



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie Klinikum rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe)

Die in vitro Response osteoarthrotischer Knorpel-Knochen-Zylinder unter Hyaluronsäure-Einfluss während physiologisch-mechanischer Stimulation

Florian Dieter Güll

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe 2. apl. Prof. Dr. H. W. Gollwitzer

Die Dissertation wurde am 14.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.09.2016 angenommen. **Meiner Familie**

Inhaltsverzeichnis

Inha	LTSVERZEICHNIS	3
Авк	ÜRZUNGEN	5
1.	EINLEITUNG	7
1.1.	Das Kniegelenk	.7
1.2.	Hyaliner Gelenkknorpel	. 8
1.2.1	Chondrogenese	. 8
1.2.2	Die Extrazelluläre Matrix	. 8
1.3.	Die Gonarthrose	. 9
1.3.1	Radiologische Einteilung der Arthrose nach Kellgren und Lawrence (K&L)	10
1.3.2	Molekularbiologische Pathogenese	11
1.3.3	Therapiemöglichkeiten von Gonarthrose	12
1.4.	Matrixmetalloproteinasen	13
1.4.1	Struktur und Funktion von Matrixmetalloproteinasen	13
1.4.2	MMPs in arthrotischen Gelenken	15
1.5.	Nachweismethoden von MMPs und Bestandteilen der extrazellulären Matrix	
(EZM)	17
1.6.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
1.7.	Überblick über Bioreaktoren	22
1.8.	Aufgabenstellung	24
2.	MATERIAL UND METHODEN	25
2.1.	Zellkultur	26
2.1.1	Knorpelentnahme und Vorinkubation	26
2.1.2	Knorpelkultivierung im Bioreaktor	29
2.2.	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.1	RNA-Isolation aus dem Knorpel	31
2.2.2	Messen der RNA-Konzentration	32
2.3.	Histologische Methoden	37
2.3.1	Anfertigen der Histologischen Schnitte	37
2.3.2	Hämatoxylin-Eosin- (H.E.) Färbung	38
2.3.3	Safranin-O-Lichtgrün-Färbung	38
2.4.	Statistische Methoden	39
2.4.1	Molekularbiologische statistische Methoden	39
2.5.	Histologische statistische Auswertung	40
3.	ERGEBNISSE	11

3.1.	Molekularbiologische Ergebnisse	41
3.1.1	.MMP-1	41
3.1.2	.MMP-2	43
3.1.3	.MMP-13	45
3.1.4	Aggrekan	47
3.1.5	.Kollagen II	49
3.2.	Histologische Ergebnisse	51
3.2.1	.Statistische Auswertung	51
3.2.2	.Histologische Ergebnisse der HE und Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen	53
4.	DISKUSSION	58
4.1.	Diskussion der Methoden	58
4.2.	Die in vitro Response: Molekularbiologische Ergebnisse	60
4.2.1	.Matrixmetalloproteinasen	60
4.2.2	Extrazelluläre Matrix Bestandteile	64
4.3.	Histologische Ergebnisse	67
4.4.	Hyaluronsäure in der Arthrosebehandlung	68
4.5.	Anregungen und Limitierungen	69
4.6.	Ausblick	70
5.	ZUSAMMENFASSUNG	72
6.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
7.	TABELLENVERZEICHNIS	76
8.	QUELLENNACHWEISE	77
9.	PUBLIKATIONEN	90
Anh	ÄNGE	91
Dan	KSAGUNG	97

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
A.dest	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AFC	3-Amino-9-ethylcarbazole
an	anterior-nosterior
BZW	heziehungsweise
	Cluster of Differentiation 8 positiv
	Kohlonotoffdiavid
	Cuelessurgenees
a.n.	das nelist
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	et altera
EZM	Extrazellulärmatrix
G	Gravitationskonstante
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
aDNA	genomische DNA
aaf	gegebenenfalls
GI	gastrointestinal
н.с. Ц.	Nullbypothese
	Wasser
	Wasser
	Alternative mathema
H _A	Alternativnypotnese
HZ	Hertz
IL II.	Interleukin
IL-1β	Interleukin-1β
IQR	Interquantilsabstand
i.S.	im Sinne
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite
K&L	Kellgren und Lawrence Grad
kDa	Kilodalton
Μ	Mol
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPa	Megapascal
mRNA	messenger-RNA
MT1-MMP	Membrane-type-1 Matrixmetalloproteinase
Να	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
Nr	Nummer
	Nichtsteroidale Antirhoumatika
	Nuklappidtriphoonhot
INTE	πακιευδιαμηρησερητά

NF-ĸB	Nuclear Factor "kappa light chain enhancer" of activated B-Cells
0.g.	oben genannt(en)
p	probability
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
рН	potential Hydrogenii
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RQ	relative Quantifizierung
RT	reverse Transkriptase
Rt-PCR	reverse Transkriptase PCR
S.	siehe
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
S.O.	siehe oben
S.U.	siehe unten
Sec.	Sekunde(n)
Sog.	Sogenannte(n)
TE	Tris-EDTA
TEP	Totalendoprothese
TNF-a	Tumornekrosefaktor α
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Die Abkürzungen für die Puffer "RLT", "RW1", sowie "RPE" des RNeasy-Kits®w sind nicht weiter bekannt und stammen von der Firma Quiagen.

1. Einleitung

1.1. Das Kniegelenk

Das Kniegelenk ist das größte Gelenk im menschlichen Körper und besteht aus zwei Teilen, dem Patellofemoralgelenk und dem Femorotibialgelenk. Die knöchernen Anteile sind die Patella, das größte menschliche Sesambein, der Femur und die Tibia. Letztere kommunizieren über die beiden Femurkondylen des Oberschenkels mit dem dazugehörigen Tibiaplateau. Die Inkongruenzen der Gelenkflächen werden durch einen medialen und einen lateralen Meniskus ausgeglichen. Bei Flexions- und Extensionsbewegungen vollzieht sich eine Kombination aus Kompression sowie Rollund Gleitbewegung, wobei letztere auch durch die Synovialflüssigkeit ermöglicht wird (Putz et al. 2007). Umgeben wird das Gelenk von einer Kapsel. Die Gelenkflächen sind mit hyalinem Knorpel überzogen. Die Achse des Scharniergelenks steht parallel zum Untergrund, die mechanischen Achsen des Femurs und der Tibia stehen jeweils ca. 87° zur Knieachse, wobei im Falle der Tibia normalerweise die mechanische der anatomischen Achse entspricht. Aufgrund der Form des Femurs steht seine anatomische Achse ca. 81° zur Knieachse. Kinematisch gesehen wird das Kniegelenk nur begrenzt durch knöcherne Strukturen stabilisiert, denn die statische und dynamische Stabilität wird hauptsächlich durch die umgebenden Bänder und Muskeln hergestellt. Oftmals wird das Kniegelenk als Scharniergelenk beschrieben, jedoch besitzt es sechs Freiheitsgrade: neben der Flexion und Extension sind Innenund Außenrotation, Varus- und Valgusbewegungen, sowie für wenige Millimeter eine anterior-posterior Translation möglich (Abbildung 1) (Thompson 2009).



Abbildung 1. Die 6 Freiheitsgrade des Kniegelenks. Modifiziert nach Buescher et al. (Buescher E.S. et al.). Grün eingezeichnet sind die Richtungen der Freiheitsgrade.

Die Knieflexion wird aus vollständiger Extension und in Innenrotationsstellung des Femurs gegenüber der Tibia eingeleitet. Der Femur rollt und gleitet dabei charakteristisch auf dem Tibiaplateau zurück und vollzieht dabei eine Außenrotation. Aufgrund dieser Außenrotationsbewegung des Femurs ist die laterale Wegstrecke um ein Vielfaches größer als die mediale. Die Femurposition ist mit und ohne Flexorenkontraktion in ca. 30° und ca. 90° Flexion deutlich weiter posterior als in der Ausgangslage (Abbildung 2) (von Eisenhart-Rothe et al. 2012).



Abbildung 2. Kinematik des Kniegelenks a ohne und b mit Kontraktion der Flexoren. grün = 0° , blau = 30° , rot = 90° Flexion (von Eisenhart-Rothe et al. 2012)

1.2. Hyaliner Gelenkknorpel

1.2.1. Chondrogenese

Hyaliner Knorpel ist der klassische Knorpel des Gelenks. Das Knorpelgewebe besteht dabei hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix, denn die für die Knorpelbildung verantwortlichen Chondrozyten und deren Vorläufer, die Chondroblasten, machen lediglich 1% des Gesamtvolumens von hyalinem Knorpel aus. Aufgrund der damit verbundenen Zellarmut mit wenig bis keinen Blutgefäßen wird die Ernährung hauptsächlich über Diffusion sichergestellt. Mechanische Belastung wirkt dabei unterstützend in Hinblick auf die Verteilung von Nährstoffen. Folglich ist die metabolische Aktivität sehr gering und überwiegend auf anaeroben Stoffwechsel, wie der Glykolyse ausgerichtet (Buckwalter 1983).

1.2.2. Die Extrazelluläre Matrix

Die zellarme Extrazellularmatrix (EZM) besteht aus drei Klassen von Makromolekülen: Proteoglykane, Kollagene und nicht-kollagene Moleküle (Buckwalter 1983; Buckwalter et al. 2005).

Einleitung

Dabei haben Kollagene am Trockengewicht einen Anteil von bis zu 60%, wovon wiederum Kollagen II mit über 90% besonders stark vertreten ist. Die Quervernetzung insbesondere von Kollagen II, IX und XI, verleiht dem Knorpel seine Zugfestigkeit und Stabilität. In unmittelbarer Umgebung der Chondrozyten liegt ein hoher Anteil an Kollagen VI vor, welches die Chondrozyten mit der umgebenden Matrix verbindet (Buckwalter 1983; Buckwalter und Mankin 1997). Für die gallertige Konsistenz wird des Weiteren Aggrekan, ein Proteoglykan, gebildet, welches aus Chondroitinsufaltund Keratanketten besteht. Mehrere Proteoglykane sind an ein Core-Protein gebunden. Getragen wird dieser Komplex, der maßgeblich für die Wassereinlagerung und somit für die Belastungsfähigkeit verantwortlich ist, durch das Polysaccharid Hyaluronsäure (siehe unten und Abbildung 3).

Die Chondrozyten sind aber nicht nur bewegungslose Produzenten der EZM, sondern sie bewerkstelligen aktiv die Strukturierung sowie Anordnung dieser Makromoleküle und den Abtransport degradierter Anteile, abhängig vom Bedarf und der Belastung des Knorpels (Buckwalter 1983).



Abbildung 3. Molekularer Knorpelaufbau. Kollagene stellen das Grundgerüst der EZM. Für die Wassereinlagerung dienen Proteoglykane, welche mittels Linkprotein an ein Hyaluronsäure-Rückgrat gebunden sind. Abbildung modifiziert nach Vorlage von Chen et al. und Moreland (Chen et al. 2006; Moreland 2003).

1.3. Die Gonarthrose

Die Arthrose zählt zu den häufigsten Erkrankungen und ist Auslöser für körperliche Bewegungseinschränkungen; die Häufigkeit ihres Auftretens korreliert dabei mit zunehmendem Alter (van Saase et al. 1989). Bei dieser Erkrankung handelt es sich

Einleitung

um einen Degenerationsprozess des Gelenkknorpels mit Beteiligung des Knochengewebes, welches sekundär geschädigt und umgebaut wird (Abbildung 4). Als Ursache kommen Überbelastung, Traumata, sowie Fehlstellungen in Frage. Zusätzlich müssen aber auch (infektiöse) Entzündungen, sowie metabolische Grunderkrankungen als Auslöser in Betracht gezogen werden (Buckwalter und Mankin 1997; Silverwood et al. 2015). Zu Beginn der Erkrankung stehen belastungsabhängiger Schmerz und der sog. "Anlaufschmerz" im Vordergrund.



Abbildung 4. Hyaliner Knorpel in Safranin-O-Färbung im Vergleich. Links: gesunder junger Knorpel, mitte: gealterter gesunder Knorpel, rechts: OA (engl.: Osteoarthritis) arthrotischer Knorpel (Lotz und Loeser 2012). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Martin Lotz.

Im weiteren Verlauf kommen Ruheschmerz und eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit (engl.: Range of Motion, ROM) aufgrund der generalisierten entzündlichen Reaktion mit konsekutiver Fibrosierung hinzu (Wagenhauser 1991; Theiler 2002).

1.3.1. Radiologische Einteilung der Arthrose nach Kellgren und Lawrence (K&L)

Eine bis heute gültige radiologische Einteilung der Arthrosegrade wurde 1957 von Kellgren und Lawrence vorgenommen. In ihrer Veröffentlichung "Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis" legten sie die fünf Hauptkriterien für die Einteilung des Arthrosegrades anhand eines Röntgenbildes fest, welche in arthrotischen Gelenken vorzufinden sind:

- (1) Osteophyten an den kommunizierenden Gelenksknochen
- (2) Veränderte Form der Knochenenden
- (3) Periartikuläre Gelenksknöchelchen
- (4) Gelenksspaltverkleinerung mit subchondraler Sklerosierung
- (5) Pseudo- und Geröllzysten

Abhängig vom Ausmaß der Ausprägung können diese Gegebenheiten in vier Kellgren/Lawrence-Grade (K&L Scores) eingeteilt werden (Kellgren und Lawrence 1957):

K & L GRAD	AUSPRÄGUNG	
1	Fraglich	
11	Geringfügig	
111	Mittelschwer	
IV	Schwer	

Tabelle 1. Einteilung des Arthrosegrads nach Kellgren und Lawrence (Kellgren und Lawrence 1957).

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben aus arthrotischen Kniegelenken der radiologischen Arthrosegrade II und IV nach Kellgren und Lawrence verwendet (Abbildung 5).



Abbildung 5. Verwendete Kellgren und Lawrence Grade. Röntgenbild (ap) eines Kniegelenks mit Gonarthrose Grad II nach K&L (li.) und mit Gonarthrose Grad IV nach K&L (re.)

1.3.2. Molekularbiologische Pathogenese

Die Arthrose in Gelenken ist ein multifaktorielles Geschehen, bei dem zur Ursache interne und externe Stimuli auf den Knorpel beitragen (Abb. 8). Externe Stimuli beinhalten z.B. eine inadäquate oder zu große Belastung der Gelenke (Lane Smith et al. 2000).

Die einstige Annahme, Arthrose würde sich aber hauptsächlich durch Abnutzung und Überbeanspruchung entwickeln, wurde aufgrund neuerer Erkenntnisse mittlerweile verlassen. Es wird vielmehr als ein Prozess verstanden, der das gesamte Gelenk, inklusive Synovia und subchondralem Knochen, betrifft. Ob dieser nun vom beschädigten Knorpel und dessen Abbauprodukten ausgeht und die Gelenkentzündung somit selbst unterhält oder die Arthrose von der Synovia ausgeht, bzw. ob es sich um eine Kombination beider Möglichkeiten handelt, ist bisher nicht eindeutig geklärt (Berenbaum 2013). Einen großen Stellenwert haben auch intrinsische, immunologische Vorgänge, die zur Aktivierung von Immunzellen, wie CD8+, sowie zur Ausschüttung von Chemokinen, wie z.B. einer Reihe von Interleukinen (IL), führen (Abb. 8). Speziell IL-1 β ist neben TNF- α einer der wichtigsten Mediatoren, die zur Entstehung von Arthrose beitragen. Diese Mediatoren sind in aktiviertem Zustand in der Lage, ihre eigene Sezernierung zu erhöhen und die Expression weiterer Entzündungsproteine, wie Matrixmetalloproteinasen zu induzieren (Berenbaum 2013; Haseeb und Haqqi 2013; Scanzello et al. 2009; Tetlow et al. 2001).

1.3.3. Therapiemöglichkeiten von Gonarthrose

1.3.3.1. Operative Behandlungsmöglichkeiten

Eine operative Versorgung des betroffenen Gelenks mit einem Gelenkersatz stellt das Mittel der Wahl dar im Endstadium der Arthrose. Dabei können je nach Befallsmuster uni-, bi-, oder trikompartimentelle Endoprothesen zum Einsatz kommen (Diehl et al. 2013; Bruyere et al. 2014).

1.3.3.2. Konservative Behandlungsmöglichkeiten

Grundlage ist immer eine Basistherapie, welche die Patientenaufklärung über einen gegebenenfalls notwendigen Gewichtsverlust und aerobe Bewegungstherapie beinhaltet (Bruyere et al. 2014; Shan et al. 2015). Bei geringen Beschwerden kann sich die Therapie auf die Verschreibung von Physiotherapie und ggf. Einlagen beschränken; falls nötig kann die Therapie auch auf Gehhilfen, Wärmeapplikationen, manuelle Therapie, Akkupunktur, transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS), oder Patellartaping ausgeweitet werden (Bruyere et al. 2014); (Diehl et al. 2013).

Bei größeren Beschwerden können neben Paracetamol als Grundtherapeutikum auch SYSADOAs (Symptomatik Slow Acting Drugs in Osteoarthritis), wie Glucosaminsulfate oder Chondroitinsulfate, eingesetzt werden. Bei Persistenz sind ebenfalls topische NSAR (Nicht-steroidale Antirheumatika) oder topisches Caspaicin indiziert.

Für Patienten mit ausgedehnter Beschwerdepersistenz und fortgeschrittenem Beschwerdebild dient eine fortgeschrittene Pharmakotherapie, bei der NSAR intermittierend oder als Langzeittherapeutika eingesetzt werden. Je nach internistischen Risikofaktoren des Patienten sind nach klinischer Abwägung nichtselektive-NSAR in Kombination mit Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) empfohlen.

12

Die konservative Therapie kann zusätzlich mittels Einsatz von Opioiden eskaliert werden (Bruyere et al. 2014).

1.3.3.3. Intraartikuläre Injektionen als Behandlungsmöglichkeiten

Bei Ausschöpfen der o.g. pharmakologischen Therapieoptionen können bei Symptompersistenz als Teil der konservativen Therapie intraartikuläre Injektionen zum Einsatz kommen. Dabei finden neben Kortikosteroiden auch Hyaluronsäuren Verwendung (Bruyere et al. 2014).

Hyaluronsäure ist ein in der Synovialflüssigkeit natürlich vorkommendes Glykosaminoglykan und ein bedeutender Baustein des hyalinen Knorpels. Die Konzentration im Gelenk wird mit 1420 bis 3600 mg/L angeben. Sie gehört zur Gruppe der im Gelenk vorkommenden Polysaccharide, deren Grundeinheit abwechselnd aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-glucosamin besteht. Mit ihren negativ geladenen Carboxygruppen bindet sie Wasser, was zu ihrer hohen Viskosität führt (Laurent und Fraser 1992). Hyaluronsäure wird v.a. zur Viskosupplementation injiziert, da sie wichtiger Bestandteil der Synovialflüssigkeit und ihr Anteil im arthrotischen Gelenk um bis zu 50% vermindert ist. Trotz einer sehr kurzen Halbwertszeit von wenigen Stunden setzt die Wirkung während der intraartikulären Behandlung erst verzögert ein, kann aber Schmerzminderung bis -freiheit für bis zu etwa neun Monaten erzielen (Bellamy et al. 2006; Diehl et al. 2013; Laurent und Fraser 1992; Moreland 2003). In Verwendung finden sich in der Arthrosebehandlung nieder-, mittel- und hochmolekulare Hyaluronsäuren. Es wird jedoch diskutiert, dass niedermolekulare Präparate den mittel- und hochmolekularen Präparaten unterlegen Es wurden aber auch gegensätzliche Ergebnisse bezüglich des sind. Molekulargewichts und der therapeutischen Effizienz publiziert (Berenbaum et al. 2012; Gigante und Callegari 2011). Hinsichtlich des MMP-Metabolismus, welche im arthrotischen Gelenk eine wichtige Rolle spielt, konnte in vitro und im Tiermodell jedoch gezeigt werden, dass Hyaluronsäure auf molekularbiologischer Ebene den MMP-Stoffwechsel beeinflusst und zu einer Reduktion von knorpeldestruierenden MMPs führen kann (Hiraoka et al., 2011; Julovi et al. 2011).

1.4. Matrixmetalloproteinasen

1.4.1. Struktur und Funktion von Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind eine Gruppe von Enzymen, die an zahlreichen Gewebeumbau- und Abbauvorgängen beteiligt sind. Nissinen und Kähäri geben in einer Arbeit aus dem Jahr 2014 an, dass bis dato 23 Matrix-Metalloproteinasen identifiziert werden konnten, wobei diese in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Es wird zwischen Kollagenasen, Gelatinasen, Stromyelinen, und stromyelin-like MMPs unterschieden. Des Weiteren zählen zu den MMPs auch Martilysine, Transmembran-MMPs, GPI- (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) type-MMPs, MMP-19ähnliche und weitere MMP-Formen. Im Wesentlichen sind sie sich in der Struktur untereinander sehr ähnlich, indem sie ein Signalpeptid, eine katalytische Domäne und eine Hämopexin-ähnlichen Domäne (engl.: hemopexin-like domain) besitzen (Abbildung 6 und Abbildung 7 Nr.1) (Nagase und Woessner 1999; Nissinen und Kahari 2014). Unter physiologischen Bedingungen sind diese Proteasen im Gesunden streng reguliert, z.B. durch generelle Proteaseinhibitoren wie α -1 Antiprotease und α-2-Makroglobulin, sowie durch sehr spezifische Inhibitoren wie den Proteinen aus der Familie der tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), welche wiederum in vier Untergruppen (1 bis 4) eingeteilt werden. Matrixmetalloproteinasen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen, wie z.B. Autoimmunkrankheiten der Haut, des Gastrointestinaltrakts und der Gelenke, wie Arthritiden und Arthrose. Des Weiteren ist ihr Mitwirken in der Tumorgenese und progression bekannt.

Aktiviert werden die als Proenzyme sezernierten MMPs von plasmatische Proteasen, welche die Propeptidkomponente abspalten. Um als Proteinasen funktionieren zu können, besitzen sie in ihrem katalytischen Zentrum ein Zink-Ion (Nagase und Woessner 1999). In vitro Studien konnten zeigen, dass ein weiterer Aktivierungsmechanismus über die Interleukin-1 Rezeptor-ähnliche Domäne (engl.: IL-1 receptor-like domain) (Abbildung 7 Nr. 2), sowie durch das uPA/Plasminsystem bereitgestellt wird (Nagase und Woessner 1999; Schwab et al. 2004).



Abbildung 6. Grundstruktur von MMPs modifiziert nach Woessner (Nagase und Woessner 1999).





