

Aus der berufsgenossenschaftlichen Klinik
für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
an der Universität Tübingen

**Kollagen Typ I, II, III und VI - mRNA-Expression humaner
Chondrozyten in verschiedenen räumlichen
Organisationsformen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Schröder, Jan

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Rolauffs

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

Tag der Disputation: 06.11.2017

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Tabellenverzeichnis.....	V
III Abbildungsverzeichnis.....	VIII
IV Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Die Anatomie des humanen Kniegelenks	1
1.2 Hyaliner Gelenkknorpel	3
1.3 Kollagene und ihre Bedeutung im hyalinen Gelenkknorpel.....	5
1.4 Osteoarthritis	8
1.5 Die superfizielle Zone	9
1.6 Ziel der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.2 Reagenzien	14
2.3 Geräte	15
2.4 Software	16
2.5 Gewinnung von Knorpelgewebe	16
2.6 Herstellung standardisierter Knorpelzylinder	17
2.7 Zellkernfärbung	18
2.8 Analyse der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	18
2.9 Theoretische Einführung in die Quantitative Real-Time-PCR	20
2.9.1 mRNA-Extraktion.....	20
2.9.2 Umschreibung der mRNA zu cDNA.....	21
2.9.3 Die Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
2.9.4 Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR	24
2.10 Protokoll der mRNA-Extraktion, cDNA-Umschreibung und qRT-PCR.....	25
2.10.1 Aufbereitung der Proben	25
2.10.2 mRNA-Extraktion.....	25
2.10.3 Etablierung: Einführung eines DNase-Verdau-Schritts	27
2.10.4 Ermittlung der mRNA-Menge.....	27
2.10.5 Umschreibung der mRNA zu cDNA.....	28
2.10.6 Quantitative Real Time Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)	28

2.10.7 Auswertung der qRT-PCR-Daten	31
2.11 Statistische Auswertung	33
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Übersicht der Verteilung der räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten in den untersuchten Knorpelzylindern des Patientenkollektivs.....	35
3.2 Etablierung des Protokolls zur mRNA-Extraktion aus Chondrozyten der superfiziellen Zone humaner Kniegelenkskondylen	37
3.2.1 Wahl des mRNA-Extraktionsverfahrens aus standardisierten Knorpelzylindern der superfiziellen Knorpelzone humaner Kniegelenkskondylen	37
3.3 Einfluss der Einführung eines zusätzlichen DNase-Schritts nach der mRNA-Extraktion mittels TriFast®	41
3.3.1 Optimierung des Homogenisierungsprozesses von standardisierten Knorpelzylinder der superfiziellen Knorpelzone humaner Kniegelenkskondylen.....	43
3.3.2 Untersuchung der Einführung eines Schockgefrierschrittes mit Flüssigstickstoff zur Optimierung der mRNA- Extraktion aus standardisierten Knorpelzylindern der superfiziellen Knorpelzone humaner Kniegelenkskondylen	44
3.3.3 Zusammenfassung der Etablierung eines Protokolls zur mRNA-Extraktion aus Chondrozyten der superfiziellen Zone humaner Kniegelenkskondylen	46
3.4 Unterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen	48
3.4.1 Unterschiede der relativen COL1A2 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen..	48
3.4.2 Unterschiede der relativen COL2A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen..	51
3.4.3 Unterschiede der relativen COL3A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen..	54
3.4.4 Unterschiede der relativen COL6A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen..	56
3.4.5 Zusammenfassung der Unterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen	59
3.5 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in verschiedenen räumlichen Organisationsformen.....	63
3.5.1 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings	63

3.5.2 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen in der räumlichen Organisationsform Small Clusters.....	67
3.5.3 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen in der räumlichen Organisationsform Big Clusters.....	71
3.5.4 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen in einer diffusen räumlichen Organisationsform.....	75
3.6 Zusammenfassung: Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen in verschiedenen räumlichen Organisationsformen	79
3.7 Vergleich des Verhältnisses der COL1A2 - und COL2A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	84
3.8 Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	86
3.8.1 Korrelation der relativen COL1A2 und COL2A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	87
3.8.2 Korrelation der relativen COL1A2 und COL3A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	88
3.8.3 Korrelation der relativen COL1A2 und COL6A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	89
3.8.4 Korrelation der relativen COL2A1 und COL3A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	90
3.8.5 Korrelation der relativen COL2A1 und COL6A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	91
3.8.6 Korrelation der COL3A1 und COL6A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	92
3.8.7 Zusammenfassung der Korrelationen verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen	93

3.9	Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) mit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen.....	95
4	Diskussion	96
4.1	Etablierung des Protokolls zur mRNA-Extraktion aus Chondrozyten der superfiziellen Zone humaner Kniegelenkskondylen	96
4.2	Unterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen	98
4.2.1	Kollagen Typ I (COL1A2)	98
4.2.2	Kollagen Typ II (COL2A1).....	99
4.2.3	Kollagen Typ III (COL3A1).....	100
4.2.4	Kollagen Typ VI (COL6A1)	101
4.3	Vergleich verschiedener Kollagenexpressionen (I, II, III, VI) superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen mit klassifizierter räumlichen Organisationsformen	102
4.4	Korrelation verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen	103
4.5	COL1A2/COL2A1-Verhältnis als Marker der Differenzierung.....	104
4.6	Korrelation verschiedener Kollagenexpressionen (I, II, III, VI) mit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen	106
4.7	Zusammenfassung: Diskussion und Ausblick	106
5	Zusammenfassung der Arbeit.....	110
6	Literaturverzeichnis.....	113
7	Erklärung zum Eigenanteil	119
8	Danksagung.....	120

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Collagen Types in Cartilage Matrix (% of total collagen)</i>	6
Tabelle 2: <i>Verwendete Verbrauchsmaterialien</i>	13
Tabelle 3: <i>Verwendete Reagenzien</i>	14
Tabelle 4: <i>Verwendete Geräte</i>	15
Tabelle 5: <i>Verwendete Software</i>	16
Tabelle 6: <i>Verwendete Primersequenzen für die qRT-PCR von 5' nach 3'</i>	29
Tabelle 7: <i>Ermittelte Primereffizienzen</i>	30
Tabelle 8: <i>Verwendete TaqMan-Sonden für die qRT-PCR</i>	30
Tabelle 9: <i>Verwendetes qRT-PCR Programm des Light Cyclers 480</i>	31
Tabelle 10: <i>Übersicht über die Verteilung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten in den untersuchten Knorpelzylindern des Patientenkollektivs (n=43)</i>	35
Tabelle 11: <i>Paarweiser Vergleich der relativen COL1A2 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen</i>	50
Tabelle 12: <i>Relative Änderung der COL1A2 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters)</i>	50
Tabelle 13: <i>Paarweiser Vergleich der relativen COL2A1 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen</i>	53
Tabelle 14: <i>Relative Änderung der COL2A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters)</i>	53
Tabelle 15: <i>Paarweiser Vergleich der relativen COL3A1 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen</i>	55
Tabelle 16: <i>Relative Änderung der COL3A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters)</i>	56
Tabelle 17: <i>Paarweiser Vergleich der relativen COL6A1 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen</i>	58
Tabelle 18: <i>Relative Änderung der COL6A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters)</i>	58

Tabelle 19: <i>Übersicht über die relative Änderung der mRNA- Expression von Kollagen Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1) von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen</i>	62
Tabelle 20: <i>Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings.</i>	65
Tabelle 21: <i>Verhältnisse der relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings.</i>	66
Tabelle 22.: <i>Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings.</i>	66
Tabelle 23: <i>Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters</i>	69
Tabelle 24: <i>Verhältnisse der relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters.</i>	70
Tabelle 25: <i>Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Small Clusters.</i>	70
Tabelle 26: <i>Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters.</i>	73
Tabelle 27: <i>Verhältnisse der mRNA-Expressionen verschiedener relativer Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters.</i>	74
Tabelle 28: <i>Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Big Clusters.</i>	74
Tabelle 29: <i>Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von</i>	

<i>Chondrozyten der superfiziellen Zone mit einer diffusen räumlichen Organisationsform.</i>	<i>77</i>
<i>Tabelle 30: Verhältnisse der mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform.</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 31: Korrelation verschiedener relativer Kollagen Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten mit einer diffusenr räumlichen Organisationsform.</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 32 Übersicht über die Verhältnisse der mRNA- Expression von Kollagen Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1) innerhalb definierter räumlicher Organisationsformen superfizieller Chondrozyten</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 33: Übersicht über die Korrelation zwischen verschiedenen relativen Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) innerhalb definierter Organisationsformen superfizieller Chondrozyten der humanen Kniegelenkskondyle.</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 34: Übersicht über die Korrelationen verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1) über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen.</i>	<i>93</i>
<i>Tabelle 35: Korrelation zwischen verschiedenen relativen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen und deren räumlichen Organisationformen.</i>	<i>95</i>

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Rechtes Kniegelenk mit Bandapparat.</i>	2
Abbildung 2: <i>Haematoxylin-Mucicarmine-Orange G Färbung eines menschlichen Rippenknorpels.</i>	3
Abbildung 3: <i>Schematische dreidimensionale Darstellung von hyalinem Gelenkknorpelgewebe.</i>	4
Abbildung 4: <i>Änderung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten unter Zunahme der OA.</i>	11
Abbildung 5: <i>Schwarz-weiß Mosaikaufnahme eines Knorpelzylinders.</i>	19
Abbildung 6: <i>Programmeinstellung zur Auswertung der gemessenen qRT-PCR-Daten...</i>	32
Abbildung 7: <i>Exemplarisches Auswertungsergebnis der erhobenen qRT-PCR-Expressionsdaten mittels des Light Cycler 480.</i>	33
Abbildung 8: <i>Vergleich zweier verschiedener mRNA-Extraktionsverfahren mit vorhergehenden unterschiedlichen Zellfärbungsmethoden.</i>	38
Abbildung 9: <i>Vergleich zweier verschiedener mRNA-Extraktionsverfahren in Bezug auf das PCR-Ergebnis.</i>	39
Abbildung 10: <i>Vergleich zweier Extraktionsverfahren in Bezug auf die extrahierte mRNA Konzentration.</i>	40
Abbildung 11: <i>Vergleich der PCR-Ergebnisse der TriFast®-mRNA-Extraktion mit und ohne anschließenden DNase Verdau.</i>	42
Abbildung 12: <i>Effekt der Einführung der maschinellen Homogenisation auf das PCR-Ergebnis.</i>	44
Abbildung 13: <i>Vergleich der extrahierten mRNA-Konzentration des kombinierten Extraktionsverfahrens (TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen) mit und ohne eines vorhergehenden Schockgefrierschrittes mittels Flüssigstickstoff.</i> .	45
Abbildung 14: <i>Vergleich der PCR-Ergebnisse des kombinierten Extraktionsverfahrens (TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen) mit und ohne eines vorhergehenden Schockgefrierschrittes mittels Flüssigstickstoff.</i>	46
Abbildung 15: <i>Relative COL1A2 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten.</i>	49
Abbildung 16: <i>Relative COL2A1 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten.</i>	52
Abbildung 17: <i>Relative COL3A1 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten.</i>	54
Abbildung 18: <i>Relative COL6A1 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten.</i>	57
Abbildung 19: <i>Übersicht über die durchschnittliche relative COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform humaner superfizieller Chondrozyten.</i>	60
Abbildung 20: <i>Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in</i>	

<i>Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings.</i>	64
Abbildung 21.: <i>Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters.</i>	68
Abbildung 22: <i>Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters.</i>	72
Abbildung 23: <i>Vergleich verschiedener relativer Kollagen-mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit einer diffusen räumlichen Organisationsform.</i>	76
Abbildung 24: <i>Übersicht über den Vergleich der durchschnittlichen relativen COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression innerhalb verschiedener räumlichen Organisationsformen humaner superfizieller Chondrozyten.</i>	80
Abbildung 25: <i>Verhältnis der relativen COL1A2 mRNA-Expression zu der relativen COL2A1 mRNA-Expression superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen.</i>	84
Abbildung 26: <i>Korrelation der relativen COL1A2 und COL2A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen.</i>	87
Abbildung 27: <i>Korrelation der relativen COL1A2 und COL3A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen.</i>	88
Abbildung 28: <i>Korrelation der relativen COL1A2 und COL6A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen.</i>	89
Abbildung 29: <i>Korrelation der relativen COL2A1 und COL3A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen.</i>	90
Abbildung 30: <i>Korrelation der relativen COL2A1 und COL6A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen.</i>	91
Abbildung 31: <i>Korrelation der COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen.</i>	92

IV Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS-5	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains-5
BG	Berufsgenossenschaft
BC	Big Clusters
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
Cat.	Category
cDNA	Complementary DNA; dt.: komplementäre DNS
COL1A2	Kollagen Typ 1A2
COL2A1	Kollagen Typ 2A1
COL3A1	Kollagen Typ 3A1
COL6A1	Kollagen Typ 6A1
Ct	Cycling Threshold
D	Diffus
DAPI	4', 6'-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbescos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid, dt.: DNS= Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate

DS	Doublestrings
dT	Desoxy Thymidin
engl.	englisch
EZM	Extrazellulärmatrix
g	gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinisothiocyanat
l	Liter
lat.	lateinisch
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus, recombinant
MMP	Matrixmetalloprotease
Mrd.	Milliarden
mRNA	messenger Ribonucleinacid
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
nm	Nanometer

OA	Osteoarthrose
PCR	Polychain Reaction, dt.: Polymerase Kettenreaktion
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PZM	Perizelluläre Matrix
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
rcf	Relative centrifugal force; dt.: relative Zentrifugalkraft
RLT-Puffer	RNeasy Lysis Tissue Buffer
RNA	Ribonucleinacid, dt.: RNS - Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPL13A	Ribosomal Protein L13a
rpm	revolutions per minute
RQ1	RNA Qualified
s.	siehe
SC	Small Clusters
sek	Sekunden
sog.	sogenannte
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Anatomie des humanen Kniegelenks

Das menschliche Kniegelenk (lat. *Articulatio genus*) ist ein Drehscharniergelenk und setzt sich aus zwei Teilgelenken zusammen. Die daran beteiligten knöchernen Strukturen sind der distale Femur (Oberschenkelknochen), die proximale Tibia (Schienbein) und die Patella (Kniescheibe). Das erste Teilgelenk ist das Femoropatellargelenk, welches aus den Gelenkflächen der Patella und der *Facies patellaris* des Femurs gebildet wird. Das zweite Teilgelenk, das Femorotibialgelenk, setzt sich jeweils aus den Gelenkflächen der lateralen und medialen Kondyle des Femurs und der Tibia zusammen, wobei die Kondylen der Tibia das sog. Tibiaplateau bilden. Da die korrespondierenden Gelenkflächen grundsätzlich wenig kongruent sind, d.h. eine suboptimale Passform zueinander besitzen und das Kniegelenk die längsten Hebelarme des menschlichen Skeletts verbindet, erfordert es verschiedene anatomische Strukturen, welche die Stabilität und die physiologische Druckverteilung des Kniegelenks sichern. Das Kniegelenk wird durch verschiedene Bandstrukturen stabilisiert (s. Abbildung 1). Das mediale Ligamentum collaterale tibiale („Innenband“) und das lateral gelegene Ligamentum collaterale fibulare („Außenband“) verhindern ein seitliches Auklappen des Kniegelenks und bieten zusätzliche Stabilität, indem die Rotation von Femur und Tibia zueinander begrenzt wird. Die sich in der *Fossa intercondylaris* befindlichen Ligamenta cruciata (Kreuzbänder) verhindern vor allem bei gebeugtem Kniegelenk eine Verschiebung von Femur und Tibia in der Sagittalebene.

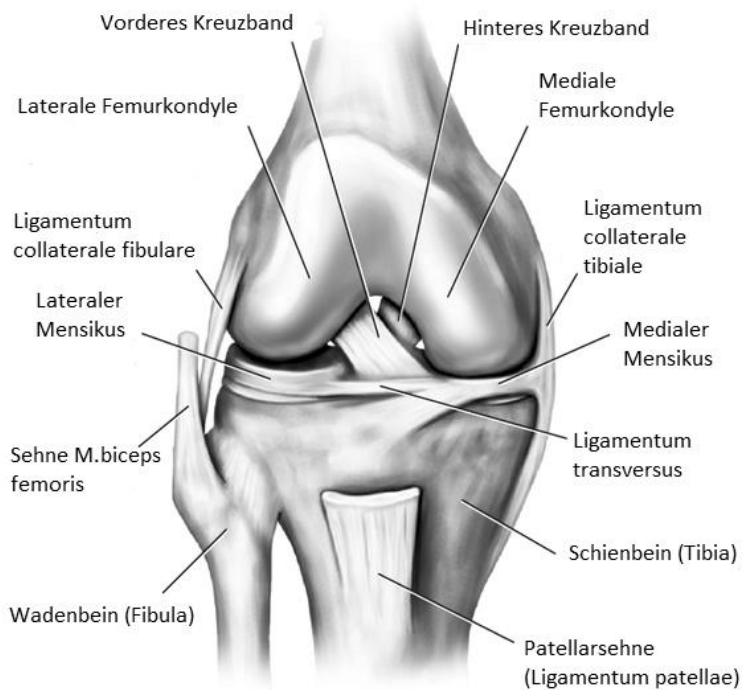


Abbildung 1: Rechtes Kniegelenk mit Bandapparat. Schematische Darstellung, Vorderansicht (Kinetics, 2016)

Die aus Faserknorpel bestehenden C-förmigen Menischi liegen zwischen der medialen bzw. lateralen Femur- und Tibiakondyle und gleichen deren Inkongruenz aus, womit sie für eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen den Gelenkflächen sorgen (Aumüller et al., 2010). Das Kniegelenk ist zudem von einer Gelenkkapsel umgeben. Diese wird aus einer außen liegenden Membrana fibrosa und einer die Gelenkhöhle auskleidenden Membrana synovialis gebildet. Während die aus straffem Bindegewebe bestehende Membrana fibrosa die äußere Begrenzung der Gelenkkapsel darstellt, ist die innen liegende Membrana synovialis maßgeblich an der Produktion der Gelenkflüssigkeit, der sog. Synovia beteiligt. Hierbei handelt es sich um eine klare, leicht gelbliche visköse Flüssigkeit, deren Hauptkomponente aus Proteohyaluronat und einem Transsudat des Blutes besteht. Sie fungiert aufgrund der viskösen Konsistenz als „Schmiermittel“ und ermöglicht ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen. Des Weiteren ist sie zuständig für die Ernährung des Gelenkknorpels und anderen intraartikulären Strukturen (Aumüller et al., 2010, Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Die aus Faserknorpel bestehenden C-förmigen Menischi liegen zwischen der medialen bzw. lateralen Femur- und Tibiakondyle und gleichen deren Inkongruenz aus, womit sie für eine gleichmäßige Druckverteilung zwischen den Gelenkflächen sorgen (Aumüller et al., 2010). Das Kniegelenk ist zudem von einer Gelenkkapsel umgeben. Diese wird aus einer außen liegenden Membrana fibrosa und einer die Gelenkhöhle auskleidenden Membrana synovialis gebildet. Während die aus straffem Bindegewebe bestehende Membrana fibrosa die äußere Begrenzung der Gelenkkapsel darstellt, ist die innen liegende Membrana synovialis maßgeblich an der Produktion der Gelenkflüssigkeit, der sog. Synovia beteiligt. Hierbei handelt es sich um eine klare, leicht gelbliche visköse Flüssigkeit, deren Hauptkomponente aus Proteohyaluronat und einem Transsudat des Blutes besteht. Sie fungiert aufgrund der viskösen Konsistenz als „Schmiermittel“ und ermöglicht ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen. Des Weiteren ist sie zuständig für die Ernährung des Gelenkknorpels und anderen intraartikulären Strukturen (Aumüller et al., 2010, Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

