das Poolen von Proben ergab keine signifikante Assoziation von MMP-1 mit MMP-13. Daraus kann man nicht notwendigerweise schließen, dass die mRNA-Expression von MMP-1 und MMP-13 gekoppelt sind und ggf. durch dieselben Regulierungsmechanismen induziert wurden. Eine alternative Erklärung wären möglicherweise interindividuelle Unterschiede der mRNA-Expression [58, 75]. Hierzu sind weiterführende Studien notwendig. Weiterhin ist in der räumlichen Organisation D, die eine fortgeschrittene OA darstellt [2], in fast allen Proben (im Gegensatz zu den anderen untersuchten räumlichen Organisationen) eine ausgeprägt hohe mRNA-Expressionen der untersuchten Gene zu finden. Der inflammatorische Hintergrund, der für die Induktion der Transkription von MMPs verantwortlich sein kann, könnte hier eine Rolle

spielen, da in fortgeschrittener OA vermehrt inflammatorische und katabole Signale zu finden sind, welche die Expression von MMPs fördern können [110]. Des Weiteren könnte die Ätiologie der OA und das Alter der Gewebespende (hier zwischen 52 und 87 Jahren) die mRNA-Expression beeinflussen, da eine inflammatorische Komponente, schnell progrediente posttraumatische OA oder über einen längeren Zeitraum präsente degenerative Geschehen ein etwas anderes mRNA-Expressionsmuster generieren können [11, 105, 109]. Die Bestätigung dieser Annahme könnte in weiterführenden Studien untersucht werden. Weiterhin fiel eine große Streubreite der Messwerte auf. Neben interindividuellen Unterschieden der mRNA-Expression [58, 75] und inflammatorischem Hintergrundgeschehen [11, 106] könnte ein weiterer Grund hierzu sein, dass Veränderungen der räumlichen Organisation der Zellen der Superfizialschicht ein dynamischer Vorgang ist, der möglicherweise nicht exakt mit den untersuchten Gruppen kategorisiert werden konnte. Um diesem vorzubeugen, wurden Knorpelproben ohne eine eindeutig zuzuordnende Organisation vermieden, so dass dieser Grund unwahrscheinlich ist. Um methodische Gründe für die Messwertstreuung zu minimieren, wurde jede Probe mehrmalig gemessen. Auch die Zeit zwischen Gewebesentnahme und Schockgefrieren wurde standardisiert, so dass von 49 Gewebespendern 42 Proben innerhalb 24h verarbeitet und 7 innerhalb 48h verarbeitet wurden. Vergleicht man die Ergebnisse der Proben, in denen Gewebe der Probanden enthalten ist, die innerhalb 48h verarbeitet wurden, ergeben sich keine Abweichungen zu den anderen Proben. Es war also davon auszugehen, dass die generierten Daten durch die standardisierte Verarbeitungsweise des stets gekühlt gelagerten Gewebes qualitativ profitierten.

Die mRNA-Expression von MMP-1 konnte in jeder der unterschiedlichen räumlichen Organisationsformen bei OA nachgewiesen werden. Wie bereits bekannt, ist MMP-1 in der superfiziellen Schicht des Gelenkknorpels zu detektieren [61]. Wie auch von Bau, Gebhard et al. 2002 [111] gezeigt, war MMP-1 nur in geringen Mengen zu detektieren, verglichen mit den anderen untersuchten MMPs. MMP-1 steigt bekanntermaßen mit Progression der OA an [77, 78], und in der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Höhe der

Expression auch mit der räumlichen Organisation in Zusammenhang steht. Die signifikant geringere Menge der MMP-1 Expression, verglichen mit anderen untersuchten Genen, und die Tatsache, dass nicht bei allen Proben die mRNA-Expression von MMP-1 nachgewiesen werden konnte, könnte eine Erklärung dafür sein, dass andere Arbeiten MMP-1 im humanen Gelenkknorpel nicht nachweisen konnten [75]. Zudem ist auch bekannt, dass die Expression von MMPs starken interindividuellen Schwankungen unterlegen ist [58, 75]. MMP-1 ist als Kollagenase dazu in der Lage Kollagen Typ II und weitere Proteine abzubauen [63], allerdings ist es affiner zu Kollagen Typ III und beim Abbau von Kollagen Typ II dem Enzym MMP-13 unterlegen, das zehnmal schneller arbeitet als MMP-1 [53]. Zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass Kollagen Typ II den Großteil des EZM Kollagens darstellt und sein Abbau ein wesentlicher Faktor der OA-Pathologie ist [42, 104]. Allerdings zeigte die vorliegende Arbeit, dass MMP-1 nicht das höchstexprimierteste MMP war.

Die mRNA von MMP-13 wird in früher und später OA signifikant verstärkt exprimiert und zeigt besonders in frühen Stufen der Erkrankung eine signifikant stärkere Expression als die anderer MMPs. MMP-13 gehört, zusammen mit MMP-1, ebenfalls als MMP zur Familie der Kollagenasen [72]. Es ist dabei sehr spezifisch für Kollagen Typ II, welches es auch im Vergleich zu den anderen Enzymen am effektivsten umsetzt [53, 58, 63, 109]. Eine Blockade der MMP-13 Aktivität konnte sogar den Abbau von Kollagen Typ II in humanen Femurkondylen verringern [63] und eine indirekte Hemmung ist koexistent mit einer protektiven Wirkung, bzw. verlangsamten Progression bei induzierter OA im Tiermodell [112]. Bei genmodifizierten Tieren, die postnatal kontinuierlich MMP-13 exprimieren, zeigten sich OA Veränderungen, die bei Wildtyp-Mäusen und bei MMP-13 supprimierten Tieren nicht vorhanden sind [60]. Zusammen mit der Tatsache, dass MMP-13 bei OA verstärkt exprimiert wird [81], wie auch hier gezeigt, deutet vieles darauf hin, dass dieses Enzym eine relevante Rolle in der OA-Pathologie spielt. MMP-13 ist physiologisch in Körper in Situationen zu finden, die einen schnellen Matrixumbau erfordern, wie z.B. bei Entzündungen [113], und besonders in der Fetalzeit. Es spielt vor allem bei der Knorpel- und Knochenentwicklung eine wichtige Rolle [114]. Zudem ist MMP-13 unter