1.4.2. MMPs in arthrotischen Gelenken

Wie bereits angedeutet kommt bei der Pathogenese der Arthrose immunologischen Vorgängen eine große Bedeutung zu (Abbildung 8). Dabei kommt es zur Aktivierung von Immunzellen sowie zur Ausschüttung von Chemokinen, wie z.B. einer Reihe von Interleukinen. Speziell IL-1 β ist neben TNF- α einer der wichtigsten Mediatoren im Rahmen der Arthroseentstehung, indem dieses Zytokin zur Hochregulierung der MMP-Expression führt (Tetlow et al. 2001). Ein wichtiger Signalweg dabei ist der Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (uPAR). Dieser ist zugleich ein direkter Regulator von MMPs. Schwab et al. konnten in ihrer in vitro Studie zeigen, dass Chondrozyten, welche mit IL-1ß stimuliert wurden, nicht nur MMPs vermehrt exprimierten, sondern ebenfalls uPAR vermehrt nachweisbar war (Schwab et al. 2004). Ebenso wurde eine vermehrte Induktion anderer Proteasen beobachtet, welche Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen, wie Aggrekan und (Pro-) Kollagen-II, oder deren Synthese vermindern (Fan et al. 2005; Goldring et al. 1988; Nietfeld et al. 1990). Wichtige MMPs im Rahmen der Pathogenese der Arthrose sind vor allem MMP-1 und MMP-13. Wie Burrage et al. in ihrer zusammenfassenden Arbeit darstellen, sind diese MMPs innerhalb des arthrotischen Knorpels in verschiedener Weise und auch in verschiedenen Schichten am Knorpelabbau beteiligt. Während MMP-13 eher in den tiefen Schichten des Knorpels aktiv ist, wird MMP-1 vornehmlich in oberflächlichen Schichten vorgefunden. Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinasen bestehen hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Konzentration. Zum Beispiel zeigt MMP-13 aufgrund seiner Substratspezifität zu Kollagen II eine 5- bis 10-fach höhere Aktivität als MMP-1, wohingegen MMP-1 dafür in einer 10-fach höheren Konzentration vorliegt (Burrage et al. 2006).



Abbildung 8. Schematische Darstellung der Einflussfaktoren im arthrotischen Gelenk modifiziert nach Kapoor et al. (Kapoor et al. 2011).

1.4.2.1. MMP-1

MMP-1, auch Kollagenase-1 oder interstitielle Kollagenase genannt (Abbildung 9), war die erste Matrix-Metalloproteinase, die im Tiermodell vollständig sequenziert wurde (Goldberg et al. 1986). Eine Induktion der Genexpression geschieht vor allem durch das akute Phase Protein IL-1 β (Barchowsky et al. 2000). Da MMP-1 unter anderem im menschlichen Knorpel gegenwärtig ist, zählen zu seinen Zielstrukturen auch Typ II Kollagene (Mitchell et al. 1996).



Abbildung 9. Dreidimensionale Struktur der Matrixmetalloproteinase 1 (Bertini et al. 2012). Mit freundlicher Genehmigung vom Verlag Elsevier.

1.4.2.2. MMP-2

MMP-2, auch Gelatinase A genannt, hat als hauptsächliches Substrat Kollagen IV und Gelatin. Die Proteinase ist ebenfalls in der Lage, wie die interstitiellen Kollagenasen zu arbeiten (Aimes und Quigley 1995). Aber auch Kollagene, die zuerst von Kollagenasen abgebaut werden, degradieren bei Körpertemperatur zu Gelatin, welches dann wiederum zum Substrat für Gelatinasen wird (Johansson et al. 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass im entzündeten Gelenk MMP-2 zwar als wesentlicher Teil der abbauenden Enzyme exprimiert wird, jedoch konnte gezeigt werden, dass MMP-2 eher einem schwachen Einfluss von IL-1ß bzw. der Stimulation durch Zytokine unterliegt (Fan et al. 2005; Konttinen et al. 1999; Tetlow et al. 2001). Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Zymogen Pro-MMP-2 durch MT1-MMP aktiviert wird, welches in den oberflächlichen Knorpelschichten, sowie in der Übergangszone vorliegt. Die Höhe der MMP-2-Expression im arthrotischen Knorpel korreliert dabei linear mit der MT1-MMP-Expression und ist im arthrotischen Gelenk um ein vielfaches höher als im gesunden Gelenk. MMP-2 spielt eine bedeutende Rolle beim weiteren Abbau von Kollagenen, nachdem deren Triple-Helix-Struktur bereits abgebaut wurde. Des Weiteren werden durch MMP-2 ebenfalls Komponenten der EZM wie Aggrekan, Fibronektin, Typ X und XI Kollagene prozessiert (Imai et al. 1997).

1.4.2.3. MMP-13

Die Sequenzierung von MMP-13, auch Kollagenase-3 genannt, wurde erstmals 1994 veröffentlicht (Freije et al. 1994). Anfänglich war die Rolle von MMP-13 in der Tumormetastasierung bekannt, bevor die Bedeutung in der Genese von Arthrose entdeckt werden konnte. Im Vergleich zum Gesunden ist die Kollagenase im arthrotischen Gelenk vermehrt exprimiert, wobei diese innerhalb des Knorpels nicht nur in den oberflächlichen, sondern auch in den tieferen Schichten vermehrt nachweisbar sein kann (Burrage et al. 2006; Johansson et al. 2000; Moldovan et al. 1997; Tetlow et al. 2001; Tetlow und Woolley 1998; Shlopov et al. 1997).

Interessant ist, dass die Kollagenase-3 zur ihrer Aktivierung nicht nur auf andere Serin-Proteasen angewiesen ist, sondern auch Matrixmetalloproteinasen benötigt werden. Wie schon bei MMP-2 erwähnt, konnte auch im Falle von MMP-13 in vitro gezeigt werden, dass bei der Aktivierung MT1-MMP, sowie aktiviertes Protein C eine wesentliche Rolle spielen (Burrage et al. 2006; Jackson et al. 2014; Knauper et al. 1996; Mitchell et al. 1996). Im aktivierten Zustand kann MMP-13 Knorpelkollagene um einiges effizienter verarbeiten als MMP-1 (Burrage et al. 2006; Mitchell et al. 2006; Mitchell et al. 1996).

1.5. Nachweismethoden von MMPs und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM)

Zum Nachweis von MMPs können verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Dabei stehen zum einen bewährte Techniken, wie z.B. die Zymographie und die Immunhistochemie zur Auswahl. Aber auch neuere und zunehmend häufiger eingesetzte Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion, haben sich etabliert.

Die Zymographie ist eine oft verwendete semi-quantitative und sehr sensitive Nachweismethode von MMPs, die es erlaubt, kleinste Mengen von Proteinen nachzuweisen. Die MMP-Konzentrationen können bestimmt werden, indem bekannte Testkonzentrationen von rekombinanten MMPs im selben Versuch als Kontrolle dienen. Die Grundlage dieser Untersuchungsmethode ist eine Gelelektrophorese mit Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), um die Proteine zu linearisieren (Heussen und Dowdle 1980; Hu und Beeton 2010; Kleiner und Stetler-Stevenson 1994). Durch das SDS können Proteine entweder durch ihr Molekulargewicht oder durch elektrophoretische Geschwindigkeit unterschieden bzw. aufgetrennt werden (Kindt et al. 2006). Des Weiteren werden Substrate für die MMPs benötigt, im Falle von MMP-2 oder -9 z.B. Gelatine, bzw. Kollagen als Substrat für MMP-1 und -13. Unter konstanter elektrischer Ladung wandern die Proteine das Gel entlang, wobei kleinere Proteine in gleicher

Einleitung

Zeit eine weitere Strecke als große wandern (Hu und Beeton 2010). Anschließend kann die Enzymaktivität gemessen werden, indem das Substrat angefärbt wird. Verdaute Substrate hinterlassen eine klare Bande; je deutlicher die Verdauung erscheint, desto konzentrierter war die Protease im Versuchsmaterial (Hu und Beeton 2010). Als Nachteile der Zymographie zur Detektion von MMPs sind der nicht zu unterschätzende technische Aufwand (u.a. hinsichtlich der nachfolgenden Färbungen) und die nötige Arbeitsroutine, die diese Methode in Anspruch nimmt, zu nennen (Zucker et al. 1994). Obwohl sie sehr sensitiv ist, bleibt sie eine semi-quantitative Nachweismethode von Matrix-Metalloproteinasen (Heussen und Dowdle 1980).

Eine weitere Nachweismethode von MMPs stellt das Enzyme-linked Immunosorbend Assay (ELISA) dar (Zucker et al. 1995). Das Prinzip der heute gängigen ELISA-Verfahren ist der antikörperbasierte Nachweis von Enzymen. In unserer Arbeitsgruppe ist zur Detektion von MMPs das "Sandwich-Verfahren" etabliert. Dabei entsteht das sog. Sandwich aus (Detektions-) Antikörper-Antigen-Antiköper. Die Quantifizierung der MMP-Menge erfolgt durch die Messung der Lichtabsorption eines detektierbaren Farbstoffs, welcher über enzymatische Verdauung aus einer Substratlösung freigesetzt wird (Siebuhr et al. 2012). Im Gegensatz zur Zymographie wird diese zwar als sensitiver betrachtet, jedoch kann nicht zwischen ruhenden und aktiven Enzymen unterschieden werden (Zucker et al. 1994).

Um das Vorhandensein von MMP-Enzymen zu überprüfen kann auch die Immunhistochemie zur Anwendung kommen (Zhou et al. 2014). Hier kommen spezifische Antikörper zum Einsatz, welche nach vorheriger Beimpfung von Versuchstieren hergestellt werden (Edwards et al. 1996). Diese Antikörper, welche mit Detektoren gekoppelt sind, binden auf dem histologischen Präparat an ihre spezifischen Epitope der MMPs und markieren diese. Durch die Färbung der Detektoren werden diese somit sichtbar. Sind die Detektoren Fluoreszenzfarbstoffe, so nennt man dies auch Immunfluoreszenzfärbung. Grundsätzlich unterscheidet man eine direkte von einer indirekten Immunofluoreszenz. Beim direkten Anfärben ist der primäre Antikörper direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Bei der indirekten Methode ist der primäre Antikörper unkonjugiert und wird erst mit einem weiteren Reagenz an den Farbstoff gekoppelt (Kindt et al. 2006). Es handelt sich hierbei also um eine sehr sensitive Nachweismethode, die jedoch mehrere Nachteile in sich birgt. Dazu zählt die zur Vorbereitung notwendige und aufwändige Herstellung mehrerer histologischer Schnitte, um die verschiedenen Gewebsschichten darstellen zu können. Folglich können die jeweiligen Einzelschnitte möglicherweise die tatsächliche Menge des gesuchten Antigens nicht aussagekräftig repräsentieren. Eine

18

inhomogene Verteilung des gesuchten Antigens kann die Aussagekraft einer immunhistochemischen Auswertung ebenfalls limitieren. Die Immunhistochemie und die damit verbundene Bewertung der Färbung bleibt daher untersucherabhängig (Nistor et al. 2006; Vilmar et al. 2012).

Um den genannten Nachteilen auszuweichen und eine quantitative Methode anzuwenden, steht die Polymerase-Kettenreaktion zur Verfügung. Sie wird in der Literatur auch als Goldstandard zum Nachweis von Nukleinsäuren aufgeführt, welche das hauptsächliche Ausgangsmaterial dieser Studie darstellen (Mackay et al. 2002).

1.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Mitte der 80er-Jahre entwickelte Methode, welche DNA- oder cDNA-Produkte enzymatisch exponentiell amplifiziert (Saiki et al. 1985). Anders als bei einer herkömmlichen PCR, welche die amplifizierten Produkte erst am Endpunkt (z.B. mittels Gelelektrophorese) misst, werden die Produkte bei der real-time-PCR nach jedem Zyklus quantifiziert. Statt die vervielfältigten (c)DNA-Produkte direkt zu bestimmen, bedient sich die real-time-PCR der Fluoreszenz, deren mit der Anzahl der Zyklen ansteigende Intensität direkt proportional mit der Menge der kopierten PCR-Produkte ist (Abbildung 10). Je nach Menge des Ausgangsmaterials, ist die Amplifikationskurve in einem früheren oder in einem späteren Zyklus erkennbar, z.B. wenn das Ausgangsmaterial in geringen Mengen vorlag (Kubista et al. 2006).



Abbildung 10. Beispiel eines Amplifikationsgraphs mit Hintergrundrauschen. Werden Intensität und Zykluszahl gegeneinander aufgetragen, so entsteht der charakteristische Plot.

Während der PCR werden im Wesentlichen drei wichtige Schritte durchlaufen. Um die Bindung der Polymerase an die DNA zu ermöglichen, muss die doppelsträngige DNA aufgetrennt werden. Dies wird als Denaturierung bezeichnet. Damit die Primer, welche eine Komplementärsequenz zur DNA besitzen, binden können (sog. Annealing), ist eine Temperatur von 60°C nötig. Diese Temperatur liegt etwa 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur T_m der Primer. Bei kleinen Ausgangsmengen kann das Annealing zusammen mit der Verlängerung erfolgen (s.u.), welches gewöhnlich bei etwa 70°C stattfindet (Haras und Amoros 1994).

Die Messung einer Fluoreszenzänderung erfordert die vorhergehende Installierung einer Baseline, was empirisch oder automatisch erfolgen kann. Die Baseline stellt das Fluoreszenzlevel der initialen Zyklen dar, in denen noch geringe Aktivität vorliegt. Diese wird an das sog. "Hintergrundrauschen" angepasst. Derjenige Punkt, bei dem es zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der Baseline bezüglich der gemessenen Fluoreszenz kommt, wird Threshold (Schwelle) genannt. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz die Schwelle überschreitet, nennt sich Threshold-Cycle (Nehrer et al. 1997; Biosystems 2014). Anhand des Ct-Werts kann auch auf den relativen Mengenunterschied zwischen den Proben geschlossen werden. Hat z.B. Probe A eine doppelte Ausgangsmenge an DNA als Probe B, so überschreitet diese den Schwellenwert einen Zyklus früher als Probe B (Abbildung 11 und Abbildung 12) (Applied Biosystems 2014). Zur Einordnung der quantifizierten C_t-Werte erfolgt der Vergleich mit einem Standard-Housekeeping-Gen (Dheda et al. 2004).



Abbildung 11. Visualisierung unterschiedlich hoher Expressionslevel. Die linke Kurve (1) zeigt eine frühere Amplifizierung an, daher ist in dieser Gruppe das gesuchte Gen niedriger exprimiert als in der Gruppe mit der rechten Kurve (2).



Abbildung 12. Auswertung der Genexpression durch StepOne-Software. Barplotdarstellung der unterschiedlichen Expressionslevel von Proben 1 und 2 aus Abbildung 11.

Wichtig dabei ist eine hohe Effizienz der Amplifizierung, welche ein zuverlässiges Kopieren der DNA-Produkte in jedem Zyklus sicherstellt (Kubista et al. 2006). Bei der Verwendung von TaqMan®-Reagenzien wird vom Hersteller eine Effizienz von 90% bis 110% angegeben (Andergassen et al. 2013).



Abbildung 13. Schema der Taq-Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität nach Applied Biosystems (Applied Biosystems 2014).

Das verwendete TaqMan®-System ist ein zusammengesetzter Komplex aus TaqMan®-Polymerase, eine synthetischen Domäne und einer Domäne mit 5'-Nukleaseaktivität, welche in der Lage ist, Downstream-DNA, welche an der Zielsequenz gebunden ist, zu degradieren (Abbildung 13). Ein weiteres entscheidendes Merkmal dieser Domäne ist die Möglichkeit zum FRET, *Fluorescent Resonance Energy Transfer*, d.h. es werden zwei fluoreszierende Systeme nebeneinander verwendet, wobei ein System, ein sog. Quencher (Auslöscher), das andere System aufgrund eines niedrigeren Energielevels durch Energietransfer vom fluoreszierenden höheren Energielevel (Reporter) unterdrückt. Zu Beginn einer PCR-Reaktion ist dieses System noch intakt, jedoch dissoziieren diese beiden Systeme bei Fortschreiten der Reaktion aufgrund der unterschiedlichen Annealingorte, sodass der Reporterfarbstoff bei Polymerase- und Nukleaseaktivität fluoreszieren kann. Diese Fluoreszenz wird von einem speziellen Detektor im Thermocycler erkannt und mathematisch aufbereitet. Die verwendeten Mastermixe enthalten eine passive Fluoreszenz-Kontrolle (ROX[™]), um die in den Primern verwendete FAM-Fluoreszenz zu normalisieren, welche vom StepOne-System erkannt wird. Dies ist wichtig, um eine stabile Baseline zu etablieren und das Hintergrundrauschen von PCR-Reaktionsemissionen zu unterscheiden. Um auch auf Genexpressionsebene falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, werden als interne Kontrolle die Genexpressionen von Housekeeping Genen (s.u.) verwendet (Applied Biosystems 2014).

Die Genexpressionen einer stimulierten Probe werden mit der des Kalibrators verglichen. Parallel werden die Genexpressionen vom Housekeeping-Gen GAPDH im Kalibrator und in der stimulierten Probe miteinander verglichen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen werden nochmals gegeneinander ausgewertet und die Höhe der Vervielfachung ermittelt:

 $\Delta C_{t \text{ Probe}} = C_{t \text{ gesucht}} P^{\text{Probe}} - C_{t \text{ Standard}} P^{\text{Probe}}$ $\Delta C_{t \text{ Kalibrator}} = C_{t \text{ gesucht}} K^{\text{Alibrator}} - C_{t \text{ Standard}} K^{\text{Alibrator}}$ $\Delta \Delta C_{t} = C_{t \text{ Probe}} - C_{t \text{ Standard}}$

Mit: Probe = stimulierte Probe; Kalibrator = unstimulierte Probe (Kontrolle, s.o.) Ct Standard ist derjenige Zyklus mit Schwellenwertüberschreitung der unstimulierten Probe Ct gesucht ist derjenige Zyklus mit Schwellenwertüberschreitung der stimulierten Probe

Die ermittelten $\Delta\Delta C_t$ – Werte werden nun zur Ermittlung der relativen Quantifikation in folgende Formel eingesetzt: 2^{- $\Delta\Delta Ct$} (Applied Biosystems 2014; Boone et al. 2014; Dheda et al. 2004).

1.7. Überblick über Bioreaktoren

Beim Fortschreiten einer Arthrose handelt es sich um einen Prozess, welcher in vivo einer zyklischen Belastung unterliegt (Buckwalter et al. 2013). Bioreaktoren ermöglichen hierzu eine Zellkultur, welche der Physiologie im Organismus näher ist als die bisherigen, herkömmlichen Kultivierungsbedingungen der Zellkultur. Neben chemischen Belastungen im Kulturmedium lassen sie auch mechanische Belastungen zu. Somit können bisher unbekannte zelluläre Vorgänge besser erforscht oder neue therapeutische Ziele effektiver erkannt werden (Portner et al. 2005; Spitters et al. 2013). Wegen der unterschiedlichen Beanspruchung benötigt jedes Gewebe auch seine ganz individuelle Bioreaktorgestaltung (Ratcliffe und Niklason 2002). Hinsichtlich der unterschiedlichen Bauart und Zweckerfüllung können die Bioreaktoren, die in der Knorpelforschung hauptsächlich verwendet werden, in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Grad et al. unterscheiden zwischen Bioreaktoren basierend auf hydrostatischem Druck, Zug, Kompression, sowie Kompression kombiniert mit Scherkräften (Grad et al. 2011). Neben diesen genannten Bioreaktoren fanden aber auch sog. Spinner Flasks Anwendung. Hier übt die durch Rotation induzierte Gravitation Scherkräfte auf den Knorpel aus. Sie sind eher den geschlossenen Systemen zuzuordnen, welche den Knorpel durch Diffusion ernähren. Durch ihre Einfachheit simulieren sie die physiologischen Belastungen auf den Knorpel nicht ausreichend (Mauck et al. 2000). Bioreaktoren, welche hauptsächlich mit hydrostatischen Druck arbeiten, werden eingesetzt, um innerhalb einer Chondrozytenkultur die Matrixentstehung zu stimulieren, wobei je nach Kulturart die Höhe des Drucks, die Frequenz und die Dauer der Stimulation angepasst werden müssen. Beispielsweise führen 5.0 MPa Druck bei einer Frequenz von 0.5 Hz in einer Monolayerkultur zu einer verminderten Glykosaminoglykan-Synthese, wohingegen in einer Explantkultur diese vermehrt wurde. Bioreaktoren, welche die Knorpelkultur unter Zug versetzen, spielten bisher eher eine untergeordnete Rolle, da diese Art von Stimulation tendenziell mehr negative Folgen für die Knorpelmatrix hatte. Die meisten Arbeitsgruppen verwendeten jedoch Druck ohne oder in Kombination mit Scherkräften, um die Belastungen der menschlichen Gelenke möglichst gut zu simulieren, wobei die Integration von Roll-und Gleitbewegungen eine große Rolle spielen. Die tatsächlichen Verhältnisse sind aber viel komplexer und schwer zu simulieren, da selbst innerhalb des gleichen Gelenks die Knorpelbelastung erheblich variieren kann (Grad et al. 2011).

Komplexere Bioreaktoren, welche mit alleiniger Kompression arbeiten, stellen die Proform der tribolischen Pin-on-Ball-Systeme dar. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits die Berücksichtigung von Knorpelbelastung eine Erhöhung der Genexpression extrazellulärer Matrixbestandteile als Resultat hatte oder diese durch verschiedene Arten der Kraftapplikation beeinflussbar sind (Angele et al. 2004); (Davisson et al. 2002). Bezüglich der Art der mechanischen Stimulation kommt auch Abscherkräften eine große Bedeutung zu (Waldman et al. 2003). Diese Erkenntnisse führten dazu, eine noch genauere Simulation der Bewegungsabläufe in menschlichen Gelenken zu konstruieren, welche neben Kompression und Abscherkräften auch Gleitbewegungen mitberücksichtigen.

Um die in vivo Verhältnisse im Knie zu simulieren, eignet sich ein Bioreaktor mit der Möglichkeit Druck-, Gleit-, und Scherkräfte kombiniert anzuwenden (Abbildung 14). Ein sogenanntes Pin-on-Ball-System nach den Vorgaben von Wimmer et al. wird hauptsächlich für bereits dreidimensional organisierte Knorpelproben eingesetzt wird (Wimmer et al. 2004; Wimmer et al. 2009).



Abbildung 14. Pin-on-Ball-System verwendet im Bioreaktor von Endolab. Die Keramikkugel stellt den Ball dar, welche auf die Knorpelprobe, also den Pin, Kraft ausübt.

1.8. Aufgabenstellung

In dieser Arbeit war es Zielsetzung, matrixdegradierende Prozesse im Knorpelgewebe, wie sie bei der Arthrose vorzufinden sind, zu erzeugen. In diesem artifiziellen Milieu war unter mechanischer Belastung die Wirkung von Hyaluronsäure auf den Knorpelmetabolismus zu untersuchen.

Dies sollte erreicht werden mittels:

- Implementierung eines Bioreaktors in die kliniknahe Arthroseforschung
- Etablierung einer möglichst sensitiven Nachweismethode für MMPs im arthrotischen Knorpel sowie Komponenten der extrazellulären Matrix
- histologischer Beschreibung der verschiedenen Kultivierungs- bzw.
 Belastungsschemata
- statistischer Auswertung der vorgefundenen Ergebnisse und Vergleich mit dem gegenwärtigen Stand der Forschung

2. Material und Methoden

Die Laborarbeiten beinhalten nach der Probengewinnung die Vorinkubation der Proben, die Kultivierung im Bioreaktor sowie molekularbiologische und histologische Analysen. Der Arbeitsablauf wird in Abbildung 15 zusammengefasst.



