

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. P. Eysel

**Charakterisierung der Expressions- und
Verteilungsmuster der Osteoarthrose-assoziierten
Proteine STIM1, Plastin-3, TSP-1 und TSP-5 bei
der humanen Varusgonarthrose**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anne Glasmacher
aus Köln

promoviert am 08. November 2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin oder Gutachter: Privatdozent Dr. med. J. Oppermann

2. Gutachterin oder Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. F. Sengle

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Priv.-Doz. Dr. med. Jan Oppermann

Frau Apl. Prof. Dr. sportwiss. Anja Niehoff

Frau Dr. rer. nat. Juliane Heilig

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Tibiaplateaus sind Resektate und stammen aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie und wurden dort ohne meine Mitarbeit nach entsprechender Einwilligung der Patienten im Rahmen der Implantation von Knie-Endoprothesen aufgrund fortgeschrittener Varusgonarthrosen routinemäßig reseziert.

Anschließend wurden die Tibiaplateaus von Frau Dr. Juliane Heilig in Paraformaldehyd fixiert und über 8 Wochen entkalkifiziert. Aus spezifischen Regionen der Tibiaplateaus wurden Gewebeproben entnommen und mir im Anschluss freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Juliane Heilig von mir selbst ausgeführt worden.

Die aus den Experimenten stammenden Knorpelschnitte wurden nach entsprechender Anleitung von Frau Prof. Dr. Anja Niehoff und Frau Dr. Juliane Heilig von mir selbstständig ausgewertet.

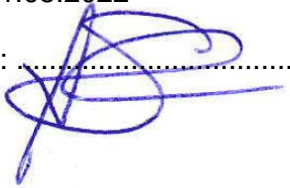
Die Erarbeitung der Statistik wurde von mir selbst nach entsprechender Anleitung und unter Mitarbeit von Frau Prof. Dr. Anja Niehoff durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 01.05.2022

Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right, positioned over the dotted line of the signature field.

Danksagung

Meinen ausdrücklichen Dank möchte ich an dieser Stelle folgenden Personen entgegenbringen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben und ohne die diese Dissertation wahrscheinlich nicht fertig gestellt worden wäre:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Jan Oppermann für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die flexible und schnelle Unterstützung und Hilfe in allen Belangen.

Außerdem möchte ich Frau Prof. Anja Niehoff danken, die für mich immer eine zuverlässige und vertrauensvolle Ansprechpartnerin war. Ich danke ihr für all die konstruktive Kritik und wertvollen Hilfestellungen, sowie die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und für all die Zeit, die sie sich für meine zahllosen Fragen genommen hat.

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Juliane Heilig aussprechen, die mich zuverlässig durch die Laborarbeit geführt hat, meine erste Ansprechpartnerin bei Fragen aller Art war und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Sie hat mich stets motiviert und mich souverän bei meinen ersten Schritten im Laboralltag unterstützt. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit mit deutlich weniger Freude an der Arbeit und weniger unterhaltsamen Pausen fertig gestellt worden.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern danke ich für Ihre Unterstützung, ihren Glauben an mich und für ihre Liebe, die mich mein Leben lang begleitet und geleitet hat.

Zu guter Letzt danke ich Michael, der mir in Zeiten großer und weniger großer Motivation zur Seite gestanden hat, größtes Verständnis und Geduld bewiesen hat und mich immer uneingeschränkt unterstützt hat.

Meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	12
2.1 Osteoarthritis	12
2.2 Hyaliner Gelenkknorpel	16
2.3 Zytoskelett und Mechanotransduktion	22
2.4 Calcium-abhängige Proteine im Gelenkknorpel.....	26
2.4.1. Thrombospondine	27
2.4.1.1 TSP-1	28
2.4.1.2 TSP-5	28
2.4.2. STIM1	29
2.4.3. Plastin-3.....	31
2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	33
3. MATERIAL UND METHODEN	35
3.1 Materialien	35
3.1.1. Allgemeine Pufferlösungen	35
3.1.2. Verwendete Antikörper	36
3.2 Methoden	37
3.2.1. Gewebeproben	37
3.2.2. Herstellung von Gewebeschnitten.....	39
3.2.3. Histologische Färbungen	39
3.2.3.1 Entparaffinierung und Rehydrierung	39
3.2.3.2 Safranin-O/Fast-Green-Färbung	39
3.2.4. Immunhistochemische Färbungen	41
3.2.4.1 TSP-1 und TSP-5.....	41
3.2.4.2 STIM1 und PLS3	45
3.2.5. Analyse der gefärbten Gewebeschnitte	47
3.2.6. Auswertung der Färbungen.....	48
3.2.6.1 Histologisches Scoring	48
3.2.6.2 Scoring der immunhistochemischen Färbungen	51

3.2.6.2.1 TSP-1 und TSP-5	51
3.2.6.2.2 STIM1 und PLS3	53
3.2.7. Statistische Auswertung.....	54
4. ERGEBNISSE	55
4.1 OARSI-Score	55
4.2 Thrombospondin-1 (TSP-1)	57
4.3 Thrombospondin-5 (TSP-5)	60
4.4 <i>Stroma interaction molecule 1</i> (STIM1)	63
4.5 Plastin-3 (PLS3)	71
5. DISKUSSION	79
5.1 Thrombospondin-1 (TSP-1)	80
5.2 Thrombospondin-5 (TSP-5)	81
5.3 <i>Stroma interaction molecule 1</i> (STIM1)	83
5.4 Plastin-3 (PLS3)	84
5.5 Abhängigkeit der Expressions- und Verteilungsmuster der untersuchten Proteine von mechanischer Belastung	85
5.6 Kolokalisationen von TSP-1, TSP-5, STIM1 und PLS3.....	87
5.7 Kritische Analyse der angewandten Verfahren.....	88
5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick	90
6. LITERATURVERZEICHNIS	92
7. ANHANG	104
7.1 Abbildungsverzeichnis	104
7.2 Tabellenverzeichnis	106
8. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	107

Abkürzungsverzeichnis

ABD	Aktin-bindende Domäne
ABP	Aktin-bindendes Protein
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AF	Aktinfilament
AGG	Aggrecan
ANOVA	a one-way analysis of variance
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BMP	bone morphogenetic proteins
BSA	Bovinseryumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
Ca ²⁺ -BD	Calcium-Bindungsstelle
CalD	Calponin-ähnliche Domäne
CH-ZYT	Chondrozyt
COMP	Cartilage oligmeric matrix protein
CRAC	Calcium-release activated Calcium-Channel
CTD	C-terminal domain
DAB	Diaminobenzidin
DALY	disability-adjusted life years
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DPX	Dibutylphthalate polystyrene xylene
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFh	Ef-Hand
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hyaluronan
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6

IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
LINC	linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton
MMP	Matrix-Metalloprotease
MSC	mechanosensitive channel
Nf- κ B	nuclear factor-kappa-B
NSAR	Nicht-steroidale-Antirheumatika
NTD	N-terminal domain
OA	Osteoarthrose
OARSI	Osteoarthritis Research International Society
PBS	phosphate-buffered saline
PG	Proteoglykan
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PLS3	Plastin-3
PZM	perizelluläre Matrix
SD	standard deviation (Standardabweichung)
STIM1	stroma interaction molecule 1
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRPV4	transient receptor potential vanilloid 4
TSP	Thrombospondin
TSP-1	Thrombospondin-1
TSP-5	Thrombospondin-5
VEGF	vascular endothelial growth factor
VP	Verbindungsproteine
YLD	years lived with disability

1. Zusammenfassung

Osteoarthritis (OA) stellt in Deutschland aufgrund des demographischen Wandels und der fehlenden kausalen Therapiemöglichkeiten ein bedeutendes Krankheitsbild der Gesellschaft dar. Trotzdem ist die molekulare Pathogenese der OA noch nicht im Detail verstanden. Zahlreiche Studien deuten auf eine Schlüsselrolle verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) im Rahmen der Entwicklung und Progression der OA hin. Die EZM des Knorpelgewebes stellt eine wichtige Komponente für die Integrität und physiologische Funktion des gesamten hyalinen Gewebes und somit des Gelenks dar. Eine Beeinträchtigung der EZM führt folglich unweigerlich zu einer gestörten Knorpelfunktion und kann so potentiell eine Degeneration des Gewebes induzieren. Aufgrund der starken mechanischen Belastungen, dem das hyaline Knorpelgewebe der Gelenke ausgesetzt ist, werden dem Erhalt der physiologischen Funktion der EZM bestimmte zelluläre Vorgänge wie die Mechanotransduktion sowie eine intakte Zell-Matrix-Interaktion eine zentrale Funktion zugeschrieben. Die Untersuchung von Komponenten der EZM, die an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt sind, stellt demnach einen vielversprechenden Ansatz für ein detaillierteres Verständnis pathophysiologischer Vorgänge bei der Entwicklung der OA dar. Ebenfalls essentiell für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion sind Calcium- (Ca^{2+})-abhängige Signalwege, die eine Vielzahl von Zellfunktionen wie Differenzierung, Migration und Apoptose beeinflussen. Die Untersuchung Ca^{2+} -abhängiger Faktoren in der EZM stellt also ebenfalls potentiell aufschlussreiche Erkenntnisse in Aussicht, um die der OA zugrunde liegenden Vorgänge detaillierter aufzuschlüsseln.

Um ein besseres Verständnis der molekularen Pathogenese der OA zu erlangen, wurde in dieser Arbeit die Expression und Lokalisation der Ca^{2+} -abhängigen Proteine Thrombospondin-1 (TSP-1), Thrombospondin-5 (TSP-5), *stroma interaction molecule 1* (STIM1) und Plastin-3 (PLS3) in humanem Knorpelgewebe analysiert. Hierzu wurden 15 Tibiaplateaus von Patienten untersucht, die aufgrund einer Fehlstellung der Beinachse an einer medial betonten Varusgonarthrose litten. Hierbei kommt es durch die varische Beinachse zu einer veränderten mechanischen Belastung innerhalb des Kniegelenks zu Lasten des medialen Kompartiments. Konsekutiv führt dies zu einer vermehrten Degeneration des medial gelegenen Knorpelgewebes aufgrund der erhöhten mechanischen Beanspruchung. Die Tibiaplateaus wiesen dementsprechend verschiedene Stadien der Knorpeldegeneration auf. Die Betrachtung des stärker betroffenen medialen Kompartiments und des weniger betroffenen lateralen Kompartiments ermöglichte den direkten Vergleich der Expression und Lokalisation der untersuchten Proteine bei unterschiedlich stark degeneriertem Knorpelgewebe. Zur topographischen Analyse der OA-Stadien wurden diese mittels Safranin-O/Fast-Green

angefärbt und anhand der Kriterien des *Osteoarthritis Research International Society-Scores* (OARSI-Scores) ausgewertet. Zur Lokalisation von TSP-1 und TSP-5 wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Verteilung von STIM1 und PLS3 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen visualisiert. Anschließend wurde eine quantitative und qualitative Auswertung der Verteilungs- und Expressionsmuster der Proteine anhand verschiedener Scores durchgeführt. Die morphologische Untersuchung der Knorpelproben sowie die erhobenen Scores zeigten, dass STIM1 und PLS3 vornehmlich in superfiziell gelegenen Chondrozyten lokalisiert waren. Hierbei zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression von STIM1 und PLS3 in der oberflächlichen Zone des medialen Kompartiments im Vergleich zu den lateralen Gewebeproben. Außerdem konnte im direkten Vergleich von medialen und lateralen Gewebeproben gezeigt werden, dass die medialen Knorpelschnitte eine eindeutig reduzierte Färbung von TSP-1 aufwiesen. Bei der Analyse der Lokalisation und Expression von TSP-5 fielen lediglich subtile Unterschiede beim Vergleich der beiden Kompartimente auf.

Insgesamt konnten durch diese Arbeit OA-assoziierte Veränderungen im direkten Vergleich von verschiedenen Stadien der Knorpeldegradation gezeigt werden. Die akzentuierte Expression von STIM1 und PLS3 in stärker degeneriertem Knorpel weist hierbei auf eine direkte Beteiligung dieser Proteine an der Pathogenese der OA hin. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Proteine STIM1 und PLS3, die eine zentrale Funktion bei der Ca^{2+} -abhängigen Zell-Matrix-Interaktion in hyalinem Knorpelgewebe besitzen, einen Einfluss auf mechanosensitive Vorgänge der EZM und der Chondrozyten innehaben. Diese Arbeit bietet neue Erkenntnisse hinsichtlich des Verständnisses der Pathogenese der OA und kann eine Grundlage für neue diagnostische und therapeutische Ansätze bieten mit dem Ziel, eine kausale Behandlung OA-assoziiierter Veränderungen zu ermöglichen.

2. Einleitung

2.1 Osteoarthrose

Osteoarthrose (OA), synonym lediglich als Arthrose oder Arthrosis deformans bezeichnet, ist eine degenerative Erkrankung des Gelenks, die zu einem zunehmenden Verlust des Knorpelgewebes führt. Die „*Osteoarthritis Research Society International*“ (OARSI) definiert OA als Erkrankung der beweglichen Gelenke, die durch Zellstress und Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM) infolge von Mikro- und Makroverletzungen gekennzeichnet ist und die maladaptive Reparaturreaktionen inklusive inflammatorischer Signalwege aktiviert, welche konsekutiv zu einer Störung des Knorpelstoffwechsels und schließlich zu Knorpelabbau, Knochenumbau, Osteophytenbildung, Gelenkentzündung und dem Verlust der normalen Gelenkfunktion führt (1). Betroffen sind hierbei vor allem die gewichtstragenden Gelenke der unteren Extremität, wie Hüft- und Kniegelenke (2).

OA stellt die häufigste Gelenkerkrankung weltweit dar (3). Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes aus dem Jahr 2013, sind in Deutschland ab dem 60. Lebensjahr circa ein Drittel aller Männer und die Hälfte der Frauen betroffen (Abb. 1). In Deutschland ließ sich dabei im Zeitraum von 2003 bis 2010 eine Zunahme der OA-Prävalenz sowohl bei Frauen (2003: 22,6%, 2010: 27,1%) als auch bei Männern (2003: 15,5%, 2010: 17,9%) verzeichnen (4). Aufgrund des demographischen Wandels und der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung ist anzunehmen, dass sich diese Tendenz weiter fortsetzt.

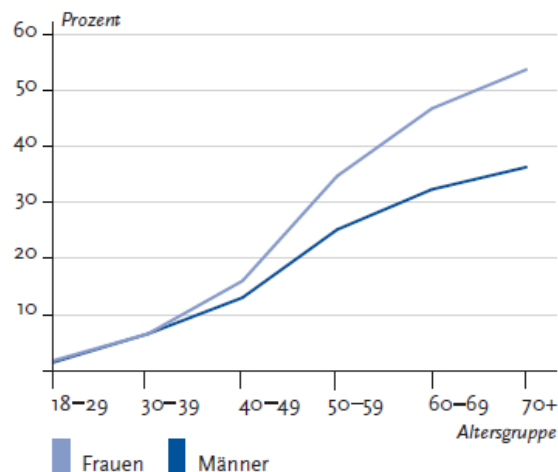


Abb. 1: Lebenszeitprävalenz der Arthrose (Datenbasis GEDA-Studie 2010). Es ist eine deutliche Zunahme der Lebenszeitprävalenz in Abhängigkeit zum Lebensalter zu erkennen. Ab dem 60. Lebensjahr beträgt diese bei Frauen fast 50%, bei Männern über 30%. Übernommen aus (4).

Ätiologisch wird zwischen der primären, auch als idiopathisch bezeichneten Form der OA und sekundären Formen unterschieden, wobei bei primären OA-Formen weder ein bekanntes Grundleiden besteht, noch eine erkennbare, auslösende Krankheit als Ursache nachgewiesen werden kann (5). Prädisponierende Faktoren für die Ausbildung einer primären OA sind hierbei vor allem das Alter und das weibliche Geschlecht (6). Sekundäre Formen einer OA sind das Resultat vorbestehender Konditionen, wie Fehlbildungen oder -stellungen, metabolische Vorerkrankungen wie Rachitis oder Hämochromatose oder endokrinologische Ursachen wie Hyperparathyreoidismus oder Hyperurikämie. OA kann hierbei auch als Folge von Traumata oder Operationen im Gelenkbereich entstehen (7). Auch durch berufliche Belastungen, wie schwere körperliche Arbeit, häufiges Knien oder Treppensteigen und repetitive Bewegungen wird die Entwicklung einer OA begünstigt (8). Für die Entwicklung einer OA des Kniegelenks scheint vor allem Übergewicht eine bedeutende Rolle zu spielen. Eine Meta-Analyse von einundzwanzig Studien (Jiang et al., 2011) ergab hierbei, dass eine Erhöhung des Body-Maß-Index um 5 Punkte mit einem erhöhten Risiko von 35% für die Entwicklung einer OA des Kniegelenks assoziiert ist. Dieser Effekt war bei Frauen stärker ausgeprägt als bei Männern (9).

Die Risikofaktoren, die die Entstehung einer primären oder sekundären OA begünstigen, sind vielfältig und können in systemische und lokale, gelenkspezifische Faktoren unterteilt werden. Systemisch spielen vor allem Alter, Geschlecht, Übergewicht, eine genetische Prädisposition, die Ethnie, Ernährungsgewohnheiten und der Knochenstoffwechsel der betroffenen Person eine wichtige Rolle. Diese Faktoren beeinflussen die generelle Anfälligkeit einer Person, an OA zu erkranken (2). Gelenkspezifische Risikofaktoren beinhalten unter anderem stattgehabte Verletzungen des Gelenks, sowie die gelenkspezifische Belastung durch sportliche Betätigung und Beruf. Vor allem in den letzten Jahren haben Studien gezeigt, dass neben der mechanischen Komponente auch metabolische und inflammatorische Stoffwechselwege zu der Entwicklung von OA beitragen (10). Ein weiterer wichtiger gelenkspezifischer Faktor ist hierbei das Alignment des Gelenks, sowie mögliche angeborene oder erworbene Deformitäten der Achsstellung oder Gelenkfläche (2, 11). Malalignment und Deformitäten führen zu einer veränderten Lastverteilung innerhalb des Gelenks und somit zu einer vermehrten Beanspruchung einzelner Gelenkanteile, die mit Destruktion von Knorpelgewebe einhergehen können. Bei einer Varusfehlstellung im Kniegelenk kommt es zu einer erhöhten mechanischen Belastung im medialen Kompartiment des Gelenkes und daher vorzugsweise im Bereich der medialen Tibia zu einem vermehrten Knorpelverlust mit medialer Gelenkspaltverminderung und Osteophytenbildung (12, 13, 14). Folglich ist ein suboptimales Alignment im Kniegelenk im Sinne einer Varusfehlstellung hierbei nicht nur mit der Entstehung, sondern auch mit der weiteren Progression einer bereits vorhandenen OA im Kniegelenk assoziiert, vor allem bei zusätzlichem Vorhandensein von Übergewicht (15).

Klinisch äußert sich die OA unter anderem in Schmerzen und eingeschränkter Beweglichkeit in den betroffenen Gelenken. Dies wird vor allem durch einen Verlust der Knorpelsubstanz im Gelenk und einer konsekutiven Verringerung der Gelenkspaltbreite ausgelöst (16). Als symptomatische Frühtrias werden hierbei Anlauf-, Ermüdungs- und Belastungsschmerz genannt (6). Im weiteren Verlauf kommen Dauer-, Nacht- und Muskelschmerz sowie Bewegungseinschränkungen, Wetterfühligkeit und Krepitation hinzu. In fortgeschrittenen Stadien kann es weiterhin zu einer Verdickung der Gelenkkonturen sowie Gelenkdeformierung, Fehlstellungen und Muskelatrophie bzw. -kontrakturen kommen (6).

Neben der klinischen Einschätzung bilden bei der Diagnostik der OA vor allem bildgebende Verfahren ein wichtiges Fundament für die Diagnosestellung und die Evaluation des Krankheitsverlaufes. Mithilfe der Röntgendiagnostik wurde bereits 1957 von Kellgren und Lawrence eine radiologische Klassifikation eingeführt, die bis heute sowohl im klinischen Alltag zur Stadieneinteilung, als auch in wissenschaftlichen Studien vorwiegend angewandt wird (17). Nach Kellgren und Lawrence wird die Schwere der OA anhand verschiedener, röntgenologischer Kriterien in vier Grade eingeteilt, die durch die Ausprägung einer subchondralen Sklerosierung, Osteophyten, einer Gelenkspaltverschmälerung und einer Deformierung der Gelenkfläche bestimmt werden (18, 19). Mithilfe der Magnetresonanztomographie kann zusätzlich das gelenkassoziierte Weichteilgewebe inklusive Gelenkknorpel und Ligamente dargestellt werden. Somit stellt die MRT die genauere, jedoch auch kostenintensivere Bildgebungsmethode zur Diagnostik der OA dar (20), auf welche dennoch zunehmend zurückgegriffen wird, um strukturelle Weichteilpathologien genauer beurteilen zu können (21).

Der Nachweis von OA in der Bildgebung geht nicht in jedem Fall mit einer OA-spezifischen Symptomatik einher und der Schweregrad der OA in der Bildgebung korreliert nicht zwingend mit der Schwere der subjektiven Symptomatik (11, 21). Im Falle der Kniegelenks-OA scheint vor allem die Ausprägung von Osteophyten und subchondraler Sklerose mit dem Auftreten einer Schmerzsymptomatik assoziiert zu sein (22). Speziell für die Klassifikation der OA des Kniegelenks wird neben der Einteilung nach Kellgren und Lawrence die Ahlbäck-Klassifikation genutzt, welche ebenfalls röntgenologische Kriterien nutzt, um 5 OA-Typen voneinander abzugrenzen (übernommen aus der S2k-Leitlinie für Gonarthrose, S. 8, 23):

- Typ 1: Gelenkspaltverschmälerung
- Typ 2: Aufhebung des Gelenkspalts
- Typ 3: Geringe Knochenarrosion
- Typ 4: Mäßige Knochenarrosion
- Typ 5: Massive Knochenarrosion, oft mit Subluxation und sekundärer lateraler Arthrose

Die Therapieziele bei der Behandlung einer OA sind zum einen die Begrenzung des OA-Progresses und zum anderen die Reduktion von Schmerzen und der Funktionseinschränkung des betroffenen Gelenks (6) und sind demnach vor allem symptomatisch und nicht kurativ ausgerichtet. Zurzeit besteht die konservative Therapie der OA des Kniegelenks aus einer Kombination aus supportiven und pharmakologischen Therapieoptionen. Medikamentös sieht die S2k-Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) für Gonarthrose zunächst eine topische bzw. systemische Anwendung von Nicht-steroidalen-Antirheumatika (NSAR) vor. Bei Kontraindikationen oder nicht ausreichender Wirksamkeit kann auf orale Glucosamine bzw. intraartikuläre Hyaluronsäure oder kurzzeitig auch auf intraartikulär injizierte Corticosteroide zurückgegriffen werden. Als pharmakologische Ultima Ratio können Opioide verabreicht werden, die jedoch möglichst niedrig dosiert und nur kurzzeitig verabreicht werden sollen (23). Die supportiven Therapiemethoden basieren vor allem auf einer Kombination aus physiotherapeutischen Konzepten, wie Krankengymnastik, Ultraschallbehandlungen, Kälte- und Wärmetherapie, Gewichtsreduktion und moderater, sportlicher Betätigung ohne Überlastung der Gelenke sowie der Nutzung orthopädischer Hilfsmittel wie Einlagen oder Orthesen (7, 24).

Erst nach vollem Ausschöpfen der konservativen Therapie und einer weiterhin bestehenden Einschränkung der Lebensqualität durch einen hohen Leidensdruck des Patienten soll eine operative Therapie in Erwägung gezogen werden (25). Zur Verfügung stehen hierbei gelenkerhaltende Verfahren, wie Arthroskopien, fokale Knorpeltransplantationen oder Osteotomien zur Korrektur der Beinachse, und gelenkersetzende Therapie, wie dem Einsatz von unikondylären Endoprothesen oder Totalendoprothesen (23).

Die OA ist zurzeit nicht kausal therapierbar (7). Aufgrund der zunehmenden Erforschung grundlegender, biochemischer Stoffwechselwege in der Pathogenese der OA, existieren inzwischen jedoch zahlreiche Studien bezüglich neuer, experimenteller Therapieansätze, wie dem Einsatz verschiedener Bisphosphonate, dem rekombinanten Fibroblasten-Wachstumsfaktoren 18 (Sprifermin) oder verschiedener Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Antikörper (TNF- α -Antikörper), die bei der Therapie der OA des Kniegelenkes in Studien erste erfolgsversprechende Ergebnisse zeigen (10).

Das statistische Bundesamt hat für das Jahr 2050 eine Erhöhung des Durchschnittsalters von 42 Jahren im Jahr 2005 auf circa 50 Jahre im Jahr 2050 sowie eine weitere Zuspitzung des demographischen Wandels zugunsten älterer Bevölkerungsgruppen prognostiziert (26). Da OA in erster Linie eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist, ist also anzunehmen, dass die OA-Prävalenz mit dem zunehmenden Alter der Bevölkerung steigen wird.

Durch OA kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Lebensqualität bei betroffenen Patienten weltweit, die in den letzten Jahrzehnten in einer zunehmenden Anzahl von

sogenannten DALYs (*disability-adjusted life years*) und YLDs (*years lived with disability*) resultierte. Im Jahr 2019 war OA für 2,2% der weltweiten YLDs verantwortlich (27). Der Anstieg der OA-Prävalenz hat neben individuellem Leidensdruck auch eine erhöhte wirtschaftliche Belastung zur Folge. Laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes aus dem Jahr 2013 verursachen OA-Patienten sowohl hohe direkte Kosten durch die Inanspruchnahme ambulanter und stationärer Versorgungseinrichtungen, als auch hohe indirekte Kosten durch Arbeitsausfälle, Frühberentung und Invalidität. Führend ist hierbei vor allem der Anteil der Arbeitsunfähigkeitsfälle durch eine OA des Kniegelenkes (4). Trotz der steigenden Relevanz von OA-assoziierten Belastungen sowohl für den Einzelnen als auch für die Gesellschaft, sind die genauen Vorgänge der Pathophysiologie der OA erst teilweise verstanden, eine kurative Therapie existiert bisher nicht. Deshalb wurde in den letzten Jahren vermehrt versucht, globale Aufmerksamkeit für die wachsende Belastung durch muskuloskeletale Erkrankungen, wie OA zu gewinnen. Mit Unterstützung der WHO und der Vereinten Nationen wurde bereits im Jahr 2000 der Start der „Bone and Joint Decade“ deklariert, einer Kampagne, die durch einen Zusammenschluss zahlreicher Organisationen die Prävention und Behandlung muskuloskeletaler Erkrankungen wie OA verbessern soll (28).

2.2 Hyaliner Gelenkknorpel

Hyaliner Gelenkknorpel ist hochspezialisiertes Gewebe, welches sich aus mesenchymalen, Bindegewebszellen entwickelt (29). Es ist hypozellulär, avaskulär und alymphatisch und enthält ein dichtes, hochorganisiertes Netzwerk aus Kollagenen und Proteoglykanen (PG), welches dem Knorpelgewebe eine reibungsarme und trotzdem belastungsstabile Charakteristik verleiht (30). Die Knorpelschicht im Kniegelenk weist eine Dicke von ca. $2,4 \pm 0,4$ mm an der medialen femoralen Kondyle und $3,0 \pm 0,4$ mm am medialen Tibiaplateau auf (31) und dient hauptsächlich als gleitfähige Verbindungsfläche, die eine reibungslose Beweglichkeit und optimale Lastverteilung auf den Kraft-übertragenden Flächen ermöglicht (32). Knorpelgewebe ist durch das Zusammenwirken seiner einzelnen Komponenten viskoelastisch; durch die Bindung von Wasser und dem Aufbau eines hydrostatischen Drucks innerhalb des Gewebes, entweicht bei Kraftereinwirkung eine geringe Menge Flüssigkeit aus dem Gewebe und trägt zusätzlich zur reibungsarmen Gleitfähigkeit der Knorpeloberfläche bei (30). Hyalines Knorpelgewebe besteht aus zwei Hauptbestandteilen: dem zellulären Anteil gebildet von Chondrozyten, sowie der Interzellulärsubstanz aus geformter und ungeformter Matrix, die die Chondrozyten einbettet.

Chondrozyten sind hochspezialisierte Zellen, die circa 2-5% des hyalinen Knorpelgewebes

ausmachen. Im adulten Knorpel besitzen Chondrozyten lediglich eine eingeschränkte Fähigkeit zur Replikation, es findet in der Regel also keine Zellteilung mehr statt. Dies trägt maßgeblich zur limitierten Regenerationsfähigkeit des hyalinen Knorpelgewebes bei (31, 32). Sie sind metabolisch hochaktiv und hauptsächlich für den Umsatz, also einen balancierten Auf- und Abbau der EZM verantwortlich, indem sie stetig Bestandteile der EZM synthetisieren und verstoffwechseln. So erzeugt jeder Chondrozyt in seiner direkten Umgebung mit der Produktion von EZM-Molekülen ein bestimmtes Mikromilieu und trägt so zur Erneuerung, Erhaltung und Reparatur der EZM bei (33). Chondrozyten treten im gesunden Gelenkknorpel einzeln oder als Zellkomplexe bestehend aus 2-10 Zellen auf. Diese Knorpelnester bezeichnet man als isogene Gruppe, da alle zugehörigen Chondrozyten aus einem Chondroblasten hervorgegangen sind. Eine Gruppe isogener Chondrozyten werden von einer Knorpelkapsel und einem stark basophilen Knorpelhof umgeben. Diese Basophilie entsteht durch den hohen Anteil der dort vorkommenden polyanionischen PGs. Eine Einheit aus isogenen Chondrozyten, der umgebenen Knorpelkapsel und der perizellulären Matrix (PZM) wird Chondron genannt (34, siehe Abb. 2).

Die EZM füllt den Zellzwischenraum des hyalinen Knorpelgewebes aus und kann in geformte und ungeformte Anteile unterteilt werden. Die Hauptbestandteile der EZM setzen sich aus Kollagenfibrillen, PGs und einem hohen Wasseranteil von bis zu 70% zusammen (35). Sie bilden ein System hoher supramolekularer Ordnung und verleihen dem Gewebe so Druckfestigkeit und ein gewisses Maß an Elastizität (36). Die geformte EZM besteht zum überwiegenden Teil aus den Fibrillen verschiedener Kollagentypen. Kollagen Typ II, IX, und XI formen hierbei ein fibrilläres Netzwerk, welches dem Gewebe Form und Festigkeit verleihen. Kollagen Typ VI findet sich vor allem im perizellulären Anteil der EZM und unterstützt die Zell-Matrix-Interaktion (37). Die verschiedenen fibrillären Kollagen-Typen verfügen alle über denselben, grundsätzlichen Aufbau aus drei linksgängigen Kollagen- α -Ketten, die sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammenschließen (38). Diese Tripelhelix wird über die Bildung von Wasserstoffbrücken sowie elektrostatischen Interaktionen zwischen den einzelnen Aminosäuren der verschiedenen Ketten stabilisiert, wobei repetitive Muster in der Anordnung der Aminosäurekette essentiell sind; jede dritte Position wird hierbei von Glycin besetzt, während die anderen Positionen zu einem hohen Anteil aus Prolin, Hydroxyprolin und Lysin bestehen (39). Durch die parallele Anlagerung mehrerer Kollagenmoleküle entstehen Kollagenfibrillen, die über kovalente Verbindungen quervernetzt werden und hierdurch eine Zugfestigkeit erhalten. Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen im Knorpelgewebe orientiert sich an der räumlichen Ausrichtung der Chondrozyten (40). Der ungeformte Anteil der EZM des hyalinen Knorpelgewebes besteht aus größtenteils sulfatierten, repetitiven Disaccharideinheiten, den sogenannten Glykosaminoglykanen (GAGs). Die Hauptgruppen stellen Chondroitinsulfate und Keratansulfate dar: Mithilfe der negativ geladenen

Sulfatgruppen der GAGs können über Kationenanlagerung osmotisch große Mengen an Wasser gespeichert werden (41). Enthalten GAGs einen Proteinkern, werden sie PGs genannt. Mehrere GAGs sind kovalent an dieses Protein gebunden und bilden so PG-Monomere, von denen der Hauptvertreter im Knorpelgewebe das Aggrecan ist (AGG, 42). Aggrecan besteht aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat und liegt in großen Aggrecan-Hyaluronat-Komplexen vor (Abb. 2).

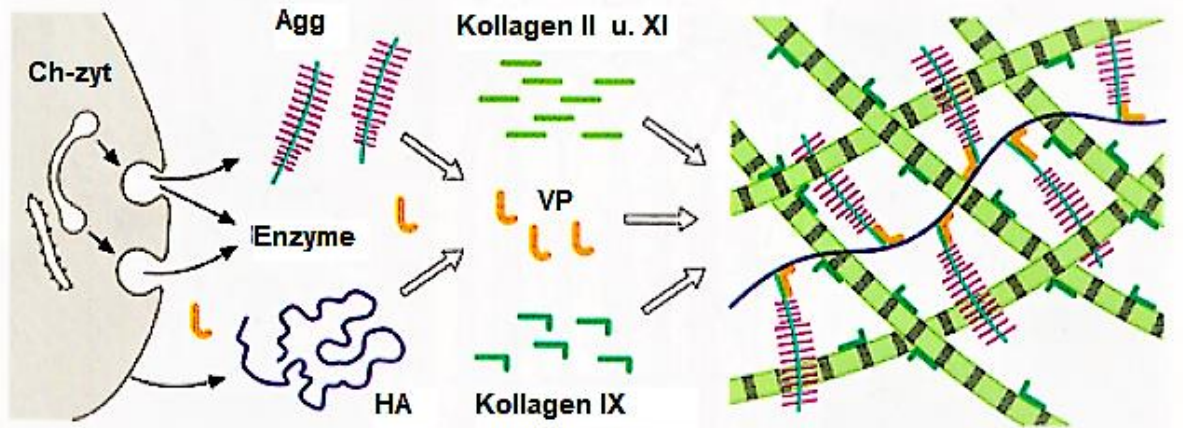


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der EZM des Knorpelgewebes. Chondrozyten (**Ch-zyt**) synthetisieren die Bestandteile der EZM und geben diese in den umliegenden Extrazellularraum. Aggrecanmoleküle (**Agg**) aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat lagern sich mithilfe von Verbindungsproteinen (**VP**), wie Hyaluronektin, an lange Hyaluronanmoleküle (**HA**) an, welche ebenfalls von Chondrozyten synthetisiert wird. Diese Aggrecan-Hyaluronan-Komplexe lagern sich wiederum an die Kollagenfibrillen an, welche vorwiegend aus **Kollagen II und XI** bestehen (40). Abbildung übernommen aus (40).

Diese Komplexe tragen über die Bindung von Wasser entscheidend zu den viskoelastischen Charakteristiken des Knorpelgewebes bei und sind somit maßgeblich an der mechanischen Belastbarkeit des Gelenkknorpels beteiligt (43). Die Zusammensetzung und Anordnung der PGs und Kollagenfibrillen ist demnach essentiell für die Funktion des Gelenkknorpels. Zusätzlich sind PGs über die Sekretion von Signalmolekülen wie dem Zytokin *Transforming growth factor beta* (TGF- β) an der Signalübertragung beteiligt und über ihre Bindung an Integrine oder Kollagen ein Faktor in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation (36).

Die Kollagenfibrillen im artikulären, hyalinen Knorpelgewebe orientieren sich entlang der Ausrichtung der sie produzierenden Chondrozyten und sind arkadenförmig angeordnet. Nahe der Knorpeloberfläche verlaufen sie parallel, um sich dann in profunderen Schichten mit den

benachbarten Fibrillen zu überkreuzen und zunehmend vertikal zur Knochenoberfläche auszurichten. Durch diesen Aufbau der EZM ermöglichen die zugfesten Kollagenfibrillen eine Umwandlung von Druck- in Zugkräfte (44). Die Knorpelschicht lässt sich durch die spezielle Anordnung dieser Kollagenfibrillen in vier Zonen gliedern (Abb. 3); eine oberflächliche, eine mittlere und eine tiefe Knorpelschicht sowie eine kalzifizierte Mineralisationszone (35). Die oberflächliche Schicht, auch Tangentialfaserzone genannt, enthält parallel zur Oberfläche verlaufende Kollagenfibrillen sowie abgeflachte Chondrozyten (45). Hier sind die Kollagenfibrillen trajektoriell in Richtung der stärksten Zugspannung, ausgerichtet (40). Hierdurch ist die Tangentialfaserzone besonders flexibel gegenüber mechanischem Stress. Bei Schädigung dieser Zone kommt es zu einem erhöhten Flüssigkeitsaustausch zwischen dem Knorpelgewebe und der Umgebung und zu einer erhöhten mechanischen Belastung (46).