anderem ein Marker hypertropher Chondrozyten [114]. Pathologisch kommt das Enzym beispielsweise bei diversen Tumorarten sowie bei RA und OA vor [53, 115]. Zudem könnte eine Veränderung des Phänotyps der CHs bei OA bei der verstärkten mRNA-Expression von MMP-13 eine Rolle spielen, welches sie als hypertrophe Formen verstärkt exprimieren [81]. Möglicherweise hat MMP-13 bei weit fortgeschrittener OA ein anderes Funktionsspektrum, wenn es als sehr potente Protease [53] in einem Zustand eines raschen Matrixab- und Umbau zu finden ist [110]. Der gesunde Knorpel exprimiert wenig MMP-13 [111], welches aber als inaktive Pro-Form direkt wieder endozytiert und abgebaut wird und in diesem, inaktiven Umfang zur normalen Matrixhomöostase zu gehören scheint [116]. Die hier generierten Daten zeigten, dass die mRNA-Expression von MMP-13 in Knorpelproben mit einer physiologischen Organisation (S) geringer war als in Proben mit einer veränderten Organisation, wie sie typisch für die fortgeschrittene OA ist [2]. Eine Erhöhung der MMP-13 Expression konnte schon in der räumlichen Organisation DS beobachtet werden, die ein Frühstadium räumlicher Veränderungen darstellt [2]. Auch die räumliche Organisation SC zeigte eine derartig erhöhte MMP-13 Expression, was mit anderen Studien übereinstimmt [44, 75]. Ein weiterer Peak in der MMP-13-Expression fand sich in Proben mit einem Verlust der räumlichen Organisation (D), was der fortgeschrittenen OA entspricht [2]; dieser Zusammenhang von fortgeschrittener OA und maximaler MMP-13 wurde durch andere Studien bestätigt [77, 81] und konnte hier auf das Organisationsstadium D zurückgeführt werden. Wie auch in anderen Arbeiten gezeigt wurde [77, 81, 111], lag ein Doppel-Peak der MMP-13-Expression vor, welcher hier auf die Organisationsformen DS und D zurückgeführt werden konnte.

Die PZM spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz der Zellen vor mechanischem und biochemischem Stress [23, 24]. Zudem dient sie der Signaltransduktion und -Modifikation von Signalen von oder zu der Zelle [30]. Eine gesunde PZM fördert die Matrixproduktion [28] und erhält die Zellvitalität, wobei hier vor allem die Hauptkomponente der PZM, das Kollagen Typ VI [19], relevant ist. Kollagen Typ VI schützt vor Apoptose [26] [25] und verringert osmotischem Stress [27]. Die Chondrozyten scheinen den Kontakt mit dem

Kollagen Typ VI, über welches sie mit ihrer Umgebung in Kontakt stehen, dringend für eine normale Funktion zu benötigen [46, 48]. OA indessen ist durch einen Funktionsverlust der PZM gekennzeichnet [31, 32] und auch durch einen Verlust der PZM-Struktur [1]. Auch frühe Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der PZM durch Veränderungen des Kollagen Typ VI-Gehaltes sind mit einem Fortschreiten der OA assoziiert [41]. Der Verlust des Kontakts der Zelle zum Kollagen Typ VI ist bei OA gestört oder geht verloren, womit der Verlust der protektiven Funktion der PZM bei OA einhergeht [46] [48]. Die funktionelle Bedeutung von Kollagen Typ VI für die Homöostase der CHs wurde bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben. Ebenso die Tatsache, dass das Protein in progredienter OA immer weiter abgebaut wird, bis es schließlich nicht mehr nachweisbar ist oder nicht vollständig synthetisiert wird [1, 39, 47]. Im kompletten Gegensatz dazu steht allerdings die Tatsache, dass die mRNA für Kollagen Typ VI ($\alpha 1$ -Kette) mit Progression der OA stark ansteigt [84], während das Vorhandensein des Proteins abnimmt [1]. Hier wurde ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression des Col6A3 bei Veränderungen der räumlichen Organisation, typisch für die späte OA [2], anhand der mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Kette aufgezeigt (siehe Abbildung 30 und Tabelle 30). Die Expression der $\alpha 3$ Kette des Kollagen Typ VI wurde bestimmt, da sie als größte Kette mit vielen Bindungsstellen für EZM und Zelloberflächenproteine hauptverantwortlich für die Wechselwirkungen des Proteins Kollagen Typ VI mit seiner Umgebung ist [117]. Allerdings ist anzumerken, dass nicht bei allen Proben eine Expression von Kollagen Typ VI nachzuweisen war. Dies könnte daran liegen, dass nicht alle Zellen eine vermehrte Kollagen Typ VI Produktion aufwiesen, was auch schon früher beobachtet werden konnte [39]. Allerdings ist noch unklar, weshalb es sich so verhält. Nur in Proben mit einer gesunden Organisation (S) und im Endstadium der OA (D) war bei fast allen Proben eine Expression von Col6A3 zu messen. Für die ausbleibende mRNA-Expression von Col6A3 zeigte sich abgesehen von einer ebenfalls ausbleibenden mRNA-Expression von MMP-1 aber kein wesentlicher Zusammenhang mit anderen nicht exprimierten Genen. Betrachtet man die Ergebnisse unserer Untersuchungen im Kontext der MMPs 2, 3 und 9,

welche in der Lage sind, Kollagen Typ VI abzubauen [55, 69, 70], haben wir eine mögliche Erklärung, aus welchem Grund Kollagen Typ VI exprimiert wird, aber in einer anderen Arbeit aus unserem Labor [1] im Stadium D der Organisation nicht nachweisbar war. Hier steht ein kausaler Nachweis noch aus.