1.2 Hyaliner Gelenkknorpel

Hyaliner Gelenkknorpel überzieht die artikulierenden Gelenkflächen in Diarthrosen und ermöglicht ein nahezu reibungsfreies Gleiten der Gelenkflächen. Es handelt sich um ein bradytrophes Gewebe, welches weder Blut- oder Lymphgefäße (avasculär) noch eine Innervierung (aneural) aufweist (Martel-Pelletier et al., 2008). Daher erfolgt die Ernährung des Gelenkknorpels allein durch Diffusion aller nötigen Nährstoffe aus der Synovia. Hieraus erklärt sich unter anderem die schlechte Regenerationsfähigkeit von hyalinem Knorpelgewebe. Hyalines Knorpelgewebe besteht aus wenigen Knorpelzellen (Chondrozyten) und der umgebenden extrazellulären Matrix (EZM), welche im Wesentlichen aus Proteoglykanen, Wasser und Kollagenfibrillen besteht (Kuettnner et al., 1991). Die Chondrozyten teilen sich im reifen und gesunden Knorpelgewebe nicht mehr und sind verantwortlich für den metabo-

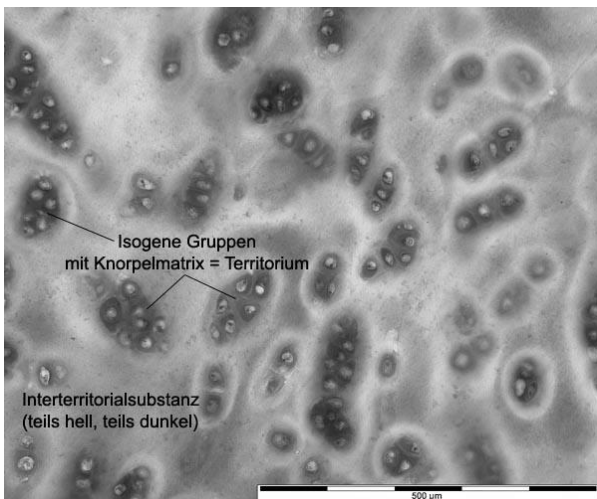


Abbildung 2: Haematoxylin-Mucicarmine-Orange G Färbung eines menschlichen Rippenknorpels. Dargestellt ist ein lichtmikroskopisches Bild eines histologischen Schnittes von hyalinem Knorpelgewebe am Beispiel eines menschlichen Rippenknorpels. Zu sehen sind isogene Gruppen aus Chondrozyten mit ihrer umgebenden Knorpelmatrix (Perizelluläre und territoriale Matrix). Die funktionelle Einheit aus einer isogenen Gruppe mit ihrer umgebenden Matrix ist als ein Chondron definiert. Zwischen den einzelnen Chondronen befindet sich die Interterritorialschubstanz oder -matrix. Sie besteht überwiegend aus einem Kollagen Typ II Fasernetz und wasserbindenden Proteoglykanen. In dieser Färbung sind die Kollagen Typ II Faser nicht sichtbar. Diese ließen sich jedoch in polarisiertem Licht darstellen (Universität Bern, 2016).

lischen Umsatz und Erhalt der extrazellulären Matrix. Sie liegen als Zellkomplexe aus zwei bis zehn Zellen vor, welche als isogene Gruppe bezeichnet werden. Die isogenen Gruppen liegen in einer Knorpelhöhle, welche von einem basophilen Knorpelhof (Territorium) umgeben wird (s. Abbildung 2) Die funktionelle Einheit aus isogener Gruppe und zugehörigem Territorium ist als Chondron definiert (Poole et al., 1987). Jeder Chondrozyt ist von einer eigenen perizellulären Matrix (PZM) umgeben, welche v. a. aus einem Netz aus Kollagen Typ VI Fibrillen besteht (Söder et al., 2002). Die PZM stellt die Verbindung zur territorialen Matrix dar, welche

jeweils ein Chondron umgibt. Den größten Anteil bildet jedoch die interterritoriale Matrix, auch Extrazellulärmatrix (EZM) genannt, welche Kollagen Typ II Fibrillen mit einer speziellen arkadenförmigen Ausrichtung aufweist (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Aufgrund der Anordnung der Knorpelzellen und dem Verlauf der Kollagen Typ II Fibrillen kann man im Querschnitt des Gelenkknorpels mikroskopisch vier verschiedene Zonen unterscheiden (s. Abbildung 3). Die Kollagenfibrillen sind in der

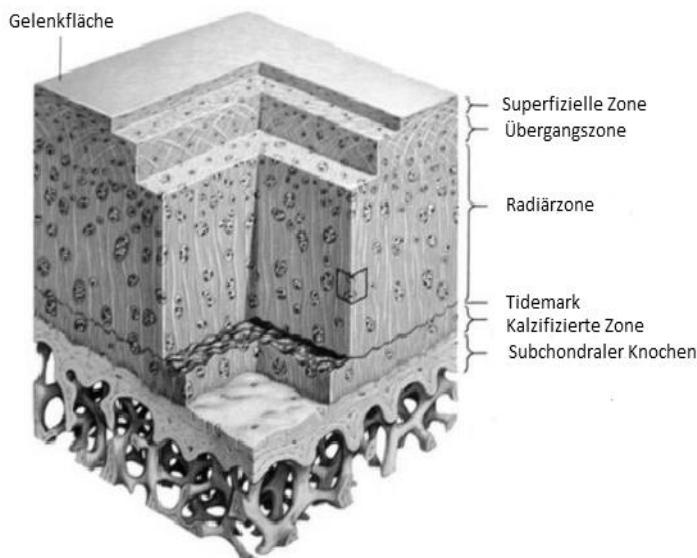


Abbildung 3: Schematische dreidimensionale Darstellung von hyalinem Gelenkknorpelgewebe. Abgebildet ist eine schematische dreidimensionale Darstellung des zonalen Aufbaus von hyalinem Gelenkknorpel. Man sieht verschiedengroße Chondrone und die umgebende Extrazellulärmatrix (hellblau). Der arkadenförmige Verlauf der Kollagen Typ II Fasern der Extrazellulärmatrix ist leicht angedeutet. (Sopena Juncosa et al., 2000). Die Beschriftung der Originalgrafik wurde verändert.

verankert. Sie ziehen von hier aus senkrecht nach oben durch die Radiärzone. Am Übergang der kalzifizierten Zone und der Radiärzone verläuft eine deutlich sichtbare Grenzlinie, die sog. Tidemark. Der Verlauf der Kollagen Typ II Fibrillen flacht in der Übergangszone ab, bis sie schließlich in der obersten Zone, der Tangentialzone oder superfiziellen Zone, parallel zur Gelenkoberfläche verlaufen und wieder absteigen (Benninghoff, 1925,

Clark, 1990, Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Der Kollagenfaserverlauf und der hohe Anteil an Wasser, welches in der EZM hauptsächlich durch Aggrecan-Hyaluronan-Aggregate gebunden ist, führen zu der charakteristischen Druckelastizität des Knorpelgewebes und verleihen ihm die nötigen biomechanischen Eigenschaften (Roughley and Lee, 1994).

1.3 Kollagene und ihre Bedeutung im hyalinen Gelenkknorpel

Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Körper. Obwohl man verschiedene Kollagen-Typen unterscheiden kann, ist allen der Grundaufbau aus einer rechtsgängigen Tripelhelix, welche sich wiederum aus drei linksgängigen α -Ketten zusammensetzt, gemeinsam (Rassow et al., 2008). Die Kombination verschiedener α -Ketten ergeben verschiedene Kollagentypen, wovon mittlerweile 28 verschiedene Typen gefunden wurden (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012, Ricard-Blum, 2011). Manche Kollagentypen bilden Homotrimere (Typ II, III, VII, VIII, X) d.h. sie bestehen aus drei identischen α -Ketten. Andere Kollagentypen hingegen bestehen aus zwei oder drei verschiedenen α -Ketten und bilden sogenannte Heterotrimere (Typ I, IV, V, VI, IX, XI). Jede α -Kette besitzt einen eigenen Genlocus, welcher nach Kollagentyp und α -Kette benannt ist. So besteht Kollagentyp VI aus drei verschiedenen α -Ketten ($\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$), deren Genloci mit COL6A1, COL6A2 und COL6A3 bezeichnet sind. Man unterscheidet außerdem funktionell unterschiedliche Gruppen von Kollagenen. Die fibrillären Kollagene, zu welchen Kollagen Typ I, II, III, V und XI gehören, bilden verschieden dicke (25-400 nm) und lange Fibrillen aus. Sie stellen mit einem Anteil von 90 % die größte Gruppe dar der Kollagene dar (Gelse et al., 2003, Ricard-Blum, 2011). Die fibrillen-assoziierten Kollagene (FACIT) bilden selbst keine eigenen Fibrillen aus, sondern binden in regelmäßigen Abständen an Fibrillen der fibrillären Kollagene und beeinflussen so deren Eigenschaften. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung von Kollagen Typ IX an das fibrilläre Kollagen Typ II in hyalinem Knorpel, welchem dadurch unter Anderem sein hydrophiler Charakter verliehen wird (Rassow et al., 2008, Diab et al., 1996). Verschiedene Kollagen-Typen spielen im Aufbau des Knorpelgewebes, vor allem bei der Formierung der extrazellulären und perizellulären Matrix, eine besondere Rolle (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Collagen Types in Cartilage Matrix (% of total collagen) (Eyre et al., 2006). Es wurden verschiedene Kollagen-Typen und ihr entsprechendes prozentuales Vorkommen in gesunder Knorpelmatrix aufgeführt.

• Type II (75% foetal, >90 % adult)
• Type III (>10 % in adult human articular)
• Type IX (covalently fibril-associated collagen, 10 % foetal, 1 % adult)
• Type X (hypertrophic cartilage only)
• Type XI (fibril template, 10 % foetal, 3 % adult)
• Type VI (chondron basket, microfilaments <1 %)
• Type XII/XIV (non-covalently fibril-associated collagens)
• Type XIII (transmembrane)

Auf die in dieser Arbeit untersuchten Kollagene wird im Folgenden kurz eingegangen:

Der am häufigsten vorkommende und wichtigste Kollagen-Typ in gesundem hyalinen Gelenkknorpel ist Kollagen Typ II (Rassow et al., 2008, Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Es bildet Homotrimere und wird charakteristischerweise von differenzierten Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels exprimiert (Aigner et al., 1993, Benya et al., 1978, Benya and Shaffer, 1982, Schnabel et al., 2002). Dabei ist Kollagen Typ II das zentrale Kollagen, welches arkadenartige Fibrillen bildet (Benninghoff, 1925, Gelse et al., 2003) und damit dem Knorpelgewebe seine einzigartigen biomechanischen Eigenschaften verleiht. Es bildet zusammen mit Kollagen Typ IX und XI ein Heteropolymer, welches essentiell für die Druckelastizität des Knorpelgewebes ist (Diab et al., 1996, Rassow et al., 2008, Eyre et al., 2002).

Kollagen Typ III bildet Homotrimere und ist ein wichtiger Bestandteil retikulärer Fasern. Es ist vor allem in Kollagen Typ I enthaltenden Geweben zu finden, außer in Knochen (Gelse et al., 2003). Hyaliner Gelenkknorpel stellt ebenfalls eine Aus-

nahme dar, denn sowohl in gesundem als auch in osteoarthrotischem hyalinem Knorpelgewebe konnte Kollagen Typ III nachgewiesen, obwohl in gesundem Gelenkknorpel Kollagen Typ I nicht zu finden ist. Es ist mit Kollagen Typ II-Fibrillen assoziiert und spielt vermutlich eine wesentliche Rolle bei Regenerationsversuchen nach Matrixschäden (Young et al., 2000, Eyre et al., 2006, Wotton and Duance, 1994, Wu et al., 2010).

Das heterotrimere Kollagen Typ VI ist weit verbreitet und zählt zu den mikrofibrillären Kollagenen, welches feine Netzstrukturen bildet (Gelse et al., 2003, Poole et al., 1988, Keene et al., 1988). In hyalinem Gelenkknorpel ist es ein bedeutender Bestandteil der die Chondrone umgebenden perizellulären Matrix (Pullig et al., 1999, Söder et al., 2002). Darüber hinaus scheint die PZM und insbesondere Kollagen Typ VI als eine Art Mediator zwischen interterritorialer Matrix und Chondrozyt zu fungieren (Poole et al., 1992).

Kollagen Typ I bildet Heterotrimere und kommt in gesundem hyalinem Gelenkknorpel nicht vor, sondern vor allem, in Knochen, Sehnen und Haut (Gelse et al., 2003, Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Es wird jedoch vermehrt in osteoarthrotischem Knorpel und sich dedifferenzierenden Chondrozyten exprimiert (Benya et al., 1978, Miosge et al., 2004, Aigner et al., 2006a, von der Mark et al., 1977, Schnabel et al., 2002).

1.4 Osteoarthrose

Osteoarthrose (OA), im deutschen Sprachgebrauch auch kurz als „Arthrose“ bekannt, ist eine bisher nicht vollständig verstandene Erkrankung des gesamten Gelenks, welche mit Verlust von Knorpelgewebe, Osteophytenbildung, subchondraler Sklerose und einer chronischen Entzündung der Synovia einhergeht (Martel-Pelletier et al., 2008, Aigner et al., 2006b). OA ist einer der häufigsten Gründe für Schmerzen und Immobilität im Alter (Morbidity, 2010), wobei in Deutschland ca. die Hälfte aller Frauen und ein Drittel aller Männer über 60 Jahre an OA leiden (Rabenberg, 2013). Symptome sind vor allem Schmerzen, Immobilität, zunehmender Verlust der Gelenkfunktion bis hin zur vollständigen Gelenkversteifung. Außerdem ist OA die häufigste Gelenkerkrankung des Erwachsenen weltweit (Woolf and Pfleger, 2003, Felson and Zhang, 1998). Zu den Risikofaktoren zählen weibliches Geschlecht, Alter, vorhergehende Gelenktraumata, Übergewicht, genetische Prädisposition, sowie Achsenfehlstellungen (Blagojevic et al., 2010, Felson et al., 2000). Die hohe sozioökonomische Relevanz wird deutlich vor dem Hintergrund, dass die Diagnose OA im Jahre 2008 in Deutschland etwa 7,6 Mrd. Euro direkte Krankheitskosten verursacht hat und 2011 ursächlich für ca. 10 Mio. Arbeitsunfähigkeitstagen war (Rabenberg, 2013).

Grundsätzlich wird zwischen der primären und der sekundären OA unterschieden. Die Ursache der primären OA ist im Allgemeinen ein Überwiegen von mechanischem Stress auf den Gelenkknorpel gegenüber der physiologischen Fähigkeit dieser Belastung standzuhalten. Die sekundäre Arthrose hingegen resultiert aus vorherigen Verletzungen des Gelenkapparats, Gendefekten oder metabolischen Störungen (Aigner et al., 2006b). Im Anfangsstadium der OA ist makroskopisch eine raue und mit kleinen Rissen versehene Gelenkoberfläche zu erkennen. Zudem weicht das Knorpelgewebe zunehmend auf und schwillt an (Aigner et al., 2006b, Maroudas, 1976). Mikroskopisch ist eine progressive Zerstörung des Kollagenfasernetzes sowohl in der EZM als auch in der PZM zu beobachten. Dies resultiert aus einem Ungleichgewicht der Matrix auf- und abbauenden Prozesse. Im

Frühstadium der OA versuchen die Chondrozyten zunächst die Matrixdefekte zu beheben, indem sie z.B. die Kollagen Typ II Expression erhöhen (Hambach et al., 1998a, Aigner et al., 1992). Bei der Degradierung der EZM spielen zum einen die Zerstörung der Kollagenarchitektur und zum anderen ein Verlust der hydrophilen Proteoglykane eine zentrale Rolle. Dabei scheint die Zerstörung des Kollagennetzes jedoch gegenüber dem allgemeinen Abbau von Kollagenen im Vordergrund zu stehen, denn bis zum Endstadium der Krankheit bleibt der Kollagengehalt des Gelenkknorpels nahezu konstant. Allerdings findet im Verlauf der OA ein Verlust an Aggrecan, dem wichtigsten Proteoglykan, statt (Mankin et al., 1971). Es ist jedoch noch ungeklärt, ob zuerst die Beschädigung des Kollagennetzwerks stattfindet oder der Verlust an Proteoglykanen, denn beide Prozesse bedingen einander (Maroudas, 1976). Im Verlauf der Erkrankung werden EZM-degradierende Enzyme wie z.B. Collagenasen durch diverse Entzündungsmediatoren induziert und begünstigen somit ein Fortschreiten der EZM-Degradation. So wird beispielsweise die Kollagen Typ II abbauende MMP-13 und das im Aggrecanabbau beteiligte Enzym ADAMTS-5 in Chondrozyten aus arthrotischen Knorpel vermehrt exprimiert (Billinghurst et al., 1997, Bau et al., 2002). Zwar werden auch vermehrt EZM-Bestandteile wie Kollagen Typ II oder PZM-Bestandteile wie Kollagen Typ VI exprimiert, doch schlussendlich gelingt es den Chondrozyten nicht die zerstörte Matrix zu regenerieren, sodass es zu einem fortlaufenden Verlust von Gelenkknorpel kommt (Aigner et al., 2006a, Miosge et al., 2004).