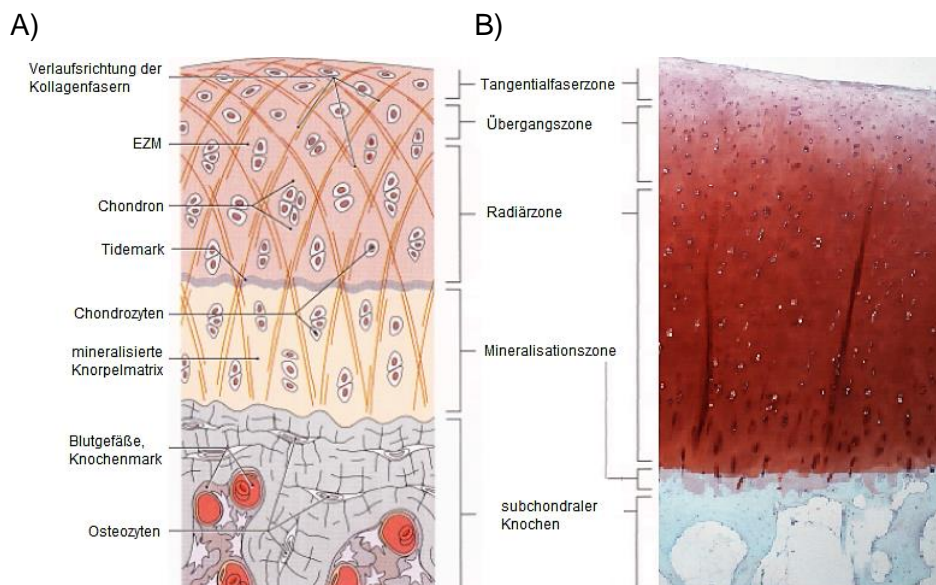


Abb. 3: A) Schematische Darstellung des Aufbaus des hyalinen Knorpelgewebes. B) Hyaliner Gelenknorpel aus einem Knorpel-Knochen-Resektat eines humanen Tibiaplateaus, Safranin-O/Fast-Green-Färbung. A) Der arkadenförmige Verlauf der Kollagenfibrillen umschließt die Chondrone und teilt die Knorpelschicht in vier Zonen. In der Tangentialfaserzone liegen die Kollagenfibrillen parallel zur Knorpeloberfläche, in der Übergangszonen überkreuzen sich die benachbarten Fibrillen und richten sich in der Radiärzone zunehmend senkrecht zur Knochenoberfläche aus. Die Fibrillen umschließen die Chondrone. Zwischen der Radiärzone und der Mineralisationszone liegt die Tidemark als Grenzlinie zwischen Knorpelgewebe und mineralisierter Knorpelmatrix. Der subchondrale Knochen enthält die Blutgefäße, die für die Ernährung des Knorpelgewebes zuständig sind. B) Die anionischen GAGs und PGs der EZM sind durch den kationischen Farbstoff des Safranin-O deutlich angefärbt, sodass die Anordnung der Chondrone deutlich zu erkennen ist. Die Kollagenfibrillen sind nicht angefärbt. Abb. A) angepasst übernommen aus (44).

An die Tangentialzone schließt sich die Übergangszone an, welche in die Radiärzone mit vertikalem Faserverlauf übergeht. Die Radiärzone ist durch die Tide Mark oder Grenzlinie von der Mineralisationzone getrennt. Diese Tide Mark besteht aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen, die über weitere Fibrillen sowohl mit der Radiärzone als auch mit der Mineralisationszone verankert sind. Die Tide Mark trennt die mineralisierte Knorpelmatrix vom Knorpelgewebe und scheint als Befestigung des Knorpelgewebes am Knochengewebe zu fungieren, indem sie Scherkräfte zwischen den Gewebeschichten abfängt (47). Zum anderen fungiert sie als Mineralisationsschranke zwischen kalzifiziertem und nicht-kalzifiziertem Knorpelgewebe (48). Oft wird die Mineralisationszone unterhalb der Tide Mark in der Einteilung vernachlässigt, sodass lediglich eine Einteilung in drei Knorpelschichten erfolgt; die oberflächliche Schicht, (*upper zone*), die mittlere Schicht der Radiärzone (*middle zone*) und die tiefe Schicht (*deep zone*) (30).

Während in gesundem Knorpelgewebe die Integrität der EZM durch die artikulären Chondrozyten aufrechterhalten wird, kann es durch mechanische oder biochemische schädigende Einflüsse zu einer Dysbalance zwischen den katabolen und anabolen Stoffwechselfvorgängen der EZM-Komponenten kommen. Die konsekutive Veränderung der Zusammensetzung der EZM führt zu einer Schädigung des Knorpels, die zunächst zu einer Knorpelaufweichung und -rissen, im Endstadium zu einem völligen Verlust der Knorpelmasse führen kann. Gleichzeitig kommt es zu einer reaktiven Hypertrophie des angrenzenden Knochengewebes, welche sich subchondral als Sklerosierung und an den Gelenkflächenkanten als Osteophyten manifestiert (23). Die Regenerationskapazität des hyalinen, artikulären Knorpels ist zum einen durch seine Avaskularität, zum anderen durch das fehlende Perichondrium begrenzt; Knorpelgewebe erfährt normalerweise durch Chondroblasten im Stratum cellulare des Perichondriums eine Regeneration durch appositionelles Wachstum. Da im hyalinen Gelenkknorpel jedoch kein Perichondrium und ausschließlich postmitotische, teilungsunfähige Chondrozyten vorhanden sind, ist dieses Gewebe äußerst vulnerabel gegenüber degenerativen Prozessen und erfährt kaum Regeneration (40). Das regenerativ gebildete Ersatzgewebe ist hierbei meist qualitativ minderwertiges fibrocartilaginäres Gewebe und kein vollfunktionales, hyalines Knorpelgewebe (49).

Treibender Faktor in der Pathogenese der hyalinen Knorpeldegeneration sind die Chondrozyten, die im Rahmen einer pathologischen Aktivierung vermehrt Matrix-degradierende Enzyme synthetisieren (23). Während der chondrozytäre Metabolismus unter physiologischen Bedingungen langsam vonstattengeht, erhöht sich der Umsatz unter pathologischen Bedingungen rapide und es kommt zur insuffizienten Bildung von EZM-Bestandteilen (30). Des Weiteren kommt es zu einer Ablösung des Knorpelgewebes von der Synovialmembran des Gelenks, infolgedessen eine reaktive Synovitis entstehen kann.

Letztere führt wiederum zu einer Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1 (IL-1) und TNF- α , welche die Knorpeldegeneration weiter unterstützen (23). Entzündliche Prozesse begünstigen außerdem die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, die ihrerseits die Seneszenz und Apoptose von Chondrozyten beeinflussen und konsekutiv auch die Degradation der hyalinen EZM beschleunigen (50). Das Zusammenspiel aus stressinduzierten, intrazellulären Signalwegen sowie inflammatorischen und katabol wirkenden Zytokinen aus den synovialen Fibroblasten und den Chondrozyten führt zu einer vermehrten Synthese von Matrix-degradierenden Proteasen, den Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sowie Proteasen der ADAMTS-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (51). Es existieren zahlreiche ADAMTS, die im Knorpelgewebe exprimiert werden und am anabolen und katabolen Stoffwechsel des Gewebes beteiligt sind. Einige dieser ADAMTS haben außerdem einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten. Studien haben gezeigt, dass sich die Expression von ADAMTS in von OA betroffenem Knorpel von gesundem Knorpelgewebe signifikant unterscheidet (52). Die Induktion von MMPs und ADAMTS führt zu einem Abbau der EZM und zu einem vermehrten Anfall von EZM-Spaltprodukten, die wiederum die synoviale Entzündungsreaktion und so die Degradierung der EZM verstärken. Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Aktivierung von anabolischen Faktoren, wie knochenmorphogenetischer Proteine (*bone morphogenetic proteins*, BMPs) und dem Zytokin TGF- β , welche zu einer hypertrophen Knochenneubildung in Form von Osteophyten beitragen. Durch eine vermehrte Synthese von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) kommt es außerdem zu einer verstärkten Angiogenese des subchondralen Knochens (33). Durch Zytokine wie IL-1, Interleukin-6 (IL-6) oder TNF- α wird die Synthese verschiedener Transkriptionsfaktoren inklusive des *nuclear factor-kappa-B* (Nf- κ B) induziert, welche wiederum die Entzündungsreaktion im Gewebe verstärken und die Proliferation und Apoptose von Chondrozyten beeinflussen (Abb. 4, 33).

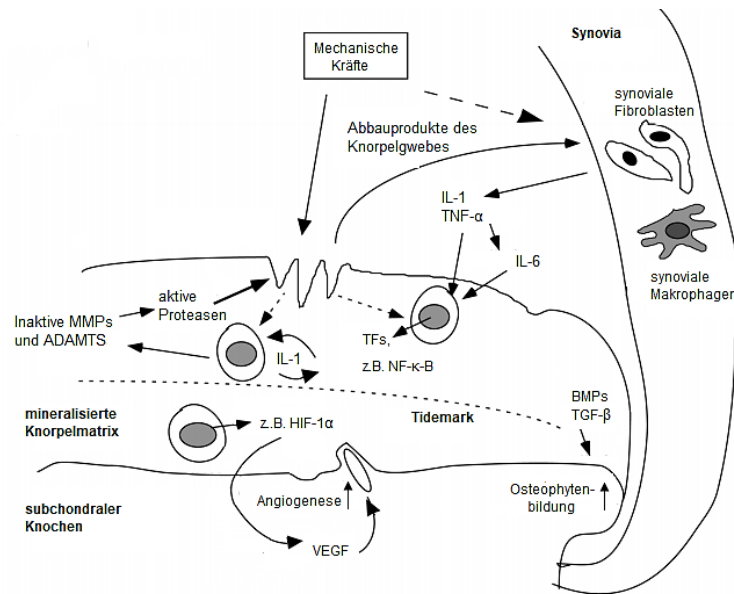


Abb. 4: Schematische Darstellung zellulärer pathogenetischer Vorgänge bei OA durch mechanische und biochemische Reize. Mechanische Kräfte schädigen das Knorpelgewebe und beeinträchtigen die Integrität der EZM. Außerdem induzieren sie eine synoviale Entzündungsreaktion, die zur Synthese von Interleukin-1 (**IL-1**), Interleukin-6 (**IL-6**) und Tumornekrosefaktor- α (**TNF- α**) führt. Chondrozyten bilden reaktiv verschiedene Transkriptionsfaktoren (**TFs**) wie den *nuclear factor-kappa-B* (**NF- κ B**), welche die Entzündungsreaktion verstärken und die Proliferation und Apoptose von Chondrozyten beeinflussen. Durch Zytokine werden verschiedene Matrix-Metalloproteasen (**MMPs**) und Proteasen der **ADAMTS**-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) aktiviert, die den Abbau von EZM-Komponenten unterstützen. Diese Abbauprodukte unterhalten die synoviale Entzündungsreaktion. Durch die inflammatorisch vermittelte Synthese von knochenmorphogenetischen Proteinen (*bone morphogenetic proteins*, **BMPs**) und dem Zytokin *Transforming growth factor beta* (**TGF- β**) kommt es zur hypertrophen Bildung von Osteophyten. Der von Chondrozyten sezernierte Hypoxie-induzierte Faktor 1-alpha (**HIF-1 α**) steuert eine vermehrte, **VEGF**-vermittelte (*vascular endothelial growth factor*) Angiogenese im subchondralen Knochen. Angepasst übernommen aus (33).

2.3 Zytoskelett und Mechanotransduktion

Zellen innerhalb eines Gewebes sind über das Zytoskelett, welches aus Aktin- und Intermediärfilamenten sowie Mikrotubuli besteht, untereinander und mit der EZM verbunden (53). Diese Polymere bilden ein dreidimensionales Netzwerk, welches dem Zellverband zum einen mechanische Stabilität verleiht, zum anderen die intrazelluläre und extrazelluläre

Kommunikation ermöglicht. Auch die aktive Zellmotilität, Endozytose, Zellteilung, die Mechanotransduktion, und der intra- sowie extrazelluläre Transport von Molekülen wird über das Zytoskelett vermittelt (53). Um diese Variabilität an Funktionen erfüllen zu können, verfügen die verschiedenen Bestandteile des Zytoskeletts über unterschiedliche mechanische und dynamische Eigenschaften. So ist unter anderem die Steifigkeit und damit die Persistenzlänge P der einzelnen Proteine unterschiedlich und reicht von wenigen hundert Nanometern bei Intermediärfilamenten über etwa $10\ \mu\text{m}$ bei Aktinfilamenten (AF) bis zu mehreren Millimetern bei Mikrotubuli (54). Außerdem unterliegt das Netzwerk des Zytoskeletts einem ständigen, bedarfsgerechten Auf- und Abbau, bei dem die schnelle Polymerisation und Depolymerisation der einzelnen Bestandteile durch spezielle Begleitproteine der jeweiligen Filamente reguliert wird und sich so intra- und extrazellulären Stimuli anpassen kann (53). Die Komplexität des Zytoskelett-Netzwerkes durch seine Zusammensetzung aus mehreren Bestandteilen und die Dynamik der einzelnen Polymere bewirken, dass sich das Zytoskelett wechselnder mechanischer Belastung optimal anpassen kann.

Mithilfe von Begleitproteinen verleiht ein subkortikal gelegenes Aktinnetz aus parallel zur Membran verlaufenden Aktinfilamenten dem unterhalb der Plasmamembran gelegenen Zytoplasma eine feste, formgebende Struktur, welche der Stabilisierung der Zellmembran dient (40). Außerdem sorgt dieses subkortikale Aktinnetz für eine Fixierung von Transmembranproteinen und dient somit der Sicherung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (40). Die Aktinfilamente des Zytoskeletts, aufgrund des geringen Durchmessers von ca. $7\ \text{Nanometern (nm)}$ auch Mikrofilamente genannt, bestehen aus α -, β - und γ -Aktin-Isoformen, wobei α -Aktine ausschließlich in Muskelzellen vorkommen, während β - und γ -Aktin-Isoformen auch in anderen, nichtmuskulären Zellen auftreten (55). Durch Polymerization und Depolymerization des Aktinskeletts kann ein rascher Umbau des Aktinnetzes und somit der Zellform hervorgerufen werden, um auf variierende Umgebungsfaktoren zu reagieren. Abhängig von der Geschwindigkeit dieser Vorgänge können sowohl Einstülpungen als auch Ausbuchtungen der Zellmembran hervorgerufen und Vorgänge wie Endo- oder Exozytose ermöglicht werden. Aktin hat so eine Schlüsselfunktion in der Zell-Zell-Kommunikation, Zelladhäsion, Muskelkontraktion, Zellteilung und intrazellulärem Transport inne (56, 57). Der Umbau des Aktinskeletts wird durch zahlreiche Aktin-bindende Proteine (ABPs) reguliert. Hierbei sind spezifische Proteine für unterschiedliche Polymerisationsschritte zuständig. Die Verlängerung der Aktinmonomere wird unter anderem durch Formin ermöglicht, die Aufspaltung längerer Filamente durch Cofilin und die Vernetzung (*cross linking*) mehrerer Aktinfilamente durch ABPs wie Fimbrin, α -Actinin oder Filamin (58). Intermediärfilamente sind ubiquitär vorkommende Proteine, die durch über 70 verschiedene Gene kodiert werden. Sie besitzen typischerweise einen Durchmesser von $10\ \text{nm}$ und können anhand ihrer Struktur in fünf verschiedene Typen unterteilt werden, von denen Typ 1 bis 4 zytoplasmatisch

vorkommende Intermediärfilamente darstellen und Typ-5-Filamente nukleär lokalisiert sind. (59). Die verschiedenen Intermediärfilament-Typen sind gewebsspezifisch und erfüllen je nach Gewebe verschiedene funktionelle Anforderungen. Während Typ 1 und 2 Keratine darstellen, die vor allem in epitheliale Gewebe vorkommen, besteht Typ 3 unter anderem aus Vimentin und Desmin. Typ 4 enthält vor allem Intermediärfilamente des Nerven- und Muskelgewebes und Typ 5 die Lamina des Nucleus (60). Im hyalinen Knorpelgewebe bilden Vimentinfilamente die wichtigsten Intermediärfilamente (40). Intermediärfilamente bestehen in der Regel aus α -helikalen, antiparallel angeordneten Doppelsträngen, die sich zu Tetrameren zusammenlagern (61). Sie sind sowohl untereinander, als auch mit den anderen Komponenten des Zytoskeletts und Zell-Matrix-Kontakten wie Desmosomen und Hemidesmosomen vernetzt. Hierbei regulieren verschiedene Begleitproteine wie Desmin, Filamin C und Plektin die Bindung zwischen anderen Intermediärfilamenten, dem Aktinnetz und dem Mikrotubulussystem. Mutationen dieser Proteine können zu einer Vielzahl von Haut- oder Muskelpathologien führen (62). Der Auf- und Abbau der Intermediärfilamente wird hauptsächlich durch Phosphorylierungskaskaden reguliert (63). Intermediärfilamente bilden ein passives, zelluläres Stützgerüst und können unter dem Einfluss von mechanischen Kräften eine Konformationsänderung untergehen, die die Integrität der Zellstruktur auch bei mechanischem Stress erhalten kann (64). Durch ihre Eigenschaften und Vernetzungen tragen Intermediärfilamente zu der mechanischen Festigkeit des Zytoskeletts und damit des Zellverbandes bei und spielen eine essentielle Rolle in der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (65). Die größten Bestandteile des Zytoskeletts bilden die Mikrotubuli, die einen Durchmesser von ca. 25 nm besitzen und eine Länge von bis zu über 100 μ m erreichen können (66). Sie fungieren zum einen als mechanische Stütze, zum anderen dienen sie mithilfe der Motorproteine Kinesin und Dynein als dynamische Transportwege für Moleküle und Zellorganellen. Aufgebaut sind sie aus α - und β -Tubulin, die sich zu Dimeren zusammenlagern. Mithilfe zahlreicher stabilisierender und destabilisierender Proteine wird die dynamische Polymerisierung und Depolymerisierung des Mikrotubulusnetzwerkes in Abhängigkeit intra- und extrazellulärer Stimuli reguliert (66). Weiterhin inserieren zahlreiche Transmembranproteine am Zytoskelett und verbinden so benachbarte Zellen eines Gewebes miteinander. Die relevantesten dieser Zellkontakte stellen Haft-, Verschluss- und Kommunikationskontakte dar. Bei einem Adhäsionskontakt zweier benachbarter Zellen fungieren Cadherine als Ca^{2+} -abhängige Transmembranproteine und binden über ihre extrazelluläre Domäne an ein entsprechendes Cadherin der Nachbarzelle (67). Zusätzlich fungieren Cadherine als Mediatoren bei einer Vielzahl von zellulären Vorgängen wie Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung (68). Bei adhäsiven Zell-Matrix-Kontakten wird eine Verbindung zwischen der EZM und dem Zytoskelett über Integrine hergestellt. Hierbei fungieren Integrine nicht nur als mechanische Verankerung, sondern auch als funktionelle

Verbindung zwischen der EZM und intrazellulären Signalwegen. Durch die Aktivierung und Inaktivierung von Integrinen wird diese Mediatorrolle reguliert und Aspekte wie Zellverankerung, -adhäsion und -ausrichtung beeinflusst (69). Abhängig von der Polymerart des Zytoskeletts, welche an den Haftkontakt gebunden ist, werden diese Adhärens-Kontakt oder Desmosom genannt. Während Adhärens-Kontakte an das subkortikal gelegene Aktinnetz gebunden sind, sind Desmosomen an intrazellulär gelegenen Intermediärfilamenten verankert. Bei Zell-Matrix-Kontakten sind die transmembranären Integrine bei Hemidesmosomen an Intermediärfilamente, bei Fokaladhäsionen an Aktinfilamente gebunden (40, 44). Durch die mechanische Verankerung der Zellen untereinander sowie der Zellen mit der umgebenden EZM können mechanische Kräfte, die auf das Gewebe wirken, auf alle Gewebszellen übertragen werden. Als Reaktion auf etwaige mechanische Einflüsse auf den Zellverband werden außerdem zusätzliche fokale Adhäsionen gebildet, die über Integrine das intrazelluläre Aktinnetz mit der EZM verbinden und die Weitergabe dieser mechanischen Informationen nach intrazellulär sowie an benachbarte Zellen verstärken (70). Durch ein den Zellkern umspannendes Aktinnetz, die sogenannte perinukleäre Aktinkappe (*actin cap*), wird die direkte Übertragung des mechanischen Signals auf den Zellkern ermöglicht und die Genexpression der Zelle beeinflusst (71). Der Zellkern ist zusätzlich über sogenannte LINC-Komplexe (*linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton*) mit dem Filamentgerüst der Zelle verbunden und wird so direkt von der Übertragung mechanischer Impulse auf die Zelle beeinflusst (72). Diese Übersetzung mechanischer Reize in biochemische Stoffwechselvorgänge nennt sich Mechanotransduktion und bildet die Grundlage für die Adaption eines Zellverbands an sich ändernde Bedingungen des extrazellulären Milieus und variabler Anforderungen an die Form und Stoffwechsellage von Zellen. Hierbei werden durch mechanische Reize intrazelluläre Signalketten initiiert („*Signaling*“), welche Einfluss auf Stoffwechselvorgänge, den Umbau des Zytoskeletts und die Genexpression der Zelle haben (70). Als Folge kann die Zelle auf extrazelluläre Vorgänge mit Formänderung, Zellmigration, Proliferation Differenzierung oder Apoptose reagieren (70). Weiterhin essentiell für eine optimale Zell-Matrix-Interaktion ist die spezifische Zusammensetzung der PZM, welche sich biochemisch und biomechanisch von dem Aufbau der EZM unterscheidet. Hierbei findet sich vor allem eine höhere Konzentration an Kollagen Typ VI, Perlecan, Aggrecan-Monomeren, und HA (73). Zahlreiche Studien suggerieren, dass die Integrität der PZM essentiell für die Chondrozytenfunktion ist und bereits initiale OA-Stadien eine Änderung der PZM-Zusammensetzung aufweisen können (74). Die Mechanotransduktion ist außerdem maßgeblich an der Aufrechterhaltung und Regulation der Gewebshomöostase beteiligt. Eine Fehlregulation ist oft mit einer Erkrankung verbunden (75). Aus diesen Gründen ist ein genaueres Verständnis der mechanosensitiven Vorgänge innerhalb des Knorpelgewebes von großem Interesse, um die Pathogenese der OA zu analysieren.

2.4 Calcium-abhängige Proteine im Gelenkknorpel

Wie bereits belegt, verändert sich der Metabolismus der im Knorpel enthaltenen Chondrozyten durch mechanische Belastung. Dies kann sowohl in einem verstärkten Katabolismus als auch Anabolismus resultieren (76). Ein wichtiger Faktor bei der Mechanotransduktion im Zellverbund der Chondrozyten ist unter anderem der intrazelluläre *second messenger* Calcium (Ca^{2+} , 77). Ca^{2+} fungiert hierbei als Schlüsselmolekül, welches diverse zelluläre Prozesse wie Stoffwechsel, Proliferation oder Mechanotransduktion innerhalb des Zellverbundes reguliert (78). Auch für die zelluläre Kommunikation zwischen Chondrozyten scheint Ca^{2+} eine wichtige Rolle zu spielen, die mittels spontaner Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration unabhängig von extrinsischen Stimuli aufrechterhalten wird (79).

Die Änderung intrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel (*Ca^{2+} -Signaling*) ist eine der frühesten und grundlegendsten Reaktionen von Chondrozyten auf mechanische Stimuli (80). Es konnte gezeigt werden, dass der Ca^{2+} -Influx über den mechanosensitiven TRPV4-Kanal (*transient receptor potential vanilloid 4-Kanal*) eine große Rolle bei der anabolen und katabolen Reaktion der Chondrozyten auf mechanische Belastung hat (81). Dieser TRPV4-Kanal ist vor allem in der Zellmembran von Chondrozyten im Gelenkknorpel exprimiert und regelt den Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum in die Chondrozyten. Neben dem TRPV4-Kanal existieren weitere transmembranäre Ca^{2+} -Kanäle, die durch mechanische Stimulation für einen Influx von Ca^{2+} -Ionen verantwortlich sind (*mechanosensitive channels*, MSCs) (82). Der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel kann jedoch nicht nur über Ionenkanäle in der Zellmembran reguliert werden, sondern auch über den zelleigenen Ca^{2+} -Speicher, das sogenannte endoplasmatische Retikulum (ER). Dieser Ca^{2+} -Strom wird in der Regel über einen *second-messenger*-Mechanismus gesteuert, welcher bei einem intrazellulären Ca^{2+} -Abfall ausgelöst wird. Hierbei bindet Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) an einen Rezeptor in der Membran des ER, den sogenannten IP_3 -Rezeptor. Dies führt zu einem Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER in den Intrazellulärraum (Abb. 5, 83). Studien haben gezeigt, dass sowohl der extrazelluläre Ca^{2+} -Influx als auch die Molekülverschiebungen aus dem zelleigenen Ca^{2+} -Speicher essentiell für die Ca^{2+} -basierte Kommunikation zwischen Chondrozyten und somit die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts des EZM-Metabolismus ist und ein Wegfall einer dieser Komponenten unmittelbar die Homöostase zwischen Auf- und Abbau der EZM beeinträchtigt (84, 85). Für ein fundiertes Verständnis der Pathogenese der OA ist es demnach interessant, Schlüsselkomponenten des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts in Chondrozyten zu determinieren und deren Rolle in von OA betroffenem Knorpelgewebe zu untersuchen.

2.4.1. Thrombospondine

Thrombospondine (TSP) sind extrazellulär gelegene, Ca^{2+} -bindende Glykoproteine, die mit Zelloberflächen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und EZM-Komponenten interagieren können und somit eine wichtige Rolle in der Wundheilung, Angiogenese, EZM-Organisation, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion spielen (86). In der Familie der TSP existieren die Unterformen TSP-1 bis TSP-5, wobei sie abhängig von ihrer Struktur in Untergruppen klassifiziert werden (Abb. 5);

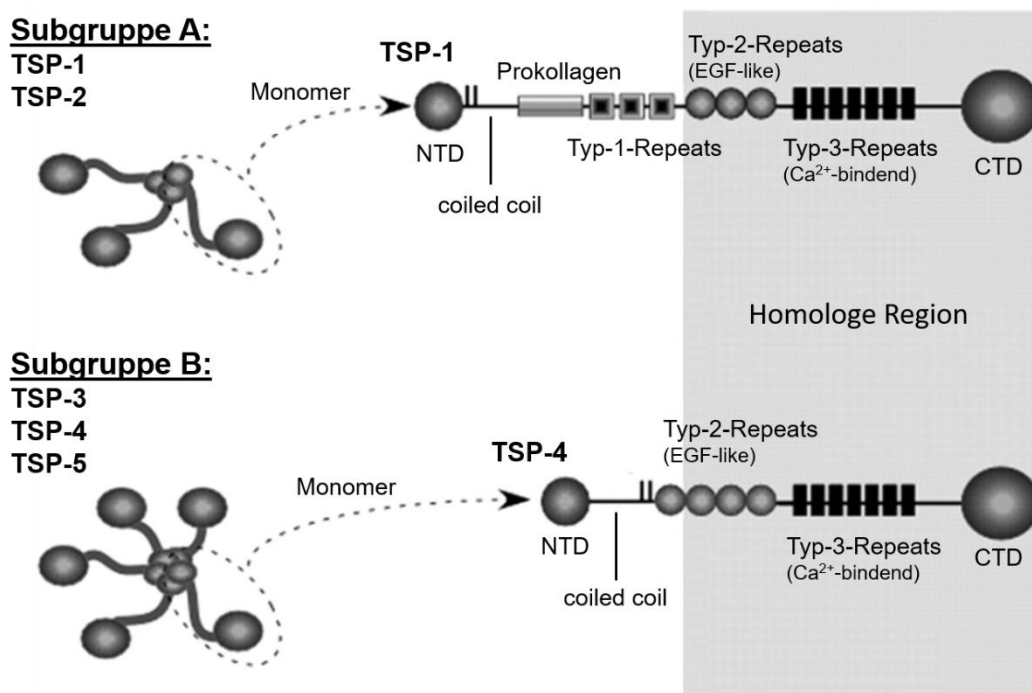


Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur der TSPs. Die Unterteilung in die Subgruppen A und B basiert auf der unterschiedlichen molekularen Struktur sowie der Oligomerisierung der einzelnen TSPs; während TSP-1 und TSP-2 in Homotrimeren vorliegen, formen TSP-3 TSP-4 und TSP-5 Homopentamere. Dem N-terminalen Ende (*N-terminal domain*, **NTD**) folgt in beiden Subgruppen eine coiled-coil-Oligomerisierungsdomäne. In Subgruppe A schließt sich ein Prokollagen, auch von-Willebrand-Faktor-ähnliche Domäne genannt, und 3 Typ-1-Wiederholungen (*Typ-1-Repeats*) an. Die homologe Region aller TSPs besteht schließlich aus Typ-2-Repeats (auch *EGF-like repeats* genannt), Ca^{2+} -bindenden Typ-3-Repeats und schließlich dem C-terminalen Ende (*C-terminal domain*, **CTD**) (87). Angepasst übernommen aus (87).

TSP-1 und TSP-2 werden demnach der Subfamilie A, TSP-3, TSP-4 und TSP-5 der Subfamilie B zugeordnet (87). Abhängig von der TSP-Unterform und dem Zelltyp des jeweiligen Gewebes haben sie spezifische Einflüsse auf den Zellmetabolismus, das Zytoskelett und die Zusammensetzung der EZM (88). Die verschiedenen TSPs haben einen essentiellen Einfluss

auf Zellen der Immunantwort sowie auf molekulare Vorgänge bei Inflammation, Angiogenese und dem Alterungsprozess von Zellen (89).

Wie im Folgenden erläutert, sind sowohl TSP-1 als auch TSP-5 in artikulären Chondrozyten exprimiert und über ihre spezifischen Eigenschaften mit der Pathogenese der OA assoziiert.

2.4.1.1 TSP-1

TSP-1 ist ein antiangiogen wirkendes Protein, das unter anderem von Chondrozyten exprimiert wird (90, 91, 92). Über den endothelialen Rezeptor CD36 wirkt es inhibierend auf die VEGF-induzierte Neubildung von Gefäßen (93). Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung des TSP-1-Spiegels im Knorpelgewebe durch gezielten Gen-Transfer sowohl eine vermehrte Angiogenese als auch inflammatorische Vorgänge inhibieren konnte (94). TSP-1 kann so im avaskulären Knorpelgewebe einen Schutz gegen pathologische Gefäßneubildungen bieten, welche eine essentielle Komponente bei den pathogenetischen Vorgängen der OA darstellen. Außerdem wirkt TSP-1 im Rahmen des Reparaturprozesses von geschädigtem Knorpelgewebe protektiv gegenüber einer hypertrophen Ossifikation des Knorpelgewebes und sichert somit eine effektive Regeneration des Knorpelgewebes (95). Durch die Bindung an verschiedene, membranständige Rezeptoren, zu denen auch die Integrine des Zytoskeletts gehören, ist TSP-1 außerdem maßgeblich an der Zell-Matrix-Interaktion beteiligt (96). In gesundem Knorpelgewebe wird TSP-1 vor allem in der tiefen oberflächlichen und mittleren Zone der artikulären Knorpelschicht exprimiert (90). Bei schwach und mäßig ausgeprägter OA in frühen OA-Stadien konnte eine vermehrte Expression von TSP-1 durch die Chondrozyten beobachtet werden, während in stark von OA betroffenem Knorpelgewebe ein Abfall der TSP-1-Konzentration detektiert werden konnte (90, 91).

2.4.1.2 TSP-5

TSP-5, auch COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) genannt, ist ein mechanosensitives Protein, welches in artikulärem Knorpel durch chondrozytäre Synthese stark exprimiert wird, wobei mechanische Stimuli zu einer gesteigerten Expression führen (97). Es stellt ein wichtiges Adapterprotein für die EZM des Knorpelgewebes und somit die Mechanotransduktion des Zellverbands dar (98). TSP-5 bindet im artikulären Knorpel zum einen an Kollagen I, II und IX und beeinflusst so die Anordnung und Stabilität der EZM, zum anderen bindet TSP-5 weitere EZM-Komponenten wie Aggrecan und verschiedene GAGs und trägt somit zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität bei (99). Viele Interaktionen von TSP-5 sind Ca^{2+} -abhängig und es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Ca^{2+} -Bindungsstelle die Bindung von Ca^{2+} -Ionen verringert und eine Konformations- und Funktionsänderung von TSP-5 nach sich zieht (99, 100, 101). Konsekutiv kann es zur

Ausprägung einer Pseudoachondroplasie (PSACH) oder einer epiphysialen Dysplasie (MED) kommen, welche sich unter anderem durch die frühzeitige Entwicklung einer OA auszeichnen (101, 102). TSP-5 ist das einzige Protein der TSP-Familie, welches mit der Pathogenese muskuloskelettaler Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde (99). Zahlreiche Studien zeigen, dass die TSP-5-Spiegel im Serum bei Vorliegen einer OA erhöht sind und proportional mit der Schwere der diagnostizierten OA sowie der Anzahl der betroffenen Gelenke korrelieren (103, 104, 105, 106). TSP-5 bietet daher vielversprechende Eigenschaften, um als Biomarker für die Diagnostik, den Verlauf und die Beurteilung von Therapieerfolgen bei OA genutzt zu werden (107). In gesundem Knorpelgewebe ist eine gleichmäßige Verteilung von TSP-5 in der intraterritorialen EZM mit einer verstärkten Expression in den tieferen Knorpelschichten zu detektieren, während in von OA betroffenem Knorpelgewebe, vor allem die oberflächlichen Knorpelschichten über eine vermehrte TSP-5-Expression verfügen und die tieferen Schichten wenig bis kein Vorkommen von TSP-5 aufzeigen (108). In mäßig degradiertem Knorpelgewebe zeigt sich zunächst ein quantitativer Abfall der TSP-5-Expression, während in stark von OA betroffenem Knorpelgewebe eine gesteigerte, perizellulär akzentuierte Reexpression von TSP-5 als mögliches Zeichen dafür gedeutet werden kann, dass TSP-5 so der weiteren Degradierung der EZM entgegenwirken soll (109).

2.4.2. STIM1

STIM1 (*stroma interaction molecule 1*) ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein der ER-Membran und reguliert über eine Interaktion mit dem in der Zellmembran gelegenen Ca^{2+} -Ionenkanal ORAI1 den Ca^{2+} -Spiegel im Intrazellulärraum (110). Bei einem Abfall des Ca^{2+} -Spiegels im ER, also dem Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, wird STIM1 vermehrt aktiviert, woraufhin es eine Konformationsänderung erfährt und ORAI1-Proteine bindet und aktiviert (Abb. 6, 111). Diese bilden eine funktionelle Einheit mit transmembranären CRACs (*Ca²⁺-release activated Ca²⁺-Channels*) und öffnen diese. Hierdurch kommt es im Rahmen des sogenannten *store operated-Ca²⁺ entry* (SOCE) zu einem vermehrten Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum in die Zelle und zu einer erneuten Saturierung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (112). STIM1 spielt demnach eine essentielle Rolle für den Ca^{2+} -Haushalt von Zellen und fungiert als Sensor, um einem Abfall des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers durch einen extrazellulären Influx entgegenzuwirken (113).

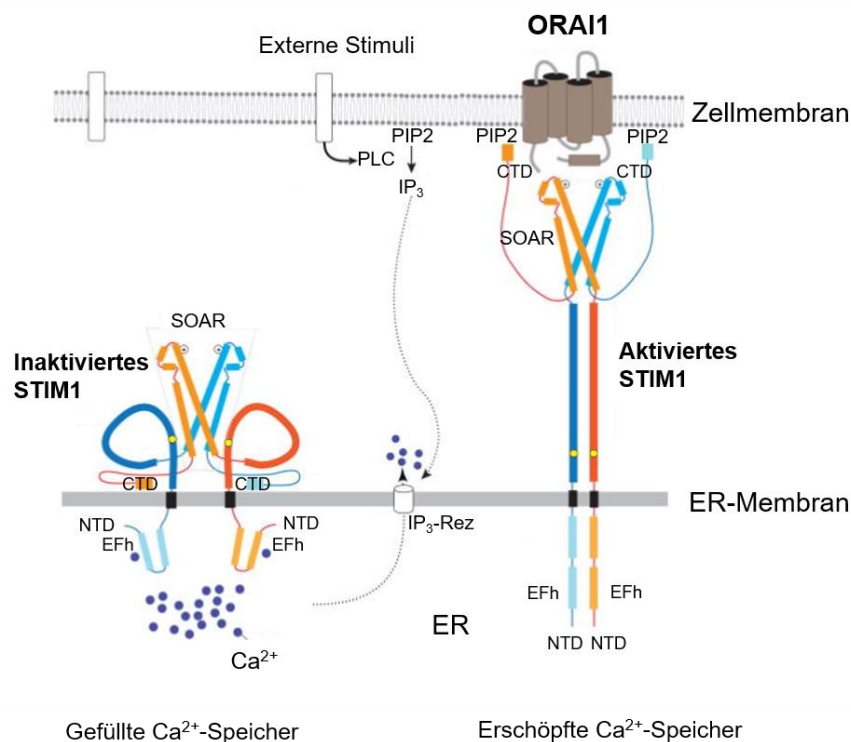


Abb. 6: Schematische Darstellung der strukturellen Dynamik bei STIM1-Aktivierung durch ein Absinken der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Bei gefüllten Ca^{2+} -Speichern ist STIM1 inaktiviert. Die N-terminalen Domänen (NTD) der STIM1-Moleküle liegen im Lumen des ER und fungieren als Sensor für die dortige Ca^{2+} -Konzentration. Die C-terminalen Domänen (CTD) erfüllen die entsprechende Funktion für den Ca^{2+} -Spiegel des Zytoplasmas. Sind die Ca^{2+} -Speicher im ER saturiert, bindet Ca^{2+} an eine EF-Hand (EFh) nahe der NTD und stabilisiert die inaktive Konformation des STIM-Moleküls. Bindet nun extrazellulär ein Ligand und aktiviert über Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) die Phospholipase C (PLC), setzt diese IP_3 frei und es kommt über den IP_3 -Rezeptor zu einem Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER ins Zytoplasma. Durch diese Depletion des intrazellulären Ca^{2+} -Speichers im ER untergeht STIM1 aufgrund der Dissoziation von Ca^{2+} von der EFh einer Konformationsänderung. Es kommt zu einer Dimerisierung mit einem benachbarten STIM1-Molekül und der Bindung von ORAI1 im Bereich der STIM1-ORAI1-aktivierenden Region (SOAR) (111). Angepasst übernommen aus (111).