MMP-3, auch Stromelysin-1 genannt, wurde in signifikant höherem Maß exprimiert als alle anderen hier untersuchten Gene und war auch in fast allen Proben zu detektieren. Auch andere Studien zeigten einen wesentlich höheren Stromelysin- als Kollagenasespiegel im Knorpel [118] und ein deutliches Hervortreten der MMP-3 Expression [119]. Das Enzym weist ein großes Spektrum an Substraten auf, wobei es das für den Knorpel relevante Aggrekan und auch einige MMPs, darunter auch MMP-1, -2, -9 und -13, abbaut, sowie unter anderem MMP-1, -9 und -13 aktiviert [120]. Außerdem kann es die α 3 Kette des Kollagen Typ VI der PZM abbauen [55]. Bei MMP-3 könnte es sich um eine „Housekeeping-MMP“ handeln, da auch gesundes Knorpelgewebe große Mengen des Enzyms exprimiert [59, 75], und da es in der Lage ist viele andere MMPs, Enzyme und EZM Komponenten abzubauen [120]. MMP-3 ist auch bei OA nachzuweisen [59, 77] und steigt zunächst mit Progression der Krankheit an [79], sinkt dann allerdings, im fortgeschrittenem Stadium der OA wieder ab [75, 111]. Diese Beobachtungen sind auch mit den hier erhobenen Daten konsistent, da MMP-3 in allen Organisationsstadien nachweisbar war. Da OA auch schon früh durch PG-Verlust charakteristisch ist und MMP-3 PGs abbauen kann, könnte MMP-3 in der frühen OA beim PG-Abbau eine entscheidende Rolle spielen [65]. Über die größere Menge der MMP-3 Expression im Vergleich zu anderen MMPs wurde schon berichtet [118, 119], allerdings ist das Verhältnis der relativen Expression zu anderen Zielgenen in derart signifikanter Höhe unseres Wissens nach neu. Damit scheint MMP-3 eine bislang ggf. unterschätzte Rolle in der OA-Pathologie zu spielen. Durch diese sehr große mRNA-Expressionsrate und seine Fähigkeit Kollagen Typ VI abzubauen [55], rückt MMP-3 möglicherweise in den Fokus der PZM-Zerstörung in OA [1].

MMP-2 wird nur wenig in gesundem Knorpel und bei früher OA exprimiert, aber die Expression steigt signifikant im Endstadium der OA an [59, 62, 75, 121]. Hier konnte die MMP-2 Expression auf die räumliche Organisationsform D zurückgeführt werden. Dies ist eine neue Erkenntnis, welche zur Differenzierung zwischen den OA-relevanten Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 beiträgt. In den hier nachgewiesenen geringen Mengen der MMP-2 mRNA-Expression und einer ersten Nachweisbarkeit im Stadium D scheint MMP-2 keine große Rolle in der Früh-OA spielen zu können. Da jedoch bereits in der Früh-OA eine beginnende PZM-Schädigung auftritt [1], erscheint eine Beteiligung von MMP-2 an diesem Prozess unwahrscheinlich, obwohl MMP-2 in der Lage ist, Kollagen Typ VI abzubauen [55, 69, 70]. Aufgrund der sehr niedrigen relativen mRNA-Expression in frühen OA-Stadien, hier kategorisiert als DS, SC und BC, ist es auch unwahrscheinlich, dass MMP-2 eine große Rolle in der Früh-OA spielt. Als Gelatinase ist das Enzym dazu in der Lage, Gelatin, ein anfallendes Abbauprodukt von EZM-Komponenten, abzubauen [68]. Insofern würde die MMP-2 Expression im späten OA-Stadium D Sinn machen, da hier eine große Menge an Gelatin vorliegen kann. Man muss immer berücksichtigen, dass eine ausbleibende Steigerung der Transkriptionsrate nicht mit einer ausbleibenden Steigerung der Enzymaktivität gleichgesetzt werden kann. In gesundem Knorpel ist MMP-2 vor allem in seiner inaktiven Form zu finden, kann allerdings durch mechanischen Stress aktiviert werden [122]. So kann eine weitestgehend gleiche Expressionsrate trotzdem eine unterschiedliche Enzymaktivität bedeuten. Nichtsdestotrotz finden wir eine signifikante mRNA-Expression in relativ so geringen Mengen, verglichen mit anderen gemessenen mRNA-Expressionsmengen anderer MMPs, dass die Rolle des MMP-2 bei OA wohl mit größerer Wahrscheinlichkeit im Abbau von Gelatin [68] im diffusen Organisationsstadium der OA liegt, als in der progredienten Zerstörung der Kollagen Typ VI-reichen PZM.

Da die Expression von MMP-9 zum Teil großen Schwankungen unterliegt, könnte MMP-9 in spezifischen Phasen der Pathogenese der OA von relevanter Bedeutung sein. MMP-9 zeigt in seiner mRNA-Expression einen signifikanten Peak bei der räumlichen Organisationsform BC, aber eine signifikante

Steigerung der mRNA-Expression war auch bei DS zu beobachten. Auch andere Studien haben eine gesteigerte Expression von MMP-9 bei OA gezeigt [59, 121]. Dabei sind geringe Mengen in gesundem Knorpel nachweisbar, da MMP-9 dort meist als inaktive Form zu finden ist [122]. Eine leicht gesteigerte Expression ist in früher OA, eine starke Steigerung der Expression in später OA nachzuweisen [123]. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit. MMP-9 kann die $\alpha 3$ Kette von Kollagen Typ VI abbauen [55, 69, 71]. Besonders die Superfizialschicht zeigt im gesunden Gewebe und bei Früh-OA einen hohen MMP-9-Gehalt; bei später OA ist MMP-9 in allen Schichten zu finden [83]. Da eine signifikant erhöhte MMP-9 Expression in der räumlichen Organisation BC in der Superfizialschicht zu finden ist und in diesem Stadium die Integrität der PZM kompromittiert ist [1], könnte MMP-9 hier eine Rolle spielen.