1.5 Die superfizielle Zone

Die superfizielle Zone des Gelenkknorpels, welche etwa die obersten 300 µm der Gelenkfläche umfasst, stellt eine besondere Knorpelzone dar. Sie ist als oberste Schicht der größten mechanischen Belastung ausgesetzt und unterscheidet sich deutlich von den übrigen Knorpelzonen. In dieser obersten Knorpelschicht verlaufen die Fasern des Kollagennetzwerkes parallel zur Gelenkoberfläche, wobei der Gehalt an Kollagenfasern in dieser Zone am höchsten ist. Biomechanisch betrachtet ist die superfizielle Zone weniger steif und verformt sich unter Druckbelastung

am stärksten (O'Connor et al., 1988). Außerdem unterscheiden sich die Chondrozyten der superfiziellen Zone von denen der übrigen Zonen in Metabolismus, Genexpression und Zellform (Schumacher et al., 1994, Darling et al., 2004, Youn et al., 2006, Aigner et al., 1993). Darüber hinaus besitzt die superfizielle Zone die höchste Zelldichte (Vignon et al., 1976, Egli et al., 1988) und enthält Stamm- und Progenitorzellen von Chondrozyten (Hattori et al., 2007). Die superfizielle Zone spielt eine wesentliche Rolle beim Beginn der OA, da in dieser Zone als erstes das Kollagenetzwerk beschädigt wird (Hollander et al., 1995). Eine weitere Besonderheit der superfiziellen Zone ist, dass in dieser Zone die Chondrozyten in definierten horizontalen räumlichen Mustern organisiert sind. Diese Muster sind sowohl gelenkspezifisch als auch spezienspezifisch und können wie ein „biologischer Fingerabdruck“ für jedes Gelenk verstanden werden. Als wesentliche Muster konnten einzelne Chondrozyten, Chondrozyten-Paare, Einzenstränge (Strings) sowie Clusters identifiziert werden (Rolauffs et al., 2008). Interessanterweise konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass sich die räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten unter Progression der OA verändert. Im vollständig gesunden Gelenkknorpel der Femurkondyle sind die superfiziellen Chondrozyten in Strings organisiert. In frühesten Stadien der OA hingegen, werden die Chondrozyten in Doppelsträngen (Doublestrings) organisiert vorgefunden (Rolauffs et al., 2010). Im Spätstadium der OA können zunächst Small und später Big Clusters beobachtet werden. Unter weiterer Progression der OA geht die räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten vollkommen verloren. Es stellt sich ein Bild von vollkommen diffus verteilten Chondrozyten dar, ohne erkennbares Zell-Organisationsmuster (s. Abbildung 4). Des Weiteren geht ab der Organisationsform der Doublestrings sukzessive die PZM verloren, bis sie bei Big Clustern praktisch nicht mehr vorhanden ist. Damit sind die Chondrozyten völlig „schutzlos“ den Kompressionskräften, die auf die Gelenkfläche wirken, ausgeliefert (Felka et al., 2016), was den OA-assoziierten Zelltod beschleunigen könnte.

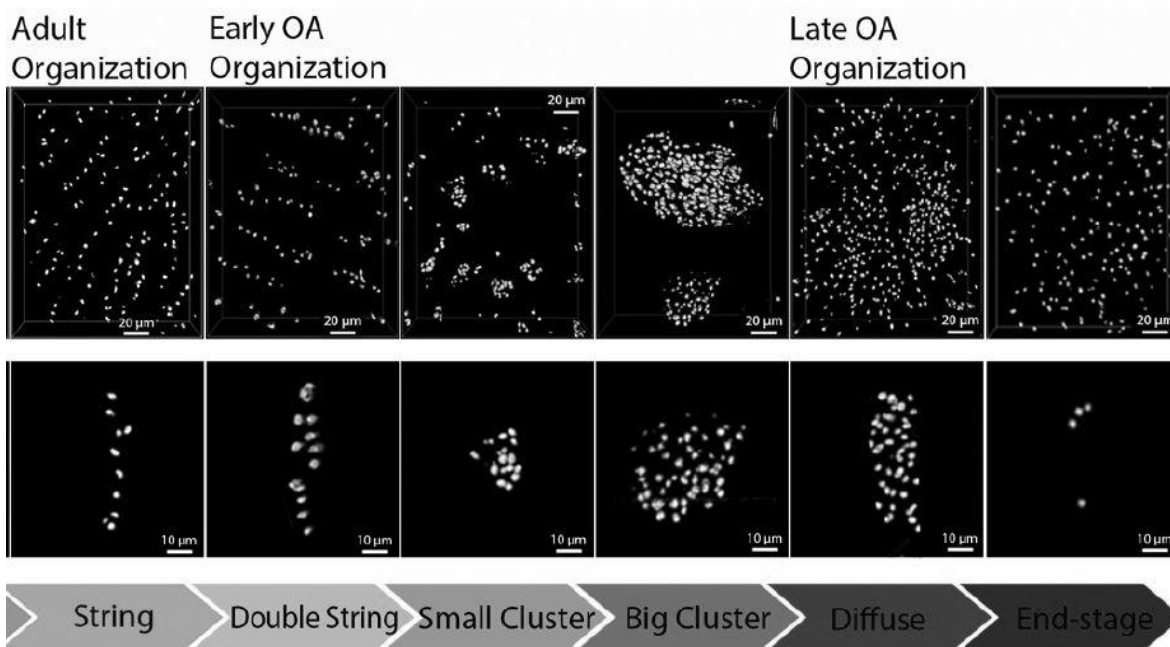


Abbildung 4: Änderung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten unter Zunahme der OA. Dargestellt sind verschiedene Organisationsstadien humaner Chondrozyten der superfiziellen Knorpelzone in Abhängigkeit des OA-Grades. Während Chondrozyten organisiert in Strings den gesunden Phänotyp darstellen, findet man in frühen OA geschädigten Gelenken vor allem Doublestrings. Unter weiterer Progression der OA kann man Chondrozyten organisiert in Small Clusters und darauffolgend in Big Clusters beobachten. Im Spätstadium der OA geht die räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten schließlich vollkommen verloren, sodass sich eine völlig diffuse Zellverteilung zeigt (Felka et al., 2016).

1.6 Ziel der Arbeit

Erstes methodisches Ziel der Arbeit war es, ein mRNA-Extraktionsprotokoll zu erarbeiten, welches eine adäquate Reinheit mit einer maximalen RNA-Gewinnung lieferte, um die relativen mRNA-Expressionsprofile von Kollagen Typ I, II, III und VI in superfiziellen Chondrozyten in definierten räumlichen Organisationsformen ohne eine vorhergehende Zellisolation (z.B. Gewebeverdau mit Proteinase K) im Gewebe zu untersuchen.

Das wesentliche Ziel der Arbeit war es, durch eine organisations-spezifische Analyse der relativen mRNA-Expressionen von Kollagen Typ I, II, III und VI in superfiziellen Chondrozyten erstmals einen Zusammenhang der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten mit phänotyp-relevanten Funktionsparametern zu untersuchen.

Dieses Ziel wurde unter vier spezifischen Fragestellungen verfolgt:

- 1) Gibt es signifikante Unterschiede in der relativen mRNA-Expression spezifischer Kollagen-Typen in verschiedenen Stadien der räumlichen Organisation (z. B. Unterschied in der Kollagen Typ I Expression in Strings und einer diffusen Anordnung)?
- 2) Gibt es signifikante Unterschiede in der relativen mRNA-Expression spezifischer Kollagen-Typen innerhalb einer definierten Organisationsform (z. B. zwischen Kollagen Typ I und II innerhalb der Organisationsform Strings)?
- 3) Gibt es eine signifikante Korrelation zwischen den Expressionen spezifischer Kollagentypen sowohl innerhalb spezifischer Stadien als auch bei der Poolung aller Stadien (z. B. Korrelation von Kollagen Typ I mit II innerhalb der Organisationsform Strings bzw. gepoolt über alle Organisationsformen betrachtet)?
- 4) Gibt es eine signifikante Korrelation zwischen der Expression eines spezifischen Kollagentyps (z.B. Kollagen Typ I) mit spezifischen Stadien der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten (die hierzu folgendermaßen klassifiziert wurden: 1= Strings/Doublestrings, 2= Small Clusters, 3= Big Clusters und 4= Diffus Verteilung)?

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: *Verwendete Verbrauchsmaterialien.* Angegeben sind jeweils Produktname und Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorf-Cups (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg/D
Spatel/Pinzetten (chirurgisch/anatomisch)	Fa. Aesculap, Tuttlingen/D
Skalpell	No. 21 FEATHER Safety Razor Co., Ltd/Japan
Biopsiestanze 4 mm/8 mm	Pfm Medical, Köln/D
Rasierklingen	Müller Drogerie
Blue Caps 10/50 ml	Greiner bio-one, Deutschland
Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche
96-Well-Platten, flach	Greiner bio-one, Deutschland
Petrischale 145 mm x 20 mm	Greiner bio-one, Deutschland
Multi®-SafeSeal®Tubes 1 ml, farblos	Carl Roth GmbH+Co. KG
Pipetten (10,100,200,1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg/D
Pipettenspitzen: Eppendorf Research <i>plus</i> (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg/D
Serological Pipet (5, 10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Schraubbecher 100 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht/D

2.2 Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien. Angegeben sind jeweils Produktname, Hersteller, Kompositionsdetails sowie falls vorhanden die entsprechende CAS-oder die Referenznummer des Herstellers.

Produkt	Hersteller	Details	CAS-/Referenznummer
Cell Tracker Blue CMAC Dye	Thermo Fisher Scientific, USA		C2110
DMEM(1X) = Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco by life technologies	[+] 4,5 g/l D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate 500 ml	41966-029
Fungizone Antimycotic	Gibco by life technologies	Amphotericin B 250 µg/ml 50 ml	15290-026
Penicillin-Streptomycin	Gibco by life technologies	[+] 10 000 Units/ml [+] 10 000 µg/ml	15140-122
Ethanol	SAV-Liquid Production	Ethanol 99 %, vollständig vergällt	ETO-5000-99-1
AnalaR NORMAPUR Ethanol absolut	VWR PROLABO CHEMICALS		64-17-5
4', 6'-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Roche, Schweiz		28718-90-3
Qiagen RNeasy Mini Kit (250)	QIAGEN	Enthält: - RPE-Puffer - RW1- Puffer - RLT-Puffer	74106
RNase-free DNase Set (50x)	QIAGEN	Enthält: -DNase -RDD-Puffer	79254

Advantage RT-PCR-Kit	Clontech	Enthält: - Reaction Buffer - Random hexamer Primer - Oligo dT Primer -MMLV Reverse Transcriptase -Recombinant RNase Inhibitor	639506
PeqGOLD TriFast®	peqLab Erlangen/D		30-2010
PCR grade water	Roche, Schweiz		
Chloroform	Sigma-Aldrich		67-66-3
RNase AWAY	Molecular Bio Products		#7002
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, USA	-RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer - RQ1 RNase-Free DNase - RQ1 DNase Stop Solution	Cat. # M6101

2.3 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte. Angeben ist jeweils das verwendete Gerät mit zugehörigem Hersteller.

Gerät	Hersteller
Light Cycler 480 II	Roche, Schweiz
LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop mit ApoTome	Carl Zeiss GmbH, D
Pipettierhilfe pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt/D
Vortexer (Reax top)	Heidolph Instruments GmbH, D
Sterilbank	BDK; Luft- und Raumtechnik GmbH, D
Absaugpumpe	Laboport, Neuberger, Freiburg/D

Gefrierschrank - 72 °C	GFL
Gefrierschrank - 24 °C	Liebherr Premium, Deutschland
Abzug	Prutscher, Österreich
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Severin, Deutschland
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg/D
Zentrifuge 5242 R	Eppendorf, Hamburg/D
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg/D
Thermocycler UNO II	Biometra, Göttingen/D
Homogenisator Micra D8	Falc Instruments, Italien
NanoDrop 1000 V	peqLab, Erlangen/D

2.4 Software

Tabelle 5: *Verwendete Software.*

Name	Hersteller
Axio Vision 4.8.	Carl Zeiss GmbH, D
Microsoft Office Word/Excel	Microsoft Corporation, USA
Light Cycler® 480 SW 1.5.1	Roche, Schweiz
NanoDrop 1000 V 3.8.1	Thermo Fisher Scientific/USA
SigmaPlot Notebook 12.0	Systat Software GmbH, Erkrath/D
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Software/Irland

2.5 Gewinnung von Knorpelgewebe

Die Knorpelgewebeproben stammten von Patienten der BG Unfallklinik Tübingen. Es wurde eine Knorpelprobe von einem Körperspender der Anatomie Tübingen entnommen. Das untersuchte Patientenkollektiv (n=43) setzte sich aus 12 Männern (Alter 52-78 Jahre) und 31 Frauen (Alter 45-99 Jahre) zusammen. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Knorpel-Knochen-Fragmente aus Kniegelen-

ken, die im Rahmen einer Totalendoprothese operiert wurden, sodass die Gewebeproben die laterale und mediale Femurkondyle, sowie die Interkondylarregion beinhalteten. Die Gewebeproben wurden unter sterilen Bedingungen in Schraubbecher mit 60 ml Transportmedium (56,4 ml DMEM + 1,35 ml Fungizone + 2,25 ml PenStrep) überführt und anschließend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Alle Proben wurden mindestens innerhalb von 24 h nach Entnahme im Labor weiterverarbeitet.

2.6 Herstellung standardisierter Knorpelzylinder

Alle verwendeten Instrumente wurden vor Gebrauch mit Hilfe eines Dampfautoklaviers (HIKLAVEC HV-50) bei 120 °C sterilisiert. Die Rasierklingen und die Unterlage der Schneidevorrichtung aus Hartwachs wurden über 10 min in 100 % Ethanol desinfiziert.

Die Knorpel-Knochen-Fragmente wurden zur weiteren Verarbeitung unter der Sterilbank in eine mit Medium (DMEM) befüllte Petrischale gelegt. Hierbei wurde bei allen Arbeitsschritten sichergestellt, dass die Knorpeloberfläche der Fragmente immer mit Medium benetzt war und nicht austrocknete. Zunächst wurde der Knorpel mit Hilfe eines Skalpells vom subchondralen Knochen abgetrennt. Mit Hilfe von Biopsiestanzen (Pfm medical) mit einem Durchmesser von 4 mm wurden standardisierte Knorpelzylinder aus der abgetrennten Knorpelschicht gestanzt. Da das Medium die ursprüngliche Gelenkoberfläche blass rosa verfärbte, war eine Unterscheidung zwischen der subchondralen Unterseite und der ursprünglichen Gelenkoberfläche makroskopisch möglich. Daraufhin wurden die obersten 300 µm der ursprünglichen Gelenkoberfläche mit einer Schneidevorrichtung und einer Rasierklinge abgetrennt. Der restliche Knorpel der Unterseite wurde verworfen. Die Schneidevorrichtung bestand aus einem Edelstahlblock mit einer 300 µm tiefen und 8 mm breiten runden Vertiefung. Zum Abtrennen der superfiziellen Knorpelzone wurden die Knorpelzylinder mit der ursprünglichen Gelenkoberfläche nach unten in die vorgesehene Vertiefung gelegt. Im Anschluss wurde der Überstand, der

über die 300 µm tiefe Vertiefung hinausragte, mit einer handelsüblichen Rasierklinge abgetrennt. Somit bleiben in der Vertiefung die obersten 300 µm der ursprünglichen Gelenkoberfläche. Alle geschnittenen Knorpelzylinder wurden in einem mit Medium gefüllten 2,0 ml Eppendorf-Cups gesammelt und drei Mal mit Medium (DMEM) gewaschen, indem das alte Medium mit einer Glaspipette abgesaugt wurde und anschließend frisches Medium hinzugegeben wurde.

2.7 Zellkernfärbung

Zur Zellkernfärbung wurde DAPI zum Medium (DMEM) im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben. Jeweils 150 µl Färbelösung wurden pro Well auf eine 96-Well-Platte verteilt. Die geschnittenen Knorpelzylinder wurden daraufhin in die einzelnen Wells verteilt und für ca. 15 min unter Lichtverschluss im Kühlschrank inkubiert.

2.8 Analyse der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Mikroskopie, welche sich den Einsatz von sogenannten Fluorochromen zu Nutze macht. Werden Fluorochrome mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so strahlen sie wenig später Licht einer anderen Wellenlänge zurück. Mit Hilfe eines Filters kann man dafür sorgen, dass nur das von den Fluorochromen abgestrahlte Licht im Mikroskop detektiert wird. Somit werden nur die Strukturen sichtbar gemacht, an welche zuvor der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff gebunden wurde (Niedermayr, 2010). In dieser Arbeit wurde zur Darstellung der Zellkerne 4', 6'-diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) verwendet.

Die Analyse der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten erfolgte mit dem LSM 510 (Zeiss) mit der Software Axiovision Version 4.8.2. Die Knorpelzylinder wurden in einer 96-Well-Platte betrachtet, wofür es eine spezielle Einspannvorrichtung gab. Die Analyse fand unter Verwendung des 10-fach Vergrößerungsobjektivs und des Lichtkanals DAPI statt. Die Knorpelzylinder wurden über das

Eye-piece von oben auf die ehemalige Gelenkfläche schauend betrachtet und der jeweiligen räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten zugeordnet. Dabei wurde zwischen den Organisationsformen Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters und einer diffusen Verteilung unterschieden.