STIM1 beeinflusst weiterhin das Gleichgewicht des Umsatzes von Knochengewebe, indem es einerseits die Differenzierung von Osteozyten zu Osteoblasten und damit den Aufbau von Knochensubstanz unterstützt und andererseits die resorptive, knochenabbauende Funktion von Osteoklasten reguliert (114). Auch für chondrogene Zellen konnte nachgewiesen werden, dass STIM1 und ORAI1 einen Einfluss auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und somit wichtige Ca^{2+} -abhängige Signalwege haben und durch eine Inhibierung des SOCE die Proliferation von Chondrozyten gestört wird (115, 116). Bei der Pathogenese der OA spielt STIM1 eine wichtige Rolle bei der Histamin-vermittelten Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms in Chondrozyten; im Rahmen des inflammatorischen Geschehens bei OA ist der Histamin-Spiegel durch

Mastzellsekretion erhöht. Hierdurch beeinflusst Histamin den durch STIM1 und ORAI1 kontrollierten SOCE und somit die konsekutive Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (115, 117, 118). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass STIM1 an mehrere, multifunktionale TSPs binden kann. Hierbei ist unter anderem TSP-5 in der Lage, STIM1 zu regulieren und die Aktivierung der CRACs und somit den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zu beeinflussen (119). Aufgrund der zentralen Rolle von STIM1 bei der Regulation des Ca^{2+} -Spiegels und somit der Aufrechterhaltung Ca^{2+} -abhängiger Signalwege, sowie der Interaktion von STIM1 mit dem Zytoskelett über TSPs, bietet eine weitere Untersuchung von STIM1 einen vielversprechenden Ansatz für ein detaillierteres Verständnis der Pathogenese der OA.

2.4.3. Plastin-3

Plastin-3 (PLS3) gehört zur Proteinfamilie der Plastine (auch Fimbrine genannt), welche über eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von F-Aktinfilamenten maßgeblich am Aufbau des Zytoskeletts und somit an der Mechanotransduktion, Zellmigration und Zelladhäsion beteiligt sind (120, 121). Es existieren drei Unterformen, die sich anhand ihres Vorkommens in unterschiedlichen Gewebsarten charakterisieren lassen. Während PLS1 (I-Plastin) vor allem im Gastrointestinaltrakt und im Nierengewebe exprimiert ist und PLS2 (L-Plastin) in hämatopoetischen Zellen und Krebszellen vorkommt, ist PLS3 (T-Plastin) ein ubiquitär vorkommendes Protein solider Gewebe (120). PLS verfügen über zwei Aktin-bindende Domänen (ABDs) an ihrem C-terminalen Ende sowie zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen (Ca^{2+} -BDs) an ihrem N-Terminus (Abb. 7, 122, 123).

Gebundenes Ca^{2+} inhibiert die Bindung eines Aktinfilaments an die zweite Aktin-bindende-Domäne und verhindert so die Bündelung zweier Aktinfilamente (121). Ca^{2+} -Ionen fungieren demnach als wichtiger Regulationsmechanismus der PLS-Funktion. Sowohl Mutationen der Aktin- als auch der Ca^{2+} -Bindungsstellen führen dementsprechend zu einer eingeschränkten Funktion von PLS3 (124) und einer konsekutiven Beeinträchtigung des Zytoskeletts. Zahlreiche Studien haben PLS3-Mutationen mit Knochenerkrankungen in Verbindung bringen können. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass PLS3-Mutationen, die bei Osteogenesis Imperfecta vorkommen, zu einer gestörten Ca^{2+} -Regulation der Aktinfilamentbündelung führen und so an der Fehlf ormation des Knochengewebes beteiligt sind (125). PLS3-Mutationen konnten außerdem als ursächlicher Faktor mit verschiedenen Formen von Osteoporose und pathologischen Frakturen in Verbindung gebracht werden, wobei die Ausprägung und der Schweregrad der Erkrankung abhängig von der Mutationsform ist (126, 127, 128). Weiterhin konnte PLS3 als Regulator der Osteoklastenaktivität und somit als wichtiger Faktor in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Knochenstoffwechsels

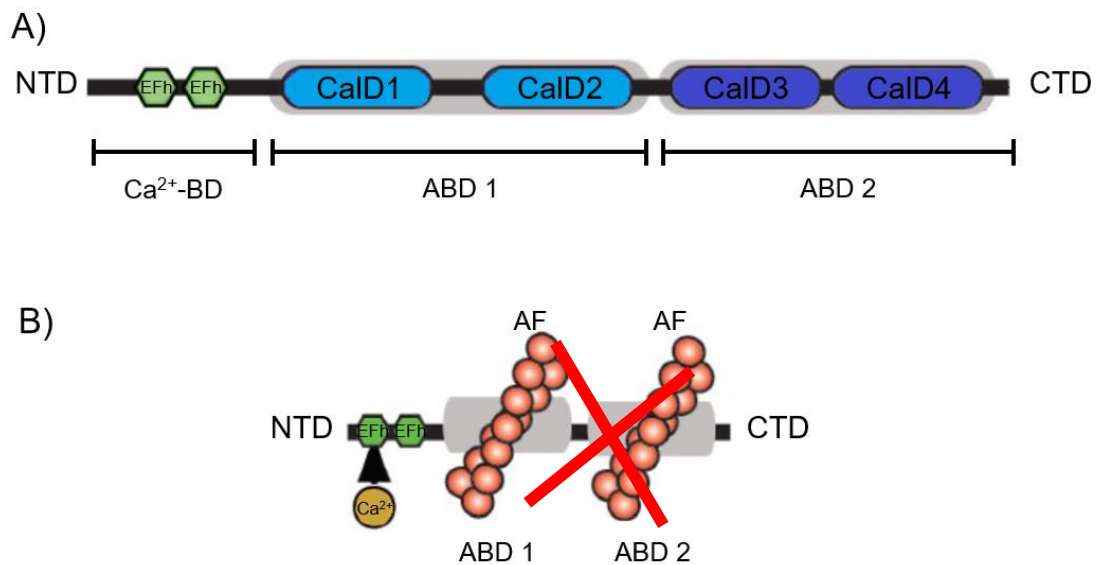


Abb. 7: A) Vereinfachte, schematische Darstellung der Struktur der Plastine. B) Schematische, Darstellung der Bindung von Ca²⁺ an die Ca²⁺-BD und jeweils eines Aktinfilaments (AF) an jede ABD. A) An die NTD der Plastine schließen sich zwei EFh an, welche als Ca²⁺-Bindungsstelle (Ca²⁺-BD) fungieren. Es folgen zwei ABDs, welche aus je zwei repetitiven Calponin-ähnlichen Domänen (CalD1-4) bestehen (123). B) Exemplarische Darstellung der Bindung von Ca²⁺ an eine EFh und zwei AFs an die ABDs. Die Bindung von Ca²⁺ inhibiert die Bindung eines AF an die zweite ABD, reguliert so die Aktinbündelung und nimmt Einfluss auf die Strukturierung des Zytoskeletts (121). Angepasst übernommen aus (123).

identifiziert werden (129). PLS3 ist aufgrund seiner Bindung an die motilen Aktinfilamente des Zytoskeletts außerdem in der Lage, lokale Lücken in der EZM durch Zellmigration und Membranprotrusion zu überbrücken und diese zu schließen (130), um so die Integrität der EZM zu sichern. Ob PLS3 maßgeblich an der Pathogenese der OA beteiligt ist, ist zurzeit nicht vollständig geklärt. Nachgewiesen wurde jedoch, dass PLS3 in Chondrozyten, die aus artikulärem Knorpelgewebe von Patienten mit primärer OA isoliert wurden, im Vergleich mit Chondrozyten von Patienten ohne nachgewiesene OA-assoziierte Veränderungen vermehrt exprimiert wird (131). Der Nachweis der Expression und Lokalisation von PLS3 in von OA betroffenem hyalinem Knorpelgewebe bietet also vielversprechende Ansätze, um mögliche Hinweise auf eine Beteiligung an der Pathogenese der OA zu erlangen.

2.5 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Der Pathogenese der OA liegt oftmals eine erhöhte oder repetitive mechanische Belastung des hyalinen Knorpels zugrunde (132). Aus diesem Grund erweist es sich als sinnvoll, bei einer genaueren Analyse der molekularen Prozesse der OA-Entstehung Proteine zu untersuchen, die an der Mechanotransduktion des hyalinen Gelenkknorpels beteiligt sind. Obwohl TSP-1 und TSP-5 aufgrund ihrer Rolle bei der Zell-Matrix-Interaktion (96,99) und der Mechanotransduktion (135, 136) im Zellverband vielversprechende Kandidaten darstellen, um die Pathogenese der OA weitergehend zu untersuchen, ist die Rolle dieser Proteine bei der Entstehung und Aggravation der OA in der Literatur nicht eindeutig geklärt. Im Rahmen mechanosensitiver Vorgänge fungiert Ca^{2+} als wichtiger *second messenger* (77) und reguliert relevante zellulärer Vorgänge wie Proliferation, den zellulären Stoffwechsel sowie die interzelluläre Interaktion zwischen Chondrozyten (78, 79). Studien haben gezeigt, dass Chondrozyten auf mechanische Signale zunächst mit einer Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels reagieren (76). Der zentrale Einfluss von STIM1 auf den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel (113) und die Störung der Proliferation von Chondrozyten bei einer Inhibierung des STIM1 abhängigen SOCE (115, 116) bietet daher ebenfalls einen interessanten Ansatzpunkt für eine weitere Untersuchung dieses Proteins im Rahmen der Pathogenese der OA. Auch die nähere Untersuchung des Ca^{2+} -abhängigen Proteins PLS3 erscheint sinnvoll, um ein detaillierteres Verständnis zellulärer Vorgänge im Rahmen der OA zu erlangen. Studien konnten zeigen, dass PLS3 in Osteoblasten (137), Osteoklasten (129) und Osteozyten (138) exprimiert ist und durch eine Mutation von PLS3 zahlreiche Erkrankungen des Knochengewebes begünstigt werden; so verursachen verschiedene PLS3-Mutationen unterschiedliche Osteoporose-Formen (126, 127). Außerdem gibt es Hinweise auf einen Einfluss von PLS3 auf die resorptiven Funktionen von Osteoklasten, auf die Mineralisierung von Knochengewebe (129) und die Mechanosensitivität von Osteozyten (126). Während die Rolle von PLS3 in humanem Knochengewebe zunehmend analysiert wurde, bestehen über die genaue Funktion, Expression und Lokalisation von PLS3 in humanem Knorpelgewebe vergleichsweise geringe wissenschaftliche Erkenntnisse. So ist für PLS3 bisher lediglich der Nachweis erbracht worden, dass es in isolierten Knorpelzellen aus von OA betroffenen Knorpelregionen vermehrt exprimiert wird (131), über die genaue Funktion und Verteilung von PLS3 in humanem Knorpelgewebe ist jedoch bisher wenig bekannt. Die Vermutung, dass bei einem Vorliegen von OA die Expression von PLS3 im gesamten Knorpelgewebe erhöht ist, liegt nahe und die genauere Untersuchung von PLS3 in humanem Knorpel stellt einen interessanten Ansatzpunkt dar, um eine Beteiligung dieses Proteins an der Pathogenese der OA zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es, zum einen den Nachweis zu erbringen, dass die Proteine TSP-1, TSP-5, STIM1 und PLS3 in von OA betroffenem Knorpel im direkten Vergleich mit niedrigeren OA-Stadien vermehrt exprimiert werden. Zum anderen soll die Korrelation des OA-Stadiums mit dem Ausmaß der Expression sowie die Lokalisation dieser Proteine bestimmt werden. Um unterschiedliche OA-Stadien direkt miteinander vergleichen zu können, wurden für dieses Projekt Tibiaplateaus genutzt, bei denen die Gelenkflächen durch eine varische Beinachse einer unregelmäßigen Druckverteilung und -übertragung ausgesetzt waren. Wie bereits beschrieben, führt eine varische Beinachse zu einer Verschiebung der mechanischen Belastung zu Lasten des medialen Kompartiments des Kniegelenks und konsekutiv zu einer erhöhten Belastung der medialen Knorpelflächen (13, 133, 134). Demnach findet sich bei einer Varusgonarthrose eine stärkere Knorpeldegeneration im medialen und niedrigere OA-Stadien im lateralen Kompartiment (12, 14). Diese fokalen Diskrepanzen der Knorpeldegeneration bilden die Grundlage dafür, dass im Rahmen dieser Arbeit die Expression in unterschiedlich fortgeschrittenen OA-Stadien verglichen und im bestmöglichen Fall ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression und Verteilung der Proteine in weniger und stärker degeneriertem Knorpelgewebe detektiert werden. Die Annahme ist hierbei, dass die medialen Knorpelareale, die einer höheren mechanischen Belastung ausgesetzt waren, eine vermehrte Expression von TSP-1, TSP-5-, STIM1 und PLS3 aufweisen, als die weniger belasteten, lateral gelegenen Knorpelflächen.

Zusammenfassend ergibt sich die Hypothese, dass die Expression und Verteilung von STIM1, PLS3, TSP1- und TSP-5 eine Rolle in der Pathogenese der OA spielt und sich im direkten Vergleich von geringeren und höheren OA-Stadien voneinander unterscheidet. Mittels histologischer und immunhistochemischer Analyse der verschiedenen Bereiche im Tibiaplateau sollen deshalb folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wie ist die Lokalisation von STIM1 in humanem, von OA betroffenen artikulären Knorpel?
- 2) Wie ist die Lokalisation von PLS3 in humanem, von OA betroffenen artikulären Knorpel?
- 3) Wie verhalten sich Expressions- und Verteilungsmuster von STIM1, PLS3, TSP-1 und TSP-5 in Abhängigkeit der mechanischen Belastung in bereits stark von OA betroffenen und morphologisch weniger stark betroffenen Bereichen einer Probe?
- 4) Gibt es eine Kollokalisierung zwischen STIM1, PLS3 und TSP-1 bzw. TSP-5 in humanem Knorpel?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Biozym, Fluka, Serva, Sigma-Aldrich, Roche oder VWR bezogen. Alle verwendeten Pufferlösungen wurden unter der Verwendung von vollentsalztem oder hochreinem, deionisiertem Wasser (Milli Q PF Plus System Millipore; MPure Q² membra Pure) hergestellt. Die pH-Werte beziehen sich auf die bei Raumtemperatur eingestellten Werte.

3.1.1. Allgemeine Pufferlösungen

Tab. 1: Liste der verwendeten Pufferlösungen.

Lösung	Zusammensetzung
PBS (<i>phosphate-buffered saline</i> , pH 7,4)	140 mM NaCl 10 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
TBS (<i>tris-buffered saline</i>)	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
TBST (<i>tris-buffered saline with Tween20</i>)	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,05% Tween-20

3.1.2. Verwendete Antikörper

Alle verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper sind in den Tabellen 2 und 3 aufgelistet.

Tab. 2: Liste der verwendeten Primärantikörper. Angegeben sind die entsprechenden Verdünnungen für die Immunhistochemiefärbung (IHC) und Immunfluoreszenzfärbung (IF).

Antigen	Spezies	Hersteller/Referenz	Verdünnung	Gekoppelt an
TSP-1	Maus	MerckMillipore (BA24)	1:200 (IHC)	ungekoppelt
TSP-5	Kaninchen	(98)	1:1000 (IHC)	ungekoppelt
STIM1	Kaninchen	Proteintech (11565-1-AP)	1:200 (IF)	ungekoppelt
PLS3	Kaninchen	(139)	1:250 (IF)	ungekoppelt

Tab 3: Liste der verwendeten Sekundärantikörper. Angegeben sind die entsprechenden Verdünnungen für die Immunhistochemiefärbung (IHC) und die Immunfluoreszenzfärbung (IF).

Antigen	Spezies	Hersteller/Referenz	Verdünnung	Gekoppelt an
Maus IgG (Immunglobulin G)		Zytomed Plus HRP polymer anti-mouse (ZUC050-006)	Gebrauchsfertig (IHC)	HRP (<i>horse radish peroxidase</i>)
Kaninchen igG		Zytomed Plus HRP polymer anti-rabbit (ZUC032-006)	Gebrauchsfertig (IHC)	HRP
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Thermo Fisher (Scientific Cat# A- 11034)	1:1000 (IF)	AlexaFluor488

3.2 Methoden

3.2.1. Gewebeproben

Für diese Arbeit wurden 15 humane Tibiaplateaus verwendet. Es handelt sich um routinemäßig anfallende Resektate von Patienten, die aufgrund einer fortgeschrittenen primären Varusgonarthrose des Kniegelenks eine operative Versorgung mittels einer Totalendoprothese in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Uniklinik Köln erhielten. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln genehmigt (Aktenzeichen 14-422, „Identification of biochemical and biomechanical markers of cartilage degeneration in the knee joint“, IBBM-CKJ) und eine schriftliche Einwilligung von den Patienten eingeholt. Es wurden ausschließlich vollständige Tibiaplateaus bestehend aus medialem und lateralem Kompartiment ohne sichtbare Artefakte von der Operation verwendet. Die Varisierung der Beinachse führt zu einer Verschiebung der Druckverteilung im Kniegelenk nach medial (13). Die damit verbundene Umverteilung der mechanischen Belastung zu Lasten des medialen Kompartiments des Kniegelenks, führt zu einer konsekutiven Mehrbelastung der medialen Gelenkfläche und dort somit zu höheren OA-Stadien als bei der weniger belasteten lateralen Gelenkfläche (133). Die in dieser Arbeit verwendeten Gelenkflächen enthalten somit verschiedene Ausprägungen der Knorpeldegradierung, sodass der direkte Vergleich verschiedener OA-Stadien ermöglicht wird und die Verteilung der Proteine TSP-1, TSP-5, STIM1 und PLS3 in verschiedenen Stadien der Knorpeldegradierung beurteilt werden können.

Die Tibiaplateaus wurden für 48 h in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend entkalkifiziert. Für die Entkalkifizierung wurden die einzelnen Plateaus über 8 Wochen bei 37° in 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA) inkubiert. Das EDTA wurde wöchentlich gewechselt. Im Anschluss an diese achtwöchige Entkalkifizierung wurden die einzelnen Tibiaplateaus zweimalig für 10 min in PBS-Puffer (*phosphate-buffered saline*) gewaschen. Pro Tibiaplateau wurden mittels eines Knochenentnahmesets (Arthrex® AR-1981-10H) jeweils vier mediale und vier laterale zylindrische Proben mit einem Durchmesser von ca. 1 cm entnommen. Die Anordnung der Entnahmestellen erfolgte sowohl medial als auch lateral einmal anterior (B, F) und posterior (C, G) sowie zum Mittelpunkt der Gelenkfläche hin (A, E) und zur Gelenkaußenkante hin (D, H) und ist im Folgenden exemplarisch aufgeführt (Abb. 8). Für diese Arbeit wurden lediglich die Gewebeproben aus den Entnahmestellen A, B und C sowie E, F und G von insgesamt 15 verschiedenen Tibiaplateaus verwendet. Insgesamt ergab dies eine Summe von 90 Gewebeproben. Somit konnten unterschiedliche Stadien der Osteoarthrose in verschiedenen Regionen der Tibiaplateaus untersucht werden und mediale und laterale sowie anteriore und posteriore Regionen der Gelenkoberfläche verglichen werden.

Nach der Entnahme der einzelnen Gewebeprobe aus den Tibiaplateaus wurden diese per Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Xylol geklärt. Hierfür wurden die Gewebeprobe mithilfe eines Einbettautomaten (Citadel 2000, Thermo Fisher Scientific) nacheinander für jeweils 2 h in 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol und dreimal für 1,5 h in 100% Ethanol inkubiert und anschließend jeweils für dreimal 45 min in Xylol gegeben (Tab. 4). Zuletzt wurden die Gewebeprobe zunächst in Paraffin Typ 3 und Typ 6 inkubiert und zuletzt außerhalb des Einbettautomaten in Paraffin Typ 9 eingebettet.

Tab. 4: Dehydrierung der Gewebeprobe in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Klärung mittels Xylols.

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	70 % Ethanol	2 h
2	80 % Ethanol	2 h
3	90 % Ethanol	2 h
4	96 % Ethanol	2 h
5	100 % Ethanol	3 x 1,5 h
6	Xylol	3 x 45 min
7	Infiltration mit Paraffin Typ 3	4 h bei 60 °C
8	Infiltration mit Paraffin Typ 6	6 h bei 60 °C

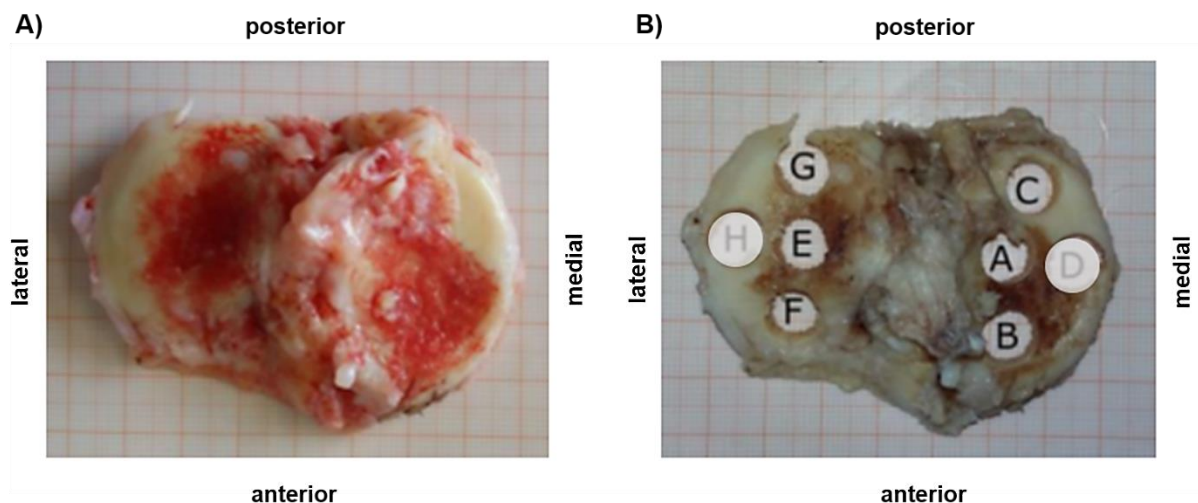


Abb. 8: Resezierte Tibiaplateaus. A) Postoperativ vor Dekalzifizierung. B) Nach achtwöchiger Dekalzifizierung in EDTA. Bereits erfolgte Entnahme von acht zylindrischen Gewebeprobe aus unterschiedlichen medialen und lateralen Regionen der Gelenkoberfläche. Die Regionen D und H wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt (Abbildung erstellt durch Frau Dr. Juliane Heilig).

3.2.2. Herstellung von Gewebeschnitten

Mithilfe eines Mikrotoms (Microm HM 355 S, Microm International) wurden aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Die fertigen Gewebeschnitte wurden in einem Wasserbad mit 45 °C warmem Wasser aufgefangen. Dies dient der Streckung der Schnitte, bevor sie anschließend auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific) übertragen wurden. Hierbei wurden auf jeden Objektträger zwei Schnitte derselben Gewebeprobe platziert. Insgesamt wurden so von jeder Gewebeprobe aus den verschiedenen Bereichen der Tibiaplateaus jeweils 30 Schnitte auf 15 Objektträgern angefertigt. Somit ergab dies eine Summe von 2700 Gewebeschnitten. Diese wurden nachfolgend auf einer Wärmeplatte bei 37 °C über Nacht getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.3. Histologische Färbungen

3.2.3.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

Um die Gewebeschnitte zugänglich für die entsprechenden Färbungen zu machen, mussten diese zunächst mittels Xylol sowie einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und rehydriert werden. Die einzelnen Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung können Tabelle 5 entnommen werden.

Tab. 5: Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung der fixierten Gewebeschnitte

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Xylol	2 x 5 min
2	Isopropanol	2 x 5 min
3	Ethanol 96 %	5 min
4	Ethanol 90 %	5 min
5	Ethanol 70 %	5 min
6	Aqua dest.	5 min

3.2.3.2 Safranin-O/Fast-Green-Färbung

Um die Degeneration der Knorpelproben histologisch mithilfe des OARSI-Scores (141) bewerten zu können, wurde eine Übersichtsfärbung der Gewebeschnitten mittels Safranin-O und Fast Green angefertigt. Der kationische Farbstoff Safranin-O färbt hierbei die anionischen Moleküle des hyalinen Gelenkknorpels, welche vor allem durch die Proteoglykane und

Glykosaminoglykane verkörpert werden. Die zusätzliche Gegenfärbung mit Fast-Green ermöglicht eine erhöhte Kontrastierung und somit verbesserte Darstellung der Gewebearchitektur. Durch die Färbung der Gewebeschnitte mittels dieser beiden Farbstoffe erhalten die anionischen Moleküle eine rötliche, der Hintergrund eine grünliche Farbe. Verwendet wurde hierfür eine Hämatoxylin-Lösung (Hämalaun nach Mayer), 1,0% Safranin-O sowie 0,02 % Fast Green (Tab. 6). Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 min in der Hämatoxylin-Lösung inkubiert, anschließend durch viermaliges Waschen in destilliertem Wasser gereinigt, für 2 sec in 1,0 % Acid-Alkohol gegeben und wiederum dreimalig gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 1 min in 0,02 % Fast Green Färbelösung gegeben, für 30 sec in 1,0 % Essigsäure und für 30 min in 1,0 % Safranin O inkubiert. Nach einem kurzen Waschvorgang und anschließender Inkubation für dreimal 1 min in 95 %igem Ethanol, wurden die Schnitte für zweimal 1 min in 100 %igem Ethanol und schließlich für zweimal 3 min in Xylol inkubiert (Tab. 7). Im Anschluss an die Dehydrierung mittels Ethanols (Schritte 8,9 und 10) und der Klärung mittels Xylols (Schritt 10) wurden die nun angefärbten Gewebeschnitte mit dem Eindeckmedium DPX (Dibutylphthalate polystyrene xylene, *DPX Mounting Medium*, Sigma 06522) und einem Deckglas abgedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

Tab. 6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen bei der histologischen Färbung mittels Safranin-O/Fast-Green.

Verwendete Lösung	Zusammensetzung	Menge
Hämatoxylin-Lösung (Hämalaun nach Mayer)	Hämatoxylin (Merck 1.04302.0025) Natriumjodat (Merck 1.06525.0100) Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Fluka 60060) H ₂ O Chloralhydrat (Merck 1.02425.0500) Citronensäure-Monohydrat (Merck 1.00242.1000)	1 g 0,2 g 50 g 1 L 50 g 1 g
1,0 % Acid-Alcohol	Ethanol 70 % Salzsäure (36,5-38 %)	500,0 ml 5,0 ml
0,02 % Fast Green	Fast Green (CAS# 2353-45-9) Aqua dest.	0.05 g 250 ml
1,0 % Essigsäure	Ethanol 70% Essigsäure (<i>acetic acid, glacial</i>)	100,0 ml 1,0 ml
1,0 % Safranin-O	Safranin-O (CAS# 477-23-6) Aqua dest.	2,5 g 250,0 ml

Tab. 7: Schritte der histologischen Färbung mittels Safranin-O/Fast-Green

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Hämatoxylin-Lösung (Hämalaun nach Mayer)	5 min
2	Aqua dest.	Kurzes Waschen (4x)
3	1,0 % Acid-Alcohol	2 sec
4	Aqua dest.	Kurzes Waschen (3x)
5	0,02 % Fast Green	1 min
6	1,0 % Essigsäure	30 sec
7	1,0 % Safranin O	30 min
8	Ethanol 95 %	Kurzes Waschen
9	Ethanol 95 %	3 x 1 min
10	Ethanol 100 %	2 x 1 min
11	Xylol	2 x 3 min

3.2.4. Immunhistochemische Färbungen

3.2.4.1 TSP-1 und TSP-5

Mithilfe von Antikörpern sollten TSP-1 und TSP-5 in den vorhandenen Gewebeschnitten nachgewiesen und lokalisiert werden. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst analog zu der unter 3.2.3.1. beschriebenen Methode entparaffiniert und rehydriert. Mittels eines enzymatischen Verfahrens wurden Hyaluronsäure und Proteine, die durch die Fixierung maskiert wurden, unter Verwendung eines Hyaluronidase- und eines Proteinase-K-Puffers (Tab. 8) demaskiert. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst für 5 min in TBS gewaschen und anschließend bei 37 °C für 15 min in 0,025 % Pepsin in 0,2 N HCl inkubiert. Dann wurden sie für 5 min in einen Hyaluronidase-Puffer gegeben. Danach wurden die Gewebeschnitte bei 37 °C für 30 min in eine Hyaluronidaselösung gegeben, für 5 min in TBS gewaschen und anschließend bei 55 °C für 10 min in einer Proteinase-K-Lösung inkubiert. Es folgte ein weiterer fünfminütiger Waschvorgang in TBS. Nach der Demaskierung erfolgte zunächst die Inaktivierung der endogenen Peroxidase, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Dazu wurden die Schnitte für 10 min in 3 % H₂O₂ inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschvorgänge mit TBS für jeweils 5 min. Um weitere unspezifische Bindungen der Primär- und Sekundärantikörper zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte im Anschluss für 5 min mit einer Blockierungslösung (Blocking Solution ZYTOMED System ZUC 007-100, 100ml) inkubiert und wieder zweimalig mit TBS für je 5 min gewaschen (Tab. 9).

Tab. 8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer bei der enzymatischen Demaskierung

Verwendeter Enzympuffer	Zusammensetzung	Menge
Hyaluronidase Puffer	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	Natriumacetat (pH 5,0)	100 mM
Proteinase-K-Puffer	TrisHCl (pH 7,4)	50 mM
	EDTA	1 mM

Tab. 9: Schritte der enzymatischen Antigendemaskierung und Inaktivierung der endogenen Peroxidase

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Waschen in TBS	5 min
2	Pepsin (0,025 % in 0,2 N HCl)	15 min (bei 37 °C)
3	Hyaluronidase-Puffer (pH 5,0)	5 min
4	Hyaluronidase (500 U/ml, Sigma-Aldrich) → Hyaluronidaselösung (50000 U/ml) im Verhältnis 1:100 in Hyaluronidasepuffer gelöst	30 min (bei 37 °C)
5	Waschen in TBS	5 min
6	Proteinase K (10 µg/ml, Qiagen) → Proteinase-K-Lösung (10 mg/ml) im Verhältnis 1:1000 in Proteinase-K-Puffer gelöst	10 min (bei 55 °C)
7	Waschen in TBS	5 min
8	3 % H ₂ O ₂	10 min
9	TBS	2 x 5 min
10	Blocking Solution ZYTOMED System ZUC 007- 100, 100ml)	5 min
11	TBS	2 x 5 min

Ferner erfolgte die Zugabe der Antigen-spezifischen Primärantikörper (siehe Tab. 2) Diese wurden in einer 1 % Bovinserumalbumin-Lösung (BSA) in TBS verdünnt, wobei für den TSP-1-Antikörper eine Verdünnung von 1:200 und für den TSP-5-Antikörper eine Verdünnung von 1:1000 gewählt wurde. Die Primärantikörper wurden über Nacht bei 4 °C auf den Gewebeschnitten belassen.

Es folgt das zweimalige Waschen mit 0,05 % TBS-T für jeweils 5 min und das einmalige

Waschen mit TBS für 5 min. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 1 h bei Raumtemperatur mit den vom Hersteller gebrauchsfertig hergestellten Sekundärantikörpern inkubiert (siehe Tab. 3). Um eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper auszuschließen, erfolgte zusätzlich jeweils eine Negativkontrolle ohne Zugabe des Primärantikörpers.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal für 5 min in 0,05 % TBS-T und einmal für 5 min mit TBS gewaschen. Um den pH-Wert der Schnitte dem Färbungsoptimum anzugleichen, folgte die Inkubation mit einer 0,01 M PBS-Lösung mit einem pH-Wert von 7,2 für 2 min. Die Zusammensetzung dieser Lösung kann Tabelle 10 entnommen werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass ein pH-Wert unter 7 zu einer schwächeren Färbung führt, während ein pH-Wert über 7,6 zu vermehrter, unspezifischer Hintergrundfärbung führt.

Die Färbung der an die Antigene gebundenen Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörpern konnten nun mittels Umsatzes eines HRP-Substrats durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP bewirkt werden. In diesem Fall wurde eine 1 % 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB) genutzt. Dieses DAB wird durch die Meerrettichperoxidase der Sekundärantikörper oxidiert und bildet so ein unlösliches Präzipitat eines braunen Farbstoffs. Die Zusammensetzung der dafür genutzten Färbelösung und ihrer Bestandteile können Tabelle 10 entnommen werden. Nach mehrmaliger Probefärbung und Kontrolle unter dem Lichtmikroskop, wurde schließlich eine Färbezeit von 7 min festgelegt. Im Anschluss wurde der Färbeprozess durch das Waschen in H₂O unterbrochen. Als Gegenfärbung zur Erhöhung des Kontrastes und somit der vereinfachten Detektion von angefärbten Bereichen

Tab. 10: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die immunhistochemische Färbung von TSP-1 und TSP-5

Lösung	Zusammensetzung	Menge
Färbelösung	0,01 M PBS (pH 7,2) 3 % H ₂ O ₂ 1 % DAB	99,935 % 0,05 % 0,015 %
0,01 M PBS (pH 7,2)	NaH ₂ PO ₄ NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O NaCl H ₂ O	0,3 g 0,062 g 2,125 g 250 ml
1% DAB	Diaminobenzidin (Fluka 32750) Aqua dest. 37 % HCl	0,1 g 10 ml 5 Tropfen

wurde die Hämatoxylin-Lösung nach Mayer genutzt (Tab. 3.2.3), welcher die Gewebeschnitte für 10 bis 15 sec ausgesetzt wurden. Nachdem die Gewebeschnitte mittels der DAB-Lösung gefärbt und mittels Hämatoxylins gegengefärbt wurden, wurden sie 15 min unter laufendem Leitungswasser gewaschen. Die Schritte der immunhistochemischen Färbung können Tabelle 11 entnommen werden. Anschließend erfolgte die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe und Xylol (Tab. 12), sowie die Abdeckung der gefärbten Schnitte mit dem Eindeckmedium DPX und einem Deckglas.

Tab. 11: Schritte der immunhistochemischen Färbung von TSP-1 und TSP-5

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Primärantikörper (Tab. 2.1.2), verdünnt in 1 % BSA/TBS (TSP-1: 1:200; TSP-5: 1:1000)	Über Nacht (bei 4 °C)
2	0,05 % TBS-T	2 x 5 min
3	TBS	5 min
4	Sekundärantikörper (Tab. 2.1.3)	60 min (Raumtemperatur)
5	0,05 % TBS-T	2 x 5 min
6	TBS	5 min
7	0,01 M PBS-Lösung (pH 7,2)	2 min
8	1 % DAB	7 min
9	H ₂ O	Kurzes Waschen
10	Hämatoxylin nach Mayer	10-15 sec
11	Laufendes Leitungswasser	15 min

Tab. 12: Schritte der Dehydrierung der mittels Immunhistochemie gefärbten Gewebeschnitte

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Ethanol 70%	2 min
2	Ethanol 90%	2 min
3	Ethanol 96%	2 min
4	Isopropanol	2 x 2 min
5	Xylol	2 x 2 min

3.2.4.2 STIM1 und PLS3

Für die Immunfluoreszenzfärbung der Proteine STIM1 und PLS3 wurden die Schnitte zunächst wie unter 3.2.3.1. aufgeführt entparaffiniert und dehydriert. Um die durch die Fixierung maskierten Antigene der Gewebeproben wieder zugänglich für Antikörper zu machen, folgte eine Hitze-induzierte Form der Demaskierung. Die Zusammensetzungen der hierfür verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 13 aufgezeigt. Die Schnitte wurden zunächst mit einem Natriumcitratpuffer (pH-Wert 6,0) für 60 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden sie unter laufendem Leitungswasser für 10 min gewaschen und zweimal 5 min in 0,025 % Triton-X-100 in TBS gegeben. Es folgte die Inkubation mit TBS für 5 min (Tab. 14).