Diese Arbeit gibt zum ersten Mal tiefere Einblicke in den detaillierten Verlauf der mRNA-Expression verschiedener kataboler Enzyme im Verlauf der OA-Progression als Funktion der Veränderung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten, also einer Region, die als erste und vulnerabelste aller Regionen von OA-Veränderungen im Knorpelgewebe betroffen ist [42, 43]. Die hier angewendete differenzierte Kategorisierung verschiedener OA-Knorpelproben in fünf mikroskopisch unterteilbare Stadien ist nur durch das Modell der räumlichen Organisation superfizieller CHs möglich [1] und zeigt, dass diese Stadien signifikante Unterschiede in der MMP-Expression aufweisen. Dies deutet wiederum darauf hin, dass die räumliche Organisation superfizieller CHs als ein OA-Score betrachtet werden kann, anhand dessen CHs mit unterschiedlichen Expressionsprofilen identifiziert werden können. Insgesamt werfen diese Ergebnisse auch die Frage auf, ob MMP-3, MMP-9 und MMP-13 an der bekannten Kompromittierung der PZM bei OA [1] beteiligt sind, und ob eine pharmakologische Blockierung dieser Substanzen die OA-Progression insofern günstig beeinflussen könnte, als dass eine Kompromittierung der PZM in der OA verhindert werden könnte.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Darstellung von Kollagen Typ VI der PZM durch Immunhistochemie und Autofluoreszenz. Die hier erstellten Daten zeigten eindrucksvoll, dass sich bei Nativaufnahmen von

Kryotomschnitten von Knorpelgewebe der Superfzialschicht im grünen Fluoreszenzkanal neben der EZM auch eine PZM-ähnliche Struktur darstellen lässt; diese Problematik könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen. Diese im grünen Fluoreszenzkanal durch Autofluoreszenz sichtbare Struktur ist im grünen Fluoreszenzkanal schwer von der, durch Antikörper gegen Col6A3 markierten PZM, zu unterscheiden. Im roten Fluoreszenzkanal zeigt sich dagegen kein solches Phänomen, wohl aber eine z.T. bekannte grüne Autofluoreszenz im Spektralbereich von ca. 400-430nm [85, 91]. Weder die Art der Lichtquelle, die Art der Fixierung noch die Blockade unspezifischer Bindungen ließ einen Einfluss auf das Phänomen erkennen. Aufgrund dieser Untersuchungen kann der rote Fluoreszenzkanal für Untersuchungen des humanen Knorpelgewebes empfohlen werden, wenn der Fokus auf der PZM liegt.

5. Zusammenfassung

Die Arthrose (Osteoarthritis/OA) ist eine bis heute noch unvollständig verstandene Erkrankung und es stehen demnach keine kausal oder präventiv wirkenden biologischen Therapien zur Verfügung. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag dazu, die Pathophysiologie der OA-assoziierten Gewebeerstörung des Gelenkknorpels besser zu verstehen, um auf dieser Basis weitergehende Forschungseinblicke zu ermöglichen und ggf. therapeutische oder präventive Ansatzpunkte für die OA zu finden. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf die superfizielle Schicht des Knorpels distaler humaner Femurkondylen des Kniegelenks, da diese Schicht früh im Krankheitsverlauf von OA-typischen Veränderungen betroffen ist und somit relevant für ein besseres OA-Verständnis ist.

Humane superfizielle Chondrozyten bilden verschiedene komplexe räumliche Anordnungsmuster, die gelenkspezifisch sind und sich in der Früh-OA charakteristisch verändern. Diese Anordnung ist eng mit der perizellulären Matrix (PZM) assoziiert, welche funktionell relevant ist und mit fortschreitendem Verlust der räumlichen Organisation in fortgeschrittenen OA-Stadien strukturell verloren geht. Eines der Hauptkomponenten der PZM ist Typ VI Kollagen, welches durch MMP-2, -9 und auch MMP-3 prinzipiell abgebaut werden kann, wie es an anderen Geweben bereits gezeigt wurde [55, 69]. Somit ist es theoretisch denkbar, dass ein Abbau der Typ VI Kollagen-Komponente der PZM am strukturellen Schaden der PZM [1] beteiligt sein könnte. In diesem Kontext stellt sich die, in der vorliegenden Arbeit untersuchte Frage, ob eine MMP-2 und/oder MMP-9 bzw. MMP-3 mRNA-Expression im humanen hyalinen Knorpel nachzuweisen ist, und ob eine solche mRNA-Expression mit spezifischen Stadien der räumlichen Anordnung superfizieller Chondrozyten im hyalinen Gelenkknorpel assoziiert ist.

Methodisch wurden standardisierte Knorpelimplantate inklusive der superfiziellen Schicht humaner Femurkondylen hergestellt. Die räumlichen Organisationsstadien der Explantate wurden fluoreszenzmikroskopisch

visualisiert und zur stadienspezifischen Sortierung der Explantate verwendet. Anschließend wurde die mRNA-Expression von Typ VI Kollagen (Col6A3) in Kombination mit den knorpelrelevanten MMPs MMP-1, -2, -3, -9 und -13 mittels qRT-PCR untersucht und statistisch ausgewertet. Weiterhin wurde die Visualisierung der PZM näher untersucht. Hier ist es üblich, Typ VI Kollagen durch Fluoreszenzmikroskopie mittels eines Antikörper-Systems darzustellen. Hierbei gehen Chondrozyten allerdings zugrunde und falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktivität mit anderen Epitopen sind möglich. Deshalb wurde hier untersucht, ob die PZM durch Autofluoreszenz nachweisbar ist.