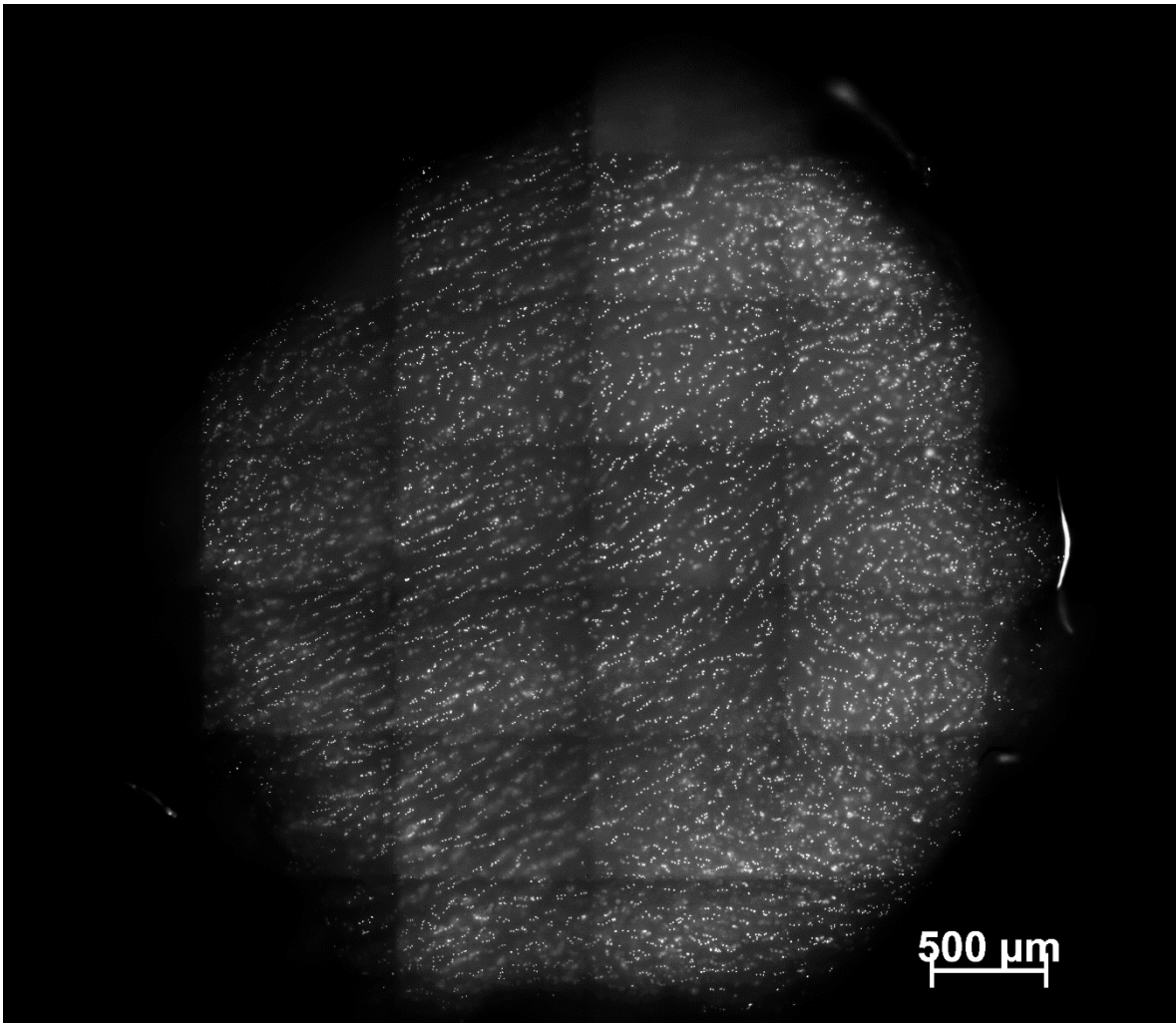


Abbildung 5: Schwarz-weiß Mosaikaufnahme eines Knorpelzylinders. Abgebildet ist eine exemplarische schwarz-weiß Mosaikaufnahme eines 4 mm durchmessenden, 300 µm dicken Knorpelzylinders der superfiziellen Zone, dessen Chondrozyten zuvor mit DAPI angefärbt wurden. Man blickt von oben auf die Gelenkfläche des Knorpelzylinders, welcher in diesem Beispiel überwiegend Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform String/Doublestrings aufweist.

Von den meisten Patienten wurden exemplarische Mosaikaufnahmen der vorherrschenden Muster gemacht. Es wurden rechteckige Mosaikaufnahmen angefertigt, wobei in der Regel eine Mosaikaufnahme bestehend aus 5 x 5 Einzelbilder ausrei-

chend waren (s. Abbildung 5). Die Belichtungszeit wurde zuvor für alle Bilder gemeinsam festgelegt, wohingegen der Fokus für jedes Einzelbild des Mosaiks manuell eingestellt wurde.

2.9 Theoretische Einführung in die Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist ein Verfahren, mit welchem eine Quantifizierung der Genexpression von Zellen möglich ist. Zu Anfang muss die mRNA aus den zu untersuchenden Zellen extrahiert werden. Hierfür war es notwendig das Knorpelgewebe zu homogenisieren, um die Chondrozyten aus dem Knorpelgewebe zu isolieren und sie für die Lysereagenzien zugänglich zu machen. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus einer Trizol-basierten (peqLab TriFast®) und einer Kieselgel-basierten Säulenextraktion (Qiagen) verwendet, um die Vorteile beider Methoden zu vereinen. Das Prinzip für die Trizol-basierte mRNA Extraktion entstammt der von Piotr Chomczynski 1987 erstmals beschriebenen Extraktionsmethode (Chomczynski and Sacchi, 1987). Das detaillierte Extraktionsprotokoll für die TriFast®-Extraktion stammt von Frau Rosa Riester (MTA im zellbiologischen Forschungslabor der orthopädischen Abteilung des UKTs). Die anschließende Kieselgel-basierte Säulenextraktion wurde nach Anleitung des Herstellers Quiagen durchgeführt (Quiagen, 2011). Der Schritt zur Zusammenführung beider Protokolle wurde aus dem Material und Methoden-Teil des 2002 erschienenen Papers „The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis“ von Jo S. Price entnommen (Price et al., 2002).

2.9.1 mRNA-Extraktion

Bei der Trizol-basierten Extraktion mit TriFast® (peqLab) kommt hauptsächlich Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol in Kombination mit Chloroform zum Einsatz. Die chaotrope Wirkung des GTC bewirkt zum einen die Lyse der Zellmembran, zum anderen kommt es zur Denaturierung sämtlicher Proteine. Daraus folgt eine Inhibition von RNasen und DNasen, sodass ein weiterer Abbau der mRNA in

der Probe durch RNase unterbunden wird. Durch die Chloroformzugabe entsteht nach der Zentrifugation die typische Ausbildung dreier Phasen. Die unterste Phase ist rötlich und enthält hauptsächlich Proteine und Lipide. Die darüberliegende schmale milchig-weiße Interphase bindet überwiegend DNA. Die oberste wasserklare Phase enthält die gelöste mRNA, die es zu isolieren gilt (Chomczynski and Sacchi, 1987, Cox, 1968).

Die Säulenextraktion mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) beruht auf dem Prinzip Nukleinsäuren an eine geladene Matrix zu binden. In den Extraktionsäulen des RNeasy Mini Kits befinden sich Kieselgel-Membranen, an welche die negativ geladenen Nukleinsäuren durch ionische Wechselwirkungen mit der Kieselgelmatrix gebunden werden. Durch Zusatz verschiedene Waschpuffer (RW1- und RPE-Puffer) werden unerwünschte Proteine, Kohlenhydrate und Salze, welche den späteren Umschreibungsprozess und die PCR negativ beeinflussen können, ausgewaschen. Zudem ist in das Protokoll ein DNase-Schritt integriert, wobei DNA, welche bei der vorangegangenen TriFast® -Extraktion nicht eliminiert wurde, zusätzlich verdaut und ausgewaschen wird. Zum Schluss wird die mRNA von der Kieselgel-Membran in RNase-freiem Wasser gelöst und bis zur Weiterverarbeitung bei -72 °C gelagert (Padhye et al., 1997).

2.9.2 Umschreibung der mRNA zu cDNA

Für die qRT-PCR wird DNA benötigt, weshalb die isolierte mRNA zu cDNA mittels Reservetransskriptsase umgeschrieben werden muss. Hierfür wurde das Advantage RT-for-PCR Kit der Firma Clontech verwendet. Das Enzym Reverse-transskriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche es ermöglicht, anhand eines RNA-Einzelstrangs einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Als Startpunkt für die Reversetransskriptase wird ein freies 3'-OH benötigt, welches durch sogenannte Primer zur Verfügung gestellt werden. Primer sind Oligonukleotide, die sich komplementär an die RNA-Stränge anlagern können und als Startpunkt für Polymerasen dienen. Für die Umschreibung werden zwei verschie-

dene Primer verwendet. Zum einen kommen „Random-Hexamer“-Primer zum Einsatz, welche eine zufällige Sequenz aus sechs Nukleotiden besitzen und zufällig an komplementäre Bereiche der RNA binden. Zudem werden sogenannte „Oligo-dT“-Primer hinzugegeben, welche komplementär an den Poly-Adenin-Schwanz binden, welcher bei jeder mRNA vorhanden ist (Rassow et al., 2008, Clontech Laboratories, 2010).

Zu Anfang wird das Gemisch aus Primern und isolierter mRNA für 2 min auf 70 °C erhitzt, wobei das sogenannte „Annealing“ stattfindet. Dabei lagern sich die oben genannten Primer an die RNA-Einzelstränge an. Im Anschluss ist ein rasches Abkühlen notwendig, damit sich die Primer nicht wieder lösen. Nach Zugabe des Master-Mix, welcher unter anderem die Reversetranskriptase enthält, wird das Reaktionsgemisch für eine Stunde auf 42 °C erwärmt, da dies die optimale Arbeitstemperatur der Reversetranskriptase ist. Zum Schluss erfolgt ein fünfminütiger Denaturierungsschritt, um die Reversetranskriptase zu inaktivieren.

2.9.3 Die Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient grundsätzlich zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Hauptbestandteile für eine PCR sind die zu vervielfältigende DNA-Fragmente, eine DNA-Polymerase und die entsprechenden Primer, die in ihrer Sequenz mit dem Anfang des zu amplifizierenden Gens übereinstimmen müssen. Zudem müssen Nukleotidtriphosphate (dNTPs) zur Verfügung gestellt werden. Eine PCR läuft in mehreren identischen Zyklen ab, wobei sich jeder Zyklus aus drei Teilschritten zusammensetzt:

1. Denaturierungsphase

Hierbei wird das Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge zu trennen. Das ist zwingend notwendig, da sich die Primer nur an DNA-Einzelstränge anlagern können.

2. Annealing-Phase

Bei diesem Schritt wird das Reaktionsgemisch für 30 sek auf ca. 60 °C abgekühlt, damit sich die Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern können. Hierfür benötigt es sowohl einen Primer, der sich an das 5'-Ende anlagert, als auch einen weiteren, der zum 3'-Ende komplementär ist. Daher unterscheidet man einen „forward“ und einen „backward“-Primer. Diese Primer stellen für die DNA-Polymerase die nötige 3'-OH-Bindungsstelle zur Verfügung, da die DNA-Polymerase den neuen komplementären Strang ausschließlich von 5'- nach 3'-Richtung synthetisieren kann.

3. Elongationsphase

Sobald die Primer an die zu vervielfältigenden DNA-Einzelstränge gebunden sind, bindet die DNA-Polymerase an das freie 3'-OH-Ende der Primer und synthetisiert unter Verwendung, der vorher hinzugefügten dNTPs, den neuen komplementären DNA-Strang. Die optimale Arbeitstemperatur liegt bei ca. 72 °C. Zu beachten ist, dass eine spezielle DNA-Polymerase zum Einsatz kommt. Hierbei handelt es sich um eine besonders hitzstabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, welche auch in der Denaturierungsphase bei 95 °C keinen Schaden nimmt (Rassow et al., 2008, National Center for Biotechnology Information, 2014, Roche, 2016).

2.9.4 Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) stellt eine Modifikation des oben erläuterten Verfahrens dar, durch welche es möglich ist, eine quantitative Aussage über die Genexpression von Zellen zu machen.

Hierfür wählt man zunächst mindestens zwei Referenzgene aus (MIQE-Guidelines (Huggett et al., 2013)). Hierbei handelt es sich in der Regel um sogenannte „Housekeeping“-Gene, die unabhängig vom metabolischen Zustand der Zelle konstant exprimiert werden. Das zu untersuchende Gen (engl. Target-Gene) wird immer im Verhältnis zu den Referenzgenen betrachtet. Daher handelt es sich um eine relative Quantifizierung, die sich immer auf die konstante Expression der Referenzgene bezieht. Somit können Expressionsunterschiede bezüglich des Target-Gens verschiedener Zellen detektiert und verglichen werden.

Zur eigentlichen Quantifizierung des in der PCR produzierten Amplifikats wird nach jedem Zyklus eine photometrische Messung durchgeführt. Hierfür muss man dem Reaktionsansatz vor der PCR sogenannte Sonden hinzufügen. Diese Sonden binden spezifisch an die Gensequenz, die es zu quantifizieren gilt und senden ein Fluoreszenzsignal aus, sobald sie gebunden haben. Da das Fluoreszenzsignal somit proportional zur amplifizierten Menge der Zielsequenz ist und die Menge der cDNA innerhalb der Probe abhängig von der ursprünglich vorhandenen mRNA ist, lässt sich folglich die relative Genexpression des Zielgens zu den Referenzgenen bestimmen (Heid et al., 1996, Arya et al., 2014).

2.10 Protokoll der mRNA-Extraktion, cDNA-Umschreibung und qRT-PCR

2.10.1 Aufbereitung der Proben

Um eine ausreichende mRNA-Menge zu garantieren wurde eine Probe mit 15 ± 3 Knorpelzylindern definiert. Hierfür war es größtenteils nötig die entsprechenden Knorpelzylinder aus verschiedenen Patientenproben zu poolen, da meistens aus einer Patientenprobe nicht 15 ± 3 Knorpelzylinder von einem Muster zu isolieren waren. Im Anschluss an die Musteranalyse, wurden die Knorpelzylinder entsprechend ihrer Muster sortiert und in Multi-SafeSeal-Tubes (Roth, 7083.1) mit 300 μ l Trizollösung (TriFast® peq gold) bei 4 °C überführt. Daraufhin wurden die Proben mittels flüssigem Stickstoff in der TriFast®-Lösung schockgefroren und bis zur eigentlichen Extraktion bei -72 °C gelagert.

2.10.2 mRNA-Extraktion

Zunächst wurden die Proben aufgetaut und während des gesamten Homogenisierungsprozesses auf Eis gelagert. Vor jeder Homogenisierung erfolgte ein standardisiertes Reinigungsverfahren. Hierfür wurde die Welle samt Rotationsmesseraufsatz als erstes in doppeldestilliertem Wasser (Millipore) abgespült. Daraufhin erfolgte eine Desinfektion in 100 % Ethanol und im Anschluss daran eine 30 sekündige Inkubation in RNaseAway®-Lösung (Molecular Bio Products). Zum Schluss wurde erneut mit doppeldestilliertem Wasser gespült. Dieses Reinigungsverfahren wurde immer vor der Homogenisierung einer neuen Probe durchgeführt, um die Vermischung von Probenmaterial zu verhindern. Zudem wurde nach der Homogenisierung jeder Probe der Rotationsmesseraufsatz in einem leerem Tube mit 300 μ l TriFast®-Lösung gespült, um Knorpelreste, die noch am Aufsatz haften geblieben sind, zu lösen.

Vor der weiteren Extraktion wurden die homogenisierten Proben bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Zudem wurde der Inhalt der Tubes mit TriFast®-Lösung,

die zur Abspülung verbliebener Knorpelreste am Homogenisator dienten, zu der jeweiligen Probe hinzugefügt und das Volumen der Probe mit TriFast® auf 1 ml aufgefüllt und nochmals gut durchmischt. Nach diesem Schritt wurden die Proben für 10 min mit 12000 rcf bei 4 °C zentrifugiert. Hierbei setzten sich die homogenisierten Knorpelfragmente am Boden des Tubes ab, sodass der TriFast®-Überstand problemlos abpipettiert und in ein frisches Eppendorfgefäß gefüllt werden konnte. Zu dem abpipettierten Überstand wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch für 30 sek auf dem Vortexer homogenisiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Darauf folgte eine Zentrifugation von 15 min mit 12000 rcf bei 4 °C. Nach der Zentrifugation wurde die Bildung von drei Phasen in der Lösung sichtbar (Extraktionsprotokoll von Frau Rosa Riester, MTA im zellbiologischen Forschungslabor der UKTs).

Unter äußerster Vorsicht wurde die obere wässrige Phase abpipettiert, ohne die darunterliegenden Phasen zu tangieren und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dann wurde zu halben Volumenanteil 100 % Ethanol zur Fällung der gelösten mRNA hinzugefügt und gut durchmischt (Price et al., 2002).

Als Nächstes wurde das gesamte Lösungsvolumen auf eine Extraktionssäule (Qiagen RNeasy Mini Kit (250)) pipettiert und anschließend für 30 sek bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und auf die Kieselgelmembran, an welcher nun die mRNA gebunden war, 350 µl RW1-Waschpuffer gegeben und erneut für 30 sek bei 10000 rpm zentrifugiert. Um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden, folgte ein DNase-Schritt. Hierfür wurden 10 µl DNase-Stocklösung in 70 µl RDD-Puffer gelöst, vorsichtig auf die Kieselgelmembran pipettiert und für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte ein weiterer Waschschrift mit RW1-Puffer für 30 sek mit 10000 rpm. Daraufhin schlossen sich zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500 µl RPE-Puffer an. Dabei fand der erste Waschschrift bei einer Zentrifugation von 10000 rpm für 30 sek statt, wohingegen der zweite Waschschrift bei 14680 rpm für 3 min durchgeführt wurde. Zum Schluss wurde die leere Säule nochmals in ein frisches Tube gesetzt und für

1 min bei 14680 rpm zentrifugiert, um letzte Waschpufferreste zu eliminieren. Als letzter Schritt wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung der isolierten mRNA-Proben bis zum Umschreibungsprozess in cDNA fand bei -72 °C statt (Quiagen, 2011).

2.10.3 Etablierung: Einführung eines DNase-Verdau-Schritts

Bei der Etablierung des in 2.9.6. genannten mRNA-Extraktionsprotokolls wurde im Vorfeld versucht, im Anschluss an die mRNA-Extraktion mittels TriFast® einen separaten DNase Verdau (Promega) einzuführen, um auf die nachfolgende Kieselgelmembran-Extraktion verzichten zu können.

Hierfür wurden 10 µl der mit TriFast®-extrahierten mRNA 1 µl RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer hinzugegeben, sowie 1 µl pro µg RNA der RQ1 RNAase-Free DNase. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch zunächst für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl der RQ1 DNase Stop-Solution hinzugegeben und für weitere 10 min bei 65 °C inkubiert (Promega, 2009).

2.10.4 Ermittlung der mRNA-Menge

Für jede mRNA-Probe wurde vor der Umschreibung zu cDNA mit Hilfe eines Spektrometers (NanoDrop 1000) die mRNA-Konzentration und - Reinheit (A260/280) bestimmt. Die Analyse erfolgte mit einer Volumenmenge von 1,5 µl und die Kallibrierung stets mit dem RNase-freiem Wasser, in dem die jeweilige Probe gelöst wurde. Alle Messungen wurden einmalig wiederholt und der Mittelwert errechnet.

2.10.5 Umschreibung der mRNA zu cDNA

Die Umschreibung der isolierten mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe des Advantage RT-for-PCR-Kits (Clontech) durchgeführt. Zunächst wurde der Annealingschritt ausgeführt, indem 11,5 µl Probenvolumen mit 1 µl Random-Hexamer-Primer und 1 µl Oligo-dT-Primer für 2 min bei 70 °C im Thermoblock inkubiert wurden. Danach wurden die Proben umgehend auf Eis gesetzt, um eine schnelle Abkühlung zu erreichen. Im darauffolgenden Schritt wurde der Mastermix angesetzt, welcher pro Probe aus 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 1 µl MMLV-Reverse-Transskriptase bestand. Nach Abkühlung der Proben wurde der Mastermix hinzu pipettiert, gut gemischt und anschließend für 60 min bei 42 °C im Thermocycler (UNO II, Biometra) inkubiert. Zum Schluss folgte ein fünfminütiger Denaturierungsschritt bei 95 °C. Die Proben wurden danach wieder auf Eis gesetzt und zusätzlich mit 20 µl RNase-freiem Wasser verdünnt (1:1-Verdünnung), um ein größeres Probenvolumen für die qRT-PCR zu erhalten (Clontech Laboratories, 2010).