Tab. 13: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen im Rahmen der Hitze-induzierten Antigendemaskierung

Verwendete Pufferlösung	Zusammensetzung	Menge
10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0)	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Aqua dest. Tween 20 → Mittels der Zugabe von HCl wurde ein pH-Wert von 6,0 eingestellt	2,94 g 1 L 0,5 ml
0,025 % Triton X-100 in TBS	Triton X-100 TBS	0,25 ml 1000 ml

Tab. 14: Schritte der Hitze-induzierten Antigendemaskierung

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Natriumcitratpuffer (pH 6,0)	60 min (bei 60° C)
2	Laufendes Leitungswasser	10 min
3	0,025% Triton X-100 in TBS	2 x 5 min
4	Waschen in TBS	5 min

Es folgten zwei weitere Waschvorgänge mit TBS für jeweils 5 min an. Wie bereits bei den Färbungen von TSP-1 und TSP-5 wurde auch hier anschließend eine Blockierungslösung (Blocking Solution ZYTOMED System ZUC 007-100, 100ml) für 5 min auf die Schnitte gegeben, um unspezifische Bindungen der Primär- und Sekundärantikörper zu reduzieren. Es folgte erneutes Waschen mit TBS für zweimal 5 min (Tab. 9, Schritte 9 bis 11).

Nachfolgend wurden die jeweiligen Primärantikörper für STIM1 und PLS3 in 1 % BSA/TBS-Lösung verdünnt. Für den STIM1-Primärantikörper wurde hierbei ein Verdünnungsverhältnis von 1:200, für den PLS3-Primärantikörper ein Verhältnis von 1:250 gewählt (Tab. 3.1.2). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte der Waschvorgang mit 0,05 % TBST für zweimal 5 min und mit TBS für weitere 5 min. Der an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelte Sekundärantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in 1 % BSA/TBS-Lösung verdünnt (siehe Tabelle 3.1.3). Mit diesem erfolgte anschließend die Inkubation der Gewebeschnitte für 1 h bei Raumtemperatur. Ab dem Zeitpunkt der Beigabe des Sekundärantikörpers wurden die Gewebeschnitte stets lichtgeschützt bearbeitet und gelagert. Es folgte eine Inkubation der Schnitte mit 0,05 % TBST für zweimal 5 min und mit TBS für 5 min. Um nun die Zellkerne spezifisch anzufärben, wurde im nächsten Schritt *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) mit einer Ausgangskonzentration von 40 µg/ml genutzt. DAPI lagert sich spezifisch an A-T-reiche Sequenzen der DNA an und färbt auf diese Weise spezifisch Chromosomen an (140). Dieses wurde in einem Verhältnis von 1:100 in TBS verdünnt und für 4 min auf die Gewebeschnitte gegeben. Anschließend folgte ein letzter Waschvorgang der Schnitte in TBS für 5 min. Um etwaige Farbstoff- oder TBS-Rückstände anschließend zu entfernen, wurden die Objektträger kurz mit Leitungswasser gewaschen. Es folgte die Eindeckung der Gewebeschnitte mittels eines Eindeckmediums (*Fluorescence Mounting Medium, Dako Omnis, Code GM304*) und eines Deckglases. Anschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte lichtgeschützt und bei 4 °C gelagert. Die Schritte der Fluoreszenzfärbung können Tabelle 15 entnommen werden.

Tab. 15: Schritte der Immunfluoreszenzfärbung von STIM1 und PLS3

Schritt	Verwendete Substanz	Dauer
1	Primärantikörper (Tab. 2.1.2), verdünnt in 1 % BSA/TBS (STIM1: 1:200; PLS3: 1:250)	Über Nacht (bei 4 °C)
2	0,05 % TBS-T	2 x 5 min
3	TBS	5 min
4	Sekundärantikörper (Tab. 2.1.3)	60 min (Raumtemperatur)
5	0,05 % TBS-T	2 x 5 min
6	TBS	5 min
7	DAPI (1:100 in TBS)	4 min
8	TBS	5 min
9	Leitungswasser	Kurzes Waschen

3.2.5. Analyse der gefärbten Gewebeschnitte

Alle Gewebeschnitte, die mittels Safranin-O/FastGreen-Färbung oder immunhistochemischer Färbung gefärbt wurden, wurden anschließend anhand eines Mikroskops (Axiphot2, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) und eines Computerprogramms (*NIS Element*, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) digitalisiert. Hierbei wurden von den mittels Safranin-O/Fast-Green angefärbten Schnitten, sowie von den Schnitten, bei denen mittels immunhistochemischer Färbung die Proteine TSP-1 und TSP-5 visualisiert wurden, Übersichtsaufnahmen mit einer 2,5fachen Vergrößerung erstellt. Es wurden von den 15 Tibiaplateaus für jede der 6 Regionen A bis G jeweils eine Aufnahme des lateralen und medialen Schnittrandes sowie des mittig gelegenen Knorpels angefertigt, sodass jeweils das gesamte Knorpelgewebe inklusive des subchondralen Knochens abgebildet wurde. So wurden insgesamt pro Färbung jeweils 270 Aufnahmen erstellt. Für die Gewebeschnitte, bei denen mittels fluoreszierender Farbstoffe die Lokalisationen von STIM1 und PLS3 gekennzeichnet wurden, wurden Aufnahmen in einer 20fachen Vergrößerung aus der tiefen, der mittleren und der oberflächlichen Knorpelschicht angefertigt. Hierbei wurde von allen 15 Tibiaplateaus die Regionen A bis G aufgenommen und jeweils ein mittig gelegener Abschnitt des Knorpelschnittes gewählt. Die Aufnahmen der tiefen Knorpelschicht beinhalten stets die Tide Mark und das subchondrale gelegene Knochengewebe. Es wurden jeweils eine Aufnahme der mittels DAPI-Färbung blau fluoreszierenden Zellkerne der Chondrozyten hergestellt und eine weitere Aufnahme des gleichen Knorpelabschnitts angefertigt, um die mittels AlexaFluor488 grün fluoreszierenden Proteine STIM1 und PLS3 sichtbar zu machen. Anschließend wurde die Software *ImageJ* (Version 1.53, Wayne Rasband) genutzt, um die verschiedenen Fluoreszenzfärbungen übereinander zu legen und so einen Rückschluss auf die intra- oder extrazelluläre Lokalisation der Proteine herzustellen. Die jeweiligen Einstellungen des Mikroskops sowie der Software für die verschiedenen Färbungen können Tabelle 16 entnommen werden.

Tab. 16: Einstellung des Mikroskops und der Software *NIS Elements* im Rahmen der Digitalisierung der gefärbten Gewebeschnitte

Färbung	Zoom	Belichtungszeit(ms)	Helligkeit	Kontrast	Filter
Safranin-O/Fast-Green	2,5x	11	1,20 - 1,70	<i>enhanced</i>	blau
DAB (TSP-1&TSP-5)	2,5x	11 - 17	1,2	<i>enhanced</i>	dunkelgrau
Immunfluoreszenz (STIM1&PLS3)	20x	- DAPI: 125 -167 - STIM1/PLS: 500- 1000	- DAPI: 1,20 - STIM1/PLS: 1,40	<i>medium</i>	-

3.2.6. Auswertung der Färbungen

3.2.6.1 Histologisches Scoring

Das verwendete Scoring-Verfahren für die Übersichtfärbung mit Safranin-O/Fast-Green basiert auf dem „OARSI cartilage OA histopathology grading system“ (141, 142), welches sowohl den Grad (*grade*) als auch das Stadium (*stage*) der Knorpelschädigung histologisch bewertet. Ziel des OARSI-Scores ist es, ein einheitliches Scoring-System zu entwickeln, welches die Morphologie von Knorpelgewebe hinsichtlich des Schädigungsausmaßes bewertet und bereits frühe OA-Stadien detektiert. So soll die literaturübergreifende Vergleichbarkeit der Terminologie sowie die Reproduzierbarkeit und Validität durch den OARSI-Score gewährleistet werden. Pritzker et al. bestimmten hierfür fünf grundlegende Prinzipien, um dies zu ermöglichen (141):

- Einfachheit (*simplicity*) des Scores, um unabhängig von der Erfahrung des Untersuchers eine korrekte Anwendung und so die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können
- Nutzbarkeit (*utility*) sowohl für klinische als auch experimentelle Studien
- Skalierbarkeit (*scalability*) zur Korrelation des makroskopischen Befundes und der histopathologischen Morphologie des Knorpelgewebes
- Erweiterbarkeit (*extendability*) des Scores um individuelle, zusätzliche Kriterien
- Vergleichbarkeit (*comparability*) des OA-Scores mit Systemen zur histologischen Bewertung anderer knorpelbezogener Pathologien

Der OARSI-Score basiert auf der Einteilung der Knorpelmorphologie in 6 Grade (*grades*), welche die Tiefe der Gewebsläsionen widerspiegeln. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die Zwischenstufen 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 und 6,5 vergeben, die von Pritzker et al. als optionale Erweiterung der histologischen Bewertung vorgesehen wurde (Tab. 17).

Grad 0 entspricht hierbei einer intakten Knorpeloberfläche mit erhaltener Gewebemorphologie, normaler Matrixarchitektur und intakten, korrekt ausgerichteten Zellen. Bei der Vergabe des Grades 1 ist die Knorpeloberfläche ebenfalls intakt, es sind jedoch bereits fokale EZM-Schädigungen in Form von Ödemen, Abrasionen oder Kondensation zu erkennen. Können zusätzlich hypertrophe, apoptotische oder proliferative Chondrozytencluster detektiert werden, liegt der Grad 1,5 vor. Diese Pathologien sind vor allem auf die oberflächliche Schicht des Knorpelgewebes beschränkt. Die kationische Färbung mit Safranin O ist in den oberflächlichen Knorpelschichten vermindert, da es zu einem zunehmenden Verlust von PG's und Untergang von Chondrozyten kommt. Ab Grad 2 bestehen fokale Diskontinuitäten der Knorpeloberfläche, die im Falle eines teilweisen Verlustes des superfiziellen Knorpelgewebes mit einer Ablösung von Knorpelfragmenten bereits dem Grad 2,5 entsprechen. EZM-Risse können in diesem Stadium bis in die Tiefe der oberflächlichen Zone und die sich anschließende mittlere Zone

des Gewebes reichen. Zellveränderungen (Hypertrophie, Apoptose, Cluster, Verlust der korrekten Orientierung) können bis in die mittlere Zone detektiert werden. Zusätzlich wird eine weitere Abnahme der kationischen Färbung im gesamten oberen Drittel des Knorpelgewebes sichtbar. Grad 3 wird durch vertikale Fissuren des Gewebes bis in die mittlere Zone bestimmt. Sind diese Risse komplex oder verzweigt, wird der Grad 3,5 vergeben. Es kommt zunehmend zur EZM-Kondensation und -Rarefizierung bis in die mittlere Zone, verbunden mit zunehmenden Zellpathologien wie Apoptose, Desorientierung oder Clusterbildung. Die Färbbarkeit des Gewebes durch kationische Stoffe ist in den oberen zwei Knorpeldritteln vermindert. Grad 4 wird vor allem von Erosionen des Knorpelgewebes bestimmt, welche mit Delamination (Verlust der oberflächlichen Knorpelschicht) und Zystenbildung mit Verlust von EZM-Gewebe innerhalb der mittleren Zone einhergehen. Durch die Delamination des superfiziellen Gewebes wirkt die Knorpeloberfläche auffällig glatt, das angrenzende Gewebe zeigt jedoch die morphologischen Charakteristika von Knorpelgewebe der mittleren Zone auf. Liegen zusätzlich zirkumskripte Exkavationen (Hohlraumbildungen) in der mittleren Zone vor, wird der Grad 4,5 vergeben. Eine Färbung des Knorpelgewebes durch kationische Farbstoffe ist zunehmend auf die Cluster-umgebende EZM beschränkt. Ab Grad 5 liegt eine Denudation vor, welche sich durch eine vollständige Erosion des hyalinen Knorpelgewebes auszeichnet. Die mineralisierte Knorpelschicht oder das Knochengewebe liegt frei. Sind Reparaturvorgänge an der Geweboberfläche in Form von fibrocartilaginärem Gewebe zu erkennen, sind diese als Ausdruck einer inkompletten Regeneration im Sinne einer *Restitutio cum defectu* anzusehen und entsprechen dem Grad 5,5. Grad 6 ist nach Pritzker et al. (141) durch eine Deformation der Gelenkoberfläche gekennzeichnet. Diese beinhaltet fibrocartilaginäres, reparatives Gewebe, welches das Niveau der Gelenkoberfläche überragt, sowie Osteophytenbildung. Sind neben randständigen Osteophyten der Gelenkfläche auch zentrale Osteophyten vorhanden, wird der Grad 6,5 vergeben.

Zusätzlich zu der Bestimmung des Schädigungsgrades erfolgt die Einteilung in vier Stadien (*stages*), die das prozentuale Ausmaß der Schädigung in Bezug zu der gesamten Knorpeloberfläche setzt (Tab. 18). Hierbei entspricht ein Schädigungsausmaß von weniger als 10% dem Stadium 1, 10% bis 25% dem Stadium 2 und 25% bis 50% dem Stadium 3. Sind über 50% der Knorpeloberfläche von einer Gewebsschädigung betroffen, wird das Stadium 4 vergeben. Um den eigentlichen Score zu erhalten, wird der entsprechende Grad mit dem Stadium multipliziert. Der minimal zu vergebene Score beträgt dementsprechend 0, der maximal zu vergebene Score 26.

Jede Region A bis G der 15 Tibiaplateaus wurde mithilfe des OARSI-Scores bewertet und so insgesamt 90 Werte jeweils für den Grad, das Stadium und den Score ermittelt. Die histologische Bewertung mittels des OARSI-Scores in dieser Arbeit wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt.

Tab. 17: Scoring-Kriterien der Grade der Knorpelschädigung nach Pritzker et al. (141)

Grad (<i>grade</i>)	Kriterien
0	<ul style="list-style-type: none"> - intakte Knorpeloberfläche und Gewebsmorphologie - normale EZM-Architektur und erhaltene Chondrozyten
1	<ul style="list-style-type: none"> - intakte Knorpeloberfläche - EZM: fokale Ödeme, Abrasionen, Kondensationen (oberflächliche Knorpelschicht) - Abnahme der kationischen Färbung der oberflächlichen Knorpelschicht → 1,5: Chondrozyten teilweise apoptotisch, hypertroph, ggf. Cluster
2	<ul style="list-style-type: none"> - fokale Diskontinuitäten der Knorpeloberfläche - EZM: Fissuren bis in die obere, mittlere Zone möglich - Chondrozyten: pathologische Veränderungen bis zur mittleren Zone (Hypertrophie, Apoptose, Cluster, inkorrekte Ausrichtung) - Abnahme der kationischen Färbung im oberem Knorpeldrittel → 2,5: Verlust von superfiziellen Knorpelfragmenten („Flakes“)
3	<ul style="list-style-type: none"> - EZM: vertikale Fissuren, Rarefizierung und Kondensation bis in die mittlere Zone - Chondrozyten: zunehmende Pathologien bis in die mittlere Zone (Hypertrophie, Apoptose, Cluster, inkorrekte Ausrichtung) - verminderte Färbung in den oberen zwei Dritteln der Knorpelschicht → 3,5: verzweigte oder komplexe Fissuren
4	<ul style="list-style-type: none"> - Erosionen der Knorpeloberfläche - Delamination der Knorpelschicht (Verlust der superfiziellen EZM) - Zystenformation in der mittleren Zone → 4,5: Exkavationen in der mittleren Zone
5	<ul style="list-style-type: none"> - Denudation (vollständige Erosion des hyalinen Knorpelgewebes) - Freilegung von mineralisiertem Knorpel- oder Knochengewebe → 5,5: Vorkommen von fibrocartilaginärem, regenerativem Gewebe ohne Verformung der Oberfläche
6	<ul style="list-style-type: none"> - Denudation - Deformation der Gelenkoberfläche durch Umbauprozesse des Knochengewebes (fibrocartilaginäres Gewebe, randständige Osteophyten) → 6,5: zentrale Osteophyten

Tab. 18: Scoring-Kriterien der Stadien der Knorpelschädigung nach Pritzker et al. (141).

Stadium (stage)	Kriterien
1	weniger als 10% der Oberfläche betroffen
2	10% bis 25% der Oberfläche betroffen
3	25% bis 50% der Oberfläche betroffen
4	über 50% der Oberfläche betroffen

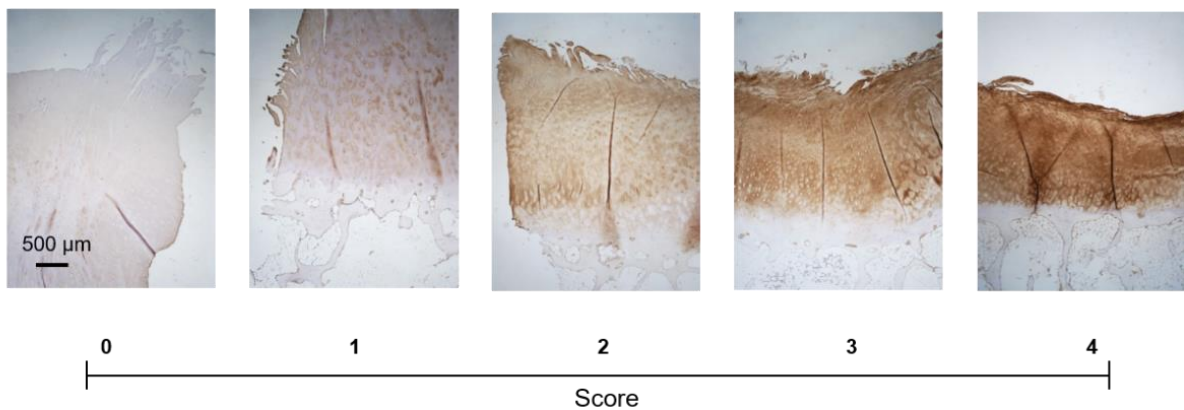
3.2.6.2 Scoring der immunhistochemischen Färbungen

3.2.6.2.1 TSP-1 und TSP-5

Das Scoring-Verfahren der immunhistochemischen Färbungen für die mittels Antikörper visualisierten Proteine TSP-1 und TSP-5 orientierte sich an den optischen Kriterien der Farbintensität und -verteilung. Zunächst wurde die Intensität der Färbung je nach Stärkegrad mit einem Wert von 0 bis 4 versehen, wobei 0 keinerlei Färbung, 4 hingegen der am stärksten vorhandenen Färbung entsprach (Abb. 9). Um die Abstufungen der Farbintensität festzulegen, wurde zunächst für jeden Wert von 0 bis 4 ein Gewebeschnitt exemplarisch als Orientierungsmarker festgelegt, wobei bei der Färbung von TSP-1 lediglich die Intensitäten 0 bis 2 vorlagen (Abb. 9).

Zusätzlich wurde bei jedem Gewebeschnitt die Ausdehnung der gefärbten Anteile von einem Wert von 0 bis 4 versehen. Die genauen Kriterien zur Bestimmung der Ausdehnung können Tabelle 19 entnommen werden. Anschließend wurde für jede Färbung ein Score ermittelt, indem die Intensität der Färbung mit der Ausdehnung multipliziert wurde. Der Score kann hierbei demnach die Werte von 0 bis 16 annehmen. Insgesamt wurde so für jede der Regionen A, B, C, E, F und G der 15 Tibiaplateaus ein Wert für die Intensität, die Ausdehnung und den Score bestimmt. Insgesamt ergaben sich hierbei je 90 Werte für jedes Kriterium und die daraus bestimmten Scores für jeweils TSP-1 und TSP-5.

A) TSP-5



B) TSP-1

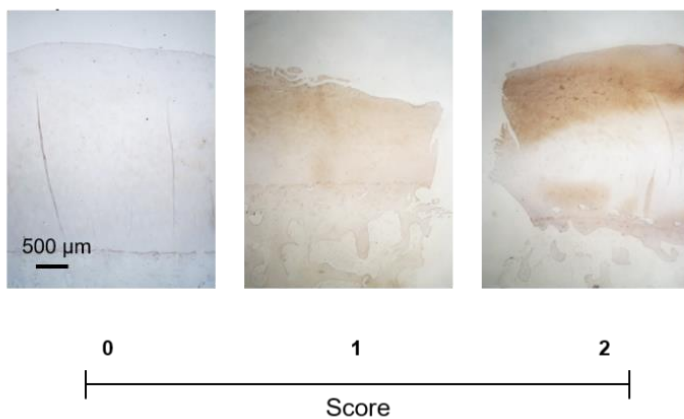


Abb. 9: Score "Intensität" zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.
 A) Exemplarische Schnitte für Score 0 (keine Färbung) bis Score 4 (intensive Färbung) der immunhistochemischen Färbung für TSP-5. B) Exemplarische Schnitte für Score 0 (keine Färbung) bis Score 2 (mittelintensive Färbung). Die Intensitätsstufen 3 und 4 lagen bei den Färbungen von TSP-1 nicht vor.

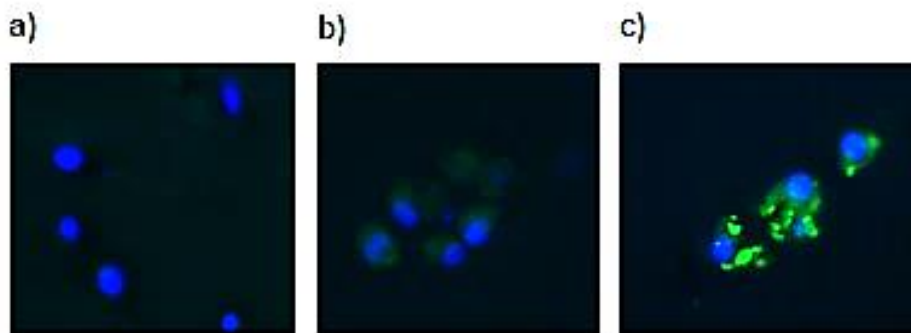
Tab. 19: Kriterien zur Bestimmung der Ausdehnung der Färbung beim Scoring von TSP-1 und TSP-5

Ausdehnung (<i>extend</i>)	Kriterien
0	Keine Färbung
1	weniger als 25% der Knorpelschicht gefärbt
2	Ca. 50% der Knorpelschicht gefärbt
3	Ca. 75% der Knorpelschicht gefärbt
4	100% der Knorpelschicht gefärbt

3.2.6.2.2 STIM1 und PLS3

Zunächst wurden mithilfe der Software *ImageJ* (Version 1.53, Wayne Rasband) die digitalisierten Gewebeschnitte der DAPI-Färbungen mit den entsprechenden Bildern der Protein-Färbungen übereinandergelegt. So konnten die Lokalisationen der Zellen mit denen der gefärbten Proteine STIM1 und PLS3 verglichen werden und infolge bestimmt werden, ob die detektierten Proteine eine intrazelluläre Lage aufweisen. Hierbei wurden für jede der Regionen A bis G jeweils für jedes Tibiaplateau jeweils eine übereinander gelegte Abbildung für die tiefe, die mittlere und die oberflächliche Knorpelschicht erstellt, sodass jeweils für STIM1 als auch für PLS3 270 auszuwertende Knorpelabschnitte abgebildet wurden. Für die histologische Graduierung wurde anschließend zunächst die Anzahl der insgesamt vorhandenen Zellen pro digitalisiertem Gewebeausschnitt bestimmt. Dafür wurden alle sichtbaren, mit DAPI angefärbten Zellkerne gezählt.

A) STIM1



B) PLS3

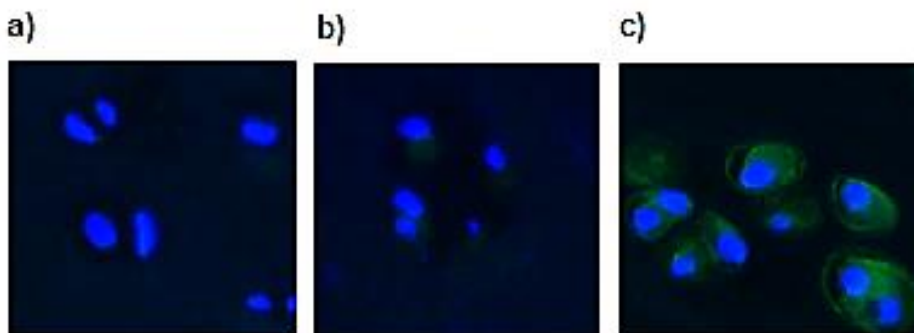


Abb. 10: Kriterium „Stärke der Färbung“ zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen.

A) Exemplarische Gewebeschnitte der immunhistochemischen Färbung von STIM1 für die Vergabe des Kriteriums a) „keine Färbung“, b) „schwache Färbung“ und c) „starke Färbung“. B) Exemplarische Schnitte der immunhistochemischen Färbung von PLS3 für die Vergabe des Kriteriums a) „keine Färbung“, b) „schwache Färbung“ und c) „starke Färbung“.

Anschließend wurde die Anzahl der Zellen ermittelt, in denen eine Proteinexpression von jeweils STIM1 oder PLS3 detektiert werden konnte. Hierbei wurde zwischen keiner Färbung, einer starken und einer schwachen Färbung der Zellen unterschieden (Abb. 10). Aus den so ermittelten absoluten Zahlen wurden anschließend die prozentualen Anteile der insgesamt angefärbten Zellen sowie die der stark und schwach angefärbten Zellen ermittelt.

3.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Softwareprogramme GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und Statistica 7.1 (StatSoft GmbH Europe, Hamburg, Germany) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels des Kolmogorov-Schmirnov-Tests analysiert und die Sphärizität wurde mit dem Mauchy-Test überprüft. Die Prüfung von statistischen Unterschieden zwischen dem medialen und lateralen Kompartiment der Tibiaplateaus wurde mithilfe eines gepaarten Students t-Test oder dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rank-Test umgesetzt. Zur Detektion signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen der Tibiaplateaus wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA, *a one-way analysis of variance*) mit Messwiederholungen sowie der Duncan-Test als Post-Hoc-Analyse angewendet. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, *standard deviation*) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 OARSI-Score

Um die Degeneration des Gelenkknorpels zu quantifizieren, wurde mithilfe der Safranin-O/Fast Green-Übersichtsfärbung des Knorpelgewebes (Abb. 11) der OARSI-Score (135) bestimmt.

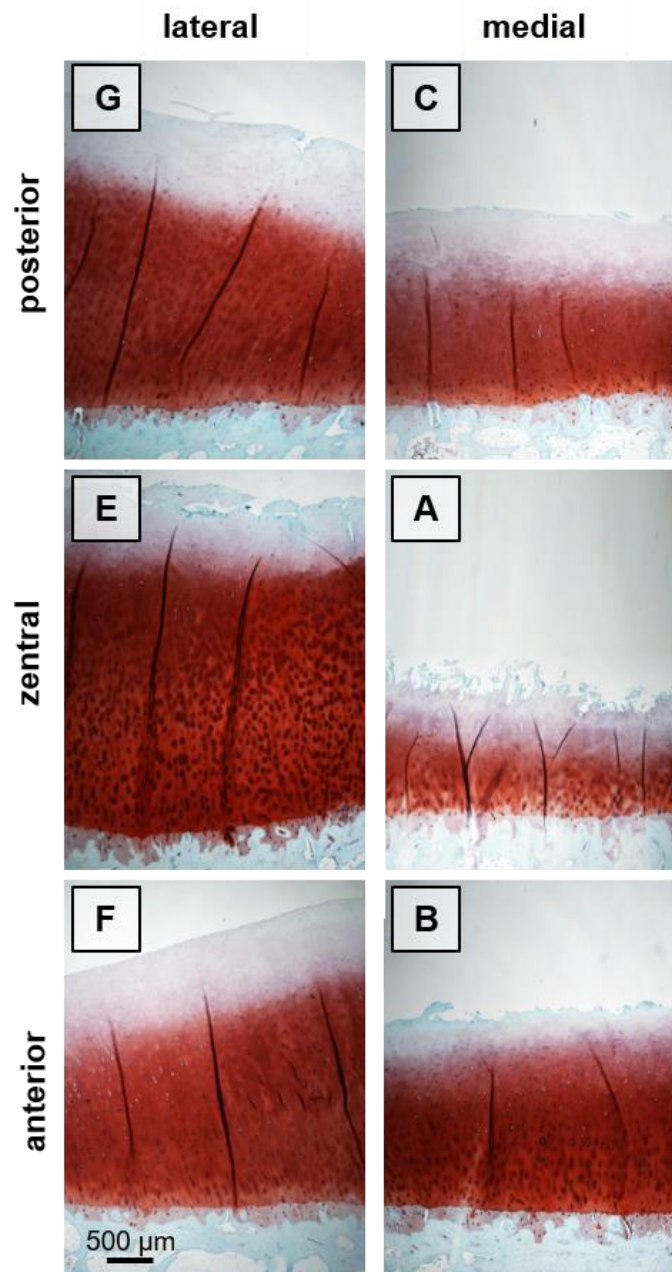


Abb. 11: Safranin-O/Fast-Green-Färbungen des Gelenkknorpels. Repräsentative Schnitte der Safranin-O/Fast-Green-Färbung der verschiedenen Regionen A bis C des medialen sowie E bis G des lateralen Kompartiments. A und E stellen hierbei die zentralen, B und F die anterioren und C und G die posterioren Regionen des Tibiaplateaus dar (siehe Abb. 8).

Die Regionen des medialen Kompartiments zeigten in dieser Übersichtsfärbung eine stärker ausgeprägte Höhenminderung des Knorpelgewebes im Vergleich mit den Regionen des lateralen Kompartiments. Außerdem zeigten sich tiefer reichende Fissuren und markantere Erosionen bei den Regionen des medialen Kompartiments, während sich die Regionen des lateralen Kompartiments oftmals lediglich über superfizielle und fokale Diskontinuitäten der Knorpeloberfläche auszeichneten und das tief liegende Knorpelgewebe in der Übersichtsfärbung weitestgehend intakt erschien (Abb. 11). Im nächsten Schritt wurde der OARSI-Score der unterschiedlichen Regionen der Tibiaplateaus miteinander verglichen. Ein Vergleich der OARSI-Scores, die über das gesamte mediale (Regionen A bis C) und laterale (Regionen E bis G) Kompartiment gebildet wurde, zeigte, dass das mediale Kompartiment einen signifikant ($p < 0,0001$) höheren OARSI-Score hatte im Vergleich zum lateralen Kompartiment (Abb. 12).

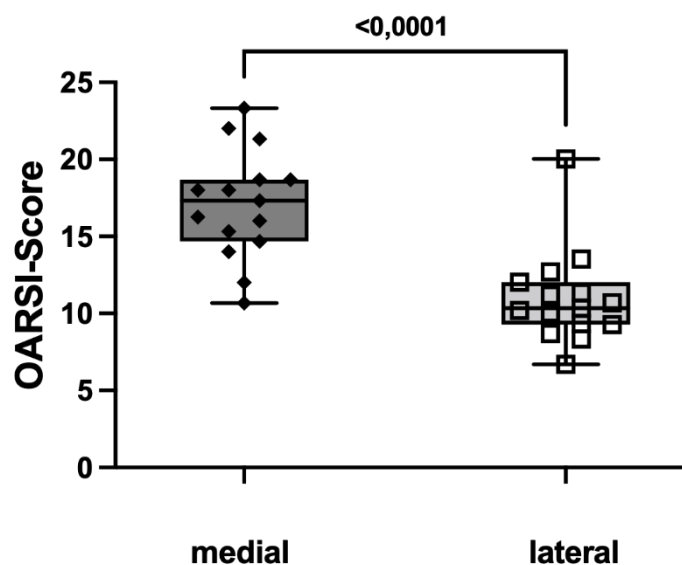


Abb. 12: Histopathologischer Osteoarthritis-Score (Osteoarthritis Research Society International (OARSI)) des Gelenkknorpels vom medialen und lateralen Kompartiment der Tibiaplateaus (n=15). Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen medialem und lateralem Kompartiment wurden mit dem gepaarten t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

Bei einem Vergleich der OARSI-Scores der einzelnen, verschiedenen Regionen des Tibiaplateaus zeigte sich, dass jede der medialen Regionen A bis C des medialen Kompartiments einen signifikant höheren OARSI-Score aufwies, als jede der lateralen Regionen E bis G ($p \leq 0,05$, Abb. 13). Hierbei zeigten sich die signifikantesten ($p < 0,0001$) Unterschiede zwischen den Regionen A (zentral) und C (posterior) des medialen Kompartiments im Vergleich mit der zentralen Region (F) des lateralen Kompartiments.