Abbildung 15. Allgemeiner Ablaufplan der Laborarbeiten

2.1. Zellkultur

2.1.1. Knorpelentnahme und Vorinkubation

Die bei der Knie-Totalprothesen-Implantation gewonnenen distalen Femurschnitte wurden noch während der Operation übergeben. Der Entnahmeort war dabei immer der weniger von Arthrose betroffene Kondylus, d.h. bei einer Varusgonarthrose das laterale, bei einer Valgusgonarthrose das mediale Kompartiment (Abbildung 16). Direkt im Anschluss wurden die Knochen-Knorpel-Zylinder mittels einer Lochstanze, welche einen Durchmesser von 6 mm fasst, unter sterilen Bedingungen gewonnen (Abbildung 17 und Abbildung 19) und im Zellkultumedium in einer 6-Well-Platte im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt (Abbildung 18).



Abbildung 16. Knorpelentnahme aus Femurkondyle. Die Probengewinnung durch Anbringung der Lochstanze und Entnahme des Zylinders.



Abbildung 17. Übersicht Femurkondyle und Knochen-Knorpel-Zylinder.



Abbildung 18. Beginn der Kultivierung in einer 6er-Well-Platte zur Gewöhnung an in vitro Bedingungen.



Abbildung 19. Knochen-Knorpelzylinder-Entnahmeorte. Abbildung modifiziert nach Sobotta 22.A (Putz et al. 2007). Rot markiert sind beispielhaft die Entnahmeorte mittels Lochstanze mit Innendurchmesser 6,0 mm.

Die Zylinder wurden am Folgetag erneut mit neuem Kulturmedium versorgt und über weitere drei Tage zur Vorbereitung an in vitro Bedingungen kultiviert. Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter einer Laminar-Flow-Sterilwerkbank getätigt und die Arbeitsmaterialien im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Als Medium wurde ein Basismedium für Chondrozyten gewählt. Zur Herstellung wurden in 500ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (MEM) Low Glucose Medium, Primocin (0,2%), Vitamine (1%), sowie Glutamin (1%) gelöst. Für den Mediumwechsel wurden jeweils 50ml Knorpelkulturmedium hergestellt, in welches zusätzlich zum Basismedium folgende Substanzen zugeführt wurden:

Zusätze	Endkonzentration
Dexamethason	0,2 %
Ascorbinsäure-2-Phosphat	1%
Natrium-Pyruvat	1%
Prolin	1%
ITS+1 Liquid Media Supplement	1 %

Tabelle 2. Zusätze zum Basismedium für Knorpelkulturmedium.

Zur Verwendung wurden in destilliertem Wasser L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (0,5%), L-Proline (0,4%) und Natrium-Pyruvat (1%) gelöst; zusätzlich wird 1% ITS+1 Liquid Media Supplement beigemengt, welches gebrauchsfertig ist und aus ITS Media Supplement mit 50mg/ml bovinen Serumalbumin und 470µg/ml Linolsäure besteht Die Kultivierung sowie die Zusammensetzung der Medien erfolgte nach laborinternen Protokollen und Modifikationen.

2.1.2. Knorpelkultivierung im Bioreaktor

Nach viertägiger Vorinkubation wurden die Knochen-Knorpel-Zylinder aus dem Inkubator entnommen und in den Bioreaktor überführt. Als Kontrolle diente jeweils ein Knochen-Knorpelzylinder, der lediglich im Knorpelkulturmedium im Bioreaktor mit kultiviert und nicht weiter stimuliert oder belastet wurde. Eine weitere Probe wurde, wie alle folgenden Proben, mechanisch belastet. Den weiteren Proben wurde zusätzlich 2ng/ml IL-1β zugesetzt. Den letzten beiden Proben einer Patientenreihe wurde, zusätzlich zum Interleukin, eine niedrige Konzentration (1mg/ml HA) sowie eine hohe Konzentration (3mg/ml HA) zum Kulturmedium zugegeben (Abbildung 20). Bei der Hyaluronsäure wurde das Präparat OSTENIL® mit einem mittleren Molekulargewicht von der Firma TRB Chemedica verwendet. Es handelt sich dabei Hyaluronsäurepräparat (1% Natrium-Hyaluronsäure) um ein mit einem Molekulargewicht von etwa 1200-1400 kDa, welches zusätzlich Natriumchlorid, Natriummonohydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, sowie Aqua ad injectabile enthält (Tikiz et al. 2005; TRB Chemedica LTD 2009).



Abbildung 20. Kultivierungsschema Bioreaktor.

Um die Bewegung des menschlichen Kniegelenks simulieren zu können, verfügt der Bioreaktor über die Möglichkeit, Dreh-, Kompressions-, und Scherbelastungen auf die Proben auszuüben. Dazu rotierten die Keramikköpfe um die Horizontalachse und die Probenhalterungen mit der Probenbeschriftung um die Vertikalebene (Abb. 24). Dabei werden Schwenkamplituden der Keramikköpfe von 30°, sowie der Probenhalterungen von 15° erreicht (Abb. 21).

Die mechanische Belastung wurde täglich für zwei Stunden ausgeführt. Dabei wurde auf die Zylinder eine Belastung von 2.0 MPa bei 0,5 Hz Horizontal- und 0,1 Hz Vertikalbelastung eingestellt (Fitzgerald et al. 2006; Sauerland et al. 2003; Waldman et al. 2007).

Abbildung 21. Inkubation im Bioreaktor. Richtungen der Krafteinwirkung auf die Knochen-Knorpelzylinder (links dargestellt).

Die Kulturbedingungen im Bioreaktor waren identisch zu jenen der Vorinkubation. Die Proben wurden in speziell angefertigte Passformen mit einem Füllvolumen von ca. 8ml eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein nonconfined-System, in welchem die Knorpel zur besseren Versorgung durch das Medium nur am Knochen fixiert und am Knorpel freiliegend waren.

Nach zweitägiger Kultivierung der osteochondralen Zylinder erfolgte erneut ein Kulturmediumswechsel, bevor nach 5-tägigem Verbleib im Bioreaktor diese wieder entnommen wurden. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Knorpelzylinder vom Knochen mittels eines Skalpells. Diese wurden anschließend in zwei gleichgroße Hälften geteilt, eine für die molekularbiologischen Analysen, die Zweite für die histologische Auswertung (Abb. 15 bis 18). Alle Proben wurden schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. RNA-Isolation aus dem Knorpel

Alle Arbeiten wurden auf einem RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt. Zur Gewährleistung wurde RNase Away® verwendet. Damit eine endogene RNase-Aktivität so gering wie möglich gehalten werden kann, wurden die Pipettierarbeiten auf Eis getätigt.

Zum Aufschluss der RNA werden die Knorpelproben noch im tiefgefrorenen Zustand gemörsert, wozu ein RNase-freier Medikamentenmörser dient. Hierdurch wird der Knorpel pulverisiert. Zur weiteren RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini Kit® von

Qiagen verwendet und die Isolation nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip der Isolation basiert auf der von Chomczynski und Sacchi 1987 veröffentlichten Methode (Chomczynski und Sacchi 1987). Da die zu erwartende Knorpelzellmenge weniger als 5x10⁶ Zellen beträgt, werden 350µl RLT-Lysepuffer zum Knorpelpulver in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und das Gemisch mehrere Male gut auf- und abpipettiert, um die Zellen zu lysieren. Das im Lysepuffer gelöste β-Mercaptoethanol, sowie das Guanidium Isothiozyanat erfüllen zusätzlich die Aufgabe, RNase zu eliminieren. Anschließend erfolgt das Homogenisieren der Zellen, indem das Lysat nun in einen Quiashredder® gegeben und 2 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert wird. Damit die RNA im Verlauf in den Säulen gut an die Silicamembranen anhaftet und zudem die nicht anhaftende DNA ausgewaschen wird, bedarf es zusätzlich Ethanol (96-100%). Nach Messen des Durchflusses wird dazu Ethanol (70%) im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und das Lysat durch mehrmaliges auf- und abpipettieren durchgemischt. Im nächsten Schritt wird die RNA auf RNeasy-Säulen gebunden, wobei darauf zu achten ist, dass maximal 700µl auf eine Rneasy-Säule pipettiert werden; diese wird auf ein Auffang-Tube gesetzt. Bei einem größeren Volumen werden die Schritte der RNA-Bindung mit dem Rest entsprechend wiederholt. Anschließend erfolgt ein Zentrifugieren bei 8000 G (15 sec.), nachdem sich die RNA gebunden auf der Säule befindet. Damit die RNA gewaschen wird, muss zur Säule 700µl RW1-Puffer zugefügt und diese bei 8000 G (15 sec.) zentrifugiert werden. Nun werden der Säule 500µl RPE-Puffer zugeführt und diese wird für 15 sec. bei 8000 G zentrifugiert. Anschließend erfolgt eine zweite Waschung mit 500µl, jedoch wird bei diesem Durchgang für 2 min. bei 8000 G zentrifugiert. Um die RNA abschließend nochmals von restlichen Puffern zu reinigen wird die Säule für 1 min. bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Da die RNA noch von der Säule gelöst werden muss, wird auf diese 30µl RNase-freies Wasser pipettiert und nun für 1 min. bei 8000 G zentrifugiert. Die RNA findet sich nun im RNase freien Wasser gelöst. Aufgrund geringer Knorpelmengen konnte die RNA nur einmal isoliert werden, worauf pro Patient diese zweimal in DNA (s.u.) umgeschrieben wurde (Chomczynski und Sacchi 1987).

2.2.2. Messen der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration und –Reinheit erfolgte mittels Nanodrop®2000 und der dazugehörigen Software. Das Funktionsprinzip beruht auf der Messung der Lichtabsorption. Dabei wird die Intensität des Lichtstrahls, welcher in das Wasser mit der darin enthaltenen RNA eintritt, mit der Intensität des austretenden Lichtstrahls

32

verglichen. Die Abhängigkeit der Lichtabsorbierung in verdünnten Lösungen wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben: A = ϵ x c x d, wobei A der logarithmierte Quotient aus der Intensität des einfallenden und ausfallenden Lichts ist. ϵ ist der molare Extinktionskoeffizient (L mol⁻¹ cm ⁻¹), c die molare Konzentration der absorbierenden Substanz (mol/L) und d die Schichtdicke (cm).

Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260nm und Proteine von 280nm (Watts). Die Reinheit wird nun mittels Computer berechnet und als Quotient der beiden Wellenlängen als ²⁶⁰/₂₈₀ –Wert angegeben. Generell wird eine Probe mit einem Wert von ca. 2.0 als sehr rein angesehen (Nanodrop).

2.2.2.1. Reverse Transkription

Um die nachfolgende Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchführen zu können, ist es nötig, die vorher gewonnene Messenger-RNA (mRNA) in die "Complimentary DNA" (cDNA) zu transkribieren (Wilczynska et al. 2006). Für die Transkription der gewonnenen RNA wurde das für die spätere Präamplifizierung vom Hersteller empfohlene High Capacity Reverse Transcription Kit® verwendet. Eine Präamplifikation war aufgrund der sehr geringen Mengen an gewonnener RNA nötig. Der notwendige Mastermix wurde für 6 RNA-Proben inklusive Pipettierfehler siebenfach angesetzt (s. Tabelle 3.).

10x RT	2,0 µl	14,0 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl	5,6 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl	14,0 µl
MultiScribe Reverse	1,0 µl	7,0 µl
Transcription		
RNase Inhibitor	1,0 µl	7 µl
Nuclease-free water	3,2 µl	22,4 µl
TOTAL	10,0 µl	70,0 µl

Tabelle 3. Herstellung des 2X Mastermix für die Reverse Transkription.

Die im Mastermix enthaltenen Randomprimer können sich im ersten Schritt unspezifisch an die RNA anheften. Die Transkription erfolgt im zweiten Schritt bei 37°C durch die MultiScribe® Reverse Transkriptase, welche einen Mix aus dNTP, also Nukleotidtriphosphate, als Bausteine für die cDNA-Synthese verwendet. Die Transkriptase wird inaktiviert, indem im nächsten Schritt auf 85°C erhitzt wird. Vor Durchführung der reversen Transkription werden in die für eine RT-Reaktion geeigneten Reaktionsgefäße jeweils 10µl des 2X RT Master Mix pipettiert, sodass das Reaktionsvolumen 20µl beträgt. Aufgrund der hohen RNase-Aktivität von Knorpel wurde ein Kit mit Randomprimern (s.o.) gewählt, welches auch für degradierte RNA verwendet werden kann. Dazu werden 10µl RNA-Proben hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren durchgemischt. Durch anschließendes Zentrifugieren werden Luftblasen eliminiert. Die Reaktionsgefäße werden nun bis zur weiteren Verwendung im Thermocycler auf Eis gelagert.

Die reverse Transkription ist in vier Schritte mit folgenden Temperaturen unterteilt:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit (min)	10	120	5	Unendl.

Tabelle 4. Ablauf der Reversen Transkription.

Die RNA kann bis zur Weiterverwendung innerhalb 24h bei 2-6 °C und gelagert werden, wurde jedoch zur Langzeitaufbewahrung bei –25 °C eingefroren (Applied Biosystems 2000).

Um genomische DNA auszuschließen, wurde exemplarisch mit einer Referenzprobe eine PCR über 40 Zyklen gefahren. Die Amplifizierung zeigte, dass bei 40 Zyklen mit GAPDH als Referenzprimer keine oder erst sehr spät Amplifizierungen mit CT-Werten bei über 38 zu sehen waren, welche jedoch kein Plateau erreichten (Abbildung 22). Somit ist die Kontaminierung der Proben mit gDNA als sehr gering einzuschätzen. Die nachfolgende Präamplifizierung fand wiederum spezifisch mit den Primern der nachzuweisenden Gene statt.

Abbildung 22. Testung auf gDNA.

2.2.2.2. Präamplifizierung

Bei der Verwendung der kleinen Knorpelproben zur RNA-Gewinnung wurden aufgrund des zusätzlich zellarmen arthrotischen Knorpels nur kleine Mengen an RNA und folglich auch cDNA gewonnen. Damit dennoch eine erfolgreiche Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt werden kann, wurden die cDNA Proben präamplifiziert. Da die Proben für die PCR vergleichbar sein müssen, wurden die Proben gemäß der RNA-Ausgangskonzentration durch Verdünnung aneinander angeglichen. Zur Vorbereitung der Präamplifizierung werden die dazugehörigen 20x TagMan Gene Expression Assays® jeweils in einem Volumen von 10µl in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Wenn beispielsweise fünf verschiedene MMPs bestimmt werden sollen, müssen die 5 dazugehörigen Primer gesammelt werden, was ein Volumen von 50µl ergibt. Im nächsten Schritt werden die gesammelten TaqMan Assays mit 1xTrisEDTA (TE) Puffer verdünnt, sodass eine Konzentration von 0.2x entsteht. Im oben genannten Beispiel müssen zu den entstandenen 50µl TagMan Assays nun noch 950µl 1x TE gegeben werden. Das Protokoll wurde nach vorheriger Testung so modifiziert, dass 1 Volumenanteil zum gesammelten Assay hinzugegeben wurde, um ein ausreichendes Angebot sicherzustellen und bei der geringen Menge Pipettierungenauigkeiten, durch Verluste hervorgerufen, zu vermeiden. Abhängig von der Anzahl der Reaktionszyklen (10 oder 14) muss die Verdünnungsstufe gewählt werden. Für die höhere Anzahl der Zyklen spricht eine streng limitierte Probenanzahl oder eine hohe Anzahl an benötigten Wells in der PCR. Wir haben uns für 10 Zyklen entschieden, um ein möglichst reines Präamplifikat zu erhalten.

Für den Präamplifizierungsansatz werden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz/Komponente	Volumen (µl/Reaktion)
TaqMan Preamp Master Mix (2x)	25,0 μl
Pooled Assay mix	12,5 µl
1-250ng cDNA Probe und Nuklease-freies	12,0 µl
Wasser	
TOTAL	50,0 µl

Tabelle 5. Herstellung des Präamplifizierungsansatzes.

Die Amplifizierung unterteilt sich in 2 Schritte analog des Ablaufs der PCR (Tab. 7) mit Erreichen der Arbeitstemperatur für die Polymerase und Annealing der Primer, sowie der sich wiederholenden Zyklen, in denen die eigentliche Amplifizierung stattfinden soll (Tab. 6).

	HOLD	Zyklus (10 oder 14)	
Temperatur (°C)	95	95	60
Zeit	10 min	15 sec	4 min

Tabelle 6. Ablauf Präamplifizierung.

Nach der Präamplifizierung müssen die Reaktionsgefäße sofort auf Eis weiterbearbeitet werden oder bei –20°C eingefroren werden (Applied Biosystems 2010).

2.2.2.3. Durchführung der real-time-Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion wurde nach Herstellerangaben mit dem TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die vorher präamplifizierten cDNA-Produkte müssen vor der PCR im Verhältnis 1:5 mit 1x TE-Puffer verdünnt werden. Das Verhältnis wird durch die Anzahl der Präamplifikationszyklen (10 Zyklen, s.o.) bereits festgelegt.

Die einzelnen Wells der 96-Well-Platte werden also, wie in unserer Auswertung festgelegt, bei einem Reaktionsvolumen von 20µl wie folgt vorbereitet:

1,0 µl TaqMan® Gene Expression Assay, 5,0 µl, Präamplifizierte cDNA (1:5 verdünnt), 10,0 µl TaqMan® Gene Expression Master Mix, sowie 4,0 µl und Nukleasefreies Wasser. Es sollten dabei mindestens 10% Verlust wegen unvermeidbarer Pipettierungenauigkeiten bei der Planung berücksichtigt werden. Nachdem die 96-Well-Platte mit einer optischen Klebefolie versiegelt worden ist, wird die PCR nach folgendem Schema durchgeführt:

	Schritt 1	Schritt 2	Zyklus (40 Zyklen)	
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C
Zeit	2 min	10 min	15 s Denaturierung	1 min Annealing und Extension

 Tabelle 7. Ablauf der Polymerase Kettenreaktion.
 Denaturierung, Annealing und Extension

 erfolgen während der Zyklusphase.
 Participartiz/zeteex/zeteex/zeteex/zeteex/zeteex/zeteex/zeteex/zete
Zur Bestimmung der Genexpressionsmuster wurden die nachfolgenden TaqMan® Primer verwendet (Applied Biosystems 2010):

Humanes GAPDH:	Human GAPDH (NM_002046.3)
Matrix-Metalloproteinase-1:	MMP-1 (Hs00899658_m1)
Matrix-Metalloproteinase-2:	MMP-2 (Hs01548727_m1)
Matrix-Metalloproteinase-13:	MMP-13 (Hs00233992_m1)
Aggrekan:	ACAN (Hs00153936_m1)
Kollagen II:	Col2A1(Hs00264051_m1)

Tabelle 8. Verwendete TaqMan® Primer für die PCR.

Das Gen für die Glyzerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als valide interne Referenzkontrolle zur Bestimmung der Genexpressionen benutzt (Dheda et al. 2004). Aus den zwei cDNA-Proben pro Patient (s.o.) wurde jeweils eine PCR-Bestimmung durchgeführt. Die dritte PCR-Bestimmung ergibt sich aufgrund limitierter Verfügbarkeit aus einem Pooling von erster cDNA-Umschreibung und zweiter reversen transkribierten cDNA-Proben im Verhältnis 3:7. Die Ergebnisse der PCR wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt und die Daten zur statistischen Auswertung in das Statistikprogramm R überführt (s.u.).

2.3. Histologische Methoden

2.3.1. Anfertigen der Histologischen Schnitte

Die verbleibenden, tiefgefrorenen Knochen-Knorpelzylinder wurden als Kryoschnitte im Kryotom Kryostat MH 560 angefertigt. Dabei wurden eine Messertemperatur von -18°C und eine Objekttemperatur von -14°C, sowie eine Schnittdicke von ca. 9µm gewählt. Um die Proben im Kryotom befestigen zu können, wurden diese mit Gefriermedium an den Objektträger im Kryotom angehäftet. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte vollständig getrocknet, bevor diese wiederum gefärbt (s.u.) wurden. Die Anfertigung und Färbung der Präparate erfolgte nach laborinternen etablierten Methoden und Modifikationen.

2.3.2. Hämatoxylin-Eosin- (H.E.) Färbung

Zuerst müssen die Kryoschnitte aufgetaut und anschließend für 10-15 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA) gestellt werden. Anschließend werden die Schnitte in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) für 2 min. wieder rehydriert. Im nächsten Schritt wird mit Mayer's Hämalaun für 5 min gefärbt, woraufhin für 15 min fließend gewässert werden muss, bis keine Farbwolken mehr vom Schnitt abgehen. Im Anschluss erfolgt eine Gegenfärbung mit Eosin für etwa 5 Minuten und eine Spülung mit destilliertem Wasser. Um die Schnitte wieder zu entwässern erfolgt eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend mit einer kurzen Spülung in 70% und 80% Ethanol. Danach werden die Schnitte noch jeweils 5 min. in 90% und 96%, sowie zweimal je 5 min. in 100% Ethanol entwässert. Nach je zweimal 5 min. Xylol werden die Schnitte mit Eukitt® eingebettet und können zum Aushärten gelagert werden. Es wurde nach dem laborinternen Protokoll gefärbt.

2.3.3. Safranin-O-Lichtgrün-Färbung

Wie unter Punkt 2.3.2 wurden die Schnitte nach Auftauen in PFA für 10-15 min. fixiert und für 2 min. rehydriert. Danach werden die histologischen Präparate für 10 min. in einer Weigert'schen Lösung gefärbt, welche sich aus einer gebrauchsfertigen Stammlösung A und B zusammensetzt, wonach die Knorpelgewebe für 10 min. fließend gewässert werden müssen. Im Anschluss erfolgt die Färbung mit Lichtgrün für 5 Minuten. Nachdem die Schnitte kurz (10-15 Sekunden) mit Essigsäure (1%) behandelt wurden, erfolgt eine Gegenfärbung für 5 min. mit Safranin. Bei sehr starker Färbung kann mit destilliertem H₂O gespült werden. Abschließend erfolgt eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung, beginnend mit 5 min. 70% Ethanol und jeweils zweimal 5 min. in 96% und 100% Ethanol. Nach jeweils zweimal 5 min. Xylol-Behandlungen werden die Schnitte mit Eukitt® versiegelt (Rosenberg 1971). Das Safranin-O-Pulver wurde 1%-ig in 50% Ethanol, das Lichtgrün 1%-ig wässrig mit 2 Tropfen Eisessig in 100ml angesetzt.

2.4. Statistische Methoden

2.4.1. Molekularbiologische statistische Methoden

Die Grundlage für die molekularbiologische statistische Auswertung stellen die Werte der relativen Quantifikation dar, welche jeweils die Höhe der Genexpression repräsentieren (Boone et al. 2014). Um die verschiedenen Expressionslevel vergleichen und gegeneinander auswerten zu können, wurde für die statistische Auswertung durchgehend ein Wilcoxon Test für verbundene Stichproben gewählt (engl. Wilcoxon signed ranked test), da dieser eine Normalverteilung der Daten nicht voraussetzt. Für die Auswertung wurde ein zweiseitiger Test gewählt. Die Nullhypothese H_0 geht davon aus, dass zwischen dem Median der beiden Gruppen kein Unterschied besteht, wohingegen die Alternativhypothese H_A das Gegenteil darstellt. Bei einem Standardsignifikanzlevel von α = 0,05 wird die Nullhypothese bei einem p-Wert < α abgelehnt. Ist p > α kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden (Rosner 2011). Eine Korrektur von α aufgrund multipler Tests erfolgte wegen der geringen Patientenzahl nicht. Zur Auswertungsunterstützung und Graphikerstellung wurde die Software R mit der Benutzeroberfläche RStudio (Version 0.97.551 - © 2009-2012 RStudio, Inc.) benutzt. Die Barplots wurden mit dem Package "graphics" erstellt. Der Wilcoxontest für verbundene Stichproben benötigte das Package "stats" (R Team 2012; R Core Team 2013).