2.10.6 Quantitative Real Time Polymerase-Chain-Reaction (qRT-PCR)

Die PCR fand unter Verwendung des Light Cycler 480 (Roche) statt. Der Reaktionsmix enthielt pro Probe 10 µl Mastermix (Light Cycler 480 Probes Master), 5,5 µl RNase-freies Wasser (PCR grade Water, Roche), jeweils 1 µl Primer in 3'-5' (forward) und 5'-3'-Richtung (backward), sowie 0,5 µl der entsprechenden TaqMan-Sonde (Roche).

Die gesamte PCR wurde auf spezielle 96-Well-Platten pipettiert. Dabei wurden 18 µl Mastermix und 2 µl der entsprechenden Probe in ein Well gegeben. Jegliche Proben wurden doppelbestimmt, ebenso wie die Positiv- und Negativkontrollen. Als Positivkontrolle diente eine verdünnte Probe, die für alle durchgeführten qRT-PCR-Reaktionen verwendet und nie gewechselt wurde. Für die Negativkontrolle wurde statt einer Probe lediglich 2 µl des verwendeten RNase-freien Wassers verwendet.

Als Referenzgene wurden GAPDH und RPL13A gewählt (Tabelle 6). Es konnte zwar gezeigt das GAPDH in Chondrozyten im Vergleich zu RPL13A weniger konstant exprimiert wird (Pombo-Suarez et al., 2008), jedoch ist GAPDH das klassische Housekeeping-Gen in der bisherigen Literatur. Daher wurde GAPDH dennoch ausgewählt, um die Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erhobenen quantitativen Expressionsdaten mit denen der bisherigen wissenschaftlichen Literatur zu gewährleisten. RPL13A stellte sich als äußerst stabiles Housekeeping-Gen in Chondrozyten heraus (Pombo-Suarez et al., 2008). Die untersuchten Zielgene waren COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL6A1 (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Verwendete Primersequenzen für die qRT-PCR von 5' nach 3'. C=Cytosin, A=Adenin, G=Guanin, T=Thymin. Alle Primersequenzen sind sondenbasiert und wurden entstammen „RealTime ready Assays“ der Firma Roche.

Gen	Primersequenz (5' nach 3')
GAPDH	f: CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC r: ACGACCAAATCCGTTGACT
RPL13A	f: CTGGACCGTCTCAAGGTGTT r: GCCCCAGATAGGCAAACCTT
COL1A2	f: TCTGGAGAGGCTGGTACTGC r: GAGCACCAAGAAGACCCTGA
COL2A1	f: CTGGTCCTCAAGGCAAAGTT r: GAGGTCCAGGACGACCATC
COL3A1	f: ACTGGAGCACGGGGTCTT r: TCCTGGTTTTCCCACTTTCAC
COL6A1	f: GAAGAGAAGGCCCCGTTG r: CGGTAGCCTTTAGGTCCGATA

Die Effizienzen für alle Primer wurden dreimalig mit einer 1:10-Verdünnungsreihe getestet und daraus der Mittelwert bestimmt (s. Tabelle 7). Anschließend wurde für die Auswertung jeweils diejenige Standardkurve ausgewählt, welche dem Mittelwert am Nächsten kam.

Tabelle 7: Ermittelte Primereffizienzen. Für jedes Referenz- und Zielgen wurde die Effizienz dreimalig bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert bestimmt und diejenige Standardkurve für die spätere quantitative Bestimmung verwendet, welche dem Mittelwert am Nächsten kam. Die für die Auswertung verwendete Standardkurve ist jeweils fett gedruckt hervorgehoben.

Primer	Effizienz 1	Effizienz 2	Effizienz 3	Mittelwert
COL1A2	1,997	1,874	1,928	1,933
COL2A1	2,011	1,870	1,873	1,918
COL3A1	1,986	1,871	1,948	1,935
COL6A1	1,933	1,976	1,846	1,918
RPL13A	1,957	2,010	1,842	1,936
GAPDH (Uynuk-Ool, 2014)	1,940	2,010	1,981	1,977

Folgende TaqMan-Sonden wurden für die qRT-PCR mit dem Light Cycler 480 (Roche) verwendet (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Verwendete TaqMan-Sonden für die qRT-PCR. Angegeben sind für jedes Zielgen jeweils die verwendete TaqMan-Sonde und ihre Listennummer (#) in der Universal ProbeLibrary von Roche, sowie die entsprechende Produktnummer der Firma Roche (Roche-Diagnostics, 2016).

Zielgen	Sondennummer (Universal ProbeLibrary)	Produktnummer
GAPDH	# 60	04688589001
RPL13A	# 157	04694449001
COL1A2	# 79	04689020001
COL2A1	# 50	04688112001
COL3A1	# 131	04694155001
COL6A1	# 80	04689038001

Das angewendete qRT-PCR-Programm des Light Cycler 480 (Roche) setzte sich wie in Tabelle 9 aufgeführt zusammen.

Tabelle 9: Verwendetes qRT-PCR Programm des Light Cycler 480. Für jeden Schritt oder Teilschritt (siehe Amplifizierung) sind jeweils die Temperatur, die Dauer und die Anzahl der Wiederholungen des Zyklus angegeben.

Schritt		Temperatur	Dauer	Wiederholung
Pre-Inkubation		95 °C	10 min	0
Amplifizierung	Denaturierung	95 °C	10 sek	40
	Annealing	60 °C	30 sek	40
	Elongation	72 °C	1 sek	40
Abkühlen		40 °C	30 sek	0

2.10.7 Auswertung der qRT-PCR-Daten

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit Hilfe der zum Light Cycler 480 gehörigen Software LightCycler 480® SW 1.5.0. In jeder qRT-PCR-Datei wurden zunächst die Subsets für jedes Gen generiert, welche alle Proben eines Gens inklusive der dazugehörigen Positiv- und Negativkontrollen enthielt. Anschließend wurde für jede Probe im „Sample Editor“ Name, Genname, Referenz/Target und ob es sich um eine Kontrolle oder eine Probe handelt, eingegeben. Da alle Proben doppelt bestimmt wurden, wurden identische Proben über die Funktion „Make Replicates“ verknüpft. Im Analysemodus wurde für jedes Subset über „Advanced Relative Quantification“ unter folgenden Grundeinstellungen die Expressionsdaten kalkuliert (s. Abbildung 6):

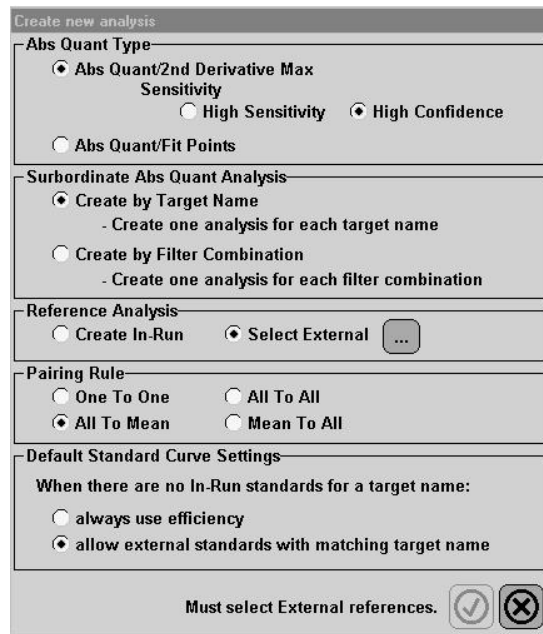


Abbildung 6: Programmeinstellung zur Auswertung der gemessenen qRT-PCR-Daten. Abgebildet ist die Grundeinstellung im Programm Light Cycler® 480 SW 1.5.1., welches zur Analyse der gemessenen PCR-Daten mit der „Advanced Relative Quantification“ verwendet wurde, um die relative mRNA-Expression zu errechnen.

Als externe Referenz wurde der eigentliche „Run“ wieder angewählt, da die „Create-in-Run-Funktion“ nicht fehlerfrei funktioniert hat. Als externe Standards für die Effizienzen wurden die Standardkurven aus Tabelle 7 verknüpft.

Eine exemplarische Auswertung ist in Abbildung 7 dargestellt.

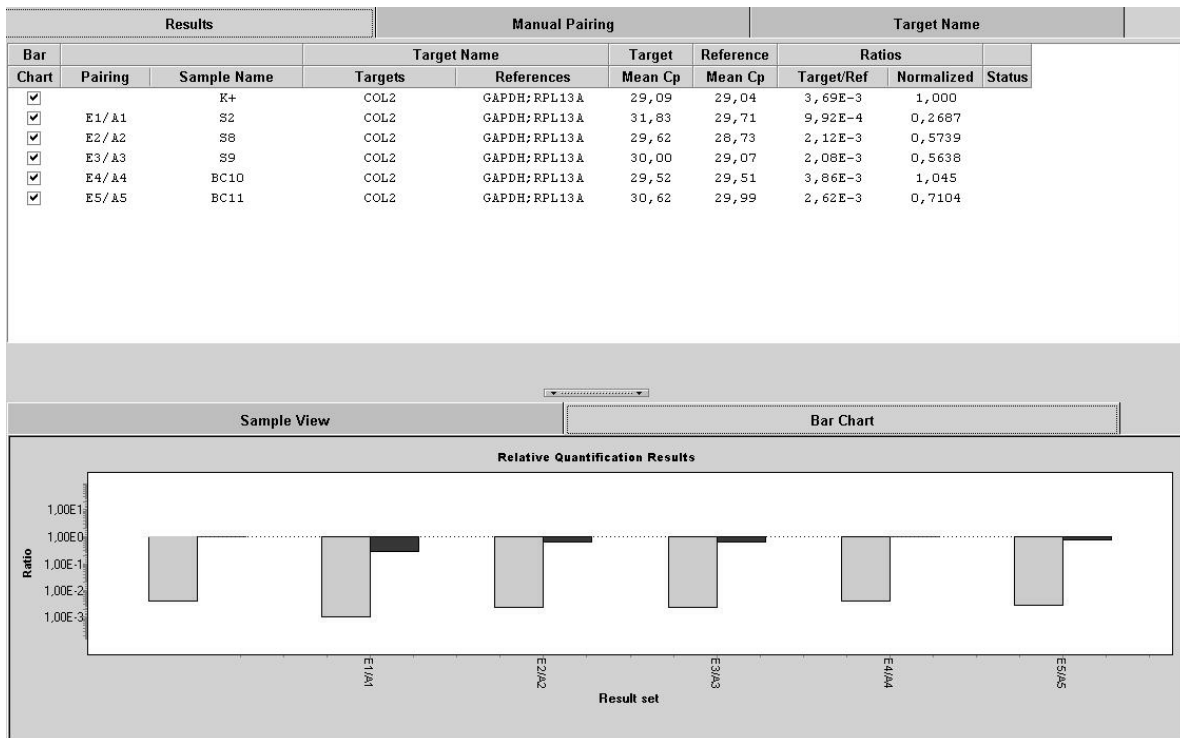


Abbildung 7: Exemplarisches Auswertungsergebnis der erhobenen qRT-PCR- Expressionsdaten mittels des Light Cycler 480. Dargestellt ist beispielhaft eine abgeschlossene Auswertung relativer mRNA-Expressions Rohdaten unter der Verwendung des Programms Light Cycler® 480 SW 1.5.1. mit der Analyseform: "Advanced Relative Quantification".

Mit den zur Positivkontrolle normalisierten Werten (letzte Spalte in Abbildung 7) wurde in der statistischen Auswertung der Genexpressionsprofile weitergearbeitet.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Expressionsdaten wurde in dieser Arbeit mit Sigma Plot Notebook 12.0 durchgeführt. Alle Daten wurden zunächst auf Normalverteilung getestet. Die qRT-PCR-Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt. Die gemessenen Einzelwerte wurden sowohl für die Bildung des arithmetischen Mittelwerts, die graphische Darstellung als auch für die statistische Auswertung verwendet. Bei nicht normalverteilten Datensätzen zweier unabhängiger Gruppen wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewendet, um statistisch signifikante Unterschiede zu prüfen. Für den Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde der One-Way-ANOVA on

ranks (Kruskal–Wallis) mit dem Post-hoc Test nach Dunn angewandt. Für den Vergleich zweier normalverteilter unabhängiger Gruppen wurde der two-tailed t-Test verwendet. Für den Vergleich der normalverteilten Datensätze mehrerer unabhängigen Gruppen wurde der One-Way Anova Test verwendet. Für die Auswertung der Korrelation zwischen den verschiedenen Kollagen-mRNA-Expressionsprofilen wurde die Pearson Produkt Moment Korrelation ermittelt. Die Korrelation zwischen der relativen mRNA-Kollagenexpression und den verschiedenen räumlichen Organisationsformen der superfiziellen Chondrozyten wurde mit Hilfe der Spearman-Rank-Order-Korrelation bestimmt. Hierfür war folgende Kodierung der räumlichen Organisationsformen notwendig: String/Doublestring=1, Small Clusters=2, Big Clusters=3 und Diffus=4.

Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht der Verteilung der räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten in den untersuchten Knorpelzylindern des Patientenkollektivs

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten und deren mRNA-Expression verschiedener Kollagene (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevanten Funktionsparametern besteht. Hierfür wurden standardisierte Knorpelzylinder der superfiziellen Zone des Gelenkknorpels von 43 Patienten hergestellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop entsprechend der vorherrschenden räumlichen Organisationsform (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) der superfiziellen Chondrozyten klassifiziert (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht über die Verteilung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten in den untersuchten Knorpelzylindern des Patientenkollektivs (n=43). Es wurde für jede Knorpelprobe eines Patienten dokumentiert, wieviele standardisierte Knorpelzylinder insgesamt entommen wurden und der Prozentsatz der gefundenen räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) errechnet.

	Gesamtzahl entommener Knorpelzylinder	Strings/ Double-strings	Small Clusters	Big Clusters	Diffus
Patient 1	21	29 %	62 %	0 %	10 %
Patient 2	34	56 %	24 %	15 %	6 %
Patient 3	46	46 %	22 %	20 %	13 %
Patient 4	26	42 %	27 %	15 %	15 %
Patient 5	19	32 %	53 %	5 %	11 %
Patient 6	14	7 %	36 %	43 %	14 %
Patient 7	31	29 %	42 %	19 %	10 %
Patient 8	35	0 %	83 %	0 %	17 %
Patient 9	24	0 %	58 %	29 %	13 %
Patient 10	14	100 %	0 %	0 %	0 %
Patient 11	20	50 %	35 %	15 %	0 %
Patient 12	10	70 %	20 %	10 %	0 %
Patient 13	22	64 %	27 %	9 %	0 %

Patient 14	15	93 %	7 %	0 %	0 %
Patient 15	9	89 %	11 %	0 %	0 %
Patient 16	9	67 %	33 %	0 %	0 %
Patient 17	30	67 %	10 %	23 %	0 %
Patient 18	11	0 %	55 %	18 %	27 %
Patient 19	11	0 %	9 %	45 %	45 %
Patient 20	26	88 %	12 %	0 %	0 %
Patient 21	18	100 %	0 %	0 %	0 %
Patient 22	2	0 %	0 %	0 %	100 %
Patient 23	27	41 %	7 %	26 %	26 %
Patient 24	20	5 %	15 %	50 %	30 %
Patient 25	22	77 %	23 %	0 %	0 %
Patient 26	21	0 %	38 %	62 %	0 %
Patient 27	12	17 %	0 %	75 %	8 %
Patient 28	14	0 %	21 %	79 %	0 %
Patient 29	36	28 %	36 %	8 %	28 %
Patient 30	28	21 %	25 %	25 %	29 %
Patient 31	19	0 %	0 %	53 %	47 %
Patient 32	21	24 %	29 %	29 %	19 %
Patient 33	20	25 %	0 %	0 %	75 %
Patient 34	29	41 %	7 %	17 %	34 %
Patient 35	7	0 %	0 %	100 %	0 %
Patient 36	21	14 %	43 %	29 %	14 %
Patient 37	35	49 %	20 %	23 %	9 %
Patient 38	18	67 %	22 %	11 %	0 %
Patient 39	20	35 %	65 %	0 %	0 %
Patient 40	17	0 %	0 %	0 %	100 %
Patient 41	9	0 %	0 %	0 %	100 %
Patient 42	4	0 %	0 %	0 %	100 %
Patient 43	12	100 %	0 %	0 %	0 %

Bei 82 % der untersuchten Patientenproben wiesen die superfiziellen Chondrozyten zwei oder mehrere räumliche Organisationsformen auf. Somit zeigte sich grundsätzlich eine ausgeprägte Heterogenität in der Verteilung der räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten innerhalb der Patientenproben.

3.2 Etablierung des Protokolls zur mRNA-Extraktion aus Chondrozyten der superfiziellen Zone humaner Kniegelenkskondylen

3.2.1 Wahl des mRNA-Extraktionsverfahrens aus standardisierten Knorpelzylindern der superfiziellen Knorpelzone humaner Kniegelenkskondylen

Erstes methodisches Ziel der Arbeit war es, ein mRNA-Extraktionsprotokoll zu erarbeiten, welches eine adäquate Reinheit mit einer maximalen mRNA-Gewinnung lieferte, um die Genexpressionsprofile von Kollagen Typ I, II, III und VI in superfiziellen Chondrozyten in definierten räumlichen Organisationsformen ohne eine vorhergehende Zellisolation aus dem Gewebe zu untersuchen. Bisher mussten die Chondrozyten mittels verschiedener Gewebeverdaumethoden aus dem Knorpelgewebe zunächst isoliert werden. Erst im Anschluss daran konnte man mit der eigentlichen mRNA-Isolation mittels Kieselgelmembran-Säulchen beginnen. Solche Gewebeverdaumethoden nahmen teils mehrere Stunden Inkubationszeit bei höheren Temperaturen in Anspruch, wobei der Einfluss dieser Inkubationszeit auf die mRNA-Expression der Chondrozyten unklar ist. Aus diesem Grund war es nötig, ein mRNA-Extraktionsverfahren zu finden, mit welchem eine mRNA-Isolation direkt aus dem Gewebe möglich war. Das TriFast®-Extraktionsverfahren (Chomczynski and Sacchi, 1987, Riester, 2014) erlaubte es, das Gewebe direkt in der TriFast®-Puffer-Lösung zu homogenisieren (siehe Material und Methoden). Deshalb wurde im ersten Schritt die bisher verwendete Kieselgelmembran-Säulchen-Extraktion mit vorhergehendem Proteinase K-Verdau mit dem Verfahren der Homogenisation und anschließender TriFast®-Extraktion verglichen. Dazu wurden definierte Knorpelzy-

linder der superfiziellen Zone aus drei arthrotischen Kniegelenken entnommen und die mRNA über TriFast® (s. Abbildung 8, T), bzw. mit Hilfe von Kieselgelmembran-Säulchenen (s. Abbildung 8, C) extrahiert. Hierbei wurde geprüft, ob das TriFast®-Extraktionsverfahren dem bisher verwendeten Kieselgelmembran-Extraktion in Hinsicht auf die extrahierte mRNA-Konzentration und dem zugehörigen PCR Ergebnis unterlegen war. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine vorhergehende Färbung der Chondrozyten, welche zur mikroskopischen Charakterisierung der räumlichen Organisationsform der superfiziellen Chondrozyten notwendig ist, mit DAPI (s. Abbildung 8, D) oder mit dem Blue Cell Tracker (s. Abbildung 8, B) einen Einfluss auf die extrahierten mRNA-Konzentration und dem zugehörigem PCR Ergebnis hat.