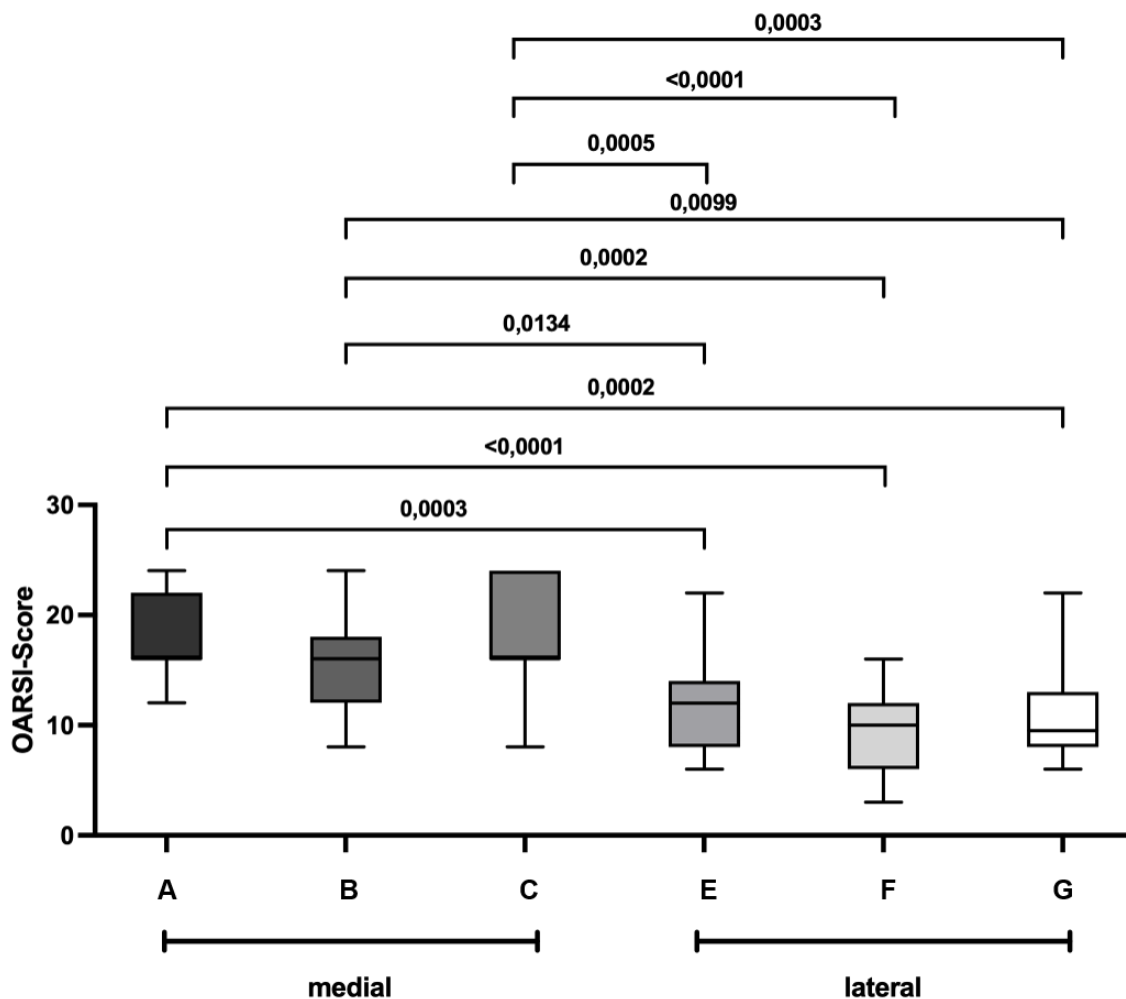


Abb. 13: OARSI-Score der verschiedenen Regionen A bis C des medialen und E bis G des lateralen Kompartiments (n=15). Die Werte des OARSI-Scores sind für die verschiedenen Regionen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Regionen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

4.2 Thrombospondin-1 (TSP-1)

Um die Lokalisation und Expression von TSP-1 in den verschiedenen Knorpelregionen des medialen und lateralen Kompartiments analysieren zu können, wurde eine Färbung von TSP-1 mittels IHC durchgeführt. Es zeigte sich hierbei eine stärkere Färbung von TSP-1 in den Regionen des lateralen Kompartiments des Gelenkknorpels im Vergleich zu denen des medialen Kompartiments (Abb.14). Dabei fiel auf, dass sich bei allen Regionen des lateralen Kompartiments die Färbung der oberflächlichen Knorpelzone auf die Bereiche der

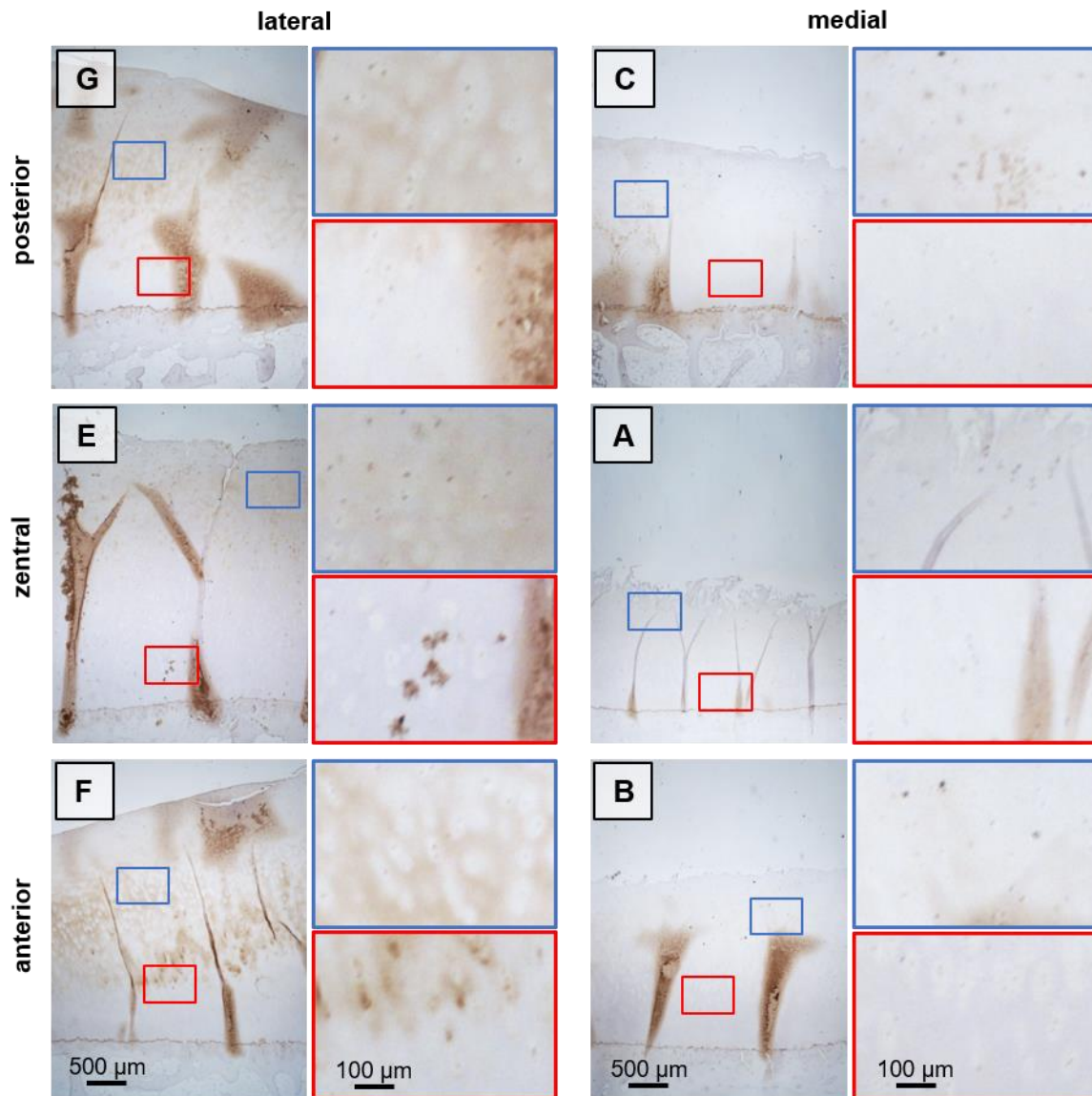


Abb. 14: Exemplarische Knorpelgewebeschnitte der sechs verschiedenen Regionen des Gelenkknorpels nach immunhistochemischer Färbung von TSP-1 (n=15). Darstellung der Regionen des medialen Kompartiments A (=zentral), B (=anterior) und C (=posterior) sowie des lateralen Kompartiments E (=zentral), F (=anterior) und G (=posterior). Fünffach vergrößerte Darstellung der oberen (blaues Kästchen) und tiefen (rotes Kästchen) Knorpelschicht. Die Expression von TSP-1 war in der EZM von allen Regionen des lateralen Kompartiments stärker ausgeprägt, als in den Regionen des medialen Kompartiments.

interterritorialen EZM konzentrierte, während die PZM eine geringere Färbung aufwies. In der Region E (zentral) und F (anterior) des lateralen Kompartiments zeigte sich zusätzlich in der tiefen Knorpelzone im Bereich der PZM eine Färbung, während in der Region G (posterior) keine Färbung der PZM zu detektieren war. Die Regionen des medialen Kompartiments wiesen nahezu keine Färbung von TSP-1 auf, lediglich vereinzelt zeigte sich hier eine Färbung,

welche sich im Bereich der EZM manifestierte (Abb.14). Durch die Bestimmung der Werte für die Intensität (*TSP-1-Intensity*) sowie des Ausmaßes (*TSP-1-Extend*) der Färbung wurde durch die Multiplikation beider Werte der TSP-1-Score zur Evaluation der Expression von TSP-1 ermittelt. Der mittlere Score für das laterale Kompartiment war signifikant ($p=0,0002$) höher im Vergleich zum medialen Kompartiment (Abb. 15).

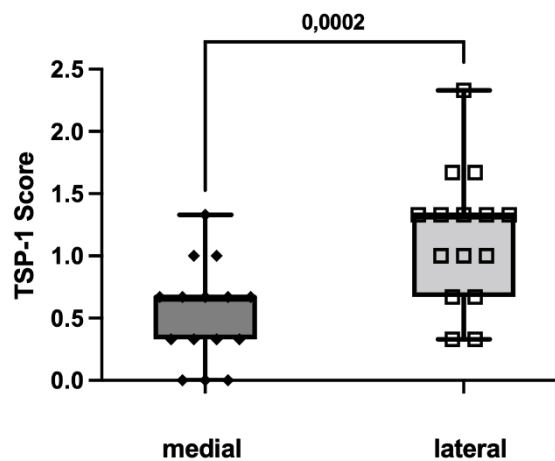


Abb. 15: TSP-1-Score des medialen und lateralen Kompartiments (n=15). Das laterale Kompartiment hat einen signifikant ($p=0,0002$) höheren TSP-1-Score im Vergleich zum medialen Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

Der Vergleich der einzelnen Regionen miteinander zeigte, dass der TSP-1-Score aller Regionen des lateralen Kompartiments signifikant ($p \leq 0,05$) höher war als der TSP-1-Score der Region A (zentral) des medialen Kompartiments (Abb. 16). Die Regionen F (anterior, $p=0,0020$) und G (posterior, $p=0,0024$) des lateralen Kompartiments wiesen zudem einen höheren TSP-1-Score auf als die Region C (posterior) des medialen Kompartiments (Abb. 16). Außerdem zeigte die anteriore Region (B) des medialen Kompartiments einen signifikant ($p=0,0245$) höheren TSP-1-Score als die zentrale Region (A) des medialen Kompartiments.

Insgesamt zeigte sich sowohl eine lateral akzentuierte Färbung von TSP-1 in allen Zonen der Knorpelschicht, wobei diese vor allem im Bereich der EZM detektiert werden konnte (Abb. 14). Diese vermehrte Expression zeigte sich zum einen in einem direkten Vergleich des TSP-1-Scores des medialen und lateralen Kompartiments (Abb. 15), zum anderen auch durch durchweg höhere TSP-1-Scores im Bereich der Regionen des lateralen Kompartiments im Vergleich mit der zentralen Region (A) des medialen Kompartiments (Abb. 16). Bei Betrachtung aller Regionen des medialen Kompartiments zeigte die anteriore Region (B) eine signifikante ($p=0,0245$) Mehrexpression von TSP-1 als die zentrale Region (A). Dies war

sowohl anhand der Färbung (Abb. 14) als auch anhand eines signifikant höheren TSP-1-Scores gegenüber der zentralen Region (A) detektierbar (Abb. 16).

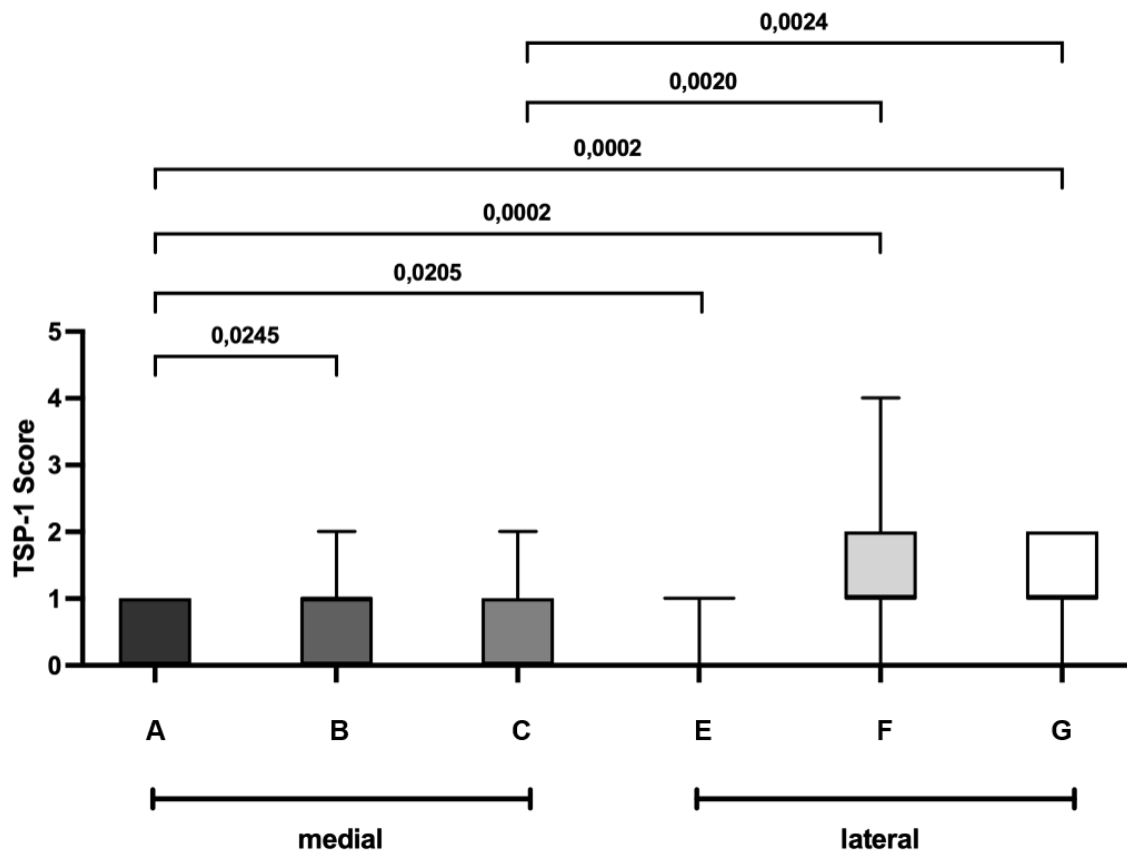


Abb. 16: TSP-1-Score der verschiedenen Regionen A bis C des medialen und E bis G des lateralen Kompartiments (n=15). Die Werte des TSP-1-Scores sind für die verschiedenen Regionen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Regionen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

4.3 Thrombospondin-5 (TSP-5)

Mittels IHC wurden die hyalinen Gewebeschnitte gefärbt, um die Verteilung und Expression von TSP-5 zu visualisieren und diese bei den verschiedenen OA-Stadien der gonarthrotischen Tibiaplateaus zu vergleichen. Bei der morphologischen Betrachtung der Färbungen, fiel zunächst eine durchgehende, überwiegend deutlich ausgeprägte Färbung von TSP-5 in allen Gewebeproben unabhängig ihrer Lokalisation auf (Abb. 17). In der oberflächlichen

Knorpelzone stellte sich sowohl in der posterioren Region des medialen Kompartiments (C), als auch in der posterioren Region des lateralen Kompartiments (G) eine homogene Färbung der gesamten EZM dar (Abb. 17).

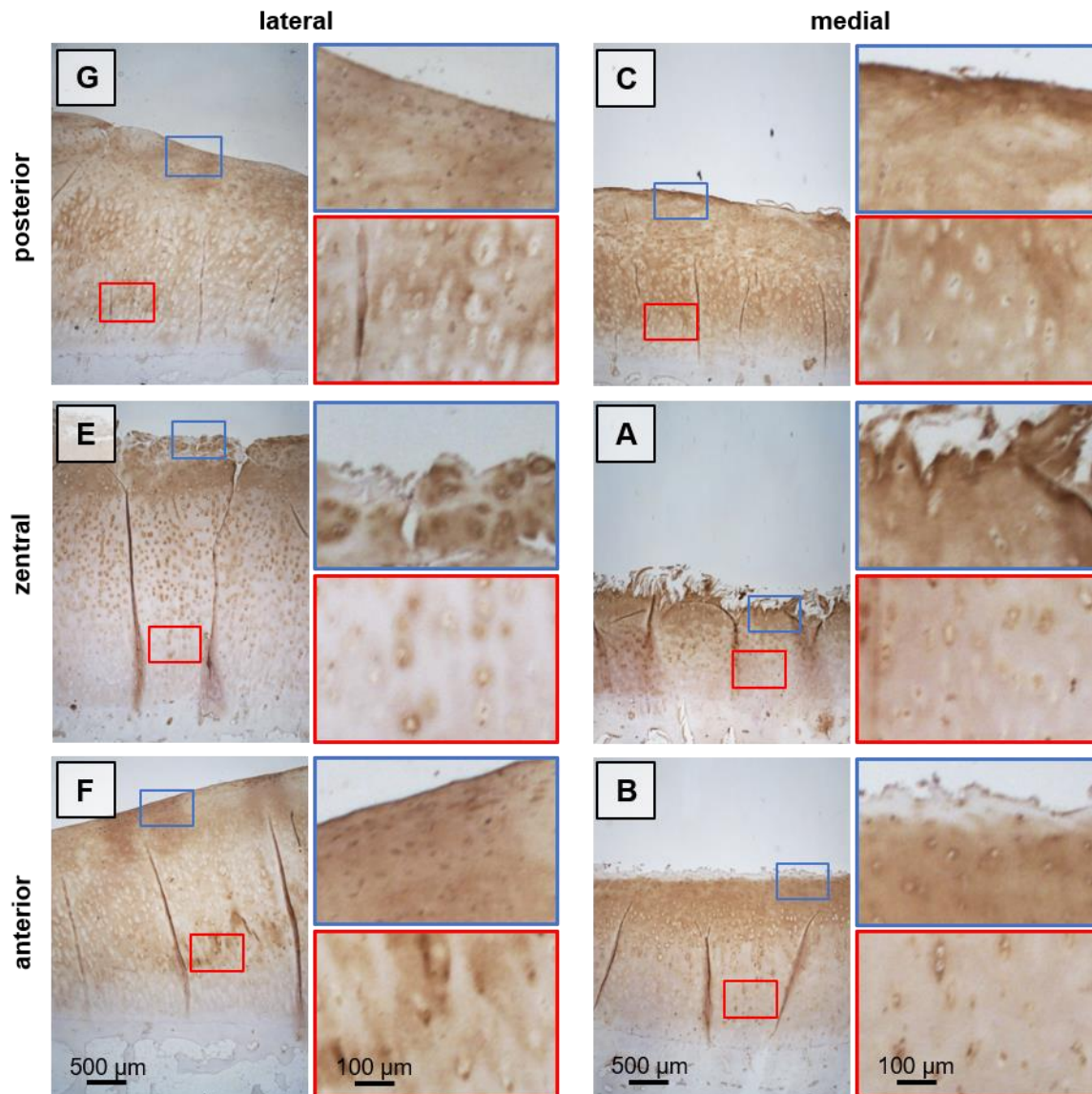


Abb. 17: Exemplarische Knorpelgewebeschnitte der sechs verschiedenen Regionen des Gelenkknorpels nach immunhistochemischer Färbung von TSP-5 (n=15). Darstellung der Regionen des medialen Kompartiments A (=zentral), B (=anterior) und C (=posterior) sowie des lateralen Kompartiments E (=zentral), F (=anterior) und G (=posterior). Fünffach vergrößerte Darstellung der oberflächlichen (blaues Kästchen) und tiefen (rotes Kästchen) Knorpelschicht. Es zeigte sich eine durchgehende TSP-5-Färbung der gesamten Knorpelschicht des medialen und lateralen Kompartiments.

In den tiefen Zonen aller Regionen zeigte sich hingegen eine verminderte EZM-Färbung, wobei in den tiefen Knorpelschichten der zentralen und anterioren Regionen sowohl des medialen (A und B) als auch des lateralen (E und F) Kompartiments eine perizellulär stärker betonte Färbung von TSP-5, als in den posterioren Regionen des medialen (C) und lateralen (G) Kompartiments detektiert werden konnte. Während die anterioren Regionen des medialen (B) und lateralen (F) Kompartiments sowie die zentrale Region (A) des medialen Kompartiments eine homogene Färbung von TSP-5 im Bereich der EZM der oberflächlichen Knorpelschicht aufwies, fiel bei Betrachtung der zentralen Region (E) des lateralen Kompartiments eine vermehrte Expression von TSP-5 vor allem perizellulär auf. In der oberflächlichen Knorpelschicht der anterioren Region (B) des medialen Kompartiments fiel zudem eine stark verminderte Färbung der EZM in Form eines schmalen, nicht gefärbten Saums im apikalen Anteil des Knorpelgewebes auf, während in der zentralen (A) und posterioren (C) Region des medialen Kompartiments eine akzentuierte Färbung der EZM im superfiziellen Bereich deutlich wurde. Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz hierzu in der zentralen Region (E) des lateralen Kompartiments eher eine vermehrte Expression von TSP-5.

Nach Ermittlung des TSP-5 Scores analog zu der Vorgehensweise zur Ermittlung des TSP-1-Scores, wurden die medialen und lateralen TSP-5 Scores verglichen (Abb. 18). Hierbei zeigte sich kein signifikanter ($p=0,3105$) Unterschied zwischen den TSP-5-Scores des medialen und des lateralen Kompartiments. Auch im Rahmen der statistischen Auswertung der verschiedenen Lokalisationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen TSP-5 Scores der verschiedenen Regionen festgestellt werden (Abb. 19).

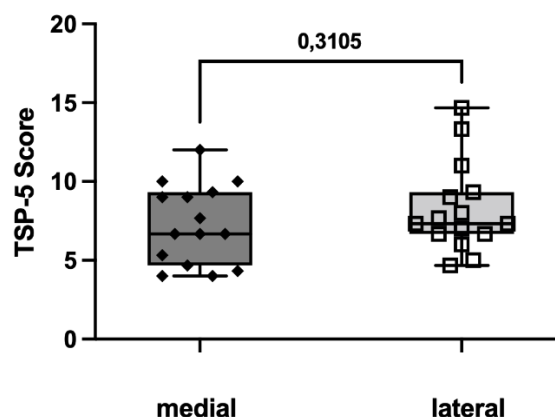


Abb. 18: TSP-5-Scores des medialen und lateralen Kompartiments (n=15). Es konnte kein signifikanter ($p=0,3105$) Unterschied zwischen den TSP-5-Scores des medialen und lateralen Kompartiments gezeigt werden. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

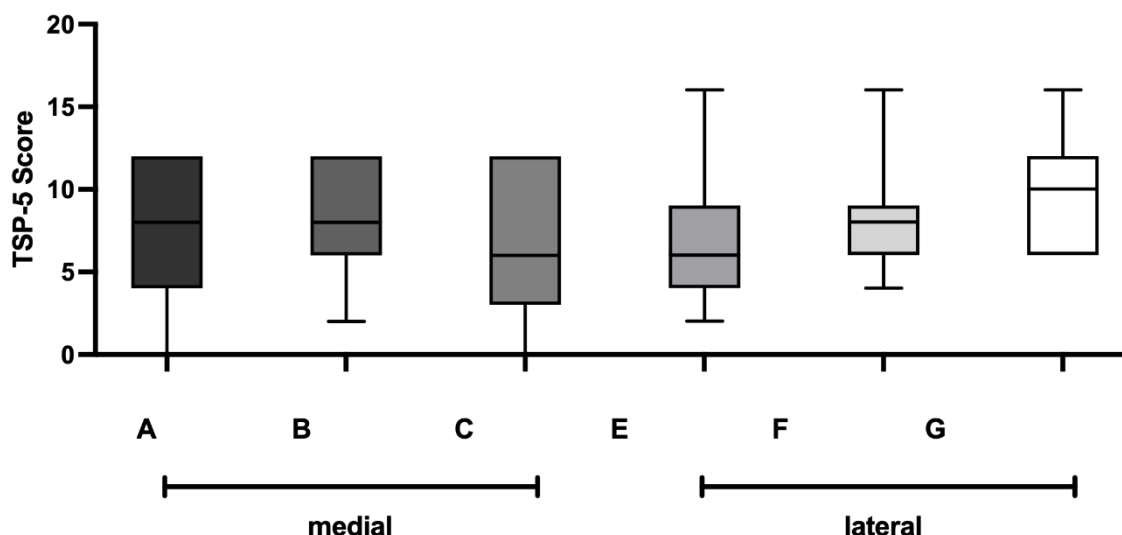


Abb. 19: TSP-5-Score der verschiedenen Regionen A bis C des medialen und E bis G des lateralen Kompartiments (n=15). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den TSP-5-Scores der verschiedenen Regionen des medialen und lateralen Kompartiments festgestellt werden. Die Werte des TSP-5-Scores sind für die verschiedenen Regionen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Regionen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

Zusammenfassend wies die Färbung von TSP-5 eher geringe Diskrepanzen zwischen Regionen des medialen und lateralen Kompartiments auf. Es zeigte sich eine superfiziell verstärkte Expression von TSP-5 im Bereich der zentralen Region (E) des lateralen Kompartiments, welche sich vorrangig perizellulär detektieren ließ. Zudem fiel eine verminderte Färbung von TSP-5 in der oberflächlichen Knorpelschicht in der anterioren Region (B) des medialen Kompartiments auf. Zusätzlich zeigte sich vor allem bei der Betrachtung der posterioren Regionen des medialen (C) und lateralen (G) Kompartiments eine verminderte Färbung von TSP-5 im Bereich der PZM der tiefen Knorpelschichten.

4.4 *Stroma interaction molecule 1 (STIM1)*

Um die Expression und Lokalisation von STIM1 in den verschiedenen Regionen des Knorpelgewebes zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Es fiel auf, dass vor allem die oberflächliche Zone des Knorpelgewebes eine prägnante Färbung von STIM1 innerhalb der Chondrozyten aufwies, während die mittlere und tiefe Zone der Knorpelschicht lediglich über wenige bis keine gefärbten Chondrozyten verfügten (Abb. 20).

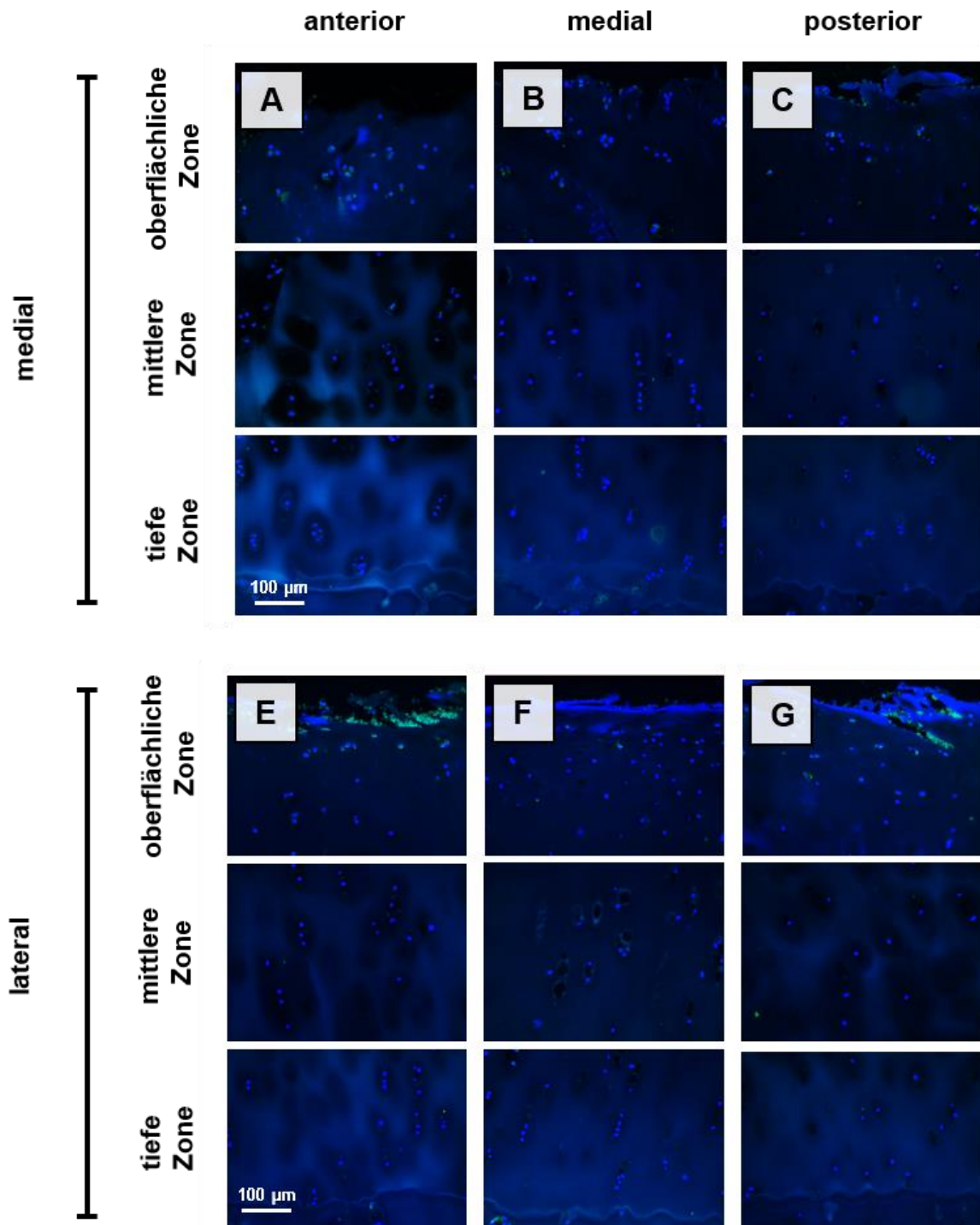


Abb. 20: Immunfluoreszenz-Färbung von STIM1 in Chondrozyten des Gelenkknorpels. STIM1 konnte in Chondrozyten der oberflächlichen, mittleren und tiefen Zone des Gelenkknorpels der verschiedenen Regionen A bis C des medialen Kompartiments und E bis G des lateralen Kompartiments der Tibia nachgewiesen werden, Die stärkste Färbung war in den Chondrozyten der oberflächlichen Zone vorhanden. Es sind repräsentative Schnitte der Regionen eines Patienten dargestellt.

In jeder Region des Tibiaplateaus konnte eine Expression von STIM1 detektiert werden. Bei genauerer Betrachtung der oberflächlichen Knorpelschicht zeigte sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte, von schwach bis intensiv reichende Färbung von STIM1 innerhalb der Chondrozyten aller Regionen (Abb. 21).

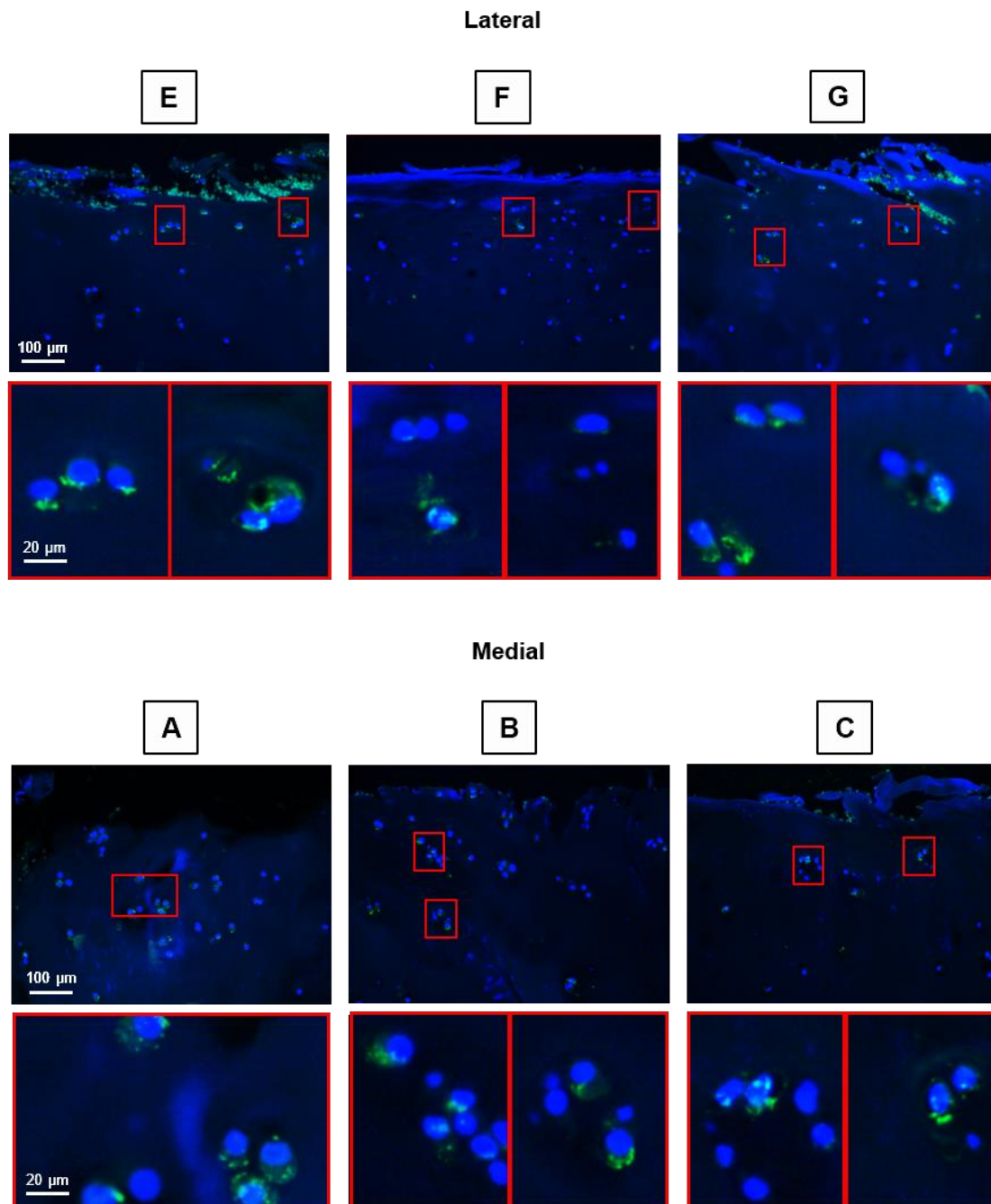


Abb. 21: Immunfluoreszenz-Färbung von STIM1 in Chondrozyten des oberflächlichen Gelenkknorpels. In der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels der verschiedenen Regionen A bis C des medialen Kompartiments und E bis G des lateralen Kompartiments sind STIM1-gefärbte Chondrozyten zu identifizieren. Die Vergrößerungen in den roten Kästchen zeigen die Lokalisation von STIM1 in den einzelnen Chondrozyten. Es sind repräsentative Schnitte der Regionen dargestellt.

Diese unterschiedlichen Ausmaße der Färbung traten sowohl in den Regionen des medialen als auch in den Regionen des lateralen Kompartiments auf, wobei in den medialen Regionen mehr STIM1 gefärbte Chondrozyten zu detektieren waren (Abb. 21).

Anschließend wurde der prozentuale Anteil der STIM1-gefärbten Zellen in Relation zur Gesamtzahl der vorhandenen Chondrozyten bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass das mediale Kompartiment einen signifikant ($p=0,0416$) höheren prozentualen Anteil an STIM1-gefärbten Zellen im Vergleich zum lateralen Kompartiment aufwies (Abb. 22).

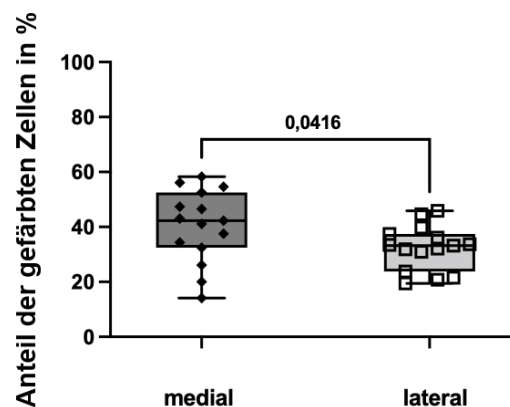


Abb. 22: Quantitative Auswertung der STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller vorhandenen Zellen (n=15). Das mediale Kompartiment hat einen signifikant ($p=0,0416$) höheren prozentualen Anteil an STIM1-positiven Chondrozyten im Vergleich zum lateralen Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

Bei einem Vergleich der STIM1-gefärbten Zellen in der oberflächlichen, mittleren und tiefen Zone des Gelenkknorpels zwischen medialem und lateralem Kompartiment zeigten sich deutliche Unterschiede in der zonenspezifischen Färbung der Zellen (Abb. 23). Die oberflächliche Zone sowohl des medialen als auch des lateralen Kompartiments wies signifikant ($p \leq 0,0001$) mehr STIM1-gefärbte Chondrozyten auf als die mittlere und tiefe Zone. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter ($p > 0,05$) Unterschied zwischen der oberflächlichen Zone des medialen Kompartiments im Vergleich zur oberflächlichen Zone des lateralen Kompartiments (Abb. 23).

Insgesamt fiel auf, dass die Expression von STIM1 vor allem in Zellen der oberflächlichen Zone der Knorpelschicht lokalisiert war. Dies traf sowohl für das laterale Kompartiment, als auch für das mediale Kompartiment zu.

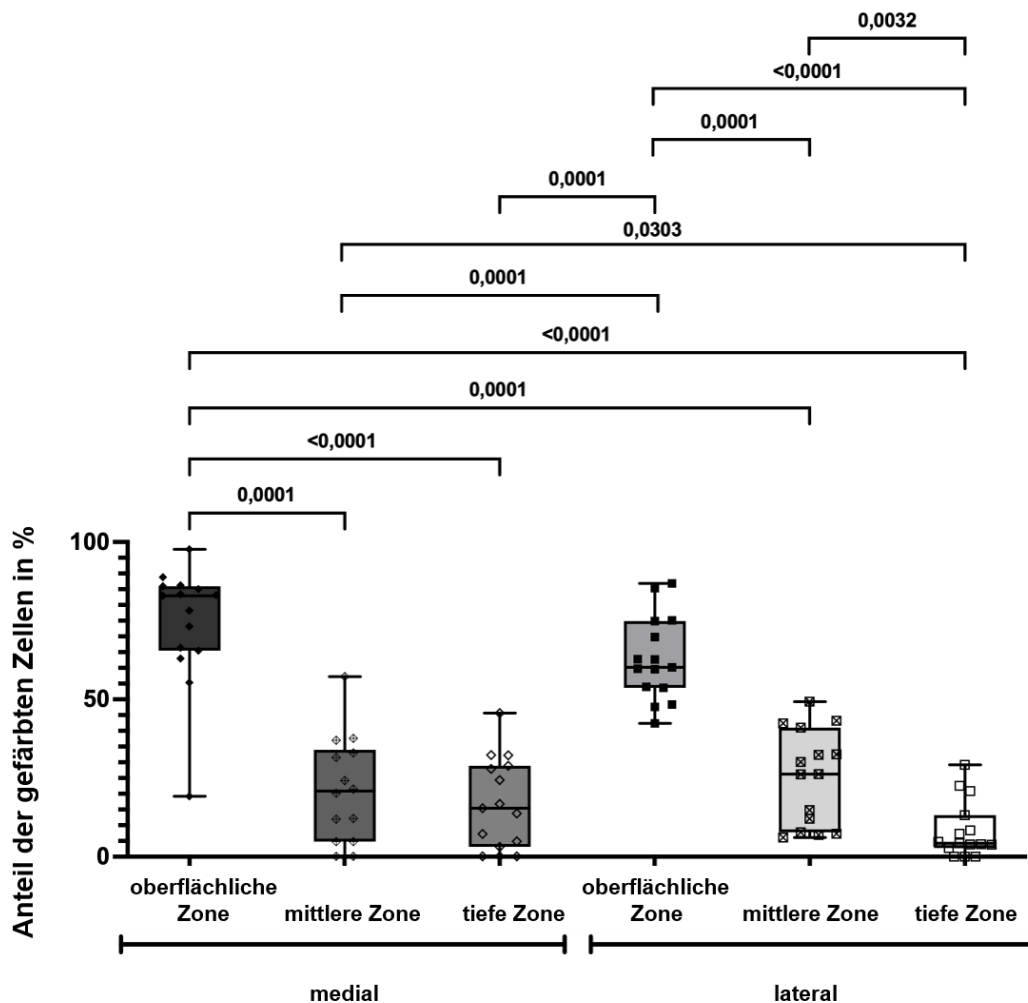


Abb. 23: Quantitative Auswertung der STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller vorhandenen Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15). Die oberflächlichen Zonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigten einen signifikant höheren Anteil STIM1-positiver Zellen als die mittlere und tiefe Zone. Die Werte sind für die verschiedenen Zonen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Zonen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

Beim Vergleich der Chondrozyten, die eine starke Färbung von STIM1 aufwiesen in Relation zur Anzahl aller STIM1-positiven Chondrozyten, zeigten sich signifikant ($p=0,0133$) mehr stark gefärbte Zellen im medialen Kompartiment als im lateralen Kompartiment (Abb. 24).