Zur Veranschaulichung wurde ein Standardbarplot mit den folgenden Merkmalen gewählt: In den Barplots stellt die Höhe eines Balkens den Mittelwert der Daten in der jeweiligen Gruppe dar. Zusätzlich sind Fehlerbalken eingezeichnet welche die Länge der Standardabweichung haben und jeweils vom Mittelwert ausgehend angetragen sind (Mittelwert \pm Standardabweichung) (Rosner 2011).

Gruppennummerierung	Belastungs- und Stimulationsschema
0	Kontrolle
1	Mechanische Belastung
2	Mechanische Belastung
	+ Interleukin-1β
3	Mechanische Belastung
	+ Interleukin-1β
	+ 1 mg/ml Hyaluronsäure
4	Mechanische Belastung
	+ Interleukin-1β
	+ 3 mg/ml Hyaluronsäure

Tabelle 9. Zuteilung der in den Graphiken verwendeten Zahlen zu den Proben.

2.5. Histologische statistische Auswertung

Die histologische Auswertung der Gewebsschnitte erfolgte durch drei unabhängige Bewerter. Der Auswertung liegt ein modifizierter Mankin-Score zugrunde. Dabei wurde die Auswertung der Knorpel-Knochengrenze, welche in der ursprünglichen Bewertungsskala vorzufinden ist, ausgelassen (Mankin und Lippiello 1970). Es wurde auszugsweise jeder zweite Patient eines Kultivierungszyklus ausgewertet, d.h. pro Kultivierungs- und Stimulationszyklus wurden die Knochen-Knorpelzylinder von zwei Patienten im Bioreaktor kultiviert, wovon jeweils ein Patient eines gemeinsamen Zyklus histologisch aufbereitet wurde.

Folgende Kriterien wurden untersucht und mit einem Punktwert versehen:

Knorpelstruktur	Normal	0
	Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Pannus, Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Risse bis in Überganszone	3
	Risse bis in Radiärzone	4
	Risse bis in verkalkte Zone	5
	Komplette Desorganisation	6
Zellmorphologie	Normal	0
	diffuse Hyperzellularität	1
	Cloning	2
	Hypozellularität	3
Intensität der Safranin-O- Färbung	Normal	0
	Gering reduziert	1
	Mäßig reduziert	2
	Stark reduziert	3
	Keine Färbung nachweisbar	4

Tabelle 10. Histologische Einteilung des Arthrosegrads abgeändert nach Mankin (s.o.).

Für die histologische Auswertung wurde die Urteilsübereinstimmung dreier unabhängiger Bewerter mittels Krippendorffs Alpha und Kendalls W untersucht. Dafür wurde in der Software R das Zusatzpackage "irr" verwendet (Gamer 2012). Beide Maße der Objektivität nehmen Werte zwischen 0 und 1 an, wobei ein hoher Wert für eine hohe Verlässlichkeit der Übereinstimmung steht. Ab einem Wert von 0.8 geht man in der Regel von einer hohen Übereinstimmung aus (Kendall 1962; Krippendorff 1986). Analog der molekularbiologischen Auswertung wurde auch bei der Histologie ein Wilcoxon Test (s.o.) verwendet um jeweils zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. Zusätzlich erfolgte eine Kontinuitätskorrektur bei der Berechnung. Diese führt zu einer besseren Näherung der binominalen Verteilung durch die Normalverteilung. Die Korrektur ist notwendig, wenn die verwendeten Rangsummen zur Berechnung der Teststatistik keine ganzen Werte annehmen (Rosner 2011).

3. Ergebnisse

3.1. Molekularbiologische Ergebnisse

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Gruppen (p<0,05) wurden mit einer Klammer und einem * in den Barplots gekennzeichnet. Zur Legende der Plots gibt es außerdem folgende Anmerkungen bezüglich der Achsenbeschriftungen:

Die Ordinaten beschreiben die jeweiligen Genexpressionen, ermittelt anhand des berechneten RQ-Wertes. Diese wurden über insgesamt drei PCR-Bestimmungen gemittelt. Die Abszisse enthält eine nominale Auflistung der verwendeten Proben. Die Zahlenkodierung wurde, wie in Tabelle 9 ersichtlich, festgelegt (Rosner 2011).

3.1.1. MMP-1

Die statistische Auswertung der MMP-1-Gesamtexpression (Abbildung 23) zeigt in den Barplots keinen Anstieg nach mechanischer Belastung. Nach alleiniger Zugabe von IL-1 β wurde die MMP-1-Expression hochreguliert, was sich als statistisch signifikant (p=0,04) erwies. Der Abfall der Expression nach einer Dosis von 1mg/ml HA ist markant, jedoch nicht signifikant (p=0,06). Zwischen 2 und 4 gibt es keine statistischen Unterschiede, auch die scheinbar höhere Genexpression bei gesteigerter Dosis HA zwischen Gruppe 3 und 4 hat keine statistische Signifikanz.



Abbildung 23. MMP-1 Gesamtexpression.

Nach Aufteilung der Proben nach dem K&L-Score kann bei Betrachtung des Grades II Abbildung 24) lediglich eine Hochregulierung der MMP-1-Expression nach Zugabe von IL-1β verglichen mit Gruppe 1 (p=0,22) beobachtet werden. Auch der Anstieg nach Zugabe von 3mg/ml HA im Vergleich zu Gruppe 2 ist deutlich, jedoch ohne statistische Signifikanz (p=0,69).



MMP-1 - Expression Kellgren/Lawrence II

Abbildung 24. MMP-1 Genexpression Kellgren/Lawrence Score II.

Die Proben mit dem höheren Arthrosegrad (K&L-Grad IV) in Abbildung 25 zeigten nach alleiniger physikalischer Belastung kein verändertes Expressionsmuster bezüglich MMP-1. Nach Zugabe von IL-1β kam es zwischen Gruppe 1 und 2 zu einem Anstieg der MMP-1-Expression (p=0,22), sowie zu einer Downregulation nach zusätzlicher Gabe von 1mg/ml HA und 3mg/ml HA zwischen Gruppe 2 und 3 (p=0,16) bzw. zwischen Gruppen 2 und 4 (p=0,44). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Es wurden zusätzlich jeweils die Probengruppen 3 und 4 der beiden K&L-Grade mit einander verglichen, um mögliche Unterschiede der HA-Wirkung abhängig vom Arthrosegrad feststellen zu können. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied des K&L-Scores auf die Gruppen mit HA-Applikation. Zwischen den Gruppen 3 des K&L-Score II und IV (p=0,81) sowie zwischen den Gruppen 4 des K&L-Score II und IV (p=0,65) gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.



Abbildung 25. MMP-1 Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.

3.1.2. MMP-2

Die Barplots für die MMP-2-Gesamtexpressionslevel (Abbildung 26) zeigen eine relativ homogene Verteilung. Lediglich die alleinige Stimulation mit IL-1β zeigt eine Hochregulierung der MMP-2-Expression. Hyaluronsäure konnte in diesem Versuch die Expression von MMP-2 zwar geringfügig bei der höher gewählten Dosierung verringern, jedoch waren alle Unterschiede zwischen den Probengruppen ohne statistische Signifikanz (p>0,05).



Abbildung 26. MMP-2 Gesamtexpression.

Die Auswertung der Proben mit Arthrose 2. Grades (Abbildung 27) zeigt zwischen Gruppe 0 und 1 eine statistisch nicht signifikante geringe Downregulation. In Gruppe 2 zeigt sich erneut eine Upregulation der MMP-2 Genexpression (p=0,078). Gruppe 3 (1mg/ml HA) hatte wiederum niedrigere Expressionswerte als Gruppe 2, jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (p=0,058).



Abbildung 27. MMP-2 Genexpression Kellgren/Lawrence Score II.

Die MMP-2-Expression bei Arthrose 4. Grades nach K&L (Abbildung 28) zeigte jeweils verglichen mit Gruppe 2 in Gruppe 3 (p=0,44) und 4 (p=0,32) eine statistisch nicht signifikante Downregulation der Expression. Eine alleinige physikalische Belastung der Proben resultierte in einer deutlichen, aber nicht signifikanten Hochregulierung der MMP-2-Expression (p=0,09).



Abbildung 28. MMP-2 Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.

Auch der Vergleich der beiden Arthrosegrade in Gruppe 3 und 4 miteinander zeigte keinen wesentlichen Unterschied bezüglich der MMP-2-Expression unter Hyaluronsäureapplikation.

3.1.3. MMP-13

Das artifiziell erzeugte arthrotische Kultivierungsmileu mit IL-1 β bewirkte bei der MMP-13 Gesamtexpression (Abbildung 29) einen statistisch signifikanten Anstieg (p=0,00098). Durch Applikation von 1mg/ml HA (Gruppe 3) wurden im Vergleich zu Gruppe 2 eine statistisch signifikant niedrigere Expression vorgefunden (p=0,007), ebenso zwischen Gruppe 2 und 4 (p=0,016).



Abbildung 29. MMP-13 Gesamtexpression.

Nach Unterteilung der Proben nach K&L-Grade zeigte sich bei den Proben mit geringeren Arthrosegrad (Abbildung 30) zwischen Gruppe 1 und 2 ein deutlicher Anstieg der MMP-13-Expression (p=0,063). Die zusätzliche Gabe von Hyaluronsäure konnte eine geringere Genexpression in Gruppen 3 (p=0,094) und 4 (p=0,094) verglichen mit Gruppe 2 erzielen. Diese Unterschiede waren nicht signifikant.



Abbildung 30. MMP-13 Genexpression Kellgren/Lawrence Score II.

Die nach K&L-Grad IV eingeteilten Proben (Abbildung 25) zeigten im Vergleich mit der Kontrollgruppe 0 nach alleiniger physikalischer Belastung (Gruppe 1) eine unveränderte Genexpression. Jedoch konnte nach IL-Applikation (Gruppe 2) verglichen mit Gruppe 1 eine statistisch signifikant gesteigerte Expression (p=0,031) erzielt werden. Verglichen mit Gruppe 2 zeigten Gruppe 3 und 4 erneut niedrigere Expressionslevel, wobei zwischen Gruppe 2 und 3 (p=0,063) und zwischen Gruppe 2 und 4 (p=0,16) keine statistische Signifikanz vorliegt.



Abbildung 31. MMP-13 Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.

3.1.4. Aggrekan

Vergleicht man, beide Arthrosegrade zusammengenommen (Abbildung 32), die Kontrollgruppe 0 mit der Gruppe 1 (rein mechanische Belastung), so kann eine leichte Hochregulierung ohne statistische Signifikanz (p=0,080) festgestellt werden. Nach Zugabe von Interleukin zum Kulturmedium wurde Aggrekan im Vergleich zur Probengruppe 1 deutlich und hoch signifikant herunterreguliert (p=0,0034). Verglichen mit der Kontrolle war diese Downregulation ebenfalls signifikant (p=0,020). Die Zugabe von Hyaluronsäure zeigte keine signifikante Änderung der Aggrekan-Expression.



Abbildung 32. Aggrekan Gesamtexpression.

Bei Betrachtung der Gruppe mit K&L-Grad II (Abbildung 33) zeigt sich kein Unterschied im Expressionslevel von Aggrekan bei physikalischer Belastung. Alleinig die Stimulation mit IL-1 β zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zu Gruppe 1 (p=0,031), sowie zwischen Gruppe 1 und 3 und 1 und 4. (p=0,031). Eine zusätzliche Applikation von HA zeigt in den Barplots keinen Unterschied.





Beim fortgeschrittenen Arthrosegrad IV zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 34). Die IL-Stimulation zeigte ein statistisch signifikant niedrigeres Expressionslevel von Aggrekan zwischen Gruppe 1 und 2 (p=0,031). Dieser Unterschied blieb auch signifikant niedriger bei zusätzlicher HA-Applikation zwischen Gruppe 1 und 3 (p=0,031), sowie 1 und 4 (p=0,016). Darüber hinaus zeigt die alleinige physikalische Belastung eine statistisch signifikante Hochregulierung (p=0,031) der Aggrekan-Genexpression bei fortgeschrittenem Arthrosegrad.

Aggrekan - Expression Kellgren/Lawrence IV







Vergleicht man die Arthrosegrade miteinander, so hat der Kellgrenscore zwar keinen Unterschied auf die jeweiligen Gruppen 1 beider K&L-Grade, aber Gruppe 3 zeigt eine statistisch signifikant höhere Aggrekan Genexpression (p=0,047) im K&L-Grad IV verglichen mit II. Bezüglich der Gruppen 4 ergab sich ein ähnliches Bild jedoch ohne statistische Signifikanz (p=0,078).

3.1.5. Kollagen II

Die statistische Auswertung der gesamten PCR-Ergebnisse von Kollagen II (Abbildung 35) zeigte ein ähnliches Muster, wie die Untersuchung der Genexpression von Aggrekan (s.o.). Es zeigt sich, dass die alleinige Belastung im Bioreaktor eine Hochregulierung der EZM-Komponente Kollagen II zur Folge hat. Dieser Unterschied besitzt keine Signifikanz (p=0,091). Wurde zusätzlich zum Kulturmedium Interleukin gegeben, resultierte dies, verglichen mit Gruppe 1, in einer statistisch signifikanten Downregulation der Kollagen II-Genexpression (p=0,025). Der Unterschied zwischen Gruppe 2 und der Kontrolle 0 war statistisch nicht signifikant (p=0,058). Die Anreicherung des Knorpelmediums mit Hyaluronsäure hat, verglichen mit Gruppe 2 weder in hoher (p=0,30), noch in niedriger Dosierung Auswirkungen auf die Kollagen II – Expression (p=0,46).



Abbildung 35. Kollagen II Gesamtexpression.

Nach Aufteilung der PCR-Ergebnisse in die jeweiligen Kellgren/Lawrence Scores zeigt sich in den Gruppen mit Arthrosegrad 2 ein deutlicher Anstieg der Kollagenexpression bei physischer Belastung im Bioreaktor (Abbildung 36), jedoch ohne statistische Signifikanz (p=0,30). Nach Zugabe von IL-1 β wurde Kollagen II herunterreguliert (p=0,078), was sich auch durch zusätzliche Zugabe von Hyaluronsäure in niedriger (p=0,78) und hoher Konzentration (p=0,11) nicht veränderte. Diese Feststellungen haben keine statistische Signifikanz.



Abbildung 36. Kollagen II Genexpression Kellgren/Lawrence Score II.

Auch bei K&L-Grad IV zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 37) wie bei Grad II. Die Belastung im Bioreaktor bewirkt eine Hochregulierung der Kollagen II – Expression und Interleukin eine Downregulation. Statistisch signifikant ist lediglich der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 4 (p=0,031).



Abbildung 37. Kollagen II Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.

Vergleicht man die Probengruppen 1 (p=0,94) und 2 (p=0,94) der jeweiligen Arthrosegrade miteinander, so kann kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des K&L-Scores festgestellt werden.

3.2. Histologische Ergebnisse

3.2.1. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte aufgrund der Probenanzahl ohne Unterteilung in die jeweiligen Arthrosegrade. Bezüglich der drei unabhängigen Beobachter ergab sich für die Gesamtauswertung eine Interobserver-Konkordanz von 0,90, welche durch Krippendorffs Alpha analysiert wurde. Krippendorffs Alpha ergab für die Schnitte vom Arthrosegrad Kellgren und Lawrence II eine Konkordanz von 0,94, bei K&L IV ergab die Übereinstimmung den Wert 0,79. Der Kendall's Coefficient of Concordance W ergab für die Gesamtauswertung 0,92, für K&L II 0,93, sowie für K&L IV 0,84, woraus sich insgesamt eine hohe Übereinstimmung bezüglich der drei unabhängigen Beobachter ergibt. Die Bewertung des Arthrosegrades anhand des modifizierten Mankin-Scores ergab folgende Mittelwerte:

Ergebnisse

Gruppe 0	6,72
Gruppe 1	4,72
Gruppe 2	6,0
Gruppe 3	5,0
Gruppe 4	8,06

Tabelle 10. Mittelwerte des modifizierten Mankin-Scores der jeweiligen Gruppen.





Die statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse ist in Abbildung 38 zusammengefasst. Im Gegensatz zur Kontrolle (Gruppe 0) ergab die reine mechanische Belastung (Gruppe 1) einen niedrigeren Score. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Die zusätzliche Applikation von Interleuin-1β resultierte in einem höheren Punktewert. Obwohl auch dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war, liegt er jedoch mit einem p-Wert von 0,059 sehr nahe an der statistischen Signifikanz. Eine niedrig dosierte HA-Applikation verringerte zwar den histologischen Score, es zeigte sich aber keine statistische Signifikanz. Die Erhöhung des modifizierten Mankin-Scores von Gruppe 2 auf 4 war nicht signifikant (p=0,059). Zwischen Gruppen mit reiner Belastung (Gruppe 1) und den Gruppen mit einer hohen Konzentration an Hyaluronsäure (Gruppe 4) ergab der Vergleich einen statistisch signifikanten Unterschied im modifizierten Mankinscore (p=0,035).

3.2.2. Histologische Ergebnisse der H.-E.- und Safranin-O-Lichtgrün-Färbungen

3.2.2.1. Kellgren/Lawrence II

Im Folgenden werden stellvertretend für den K&L-Score II Histologie-Bilder von Patient 1 aufgeführt. Der linke Schnitt ist jeweils mittels H.-E., der rechte mittels Safranin-O-Lichtgrün angefärbt.

Die in Abbildung 39 dargestellten Kontrollschnitte zeigen in der Safranin-O-Lichtgrünfärbung durch die blau/grüne Anfärbung einen äußerst geringen Anteil an Proteoglykanen (PG). Die Knorpeloberfläche ist stark zerklüftet und unregelmäßig.



Abbildung 39. Patient 1: Kontrolle.

Nach mechanischer Belastung (Abbildung 40) zeigt sich durch die intensive Safranin-Färbung ein hoher Anteil an Proteoglykanen. In den oberen Knorpelschichten ist jedoch auch dieser deutlich reduziert. Die Knorpeloberfläche ist stark unregelmäßig mit insgesamt deutlichem Cloning.



Abbildung 40. Patient 1: mechanische Belastung.

Gruppe 2 (Abb. 41) mit zusätzlicher chemischer Belastung mittels IL-1β zeigt einen relativ hohen Proteoglykangehalt in den tieferen Knorpelschichten, jedoch reichen die PG-armen Areale von der Oberfläche hier tiefer in das Knorpelgewebe als in

Gruppe 1 (Abb. 40). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist hier die Knorpeloberfläche weniger zerklüftet.



Abbildung 41. Patient 1: mechanische und chemische Belastung mit IL-1.

Die in Abb. 42 dargestellte Probengruppe 3 zeigt wiederum einen reduzierteren PG-Gehalt als Gruppe 2. Die tieferen Schichten zeigen zum einen eine geringere Safraninfärbung, zum anderen reichen die PG-freien Areale noch weitere in die Tiefe des Gewebes.



Abbildung 42. Patient 1: 1mg/ml HA zusätzlich im Kulturmedium.

Die Probengruppe 4 (Abb. 43) zeigt ein ähnliches Bild wie die Kontrollen (Abb. 39). Eine sehr geringe Safranin-Färbung ist in einem kleinen Areal zu erkennen, wohingegen weite Areale blau/grün gefärbt und somit PG-frei sind. Ein Cloning der Zellkerne ist hier gut zu erkennen.



Abbildung 43. Patient 1: 3mg/ml zusätzlich im Kulturmedium

3.2.2.2. Kellgren/Lawrence IV

Nachfolgend sind Histologische Schnitte vom K&L-Score IV aufgeführt, welche repräsentativ von Patient Nr. 4 angefertigt wurden. Der jeweils linke Schnitt ist jeweils immer mit einer H.-E.-Färbung versehen, der rechte mit einer Safranin-O-Lichtgrün-Färbung.

Die in Abb. 44 dargestellte Probengruppe 0 (Kontrollen) besitzt bis auf die oberflächlichen Bereiche einen relativ hohen Proteoglykangehalt, was an der recht intensiven Safraninfärbung zu erkennen ist.



Abbildung 44. Patient 4: Kontrolle.

Die Gruppe 1 zeigt in Abb. 45 nicht nur einen stark reduzierte Safraninfärbung, sondern ebenfalls große Unregelmäßigkeiten auf der Knorpeloberfläche, was ebenfalls gut in der H.-E.-Färbung zu erkennen ist.



Abbildung 45. Patient 4: mechanische Belastung.

Die zusätzliche Stimulation mit IL-1β in Probengruppe 2 (Abb. 46) zeigt eine weitere Reduktion der PG-Anfärbung, welche nun weiter in die tieferen Schichten reicht. Die Knorpeloberfläche hingegen ist hier weitaus regelmäßiger.



Abbildung 46. Patient 4: mechanische und chemische Belastung mit IL-1.

Abb. 47 zeigt die Probengruppe 3 von Patient 4. Hier lässt die intensive Safranin-Färbung auf einen hohen PG-Gehalt zurückschließen. Neben der unregelmäßigen Knorpeloberfläche ist eine ausgeprägte Hypozellularität des Gewebes erkennbar.



Abbildung 47. Patient 4: 1mg/ml zusätzlich im Kulturmedium.

Nach Applikation der hohen HA-Konzentration von 3mg/ml zeigt sich in Abb. 48 eine sehr geringe Safranin-Anfärbung. In dieser Abbildung ist ein deutliches Cloning der Zellkerne zu erkennen.



Abbildung 48. Patient 4: 3mg/ml zusätzlich im Kulturmedium.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

Die Arthrose ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren Prävalenz durch den demographischen Wandel zukünftig weiter steigen wird (Zhang und Jordan 2010). Somit ist nicht nur die Behandlung, sondern auch die Prävention von gesundheitlichem und ökonomischem Interesse, da die Behandlungskosten mit dem Schweregrad und dem damit verbundenen höheren Leidensdruck des Patienten zunehmen (Loza et al. 2009). Da es sich jedoch um eine sehr komplexe Erkrankung handelt, bei der zahlreiche verschiedene Signalwege, sowie das Zusammenwirken zwischen lokalen und systemischen Faktoren eine Rolle spielen, sind viele Aspekte der Pathogenese noch nicht ausreichend erforscht (Zhang und Jordan 2010). Zur Vereinfachung der Rahmenbedingungen und zur gezielten Beantwortung der Fragestellung erfolgte in der vorliegenden Studie daher die Kultivierung und Stimulation der Knorpelproben in einem Bioreaktor. In dieser Konstellation war es möglich, einzelne Parameter gezielt zu verändern und deren Effekt zu messen.