Es zeigte sich, dass der Cycling Threshold (Ct-Wert) der PCR sich nicht in Abhängigkeit einer vorhergehenden Zellfärbung der Knorpelzylinder signifikant ($p < 0,05$) unterschied (s. Abbildung 8).

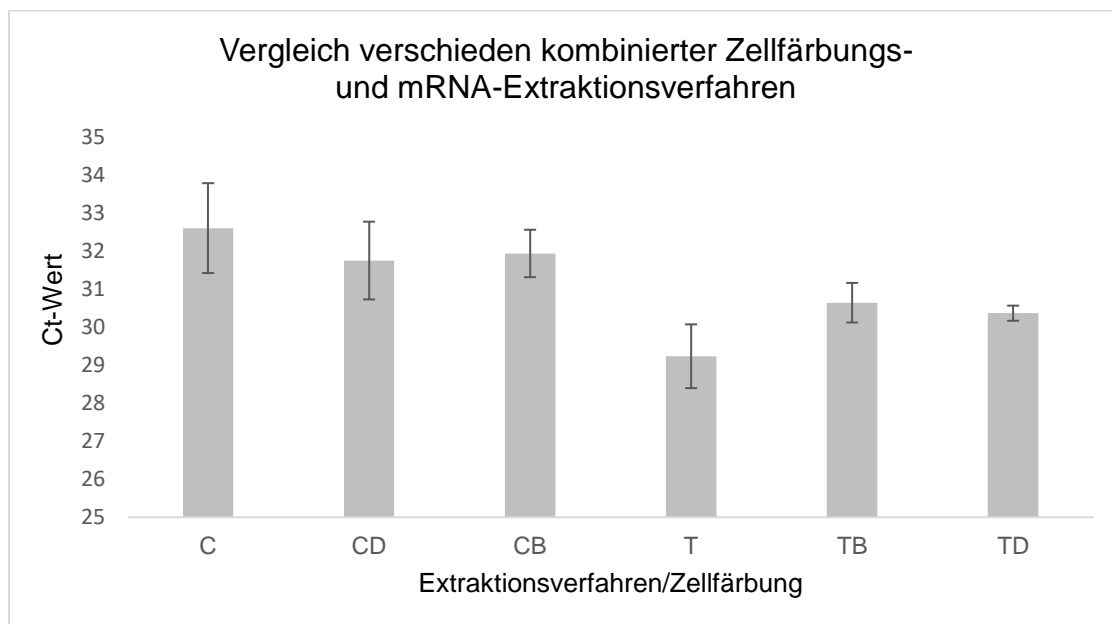


Abbildung 8: Vergleich zweier verschiedener mRNA-Extraktionsverfahren mit vorhergehenden unterschiedlichen Zellfärbungsmethoden. Dargestellt ist ein Balkendiagramm für zwei verschiedene mRNA-Extraktionsverfahren (C=Kieselgelmembran-Säulchenextraktion, T=TriFast®-Extraktion), bei welchen die Chondrozyten in standardisierten Knorpelzylindern entweder zuvor mit Hilfe einer Zellfärbungsmethode mikroskopisch dargestellt wurden (D= DAPI, B= Blue Cell Tracker) oder ungefärbt blieben. Auf der Y-Achse wurde die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen, die durchlaufen werden mussten, bis ein exponentiell zunehmendes Fluoreszenzsignal (Ct-Wert) für das Referenzgen GAPDH detektiert wurde. Die Daten wurden an drei ver-

schiedenen Patientenproben (n=3) erhoben, wobei das jeweilige arithmetische Mittel und der Standardfehler (Fehlerbalken) errechnet wurden. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit dem One-Way-Anova nicht identifiziert.

Zunächst schien es, als ob auch beide Extraktionsverfahren gleichwertig seien. Da jedoch gezeigt wurde, dass die vorhergehende Präinkubation der Knorpelzylinder mit einer Zell- (Blue Cell Tracker) bzw. einer Zellkernfärbung (DAPI) keinen signifikanten Unterschied im PCR-Ergebnis hervorrief, wurden dieselben Daten ausschließlich hinsichtlich der entsprechenden mRNA-Extraktionsmethode verglichen, sodass für jede Extraktionsmethode neun exemplarische Proben (jeweils drei ohne vorherige Färbung, drei mit vorhergehender DAPI-Färbung und drei mit vorhergehender Blue Cell Tracker-Färbung) zur Datenauswertung herangezogen wurden (s. Abbildung 9). Es wurden alle mRNA-Proben, die mittels TriFast® (s. Abbildung 9, T) extrahiert wurden mit den mRNA-Proben verglichen, welche mittels Kieselgelmembran-Säulchen (s. Abbildung 9., C) extrahiert wurden.

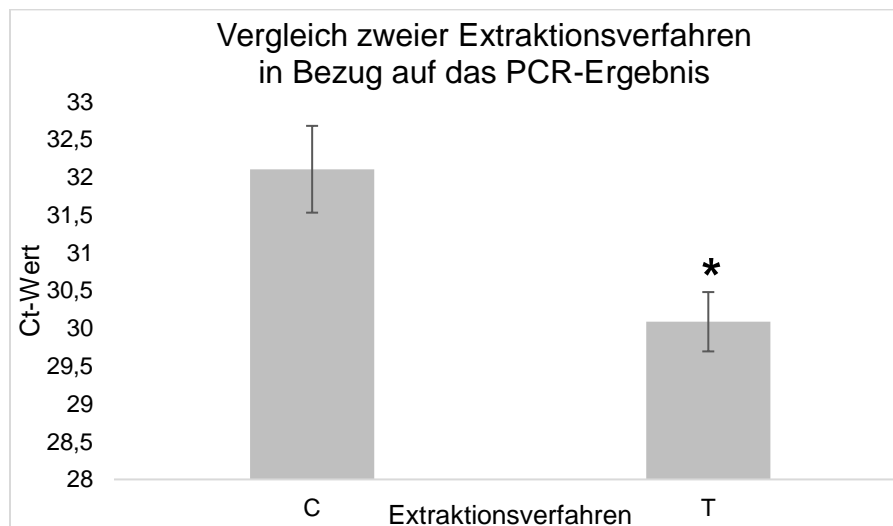


Abbildung 9: Vergleich zweier verschiedener mRNA-Extraktionsverfahren in Bezug auf das PCR-Ergebnis. Dargestellt ist ein Balkendiagramm für zwei verschiedene mRNA-Extraktionsverfahren (C=Kieselgelmembran-Säulchenextraktion, T=TriFast®-Extraktion) für Chondrozyten der superfiziellen Zone in standardisierten Knorpelzylindern. Auf der Y-Achse ist die mittlere Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen, die durchlaufen werden mussten, bis ein exponentiell zunehmendes Fluoreszenzsignal (Ct-Wert) für das Referenzgen GAPDH detektiert wurde. Die Daten wurden an drei verschiedenen Patientenproben (n=3) aus denen pro mRNA-Extraktionsverfahren jeweils drei mRNA-Extraktionen durchgeführt wurden. Es wurde jeweils das arithmetische Mittel, sowie der Standardfehler (Fehlerbalken) errechnet. Es wurde nach vorhergehendem Normalverteilungstest ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) mit dem Two-tailed-t-Test ermittelt. Signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen markiert:

Im Vergleich der mRNA-Extraktionsmethoden basierend auf TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) gefunden (s. Abbildung 9). Hierbei benötigten die Proben, bei welchen die mRNA mittels Kieselgelmembran-Säulchen extrahiert wurde, signifikant ($p < 0,05$) mehr PCR-Zyklen bis ein exponentiell zunehmendes Fluoreszenzsignal (Ct-Wert) gemessen wurde, als vergleichsweise diejenigen Proben, bei welchen die mRNA mit der TriFast® - Methode extrahiert wurde. Zudem wurde mittels des TriFast®-Extraktionsverfahrens durchschnittlich 12,39-fach mehr mRNA extrahiert, als mit der auf Kieselgelmembran-Säulchen basierenden mRNA-Extraktion (s. Abbildung 10). Auch in Bezug auf die Reinheitswerte ($A_{260}/_{280}$) war die TriFast®-mRNA-Extraktion der Kieselgelmembran-Säulchen-mRNA-Extraktion signifikant überlegen ($A_{260}/_{280}$ -Werte größer 2 wurden aus der Datenanalyse ausgeschlossen, $n=9$, $p < 0,05$, Mann-Whitney Rank Sum Test).

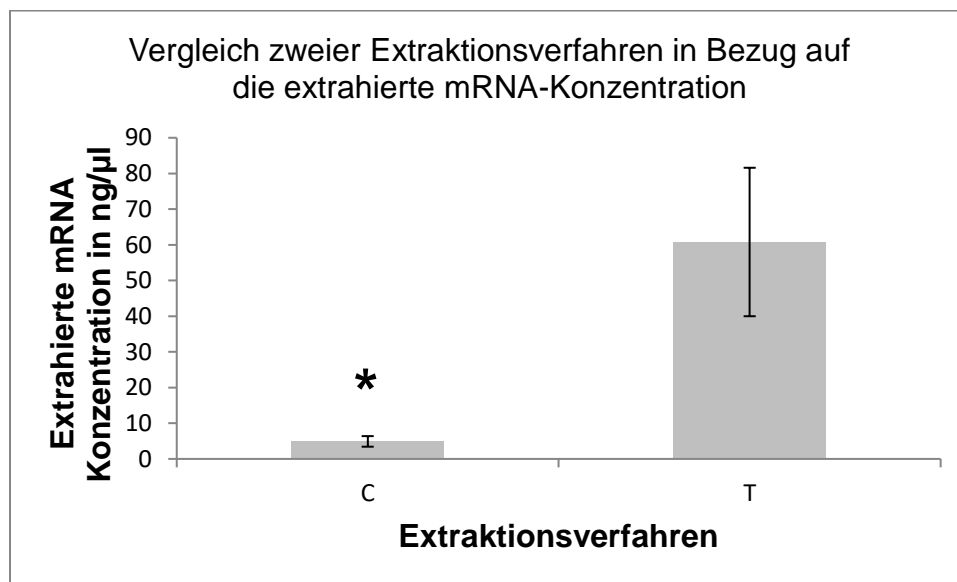


Abbildung 10: Vergleich zweier Extraktionsverfahren in Bezug auf die extrahierte mRNA Konzentration. Dargestellt ist auf der Y-Achse die durchschnittlich photometrisch gemessene extrahierte mRNA-Konzentration in Abhängigkeit des gewählten mRNA-Extraktionsverfahrens auf der X-Achse (C=Kieselgelmembran-Säulchenextraktion, T=TriFast®-Extraktion). Aus drei Knorpelzylindern wurden jeweils drei Extraktionen pro Explantat mit dem jeweiligen mRNA-Extraktionsverfahren (C oder T) durchgeführt. Es wurde das arithmetische Mittel, sowie der Standardfehler (Fehlerbalken) errechnet. Ein signifikanter Unterschied wurde anhand des Mann-Whitney Rank Sum Test identifiziert und mit einem Sternchen hervorgehoben.

Die oben genannten Ergebnisse zeigten, dass die vorhergehende Inkubation der Knorpelzylinder mit DAPI oder Blue Cell Tracker keinen Einfluss auf die mRNA-Extraktion oder das PCR-Ergebnis hatte und somit für die mikroskopische Analyse der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten und anschließender mRNA-Extraktion geeignet war. Zudem war die TriFast®-Extraktion der bisher verwendeten Kieselgelmembran-Säulchen-Extraktion sowohl in Hinsicht auf den Reinheitsgrad der extrahierten mRNA als auch auf die extrahierte mRNA-Konzentration überlegen. Allerdings beinhaltete die TriFast®-Extraktion im Gegensatz zur Kieselgelmembran-Säulchen-Extraktion keinen DNase-Verdau, sodass eine DNA-Kontamination nicht sicher auszuschließen war. Dieser DNase-Verdau war jedoch unbedingt notwendig, um ein unverfälschtes PCR-Ergebnis zu erhalten.

3.3 Einfluss der Einführung eines zusätzlichen DNase-Schritts nach der mRNA-Extraktion mittels TriFast®

Es wurde der Einfluss eines anschließenden DNase-Verdaus (Promega) bei mit TriFast® extrahierten mRNA-Proben untersucht, um eine Kontamination mit DNA auszuschließen. Dazu wurde aus drei verschiedenen Knorpelimplantaten die mRNA mittels TriFast® isoliert. Im Anschluss daran wurde jeweils die Hälfte jeder mRNA-Probe einem zusätzlichen DNase-Verdau unterzogen, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Der direkte Vergleich zwischen den Proben mit anschließendem DNase-Verdau und ohne DNase-Verdau (s. Abbildung 11) zeigte, dass die mRNA-Proben, welche einen anschließenden DNase-Verdau unterworfen wurden, signifikant ($p < 0,05$) mehr PCR-Zyklen benötigen, um den Ct-Wert zu erreichen, als dieselben Proben ohne DNase-Verdau. Besonders kritisch war, dass bei den Proben mit DNase-Verdau erst nach dem 34. PCR-Zyklus ein Fluoreszenzsignal detektiert wurde, welches als nicht mehr spezifisches Signal anzusehen war und somit nicht für eine Expressionsanalyse in Frage kam.

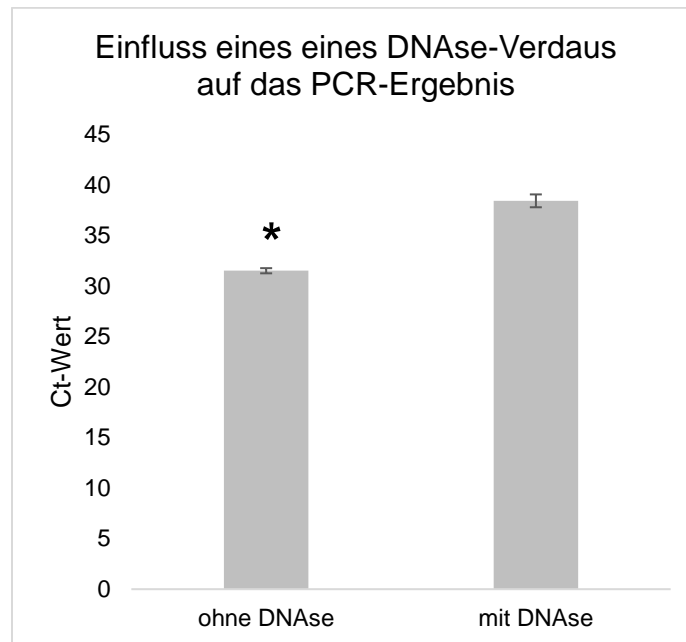


Abbildung 11: Vergleich der PCR-Ergebnisse der TriFast®-mRNA-Extraktion mit und ohne anschließenden DNase Verdau. Dargestellt ist ein Balkendiagramm für das PCR Ergebnis mit mRNA, welche aus standardisierten Knorpelzylindern der superfiziellen Zone mittels TriFast® extrahiert wurde. Hierbei wurde die eine Hälfte der extrahierten mRNA-Probe einem DNase-Verdau unterzogen, während die andere Hälfte der jeweiligen mRNA-Probe unbehandelt blieb. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen, die durchlaufen werden mussten, bis ein exponentiell wachsendes Fluoreszenzsignal (Ct-Wert) für das Referenzgen GAPDH detektiert wurde. Die Daten wurden an drei verschiedenen Patientenproben (n=3) erhoben. Es wurden das arithmetische Mittel und der dazugehörige Standardfehler (Fehlerbalken) errechnet. Es wurde ein signifikanter Unterschied anhand des Two-tailed-t-test identifiziert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen hervorgehoben.

Da ein zusätzlicher DNase-Schritt unerlässlich war, jedoch mittels eines zusätzlichen DNase-Schrittes das PCR-Ergebnis unauswertbar wurde, wurde eine Kombination der TriFast®-Extraktion und der Kieselgelmembran-Säulchen-Extraktion durchgeführt. Hierbei wurden alle Vorteile in einer Methode vereint. Die TriFast®-Extraktion erlaubte es aus standardisierten Knorpelzylindern ohne vorherigen Gewebeverdau mRNA mit einer adäquaten Reinheit und in ausreichender Menge zu isolieren. Die anschließende Kieselgelmembran-Säulchen Extraktion lieferte den unerlässlichen DNase-Verdau. Aus diesen Gründen wurde zur mikroskopischen Analyse der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten der Zellkernfarbstoff DAPI verwendet und anschließend die mRNA mittels einer Kombinationsextraktion aus TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen extrahiert, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben wurde.

3.3.1 Optimierung des Homogenisierungsprozesses von standardisierten Knorpelzylinder der superfiziellen Knorpelzone humaner Kniegelenk-kondylen

In einem nächsten Schritt war es das Ziel für das kombinierten Extraktionsverfahren zu prüfen, ob sich über eine verbesserte Homogenisierung des Knorpelgewebes nach der Gewebepräparation eine weitere Steigerung der mRNA-Menge und -Qualität erreichen ließ. Dazu wurden im Folgenden eine manuelle Homogenisierung mittels eines Mörsers und eine maschinelle Homogenisierungsmethode unter Verwendung eines Homogenisators mit Rotationsmesseraufsatz miteinander verglichen.

Hierfür wurden aus demselben Kniegelenk zwei gleichwertige Knorpelzylinder gestanzt. Einer der Knorpelzylinder wurde manuell mit einem Mörser homogenisiert, während der andere maschinell mithilfe eines Stator-Homogenisators mit Rotationsmesseraufsatz homogenisiert wurde. Nach der Homogenisation wurde aus beiden Knorpelzylindern die mRNA mittels der kombinierten Extraktion aus TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen isoliert.