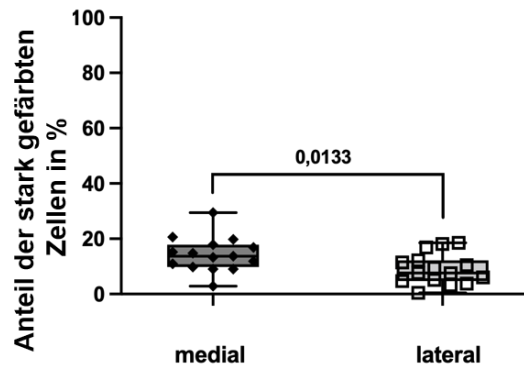


Abb. 24: Quantitative Auswertung der stark STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15). Das mediale Kompartiment hat einen signifikant ($p=0,0133$) höheren prozentualen Anteil an stark STIM1-positiven Chondrozyten im Vergleich zum lateralen Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

Ein Vergleich der verschiedenen Knorpelzonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigte, dass die oberflächliche Knorpelzone signifikant ($p \leq 0,0001$) mehr stark STIM1-positiv Chondrozyten aufwies als die mittlere und tiefe Zone (Abb. 25). Dies konnte sowohl für die oberflächliche Zone des medialen als auch des lateralen Kompartiments gezeigt werden. Zusätzlich zeigte sich, dass die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments signifikant ($p=0,0010$) mehr stark STIM1-positiv Chondrozyten aufwies als die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments (Abb. 25).

Bei einem Vergleich der schwach STIM1-positiven Chondrozyten in Relation zu allen gefärbten Zellen zeigte sich kein signifikanter ($p=0,3290$) Unterschied zwischen dem medialen und dem lateralen Kompartiment (Abb. 26). Der Vergleich der verschiedenen Zonen miteinander zeigte wiederum dieselbe zonenspezifische Expression von STIM1 wie bei den insgesamt gefärbten Chondrozyten sowie der stark STIM1-positiven Chondrozyten; die oberflächlichen Zonen des medialen und des lateralen Kompartiments wiesen signifikant ($p \leq 0,0001$) mehr schwach STIM1-positiv Chondrozyten auf als die mittlere und die tiefe Zone (Abb. 27). Es zeigte sich jedoch kein signifikanter ($p > 0,05$) Unterschied zwischen der oberflächlichen Zone des medialen Kompartimentes und der oberflächlichen Zone des lateralen Kompartiments (Abb. 27).

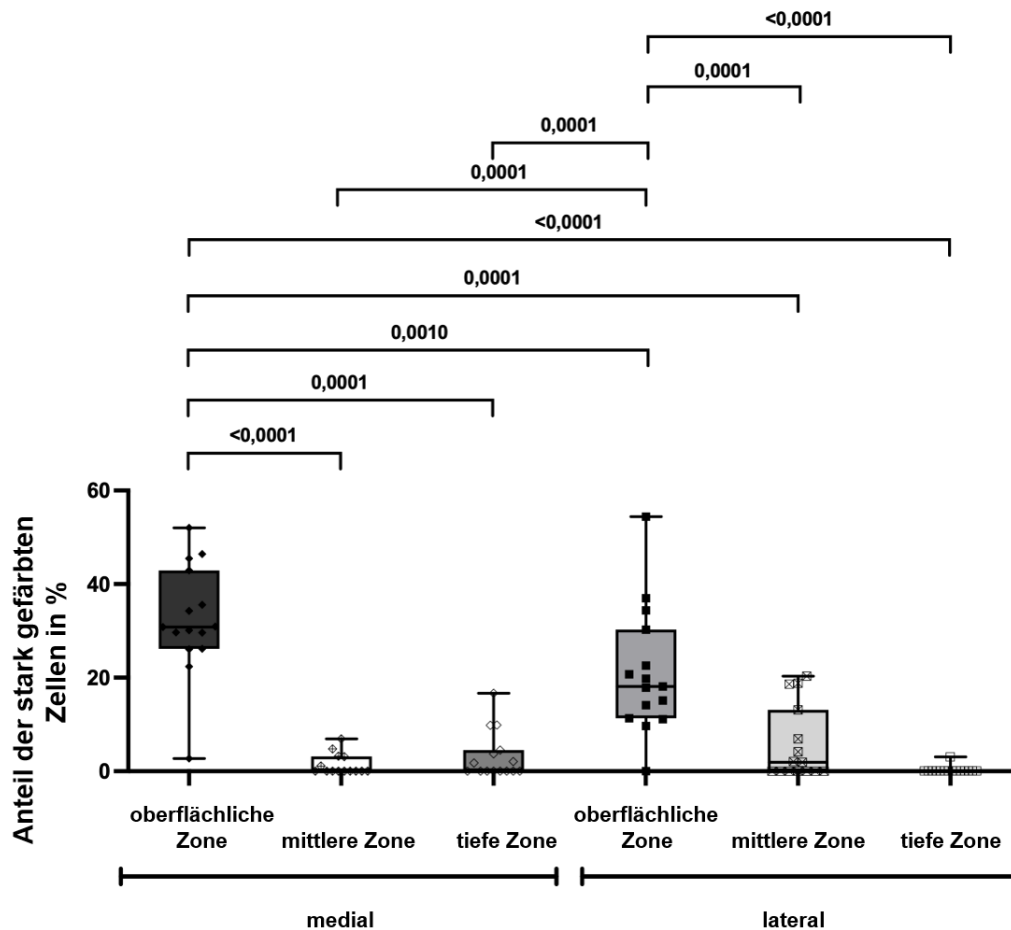


Abb. 25: Quantitative Auswertung der stark STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenknorpels (n=15). Die oberflächlichen Zonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigten einen signifikant ($p \leq 0,0001$) höheren Anteil stark STIM1-positiver Zellen als die mittlere und tiefe Zone. Die Werte sind für die Zonen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Zonen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

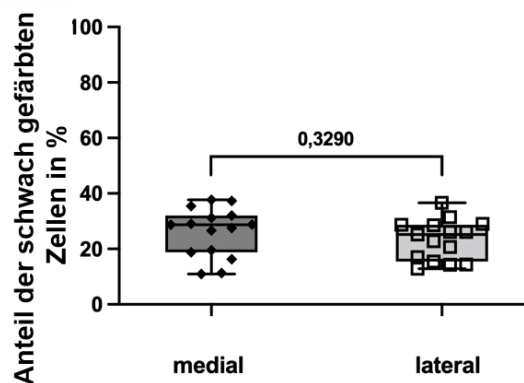


Abb. 26: Quantitative Auswertung der schwach STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15). Es zeigte sich kein signifikanter ($p=0,3290$)

Unterschied zwischen dem medialen und lateralen Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

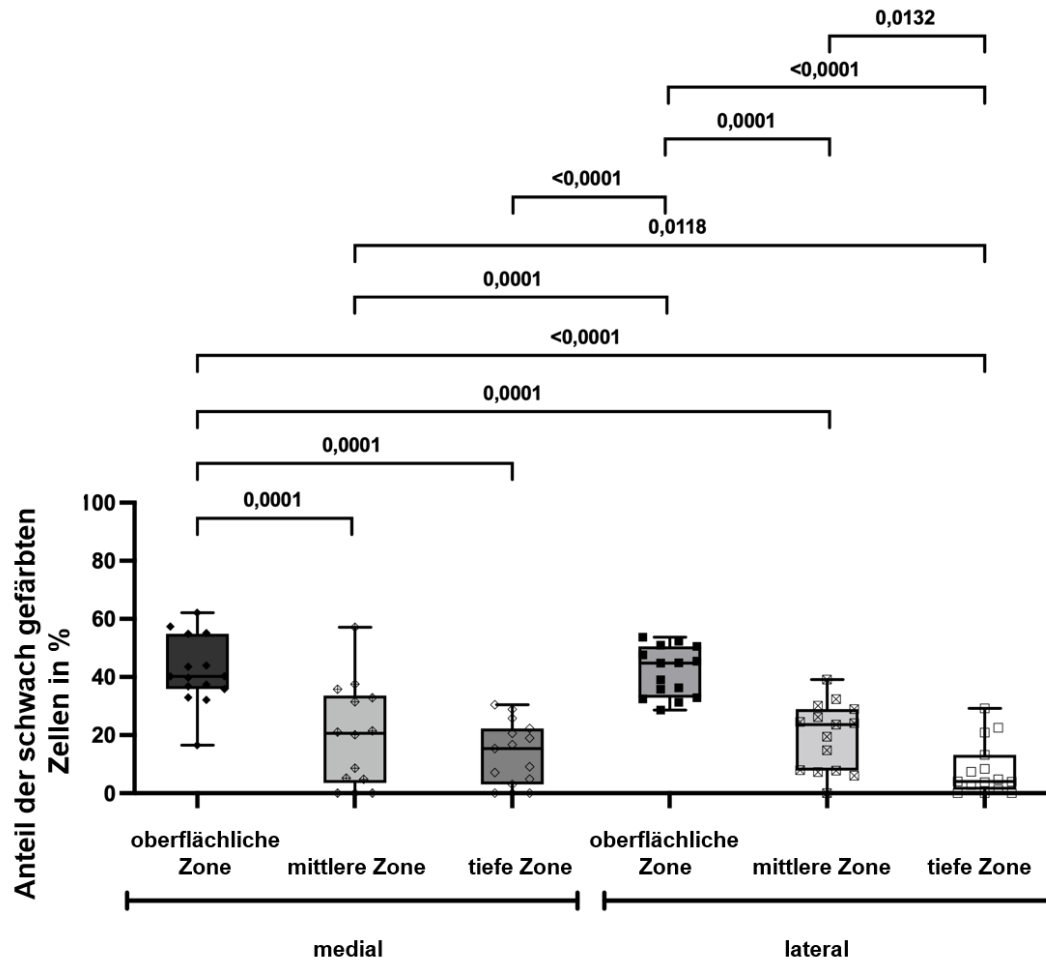


Abb. 27: Quantitative Auswertung der schwach STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15). Die oberflächlichen Zonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigten einen signifikant ($p \leq 0,0001$) höheren Anteil schwach STIM1-positiver Zellen als die mittlere und tiefe Zone. Die Werte sind für die verschiedenen Zonen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Zonen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungsergebnisse, dass STIM1 sowohl im medialen als auch im lateralen Kompartiment vor allem in der oberflächlichen Knorpelzone exprimiert ist. Dies zeigte sich sowohl für stark STIM1-positive Chondrozyten als auch schwach STIM1-positive Chondrozyten. Hierbei wies das mediale Kompartiment insgesamt mehr STIM1-gefärbte Chondrozyten auf als das laterale Kompartiment.

4.5 Plastin-3 (PLS3)

Um die Expression und Lokalisation von PLS3 in den verschiedenen Regionen des Knorpelgewebes zu analysieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (Abb. 28) mit genauerer Betrachtung vor allem der oberflächlichen Knorpelzone (Abb. 29).

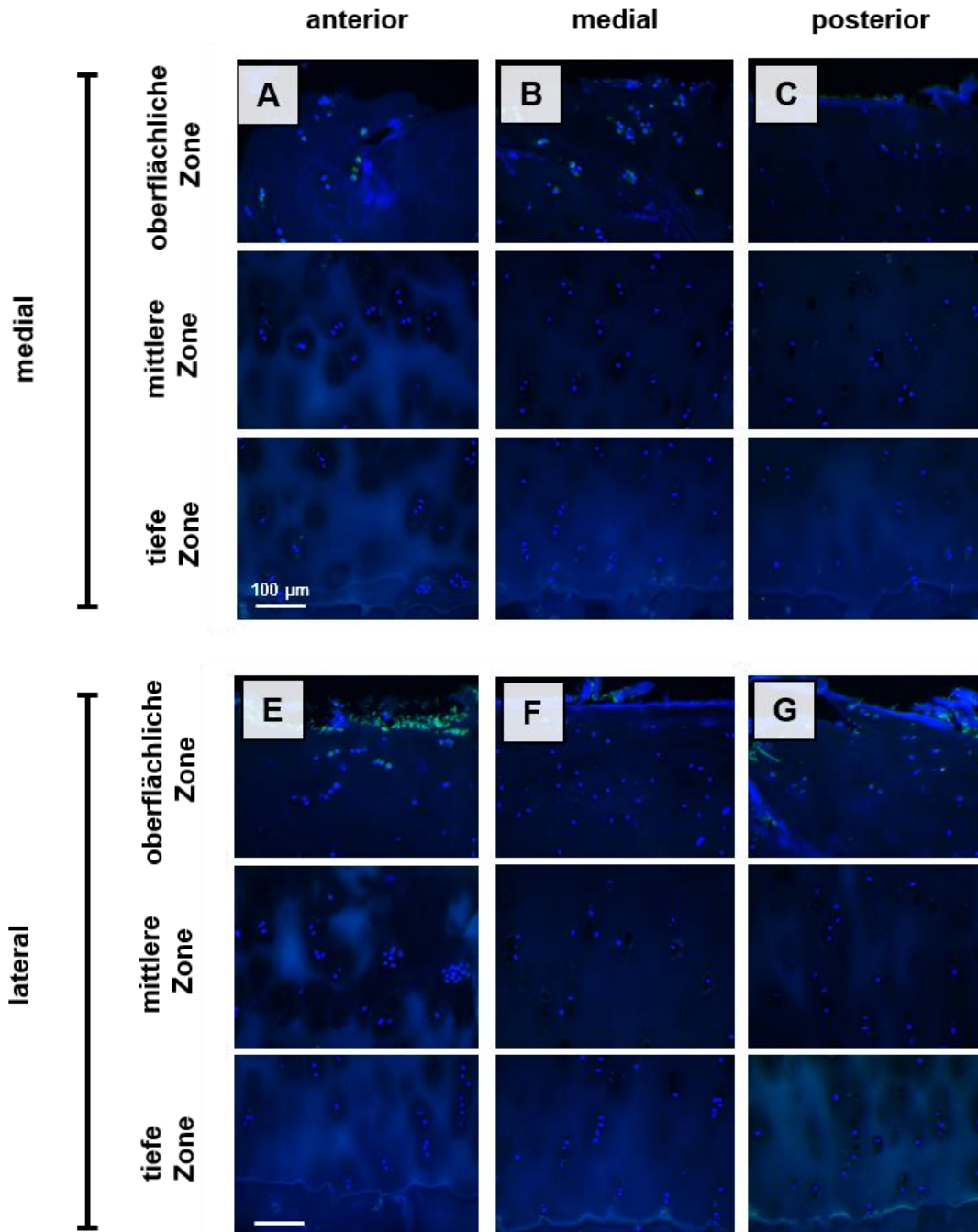


Abb. 28: Immunfluoreszenz-Färbung von PLS3 in Chondrozyten des Gelenkknorpels. PLS3 konnte in Chondrozyten der oberflächlichen, mittleren und tiefen Zone des Gelenkknorpels der

verschiedenen Regionen A bis C des medialen Kompartiments und E bis G des lateralen Kompartiments der Tibia nachgewiesen werden, Die stärkste Färbung war in den Chondrozyten der oberflächlichen Zone vorhanden. Es sind repräsentative Schnitte der Regionen eines Patienten dargestellt.

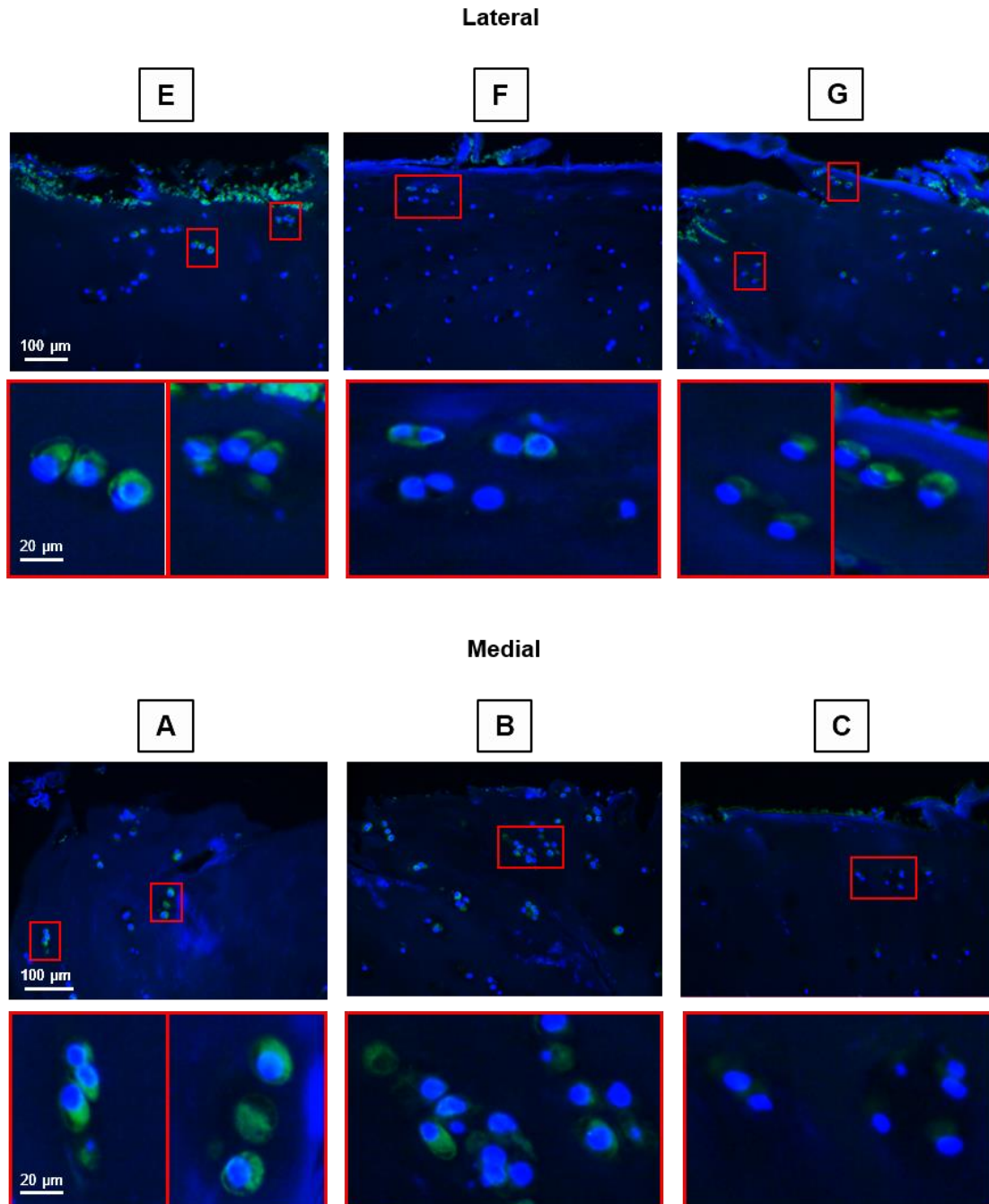


Abb. 29: Immunfluoreszenz-Färbung von PLS3 in Chondrozyten des oberflächlichen Gelenkknorpels. In der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels der verschiedenen Regionen A bis C des medialen Kompartiments und E bis G des lateralen Kompartiments sind PLS3-gefärbte Chondrozyten zu identifizieren. Die Vergrößerungen in den roten Kästchen zeigen die Lokalisation von PLS3 in den einzelnen Chondrozyten. Es sind repräsentative Schnitte der Regionen dargestellt.

Es fiel auf, dass vor allem die oberflächliche Zone des Knorpelgewebes eine prägnante Färbung von PLS3 innerhalb der Chondrozyten aufwies, während die mittlere und tiefe Zone der Knorpelschicht lediglich über wenige bis keine gefärbten Chondrozyten verfügten (Abb. 28). In jeder Region des Tibiaplateaus konnten hierbei PLS3-positive Chondrozyten detektiert werden. Bei der genaueren Betrachtung der oberflächlichen Knorpelzonen der verschiedenen Lokalisationen zeigte sich eine schwache bis starke intrazelluläre Anfärbung von PLS3 in den Chondrozyten der oberflächlichen Knorpelschicht in allen untersuchten Regionen (Abb. 29).

Die Bestimmung der prozentualen Anteile der PLS3-gefärbten Zellen in Relation zur Gesamtzahl aller vorhandenen Chondrozyten zeigte, dass das mediale Kompartiment über einen signifikant ($p=0,0105$) höheren prozentualen Anteil PLS3-positiver Zellen verfügte als das laterale Kompartiment (Abb. 30).

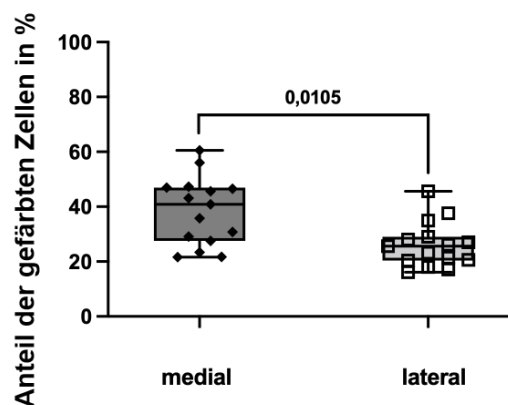


Abb. 30: Quantitative Auswertung der PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller vorhandenen Zellen (n=15). Das mediale Kompartiment hat einen signifikant ($p=0,0105$) höheren prozentualen Anteil an PLS3-positiven Chondrozyten im Vergleich zum lateralen Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

Beim Vergleich der oberflächlichen, mittleren und tiefen Knorpelzonen des medialen Kompartiments und lateralen Kompartiments zeigte sich, dass die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments einen signifikant höheren Anteil PLS3-positiver Chondrozyten aufwies als alle anderen Zonen. Interessanterweise schließt dies die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments ein, welche über einen signifikant ($p=0,0032$) niedrigeren Anteil PLS3-gefärbter Zellen als die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments verfügte (Abb. 31). Die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments wies wiederum signifikant

höhere Anteile PLS3-positiver Zellen auf als die medialen und tiefen Zonen beider Kompartimente.

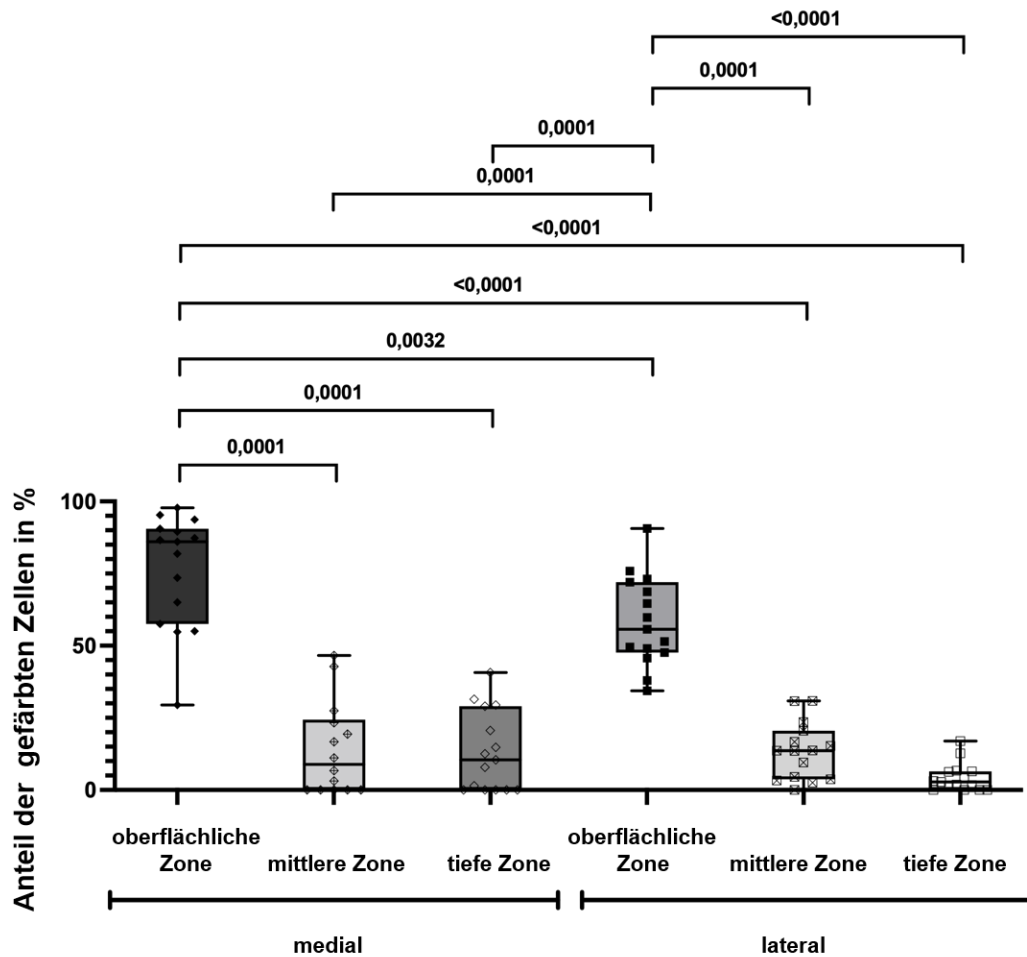


Abb. 31: Quantitative Auswertung der PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller vorhandenen Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15). Die oberflächlichen Zonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigten einen signifikant höheren Anteil PLS3-positiver Zellen als die mittlere und tiefe Zone. Zudem zeigt die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments einen signifikant höheren Anteil an PLS3-gefärbten Zellen als die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments. Die Werte sind für die verschiedenen Zonen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Zonen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

Bei dem Vergleich der Zellen, die über eine starke Färbung von PLS3 verfügten in Relation zur Anzahl aller PLS3-positiven Chondrozyten, zeigten sich signifikant ($p=0,0171$) mehr stark gefärbte Zellen im medialen Kompartiment als im lateralen Kompartiment (Abb. 32). Da in den mittleren Zonen der Regionen A, B und C des medialen Kompartiments keinerlei starke Anfärbung detektiert werden konnte und die Mittelwerte so stets 0 betragen, konnte dieser

Knorpelabschnitt bei der statistischen Auswertung der einzelnen Zonen nicht berücksichtigt werden.

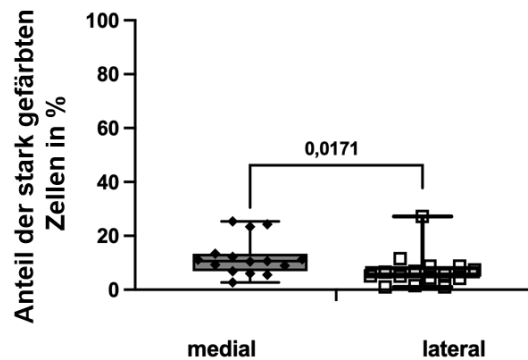


Abb. 32: Quantitative Auswertung der stark PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15). Das mediale Kompartiment hat einen signifikant höheren prozentualen Anteil an stark PLS3-positiven Chondrozyten im Vergleich zum lateralen Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

Beim Vergleich der oberflächlichen und tiefen Knorpelzone des medialen und der oberflächlichen, mittleren und tiefen Zone des lateralen Kompartiments miteinander zeigte sich, dass die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments einen signifikant höheren Anteil stark PLS3-positiver Chondrozyten aufwies, als alle Zonen des lateralen Kompartiments (Abb. 33). Interessant ist hierbei, dass die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments auch über signifikant ($p=0,0040$) mehr stark PLS3-positive Chondrozyten verfügte als die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments. Die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments verfügte jedoch über signifikant ($p=0,0001$) höhere Anteile stark PLS3-positiver Chondrozyten als die mittlere und tiefe Zone des lateralen Kompartiments. Insgesamt zeigte sich also ein akzentuiertes Vorkommen stark PLS3-positiver Chondrozyten in den oberflächlichen Knorpelschichten, wobei die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments über eine signifikant stärkere Expression verfügte als die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments.

Die Bestimmung der schwach PLS3-positiven Chondrozyten in Relation zu der Gesamtzahl aller vorhandenen Zellen zeigte, dass das mediale Kompartiment (Region A, B und C) hier ebenfalls über einen signifikant ($p=0,0100$) höheren Anteil verfügte als das laterale Kompartiment (Region E, F und G, Abb. 34).

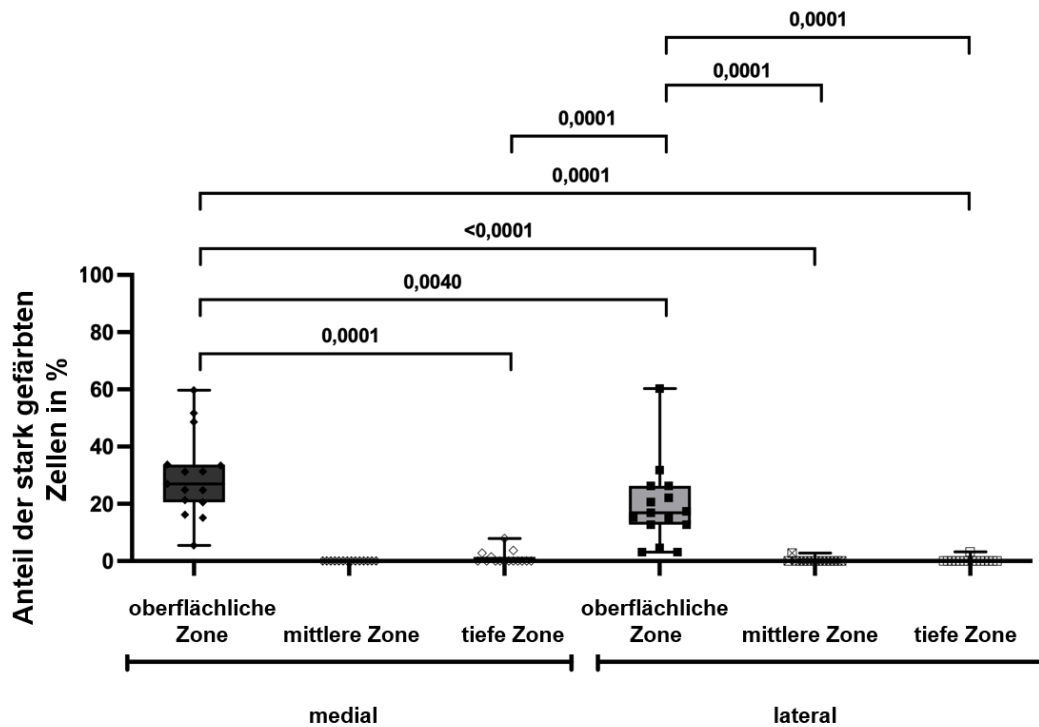


Abb. 33: Quantitative Auswertung der stark PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15). Die oberflächlichen Zonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigten einen signifikant höheren Anteil stark PLS3-positiver Zellen als die mittlere Zone des lateralen Kompartiments und die tiefe Zone beider Kompartimente. Zusätzlich verfügt die oberflächliche Zone des medialen Kompartiments über einen signifikant höheren Anteil als die oberflächliche Zone des lateralen Kompartiments. Die Werte sind für die verschiedenen Zonen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Zonen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

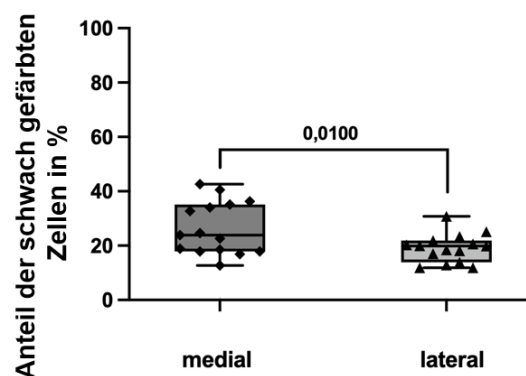


Abb. 34: Quantitative Auswertung der schwach PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15). Das mediale Kompartiment verfügt über einen signifikant höheren Anteil schwach PLS3-positiver Zellen als das laterale Kompartiment. Die Daten sind als Boxplots mit Streudiagramm dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem gepaarten t-Test ($p \leq 0,05$).

Schließlich wurden die Anteile schwach PLS3-positiver Zellen in den oberflächlichen, mittleren und tiefen Knorpelzonen des medialen und lateralen Kompartiments miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich ein signifikant ($p \leq 0,0001$) höherer Anteil schwach gefärbter PLS3-positiver Chondrozyten in den oberflächlichen Zonen jeweils des medialen und des lateralen Kompartiments im Vergleich mit den mittleren und tiefen Zonen beider Kompartimente (Abb. 35). Auch bei der Verteilung der schwach gefärbten, PLS3-positiven Chondrozyten zeigte sich also eine Akzentuierung in den oberflächlichen Zonen beider Kompartimente.

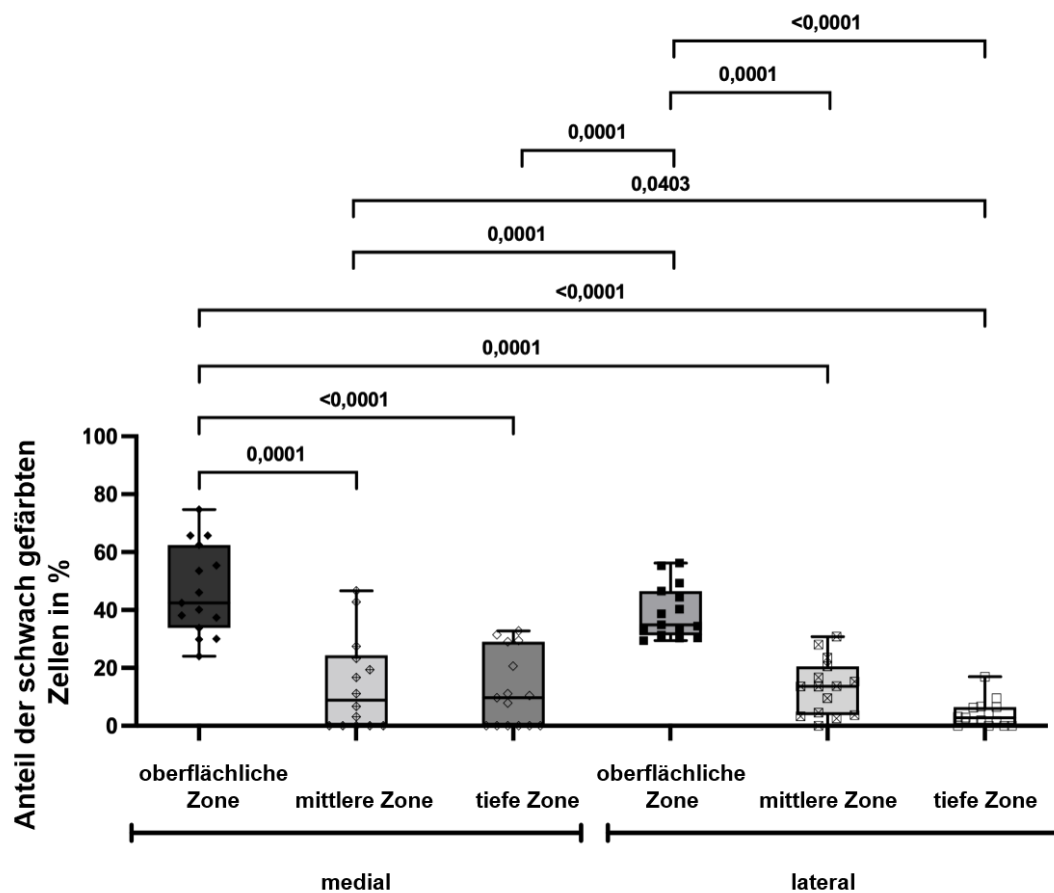


Abb. 35: Quantitative Auswertung der schwach PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15). Die oberflächlichen Zonen des medialen und lateralen Kompartiments zeigten einen signifikant ($p \leq 0,0001$) höheren Anteil schwach PLS3-positiver Zellen als die mittlere und tiefe Zone. Die Werte sind für die verschiedenen Zonen mittels Boxplots dargestellt. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Zonen wurden mittels ANOVA mit Messwiederholungen und des Duncan-Post-Hoc-Tests ermittelt ($p \leq 0,05$).