Unabhängig von der Chondrozytenorganisation war die mRNA-Expression von MMP-2, -3 und -9 in OA-Chondrozyten stets in allen Explanaten nachweisbar, während die Expression von MMP-1, -13 und von Col6A3 nur in etwa 60% nachweisbar war. Signifikante Korrelationen zwischen den mRNA-Expressionen lag nur in wenigen Fällen vor, vor allem zwischen MMP-1 und Col6A3 und zwischen MMP-13 und Col6A3. Interessanterweise ergab die mRNA Analyse für alle Zielgene charakteristische Expressionsprofile für einzelne Stadien der räumlichen Organisation Strings (S), Double Strings (DS), Small Cluster (SC), Big Cluster (BC) und Diffuse (D). Die mRNA-Expression von MMP-2 war in den Stadien S, DS, SC und BC gering, aber im diffusen Stadium D signifikant höher als in allen anderen Organisationsformen. Verglichen mit S, DS, SC und BC entsprach das einem Anstieg um das 294-fache. Die mRNA-Expression von MMP-9 war in allen Stadien nachweisbar und in der räumlichen Organisation BC signifikant höher als in S, SC und D. Die mRNA von MMP-3 wurde in fast jeder Probe signifikant stärker als alle anderen untersuchten mRNAs exprimiert und die mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-1 zeigte meist signifikant geringere Expressionsraten im Vergleich zu allen anderen Zielgenen. Die mRNA von Col6A3 war in der räumlichen Organisation S niedrig und nahm in den darauffolgenden Organisationsstadien von DS zu D signifikant zu. Die MMP-9 und MMP-13 mRNA-Expression war bereits mit frühen Organisationsveränderungen (DS) signifikant verstärkt.

Zum Thema der Autofluoreszenzdarstellung der PZM wurde erarbeitet, dass native Knorpelgewebe humaner Femurkondylen im grünen Spektralbereich

sichtbaren Lichts (470nm) autofluoreszieren, und dass eine PZM-artige Struktur mit und ohne Primär-/Sekundärantikörperverwendung sichtbar war. Hieraus wurde geschlossen, dass Sekundärantikörperfärbungen der PZM im grünen Spektralbereich mit der Problematik falsch positiver Resultate behaftet sein könnten. Der rote Spektralbereich zeigte ein solches Phänomen nicht, so dass dieser für Antikörperfärbungen der PZM am geeignetsten zu sein scheint.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit erstmals, dass spezifische Organisationsformen superfizieller Chondrozyten mit spezifischen MMP- und Col6A3-Expressionsprofilen assoziiert waren, und dass die mRNA von MMP-2, -9 und -3 im humanen Gelenkknorpel exprimiert wird. Dies kann als ein erster Hinweis darauf gedeutet werden, dass der strukturelle Verlust der PZM mit fortschreitender OA möglicherweise mit einer Typ VI Kollagen-Spaltung zusammenhängt. Dies sollte aber durch Folgestudien kausal bestätigt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Rolaufts, B., et al., *Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(6): p. 1637-47.
3. Aigner, T., et al., *Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(7): p. 391-9.
4. Koch-Institut, R. *Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2012" Arthrose*. 2012 [cited 2016 13.03]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsF/Geda2012/Arthrose.pdf?__blob=publicationFile.
5. Bundesamt, R.K.-I.S. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 54 ;Arthrose*. 2013; Available from: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/arthrose.pdf?__blob=publicationFile.
6. Bundesamt, S. *Hüft- oder Kniegelenksarthrosen sind häufigster Behandlungsgrund in der Reha*. 2013 [cited 2017 29.04]; Available from: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2013/01/PD13_030_231.pdf;jsessionid=514D41F45639D01FE85D18C5B127765C.cae4?__blob=publicationFile.
7. Orth, P. and H. Madry, *Konservative Therapie der Arthrose*. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2013. **8**(05): p. 419-436.
8. Koch-Institut, R. *Gesundheit in Deutschland – Einzelkapitel: Welche Auswirkungen hat der demografische Wandel auf Gesundheit und Gesundheitsversorgung?* 2015 [cited 2017 29.04]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsGiD/2015/09_gesundheit_in_deutschland.pdf?__blob=publicationFile.
9. Abteilung für Epidemiologie und Gesundheitsmonitoring, R.K.-I. *Übergewicht und Adipositas in Deutschland*. 2013 [cited 2017 29.04]; Available from: <http://edoc.rki.de/oa/articles/rec5I0tIFMfd2/PDF/23JuqX9byg62Q.pdf>.
10. Altman, R., et al., *Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association*. Arthritis Rheum, 1986. **29**(8): p. 1039-49.
11. Jones, G., *What's new in osteoarthritis pathogenesis?* Intern Med J, 2016. **46**(2): p. 229-36.
12. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 1697-707.
13. Chevalier, X., F. Eymard, and P. Richette, *Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments*. Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(7): p. 400-10.
14. Paulsen, F.W., Jens Sobotta, *Atlas der Anatomie des Menschen Band 1, in Allgemeine Anatomie und Bewegungsapparat*. 2010, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. p. 416.