Dazu wurden für die vorliegende Studie 14 Patienten im Alter von 63 bis 84 Jahren eingeschlossen. Der gewählte Altersbereich liegt damit in den Gruppen der höchsten Prävalenz und Inzidenz. Obwohl es epidemiologische Unterschiede bei beiden Geschlechtern gibt, wurden diese im experimentellen Ansatz vernachlässigt (Robert-Koch-Institut 2013; Zhang und Jordan 2010). Als Auswahlkriterium wurden die radiologischen Arthrosegrade II und IV nach Kellgren und Lawrence herangezogen. Anhand der beiden Arthrosegrade wurden die Proben in zwei gleich große Gruppen aufgeteilt und die in vitro Response dieser osteoarthrotischen Knochen-Knorpelzylinder auf zwei unterschiedlich hohe Hyaluronsäurekonzentrationen untersucht. Im vorliegenden Versuchsaufbau war der Einsatz eines Pin-on-Ball-Bioreaktors mit rhythmischer Be- und Entlastung von entscheidender Bedeutung, um in vivo Belastungssituationen simulieren zu können. Um diesen näher kommen zu können, wurde in Anlehnung an die Vorgaben von Wimmer et al. ein Bioreaktor ausgewählt, welcher den tribolischen Grundsätzen und verschiedenen Freiheitsgraden des Kniegelenks möglichst nahe kommt. Somit konnten die Knorpel-Knochenzylinder mittels einer Dreh-Gleitbewegung belastet werden. Um das arthrotische Milieu ebenfalls vereinfacht zu etablieren, wurde zusätzlich zur Belastung das Zytokin Interleukin-1ß zum Kulturmedium hinzugefügt (Tetlow et al. 2001; Wimmer et al. 2004). Aufgrund der Möglichkeit der dreidimensionalen Belastung des in dieser Studie verwendeten Bioreaktors wurde der komplexe Bewegungsablauf und die damit verbundene mehrdimensionale Belastung des Knorpels im Kniegelenk im

Gegensatz zu vielen anderen verwendeten Bioreaktoren berücksichtigt (Mauck et al. 2000; Grad et al. 2011). Insgesamt wurde somit eine in vitro Simulation erreicht, welche nahe an die in vivo Verhältnisse heranrückt.

Die Stimulation mit IL-1β wurde in diesem Projekt erfolgreich durchgeführt, was sich in der in vitro Response anhand der erhöhten Genexpression der Metalloproteinasen zeigte. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit anderen in vitro Studien, welche allerdings größtenteils ohne mechanische Belastung durchgeführt wurden, wie z.B. eine Studie von Julovi und Kollegen (Julovi et al. 2004). Nach Erstellung der arthrotischen Verhältnisse wurde die metabolische Antwort des arthrotischen Knorpelgewebes auf mechanische Belastung und Hyaluronsäuregabe untersucht, indem Hyaluronsäure (HA) zum Kulturmedium hinzugegeben wurde. Julovi et at. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass die hinzugefügte Hyaluronsäure in das Knorpelgewebe eindringen kann (Julovi et al. 2004). Entgegen anderen Publikationen, in denen lediglich in arthrotischen und nicht-arthrotischen Knorpel unterteilt wird, wurden in dieser Arbeit die Knorpel-Knochen-Zylinder in Kellgren-Lawrence Grad II und IV unterteilt, um mögliche Differenzen bei unterschiedlich vorgeschädigtem Knorpel besser detektieren zu können (Hiraoka et al. 2011). Interessant war hierbei der Unterschied zwischen beiden Arthrosegraden Kellgren/Lawrence II und IV in der MMP-Auswertung. Zwar waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant, dennoch aber durchgehend deutlich zu erkennen. Die Stimulation mit Interleukin zeigte dabei beim K&L-Grad II höhere MMP-Genexpressionswerte als im K&L-Score IV. Diese Beobachtung machten bereits Fan et al. und weisen auf die Möglichkeit hin, dass Chondrozyten im späten Arthrosestadium schon ausgereizt und möglicherweise nicht weiter stimulierbar sind. Diese Arbeitsgruppe fand die größte Stimulierbarkeit mittels IL-1β bei einer Konzentration zwischen 1ng/ml und 10ng/ml (Fan et al. 2005). Im eigenen Versuchsaufbau wurde eine Konzentration von 2ng/ml gewählt, welche somit im von Fan et al. empfohlenen Bereich liegt. Diese Konzentration von IL-1β wurde von Julovi et al. ebenfalls verwendet, um in-vitro IL-1β-induzierte Matrixmetalloproteinasen mittels HA zu supprimieren. Hinsichtlich der HA-Konzentration wird 1mg/ml als effiziente Dosis angegeben (Julovi et al. 2004). Bezüglich des gewählten Molekulargewichts herrschen weiterhin kontroverse Meinungen. In dieser Dissertation wurde ein Hyaluronsäurepräparat mittleren Molekulargewichts gewählt und somit möglicherweise die Vorteile von hoch- und niedermolekularen Präparaten vereinigt (Colen et al. 2012).

Um die erzielten Effekte hinsichtlich der Genexpressionen erfassen zu können kam in dieser Arbeit die Polymerasekettenreaktion als tragende Nachweismethode zum

Einsatz. Die PCR hat als Nachweismethode gegenüber der Zymographie den Vorteil, dass diese eine quantitative Auswertung erlaubt. Die Zymographie als sensitive Nachweismethode ist im Vergleich zur PCR aufwendiger und nur semiguantitativ auswertbar (Zucker et al. 1994). Zucker et al. weisen zudem darauf hin, dass die Zymographie als Nachweismethode sehr gut etabliert sein muss, um reproduzierbare Ergebnisse liefern zu können. Zudem kann die semi-guantitative Auswertung nur anhand eines gleichzeitig getesteten Standards erfolgen (Zucker et al. 1994). Die PCR hat sich dabei zum Nachweis von mRNA des Knorpels zunehmend etabliert, sodass auch andere Arbeitsgruppen auf den Einsatz der Zymographie verzichtet haben. In diesen Studien wurden ebenfalls die Genexpressionen von Kollagen II und MMP-13, sowie Aggrekan, Kollagen II, MMP-1, MMP-2 und MMP-13 bei ähnlicher Fragestellung untersucht (Fan et al. 2005; Mackay et al. 2002; Rutgers et al. 2013). Jedoch hat auch die PCR ihre Limitierungen. So vermag sie nicht wie die Zymographie, zwischen aktivem und passivem Enzym zu unterscheiden, da durch die real-time PCR lediglich mRNA-Expressionslevel nachgewiesen wurden. Die PCR präsentierte daher immer nur den aktuellen mRNA-Gehalt, nicht jedoch die Transkription einer RNA in ein Protein. Es ist daher nur mit Vorsicht auf den aktuellen und tatsächlichen Zellstatus zu schließen (Bustin 2002). Hinsichtlich der relativ kurzen Inkubationszeit von fünf Tagen im Bioreaktor bergen die von Bustin genannten Limitationen der PCR (s.o.) für diese Untersuchung aber auch einen wesentlichen Vorteil, der für den vorliegenden Versuchsaufbau schlussgefolgert werden kann. Die mRNA kann mittels spezifischer Primer direkt nachgewiesen werden, noch bevor das Protein nach Transkription sezerniert wird (s. Kapitel 1.6).

4.2. Die in vitro Response: Molekularbiologische Ergebnisse

4.2.1. Matrixmetalloproteinasen

4.2.1.1. MMP-1

Die gemessene MMP-1 Expression zeigte in der Gesamtauswertung sowie nach Unterteilung in die beiden Kellgren und Lawrence Arthrosegrade den gleichen Trend. Während eine rein mechanische Belastung kaum Einfluss auf die MMP-1-Expression zu haben schien, zeigte sich ein Anstieg nach IL-1 β -Stimulation. Julovi et al. konnten die Genexpression von MMP-1 ebenfalls mittels IL-1 β steigern (Julovi et al. 2004). Obwohl der IL-1 Anstieg in unserer Studie nur in der Gesamtauswertung statistisch

signifikant war, konnten Fan et al. in ihrer Veröffentlichung zeigen, dass matrixdestruierende Enzyme wie MMPs unter einer starken Induktion von IL-1 β stehen. Diese Arbeitsgruppe konnte jedoch einen noch größeren regulatorischen Effekt von Interleukin-6 nachweisen, was die komplexen molekularbiologischen Abläufe im Rahmen einer Arthrose unterstreicht (Fan et al. 2005).

Des Weiteren zeigte sich in der Gruppe mit 1mg/ml HA eine Herabregulierung der MMP-1-Expression. Zu diesem Ergebnis kamen ebenfalls Julovi et al. Nach einer HA-Behandlung analysierten sie dabei nicht nur das in Chondrozyten produzierte MMP-1 mittels Immunfluoreszenz, sondern zusätzlich sezerniertes MMP-1 über Immunblotting im konditioniertem Medium (Julovi et al. 2004).

In der eigenen Studie war auffallend, dass 3mg/ml HA, also eine relativ hohe Dosis Hyaluronsäure, eine zwar statistisch nicht signifikante, aber deutlich höhere Expression an MMP-1 lieferte als die niedrigere Dosis HA. Dies könnte auf einen möglichen schädlichen Effekt von Hyaluronsäure hinweisen. In der Literatur herrscht ebenfalls keine Einigkeit darüber, ob Hyaluronsäure einen herabregulierenden Effekt besitzt. So wurden mit niedermolekularer Hyaluronsäure (800 kDa) zum einen herabregulierende Ergebnisse erzielt (Julovi et al. 2004). Zum anderen wurde im Osteoarthrose-Modell auf Grundlage von Chondrosarkomzellen eine MMP-1-induzierende Wirkung von HA mit niedrigem Molekulargewicht nachgewiesen, wohingegen ein hohes Molekulargewicht einen gegenteiligen Effekt hatte (Chang et al. 2012). Darüber hinaus existieren auch Berichte über eine ausbleibende Wirkung bei niedermolekularem HA im Tierexperiment (Han et al. 1999; Qiu et al. 2005).

4.2.1.2. MMP-2

Die Messungen der MMP-2 Expressionen zeigten sowohl in der Gesamtauswertung als auch im K&L-Score II recht gleichmäßig niedrige Expressionslevel ohne große Unterschiede zwischen den Gruppen. Lediglich der Trend der Auswirkungen von IL-1β und HA auf das Knorpelgewebe ist mit den Ergebnissen von MMP-1 vergleichbar. Dieser war jedoch in wesentlich geringerer Ausprägung und ohne statistische Signifikanz. Anders als bei MMP-1 ergab die Applikation von Hyaluronsäure eine deutliche, aber statistisch nicht signifikante Herabregulierung der MMP-2 Expression. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe um Wang et. al, welche durch Analyse humaner Synovialflüssigkeit aus arthrotischen Gelenken zeigen konnte, dass hochmolekulare HA das Expressionslevel von MMP-2 supprimieren kann. Dieser Effekt war nach Zugabe von IL-1β geringer als ohne die chemische Stimulation mit IL. Die deutlichsten Unterschiede zur Kontrollprobe wurden mit HA- Konzentrationen von 100µg/ml und 1mg/ml erzielt, wobei eine Konzentration von 10µg/ml HA nach IL-Zugabe keinen Einfluss hatte (Wang et al. 2006). Andere Publikationen kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass MMP-2 einer eher schwachen externen Regulierung unterliegt. So konnten Fan et al. zeigen, dass sich hinsichtlich MMP-2-Expression im arthrotischen Knorpel unabhängig von der gewählten IL-1β-Konzentration keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle ergeben (Fan et al. 2005). Von Lemos et al. konnte hingegen im Tiermodell eine signifikante Downregulation von MMP-2 durch Hyaluronsäure nachgewiesen werden (Lemos et al. 2015).

Auffällig waren die PCR-Ergebnisse bei fortgeschrittenem Arthrosegrad der eigenen Untersuchungen. Hier zeigte sich bei den mit HA inkubierten Proben, wie bei Lemos et al., eine Downregulation. Eine mechanische Belastung hatte im eigenen Experiment zudem eine Erhöhung der MMP-Expression zur Folge (Lemos et al. 2015). Ähnliche Ergebnisse wurden, ohne mechanische Belastung, jedoch bereits von Aigner et al. vorbeschrieben. Eine Upregulation von MMP-2 wurde dabei erst bei fortgeschritten geschädigtem Knorpelgewebe gefunden. Hieraus kann schlussgefolgert werden, dass diese Diskrepanz möglicherweise daran liegt, dass der MMP-2-Metabolismus in der vorliegenden Versuchskonstellation unter Belastung und bei fortgeschrittener Arthrose gegenüber IL-1ß erst im Verlauf suszeptibler werden könnte (Aigner et al. 2001; Lemos et al. 2015).

Eine andere Studie von Jeon et al. berichtet, dass eine mechanische Belastung von Knorpelgewebe eine Erhöhung der MMP-2-Genexpression bewirkte, welche jedoch nicht mit der im Kulturmedium gemessenen Proteinmenge korrelierte. Hierbei fanden sich sogar gegenteilige Effekte hinsichtlich der MMP-2- und proMMP-2-Menge. Die Arbeitsgruppe wies jedoch darauf hin, dass zwischen gemessener Genexpression und dem Vorhandensein des Genprodukts keine Übereinstimmung herrschen muss, zumal die mRNA aus kurzzeitig belasteten Proben gewonnen wurde und die MMP-2-Menge aus dem gepoolten Medium von Proben mit zweiwöchiger Langzeitbelastung bestimmt wurde. Als weitere Determinante bezüglich einer Up- oder Downregulation von der MMP-2-Proteinmenge im Medium wird von Jeon et al. eine in ihrem Versuch durchgeführte Vorinkubation genannt. Bei dieser wurden unter mechanischer Belastung niedrigere Mengen von MMP-2 im Medium gefunden. Als mögliche Ursache wird eine Art perizelluläre Matrix mit hohem Gehalt an Kollagen VI genannt, welche sich während der Vorkultivierung um die Chondrozyten bildet. Diese soll wiederum als chondroprotektive Schicht agieren (Jeon et al. 2013).

4.2.1.3. MMP-13

Reboul et al. konnten bereits 1996 einen Zusammenhang zwischen Arthrose und einem erhöhten Level von MMP-13-mRNA feststellen. Zudem stellten sie die Vermutung auf, dass diese Erhöhung durch IL-1 β und TNF- α mitbedingt ist (Reboul et al. 1996). Der Zusammenhang zwischen IL-1 β und erhöhten MMP-13-Level konnte unter anderem von Aigner et al. bestätigt werden (Aigner et al. 2001). Little et al. zeigten darüber hinaus anhand von MMP-13 Knock-out-Mäusen, dass diese bei chirurgisch induzierter Arthrose im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen geringeren Proteoglykanverlust und Knorpelschädigung aufweisen (Little et al. 2009).

Nimmt man beide Kellgren-Grade dieser Studie zusammen, so zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der MMP-13 Expression nach Stimulation mit Interleukin-1-β. Das beabsichtigte arthrotische Milieu konnte also erfolgreich etabliert werden. Nach Applikation von Hyaluronsäure konnte bei beiden gewählten Konzentrationen (1mg/ml und 3mg/ml) eine statistisch signifikant geringere MMP-13-Expression festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe um Julovi et al. konnte ähnliche Ergebnisse nachweisen und stütze sich bei ihrer Auswertung auf Immunoblottings zur Bestimmung von sezernierter MMP-13 und Immunofluoreszenz-Analyse für intrazelluläre MMP-13. Nach Applikation von IL1-β ließen sich die MMP-13-Level mittels Hyaluronsäure reduzieren. Es zeigten sich dabei niedrigere Werte je höher die Konzentration an Hyaluronsäure gewählt wurde. Als ein möglicher Pathway wurde dabei das Protein CD44 identifiziert, welches als einer der wichtigsten Rezeptoren für HA in Chondrozyten fungiert. Die Bindung von HA an diesen Rezeptor blockierte wiederum den p38-MAPK-Signalweg, welcher die MMP-13-Transkription inhibierend beeinflusste (Julovi et al. 2011). Dieser Effekt konnte von Julovi et al. auch ohne mechanische Belastung nachgewiesen werden, woraus geschlossen werden kann, dass eine mechanische Belastung hinsichtlich der MMP-13-Expression eher eine untergeordnete Rolle zu haben scheint (Julovi et al. 2011). Jedoch hatte eine mechanische Belastung arthrotischer Kniegelenke im Tiermodell in einer Studie von Hamamura herabregulierende Effekte hinsichtlich der MMP-13-Aktivität (Hamamura et al. 2013). Zudem konnten auch Jeon et al. nachweisen, dass mechanisch belastete Chondrozyten signifikant weniger MMP-13 exprimieren, ohne jedoch den Entnahmeort weiter hinsichtlich eines Arthrosegrades zu spezifizieren. Die Auswertung erfolgte dabei nach 2 und 4 Wochen, bei der beide Male eine Reduktion der MMP-13-Expression unter Belastung festgestellt wurde. Dabei war diese Downregulation erst im Verlauf ausgeprägter (Jeon et al. 2013). Insgesamt bleibt der Effekt von Hyaluronsäure nicht nur auf das Knorpelgewebe selbst beschränkt. Hiraoka et al. konnten am Tiermodell eine positive Wirkung von Hyaluronsäure über

das Knorpelgewebe hinaus am subchondralen Knochen feststellen. In ihrer Arbeit zeigten sie ebenfalls, dass Hyaluronsäure die Expression von MMP-13 vermindert. Der gewählte Untersuchungszeitraum betrug hierbei insgesamt 10 Wochen (Hiraoka et al. 2011). Somit wären möglicherweise noch deutlichere Ergebnisse in der eigenen Studie, vor allem in Hinblick auf die Unterteilung in die K&L-Grade, bei einem länger gewählten Untersuchungszeitraum denkbar.

4.2.2. Extrazelluläre Matrix Bestandteile

4.2.2.1. Aggrekan

Fan et al. publizierten, dass unter artifiziellen arthrotischen Bedingungen durch Stimulation mit IL-1β Kollagen II sowie Aggrekan downreguliert werden (Fan et al. 2005). Diese Feststellungen konnten ebenfalls in der eigenen Studie, auch unter zusätzlicher mechanischer Belastung, bestätigt werden.

Die alleinige mechanische Belastung durch den Bioreaktor ergab nach statistischer Auswertung durchgehend einen Trend zur Erhöhung der EZM-Komponenten Aggrekan und Kollagen II, was mit der Publikation von Schatti und Kollegen korreliert. In dieser wird beschrieben, dass Kompression und Scherkräfte, ohne Zugabe zusätzlicher Wachstumsfaktoren, eine signifikante Upregulation von Bestandteilen der EZM in vitro bewirken. Bei ihren Analysen fanden sie die effizienteste Upregulation der EZM Bestandteile bei Kombination aus Kompression und Abscherrkräften vor, welche weitaus effizienter war als die Applikation von nur einer Belastungsart. Diese Vorgaben einer komplexen mechanischen Belastung konnten in der eigenen vorliegenden Studie mit dem verwendeten tribolischen Pin-on-Ball-Bioreaktor ebenfalls erfüllt werden (Schatti et al. 2011). Die Aggrekan-Genexpression wurde dabei im K&L-Grad IV bei mechanisch belasteten Proben im Vergleich zu den Kontrollproben statistisch signifikant hochreguliert. Torzilli et al. konnten im Tierexperiment unter IL-1α- und mechanischer Belastung sogar eine Reduktion des Verlustes von Proteoglykanen nachweisen, was für einen protektiven Effekt durch mechanische Belastung spricht (Torzilli et al. 2011).

Die Untersuchung beider Kellgrengrade zusammengenommen ergab hinsichtlich der Aggrekan-Genexpression durch HA-Applikation keine zusätzliche Steigerung der Genexpression. Es zeigte sich jedoch auch keine weitere Downregulierung. Hyaluronsäure scheint daher keinen wesentlichen Effekt zu haben. Torzilli et al. untersuchten zusätzlich den Verlust von Proteoglykanen pro Tag. Auffällig hierbei war, dass alleinige Belastung keinen Unterschied bewirkte, sondern erst zusammen mit IL-1β den Verlust pro Tag zu reduzieren vermochte. So könnte man anhand dieser

Studie annehmen, dass eine Wirksamkeit einer HA-Applikation erst bei vorgeschädigtem Knorpelgewebe eintritt und der IL-1β-Stoffwechsel einen möglichen Angriffspunkt für HA darstellt (Torzilli et al. 2011).

Eine statistisch signifikant höhere Genexpression bei einer Konzentration von 1mg/ml HA im fortgeschrittenen K&L-Grad IV als im Grad II, steht insgesamt möglicherweise in Einklang mit oben genannten Feststellungen von Torzilli et al. Demnach könnte vorgeschädigter Knorpel, in der eigenen Studie anhand der Ergebnisse von K&L-IV erkennbar, suszeptibler gegenüber Stimulationen mit Hyaluronsäure sein (Torzilli et 2011). Aigner et al. untersuchten die zonalen Unterschiede des al. Knorpelmetabolismus und stellten dabei große Unterschiede abhängig von der jeweiligen Schichttiefe fest. In ihrer Arbeit fanden sie eine wesentlich höhere Aktivität in tiefen Knorpelschichten für Kollagen II und Aggrekan vor, wobei die Ausprägung für Letzteres geringer ausfiel. Arthrotisches Knorpelgewebe zeigte zudem einen ausgeprägteren Turnover, sodass die Kollagen-Expression ohnehin bereits hochreguliert sein könnte (Aigner et al. 1997). In dieser Arbeit zeigten sich leicht erhöhte Werte bei fortgeschrittenem K&L-Score nach HA-Applikation unter artifiziell erzeugtem arthrotischen Milieu mit IL-1 β , was nun zum einen durch eine vorbestehende hohe Kollagen-Genexpression, oder zum anderen durch die Applikation von HA zu erklären wäre.

4.2.2.2. Kollagen II

Kollagen II wies, verglichen mit den Ergebnissen der Analyse der Aggrekan-Daten, ähnliche Expressionsmuster vor. Dabei wurde Kollagen II unter Belastung deutlich, aber ohne statistische Signifikanz hochreguliert. Des Weiteren konnte, analog zu den oben genannten anderen Ergebnissen, durch IL-1β die Expression statistisch signifikant downreguliert werden. Dies kann als erfolgreiche Etablierung des osteoarthrotischen in vitro-Modells gewertet werden. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Ergebnissen, konnte bei der Auswertung der Kollagen II-Daten nach Applikation von Hyaluronsäure kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Im eigenen Projekt fand sich eine deutliche Hochregulierung von Kollagen II unter alleiniger mechanischer Belastung. Die eigenen Ergebnisse bestätigend, konnten Juhasz et al. nämlich zeigen, dass das richtige Ausmaß an mechanischer Belastung durchaus positive Effekte auf die Chondrogenese zeigt. Als mögliche Signalwege wurden im Tiermodell eine verminderte Expression von Proteinkinase A sowie eine reduzierte Aktivität der Proteinphosphatase 2A identifiziert (Juhasz et al. 2014). Nach

Unterteilung in die beiden Kellgren und Lawrence Grade zeigte sich ein ähnlicher Trend, aber ohne statistische Signifikanz. Eine mechanische Überbelastung hingegen ist als Risikofaktor für das Fortschreiten einer Arthrose bekannt, sodass klinisch bei übergewichtigen Patienten die Empfehlung zur BMI-Reduktion ausgesprochen wird (Anandacoomarasamy et al. 2012; Lohmander et al. 2009). Dem gegenüber wird aber auch eine geringere Bedeutung des Body-Mass-Indexes hinsichtlich der Progression von Arthrose diskutiert, wenn diese durch Fehlstellungen bedingt ist (Felson et al. 2004).