Insgesamt zeigte sich bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen von PLS3 eine Anfärbung von Chondrozyten über alle Regionen hinweg. Hierbei war der Großteil der PLS3-Expression in den Chondrozyten der oberflächlichen Knorpelzone beider Kompartimente lokalisiert. Diese Verteilung konnte sowohl für eine starke Expression als auch für eine schwächere Expression von PLS3 gezeigt werden. Interessanterweise konnte beim direkten Vergleich der oberflächlichen Knorpelzone des medialen Kompartiments mit der oberflächlichen Zone des lateralen Kompartiments gezeigt werden, dass das mediale Kompartiment sowohl über einen signifikant ($p=0,0032$, $p=0,0001$, $p<0,0001$) höheren Anteil von PLS3-positiven in Relation zu allen vorhandenen Zellen verfügte (Abb. 31), als auch einen signifikant ($p=0,0040$, $p=0,0001$, $p<0,0001$) höheren Anteil von stark angefärbten PLS3-positiven Zellen aufwies (Abb. 33). Analog zu den Beobachtungen bei der Verteilung und Expression von STIM1, zeigt sich also eine stärkere Ausprägung von PLS3 in den mechanisch beanspruchteren oberflächlichen Zonen der Knorpelschicht mit einer deutlichen Akzentuierung in der oberflächlichen Knorpelzone des medialen Kompartiments.

5. Diskussion

Eine Varusgonarthrose entsteht aufgrund eines suboptimalen Alignments von Tibia und Femur, welches zu einer varischen Beinachse und einer daraus resultierenden ungleichen Verteilung der mechanischen Kräfte im Kniegelenk zu Lasten der medialen Gelenkfläche führt (13, 133, 134). Folglich kommt es im Vergleich mit dem lateralen Kompartiment zu einer stärkeren Belastung und Degeneration des medialen Knorpelgewebes (12, 14). Durch die vorausgegangene varische Fehlbelastung der untersuchten Tibiaplateaus und der konsekutiv verstärkten mechanischen Belastung des medialen Kompartiments, wurde demnach ein höheres Maß der Knorpeldegeneration der medialen Gewebeproben erwartet. Diese Annahme konnte sowohl durch die morphologische Betrachtung der Knorpelproben, als auch durch die Bestimmung des OARSI-Scores der verschiedenen Knorpelproben bestätigt werden. Die Nutzung des OARSI-Scores zur Objektivierung von OA-assoziierten Knorpelschäden sowohl bei menschlichen als auch bei tierischen Gewebeproben wurde bereits in zahlreichen Studien validiert (143, 144, 145) und erwies sich somit als geeignete Methode zur Visualisierung und Analyse der unterschiedlich stark ausgeprägten Knorpelschädigungen. Es zeigte sich ein konsequent stärker ausgeprägter Grad der Knorpeldegeneration in den Regionen A, B und C des medialen Kompartiments in den Übersichtsfärbungen mit Safranin-O/fast-Green und in den erhobenen Werten des OARSI-Scores. Hierbei zeigte sich für jede der Regionen des medialen Kompartiments ein signifikant höherer OARSI-Score als für jede der Regionen des lateralen Kompartiments. Dies korreliert mit den Ergebnissen zahlreicher Studien, die eine medial stärker ausgeprägte Knorpeldegeneration durch eine varische Belastung der Gelenkfläche nachweisen konnten (13, 133, 134). Durch die morphologische Beurteilung der Übersichtsfärbungen sowie der Bewertung der Proben mittels des OARSI-Scores konnte deutlich gezeigt werden, dass das mediale Kompartiment der untersuchten Tibiaplateaus wie erwartet über ein mechanisch bedingtes höheres Ausmaß der Knorpeldegeneration verfügte als die Regionen E, F und G des lateralen Kompartiments. Die genutzten Plateaus lieferten demnach eine geeignete Grundlage für die Analyse der Verteilung und Expression der untersuchten Proteine TSP-1, TSP-5, STIM1 und PLS3 in Abhängigkeit der mechanischen Belastung durch einen direkten Vergleich unterschiedlich stark belasteter Knorpelregionen.

5.1 Thrombospondin-1 (TSP-1)

Die immunhistochemische Färbung von TSP-1 zeigte deutliche Unterschiede in der Expression und Lokalisation zwischen dem Gelenkknorpel des medialen und des lateralen Kompartiments. Die Färbung von TSP-1 war hierbei in allen Regionen des lateralen Kompartiments des Gelenkknorpels im Vergleich zu denen des medialen Kompartiments von stärkerer Intensität. Insgesamt wies die interterritoriale EZM des Gelenkknorpels in den lateralen Regionen E, F und G eine homogene Färbung auf, während in den oberflächlichen und mittleren Knorpelschichten ein reduzierter Nachweis von TSP-1 in der PZM detektiert werden konnte. In der tiefen Knorpelzone der anterioren (F) und zentralen (E) Region des lateralen Kompartiments konnte neben der interterritorialen Anfärbung der EZM zusätzlich eine perizelluläre Expression von TSP-1 festgestellt werden. Die Regionen des medialen Kompartiments wiesen hingegen keine oder lediglich eine leichte Färbung von TSP-1 im Bereich der EZM auf.

Diese Ergebnisse konnten auch in vorherigen wissenschaftlichen Studien gezeigt werden. So konnte festgestellt werden, dass TSP-1 unter physiologischen Verhältnissen vor allem in der EZM der mittleren sowie apikalen unteren Zone des Gelenkknorpels exprimiert ist (90). Weiterhin konnte in frühen OA-Stadien eine vermehrte Expression von TSP-1 vor allem im Bereich der mittleren PZM beobachtet werden, während bei starker OA-bedingter Knorpeldegeneration eine reduzierte Anfärbung von TSP-1 vorlag (90). Die Knorpelproben, die für die Erstellung der vorliegenden Arbeit genutzt wurden, verfügten in den Regionen des medialen Kompartiments über stark ausgeprägte OA-assoziierte Veränderungen und zeigten eine reduzierte Färbung von TSP-1 im Vergleich zu den Regionen des lateralen Kompartiments. Die Regionen des lateralen Kompartiments hingegen wiesen durch die varische Fehlbelastung der Gelenkflächen lediglich geringe OA-Stadien auf und zeigten vorrangig in den mittleren und unteren Zonen des Gelenkknorpels eine vermehrte Expression von TSP-1. Eine vermehrte Expression von TSP-1 in von OA-betroffenem Knorpelgewebe konnte ebenfalls in vorangegangenen Studien festgestellt werden (91). Zudem konnte gezeigt werden, dass im Rahmen einer Inflammation wie bei der OA durch ein verstärktes Auftreten von Entzündungsmediatoren eine erhöhte Quantität von TSP-1 nachgewiesen werden konnte (90, 146).

TSP-1 verfügt über eine Reihe von Eigenschaften, die bei der Pathogenese der OA hemmend auf ein weiteres Fortschreiten der Knorpeldegeneration wirken können. Zum einen wirkt TSP-1 antiangiogen und antinflammatorisch (92, 93) und verhindert eine übermäßige Ossifikation im Rahmen kartilaginärer Reparaturvorgänge (95). Zum anderen konnte experimentell gezeigt werden, dass TSP-1 hemmend auf den Fortschritt von OA wirken kann, indem es die Dichte

von Mikrogefäßen, die Makrophageninfiltration und die IL-1 β -Level im Gewebe reduziert (94). Einen zusätzlichen protektiven Effekt im Rahmen der Pathogenese der OA bietet TSP-1 anhand der Fähigkeit, die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zugunsten der chondrogenen Zellreihe zu beeinflussen (147). Eine vermehrte Expression von TSP-1 bei beginnender Knorpeldegeneration lässt sich also als physiologische Reaktion auf den inflammatorischen Reiz früher OA-assoziierten Veränderungen interpretieren, um einen Fortschritt der Degeneration des Gelenkknorpels zu verhindern. Hierbei können erhöhte TSP-1-Level sowohl eine schädigende Neoangiogenese verhindern, als auch eine Bildung von Ossifikationen im Sinne einer Defektheilung inhibieren. Die Lokalisation von TSP-1 im Bereich der PZM lässt hierbei den Rückschluss zu, dass TSP-1 über verschiedene, zellständige Rezeptoren unmittelbar zelluläre Vorgänge beeinflusst (93, 95, 148). Der Grund für die reduzierte Expression von TSP-1 bei starken Formen der OA wurde in Kaninchen-Chondrozyten durch eine vermehrte Synthese von IL-1 begründet, welche die TSP-1-Expression hemmt (149). Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der bei einer stärkeren Knorpeldegeneration der Regionen des medialen Kompartiments eine signifikant reduzierte TSP-1-Expression nachgewiesen werden konnte.

5.2 Thrombospondin-5 (TSP-5)

Die immunhistochemischen Färbungen von TSP-5 zeigten lediglich leichte Unterschiede zwischen dem Gelenkknorpel des medialen und lateralen Kompartiments. Vor allem in der zentralen Region (E) des lateralen Kompartiments fiel hierbei eine akzentuierte perizelluläre Expression von TSP-5 in der oberflächlichen Zone des Knorpelgewebes auf. Zudem zeigte sich eine vermehrte Expression von TSP-5 in der EZM der oberflächlichen Zone in der zentralen (A) und posterioren (C) Region des medialen Kompartiments, während die oberflächliche Knorpelzone der anterioren Region (B) des medialen Kompartiments einen nicht-gefärbten, schmalen Saum im apikalen Bereich des Gewebes aufwies. Alle Regionen sowohl des medialen als auch des lateralen Kompartiments zeigten in der tiefen Zone des Knorpelgewebes eine Abnahme der Färbung von TSP-5 im Bereich der EZM.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass es zu einer Abnahme von TSP-5 in mäßig von OA betroffenen Gelenkknorpel und schließlich zu einer perizellulär stärkeren Expression von TSP-5 in stark von OA betroffenen Gelenkknorpel kommt (108). Dies wurde als Anpassung auf eine verstärkte mechanische Belastung des Knorpelgewebes gedeutet, die der weiteren Degradierung der EZM vorbeugen soll (109). Die im Rahmen dieser Arbeit

beobachtete verstärkte perizelluläre Anfärbung von TSP-5 in der zentralen Region (E) des lateralen Kompartiments könnte ebenfalls als Hochregulierung gedeutet werden und deckt sich demnach mit bereits bestehenden Erkenntnissen in der Literatur. Da diese vermehrte Expression aber vor allem für stark von OA betroffenem Gewebe vorbeschrieben ist, wurde eine verstärkte Färbung von TSP-5 im Rahmen dieser Arbeit eher in den Regionen des medialen Kompartiments erwartet. Dies konnte lediglich in der oberflächlichen Knorpelzone der zentralen und posterioren Region (A und C) des medialen Kompartiments beobachtet werden. Dass eine vermehrte Expression von TSP-5 bei OA vor allem in den oberflächlichen Knorpelzonen stattfindet, ist im Einklang mit früheren wissenschaftlichen Erkenntnissen und wurde durch eine mögliche Induktion einer chondrozytären Repopulation geschädigter Knorpelareale durch TSP-5 begründet (150). Die anderen Knorpelzonen sowie der Gelenkknorpel der anterioren Region (B) des medialen Kompartiments wiesen jedoch eher eine schwache Färbung auf, welche vor allem bei leichten OA-Stadien gezeigt wurde (108). Auch die Tatsache, dass TSP-5-Spiegel im Serum in zahlreichen Studien proportional steigend mit dem Grad der vorliegenden OA gemessen werden konnten (103, 104, 105, 106), widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da beim direkten Vergleich des medialen und lateralen Kompartiments morphologisch keine prägnante Mehrexpression in den Regionen des medialen Kompartiments im Vergleich mit den Regionen des lateralen Kompartiments detektiert werden konnte. Dies könnte darin begründet sein, dass das Knorpelgewebe des lateralen Kompartiments ebenfalls von den pathogenen und inflammatorischen Vorgängen der stark ausgeprägten OA des medialen Kompartiments betroffen war und bereits eine erhöhte Expression von TSP-5 stattgefunden hat. Da eine erhöhte Expression von TSP-5 reaktiv auf degenerative Vorgänge als vorbeugender Respons zum Schutz einer weiteren Degradation des Knorpelgewebes interpretiert wurde (109), könnte dies auch bereits im lateralen Kompartiment als prophylaktische Reaktion geschehen sein, welche durch die aggravierten OA-assoziierten Veränderungen des medialen Kompartiments induziert wurde. Das Kniegelenk muss hierbei als vollständige Einheit gesehen werden, welche in sich nicht strikt in lateral und medial trennt. Diese Annahme könnte durch die Nutzung gesunder, humaner Knorpelproben als Kontrollgruppe überprüft werden, was jedoch aufgrund ethischer Gründe nicht durchführbar war.

Der TSP-5-Score zeigte außerdem keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen des medialen und lateralen Kompartiments. Dies könnte einer suboptimalen Wahl des Scoring-Verfahrens geschuldet sein; es ist möglich, dass das gewählte Scoring-Verfahren nicht sensitiv genug war, um die subtilen Unterschiede der TSP-5-Expression zwischen den medialen und lateralen Kompartimenten zu detektieren. Zudem bezog sich das Scoring-Verfahren lediglich auf die Parameter des Ausmaßes („*Extend*“) und der Intensität („*Intensity*“)

der Anfärbungen und berücksichtigte nicht die genaue Lokalisation der Färbung innerhalb der verschiedenen Bereiche der EZM. Subtile Änderungen der Lokalisation von TSP-5 bei den unterschiedlichen OA-Stadien, die aber über ein ähnliches Ausmaß und eine vergleichbare Intensität der Anfärbung verfügten, wurden von diesem Score dementsprechend nicht detektiert. Außerdem ist es denkbar, dass durch eine bereits erhöhte Expression von TSP-5 im lateralen Kompartiment, ausgelöst durch die pathogenetischen Vorgänge im medialen Kompartiment, keine signifikanten Unterschiede mittels des Scoring-Verfahrens detektiert werden konnten. Da zuvor im Rahmen von Studien gezeigt werden konnte, dass es bei OA zu einer insgesamt vermehrten Expression von TSP-5 kommt (108, 109), kann die fehlende Signifikanz der Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Inkompatibilität des gewählten Scoring-Verfahrens mit der spezifischen Expressionsverteilung von TSP-5 innerhalb des arthrotischen Knorpelgewebes hindeuten. Die Durchführung eines Western Blots wäre hilfreich, um die quantitativen Unterschiede der Expression von TSP-5 im medialen und lateralen Kompartiment differenzierter herauszustellen. Erschwerend kommt hinzu, dass das Scoring-Verfahren für diese Arbeit erstellt wurde und somit nicht direkt übertragbar auf die Vorgehensweise vorangegangener wissenschaftlicher Betrachtungen der Expression von TSP-5 bei verschiedenen OA-Stadien ist, welche vor allem mittels quantifizierbarer Methoden wie Western Blot (108, 109) oder ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, 103, 105) durchgeführt wurden.

5.3 *Stroma interaction molecule 1 (STIM1)*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine starke Färbung von STIM1 in der oberflächlichen Knorpelzone nachgewiesen werden. Dies konnte sowohl im medialen als auch im lateralen Kompartiment gezeigt werden, wobei im Gelenkknorpel der Regionen des medialen Kompartiments eine deutlich intensivere Färbung von STIM1 in den Chondrozyten vorhanden war. Dies spiegelte sich auch in der statistischen Auswertung wider, in der die Regionen des medialen Kompartiments über signifikant mehr STIM1-positive Chondrozyten verfügten und zusätzlich eine stärkere Färbung von STIM1 in der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels aufwiesen als die Regionen des lateralen Kompartiments.

Das in der ER-Membran gelegene STIM1 reguliert über die Interaktion mit ORAI1-Ionenkanälen in der Zellmembran den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel (110). Bei einer Erschöpfung der Ca^{2+} -Speicher im ER der Zelle kommt es zu einer vermehrten Aktivierung und einer Konformationsänderung von STIM1 (111), welche im Rahmen des SOCE (*store*

operated-Ca²⁺ entry) über CRACs (*Ca²⁺-release activated Ca²⁺-Channels*) zu einem Influx von extrazellulärem Ca²⁺ mit dem Ziel einer erneuten Saturierung des intrazellulären Ca²⁺-Speichers führt (112). Interessanterweise reagieren Chondrozyten auf mechanische Stimuli im Rahmen des *Ca²⁺-Signalings* primär mit einer Veränderung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels (80). Außerdem konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung über die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle, wie dem TRPV4-Kanal, zu einer erhöhten Verschiebung von extrazellulärem Ca²⁺ nach intrazellulär führt (81, 82). Es könnte somit spekuliert werden, dass die vermehrte Expression von STIM1 in der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels und die höhere Anzahl STIM1-positiver Chondrozyten in den Regionen des medialen Kompartiments darauf hindeutet, dass bei der Pathogenese der OA Ca²⁺-abhängige zelluläre Mechanismen der Mechanotransduktion eine Rolle spielen. Vorangegangene Untersuchungen deuten außerdem auf eine Stimulierung kataboler Mechanismen in Chondrozyten im Rahmen eines veränderten *Ca²⁺Signaling* hin (151). Zudem konnte gezeigt werden, dass durch eine Störung des SOCE die Proliferation von Chondrozyten entschieden gestört wird (115, 116). STIM1 scheint also durch die Regulierung des SOCE entscheidend Einfluss auf physiologische intrazelluläre Signalwege mittels Ca²⁺-Ionen zu nehmen. Eine Hochregulierung von STIM1 in den Chondrozyten in stark mechanisch beanspruchtem Knorpelgewebe kann demnach als Folge von mechanischer Belastung und der Entwicklung von OA interpretiert werden. Die Tatsache, dass in den stärker mechanisch beanspruchten oberflächlichen Zonen des Gelenkknorpels in den Regionen des medialen Kompartiments eine signifikant höhere Expression von STIM1 detektiert werden konnte als in den weniger stark mechanisch beanspruchten Regionen des lateralen Kompartiments, stützt diese These.

5.4 Plastin-3 (PLS3)

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten eine intrazelluläre Expression von PLS3 in den Chondrozyten aller Regionen der Tibiaplateaus, wobei eine deutlich höhere Anzahl PLS3-positiver Chondrozyten in der oberflächlichen Knorpelzone nachgewiesen werden konnte. Beim Vergleich des medialen mit dem lateralen Kompartiment zeigte sich analog zu den Expressions- und Verteilungsmustern von STIM1 eine prozentual häufigere und signifikant stärkere Anfärbung von PLS3 in den Chondrozyten der Regionen des medialen Kompartiments.

Dies kann als Zusammenhang zwischen PLS3 und den mechanosensitiven Vorgängen im Gewebe interpretiert werden, die im medialen Kompartiment durch eine verstärkte mechanische Belastung entsprechend vermehrt induziert wurden. Dieses Erkenntnis deckt sich

mit den Ergebnissen vorangegangener Studien, die eine vermehrte Expression von PLS3 in isolierten Chondrozyten aus von OA betroffenem Gewebe beschrieben haben (131). PLS3 konnte in verschiedenen Zellen des Knochengewebes nachgewiesen werden; so konnte gezeigt werden, dass PLS3 in Osteoblasten (137), Osteoklasten (129) und Osteozyten (138) exprimiert wird und einen Einfluss auf die resorptive Funktion von Osteoklasten (129) und die Mechanosensitivität von Osteozyten (126) hat. Außerdem konnten PLS3-Mutationen ursächlich mit verschiedenen Knochenerkrankungen wie verschiedenen Osteoporoseformen (126, 127, 128) in Verbindung gebracht werden. Die Rolle und Funktion von PLS3 in humanem Knorpelgewebe ist bisher jedoch noch nicht im Detail verstanden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass PLS3 über seine Fähigkeit, Aktinfilamente zu binden und zu bündeln (121) und damit als Einfluss auf die Struktur des Zytoskeletts der Zelle zu nehmen, wesentlich an mechanosensitiven, intrazellulären Vorgängen beteiligt ist (152). Studien gehen zudem davon aus, dass PLS3 Signale der Mechanotransduktion beeinflussen kann (126). Die Tatsache, dass PLS3 im Rahmen dieser Arbeit vor allem in den oberflächlich gelegenen Knorpelbereichen nachgewiesen werden konnte, die starken mechanischen Einflüssen ausgesetzt waren, stützt diese These. Zusammenfassend erscheint es also schlüssig, dass PLS3 nicht nur im Knochengewebe (126), sondern auch im Knorpelgewebe an mechanosensitiven Vorgängen beteiligt ist und an den pathogenetischen Signalwegen der OA beteiligt ist.

5.5 Abhängigkeit der Expressions- und Verteilungsmuster der untersuchten Proteine von mechanischer Belastung

Sowohl für TSP-1 als auch für STIM1 und PLS3 konnte eine unterschiedliche Verteilung der Expression und Lokalisation bei einem direkten Vergleich des medialen und lateralen Kompartiments gezeigt werden.

TSP-1 zeigte hierbei eine reduzierte Expression im Gelenkknorpel des mechanisch stärker beanspruchten medialen Kompartiments und eine signifikant höhere Expression in dem mechanisch geringer beanspruchten lateralen Kompartiment. Innerhalb des medialen Kompartiments zeigten sich Abstufungen der erhobenen TSP-1-Scores mit der signifikantesten Reduktion in der zentralen Region (A) und einem signifikant höheren TSP-1-Score in der anterioren Region (B) des medialen Kompartiments. Insgesamt könnte dies für eine antiproportionale Abhängigkeit der TSP-1-Expression von mechanischer Belastung sprechen, welche im lateralen Kompartiment zu einer stärkeren Expression von TSP-1 im

Vergleich zum medialen Kompartiment führt. Diese Erkenntnis deckt sich mit der entsprechenden Literatur (90, 91). Die Abstufungen im medialen Kompartiment könnten dementsprechend für eine ungleiche Verteilung der Belastung im Sinne einer vor allem zentral akzentuierten Varusgonarthrose sprechen. Dies würde einer medialen Mehrbelastung zu Lasten vor allem der zentralen Region (A) entsprechen. Diese Erkenntnisse korrelieren mit Studien, welche einen Beginn der Varusgonarthrose vor allem im zentralen Bereich des medialen Tibiaplateaus mit einer konsekutiven Ausbreitung der Knorpeldegradierung in anteriore und posteriore Bereiche beobachtet haben (134). Dieser These widerspricht allerdings, dass der im Rahmen dieser Arbeit erhobene OARSI-Score keine signifikant höheren Werte der zentralen Region (A) des medialen Kompartiments gegenüber der anterioren (B) und posterioren (C) Region zeigte.

STIM1 und PLS3 zeigen jeweils eine deutlich höhere Expression in der oberflächlichen Zone des Gelenkknorpels bei einem Vergleich der verschiedenen Knorpelzonen. Hierbei zeigt sich für beide Proteine eine signifikant stärkere Expression im mechanisch stärker beanspruchten medialen Kompartiment. Die Expression und Verteilung von STIM1 lässt den Schluss zu, dass diese abhängig von mechanischer Belastung ist und STIM1 dementsprechend an mechanosensitiven Vorgängen beteiligt sind. Gestützt wird diese These durch Literatur, welche die Relevanz von STIM1 im Rahmen des intrazellulären Ca^{2+} Signaling zeigen konnte (110, 112), den Einfluss dieser STIM1-induzierten Vorgänge auf Chondrozyten nachweisen konnte (115, 116) sowie den Zusammenhang mechanosensitiver Vorgänge mit Änderungen des Ca^{2+} -Spiegels (81, 82) belegten. Das in dieser Arbeit gezeigte gleichartige Lokalisationsmuster von STIM1 und PLS3 legt die Vermutung nahe, dass neben STIM1 auch die Expression und Verteilung von PLS3 abhängig ist von unterschiedlicher mechanischer Beanspruchung des Knorpelgewebes. Zudem gibt die bestehende Fachliteratur Hinweise auf eine bedeutsame Rolle von PLS3 im Rahmen mechanosensitiver Vorgänge aufgrund seiner Eigenschaft, Ca^{2+} -abhängig Aktinfilamente zu binden und zu bündeln und so Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts zu nehmen (121). Dadurch wird PLS3 ebenfalls eine Beteiligung an grundlegenden Mechanismen der Mechanotransduktion zugeschrieben (152). Da eine fehlerhafte Mechanotransduktion einen essentiellen Faktor in der Entwicklung von OA darstellt (153, 154), liegt nahe, dass zwischen der Expression von PLS3 und der Pathogenese der OA ein direkter Zusammenhang besteht. Allerdings scheinen sowohl verminderte als auch erhöhte PLS3-Level mit der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen assoziiert zu sein (155); ein Vorliegen verschiedener PLS3-Mutationen und der Verlust physiologischen PLS3s konnte im Rahmen verschiedener (126, 127, 128) Osteoporoseformen als Auslöser der Erkrankung detektiert werden, während erhöhte PLS3-Spiegel in OA-Chondrozyten nachgewiesen werden konnten (131).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikant stärkere Expression von TSP-5 im medialen oder lateralen Kompartiment nachgewiesen und somit keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf eine unterschiedlich starke mechanische Belastung gezeigt werden. Diesem Ergebnis widersprechen jedoch vorangegangene Studien, die zeigen, dass mechanische Stimuli zu einer gesteigerten Expression von TSP-5 führen (97). Eine solche verstärkte Expression von TSP-5 konnte im Rahmen dieser Arbeit morphologisch vor allem in den oberflächlichen Knorpelschichten detektiert werden, wobei dies sowohl in der zentralen Region (E) des lateralen Kompartiments als auch in der zentralen (A) und posterioren (C) Region des medialen Kompartiments gezeigt werden konnte. Der Reexpression von TSP-5 im Rahmen von OA-assoziierten Veränderungen wird eine schützende Funktion für das Knorpelgewebe zugeschrieben; zum einen gibt es Hinweise darauf, dass TSP-5 einer weiteren Degradierung des Gewebes vorbeugen soll (109). Andererseits konnte gezeigt werden, dass TSP-5 eine Repopulation geschädigter Knorpelareale mit Chondrozyten begünstigt und die Synthese von Kollagen II, IX und XII sowie von PGs induziert (150) und so Anteil an reparativen Prozessen in degradiertem Knorpelgewebe hat. Insgesamt erscheint es also sinnvoll, dass TSP-5 vorrangig in stark mechanisch beanspruchten Bereichen des Knorpelgewebes exprimiert wird, auch wenn dies mit den genutzten Methoden dieser Arbeit nicht eindeutig gezeigt werden konnte.

5.6 Kolokalisationen von TSP-1, TSP-5, STIM1 und PLS3

Die Proteine STIM1 und PLS3 zeigten gleichartige Verteilungsmuster sowohl beim Vergleich der unterschiedlichen Knorpelzonen als auch beim Vergleich der Regionen des medialen Kompartiments mit den Regionen des lateralen Kompartiments. Für beide Proteine konnte eine vermehrte Expression in den oberflächlichen Knorpelzonen aller Regionen beider Kompartimente gezeigt werden. Außerdem wiesen die Regionen A, B und C des medialen Kompartiments eine signifikant stärkere Expression sowohl von STIM1 als auch von PLS3 auf als die Regionen E, F und G des lateralen Kompartiments.

Die Thrombospondine TSP-1 und TSP-5 zeigten unterschiedliche, fast entgegengesetzte Färbemuster beim Vergleich des medialen und lateralen Kompartiments und der unterschiedlichen Knorpelzonen. Die Expression von TSP-5 zeigte eine homogene Färbung der EZM und keine signifikanten Unterschiede im Vergleich des medialen mit dem lateralen Kompartiment. TSP-1 zeigte hingegen eine stärkere Expression in den Regionen des lateralen Kompartiments im Vergleich mit dem medialen Kompartiment. Zusätzlich wies TSP-5 eine stärkere Expression in der PZM der oberflächlichen Knorpelzone auf, während die Färbung

von TSP-5 vor allem im Bereich der EZM in der tiefen Knorpelzone abnahm. Die Expression von TSP-1 beschränkte sich hingegen auf die PZM in den tiefen und mittleren Knorpelzonen des lateralen Kompartiments und nahm in der oberflächlichen Knorpelzone ab.

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass die Interaktion von TSP-5 mit STIM1 regulierend auf die Aktivierung der CRACs wirkt und so einen Einfluss auf den Ca^{2+} -Influx hat (119). Eine vermehrte Expression von TSP-5 und STIM1 in den oberflächlichen Zonen des Gelenkknorpels beider Kompartimente könnte dementsprechend mit einer möglichen direkten Interaktion dieser beiden Proteine einhergehen. Die deutliche perizelluläre Expression von TSP-1 fand sich hingegen vor allem in der mittleren und tiefen Knorpelzone. Außerdem ist TSP-1 in den Regionen des medialen Kompartiments in einem geringeren Maß nachweisbar als in den Regionen des lateralen Kompartiments und stimmt daher nicht mit den übrigen untersuchten Proteinen überein. Im Vergleich zu der Expression von STIM1 und PLS3 scheint demnach keine Korrelation der Expression von TSP-1 zu bestehen, sondern eher ein antiproportionales Verhältnis vorzuherrschen. Ob dies eine Aussage über eine gegensätzliche Funktion im Rahmen pathogenetischer, OA-assoziiierter Vorgänge der einzelnen Proteine zulässt, lässt sich alleine aufgrund dieser Arbeit nicht eruieren. Eine direkte Interaktion scheint allerdings aufgrund der disproportionalen Verteilung von TSP-1 im Vergleich mit STIM1 und PLS3 unwahrscheinlich. Über eine mögliche Interaktion von PLS3 mit den übrigen untersuchten Proteinen bestehen bisher so gut wie keine wissenschaftlichen Erkenntnisse. Ebenso ist die Funktion und Interaktion von STIM1 und PLS3 in humanem Knorpelgewebe bisher aufgrund einer unzureichenden Studienlage noch größtenteils ungeklärt. Die in dieser Arbeit gezeigte analog zu STIM1 auftretende Mehrexpression von PLS3 in den oberflächlichen Knorpelzonen, mit einer deutlichen Betonung des medialen Kompartiments, sowie die Interaktion beider Proteine mit Ca^{2+} -Ionen (110, 121), bietet jedoch einen vielversprechenden Ansatzpunkt für eine detaillierte Untersuchung des Zusammenspiels dieser beiden Proteine. Zusätzlich bildet die intrazelluläre Lokalisation beider Proteine in den Chondrozyten der oberflächlichen Knorpelschichten eine Gemeinsamkeit, die auf eine mögliche funktionale Analogie oder zumindest auf symbiotische funktionale Aspekte von STIM1 und PLS3 im Rahmen pathogenetischer Vorgänge bei der OA hinweisen könnte.

5.7 Kritische Analyse der angewandten Verfahren

Für die Untersuchung der Expression der verschiedenen Proteine wurden Tibiaplateaus genutzt, die aufgrund der variablen Fehlbelastung unterschiedliche Grade der

Knorpeldegeneration aufwiesen. Die Gewebeproben des lateralen Kompartiments waren hierbei zwar einer geringeren mechanischen Belastung ausgesetzt, aufgrund der persistierenden Teilbelastung waren jedoch auch hier OA-assoziierte Veränderungen zu detektieren, wenngleich in deutlich geringerem Ausmaß als bei den Knorpelproben des medialen Kompartiments. Für eine höhere Aussagekraft der Ergebnisse müsste hingegen optimalerweise vollständig gesundes humanes Knorpelgewebe mit degeneriertem Knorpelgewebe verglichen werden, um den verschiedenen OA-assoziierten Veränderungen physiologische Verhältnisse gegenüber stellen zu können. Aufgrund ethischer Bedenken ist es jedoch nicht realisierbar, gesunde humane Knorpelgewebeproben als Kontrollgruppe heranzuziehen. Zusätzlich war nicht bei jeder Gewebeprobe eindeutig festzustellen, ob die oberste Knorpelschicht der Gewebeschnitte der ursprünglich oberflächlichen Knorpelzone entsprach. Grund hierfür ist ein eventueller Verlust der oberflächlichen Knorpelschicht im Verlauf der OA-Entwicklung in vivo. Die vermehrte Expression von STIM1 und PLS3 in den oberflächlichen Knorpelzonen ist trotzdem als interessant zu deuten, da ungeachtet der physiologischen Zoneneinteilung des Knorpels eine Hochregulierung dieser Proteine im oberen, der stärksten mechanischen Kraft ausgesetzten Bereiches des Knorpels stattfand und demnach gleichwohl als Hinweis auf eine Beteiligung von STIM1 und PLS3 an mechanosensitiven Vorgängen interpretiert werden kann.

Die Bewertung der Knorpelschnitte mittels des OARSI-Scores erwies sich in zahlreichen Untersuchungen als valide und sensitive Methode (143, 144, 145, 156), um OA-assoziierte Veränderungen von Knorpelgewebe zu beurteilen. Bei der Durchführung des OARSI-Scorings im Rahmen dieser Arbeit fiel jedoch auf, dass bei der Einteilung der verschiedenen OA-Stadien nicht eindeutig war, welches Ausmaß der Schädigung nun den ausschlaggebenden Faktor in der Bestimmung des Stadiums darstellte, wenn mehrere Schädigungsgrade vorhanden waren. Diese Schwachstelle des OARSI-Scoring-Verfahrens hatte zuvor bereits Erwähnung in der Fachliteratur gefunden (157). Im Rahmen dieser Arbeit wurde schließlich festgelegt, dass stets das Ausmaß des höheren Grades der Knorpelschädigung determinierend für die Vergabe des Stadiums sein sollte. Diese Prämisse wurde konsequent bei der Durchführung des Scorings eingehalten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten. Außerdem wurde eine doppelte Durchführung des OARSI-Scores von zwei unabhängigen Untersuchern umgesetzt, um eine mögliche Ergebnisverzerrung zu verhindern. Zusätzlich wurde die intrapersonelle Variabilität der Erstuntersucherin ausgewertet, indem das OARSI-Scoring zu einem späteren Zeitpunkt stichprobenartig für verschiedenen Gewebeschnitte wiederholt und mit den ursprünglichen Scoring-Ergebnissen verglichen wurde.

Eine weitere Schwachstelle der vorliegenden Arbeit stellt die fehlende Vergleichbarkeit der Scores von TSP-1 und TSP-5 mit wissenschaftlicher Fremdliteratur dar. Für TSP-1 konnten dessen ungeachtet Ergebnisse erzielt werden, die sich mit bestehender Fachliteratur decken. Für TSP-1 scheint das gewählte Scoring-Verfahren demnach geeignet zu sein. Es müssten weitere Untersuchungen mit diesem Verfahren durchgeführt werden, um die Validität und Sensitivität endgültig bewerten zu können. Für die Expression von TSP-5 erwies sich der Score hingegen als nicht richtungsweisend, da keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen oder der Gesamtheit der Regionen im medialen Kompartiment verglichen mit dem lateralen Kompartiment gezeigt werden konnten. Wie bereits diskutiert, könnte dies der suboptimalen Wahl der Parameter „*Extend*“ und „*Intensity*“ geschuldet sein, welche zwar die rein quantitative Änderung von Ausmaß und Intensität der Anfärbung messen, jedoch keine Differenzierung zwischen der unterschiedlichen Anfärbung verschiedener Kompartimente innerhalb des Knorpelgewebes vornehmen. Außerdem ist es möglich, dass der angewendete Score für die Quantifikation von TSP-5 nicht sensibel genug war. Dies hätte mithilfe eines quantitativen Verfahrens wie beispielsweise der zusätzlichen Durchführung eines Western Blots überprüft werden können.

5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von STIM1, PLS3 und TSP-1 abhängig von unterschiedlich stark einwirkender mechanischer Belastung auf das artikuläre Knorpelgewebe ist.

Hierbei zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression der Ca^{2+} -abhängigen, mit dem Zytoskelett verbundenen Proteine STIM1 und PLS3 in der oberflächlichen Knorpelzone des medialen Kompartiments. Die Expression von STIM1 und PLS3 verhält sich dementsprechend proportional zur mechanischen Belastung und dem OA-Stadium. Dies deutet auf eine Beteiligung Ca^{2+} -abhängiger *second-messenger*-Mechanismen in Verbindung mit dem mechanosensitiven Aktinskelett von Chondrozyten bei der zellulären Pathogenese der OA hin. Ob eine direkte Interaktion zwischen STIM1 und PLS3 besteht, ist durch diese Arbeit nicht zu eruieren. Es gibt jedoch aufgrund der analogen Expressionsmuster und der intrazellulären Lage der Proteine, sowie der Interaktion beider Proteine mit Ca^{2+} -Ionen zumindest vielversprechende Hinweise auf mögliche funktionale Analogien oder Zusammenhänge von STIM1 und PLS3 im Rahmen pathogenetischer Vorgänge der OA. Weitere Studien wären nötig, um dies genauer zu untersuchen.