15. *Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
16. Asan, E., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
17. Jadin, K.D., et al., *Three-dimensional (3-D) imaging of chondrocytes in articular cartilage: growth-associated changes in cell organization*. *Biomaterials*, 2007. **28**(2): p. 230-9.
18. Beninghoff, A., *Beninghoff A. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen Zur Funktion. Zweiter Teil: der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion*. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 1925. **76**(1): p. 43-63.
19. Zhang, Z., et al., *A proteomic approach for identification and localization of the pericellular components of chondrocytes*. *Histochem Cell Biol*, 2011. **136**(2): p. 153-62.
20. Poole, C.A., M.H. Flint, and B.W. Beaumont, *Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages*. *J Orthop Res*, 1987. **5**(4): p. 509-22.
21. Rolauuffs, B., et al., *Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints*. *J Struct Biol*, 2008. **162**(2): p. 335-44.
22. Alexopoulos, L.G., L.A. Setton, and F. Guilak, *The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage*. *Acta Biomater*, 2005. **1**(3): p. 317-25.
23. Choi, J.B., et al., *Zonal changes in the three-dimensional morphology of the chondron under compression: the relationship among cellular, pericellular, and extracellular deformation in articular cartilage*. *J Biomech*, 2007. **40**(12): p. 2596-603.
24. Hing, W.A., A.F. Sherwin, and C.A. Poole, *The influence of the pericellular microenvironment on the chondrocyte response to osmotic challenge*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(4): p. 297-307.
25. Howell, S.J. and K.J. Doane, *Type VI collagen increases cell survival and prevents anti-beta 1 integrin-mediated apoptosis*. *Exp Cell Res*, 1998. **241**(1): p. 230-41.
26. Peters, H.C., et al., *The protective role of the pericellular matrix in chondrocyte apoptosis*. *Tissue Eng Part A*, 2011. **17**(15-16): p. 2017-24.
27. Zelenski, N.A., et al., *Type VI Collagen Regulates Pericellular Matrix Properties, Chondrocyte Swelling, and Mechanotransduction in Mouse Articular Cartilage*. *Arthritis Rheumatol*, 2015. **67**(5): p. 1286-94.
28. Larson, C.M., et al., *Retention of the native chondrocyte pericellular matrix results in significantly improved matrix production*. *Matrix Biol*, 2002. **21**(4): p. 349-59.
29. Knight, M.M., et al., *Chondrocyte deformation within mechanically and enzymatically extracted chondrons compressed in agarose*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1526**(2): p. 141-6.
30. Wilusz, R.E., J. Sanchez-Adams, and F. Guilak, *The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage*. *Matrix Biol*, 2014. **39**: p. 25-32.

31. Wilusz, R.E., S. Zauscher, and F. Guilak, *Micromechanical mapping of early osteoarthritic changes in the pericellular matrix of human articular cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(12): p. 1895-903.
32. Alexopoulos, L.G., et al., *Osteoarthritic changes in the biphasic mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage*. *J Biomech*, 2005. **38**(3): p. 509-17.
33. Guilak, F., et al., *The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1068**: p. 498-512.
34. Venn, M. and A. Maroudas, *Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition*. *Ann Rheum Dis*, 1977. **36**(2): p. 121-9.
35. Klein, T.J., et al., *Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage*. *J Biomech*, 2007. **40**(1): p. 182-90.
36. Darling, E.M., J.C. Hu, and K.A. Athanasiou, *Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression*. *J Orthop Res*, 2004. **22**(6): p. 1182-7.
37. Youn, I., et al., *Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(9): p. 889-97.
38. Pullig, O., G. Weseloh, and B. Swoboda, *Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999. **7**(2): p. 191-202.
39. Hambach, L., et al., *Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(6): p. 986-96.
40. Pan, T.C., et al., *COL6A3 protein deficiency in mice leads to muscle and tendon defects similar to human collagen VI congenital muscular dystrophy*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(20): p. 14320-31.
41. Alexopoulos, L.G., et al., *Developmental and osteoarthritic changes in Col6a1-knockout mice: biomechanics of type VI collagen in the cartilage pericellular matrix*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(3): p. 771-9.
42. Hollander, A.P., et al., *Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(6): p. 2859-69.
43. Loeser, R.F., *Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis*. *Clin Geriatr Med*, 2010. **26**(3): p. 371-86.
44. Kamekura, S., et al., *Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(7): p. 632-41.
45. Poole, C.A., A. Matsuoka, and J.R. Schofield, *Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage*. *Arthritis Rheum*, 1991. **34**(1): p. 22-35.

46. Nugent, A.E., et al., *Advanced osteoarthritis in humans is associated with altered collagen VI expression and upregulation of ER-stress markers Grp78 and bag-1*. J Histochem Cytochem, 2009. **57**(10): p. 923-31.
47. Murray, D.H., et al., *Abnormal human chondrocyte morphology is related to increased levels of cell-associated IL-1beta and disruption to pericellular collagen type VI*. J Orthop Res, 2010. **28**(11): p. 1507-14.
48. Soder, S., et al., *Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(6): p. 464-70.
49. Rolaufts, 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.
50. Muehleman, C., et al., *Prevalence of degenerative morphological changes in the joints of the lower extremity*. Osteoarthritis Cartilage, 1997. **5**(1): p. 23-37.
51. Greenlee, K.J., et al., *Proteomic identification of in vivo substrates for matrix metalloproteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7312-21.
52. Deutzmann, R. and P. Bruckner, *Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P.D.M.M. Prof. Dr. Peter C. Heinrich, Prof. Dr. Lutz Graeve, Editor. 2014. p. 931-951.
53. Leeman, M.F., S. Curran, and G.I. Murray, *The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002. **37**(3): p. 149-66.
54. Uria, J.A., et al., *Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4882-8.
55. Stegemann, C., et al., *Proteomic identification of matrix metalloproteinase substrates in the human vasculature*. Circ Cardiovasc Genet, 2013. **6**(1): p. 106-17.
56. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
57. Konttinen, Y.T., et al., *Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1999. **58**(11): p. 691-7.
58. 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.
59. Mohtai, M., et al., *Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 179-85.
60. Neuhold, L.A., et al., *Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 35-44.
61. Freemont, A.J., et al., *Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(9): p. 542-9.