Es zeigte sich, dass nach einer maschinellen Homogenisierung des Knorpelzylinders weniger PCR-Zyklen notwendig waren, um ein exponentiell zunehmendes Fluoreszenzsignal (Ct-Wert) zu detektieren, als bei der mRNA-Probe, bei welcher das Knorpelimplantat mit Hilfe eines Mörsers manuell homogenisiert wurde (s. Abbildung 12).

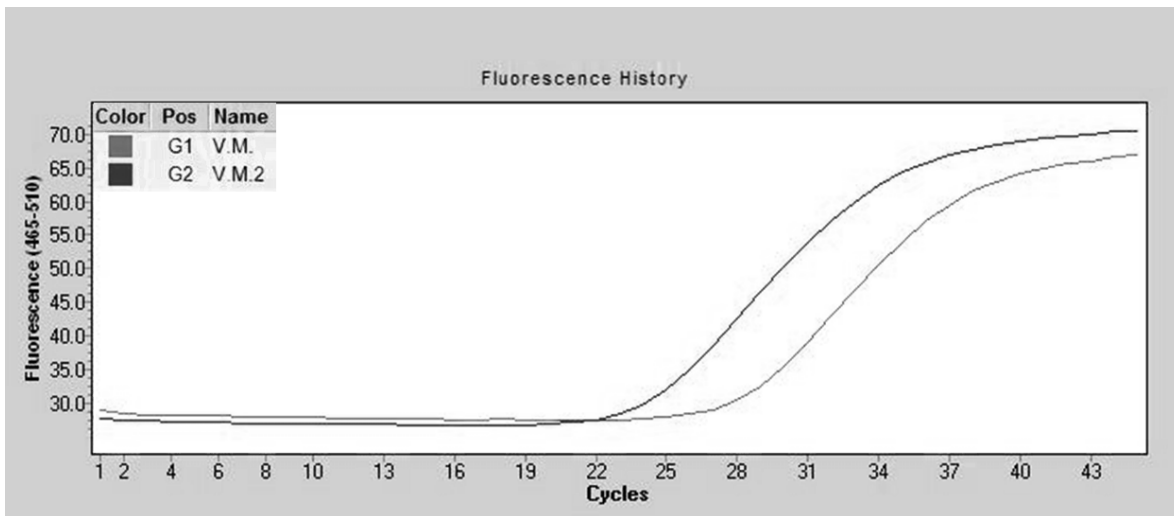


Abbildung 12: Effekt der Einführung der maschinellen Homogenisation auf das PCR-Ergebnis. Dargestellt ist die Verlaufskurve des detektierten Fluoreszenzsignals (Y-Achse) für das Referenzgen GAPDH in Abhängigkeit der durchlaufenen PCR-Zyklen (X-Achse). Probe V.M. (hellgrau) wurde manuell homogenisiert, wohingegen Probe V.M.2 (schwarz) desselben Patienten maschinell mit Hilfe eines Stator-Homogenisators mit Rotationsmesser homogenisiert wurde.

Eine maschinelle Homogenisation erwies sich im PCR-Ergebnis als deutlich besser (s. Abbildung 12) und war auch methodisch wesentlich leichter zu standardisieren. Daher wurde das mRNA-Extraktionsprotokoll unter Verwendung eines maschinellen Homogenisators durchgeführt, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

3.3.2 Untersuchung der Einführung eines Schockgefrierschrittes mit Flüssigstickstoff zur Optimierung der mRNA- Extraktion aus standardisierten Knorpelzylindern der superfiziellen Knorpelzone humaner Kniegelenkskondylen

Zuletzt wurde untersucht, ob es einen Unterschied bezüglich der extrahierten mRNA Menge und dem PCR-Ergebnis gibt, wenn ein der Extraktion vorhergehender Schockgefrierschritt mit Flüssigstickstoff eingeführt wurde. Dabei sollte festgestellt werden, ob bessere PCR-Ergebnisse erzielt werden, wenn die Knorpelimplantate unmittelbar nach der mikroskopischen Analyse der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten homogenisiert werden ohne die Knorpelzylinder vorher in TriFast®-Puffer einzufrieren. Dies war auch deshalb von großer Bedeu-

tung, da untersucht werden sollte, ob eine Lagerung der Knorpelzylinder bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ einen negativen Einfluss auf das PCR-Ergebnis hat im Vergleich zu einer unmittelbar nach der Musteranalyse anschließenden Homogenisierung und mRNA-Extraktion.

Es wurde gezeigt, dass aus den Knorpelzylindern, welche vor der Extraktion einem Schockgefrierschritt unterzogen wurden, signifikant ($p < 0,05$) höhere mRNA-Konzentrationen extrahiert werden konnten (s. Abbildung 13).

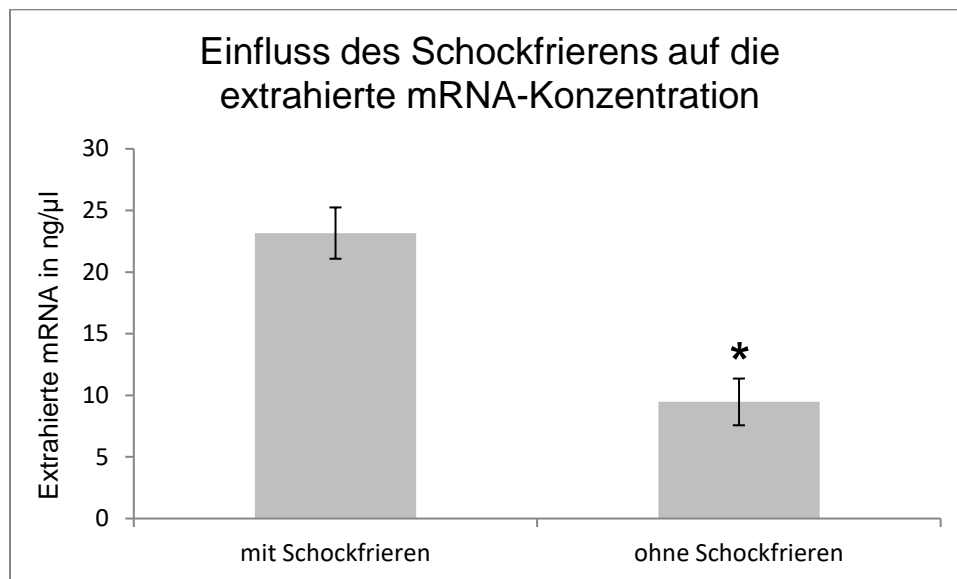


Abbildung 13: Vergleich der extrahierten mRNA-Konzentration des kombinierten Extraktionsverfahrens (TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen) mit und ohne eines vorhergehenden Schockgefrierschrittes mittels Flüssigstickstoff. Dargestellt ist die durchschnittliche extrahierte mRNA-Konzentration in ng/µl (Y-Achse) in Abhängigkeit eines der mRNA-Extraktion vorhergehenden Schockgefrierschrittes mittels Flüssigstickstoff. Angegeben wurden die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlerbalken ($n=4$). Es wurde ein signifikanter Unterschied anhand des Two-tailed-t-test identifiziert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen hervorgehoben.

Dieses Ergebnis zeigte sich ebenfalls in den zugehörigen PCR-Daten (s. Abbildung 14). Dabei wurde gezeigt, dass für die extrahierte mRNA aus den Knorpelplantaten, welche vor der Extraktion einem Schockgefrierschritt unterworfen wurden, signifikant ($p < 0,05$) weniger PCR-Zyklen notwendig waren (s. Abbildung 14), um ein exponentiell zunehmendes Fluoreszenzsignal für das Referenzgen GAPDH zu detektieren.

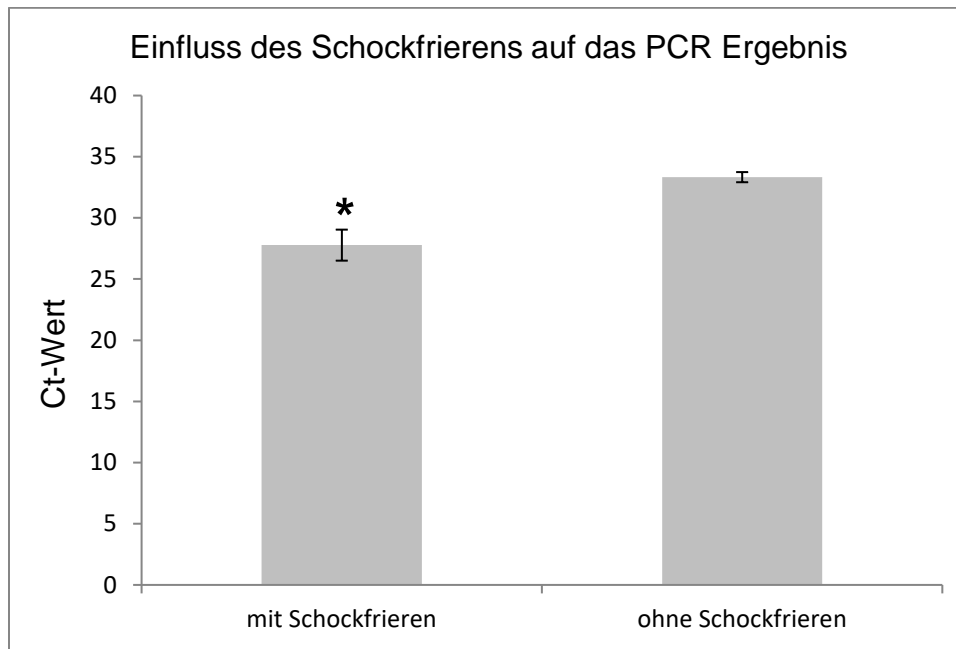


Abbildung 14: Vergleich der PCR-Ergebnisse des kombinierten Extraktionsverfahrens (TriFast® und Kieselgelmembran-Säulchen) mit und ohne eines vorhergehenden Schockgefrierschrittes mittels Flüssigstickstoff. Dargestellt sind die PCR-Zyklen (Y-Achse) die notwendig waren, um ein signifikantes Fluoreszenzsignal für das Referenzgen GAPDH zu detektieren (Ct-Wert), in Abhängigkeit eines der mRNA-Extraktion mittels TriFast® vorhergehenden Schockgefrierschrittes mit Flüssigstickstoff (X-Achse). Angegeben wurden die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlerbalken (n=4). Es wurde ein signifikanter Unterschied anhand des Two tailed t-test identifiziert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen hervorgehoben.

Somit wurde nicht nur gezeigt, dass die Lagerung der mikroskopisch analysierten Knorpelimplantate auf TriFast®-Reagenz mit Schockgefrierung und anschließender Lagerung bei -70 °C keinen negativen Einfluss auf die mRNA-Extraktion und die anschließende PCR hat, sondern es verbesserte sogar die Konzentration der extrahierten mRNA und das dazugehörige PCR-Ergebnis.

3.3.3 Zusammenfassung der Etablierung eines Protokolls zur mRNA-Extraktion aus Chondrozyten der superfiziellen Zone humaner Kniegelenkskondylen

Die mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Kollagen-Typen von Chondrozyten der superfiziellen Zone erforderte zunächst ein mRNA-Extraktionsprotokoll mittels welchem die mRNA der Chondrozyten aus dem Knorpelgewebe isoliert werden

konnte. Von großer Bedeutung war es, die mRNA ohne vorherige Zellisolation durch einen Gewebeverdau zu extrahieren.

Dazu wurde zu Anfang eine TriFast®-basierte mRNA-Extraktion mit einer mRNA-Extraktion mittels Kieselgelmembran-Säulchen hinsichtlich des PCR- Ergebnisses und der isolierten mRNA-Konzentration verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass mit Hilfe der TriFast®-basierten mRNA-Extraktion signifikant ($p < 0,05$) höhere mRNA-Konzentrationen isoliert wurden (s. Abbildung 10) und dementsprechend auch im Durchschnitt 2,02 PCR-Zyklen weniger notwendig waren, um ein signifikantes Fluoreszenzsignal für das Referenzgen GAPDH in der PCR zu detektieren (s. Abbildung 9). Die TriFast®-Extraktion bot somit den Vorteil, dass ein Gewebeverdau durch die vorhergehende Homogenisierung des Knorpelgewebes umgangen wurde und zudem mRNA in höheren Konzentrationen isoliert werden konnte. Allerdings fehlte im TriFast®-Extraktionsprotokoll ein DNase-Verdau, welcher unerlässlich war, um eine Kontamination der isolierten mRNA mit DNA auszuschließen und somit valide Expressionsdaten erheben zu können.

Aus diesem Grund wurde versucht im Anschluss an die TriFast®-basierte mRNA-Extraktion ein DNase-Verdau durchzuführen. Ein anschließender DNase-Verdau verschlechterte den RNA-Gehalt und das PCR-Ergebnis maßgeblich (s. Abbildung 11). Da die bisher verwendete Kieselgelmembran-Säulchen-Extraktion jedoch einen DNase-Schritt enthielt, wurde die Verwendung eines kombinierten mRNA-Extraktionsprotokolls aus der TriFast® und Kieselgelmembransäulchen-Extraktion ausgewählt. Hierbei wurde zunächst eine normale TriFast®-basierte mRNA-Extraktion durchgeführt und daran die Kieselgelmembran-Säulchen Extraktion angeschlossen. Nähere Untersuchungen ergaben zudem, dass eine maschinelle Homogenisation der Knorpelzylinder einer manuellen Homogenisation mit Hilfe eines Mörsers überlegen war (s. Abbildung 12). Auch durch ein vorheriges Schockfrieren der Knorpelzylinder mit Flüssigstickstoff in TriFast®-Puffer wurden signifikant ($p < 0,05$) höheren mRNA-Konzentrationen in der mRNA-Extraktion erzielt und führten folglich zu einem besseren PCR-Ergebnis (s. Abbildung 13 und Abbildung 14).

Aus den oben genannten Gründen wurde das kombinierte Extraktionsprotokoll unter Verwendung eines Rotor-Stator-Homogenisators und einem vorhergehenden Schockgefrierschrittes mittels Flüssigstickstoff wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben verwendet.

3.4 Unterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

3.4.1 Unterschiede der relativen COL1A2 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die relative COL1A2 mRNA-Expression für Kollagen Typ I als phänotyp-relevanter Funktionsparameter in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen untersucht (Abbildung 15). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede der relativen COL1A2 mRNA-Expression zwischen definierten räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht.

COL1A2 mRNA - Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten

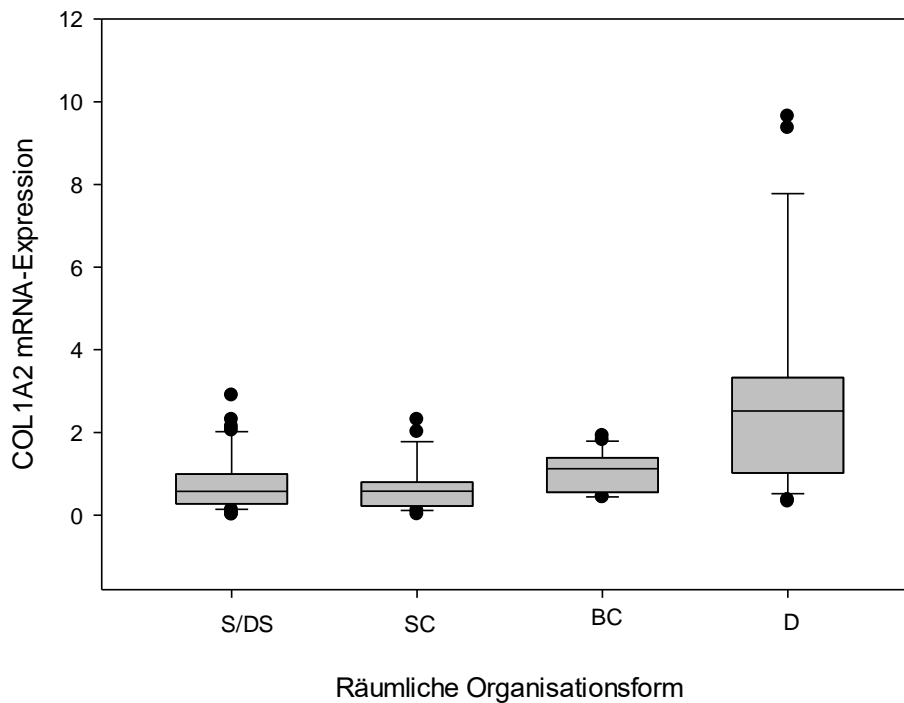


Abbildung 15: Relative COL1A2 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten. Dargestellt sind Boxplots der relativen COL1A2 mRNA-Expression humaner Chondrozyten aus Knorpelzylindern der superfiziellen Zone, welche vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch anhand der dominierenden räumlichen Organisationsform klassifiziert wurden (S/DS= Strings/Doublestrings, SC= Small Clusters, BC= Big Clusters, D= Diffus). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen wurden anhand des ANOVA-on-Ranks-Tests und nachfolgender Post-Hoc-Tests identifiziert und sind in Tabelle 11 farblich kodiert dargestellt. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) sind als schwarze Punkte dargestellt (S/DS: $n=21$ Proben und $n=315$ Knorpelzylinder, SC: $n=11$ Proben und $n=165$ Knorpelzylinder, BC: $n=11$ Proben und $n=165$ Knorpelzylinder, D: $n=12$ Proben und $n=180$ Knorpelzylinder).

Es wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) für die relative COL1A2 mRNA-Expression zwischen einer diffusen räumlichen Anordnung der superfiziellen Chondrozyten und den räumlichen Organisationsformen Strings/Doublestrings und Small Clusters gefunden (p -Werte siehe Tabelle 11). Hierbei exprimierten diffus verteilte Chondrozyten im Durchschnitt 3,6-fach mehr COL1A2 als Strings/Doublestrings und 4,3-fach mehr COL1A2 als Small Clusters (s. Tabelle 12).

Tabelle 11: Paarweiser Vergleich der relativen COL1A2 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus). Dargestellt sind hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Tests signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL1A2 mRNA-Expression zweier verschiedener räumlichen Organisationsformen ergab. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet (Strings/Doublestrings: $n=21$ Proben und $n= 315$ Knorpelzylinder, Small Clusters: $n=11$ Proben und $n= 165$ Knorpelzylinder, Big Clusters: $n= 11$ Proben und $n= 165$ Knorpelzylinder, Diffus: $n= 12$ Proben und $n=180$ Knorpelzylinder).