Gonzales-Fuentes et al. stellten nach intraartikulärer Injektion bei Gonarthrose eine Erhöhung von Collagen type-II C-telopeptide im Urin, ein Marker für Knorpeldestruktion und Krankheitsprogression, fest. Obwohl sich die klinische Symptomatik unter Hyaluronsäuretherapie in Hinblick auf Schmerzempfinden verbesserte, stellte diese Arbeitsgruppe die Vermutung auf, dass sich die klinische Verbesserung auf Kosten des Knorpelgewebes hinsichtlich seiner EZM-Bestandteile einstellt (Gonzalez-Fuentes et al. 2010). Da Kollagen II ein Zielsubstrat für MMP-1 darstellt, wären diese Ergebnisse mit den eigenen vereinbar, auch aufgrund der höheren Expressionswerte von Kollagen II bei der niedriger gewählten Konzentration von 1mg/ml im K&L-Score II. Die vorgefundene verminderte Expression von Kollagen II bei 3mg/ml HA lässt sich jedoch mit der erhöhten MMP-1-Expression damit nicht erklären (Mitchell et al. 1996). In den eigenen Untersuchungen verringerten 3mg/ml Hyaluronsäure zwar im Gegensatz zur alleinigen IL-1β-Applikation nicht die Kollagen II-Expression. Im K&L-Grad IV war jedoch Kollagen II in der Gruppe mit 3mg/ml HA im Medium verglichen mit der alleinigen mechanischen Belastung statistisch signifikant niedriger exprimiert. Zusammen mit der Upregulation von MMP-1 bei der höheren HA-Konzentration muss, wie von Gonzales-Fuentes et al. diskutiert, an eine schädliche Wirkung von HA selbst gedacht werden (Gonzalez-Fuentes et al. 2010). Aigner et al. stellten schon die Vermutung auf, dass fortgeschritten geschädigte Chondrozyten eine gesteigerte Kollagenexpression und Turnover zeigen (Aigner et al. 2001). Neugebildetes Kollagen erfährt damit im arthrotischen Knorpel verglichen mit gesundem Vergleichsgewebe einen schnelleren Abbau, wobei MMP-1 dabei eine entscheidende Rolle zukommt (Dahlberg et al. 2000). Eine mögliche Schlussfolgerung für das erniedrigte Expressionslevel von Kollagen II bei gleichzeitig

erhöhter Genexpression von MMP-1 wäre, dass durch die Vorschädigung des Knorpels MMP-1 noch hochreguliert war. Die Kollagen II-Expression dagegen könnte sich schon an die Stimulation mit HA angepasst haben und war daher erniedrigt. Daneben sind im arthrotischen Gelenk am Kollagenmetabolismus aber noch weitere

Proteasen beteiligt, sodass das gesamte System um ein vielfaches komplizierter sein dürfte (Dejica et al. 2012).

4.3. Histologische Ergebnisse

Die Analyse der Interobserver-Konkordanz mittels Krippendorffs Alpha ergab in der Gesamtauswertung eine Übereinstimmung von 0,897. Des Weiteren beträgt die zusätzlich über Kendall's Coefficient of Concordance W berechnete Konkordanz 0,917. Beide Ergebnisse sprechen für einen hohen Grad der Übereinstimmung, sodass die dreifache histologische Auswertung als verlässlich angesehen werden kann. Auffällig dabei ist, dass die mechanische Belastung durchaus positive Effekte auf den Knorpel hatte, was an den niedrigeren Punktewerten des Mankin-Scores zu sehen ist. Auch bei Stimulation mit Interleukin zeigte sich durchwegs ein Anstieg des Punktewertes im Sinne einer Schädigung des Knorpels, wohingegen sich dieser mit 1mg/ml HA nicht wieder reduzieren ließ. Jedoch bewirkte die Stimulation, analog zu den Ergebnissen der Molekularbiologie, bei dieser Konzentration keine Verschlechterung des histologischen Arthrosegrades. Bemerkenswert ist, dass auch in der Histologie die Hyaluronsäureapplikation von 3mg/ml negativere Werte bezogen auf den Arthrosescore ergab, als die Applikation von 1mg/ml. Diese Ergebnisse würden ebenfalls die von Gonzalez-Fuentes et al. in Betracht gezogene Möglichkeit einer schädlichen Wirkung von Hyaluronsäure miteinschließen (Gonzalez-Fuentes et al. 2010). Aufgrund der niedrigen Fallzahl sind hierzu nur vorsichtige Aussagen zu jedoch scheint der Unterschied wiederum treffen, im fortgeschrittenen Kellgren/Lawrence-Grad IV ausgeprägter zu sein.

Der Vergleich histologischer Ergebnisse mit Genexpressionsmustern arthrotischer Knorpel allgemein muss kritisch betrachtet werden. Stove et al. berichten in ihrer Studie zwar über eine positive Korrelation zwischen Befunden in der radiologischer Bildgebung und histologischer Auswertung, sowie über eine positive Korrelation zwischen Kellgren-Lawrence-Score und der Proteoglykangehalt. Zwischen der Höhe der MMP-13 oder Aggrekan-Genexpression und histologisch festgelegtem Mankin-Scores konnte von ihnen jedoch keine Korrelation ermittelt werden (Stove et al. 2006). Berücksichtigt man hierzu den physiologischen Gehalt von Hyaluronsäure, so wird dieser in der Synovialflüssigkeit mit etwa 2-4mg/ml angegeben (Scott et al. 2000). Erhöht man nun den Gehalt von Hyaluronsäure zusätzlich, so könnten durch das Überangebot kurzfristig knorpeldegradierende Proteasen induziert werden, um möglicherweise eine Homöostase im Knorpel-Turnover wiederherzustellen. Die

Induktion von MMPs durch Hyaluronsäure über den CD44-Rezeptor ist bisher nur von Hyaluronsäure-Oligosacchariden bekannt, welche kompetitiv an diesen Rezeptor binden und damit eine Signalkaskade aktivieren, welche gegensätzlich zur Wirkung von hochmolekularem Hyaluron ist (Ariyoshi et al. 2012).

4.4. Hyaluronsäure in der Arthrosebehandlung

Die Hyaluronsäurepräparate, welche zur Therapie der Gonarthrose zu Verfügung stehen, sind in verschieden hohen Molekulargewichten erhältlich. Bezüglich therapeutischer Effizienz, Nutzen und Schaden hinsichtlich des molekularen Gewichts herrscht noch immer keine Einigkeit. Die systematische Übersichtsarbeit von Colen et al. über randomisiert kontrollierte Studien kam zu dem Ergebnis, dass auch ein Placeboeffekt in den klinischen Auswertungen einen erheblichen Effekt von bis zu 30% beträgt und somit oftmals mit HA kein zusätzlicher Benefit erreicht wird. Vergleiche zwischen verschiedenen Produkten sind aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns nur sehr eingeschränkt möglich. Das in der vorliegenden Studie verwendete Präparat von TRB Chemedica Ostenil wird mit einer Verbesserung der klinischen Symptome von ca. 80% bezogen auf eine Schmerzskala angegeben (Colen et al. 2012). Dabei zeigte vor allem niedermolekulare Hyaluronsäure keinen Vorteil gegenüber Placebokontrollen mittels Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung (DeGroot et al. 2012). Diesen Ergebnissen widersprechend haben Gigante et al. klinische Erfolge mit Hyaluronsäuren mit niedrigem Molekulargewicht hinsichtlich Schmerzreduktion und Funktionsverbesserung erzielen können. Somit kann nicht davon ausgegangen werden kann, dass mittel- und hochmolekulare Hyaluronsäuren in der klinischen Anwendung grundsätzlich den niedermolekularen überlegen seien (Gigante und Callegari 2011). Die Wirksamkeit von Hyaluronsäure mittleren und hohem Molekulargewichts wurde hinsichtlich einer Verbesserung von Bewegungseinschränkung und Schmerzen durch Gonarthrose in einer randomisiertkontrollierten prospektiven Studie von Maheu et al. als gleichwertig eingeschätzt (Maheu et al. 2011). Die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Band et al. ergab nach Untersuchung der Synovialflüssigkeit in osteoarthrotischen Kniegelenken, dass ein niedriges Molekulargewicht von Hyaluronsäure darin mit einem rapiden Fortschreiten der Gonarthrose assoziiert ist. Darüber hinaus zeigte sich bei Hyaluronsäurepräparaten mit einem höheren Molekulargewicht eine Reduktion der klinischen Schmerzsymptomatik (Band et al. 2015).

4.5. Anregungen und Limitierungen

In dieser Studie konnte, aufgrund der erzielten Ergebnisse und nach Vergleich dieser mit anderen Publikationen, ein gutes in vitro Modell etabliert werden. Zusätzlich konnten weitere Erkenntnisse über den Knorpelmetabolismus und dessen Verhalten auf chemische und mechanische Stimuli gewonnen werden. Wie jede Forschungsarbeit zeigt auch diese Studie Möglichkeiten der Optimierung für nachfolgendende Forschungsprojekte auf. So wäre vor allem die Patientenzahl von N=14 zu erhöhen, um eine noch aussagekräftigere statistische Auswertung zu erreichen. Womöglich würden Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen besser erkennbar sein. Zusätzlich wäre zu erwarten, dass mit zunehmender Patientenzahl auch die Varianz der Ergebnisse kleiner ausfallen würde. Die initiale Limitierung der isolierten mRNA-Menge, welche durch Präamplifizierung gelöst wurde, könnte durch größere Samples vermieden werden. Dadurch wäre eine genauere Untersuchung des Knorpel und gegebenenfalls der verschiedenen Knorpelschichten möglich, welche pro Schicht verschiedenartig ausgeprägte Stoffwechselprofile und MMP-Konzentrationen zeigen (Burrage et al. 2006). So sind Bestandteile der EZM besonders in oberflächlichen Schichten bei chemischer Belastung mit IL mehr betroffen als in tiefen Schichten, was durch mechanische Belastung kompensiert werden könnte (Torzilli et al. 2011). Des Weiteren zeigt der hyaline Knorpel des Kniegelenks eine landkartenartige Stoffwechsel-Topographie auf, welche besonders unter mechanischer Belastung ausgeprägt ist. Es ist daher eine neue Definition der Entnahmeorte zu überdenken. Das von Salzmann et al. ausgewählte Areal des Kondylus entspricht jedoch den Entnahmeorten dieser Studie (Salzmann et al. 2011).

Weiterhin kann die ebenfalls angelegte Dauer der Stimulation von fünf Tagen nach vier Tagen Vorkultivierung variiert werden, um die unterschiedliche in vitro Response der Probengruppen besser detektieren zu können. Diese kann sich möglicherweise zum Teil erst nach Wochen einstellen (Hiraoka et al. 2011).

Als Limitierung dieser Studie muss ebenfalls eine fehlende Nachweismethode zur Unterstützung der in der PCR gefundenen Ergebnisse angeführt werden. Als Möglichkeiten stehen vor allem die Zymographie, sowie eine Immunofluoreszenz zur Auswahl, welche in anderen Publikationen zur Anwendung kamen (Hiraoka et al. 2011; Julovi et al. 2011). Zur Proteinmessung würde sich außerdem das ELISA anbieten, womit zum einen das Knorpelgewebe, zum anderen das Kulturmedium untersucht werden könnte (Zucker et al. 1995). Hierdurch ließen sich präzisere Aussagen über die Differenz bezüglich Geninduktion und umgesetzten Genprodukt treffen (Jeon et al. 2013; Vilmar et al. 2012). Aufgrund der Tatsache, dass Hyaluronsäure den Knorpelstoffwechsel bis zur Knochen-Knorpelgrenze beeinflusst, wäre eine gesonderte Analyse der Knochen-Knorpelgrenze auf einen von Hyaluronsäure beeinflussten Metabolismus interessant. Im in-vitro Tiermodell zeigte sich nach Stimulation von IL-1β und Applikation von Hylan G-F-20 sogar eine positive Auswirkung auf Gelenkosteophyten, indem sich deren Formation reduzieren ließ (Hiraoka et al. 2011, Li et al. 2012).

4.6. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die zahlreichen Publikationen zu Themenkomplex zeigen sowohl neue Erkenntnisse über diesem den Knorpelmetabolismus als auch neue Möglichkeiten für die zukünftige Therapie der Es konnten dabei viele unbekannte Arthrose auf. Determinanten im Hyaluronsäurestoffwechsel extern applizierter Präparate gefunden werden. So hemmt Hyaluronsäure nicht nur einen NO-induzierten Entzündungsprozess, sondern verhindert eine Dedifferenzierung von Chondrozyten (Peng et al. 2010). Mittlerweile ist ebenfalls bekannt, dass Hyaluronsäure über ihrer Hauptrezeptor CD44 in der Lage ist, die Transkription von MMP-13 zu reduzieren. Außerdem wird p38 dosisabhängig in seiner Aktivität gehemmt, was die IL-induzierte MMP-13 Expression ebenfalls runterreguliert. Auch die Erforschung der Erkrankung und ihrer Pathomechanismen zeigte, dass mit Fortschreiten der Arthrose sich der Abbau von Kollagen II, der sich initial hauptsächlich an der Knorpeloberfläche abspielt, zunehmend intensiver und in tieferen Schichten des Knorpels fortzusetzen scheint (Dejica et al. 2012). So wäre es für die zukünftige Arthrosetherapie denkbar, dass diese sich nicht nur an den Unterschieden des Metabolismus der verschiedenen Knorpelschichten orientiert, sondern darüber hinaus eine stadiengerechte Therapie ermöglicht.

Bezüglich der applizierbaren Hyaluronsäurepräparate werden Hexadecylamid-Derivate den herkömmlichen niedermolekularen Wirkstoffen als überlegen beschrieben und könnten somit eine mögliche Alternative darstellen (Smith et al. 2013). Vielversprechende therapeutische Effekte scheint zudem Honokiol zu haben, welches aus der Rinde der Magnolia officinalis gewonnen wird. In vitro Untersuchungen konnten einen deutlichen antiinflammatorischen und chondroprotektiven Effekt aufzeigen, indem Signalwege proinflammatorischer Zytokine durch Blockade des NFκB-Transkriptionsfaktors gehemmt werden. Dadurch kann eine zentrale knorpeldegradierende Protease, MMP-13, in ihrer Genexpression und Aktivität blockiert werden (Chen et al. 2014). Ähnliche Ergebnisse konnte ebenso

die Verwendung von plättchenreichem Plasma in der Chondrozytenkultur erreichen und wird mit der Applikation von Hyaluronsäure verglichen (Sundman et al. 2014). Als weiteres Phytotherapeutikum zeigte WIN-34B, ein Extrakt aus der Linoricum japonicum, eine Erhöhung der Glykosaminoglykan und Aggrekan – mRNA-Menge (Huh et al. 2012).

Auch die Forschung im Bereich der Genetik zur Entstehung und Vererbung von Arthrose trugen dazu bei, die Erkrankung als multifaktorielles Geschehen zu verstehen. Neben bereits bekannten Signalwegen hatten Genanalysen ergeben, dass bestimmte Gene an der Vererbung von Arthrose beteiligt sind (Chen et al. 2010; Bruyère et al. 2015). Darüber hinaus sind einzelne Allelvarianten des NFkB-Transkriptionsfaktors identifiziert worden, die vermehrt mit hohen CRP-Werten und damit mit der Entwicklung von Arthrose in Verbindung gebracht werden (Hulin-Curtis et al. 2013). Außerdem werden aktuell mehrere Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) mit Gonarthrose assoziiert, welche mit weiteren genetischen Faktoren kombiniert, möglicherweise herangezogen werden können, um den Verlauf der Erkrankung vorherzusagen (Blanco et al. 2015). Das Wissen über diese genetischen Unterschiede könnte zukünftig die Behandlung der Arthrose nicht nur individualisierter, sondern auch noch gezielter und effizienter gestalten.

5. Zusammenfassung

Die Entstehung und das Fortschreiten von Arthrose ist ein multifaktorielles Geschehen, was mehrere Ansatzpunkte für die Therapie erlaubt. Ein anerkannter und etablierter Teil der Arthrosebehandlung ist die Applikation von Hyaluronsäure (HA). Dabei ist HA nicht nur in der Lage, das erkrankte Gelenk gleitfähiger zu machen, sondern scheint ebenfalls metabolisch wirksam zu sein. Wichtige Einflussfaktoren bei der Pathogenese von Arthrose sind Matrixmetalloproteinasen (MMPs).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, nach Etablierung eines geeigneten in vitro Arthrosemodells, den metabolischen Einfluss von Hyaluronsäure auf Matrixmetalloproteinasen während einer physiologischen Belastung zu untersuchen. Dazu erfolgte nach Gewinnung osteoarthrotischer Knochen-Knorpelzylinder die Kultivierung mit mechanischer und chemischer Belastung in einem modernen Pin-on-Ball-Bioreaktor. Anschließend erfolgte die Messung der Genexpression von MMP-1, -2, und -13, sowie verschiedene Bestandteile der EZM, wie Aggrekan und Kollagen II. Hierzu wurden 14 Patienten in die Studie eingeschlossen, die im Zeitraum Mai 2012 bis November 2012 zur Versorgung ihrer Gonarthrose mit einer Knie-TEP stationär in der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums rechts der Isar aufgenommen waren. Noch während der Operation wurden unter sterilen Bedingungen die Proben mittels Lochstanze entnommen und im Anschluss für vier Tage vorinkubiert, um das Knorpelgewebe an in-vitro-Verhältnisse zu adaptieren. Für jeden Kellgren und Lawrence Grad (II und IV) wurden jeweils 7 Patienten für die Studie ausgewählt. Pro Knie wurden neben einer Kontrollprobe vier weitere Zylinder entnommen. Eine Probe wurde dabei lediglich mechanisch, eine weitere zusätzlich mit IL-1β stimuliert. Bei den letzten beiden Probengruppen wurde zum Kulturmedium darüber hinaus eine niedrige (1mg/ml) und eine hohe Konzentration an Hyaluronsäure (3mg/ml) zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine fünf-tägige Kultivierung im Bioreaktor mit dreidimensionaler Belastung. Der komplexe Bewegungsablauf im Kniegelenk konnte damit gut simuliert werden. Zusammen mit der chemischen Stimulation mit IL-1ß konnte ein Kultivierungsschema für Arthrosemodelle etabliert werden, welches eine Annäherung der in vitro Verhältnisse an die in vivo-Situation darstellt. Nach Entnahme der Proben wurden jeweils aus der einen Knorpelhälfte die mRNA isoliert und im Verlauf eine PCR durchgeführt. Die andere Knorpelhälfte wurde der histologischen Auswertung zugeführt, welche zum einen auf einer Hämatoxylin-Eosin-, zum anderen auf einer Safranin-O-Lichtgrün-Färbung basierte. Aus den gewonnen Daten erfolgte abschließend eine statistische Auswertung.
Insgesamt zeigte sich eine überwiegend positive Wirkung von Hyaluronsäure auf den Knorpelstoffwechsel, da matrixdestruierende MMPs, v.a. aber die knorpelspezifische MMP-13 im gesamten Patientenkollektiv statistisch signifikant reduziert werden konnte. Während die MMP-2-Genexpression durch den Versuchsaufbau nur gering beeinflusst wurde, zeigte sich bei MMP-1 bei 1 mg/ml HA eine statistisch nicht signifikante Downregulation der Genexpression. Beim K&L-Grad II war dagegen eine nicht signifikante aber deutliche Upregulation zu verzeichnen. Die Belastung im Bioreaktor schein laut der vorliegenden Ergebnisse ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von MMPs zu haben.

Bezüglich der Genexpression der EZM-Komponenten Aggrekan und Kollagen-II hatte die Applikation von HA keinen Unterschied zur Folge. Hingegen resultierte die mechanische Belastung in einer deutlichen Steigerung der Genexpressionen von Aggrekan und Kollagen II. Die Kultivierung im Bioreaktor hatte daher insgesamt scheinbar günstige Auswirkungen auf die Komponenten der extrazellulären Matrix. Jedoch konnten meist keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden gewählten Kellgren und Lawrence Graden festgestellt werden. Besonders aber die signifikante Downregulation von MMP-13, einem Schlüsselprotein bei Arthrose, zeugt jedoch von einer positiven Wirkung von HA hinsichtlich der Entstehung und Progression dieser Erkrankung. Ein Hyaluronsäurepräparat mit mittlerem Molekulargewicht scheint gerade für den K&L-Grad II eine geeignete Therapie darzustellen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Die 6 Freiheitsgrade des Kniegelenks	7
Abbildung 2. Kinematik des Kniegelenks a ohne und b mit Kontraktion der Flexore	en.
	8
Abbildung 3 Molekularer Knorpelaufbau	9
Abbildung 4. Hvaliner Knornel in Safranin-O-Färbung im Vergleich	10
Abbildung 5. Verwendete Kellgren und Lawrence Grade	11
Abbildung 6. Crundetruktur von MMDe medifiziert nach Wessener (Negess und	
Abbildung 6. Grundstruktur von ministes modifizient hach woessner (Nagase und	4.4
	. 14
Abbildung 7. Schematische Darstellung von MMPs hach Nagase & Woessher	
(Nagase und Woessner 1999)	. 14
Abbildung 8. Schematische Darstellung der Einflussfaktoren im arthrotischen	
Gelenk modifiziert nach Kapoor et al. (Kapoor et al. 2011)	. 15
Abbildung 9. Dreidimensionale Struktur der Matrixmetalloproteinase 1 (Bertini et a	al.
2012)	. 16
Abbildung 10. Beispiel eines Amplifikationsgraphs mit Hintergrundrauschen	. 19
Abbildung 11. Visualisierung unterschiedlich hoher Expressionslevel.	.20
Abbildung 12, Auswertung der Genexpression durch StepOne-Software	.21
Abbildung 13. Schema der Tag-Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität nach Applied	1
Riosystems (Applied Biosystems 2014)	21
Abhildung 14 Pin-on-Ball-System verwendet im Bioreaktor von Endolah	24
Abbildung 15. Allgemeiner Ablaufalan der Laborarbeiten	25
Abbildung 16. Knornolontnahmo aus Egmurkondulo. Dio Probongowinnung durch	. 20
Abbildung 10. Knolpelenmanne aus Feinurkondyle. Die Flobengewinnung durch	200
Anbringung der Lochstanze und Enthähme des Zymiders	. 20
Abbildung 17. Obersicht Femurkohdyle und Knochen-Knorper-Zymider	. 21
Abbildung 18. Beginn der Kultivierung in einer ber-weil-Platte zur Gewonnung an	in
vitro Bedingungen.	.27
Abbildung 19. Knochen-Knorpelzylinder-Entnahmeorte.	. 28
Abbildung 20. Kultivierungsschema Bioreaktor	. 30
Abbildung 21 Inkubation im Bioreaktor.	. 31
Abbildung 22. Testung auf gDNA.	. 34
Abbildung 23. MMP-1 Gesamtexpression.	.41
Abbildung 24. MMP-1 Genexpression Kellgren/Lawrence Score II	. 42
Abbildung 25. MMP-1 Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.	. 43
Abbildung 26. MMP-2 Gesamtexpression.	.43
Abbildung 27. MMP-2 Genexpression Kellgren/Lawrence Score II	.44
Abbildung 28. MMP-2 Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.	.45
Abbildung 29. MMP-13 Gesamtexpression.	. 46
Abbildung 30. MMP-13 Genexpression Kellgren/Lawrence Score II	.46
Abbildung 31, MMP-13 Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV.	.47
Abbildung 32. Aggrekan Gesamtexpression	.48
Abbildung 33 Aggrekan Genexpression Kellgren/Lawrence Score II	48
Abbildung 34 Aggrekan Genexpression Kellgren/Lawrence Score IV	49
Abbildung 35. Kollagen II Gesamtexpression	50
Abbildung 36. Kollagen II Genevaression Kellgren/Lawrence Score II	50
Abbildung 37. Kollagen II Conexpression Kellgren/Lawrence Score II	.50
Abbildung 37. Kollagen in Generativewortung Derplete	.01
Abbildung 20. Dationt 1: Kontrollo	. 52
Abbildung 40. Detient 1: meshariasha Delecturg	. 33
Abbildung 40. Patient 1. mechanische Belastung.	. 53
Abbildung 41. Patient 1: mechanische und chemische Belastung mit IL-1.	. 54
Abbildung 42. Patient 1: 1mg/mi HA zusatzlich im Kulturmedium	. 54
Abbildung 43. Patient 1: 3mg/ml zusätzlich im Kulturmedium	. 55
Abbildung 44. Patient 4: Kontrolle.	. 55
Abbildung 45. Patient 4: mechanische Belastung	. 56

Abbildung 46.	Patient 4: mechanische und ch	nemische Belastung mit IL-1	56
Abbildung 47.	Patient 4: 1mg/ml zusätzlich in	n Kulturmedium	56
Abbildung 48.	Patient 4: 3mg/ml zusätzlich in	n Kulturmedium	57

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Einteilung des Arthrosegrads nach Kellgren und Lawrence (Kellgren un	nd
Lawrence 1957)	. 11
Tabelle 2. Zusätze zum Basismedium für Knorpelkulturmedium	. 28
Tabelle 3. Herstellung des 2X Mastermix für die Reverse Transkription	. 33
Tabelle 4. Ablauf der Reversen Transkription	. 34
Tabelle 5. Herstellung des Präamplifizierungsansatzes	. 35
Tabelle 6. Ablauf Präamplifizierung.	. 36
Tabelle 7. Ablauf der Polymerase Kettenreaktion	. 36
Tabelle 8. Verwendete TaqMan® Primer für die PCR.	. 37
Tabelle 9. Zuteilung der in den Graphiken verwendeten Zahlen zu den Proben	. 39
Tabelle 10. Mittelwerte des modifizierten Mankin-Scores der jeweiligen Gruppen.	. 52
Tabelle 11. RNA-Konzentrationen	. 91
Tabelle 12. Einteilung der Patienten in K&L-Grade	. 93
Tabelle 13. Verwendete Geräte/Software	. 93
Tabelle 14. Verwendete Reagenzien	. 94
Tabelle 15. Verwendete Verbrauchsmaterialien	. 96

8. Quellennachweise

1. Applied Biosystems (2000). "High-Capacity cDNA Archive Kit . Protocol." Retrieved 15.11.2014, from https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041198.pdf.