Für TSP-1 konnte eine deutliche Reduzierung der Expression im Bereich des stärker

mechanisch belasteten medialen Kompartiments gezeigt werden. Dies steht im Einklang mit vorangehenden Untersuchungen und Literatur und kann auf eine Inhibierung der TSP-1-Expression im Rahmen pathogenetischer Vorgänge der OA hindeuten. Außerdem konnte eine vermehrte Expression bei den geringeren OA-Stadien des lateralen Kompartiments nachgewiesen werden. Dies kann als physiologische Reaktion interpretiert werden, die einer fortschreitenden Degeneration des Knorpelgewebes entgegenwirken soll. Um ein detaillierteres Verständnis über die genauen Zusammenhänge bezüglich der Rolle von STIM1, PLS3 und TSP-1 bei der Entwicklung von OA zu erlangen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

TSP-5 zeigte lediglich subtile Veränderungen beim Vergleich der unterschiedlich stark belasteten Kompartimente. Es konnte allerdings eine verstärkte Expression von TSP-5 in den oberflächlichen Knorpelzonen sowohl einzelner Regionen des lateralen als auch des medialen Kompartiments nachgewiesen werden, was als eine Beteiligung von TSP-5 an reparativen Vorgängen bei einer Schädigung des Knorpelgewebes bei OA gedeutet werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen allerdings nur teilweise im Einklang mit bestehenden wissenschaftlichen Erkenntnissen, die eine prägnante Reexpression von TSP-5 vor allem in stark von OA betroffenem Gewebe zeigen konnten. In dieser Arbeit konnte jedoch keine signifikant vermehrte Expression von TSP-5 im stärker mechanisch belasteten medialen Kompartiment im Vergleich zum lateralen Kompartiment festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte die bereits in vivo stattgefundenene Hochregulierung von TSP-5 im lateralen Kompartiment sein, welche durch die pathogenetischen Vorgänge im medialen Kompartiment induziert worden sind, mit dem Ziel frühzeitig einer weiteren Degradierung des Knorpelgewebes entgegen zu wirken.

Insgesamt geben die Ergebnisse dieses Promotionsprojektes eindeutige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Pathogenese der OA und dem mechanosensitiven Protein TSP-1 sowie den Ca^{2+} -abhängigen Proteinen STIM1 und PLS3, welche durch ihre Verbindung mit dem Aktinskelett der Chondrozyten ebenfalls an mechanosensitiven Vorgängen beteiligt sind. Die Erkenntnisse dieser Arbeit können neue Ansatzpunkte für Untersuchungen hinsichtlich des Verständnisses der Pathogenese der OA und somit auch relevanter neuer Diagnostik- und Therapieansätze bieten, mit dem Ziel, zukünftig eine kausale Behandlung OA-assoziierter Veränderungen zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

1. Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; **23**(8): 1233-41.
2. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, Sowers M, McAlindon T, Spector TD, Poole AR, Yanovski SZ, Ateshian G, Sharma L, Buckwalter JA, Brandt KD, Fries JF. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 2000; **133**(8): 635–46.
3. Felson DT. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Epidemiol Rev.* 1988; **10**: 1-28.
4. Rabenberg M. Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Robert Koch-Inst.* 2013, **54**: 14-16.
5. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im Auftrag des Bundesministeriums für Gesundheit (BMG) unter Beteiligung der Arbeitsgruppe ICD des Kuratoriums für Fragen der Klassifikation im Gesundheitswesen (KKG). ICD-10-GM Version 2021, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme. <https://www.icd-code.de/icd/code/M15-M19.html> (Zuletzt abgerufen am 22.10.2021)
6. Herold G. Innere Medizin. Köln: Gerd Herold Verlag, 2021.
7. Michael JWP, Schlüter-Brust KU, Eysel P. Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik und Therapie der Gonarthrose. *Dtsch Arztebl Int.* 2010; **107**(9): 152-62.
8. Yucesoy B, Charles LE, Baker B, Burchfiel CM. Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: a review. *Work* 2015; **50**(2): 261-73.
9. Jiang L, Tian W, Wang Y, Rong J, Bao C, Liu Y, Zhao Y, Wang C. Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis, *Joint Bone Spine* 2012; **79**(3): 291-7.
10. Grässel S, Muschter D. Recent advances in the treatment of osteoarthritis. *F1000Res.* 2020; **9**: F1000 Faculty Rev-325.
11. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013; **39**(1): 1-19.
12. Eckstein F, Wirth W, Hudelmaier M, Stein V, Lengfelder V, Cahue S, Marshall M, Prasad P, Sharma L. Patterns of femorotibial cartilage loss in knees with neutral, varus, and valgus alignment. *Arthritis Care and Research* 2008; **59**(11): 1563-70.
13. Van Rossom S, Wesseling M, Smith CR, Thelen DG, Vanwanseele B, van Assche D, Jonkers I. The influence of knee joint geometry and alignment on the tibiofemoral load distribution: A computational study. *Knee* 2019; **26**(4): 813-23.

14. Teichtahl AJ, Cicuttini FM, Janakiraman N, Davis SR, Wluka AE. Static knee alignment and its association with radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; **14**(9): 958-62.
15. Brouwer GM, van Tol AW, Bergink AP, Belo JN, Bernsen RMD, Reijman M, Pols HAP, Bierma-Zeinstra SMA. Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**(4): 1204-11.
16. Xia B, Chen D, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int.* 2014; **95**(6): 495–505.
17. Spector TD, Hart DJ, Byrne J, Harris PA, Dacre JE, Doyle DV. Definition of osteoarthritis of the knee for epidemiological studies. *Ann Rheum Dis.* 1993; **52**(11): 790–4.
18. Kellgren JH. Radiological signs of rheumatoid arthritis; a study of observer differences in the reading of hand films. *Ann Rheum Dis.* 1956; **15**(1): 55-60.
19. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957; **16**(4): 494–502.
20. Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis. *Acta Med Port.* 2015; **28**(1): 99-106.
21. Nieminen MT, Casula V, Nevalainen MT, Saarakkala S. Osteoarthritis year in review 2018: imaging. *Osteoarthritis Cartilage* 2019; **27**(3): 401-11.
22. Sayre EC, Guermazi A, Esdaile JM, Kopec JA, Singer J, Thorne A, Nicolaou S, Cibere J. Associations between MRI features versus knee pain severity and progression: data from the Vancouver longitudinal study of early knee osteoarthritis. *PLoS One* 2017; **12**(5): e0176833.
23. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). S2k-Leitlinie Gonarthrose. AWMF online. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/033-004I_S2k_Gonarthrose_2018-01_1-verlaengert.pdf (Zuletzt abgerufen am 19.11.2021)
24. Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JWJ, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, Lohmander S, Leeb B, Lequesne M, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Serni U, Swoboda B, Verbruggen G, Zimmerman-Gorska I, Dougados M. Standing committee for international clinical studies including therapeutic trials ESCISIT. EULAR recommendations 2003: an evidence-based approach to the management of knee osteoarthritis: report of a task Force of the standing committee for international clinical studies including therapeutic trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis.* 2003; **62**(12): 1145-55.
25. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Langfassung: S2k-LL Indikation Knieendoprothese, AWMF online. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/033-052I_S2k_Knieendoprothese_2018-05.pdf (Zuletzt abgerufen am 19.11.2021)

26. Statistisches Bundesamt. Bevölkerung Deutschlands bis 2050, 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt (Destatis). [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Bevoelkerungsvorausberechnung/Publikationen/Downloads-Vorausberechnung/bevoelkerung-deutschland-2050-presse-5124204069004.pdf?__blob=publicationFile#:~:text=Die%20Bevölkerungszahl%20in%20Deutschland%2C%20die,Millionen%20im%20Jahr%202050%20abnehmen.\(Zuletzt%20abgerufen%20am%2022.10.2021\)](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Bevoelkerung/Bevoelkerungsvorausberechnung/Publikationen/Downloads-Vorausberechnung/bevoelkerung-deutschland-2050-presse-5124204069004.pdf?__blob=publicationFile#:~:text=Die%20Bevölkerungszahl%20in%20Deutschland%2C%20die,Millionen%20im%20Jahr%202050%20abnehmen.(Zuletzt%20abgerufen%20am%2022.10.2021))
27. Global burden of disease collaborative network. Global burden of disease study 2019 (GBD 2019). Osteoarthritis — level 3 cause. http://www.healthdata.org/results/gbd_summaries/2019/osteoarthritislevel-3-cause (Zuletzt abgerufen am 12.05.21)
28. Woolf AD. The bone and joint decade 2000-2010. *Ann Rheum Dis.* 2000; **59**(2): 81-2.
29. Longobardi L, Li T, Tagliaferro L, Temple JD, Willcockson HH, Ye P, Esposito A, Xu F, Spagnoli A. Synovial joints: from development to homeostasis. *Curr Osteoporos Rep.* 2015; **13**(1): 41-51.
30. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O’Keefe RJ. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003; **11**(6): 421-30.
31. Quinn TM, Häuselmann HJ, Shintani N, Hunziker EB. Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles. *Osteoarthritis Cartilage* 2013; **21**(12): 1904-12.
32. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 2009; **1**(6): 461-8.
33. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009; **11**(3): 224.
34. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res.* 1987; **5**(4): 509-22.
35. Becerra J, Andrades JA, Guerado E, Zamora-Navas P, López-Puertas JM, Reddi AH. Articular cartilage: structure and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010; **16**(6): 617-27.
36. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. Stuttgart: Thieme, 2012.
37. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998; **47**: 477-86.
38. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; **3**(1): a004978.
39. Persikov AV, Ramshaw JA, Kirkpatrick A, Brodsky B. Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability. *Biochemistry* 2005; **44**(5): 1414-22.

40. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme, 2012.
41. Jeffrey DR, Watt I. Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol.* 2003; **76**(911): 777-87.
42. Couchman JR, Pataki CA. An introduction to proteoglycans and their localization. *J Histochem Cytochem.* 2012; **60**(12): 885-97.
43. Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2015; **42**: 11-55.
44. Aumüller G, Aust G, Doll A. Duale Reihe Anatomie. Stuttgart: Thieme, 2010.
45. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MD, Kuettner KE. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 1994; **311**(1): 144-52.
46. Eschweiler J, Horn N, Rath B, Betsch M, Baroncini A, Tingart M, Migliorini F. The biomechanics of cartilage - an overview. *Life* **11**(4): 302.
47. Redler I, Mow VC, Zimny ML, Mansell J. The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 1975; (112): 357-62.
48. Meirer F, Pemmer B, Pepponi G, Zoeger N, Wobrauschek P, Sprio S, Tampieri A, Goettlicher J, Steininger R, Mangold S, Roschger P, Berzlanovich A, Hofstaetter JG, Strelci C. Assessment of chemical species of lead accumulated in tidemarks of human articular cartilage by X-ray absorption near-edge structure analysis. *J Synchrotron Radiat.* 2011; **18**(Pt 2): 238-44.
49. Armiento AR, Alini M, Stoddart MJ. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv Drug Deliv Rev.* 2019; **146**: 289-305.
50. Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2016; **1862**(4): 576-91.
51. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002; **39**(1-2): 237-46.
52. Yang CY, Chanalaris A, Troeberg L. ADAMTS and ADAM metalloproteinases in osteoarthritis - looking beyond the 'usual suspects'. *Osteoarthritis Cartilage* 2017; **25**(7): 1000-9.
53. Hohmann T, Dehghani F. The cytoskeleton - a complex interacting meshwork. *Cells* 2019; **8**(4): 362.
54. Pegoraro AF, Janmey P, Weitz DA. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017; **9**(11): a022038.
55. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 2011; **40**: 169-86.
56. Carlsson AE. Membrane bending by actin polymerization. *Curr Opin Cell Biol.* 2018; **50**: 1-7.
57. Rodriguez A, Kashina A. Posttranscriptional and posttranslational regulation of actin. *Anat Rec (Hoboken)* 2018; **301**(12): 1991-8.

58. Pollard TD. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; **8**(8): a018226.
59. Lowery J, Kuczmarski ER, Herrmann H, Goldmann RD. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *J Biol Chem.* 2015; **290**(28): 17145-53.
60. Sanghvi-Shah R, Weber GF. Intermediate filaments at the junction of mechanotransduction, migration, and development. *Front Cell Dev Biol.* 2017; **5**: 81.
61. Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: structure and assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; **8**(11): a018242.
62. Goldmann WH. Intermediate filaments and cellular mechanics. *Cell Biol. Int.* 2018; **42**(2): 132-8.
63. Nishimura Y, Kasahara K, Inagaki M. Intermediate filaments and IF-associated proteins: from cell architecture to cell proliferation. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2019; **95**(8): 479-93.
64. Block J, Schroeder V, Pawelzyk P, Willenbacher N, Köster S. Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments. *Biochim Biophys Acta.* 2015; **1853**(11b): 3053-64.
65. Dey P, Togra J, Mitra S. Intermediate filament: structure, function, and applications in cytology. *Diagn Cytopathol.* 2014; **42**(7), 628-35.
66. Goodson HV, Jonasson EM. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018; **10**(6): a022608.
67. Kemler R. Classical cadherins. *Semin Cell Biol.* 1992; **3**(3): 149-55.
68. Yulis M, Kusters DHM, Nusrat A. Cadherins: cellular adhesive molecules serving as signalling mediators. *J Physiol.* 2018; **596**(17): 3883-98.
69. Kadry YA, Calderwood DA. Chapter 22: structural and signaling functions of integrins. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020; **1862**(5): 183206.
70. Tietze S, Hofmann A, Wolk S, Reeps C. Grundlagen der zellulären Mechanotransduktion, *Gefässchirurgie* 2020; **25**(4): 244-8.
71. Kim DH, Wirtz D. Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus. *Biomaterials* 2015; **48**: 161-72.
72. Isermann P, Lammerding J. Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Curr Biol.* 2013; **23**(24): R1113-21.
73. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 2014; **39**: 25-32.
74. Guilak F, Nims RJ, Dicks A, Wu CL, Meulenbelt I. Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix. *Matrix Biol.* 2018; **71-72**: 40-50.
75. Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol.* 2016; **215**(4): 445-56.

76. Bader DL, Salter DM, Chowdhury TT. Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. *Arthritis* 2011; **2011**: 979032.
77. Guilak F, Zell RA, Erickson GR, Grande DA, Rubin CT, McLeod KJ, Donahue HJ. Mechanically induced calcium waves in articular chondrocytes are inhibited by gadolinium and amiloride. *J Orthop Res.* 1999; **17**(3): 421–9.
78. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol.* 2001; **12**(1): 3-10.
79. Zhou Y, Lv M, Li T, Zhang T, Duncan R, Wang L, Lu XL. Spontaneous calcium signaling of cartilage cells: from spatiotemporal features to biophysical modeling. *FASEB J.* 2019; **33**(4): 4675-87.
80. Han SK, Wouters W, Clark A, Herzog W. Mechanically induced calcium signaling in chondrocytes in situ. *J Orthop Res.* 2012; **30**(3): 475-81.
81. O'Connor CJ, Leddy HA, Benefield HC, Liedtke WB, Guilak F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(4): 1316–21.
82. Sukharev S, Sachs F. Molecular force transduction by ion channels: diversity and unifying principles. *J Cell Sci.* 2012; **125**(13): 3075-83.
83. Mikoshiba K, Hattori M. IP3 receptor-operated calcium entry. *Sci STKE* 2000; **2000**(51): pe1.
84. Gong X, Li G, Huang Y, Fu Z, Song X, Chen C, Yang L. Synergistically regulated spontaneous calcium signaling is attributed to cartilaginous extracellular matrix metabolism. *J Cell Physiol.* 2019; **234**(6): 9711-22.
85. Lv M, Zhou Y, Chen X, Han L, Wang L, Lu XL. Calcium signaling of in situ chondrocytes in articular cartilage under compressive loading: Roles of calcium sources and cell membrane ion channels. *J Orthop Res.* 2018; **36**(2): 730-8.
86. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; **3**(10): a009712.
87. Stenina OI, Topol EJ, Plow EF. Thrombospondins, their polymorphisms, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **27**(9): 1886-94.
88. Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; **36**(6): 961-8.
89. Stenina-Adognravi O. Thrombospondins: old players, new games. *Curr Opin Lipidol.* 2013; **24**(5): 401-9.
90. Pfander D, Cramer T, Deuerling D, Weseloh G, Swoboda B. Expression of thrombospondin-1 and its receptor CD36 in human osteoarthritic cartilage. *Ann Rheum Dis.* 2000; **59**(6): 448-54.
91. Mählich D, Glasmacher A, Müller I, Oppermann J, Grevenstein D, Eysel P, Heilig J, Wirth B, Zaucke F, Niehoff A. Expression and localization of thrombospondins, plastin 3, and

- STIM1 in different cartilage compartments of the osteoarthritic varus knee. *Int J Mol Sci.* 2021; **22**(6): 3073.
92. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* 2002; **6**(1): 1-12.
93. Simantov R, Silverstein RL. CD36: a critical anti-angiogenic receptor. *Front Biosci.* 2003; **8**: 874-82.
94. Hsieh JL, Shen PC, Shiau AL, Jou IM, Lee CH, Wang CR, Teo ML, Wu CL. Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2010; **28**(10): 1300–6.
95. Gelse K, Klinger P, Koch M, Surmann-Schmitt C, von der Mark K, Swoboda B, Hennig FF, Gusinde J. Thrombospondin-1 prevents excessive ossification in cartilage repair tissue induced by osteogenic protein-1. *Tissue Eng Part A* 2011; **17**(15-16): 2101-12.
96. Chen H, Herndon ME, Lawler J. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol.* 2000; **19**(7): 597-614.
97. Wong M, Siegrist M, Goodwin K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone.* 2003; **33**(4): 685-93.
98. DiCesare PE, Mörgelin M, Carlson CS, Pasumarti S, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein: Isolation and characterization from human articular cartilage. *J Orthop Res.* 1995; **13**(3): 422–8.
99. Acharya C, Yik JH, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR. Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol.* 2014; **37**: 102-11.
100. Chen H, Deere M, Hecht JT, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium-binding protein, and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes. *J Biol Chem.* 2000; **275**(34): 26538-44.
101. Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegard D, Paulsson M, Maurer P. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem.* 2001; **276**(9): 6083-92.
102. Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FF, Harrison WR, Francomano CA, Prange CK, Lennon GG, Deere M. Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia. *Nat Genet.* 1995; **10**(3): 325-9.
103. Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB, Dragomir AD, Luta G, Kraus VB. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project, *Arthritis Rheum.* 1999; **42**(11): 2356–64.

104. Petersson IF, Boegård T, Svensson B, Heinegård D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol*. 1998; **37**(1): 46-50.
105. Vilím V, Olejárová M, Macháček S, Gatterová J, Kraus VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; **10**(9): 707-13.
106. Sharif M, Kirwan JR, Elson CJ, Granell R, Clarke S. Suggestion of nonlinear or phasic progression of knee osteoarthritis based on measurements of serum cartilage oligomeric matrix protein levels over five years. *Arthritis Rheum*. 2004; **50**(8): 2479-88.
107. Tseng S, Reddi AH, Di Cesare PE. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): a biomarker of arthritis. *Biomark Insights* 2009; **4**: 33-44.
108. Di Cesare PE, Carlson CS, Stolerman ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M. Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res*. 1996; **14**(6): 946-55.
109. Koelling S, Clauditz TS, Kaste M, Miosge N. Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006; **8**(3): R56.
110. Hogan PG. The STIM1-ORAI1 microdomain. *Cell Calcium*. 2015; **58**(4): 357-67.
111. Feske S, Prakriya M. Conformational dynamics of STIM1 activation. *Nat Struct Mol Biol*. 2013; **20**(8): 918-9.
112. Fahrner M, Derler I, Jardin I, Romanin C. The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels (Austin)* 2013; **7**(5): 330–43.
113. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*. 2005; **15**(13): 1235-41.
114. Robinson LJ, Blair HC, Barnett JB, Soboloff J. The roles of Orai and Stim in bone health and disease. *Cell Calcium* 2019; **81**: 51-58.
115. Inayama M, Suzuki Y, Yamada S, Kurita T, Yamamura H, Ohya S, Giles WR, Imaizumi Y. Orai1-Orai2 complex is involved in store-operated calcium entry in chondrocyte cell lines. *Cell Calcium* 2015; **57**(5-6): 337-47.
116. Fodor J, Matta C, Olah T, Juhasz T, Takacs R, Toth A, Dienes B, Csernoch L, Zakany R. Store-operated calcium entry and calcium influx via voltage-operated calcium channels regulate intracellular calcium oscillations in chondrogenic cells. *Cell Calcium* 2013; **54**(1): 1-16.
117. Funabashi K, Ohya S, Yamamura H, Hatano N, Muraki K, Giles W, Imaizumi Y. Accelerated Ca²⁺ entry by membrane hyperpolarization due to Ca²⁺-activated K⁺

- channel activation in response to histamine in chondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; **298**(4): C786-97.
118. Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y, Clark RB, Giles WR. K⁺ and Ca²⁺ channels regulate ca²⁺ signaling in chondrocytes: an illustrated review. *Cells* 2020; **9**(7): 1577.
 119. Duquette M, Nadler M, Okuhara D, Thompson J, Shuttleworth T, Lawler J. Members of the thrombospondin gene family bind stromal interaction molecule 1 and regulate calcium channel activity. *Matrix Biol.* 2014; **37**: 15–24.
 120. Delanote V, Vandekerckhove J, Gettemans J. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes, *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; **26**(7): 769–79.
 121. Schwebach CL, Agrawal R, Lindert S, Kudryashova E, Kudryashov DS. The roles of actin-binding domains 1 and 2 in the calcium-dependent regulation of actin filament bundling by human plastins. *J Mol Biol.* 2017; **429**(16): 2490-508.
 122. Volkman N, DeRosier D, Matsudaira P, Hanein D. An atomic model of actin filaments cross-linked by fimbrin and its implications for bundle assembly and function. *J Cell Biol.* 2001; **153**(5): 947-56.
 123. Li N, Wong CK, Cheng CY. Plastins regulate ectoplasmic specialization via its actin bundling activity on microfilaments in the rat testis. *Asian J Androl.* 2016; **18**(5): 716-22.
 124. Lyon AN, Pineda RH, Hao IT, Kudryashova E, Kudryashov DS, Beattie CE. Calcium binding is essential for plastin 3 function in Smn-deficient motoneurons. *Hum Mol Genet.* 2014; **23**(8): 1990-2004.
 125. Schwebach CL, Kudryashova E, Zheng W, Orchard M, Smith H, Runyan LA, Egelman EH, Kudryashov DS. Osteogenesis imperfecta mutations in plastin 3 lead to impaired calcium regulation of actin bundling. *Bone Res.* 2020; **8**: 21.
 126. van Dijk FS, Zillikens MC, Micha D, Riessland M, Marcelis CL, de Die-Smulders CE, Milbradt J, Franken AA, Harsevoort AJ, Lichtenbelt KD, Pruijs HE, Rubio-Gozalbo ME, Zwertbroek R, Moutaouakil Y, Egthuijsen J, Hammerschmidt M, Bijman R, Semeins CM, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J, Campos-Obando N, Hofman A, te Meerman GJ, Verkerk AJ, Uitterlinden AG, Maugeri A, Sistermans EA, Waisfisz Q, Meijers-Heijboer H, Wirth B, Simon ME, Pals G. PLS3 mutations in X-linked osteoporosis with fractures. *N Engl J Med.* 2013; **369**(16): 1529-36.
 127. Kämpe AJ, Costantini A, Mäkitie RE, Jäntti N, Valta H, Mäyränpää M, Kröger H, Pekkinen M, Taylan F, Jiao H, Mäkitie O. PLS3 sequencing in childhood-onset primary osteoporosis identifies two novel disease-causing variants. *Osteoporos Int.* 2017; **28**(10): 3023-32.
 128. Hu J, Li LJ, Zheng WB, Zhao DC, Wang O, Jiang Y, Xing XP, Li M, Xia W. A novel mutation in PLS3 causes extremely rare X-linked osteogenesis imperfecta. *Mol Genet Genomic Med.* 2020; **8**(12): e1525.

129. Neugebauer J, Heilig J, Hosseinibarkooie S, Ross BC, Mendoza-Ferreira N, Nolte F, Peters M, Hölker I, Hupperich K, Tschanz T, Grysko V, Zaucke F, Niehoff A, Wirth B. Plastin 3 influences bone homeostasis through regulation of osteoclast activity. *Hum Mol Genet.* 2018; **27**(24): 4249–62.
130. Garbett D, Bisaria A, Yang C, McCarthy D, Hayer A, Moerner WE, Svitkina TM, Meyer T. T-Plastin reinforces membrane protrusions to bridge matrix gaps during cell migration. *Nat Commun.* 2020; **11**(1): 4818.
131. Tsolis KC, Bei ES, Papathanasiou I, Kostopoulou F, Gkretsi V, Kalantzaki K, Malizos K, Zervakis M, Tsezou A, Economou A. Comparative proteomic analysis of hypertrophic chondrocytes in osteoarthritis. *Clin Proteomics.* 2015; **12**(1): 12.
132. Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010; **26**(3): 355–69.
133. Haberkamp S, Oláh T, Orth P, Cucchiarini M, Madry H. Analysis of spatial osteochondral heterogeneity in advanced knee osteoarthritis exposes influence of joint alignment. *Sci Transl Med.* 2020; **12**(562): eaba9481.
134. Nakagawa Y, Mukai S, Yabumoto H, Tarumi E, Nakamura T. Cartilage degeneration and alignment in severe varus knee osteoarthritis. *Cartilage* 2015; **6**(4): 208-15.
135. Yamashiro Y, Thang BQ, Shin SJ, Lino CA, Nakamura T, Kim J, Sugiyama K, Tokunaga C, Sakamoto H, Osaka M, Davis EC, Wagenseil JE, Hiramatsu Y, Yanagisawa H. Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans. *Circ Res.* 2020; **123**(6): 660-72.
136. Giannoni P, Siegrist M, Hunziker EB, Wong M. The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Biorheology* 2003; **40**(1-3): 101-9.
137. Fahiminiya S, Majewski J, Al-Jallad H, Moffatt P, Mort J, Glorieux FH, Roschger P, Klaushofer K, Rauch F. Osteoporosis caused by mutations in PLS3: clinical and bone tissue characteristics. *J Bone Miner Res.* 2014; **29**(8): 1805-14.
138. Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res.* 2004; **19**(3) :471-8.
139. Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 2008; **320**: 524–7.
140. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem.* 1995; **70**(5): 220-33.
141. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; **14**(1): 13-29.

142. Pritzker KPH, Aigner T. Terminology of osteoarthritis cartilage and bone histopathology - a proposal for a consensus. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; **3**: 7-9.
143. Pauli C, Whiteside R, Heras FL, Nestic D, Koziol J, Grogan SP, Matyas J, Pritzker KPH, D'Lima DD, Lotz MK. Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20(6): 476-85.
144. Custers RJ, Creemers LB, Verboort AJ, van Rijen MH, Dhert WJ, Saris DB. Reliability, reproducibility and variability of the traditional histologic/histochemical grading system vs the new OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; **15**(11): 1241-8.
145. Pearson RG, Kurien T, Shu KS, Scammell BE. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; **19**(3): 324-31.
146. Jeremiassse B, Matta C, Fellows CR, Boocock DJ, Smith JR, Liddell S, Lafeber F, van Spil WE, Mobasher A. Alterations in the chondrocyte surfaceome in response to pro-inflammatory cytokines. *BMC Mol Cell Biol.* 2020; **21**(1): 47.
147. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Chuchana P, Casteilla L, Gachet M, Jorgensen C, Lisignoli G, Noel D. Thrombospondin-1 partly mediates the cartilage protective effect of adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Front Immunol.* 2017; **8**: 1638.
148. Qian X, Tuszynski GP. Expression of thrombospondin-1 in cancer: a role in tumor progression. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1996; **212**(3): 199-207.
149. Lyons-Giordano B, Kefalides NA, Brinker JM, Pratta MA, Arner EC. The effects of interleukin-1 on the expression of thrombospondin and fibronectin by rabbit articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 1991; **195**(2): 462-7.
150. Maly K, Andres Sastre E, Farrell E, Meurer A, Zaucke F. COMP and TSP-4: functional roles in articular cartilage and relevance in osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2021; **22**(5): 2242.
151. Mobasher A, Matta C, Uzielienè I, Budd E, Martín-Vasallo P, Bernotiene E. The chondrocyte channelome: a narrative review. *Joint Bone Spine.* 2019; **86**(1): 29-35.
152. Martino F, Perestrelo AR, Vinarsky V, Pagliari S, Forte G. Cellular mechanotransduction: from tension to function. *Front Physiol.* 2018; **9**: 824.
153. Leong DJ, Hardin JA, Cobelli NJ, Sun HB. Mechanotransduction and cartilage integrity. *Ann NY Acad Sci* 2011; **1240**: 32-7.
154. Martinez-Moreno D, Jimenez G, Galvez-Martin P, Rus G, Marchal JA. Cartilage biomechanics: a key factor for osteoarthritis regenerative medicine. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019; **1865**(6): 1067-75.
155. Wolff L, Strathmann EA, Müller I, Mählich D, Veltman C, Niehoff A, Wirth B. Plastin 3 in health and disease: a matter of balance. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021; **78**: 5275-301.

156. Sheehy L, Culham E, McLean L, Niu J, Lynch J, Segal NA, Singh JA, Nevitt M, Cooke TDV. Validity and sensitivity to change of three scales for the radiographic assessment of knee osteoarthritis using images from the multicenter osteoarthritis study (MOST). *Osteoarthritis and cartilage* 2015; **23**(9): 1491–8.
157. Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; **18**(1): 12-23.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Lebenszeitprävalenz der Arthrose (Datenbasis GEDA-Studie 2010.....	12
Abb. 2:	Schematische Darstellung des Aufbaus der EZM des Knorpelgewebes.....	18
Abb. 3:	A) Schematische Darstellung des Aufbaus des hyalinen Knorpelgewebes B) Hyaliner Gelenkknorpel aus einem Knorpel-Knochen-Resektat eines humanen Tibiaplateaus, Safranin-O/Fast-Green-Färbung.....	19
Abb. 4:	Schematische Darstellung zellulärer pathogenetischer Vorgänge bei OA durch mechanische und biochemische Reize.....	22
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Struktur der TSPs.....	27
Abb. 6:	Schematische Darstellung der strukturellen Dynamik bei STIM1-Aktivierung durch ein Absinken der intrazellulären Ca ²⁺ -Speicher.....	30
Abb. 7:	A) Vereinfachte, schematische Darstellung der Struktur der Plastine. B) Schematische Darstellung der Bindung von Ca ²⁺ an die Ca ²⁺ -BD und jeweils eines Aktinfilaments (AF) an jede ABD.....	32
Abb. 8:	Resezierte Tibiaplateaus.....	38
Abb. 9:	Score „Intensität“ zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen....	52
Abb. 10:	Kriterium „Stärke der Färbung“ zur Auswertung der Immunfluoreszenz- färbungen.....	53
Abb. 11:	Safranin-O/Fast-Green-Färbungen des Gelenkknorpels.....	55
Abb. 12:	Histopathologischer Osteoarthrose-Score (Osteoarthritis Research Society International (OARSI)) des Gelenkknorpels vom medialen und lateralen Kompartiment der Tibiaplateaus (n=15).....	56
Abb. 13:	OARSI-Score der unterschiedlichen Regionen A bis C des medialen und E bis G des lateralen Kompartiments (n=15).....	57
Abb. 14:	Exemplarische Knorpelgewebeschnitte der sechs verschiedenen Regionen des Gelenkknorpels nach immunhistochemischer Färbung von TSP-1 (n=15)	58
Abb. 15:	TSP-1-Score des medialen und lateralen Kompartiments (n=15).....	59
Abb. 16:	TSP-1-Score der verschiedenen Regionen A bis C des medialen und E bis G des lateralen Kompartiments (n=15).....	60
Abb. 17:	Exemplarische Knorpelgewebeschnitte der sechs verschiedenen Regionen des Gelenkknorpels nach immunhistochemischer Färbung von TSP-5 (n=15)	61
Abb. 18:	TSP-5-Scores des medialen und lateralen Kompartiments (n=15).....	62

Abb. 19:	TSP-5-Score der verschiedenen Regionen A bis C des medialen und E bis G des lateralen Kompartiments (n=15).....	63
Abb. 20:	Immunfluoreszenz-Färbung von STIM1 in Chondrozyten des Gelenkknorpels	64
Abb. 21:	Immunfluoreszenz-Färbung von STIM1 in Chondrozyten des oberflächlichen Gelenkknorpels.....	65
Abb. 22:	Quantitative Auswertung der STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller vorhandenen Zellen (n=15).....	66
Abb. 23:	Quantitative Auswertung der STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller vorhandenen Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15).....	67
Abb. 24:	Quantitative Auswertung der stark STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15).....	68
Abb. 25:	Quantitative Auswertung der stark STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15).....	69
Abb. 26:	Quantitative Auswertung der schwach STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15).....	69
Abb. 27:	Quantitative Auswertung der schwach STIM1-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15).....	70
Abb. 28:	Immunfluoreszenz-Färbung von PLS3 in Chondrozyten des Gelenkknorpels	71
Abb. 29:	Immunfluoreszenz-Färbung von PLS3 in Chondrozyten des oberflächlichen Gelenkknorpels.....	72
Abb. 30:	Quantitative Auswertung der PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller vorhandenen Zellen (n=15).....	73
Abb. 31:	Quantitative Auswertung der PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller vorhandenen Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15).....	74
Abb. 32:	Quantitative Auswertung der stark PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15).....	75
Abb. 33:	Quantitative Auswertung der stark PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15).....	76
Abb. 34:	Quantitative Auswertung der schwach PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zu der Anzahl aller gefärbten Zellen (n=15).....	76

Abb. 35:	Quantitative Auswertung der schwach PLS3-positiv gefärbten Chondrozyten in Relation zur Anzahl aller gefärbten Zellen für die oberflächliche, mittlere und tiefe Zone des Gelenkknorpels (n=15).....	77
----------	--	-----------

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Liste der verwendeten Pufferlösungen.....	35
Tab. 2:	Liste der verwendeten Primärantikörper.....	36
Tab. 3:	Liste der verwendeten Sekundärantikörper.....	36
Tab. 4:	Dehydrierung der Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Klärung mittels Xylols.....	38
Tab. 5:	Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung der fixierten Gewebeschnitte.....	39
Tab. 6:	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen bei der histologischen Färbung mittels Safranin-O/Fast-Green.....	40
Tab. 7:	Schritte der histologischen Färbung mittels Safranin-O/Fast-Green.....	41
Tab. 8:	Zusammensetzung der verwendeten Puffer bei der enzymatischen Demaskierung.....	42
Tab. 9:	Schritte der enzymatischen Antigendemaskierung und Inaktivierung der endogenen Peroxidase.....	42
Tab. 10:	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die immunhistochemische Färbung von TSP-1 und TSP-5.....	43
Tab. 11:	Schritte der immunhistochemischen Färbung von TSP-1 und TSP-5.....	44
Tab. 12:	Schritte der Dehydrierung der mittels Immunhistochemie gefärbten Gewebeschnitte.....	44
Tab. 13:	Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen im Rahmen der Hitze-induzierten Antigendemaskierung.....	45
Tab. 14:	Schritte der Hitze-induzierten Antigendemaskierung.....	45
Tab. 15 :	Schritte der Immunfluoreszenzfärbung von STIM1 und PLS3.....	46
Tab. 16 :	Einstellung des Mikroskops und der Software <i>NIS Elements</i> im Rahmen der Digitalisierung der gefärbten Gewebeschnitte.....	47
Tab. 17:	Scoring-Kriterien der Grade der Knorpelschädigung nach Pritzker et al.....	50
Tab. 18:	Scoring-Kriterien der Stadien der Knorpelschädigung nach Pritzker et al.....	51
Tab. 19:	Kriterien zur Bestimmung der Ausdehnung der Färbung beim Scoring von TSP-1 und TSP-5.....	52

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vor der Eröffnung des Promotionsverfahrens am 17. März 2021 im Rahmen eines wissenschaftlichen Artikels mit dem Titel

„Expression and localization of thrombospondins, plastin 3, and STIM1 in different cartilage compartments of the osteoarthritic varus knee“

in der Fachzeitschrift *International Journal of Molecular Science* veröffentlicht. Die Autoren sind Daniela Mählich, Anne Glasmacher, Ilka Müller, Johannes Oppermann, David Grevenstein, Peer Eysel, Juliane Heilig, Brunhilde Wirth, Frank Zaucke und Anja Niehoff.

Quellenangabe:

Mählich D, Glasmacher A, Müller I, Oppermann J, Grevenstein D, Eysel P, Heilig J, Wirth B, Zaucke F, Niehoff A. Expression and localization of thrombospondins, plastin 3, and STIM1 in different cartilage compartments of the osteoarthritic varus knee. *Int J Mol Sci.* 2021; **22**(6): 3073.