62. Duerr, S., et al., *MMP-2/gelatinase A is a gene product of human adult articular chondrocytes and is increased in osteoarthritic cartilage*. Clin Exp Rheumatol, 2004. **22**(5): p. 603-8.
63. Billinghamurst, R.C., et al., *Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage*. J Clin Invest, 1997. **99**(7): p. 1534-45.
64. Knauper, V., et al., *Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13)*. Eur J Biochem, 1997. **248**(2): p. 369-73.
65. Xie, D.L., et al., *Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with release of several proteinases: stromelysin plays a major role in chondrolysis*. Arch Biochem Biophys, 1994. **311**(2): p. 205-12.
66. Flores-Pliego, A., et al., *Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) Is an Endogenous Activator of the MMP-9 Secreted by Placental Leukocytes: Implication in Human Labor*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145366.
67. Welgus, H.G., et al., *The gelatinolytic activity of human skin fibroblast collagenase*. J Biol Chem, 1982. **257**(19): p. 11534-9.
68. Collier, I.E., et al., *H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen*. J Biol Chem, 1988. **263**(14): p. 6579-87.
69. Veidal, S.S., et al., *MMP mediated degradation of type VI collagen is highly associated with liver fibrosis--identification and validation of a novel biochemical marker assay*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24753.
70. Myint, E., et al., *Cleavage of human corneal type VI collagen alpha 3 chain by matrix metalloproteinase-2*. Cornea, 1996. **15**(5): p. 490-6.
71. Xu, D., et al., *Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(11): p. 2215-28.
72. Takaishi, H., et al., *Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13*. Curr Pharm Biotechnol, 2008. **9**(1): p. 47-54.
73. Xue, M., et al., *Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation*. Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(12): p. 2270-9.
74. Stevens, A.L., et al., *A sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis-liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of bovine cartilage tissue response to mechanical compression injury and the inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(2): p. 489-500.
75. Aigner, T., et al., *Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2777-89.
76. Robertson, C.M., et al., *Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits*. Osteoarthritis Cartilage, 2006. **14**(5): p. 471-6.
77. Tetlow, L.C., D.J. Adlam, and D.E. Woolley, *Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(3): p. 585-94.

78. Wu, H., J. Du, and Q. Zheng, *Expression of MMP-1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study*. *Rheumatol Int*, 2008. **29**(1): p. 31-6.
79. Shi, J., et al., *Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis*. *IUBMB Life*, 2016.
80. Aurich, M., et al., *Matrix homeostasis in aging normal human ankle cartilage*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(11): p. 2903-10.
81. Zhou, S., et al., *Influence of osteoarthritis grade on molecular signature of human cartilage*. *J Orthop Res*, 2016. **34**(3): p. 454-62.
82. Jackson, M.T., et al., *Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(6): p. 1525-36.
83. Soder, S., et al., *MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage*. *Clin Exp Rheumatol*, 2006. **24**(3): p. 302-4.
84. Schröder, J., *Medizinische Dissertation in Prüfung: Kollagen Typ I, II, III und VI - mRNA-Expression humaner Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen*, in *Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik Tübingen; Abteilung: Siegfried Weller Institut für unfallmedizinische Forschung*. 2017, Universität Tübingen.
85. Sato, M., et al., *A diagnostic system for articular cartilage using non-destructive pulsed laser irradiation*. *Lasers Surg Med*, 2011. **43**(5): p. 421-32.
86. Manning, H.B., et al., *Detection of cartilage matrix degradation by autofluorescence lifetime*. *Matrix Biol*, 2013. **32**(1): p. 32-8.
87. Monici, M., *Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications*. *Biotechnol Annu Rev*, 2005. **11**: p. 227-56.
88. Hagiwara, Y., et al., *Autofluorescence assessment of extracellular matrices of a cartilage-like tissue construct using a fluorescent image analyser*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2011. **5**(2): p. 163-8.
89. Wagnieres, G.A., W.M. Star, and B.C. Wilson, *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*. *Photochem Photobiol*, 1998. **68**(5): p. 603-32.
90. Padilla-Martinez, J.P., R. Wang, and W. Franco, *Evaluation of cell and matrix mechanics using fluorescence excitation spectroscopy: Feasibility study in collagen gels containing fibroblasts*. *Lasers Surg Med*, 2016. **48**(4): p. 377-84.
91. Sun, Y., et al., *Nondestructive evaluation of tissue engineered articular cartilage using time-resolved fluorescence spectroscopy and ultrasound backscatter microscopy*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. **18**(3): p. 215-26.
92. Fite, B.Z., et al., *Noninvasive multimodal evaluation of bioengineered cartilage constructs combining time-resolved fluorescence and ultrasound imaging*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2011. **17**(4): p. 495-504.
93. Gareau, D.S., et al., *Confocal fluorescence spectroscopy of subcutaneous cartilage expressing green fluorescent protein versus cutaneous collagen autofluorescence*. *J Biomed Opt*, 2004. **9**(2): p. 254-8.
94. *Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (MMP1), transcript variant 2, mRNA*. NCBI Reference Sequence: NM_001145938; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/clipboard>.