2. Applied Biosystems (2010). "TaqMan Gene Expression Master Mix -Protocol." Retrieved 15.11.2014, 2014, from https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms 039284.pdf.

3. Applied Biosystems (2010). "TaqMan PreAmp Master Mix Kit -Protocol." Retrieved 15.11.2014, 2014, from https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_039316.pdf.

4. Aigner, T., S. I. Vornehm, G. Zeiler, J. Dudhia, K. von der Mark and M. T. Bayliss (1997). "Suppression of cartilage matrix gene expression in upper zone chondrocytes of osteoarthritic cartilage." Arthritis Rheum **40**(3): 562-569.

5. Aigner, T., A. Zien, A. Gehrsitz, P. M. Gebhard and L. McKenna (2001). "Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology." Arthritis Rheum **44**(12): 2777-2789.

6. Aimes, R. T. and J. P. Quigley (1995). "Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4-and 1/4-length fragments." J Biol Chem **270**(11): 5872-5876.

7. Anandacoomarasamy, A., S. Leibman, G. Smith, I. Caterson, B. Giuffre, M. Fransen, P. N. Sambrook and L. March (2012). "Weight loss in obese people has structure-modifying effects on medial but not on lateral knee articular cartilage." Ann Rheum Dis **71**(1): 26-32.

8. Andergassen, U., S. Hofmann, A. C. Kolbl, C. Schindlbeck, J. Neugebauer, S. Hutter, V. Engelstadter, M. Ilmer, K. Friese and U. Jeschke (2013). "Detection of Tumor Cell-Specific mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Breast Cancer - Evaluation of Several Markers with Real-Time Reverse Transcription-PCR." Int J Mol Sci **14**(1): 1093-1104.

9. Angele, P., D. Schumann, M. Angele, B. Kinner, C. Englert, R. Hente, B. Fuchtmeier, M. Nerlich, C. Neumann and R. Kujat (2004). "Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds." Biorheology **41**(3-4): 335-346.

10. Ariyoshi, W., N. Takahashi, D. Hida, C. B. Knudson and W. Knudson (2012). "Mechanisms involved in enhancement of the expression and function of aggrecanases by hyaluronan oligosaccharides." Arthritis Rheum **64**(1): 187-197.

11. Band, P. A., J. Heeter, H. G. Wisniewski, V. Liublinska, C. W. Pattanayak, R. J. Karia, T. Stabler, E. A. Balazs and V. B. Kraus (2015). "Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression." Osteoarthritis Cartilage **23**(1): 70-76.

12. Barchowsky, A., D. Frleta and M. P. Vincenti (2000). "Integration of the NF-κB and mitogen-activated protein kinase/AP-1 pathways at the Collagenase-1 promoter: Divergence of IL-1 and TNF-dependent signal transduction in rabbit primary synovial fibroblasts." Cytokine **12**(10): 1469-1479.

13. Bellamy, N., J. Campbell, V. Robinson, T. Gee, R. Bourne and G. Wells (2006). "Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee." Cochrane Database Syst Rev(2): CD005321.

14. Berenbaum, F. (2013). "Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)." Osteoarthritis and Cartilage **21**(1): 16-21.

15. Berenbaum, F., J. Grifka, S. Cazzaniga, M. D'Amato, G. Giacovelli, X. Chevalier, F. Rannou, L. C. Rovati and E. Maheu (2012). "A randomised, double-blind, controlled trial comparing two intra-articular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis." Ann Rheum Dis **71**(9): 1454-1460.

16. Bertini, I., V. Calderone, L. Cerofolini, M. Fragai, C. F. G. C. Geraldes, P. Hermann, C. Luchinat, G. Parigi and J. M. C. Teixeira (2012). "The catalytic domain of MMP-1 studied through tagged lanthanides." FEBS Letters **586**(5): 557-567.

17. Biosystems, A. (2014). "Real-time PCR handbook." Retrieved 23.02.2015, 2015, from

http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/global/forms/real-time-pcrhandbook-download/real-time-pcr-handbook-thank-you.html?status=500.

 Blanco, F. J., I. Moller, M. Romera, A. Rozadilla, J. A. Sanchez-Lazaro, A. Rodriguez, J. Galvez, J. Fores, J. Monfort, S. Ojeda, C. Moragues, M. A. Caracuel, T. Clavaguera, C. Valdes, J. M. Soler, C. Orellana, M. A. Belmonte, F. Martin, S. Gimenez, E. Ucar, J. Pous, N. Bartolome, M. Artieda, M. Szczypiorska, D. Tejedor, A. Martinez, E. Montell, H. Martinez, M. Herrero, J. Verges and G. the Arthrotest Study (2015).
 "Improved prediction of knee osteoarthritis progression by genetic polymorphisms: the Arthrotest Study." Rheumatology (Oxford).

19. Boone, J. D., K. H. Kim, M. Marques and J. M. Straughn (2014). "Compliance rates and outcomes associated with a restrictive transfusion policy in gynecologic oncology patients." Gynecol Oncol **132**(1): 227-230.

20. Bruyère, O., C. Cooper, N. Arden, J. Branco, M. L. Brandi, G. Herrero-Beaumont, F. Berenbaum, E. Dennison, J.-P. Devogelaer, M. Hochberg, J. Kanis, A. Laslop, T. McAlindon, S. Reiter, P. Richette, R. Rizzoli and J.-Y. Reginster (2015). "Can We Identify Patients with High Risk of Osteoarthritis Progression Who Will Respond to Treatment? A Focus on Epidemiology and Phenotype of Osteoarthritis." Drugs & Aging **32**(3): 179-187.

21. Bruyere, O., C. Cooper, J. P. Pelletier, J. Branco, M. Luisa Brandi, F. Guillemin, M. C. Hochberg, J. A. Kanis, T. K. Kvien, J. Martel-Pelletier, R. Rizzoli, S. Silverman and J. Y. Reginster (2014). "An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: A report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)." Semin Arthritis Rheum.

22. Buckwalter, J. A. (1983). "Articular cartilage." Instr Course Lect **32**: 349-370.

23. Buckwalter, J. A. (1983). "Proteoglycan structure in calcifying cartilage." Clin Orthop Relat Res(172): 207-232.

24. Buckwalter, J. A., D. D. Anderson, T. D. Brown, Y. Tochigi and J. A. Martin (2013). "The Roles of Mechanical Stresses in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Implications for Treatment of Joint Injuries()." Cartilage **4**(4): 286-294.

25. Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1997). Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions*†.

26. Buckwalter, J. A. and H. J. Mankin (1997). "Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration, and Transplantation*†." The Journal of Bone & amp; Joint Surgery **79**(4): 612-632.

27. Buckwalter, J. A., H. J. Mankin and A. J. Grodzinsky (2005). "Articular cartilage and osteoarthritis." Instr Course Lect **54**: 465-480.

28. Buescher E.S., Weber. G. M., Luckstead E.F. Retrieved 28.07.2014, 2014, from http://www.jointinjury.com/knee/images/knee1a.gif.

29. Burrage, P. S., K. S. Mix and C. E. Brinckerhoff (2006). "Matrix metalloproteinases: role in arthritis." Front Biosci **11**: 529-543.

30. Bustin, S. A. (2002). "Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems." J Mol Endocrinol **29**(1): 23-39.

31. Chang, C. C., M. S. Hsieh, S. T. Liao, Y. H. Chen, C. W. Cheng, P. T. Huang, Y. F. Lin and C. H. Chen (2012). "Hyaluronan regulates PPARgamma and inflammatory responses in IL-1beta-stimulated human chondrosarcoma cells, a model for osteoarthritis." Carbohydr Polym **90**(2): 1168-1175.

32. Chen, F. H., K. T. Rousche and R. S. Tuan (2006). "Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering." Nat Clin Pract Rheumatol **2**(7): 373-382.

33. Chen, H. C., V. B. Kraus, Y. J. Li, S. Nelson, C. Haynes, J. Johnson,
T. Stabler, E. R. Hauser, S. G. Gregory, W. E. Kraus and S. H. Shah (2010).
"Genome-wide linkage analysis of quantitative biomarker traits of osteoarthritis in a large, multigenerational extended family." Arthritis Rheum 62(3): 781-790.

34. Chen, Y. J., K. S. Tsai, D. C. Chan, K. C. Lan, C. F. Chen, R. S. Yang and S. H. Liu (2014). "Honokiol, a low molecular weight natural product, prevents inflammatory response and cartilage matrix degradation in human osteoarthritis chondrocytes." J Orthop Res **32**(4): 573-580.

35. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

36. Colen, S., D. Haverkamp, M. Mulier and M. P. van den Bekerom (2012). "Hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in all joints except the knee: what is the current evidence?" BioDrugs **26**(2): 101-112.

37. Dahlberg, L., R. C. Billinghurst, P. Manner, F. Nelson, G. Webb, M. Ionescu, A. Reiner, M. Tanzer, D. Zukor, J. Chen, H. E. van Wart and A. R. Poole (2000). "Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1)." Arthritis Rheum **43**(3): 673-682.

38. Davisson, T., S. Kunig, A. Chen, R. Sah and A. Ratcliffe (2002). "Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage." J Orthop Res **20**(4): 842-848.

39. DeGroot, H., 3rd, S. Uzunishvili, R. Weir, A. Al-omari and B. Gomes (2012). "Intra-articular injection of hyaluronic acid is not superior to saline solution injection for ankle arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." J Bone Joint Surg Am **94**(1): 2-8.

40. Dejica, V. M., J. S. Mort, S. Laverty, J. Antoniou, D. J. Zukor, M. Tanzer and A. R. Poole (2012). "Increased type II collagen cleavage by cathepsin K and collagenase activities with aging and osteoarthritis in human articular cartilage." Arthritis Research & Therapy **14**(3): R113-R113.

41. Dheda, K., J. F. Huggett, S. A. Bustin, M. A. Johnson, G. Rook and A. Zumla (2004). "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR." Biotechniques **37**(1): 112-114, 116, 118-119.

42. Diehl, P., L. Gerdesmeyer, J. Schauwecker, P. C. Kreuz, H. Gollwitzer and T. Tischer (2013). "[Conservative therapy of osteoarthritis]." Orthopade **42**(2): 125-139.

43. Edwards, J. C., L. S. Wilkinson, P. Soothill, R. M. Hembry, G. Murphy and J. J. Reynolds (1996). "Matrix metalloproteinases in the formation of human synovial joint cavities." J Anat **188 (Pt 2)**: 355-360.

44. Fan, Z., B. Bau, H. Yang, S. Soeder and T. Aigner (2005). "Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1beta." Arthritis Rheum **52**(1): 136-143.

45. Felson, D. T., J. Goggins, J. Niu, Y. Zhang and D. J. Hunter (2004). "The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment." Arthritis Rheum **50**(12): 3904-3909.

46. Fitzgerald, J. B., M. Jin and A. J. Grodzinsky (2006). "Shear and compression differentially regulate clusters of functionally related temporal transcription patterns in cartilage tissue." J Biol Chem **281**(34): 24095-24103.

47. Freije, J. M., I. Diez-Itza, M. Balbin, L. M. Sanchez, R. Blasco, J. Tolivia and C. Lopez-Otin (1994). "Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas." J Biol Chem **269**(24): 16766-16773.

48. Gigante, A. and L. Callegari (2011). "The role of intra-articular hyaluronan (Sinovial) in the treatment of osteoarthritis." Rheumatol Int **31**(4): 427-444.

49. Goldberg, G. I., S. M. Wilhelm, A. Kronberger, E. A. Bauer, G. A. Grant and A. Z. Eisen (1986). "Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein." J Biol Chem **261**(14): 6600-6605.

50. Goldring, M. B., J. Birkhead, L. J. Sandell, T. Kimura and S. M. Krane (1988). "Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes." J Clin Invest **82**(6): 2026-2037.

51. Gonzalez-Fuentes, A. M., D. M. Green, R. D. Rossen and B. Ng (2010). "Intra-articular hyaluronic acid increases cartilage breakdown biomarker in patients with knee osteoarthritis." Clin Rheumatol **29**(6): 619-624.

52. Grad, S., D. Eglin, M. Alini and M. J. Stoddart (2011). "Physical stimulation of chondrogenic cells in vitro: a review." Clin Orthop Relat Res **469**(10): 2764-2772.

53. Hamamura, K., P. Zhang, L. Zhao, J. W. Shim, A. Chen, T. R. Dodge, Q. Wan, H. Shih, S. Na, C. C. Lin, H. B. Sun and H. Yokota (2013). "Knee loading reduces MMP13 activity in the mouse cartilage." BMC Musculoskelet Disord **14**: 312.

54. Han, F., N. Ishiguro, T. Ito, T. Sakai and H. Iwata (1999). "Effects of sodium hyaluronate on experimental osteoarthritis in rabbit knee joints." Nagoya J Med Sci **62**(3-4): 115-126.

55. Haras, D. and J. P. Amoros (1994). "[Polymerase chain reaction, cold probes and clinical diagnosis]." Sante **4**(1): 43-52.

56. Haseeb, A. and T. M. Haqqi (2013). "Immunopathogenesis of osteoarthritis." Clin Immunol **146**(3): 185-196.

57. Heussen, C. and E. B. Dowdle (1980). "Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates." Anal Biochem **102**(1): 196-202.

58. Hiraoka, N., K. A. Takahashi, Y. Arai, K. Sakao, O. Mazda, T. Kishida, K. Honjo, S. Tanaka and T. Kubo (2011). "Intra-articular injection of hyaluronan restores the aberrant expression of matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritic subchondral bone." J Orthop Res **29**(3): 354-360.

59. Hu, X. and C. Beeton (2010). "Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography." J Vis Exp(45).

60. Huh, J.-E., B.-K. Seo, Y.-H. Baek, S. Lee, J.-D. Lee, D.-Y. Choi and D.-S. Park (2012). "Standardized butanol fraction of WIN-34B suppresses cartilage destruction via inhibited production of matrix metalloproteinase and inflammatory mediator in osteoarthritis human cartilage explants culture and chondrocytes." BMC Complementary and Alternative Medicine **12**: 256-256.

61. Hulin-Curtis, S. L., M. Sharif, J. L. Bidwell and M. J. Perry (2013). "Evaluation of NFKB1A variants in patients with knee osteoarthritis." Int J Immunogenet **40**(4): 272-279.

62. Imai, K., S. Ohta, T. Matsumoto, N. Fujimoto, H. Sato, M. Seiki and Y. Okada (1997). "Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and activation of progelatinase A in human osteoarthritic cartilage." Am J Pathol **151**(1): 245-256.

63. Jackson, M. T., B. Moradi, M. M. Smith, C. J. Jackson and C. B. Little (2014). "Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes." Arthritis Rheumatol **66**(6): 1525-1536.

64. Jeon, J. E., K. Schrobback, C. Meinert, V. Sramek, D. W. Hutmacher and T. J. Klein (2013). "Effect of preculture and loading on expression of matrix molecules, matrix metalloproteinases, and cytokines by expanded osteoarthritic chondrocytes." Arthritis Rheum **65**(9): 2356-2367.

65. Johansson, N., M. Ahonen and V. M. Kahari (2000). "Matrix metalloproteinases in tumor invasion." Cell Mol Life Sci **57**(1): 5-15.

66. Juhasz, T., C. Matta, C. Somogyi, E. Katona, R. Takacs, R. F. Soha, I. A. Szabo, C. Cserhati, R. Szody, Z. Karacsonyi, E. Bako, P. Gergely and R. Zakany (2014). "Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the

PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures." Cell Signal **26**(3): 468-482.

67. Julovi, S. M., H. Ito, K. Nishitani, C. J. Jackson and T. Nakamura (2011). "Hyaluronan inhibits matrix metalloproteinase-13 in human arthritic chondrocytes via CD44 and P38." J Orthop Res **29**(2): 258-264.

68. Julovi, S. M., T. Yasuda, M. Shimizu, T. Hiramitsu and T. Nakamura (2004). "Inhibition of interleukin-1beta-stimulated production of matrix metalloproteinases by hyaluronan via CD44 in human articular cartilage." Arthritis Rheum **50**(2): 516-525.

69. Kapoor, M., J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J. P. Pelletier and H. Fahmi (2011). "Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis." Nat Rev Rheumatol **7**(1): 33-42.

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

71. Kendall, M. G. (1962). Rank correlation methods. London, Charles Griffin and Co. Limited.

72. Kindt, T. J., R. A. Goldsby, B. A. Osborne and J. Kuby (2006). Immunology. New York, Freeman.

73. Kleiner, D. E. and W. G. Stetler-Stevenson (1994). "Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases." Anal Biochem **218**(2): 325-329.

74. Knauper, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembry and G. Murphy (1996). "Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme." J Biol Chem **271**(29): 17124-17131.

75. Konttinen, Y. T., M. Ainola, H. Valleala, J. Ma, H. Ida, J. Mandelin, R. W. Kinne, S. Santavirta, T. Sorsa, C. Lopez-Otin and M. Takagi (1999). "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 **58**(11): 691-697.

76. Krippendorff, K. (1986). Content analysis. An Introduction to its Methodology. Beverly Hills, Sage.

77. Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg and N. Zoric (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Molecular Aspects of Medicine **27**(2–3): 95-125.

78. Lane Smith, R., M. C. Trindade, T. Ikenoue, M. Mohtai, P. Das, D. R. Carter, S. B. Goodman and D. J. Schurman (2000). "Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism." Biorheology **37**(1-2): 95-107.

79. Laurent, T. C. and J. R. Fraser (1992). "Hyaluronan." FASEB J **6**(7): 2397-2404.

80. Lemos, G. A., R. Rissi, E. R. Pimentel and E. T. Palomari (2015). "Effects of high molecular weight hyaluronic acid on induced arthritis of the temporomandibular joint in rats." Acta Histochem.

81. Li, P., D. Raitcheva, M. Hawes, N. Moran, X. Yu, F. Wang and G. L. Matthews (2012). "Hylan G-F 20 maintains cartilage integrity and decreases osteophyte formation in osteoarthritis through both anabolic and anti-catabolic mechanisms." Osteoarthritis Cartilage **20**(11): 1336-1346.

82. Little, C. B., A. Barai, D. Burkhardt, S. M. Smith, A. J. Fosang, Z. Werb, M. Shah and E. W. Thompson (2009). "Matrix metalloproteinase 13deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development." Arthritis Rheum **60**(12): 3723-3733.

83. Lohmander, L. S., M. Gerhardsson de Verdier, J. Rollof, P. M. Nilsson and G. Engstrom (2009). "Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study." Ann Rheum Dis **68**(4): 490-496.

84. Lotz, M. and R. F. Loeser (2012). "Effects of aging on articular cartilage homeostasis." Bone **51**(2): 241-248.

85. Loza, E., J. M. Lopez-Gomez, L. Abasolo, J. Maese, L. Carmona, E. Batlle-Gualda and G. Artrocad Study (2009). "Economic burden of knee and hip osteoarthritis in Spain." Arthritis Rheum **61**(2): 158-165.

86. TRB Chemedica LTD, T. C. (2009). Retrieved 15.11.2014, 2014, from http://www.trbchemedica.co.uk/musculoskeletal-products/ostenil-smpc.

87. Mackay, I. M., K. E. Arden and A. Nitsche (2002). "Real-time PCR in virology." Nucleic Acids Research **30**(6): 1292-1305.

88. Maheu, E., M. Zaim, T. Appelboom, S. Jeka, T. Trc, F. Berenbaum, K. Maasalu and F. Berenbaum (2011). "Comparative efficacy and safety of two different molecular weight (MW) hyaluronans F60027 and Hylan G-F20 in symptomatic osteoarthritis of the knee (KOA). Results of a non inferiority, prospective, randomized, controlled trial." Clin Exp Rheumatol **29**(3): 527-535.

89. Mankin, H. J. and L. Lippiello (1970). "Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips." J Bone Joint Surg Am **52**(3): 424-434.

90. Matthias Gamer, J. L., Ian Fellows, Puspendra Singh (2012). Package irr, Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement.

91. Mauck, R. L., M. A. Soltz, C. C. Wang, D. D. Wong, P. H. Chao, W. B. Valhmu, C. T. Hung and G. A. Ateshian (2000). "Functional tissue

engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyteseeded agarose gels." J Biomech Eng **122**(3): 252-260.

92. Mitchell, P. G., H. A. Magna, L. M. Reeves, L. L. Lopresti-Morrow, S. A. Yocum, P. J. Rosner, K. F. Geoghegan and J. E. Hambor (1996).
"Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage." J Clin Invest 97(3): 761-768.

93. Moldovan, F., J. P. Pelletier, J. Hambor, J. M. Cloutier and J. Martel-Pelletier (1997). "Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta." Arthritis Rheum **40**(9): 1653-1661.