95. *Homo sapiens matrix metalloproteinase 2 (MMP2), transcript variant 5, mRNA*. NCBI Reference Sequence: NM_001302510; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001302510.
96. *Homo sapiens matrix metalloproteinase 3 (MMP3), mRNA*. NCBI Reference Sequence: NM_002422; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002422.
97. *Homo sapiens matrix metalloproteinase 9 (MMP9), mRNA*. NCBI Reference Sequence: NM_004994.2; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004994.2.
98. *Homo sapiens matrix metalloproteinase 13 (MMP13), mRNA*. NCBI Reference Sequence: NM_002427; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002427.
99. *PREDICTED: Homo sapiens collagen type VI alpha 3 (COL6A3), transcript variant X2, mRNA*. NCBI Reference Sequence: XM_006712253; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_006712253.
100. Skousgaard, S.G., et al., *Sex differences in risk and heritability estimates on primary knee osteoarthritis leading to total knee arthroplasty: a nationwide population based follow up study in Danish twins*. *Arthritis Res Ther*, 2016. **18**(1): p. 46.
101. van Saase, J.L., et al., *Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations*. *Ann Rheum Dis*, 1989. **48**(4): p. 271-80.
102. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(9): p. 981-1000.
103. Rutgers, M., et al., *Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010. **18**(1): p. 12-23.
104. Madry, H., et al., *Early osteoarthritis of the knee*. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016. **24**(6): p. 1753-62.
105. Hsueh, M.F., P. Onnerfjord, and V.B. Kraus, *Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis*. *Matrix Biol*, 2014. **39**: p. 56-66.
106. Haywood, L., et al., *Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(8): p. 2173-7.
107. Goldring, M.B. and M. Otero, *Inflammation in osteoarthritis*. *Curr Opin Rheumatol*, 2011. **23**(5): p. 471-8.
108. Kim, K.S., et al., *Taurine chloramine differentially inhibits matrix metalloproteinase 1 and 13 synthesis in interleukin-1beta stimulated fibroblast-like synoviocytes*. *Arthritis Res Ther*, 2007. **9**(4): p. R80.
109. Reboul, P., et al., *The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(9): p. 2011-9.
110. Favero, M., et al., *Early knee osteoarthritis*. *RMD Open*, 2015. **1**(Suppl 1): p. e000062.
111. Bau, B., et al., *Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(10): p. 2648-57.

112. Ma, C.H., et al., *Protective effects of tumor necrosis factor-alpha blockade by adalimumab on articular cartilage and subchondral bone in a rat model of osteoarthritis*. Braz J Med Biol Res, 2015. **48**(10): p. 863-70.
113. Golestani, R., et al., *Matrix metalloproteinase-targeted imaging of lung inflammation and remodeling*. J Nucl Med, 2016.
114. Johansson, N., et al., *Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development*. Dev Dyn, 1997. **208**(3): p. 387-97.
115. Stahle-Backdahl, M., et al., *Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis*. Lab Invest, 1997. **76**(5): p. 717-28.
116. Yamamoto, K., et al., *MMP-13 is constitutively produced in human chondrocytes and co-endocytosed with ADAMTS-5 and TIMP-3 by the endocytic receptor LRP1*. Matrix Biol, 2016.
117. Specks, U., et al., *Structure of recombinant N-terminal globule of type VI collagen alpha 3 chain and its binding to heparin and hyaluronan*. Embo j, 1992. **11**(12): p. 4281-90.
118. Wolfe, G.C., et al., *Differential in vivo expression of collagenase messenger RNA in synovium and cartilage. Quantitative comparison with stromelysin messenger RNA levels in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients and in two animal models of acute inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 1993. **36**(11): p. 1540-7.
119. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors*. Arthritis Res, 2002. **4**(3): p. 157-64.
120. Chakraborti, S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 269-85.
121. Lipari, L. and A. Gerbino, *Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9) in human articular cartilage*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2013. **26**(3): p. 817-23.
122. Blain, E.J., et al., *Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro*. Arch Biochem Biophys, 2001. **396**(1): p. 49-55.
123. Tsuchiya, K., et al., *Osteoarthritis: differential expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in nonfibrillated and fibrillated cartilage*. J Orthop Res, 1997. **15**(1): p. 94-100.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen; Abteilung Siegfried-Weller-Institut an der Universität Tübingen von Andrea Egler unter Betreuung von Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs. Die Versuche, welche in Kapitel 2.2 und 2.3.4 beschrieben sind, wurden nach Einarbeitung durch das Labormitglied Franziska Buck, die Versuche, welche in Kapitel 2.3 beschrieben sind, nach Einarbeitung durch das Labormitglied Jan Schröder und die Versuche welche unter 2.4 beschrieben sind, nach Einarbeitung durch das Labormitglied Tatiana Uynuk-Ool, von mir eigenständig durchgeführt. Die Versuche, welche in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben sind, wurden von mir nach Einweisung durch das Labormitglied Marina Danalache eigenständig durchgeführt. Alle weiteren Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich, nach Einweisung in ANOVA-on-Ranks durch meinen Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs und der Exakte Test nach Fisher nach Empfehlung durch das Institut für Biometrie der Universität Tübingen.

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

Tübingen, den 16.10.2017

Danksagung

Eine Doktorarbeit ohne Hilfe fertig zu stellen ist unmöglich. Deshalb möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben diese Arbeit zu bewältigen.

Mein größter Dank geht an meinen Doktorvater und Betreuer Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolaufts, der mir jederzeit mit seinem Rat zur Seite stand und mir das Schreiben meiner Dissertation in seinem Labor ermöglicht hat. Außerdem möchte ich dem Siegfried-Weller-Institut und der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen danken, welche mir den strukturellen und finanziellen Rahmen dafür gegeben haben. Besonderer Dank geht dabei auch an die BGU Tübingen mit ihren Mitarbeitern und Frau Weihing (für die tolle Organisation), die Winghofer Klinik in Rottenburg und den beteiligten Mitarbeitern, sowie alle Patienten, die mir die Untersuchung an menschlichem Gewebe zur Datenerhebung ermöglicht haben.

Ein großer Dank auch an das IZKF Promotionskolleg der Universität Tübingen, welches mir ideell und finanziell stets eine unverzichtbare Stütze war.

Ein weiteres großes Dankeschön an alle Mitglieder im Labor. An Franziska Buck, Jan Schröder und Tatiana Uynuk-Ool, die mich eingearbeitet haben, mir bei Fragen jederzeit zur Seite gestanden und mir mit neuen Anregungen stets weitergeholfen haben. Ebenso danke an Rosa Riester, Marina Danalache, Florian Bonaire, Sina Bast und Maximilian Holweg, der Abteilung Klein für die Benutzung des NanoDrop 1000V, der Klinik für Anästhesiologie für die Benutzung des Homogenisators und weiteren Labormitarbeitern, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für ihre Unterstützung danken, dabei besonders meinem Bruder Thomas Egler für die große Unterstützung bei der Erstellung von Abbildung 1.