94. Moreland, L. (2003). "Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action." Arthritis Res Ther **5**(2): 54 - 67.

95. Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." J Biol Chem **274**(31): 21491-21494.

96. Nanodrop. "T009- Technical Bulletin." Retrieved 15.11.2014, from http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf.

97. Nehrer, S., H. A. Breinan, A. Ramappa, G. Young, S. Shortkroff, L. K. Louie, C. B. Sledge, I. V. Yannas and M. Spector (1997). "Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes." Biomaterials **18**(11): 769-776.

98. Nietfeld, J. J., B. Wilbrink, W. Den Otter, J. Huber and O. Huber-Bruning (1990). "The effect of human interleukin 1 on proteoglycan metabolism in human and porcine cartilage explants." J Rheumatol **17**(6): 818-826.

99. Nissinen, L. and V. M. Kahari (2014). "Matrix metalloproteinases in inflammation." Biochim Biophys Acta **1840**(8): 2571-2580.

100. Nistor, A., P. H. Watson, N. Pettigrew, K. Tabiti, A. Dawson and Y. Myal (2006). "Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer." BMC Clin Pathol **6**: 2.

101. Peng, H., J. L. Zhou, S. Q. Liu, Q. J. Hu, J. H. Ming and B. Qiu (2010). "Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes in vitro." Inflamm Res **59**(7): 519-530.

102. Portner, R., S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz and N. M. Meenen (2005). "Bioreactor design for tissue engineering." J Biosci Bioeng **100**(3): 235-245.

103. Putz, R., J. Sobotta and R. Pabst (2007). Anatomie des Menschen: der komplette Atlas in einem Band ; allgemeine Anatomie,

Bewegungsapparat, innere Organe, Neuroanatomie ; [Online-Zugang + interaktive Extras], Elsevier Urban & Fischer.

104. Qiu, B., S. Q. Liu, H. Peng and H. B. Wang (2005). "The effects of sodium hyaluronate on mRNA expressions of matrix metalloproteinase-1, -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cartilage and synovium of traumatic osteoarthritis model." Chin J Traumatol **8**(1): 8-12.

105. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

106. Ratcliffe, A. and L. E. Niklason (2002). "Bioreactors and Bioprocessing for Tissue Engineering." Annals of the New York Academy of Sciences **961**(1): 210-215.

107. Reboul, P., J. P. Pelletier, G. Tardif, J. M. Cloutier and J. Martel-Pelletier (1996). "The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis." J Clin Invest **97**(9): 2011-2019.

108. Robert-Koch-Institut (2013). Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin, RKI. **Heft 54**.

109. Rosenberg, L. (1971). "Chemical Basis for the Histological Use of Safranin O in the Study of Articular Cartilage." The Journal of Bone & Joint Surgery **53**(1): 69-82.

110. Rosner, B. (2011). Fundamentals of biostatistics.

111. Rutgers, M., D. B. Saris, L. A. Vonk, M. H. van Rijen, V. Akrum, D. Langeveld, A. van Boxtel, W. J. Dhert and L. B. Creemers (2013). "Effect of collagen type I or type II on chondrogenesis by cultured human articular chondrocytes." Tissue Eng Part A **19**(1-2): 59-65.

112. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.

113. Salzmann, G. M., M. S. Buchberger, M. J. Stoddart, S. Grad, S. Milz, P. Niemyer, N. P. Sudkamp, A. B. Imhoff and M. Alini (2011). "Varying regional topology within knee articular chondrocytes under simulated in vivo conditions." Tissue Eng Part A **17**(3-4): 451-461.

114. Sauerland, K., R. X. Raiss and J. Steinmeyer (2003). "Proteoglycan metabolism and viability of articular cartilage explants as modulated by the frequency of intermittent loading." Osteoarthritis Cartilage **11**(5): 343-350.

115. Scanzello, C. R., E. Umoh, F. Pessler, C. Diaz-Torne, T. Miles, E. Dicarlo, H. G. Potter, L. Mandl, R. Marx, S. Rodeo, S. R. Goldring and M. K. Crow (2009). "Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease." Osteoarthritis Cartilage **17**(8): 1040-1048.

116. Schatti, O., S. Grad, J. Goldhahn, G. Salzmann, Z. Li, M. Alini and M. J. Stoddart (2011). "A combination of shear and dynamic compression leads to mechanically induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells." Eur Cell Mater **22**: 214-225.

117. Schwab, W., G. Schulze-Tanzil, A. Mobasheri, J. Dressler, M. Kotzsch and M. Shakibaei (2004). "Interleukin-1beta-induced expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor and its co-localization with MMPs in human articular chondrocytes." Histol Histopathol **19**(1): 105-112.

118. Scott, D., P. J. Coleman, R. M. Mason and J. R. Levick (2000). "Action of polysaccharides of similar average mass but differing molecular volume and charge on fluid drainage through synovial interstitium in rabbit knees." The Journal of Physiology **528**(3): 609-618.

119. Shan, L., B. Shan, A. Suzuki, F. Nouh and A. Saxena (2015). "Intermediate and Long-Term Quality of Life After Total Knee Replacement." The Journal of Bone & amp; Joint Surgery **97**(2): 156-168.

120. Shlopov, B. V., W. R. Lie, C. L. Mainardi, A. A. Cole, S. Chubinskaya and K. A. Hasty (1997). "Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases." Arthritis Rheum **40**(11): 2065-2074.

121. Siebuhr, A. S., J. Wang, M. Karsdal, A. C. Bay-Jensen, J. Y and Z. Q (2012). "Matrix metalloproteinase-dependent turnover of cartilage, synovial membrane, and connective tissue is elevated in rats with collagen induced arthritis." J Transl Med **10**: 195.

122. Silverwood, V., M. Blagojevic-Bucknall, C. Jinks, J. L. Jordan, J. Protheroe and K. P. Jordan (2015). "Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis." Osteoarthritis Cartilage **23**(4): 507-515.

123. Smith, M. M., A. K. Russell, A. Schiavinato and C. B. Little (2013). "A hexadecylamide derivative of hyaluronan (HYMOVIS(R)) has superior beneficial effects on human osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes than unmodified hyaluronan." J Inflamm (Lond) **10**: 26.

124. Spitters, T. W., J. C. Leijten, F. D. Deus, I. B. Costa, A. A. van Apeldoorn, C. A. van Blitterswijk and M. Karperien (2013). "A dual flow bioreactor with controlled mechanical stimulation for cartilage tissue engineering." Tissue Eng Part C Methods **19**(10): 774-783.

125. Stove, J., C. Gremmes, K. P. Gunther, H. P. Scharf and M. Schwarz (2006). "Metabolic activity and gene expression of osteoarthritic chondrocytes in correlation with radiological and histological characteristics." Biomed Pharmacother **60**(10): 644-647.

126. Sundman, E. A., B. J. Cole, V. Karas, C. Della Valle, M. W. Tetreault, H. O. Mohammed and L. A. Fortier (2014). "The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis." Am J Sports Med **42**(1): 35-41.

127. R Team (2012). Integrated Development for R. RStudio, Inc. Boston, MA.

128. Tetlow, L. C., D. J. Adlam and D. E. Woolley (2001). "Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: Associations with degenerative changes." Arthritis & Rheumatism **44**(3): 585-594.

129. Tetlow, L. C. and D. E. Woolley (1998). "Comparative immunolocalization studies of collagenase 1 and collagenase 3 production in the rheumatoid lesion, and by human chondrocytes and synoviocytes in vitro." Rheumatology **37**(1): 64-70.

130. Theiler, R. (2002). "Arthrose Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation." Schweiz Med Forum **2**(23): 555-561.

131. Thompson, J. C. (2009). Netter's Concise Orthopaedic Anatomy, Elsevier Health Sciences.

132. Tikiz, C., Z. Unlu, A. Sener, M. Efe and C. Tuzun (2005). "Comparison of the efficacy of lower and higher molecular weight viscosupplementation in the treatment of hip osteoarthritis." Clin Rheumatol **24**(3): 244-250.

133. Torzilli, P. A., M. Bhargava and C. T. Chen (2011). "Mechanical Loading of Articular Cartilage Reduces IL-1-Induced Enzyme Expression." Cartilage **2**(4): 364-373.

134. van Saase, J. L., L. K. van Romunde, A. Cats, J. P. Vandenbroucke and H. A. Valkenburg (1989). "Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations." Ann Rheum Dis **48**(4): 271-280.

135. Vilmar, A., J. Garcia-Foncillas, M. Huarriz, E. Santoni-Rugiu and J. B. Sorensen (2012). "RT-PCR versus immunohistochemistry for correlation and quantification of ERCC1, BRCA1, TUBB3 and RRM1 in NSCLC." Lung Cancer **75**(3): 306-312.

136. von Eisenhart-Rothe, R., U. Lenze, S. Hinterwimmer, F. Pohlig, H. Graichen, T. Stein, F. Welsch and R. Burgkart (2012). "Tibiofemoral and patellofemoral joint 3D-kinematics in patients with posterior cruciate ligament deficiency compared to healthy volunteers." BMC Musculoskelet Disord **13**: 231.

137. Wagenhauser, F. J. (1991). "[Arthritis from a clinical viewpoint]." Ther Umsch **48**(1): 18-28.

138. Waldman, S. D., D. C. Couto, M. D. Grynpas, R. M. Pilliar and R. A. Kandel (2007). "Multi-axial mechanical stimulation of tissue engineered cartilage: review." Eur Cell Mater **13**: 66-73; discussion 73-64.

139. Waldman, S. D., C. G. Spiteri, M. D. Grynpas, R. M. Pilliar, J. Hong and R. A. Kandel (2003). "Effect of biomechanical conditioning on

cartilaginous tissue formation in vitro." J Bone Joint Surg Am **85-A Suppl 2**: 101-105.

140. Wang, C. T., Y. T. Lin, B. L. Chiang, Y. H. Lin and S. M. Hou (2006). "High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **14**(12): 1237-1247.

141. Watts, G. "Interpreting Nanodrop (Spectrophotometric) Results." Retrieved 15.11.2014, from http://www.u.arizona.edu/~gwatts/azcc/InterpretingSpec.pdf.

142. Wilczynska, K. M., S. M. Gopalan, M. Bugno, A. Kasza, B. S. Konik, L. Bryan, S. Wright, I. Griswold-Prenner and T. Kordula (2006). "A novel mechanism of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 activation by interleukin-1 in primary human astrocytes." J Biol Chem **281**(46): 34955-34964.

143. Wimmer, M. A., M. Alini and S. Grad (2009). "The effect of sliding velocity on chondrocytes activity in 3D scaffolds." J Biomech **42**(4): 424-429.

144. Wimmer, M. A., S. Grad, T. Kaup, M. Hanni, E. Schneider, S. Gogolewski and M. Alini (2004). "Tribology approach to the engineering and study of articular cartilage." Tissue Eng **10**(9-10): 1436-1445.

145. Zhang, Y. and J. M. Jordan (2010). "Epidemiology of Osteoarthritis." Clinics in geriatric medicine **26**(3): 355-369.

146. Zhou, M., S. Qin, Y. Chu, F. Wang, L. Chen and Y. Lu (2014). "Immunolocalization of MMP-2 and MMP-9 in human rheumatoid synovium." Int J Clin Exp Pathol **7**(6): 3048-3056.

147. Zucker, S., R. M. Lysik, B. I. DiMassimo, H. M. Zarrabi, U. M. Moll, R. Grimson, S. P. Tickle and A. J. Docherty (1995). "Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer." Cancer **76**(4): 700-708.

148. Zucker, S., P. Mancuso, B. DiMassimo, R. M. Lysik, C. Conner and C. L. Wu (1994). "Comparison of techniques for measurement of gelatinases/type IV collagenases: enzyme-linked immunoassays versus substrate degradation assays." Clin Exp Metastasis **12**(1): 13-23.

9. Publikationen

Vortrag am 19.09.2013: 30. AGA-Kongress, Jubiläumskongress, Wiesbaden

The in vitro response of osteoarthritic bone-cartilage-cylinders during mechanical loading in a novel bioreactor and influence of hyaluronic acid. *Güll F., Pohlig F., Salzmann G., Lenze U., Burgkart R., von Eisenhart-Rothe R.*

Vortrag am 30.11.2013: 2. Jahreskongress der Deutschen Kniegesellschaft, Hamburg

Die in vitro Response osteoarthrotischer Knorpel-Knochen-Zylinder unter Hyaluronsäure-Einfluss während physiologisch-mechanischer Stimulation in einem neuartigen Bioreaktor.

Florian Pohlig

Wissenschaftliche Veröffentlichung:

Hyaluronic Acid Suppresses the Expression of Metalloproteinases in Osteoarthritic Cartilage Stimulated Simultaneously by Interleukin 1β and Mechanical Load. *Pohlig F, Guell F, Lenze U, Lenze FW, Muehlhofer H, Schauwecker J, Toepfer A, Mayer-Kuckuk P, von Eisenhart-Rothe R, Burgkart R, Salzmann G.* PLoS One. 2016 Mar 2;11(3):e0150020. doi: 10.1371/journal.pone.0150020.

eCollection 2016

Anhänge

PATIENT 1	RNA-KONZENTRATION µG/ML	²⁶⁰ / ₂₈₀	LEGENDE
0	5,7	2,09	0= Kontrolle
1	7	2,05	1 = mech. Belastung
2	4,6	2,73	2= 1+ IL
3	10,6	2,11	3= 2+ 1mg/ml HA
4	7,8	1,79	4= 2+ 3mg/ml HA
PATIENT 2			
0	7,9	1,77	
1	6,3	1,91	
2	4,4	1,61	
3	4,3	2,21	
4	8,7	1,74	
PATIENT 3			
0	2,9	1,86	
1	8,4	1,89	
2	9,3	2,43	
3	20,8	2,02	
4	9,6	2,38	
PATIENT 4			
0	14,6	1,97	
1	6,1	2,75	
2	4,4	3,27	
3	5,1	4,17	
4	4,9	1,97	
PATIENT 5			
0	5,8	1,71	
1	5,7	1,85	
2	2,6	2,73	
3	5,6	1,61	
4	5,8	1,89	
PATIENT 6			
0	7,2	2,19	
1	5,8	2,15	
2	6,7	1,9	
3	3,1	1,81	
4	8,3	1,73	
PATIENT 7			
0	5,4	1,87	
1	17,4	2,05	
2	3,2	2,01	
3	6,7	1,86	
4	6,3	1,96	
1			

Tabelle 11. RNA-Konzentrationen

PATIENT 8		
0	1,7	2,45
1	5,2	2,15
2	3,6	1,81
3	17,8	2,14
4	7,2	1,89
PATIENT 9		
0	10,3	2,09
1	13,4	2,21
2	4,4	1,99
3	24,4	1,83
4	12,8	1,9
PATIENT 10		
0	5,6	2,63
1	8	2,15
2	15,7	2,04
3	9,7	1,94
4	5,9	1,69
PATIENT 11		
0	14,6	1,97
1	9,1	1,88
2	6,7	1,77
3	6	2,04
4	7,6	1,91
PATIENT 12		
0	8,9	2,07
1	7	2
2	5,5	1,86
3	14,1	2,07
4	6,1	2,07
PATIENT 13		
0	10,2	2,13
1	7,5	2,19
2	7,2	2,01
3	22,3	2,14
4	6,4	2,3
PATIENT 14		
0	11,8	2,34
1	7,1	2,1
2	12	2,2
3	7,6	2,08
4	5,1	2,16

Tabelle 12. Einteilung der Patienten in K&L-Grade

	KELLGREN II	KELLGREN IV
PATIENT-NR.	1	
		2
	3	
		4
		5
	6	
		7
	8	
		9
	10	
		11
	12	
	13	
		14

Tabelle 13. Verwendete Geräte/Software

GERÄT / SOFTWARE	HERSTELLER
ANALYSEKAMERA FUSION FX7	PeqLab, Erlangen
ANALYSEMIKROSKOP AXIOVISION OBSERVER.Z1	Carl Zeiss, Oberkochen
AUTOKLAV VARIOCLAV	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim,
BILDANALYSESOFTWARE AXIOVISION, VERSION 4.8.2.0	Carl Zeiss, Oberkochen
ELISA-READER ASCENT SOFTWARE, VERSION 2.4.2	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
ELISA-READER MULTISKAN ASCENT	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
FEINWAAGE SBC 32	Scaltec, Heiligenstadt
INKUBATOR HERACELL® 150	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
KRYOSTAT MH 560	Microm, Walldorf
MAGNETRÜHRER RET BASIC	IKA, Wilmington, USA
NANODROP® 2000C	PeqLab, Erlangen
NANODROP®-SOFTWARE, VERSION 1.4.2	PeqLab, Erlangen
PCR EXPRESS® THERMOCYCLER	Thermo Hybaid, Ashford, USA
PCR-WERKBANK CAPTAIR BIO	erlab, Val de Reuil, Frankreich
PH-METER PH LEVEL ONE	WTW, Weilheim
PIPETTEN REFERENCE	Eppendorf, Hamburg
PIPETTIERHILFE ELEKTRISCH, EASYPET®	Eppendorf, Hamburg
PLATTENZENTRIFUGE PERFECT SPIN PLATE SPINNER	PeqLab, Erlangen
RNA-WERKBANK	Berner, Elmshorn
ROUTINEMIKROSKOP WILOVERT S	Hund, Wetzlar
SCHNITTSTRECKER	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
SPÜLMASCHINE MIELABOR G7783	Miele, Gütersloh
STEPONEPLUS® REAL TIME PCR SYSTEM	Applied Biosystems, Foster City, USA

STEPONEPLUS® SOFTWARE VERSION 2.2.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
STERILE WERKBANK HERASAFE® HS12	Kendro, Langenselbold
STERILISATOR ED115	Binder, Tuttlingen, Germany
STROMQUELLE EV200	PeqLab, Erlangen
TISCHZENTRIFUGE BIOFUGE FRESCO	Heraeus, Osterode
TISCHZENTRIFUGE EPPENDORF MINISPIN	Eppendorf, Hamburg
PLUS	
VORTEX-MINISHAKER (MS2)	IKA, Wilmington, USA
WASSERBAD SUB14	Grant Instruments, Cambridge, UK
ZENTRIFUGE EPPENDORF CENTRIFUGE	Eppendorf, Hamburg
5415D	
ZENTRIFUGE EPPENDORF CENTRIFUGE 5804R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 14. Verwendete Reagenzien

REAGENZ	HERSTELLER
AEC Dako	Dako, Glostrup, Denmark
Azeton	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
β-Glycerophosphat Disodium Salt Hydrate	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Biotin-14-dATP, 0.4 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
dCTP, 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
dGTP, 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNase-, RNase-freies H2O	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
dTTP, 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's MEM (w/o Ca2+, low Glucose)	Biochrom, Berlin
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x) (w/o Ca2+ , w/o Mg2+)	Biochrom, Berlin, Germany
Eisessigsäure	Merck, Darmstadt
Eosin G	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %	Apotheke TUM MRI, München
Ethanol 96 %	Apotheke TUM MRI, München
Ethanol 99.8 %	Apotheke TUM MRI, München
Eukitt® quick	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
ExtrAvidin®-Peroxidase	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Fetal Bovines Serum	Biochrom, Berlin
Fetal Bovines Serum 22, Frozen Section Compound	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
HCI (1M)	Merck, Darmstadt
HCI (37%)	Merck, Darmstadt
High Capacitiy cDNA Transkriptions-Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Humanes IL-1β	Biochrom, Berlin
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Apotheke TUM MRI, München
ITS Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
ITS+1 Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Kaiser's Glycerin Gelatine	Merck, Darmstadt
KCL	Merck, Darmstadt
Klenow Fragment Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Klenow Fragment, 10 U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Linolsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
L-Proline	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Mayer's Hämatoxylin	Apotheke TUM MRI, München
MEM Vitamine (100x)	Biochrom, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Ostenil Hyaluronsäure	TRB Chemedila AG, Haar, Germany
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Peroxidase Substrate AEC+	Dako, Glostrup, Denmark
PBS	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PFA 8%	Apotheke TUM MRI, München
PrimocinTM	InVivoGen, San Diego, USA
Proteinase K	Qiagen, Hilden
Qiashredder®	Qiagen, Hilden
RNase Away®	Molecular Bioproducts, San Diego, USA
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rneasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Rotistock SDS 20%	Roth, Karlsruhe
Safranin-O	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Steriles Wasser (ddH2O)	Braun, Melsungen
TaqMan [®] Gene Expression Assays	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Master Mix Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® PreAmp Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TE Buffer (100x)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
TissueTek O.C.T. Gefriermedium	Sakura Finetek, AJ Alphen aan den Rjin, Niederlande
Tris-EDTA 100x Concentrate	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris-HCl, 1M, pH 7.0	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100®	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Weigert'sche Stammlösung A	Merck, Darmstadt
Weigert'sche Stammlösung B	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Tabelle 15. Verwendete Verbrauchsmaterialien

C35 MICROTOMKLINGEN	FEATHER SAFETY RAZOR, OSAKA, JAPAN
0,6 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hess
1,5 ml Reaktionsgefäße	Biozym, Hess
2,0 ml Reaktionsgefäße (SafeLock Tube)	Eppendorf, Hamburg
15 ml Falconröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
50 ml Falconröhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen 75 cm2	BD Biosciences, New Jersey, USA
Zelkulturplatten 6-Well	BD Biosciences, New Jersey, USA
Pipettenspitzen 2ml, 10ml, 25ml (Cellstar)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000 µl	Biozym, Hess
Kang Ming Na Einmalpinzetten	Medicon Subine Scholz, Neubiberg, Germany
Medikamentenmörser	Rehaforum Medical GmbH, Elmshorn, Germany
Klebefolie MicroAmp™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reaktionsplatte 96-Well MicroAmp™	Applied Biosystems, Foster City, USA
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle Größe 14, 21	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Filter, steril 0,22 µm	Merck Millipore, Billerica, USA
Papierfilter	
Spritzen, steril	Braun Melsungen, Melsungen, Germany

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Labor für Zellkultur der Klinik für Sportorthopädie und Orthopädie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München. Ich möchte mich für die Überlassung des Themas bei Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe und Herrn PD. Dr. med. Rainer Burgkart bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Florian Pohlig für die ausgezeichnete und intensive Betreuung sowie für die Hilfestellungen bei jeglichen Fragen.

Herzlichster Dank gilt Frau Jutta Tübel für die unermüdliche Unterstützung bei labortechnischen Fragen und für ihre stets motivierenden Worte, sowie dem gesamten Laborteam für die äußerst gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich außerdem bei der Firma Endolab in Rohrdorf für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und bei Frau Riedelsheimer für die zuvorkommende Betreuung vor Ort.

Für die finanzielle Förderung dieses Forschungsprojekts danke ich der AGA – Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie, die ausschlaggebend für das Zustandekommen des Projekts war.

Zudem bedanke ich mich beim Institut für experimentelle Onkologie für die Bereitstellung ihrer Räume und ihres Materials für die Anfertigung der histologischen Schnitte.

Für die Mitbewertung der histologischen Arthrose-Scores bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Dr. med. Frauke Wilken und Herrn Dr. med. Ulrich Lenze.

Darüber hinaus geht mein aufrichtigster Dank an meine jetzigen Kollegen der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, ohne die das Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären, sowie meiner Partnerin Sonja, die immer geduldig und unterstützend hinter mir steht.