Unterschiede der relativen COL1A2 mRNA-Expression	Small Clusters	Big Clusters	Diffus
Strings/Doublestrings	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Small Clusters	x	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Big Clusters	x	x	$p > 0,05$

Tabelle 12: Relative Änderung der COL1A2 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters). Das Verhältnis der COL1A2 mRNA-Expression von diffus organisierten Chondrozyten zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen wurde hierbei als Quotient der COL1A2 mRNA-Expressionen gebildet (Mittelwerte der organisationsspezifischen mRNA Expression). Alle Spalten wurden mit X codiert und alle Zeilen mit Y. Das mRNA-Expressionsverhältnis wurde nach der Formel $\text{Verhältnis} = X/Y$ gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 11).

Verhältnisse organisationsspezifischer COL1A2 mRNA Expressionen ($\frac{X}{Y}$)	X=Diffus
Y= Strings/Doublestrings	3,65-fache mRNA-Expression
Y= Small Clusters	4,29-fache mRNA- Expression

3.4.2 Unterschiede der relativen COL2A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die relative COL2A1 mRNA-Expression für Kollagen Typ II als phänotyp-relevanter Funktionsparameter in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen untersucht (Abbildung 16). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede der relativen COL2A1 mRNA-Expression zwischen definierten räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht.

COL2A1 mRNA - Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten

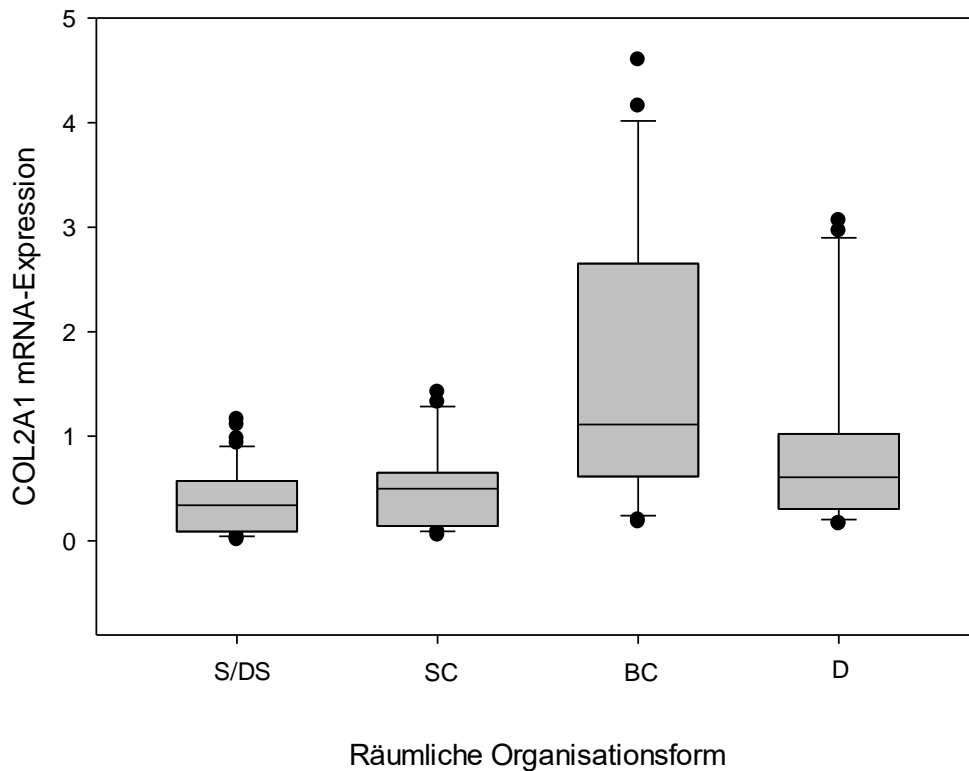


Abbildung 16: Relative COL2A1 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten. Dargestellt sind Boxplots der relativen COL2A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten aus Knorpelzylindern der superfiziellen Zone, welche vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch anhand der dominierenden räumlichen Organisationsform klassifiziert wurden (S/DS= Strings/Doublestrings, SC= Small Clusters, BC= Big Clusters, D= Diffus). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des ANOVA-on-Ranks-Tests und nachfolgender Post-Hoc-Tests identifiziert und sind in Tabelle 13 farblich kodiert dargestellt. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) sind als schwarze Punkte dargestellt (S/DS: n=21 Proben und n= 315 Knorpelzylinder, SC: n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, BC: n= 11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, D: n= 12 Proben und n=180 Knorpelzylinder).

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der relativen COL2A1 mRNA-Expression wurden zwischen der räumlichen Organisationsform der Big Clusters und den Organisationsformen der Strings/Doublestrings und Small Clusters, sowie zwischen den Organisationsformen Diffus und Strings/Doublestrings gefunden (p -Werte siehe Tabelle 13). Hierbei exprimierten in Big Clusters organisierte Chondrozyten durchschnittlich 4,3-fach mehr COL2A1 als vergleichsweise Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings. Von der Organisationsform

der Small Clusters ausgehend, ergab sich für in Big Clusters organisierte Chondrozyten eine durchschnittlich 3,3-fache Steigerung der COL2A1 mRNA-Expression. Diffus verteilte Chondrozyten exprimierten durchschnittlich 2,4-fach mehr COL2A1 mRNA also in Strings organisierte Chondrozyten (s. Tabelle 14).

Tabelle 13: Paarweiser Vergleich der relativen COL2A1 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus). Dargestellt sind hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL2A1 mRNA-Expression zweier verschiedener räumlichen Organisationsformen ergab. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet (Strings/Doublestrings: $n = 21$ Proben und $n = 315$ Knorpelzylinder, Small Cluster: $n = 11$ Proben und $n = 165$ Knorpelzylinder, Big Clusters: $n = 11$ Proben und $n = 165$ Knorpelzylinder, Diffus: $n = 12$ Proben und $n = 180$ Knorpelzylinder).

Unterschiede der relativen COL2A1 mRNA-Expression	Small Clusters	Big Clusters	Diffus
Strings/Doublestrings	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Small Clusters	x	$p < 0,05$	$p > 0,05$
Big Clusters	x	x	$p > 0,05$

Tabelle 14: Relative Änderung der COL2A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters). Das Verhältnis der COL2A1 mRNA-Expression von diffus und in Big Clusters organisierten Chondrozyten zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen wurde hierbei als Quotient der COL2A1 mRNA-Expressionen gebildet (Mittelwerte der organisationsspezifischen mRNA Expression). Alle Spalten wurden mit X codiert und alle Zeilen mit Y. Das mRNA-Expressionsverhältnis wurde nach der Formel $\text{Verhältnis} = X/Y$ gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 13). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurden mit „-“ gekennzeichnet.

Verhältnisse organisationsspezifischer COL2A1 mRNA-Expressionen ($\frac{X}{Y}$)	X= Big Clusters	X= Diffus
Y= Strings/Doublestrings	4,31-fache mRNA-Expression	2,36-fache mRNA-Expression
Y= Small Clusters	3,28-fache mRNA-Expression	-

3.4.3 Unterschiede der relativen COL3A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die relative COL3A1 mRNA-Expression für Kollagen Typ III als phänotyp-relevanter Funktionsparameter in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen untersucht (s. Abbildung 17). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede der relativen COL3A1 mRNA-Expression zwischen definierten räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht.

COL3A1 mRNA - Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten

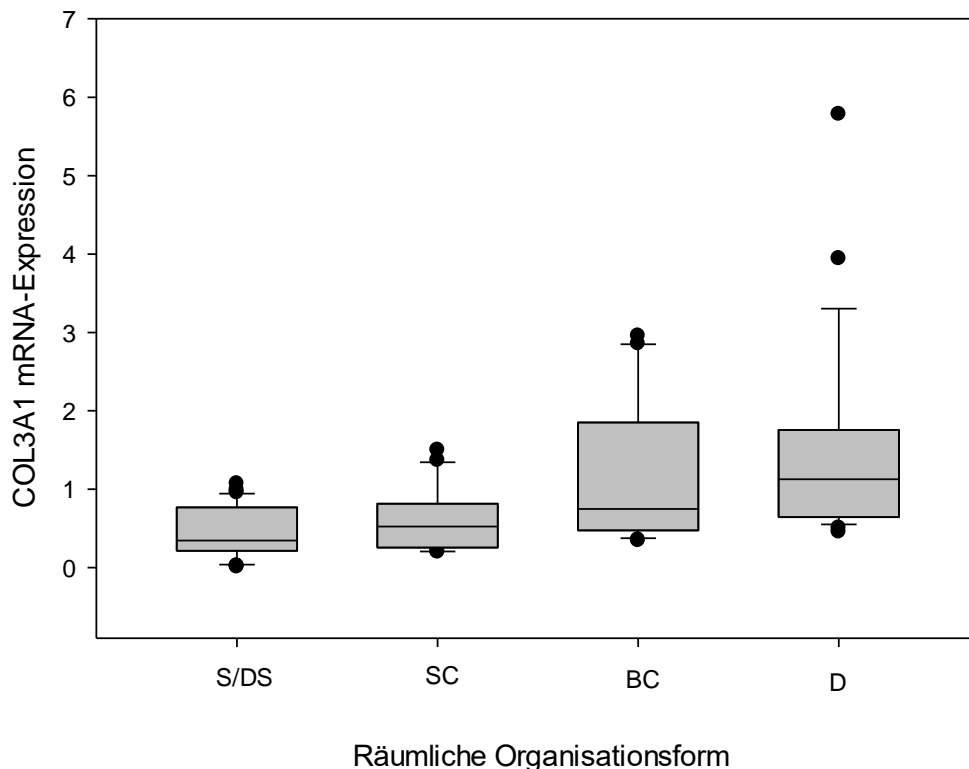


Abbildung 17: Relative COL3A1 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten. Dargestellt sind Boxplots der relativen COL3A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten aus Knorpelzylindern der superfiziellen Zone, welche vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch anhand der dominierenden räumlichen Organisationsform klassifiziert wurden (S/DS=

Strings/Doublestrings, SC= Small Clusters, BC= Big Clusters, D= Diffus). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des ANOVA-on-Ranks-Tests und nachfolgender Post-Hoc-Tests identifiziert und sind in Tabelle 15 farblich kodiert dargestellt. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) sind als schwarze Punkte dargestellt (S/DS: n=21 Proben und n= 315 Knorpelzylinder, SC: n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, BC: n= 11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, D: n= 12 Proben und n=180 Knorpelzylinder).

Es wurden signifikante Unterschiede (s. Tabelle 15) in der relativen COL3A1 mRNA-Expression zwischen einer diffusen räumlichen Anordnung der superfiziellen Chondrozyten und der Organisationsform der Strings/Doublestrings und Small Clusters, sowie zwischen Big Clusters und Strings/Doublestrings gefunden. Diffus verteilte superfizielle Chondrozyten exprimierten dabei durchschnittlich 3,4-fach mehr COL3A1 als Chondrozyten in Strings/Doublestrings und 2,6-fach mehr als in Small Clusters organisierte superfizielle Chondrozyten. In Big Clusters organisierte superfizielle Chondrozyten exprimierten durchschnittlich 2,6-fach mehr COL3A1 als in Strings/Doublestrings organisierte Chondrozyten (s. Tabelle 16).

Tabelle 15: Paarweiser Vergleich der relativen COL3A1 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus). Dargestellt sind hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL3A1 mRNA-Expression zweier verschiedener räumlichen Organisationsformen ergab. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet (Strings/Doublestrings: n=21 Proben und n= 315 Knorpelzylinder, Small Clusters: n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, Big Clusters: n= 11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, Diffus: n= 12 Proben und n=180 Knorpelzylinder)

Unterschiede der relativen COL3A1 mRNA-Expression	Small Clusters	Big Clusters	Diffus
Strings/Doublestrings	p>0,05	p<0,05	p<0,05
Small Clusters	x	p>0,05	p<0,05
Big Clusters	x	x	p>0,05

Tabelle 16: Relative Änderung der COL3A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters). Das Verhältnis der COL3A1 mRNA-Expression von diffus und in Big Clusters organisierten Chondrozyten zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen wurde hierbei als Quotient der COL3A1 mRNA-Expressionen gebildet (Mittelwerte der organisationsspezifischen mRNA Expression). Alle Spalten wurden mit X codiert und alle Zeilen mit Y. Das mRNA-Expressionsverhältnis wurde nach der Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 15). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurden mit „-“ gekennzeichnet.

Verhältnisse organisationsspezifischer COL3A1 Expressionen ($\frac{X}{Y}$)	X= Big Clusters	X= Diffus
Y= Strings/Doublestrings	2,58-fache mRNA Expression	3,40-fache mRNA Expression
Y=Small Clusters	-	2,57-fache mRNA Expression

3.4.4 Unterschiede der relativen COL6A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die relative COL6A1 mRNA-Expression für Kollagen Typ VI als phänotyp-relevanter Funktionsparameter in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen untersucht (s. Abbildung 18). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede der relativen COL6A1 mRNA-Expression zwischen definierten räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht.

COL6A1 mRNA - Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten

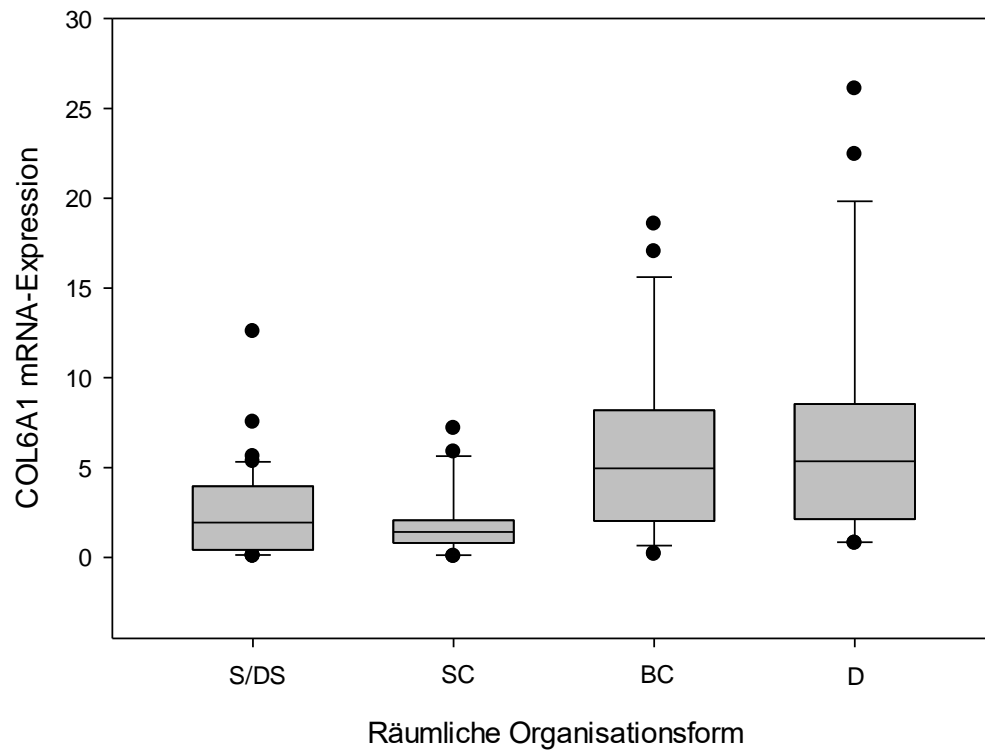


Abbildung 18: Relative COL6A1 mRNA-Expression in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten. Dargestellt sind Boxplots der relativen COL6A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten aus Knorpelzylindern der superfiziellen Zone, welche vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch anhand der dominierenden räumlichen Organisationsform klassifiziert wurden (S/DS= Strings/Doublestrings, SC= Small Clusters, BC= Big Clusters, D= Diffus). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden anhand des ANOVA-on-Ranks-Tests und nachfolgender Post-Hoc-Tests identifiziert und sind in Tabelle 17 farblich kodiert dargestellt. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) sind als schwarze Punkte dargestellt (S/DS: n=21 Proben und n= 315 Knorpelzylinder, SC: n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, BC: n= 11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder, D: n= 12 Proben und n=180 Knorpelzylinder).

Es wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in der relativen COL6A1 mRNA-Expression superfizieller Chondrozyten mit einer diffusen Anordnung und denjenigen superfiziellen Chondrozyten gefunden, welche die räumliche Organisationsform der Strings/Doublestrings und Small Clusters aufwiesen (p -Werte siehe Tabelle 17). Hierbei exprimierten diffus verteilte Chondrozyten im Durchschnitt 2,7-fach mehr COL6A1 als in Strings/Doublestrings organisierte Chondrozyten. Die durchschnittliche Steigerung der mRNA-Expression von COL6A1 in diffus verteilten Chondrozyten gegenüber in Small Clusters organisierten Chondrozyten betrug

3,4 (s. Tabelle 18). Zudem wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen in Big Clusters organisierten superfiziellen Chondrozyten und denjenigen superfiziellen Chondrozyten, die in Strings/Doublestrings, sowie Small Clusters organisiert waren, gefunden (p-Werte siehe Tabelle 17). Hierbei exprimierten Big Clusters durchschnittlich 2,4-fach mehr COL6A1 als Strings/Doublestrings und 3-fach mehr als Small Clusters (s. Tabelle 18).

Tabelle 17: Paarweiser Vergleich der relativen COL6A1 mRNA-Expression zwischen superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus). Dargestellt sind hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests errechnet wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-Ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL6A1 mRNA-Expression zweier verschiedener räumlichen Organisationsformen ergab. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) wurden dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet.

Unterschiede der relativen COL6A1 mRNA-Expression	Small Clusters	Big Clusters	Diffus
Strings/Doublestrings	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Small Clusters	x	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Big Clusters	x	x	$p > 0,05$

Tabelle 18: Relative Änderung der COL6A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters). Das Verhältnis der COL6A1 mRNA-Expression von diffus und in Big Clusters organisierten Chondrozyten zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen wurde hierbei als Quotient der COL6A1 mRNA-Expressionen gebildet (Mittelwerte der organisationsspezifischen mRNA Expression). Alle Spalten wurden mit X codiert und alle Zeilen mit Y. Das mRNA-Expressionsverhältnis wurde nach der Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 17).

Verhältnisse organisationspezifischer COL6A1 mRNA-Expressionen ($\frac{X}{Y}$)	X= Big Clusters	X= Diffus
Y= Strings/Doublestrings	2,42-fache mRNA-Expression	2,75-fache mRNA-Expression
Y= Small Clusters	3,0-fache mRNA-Expression	3,45-fache mRNA-Expression

3.4.5 Zusammenfassung der Unterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die relative COL1A2-, COL2A1-, COL3A1 und COL6A1-mRNA-Expression für Kollagen Typ I, II, III und VI als phänotyp-relevante Funktionsparameter in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen untersucht (s. Abbildung 19). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede der relativen Kollagen mRNA-Expressionen zwischen definierten räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht.

Übersicht der organisationsspezifischen durchschnittlichen relativen Kollagen mRNA-Expressionen superfizieller Chondrozyten

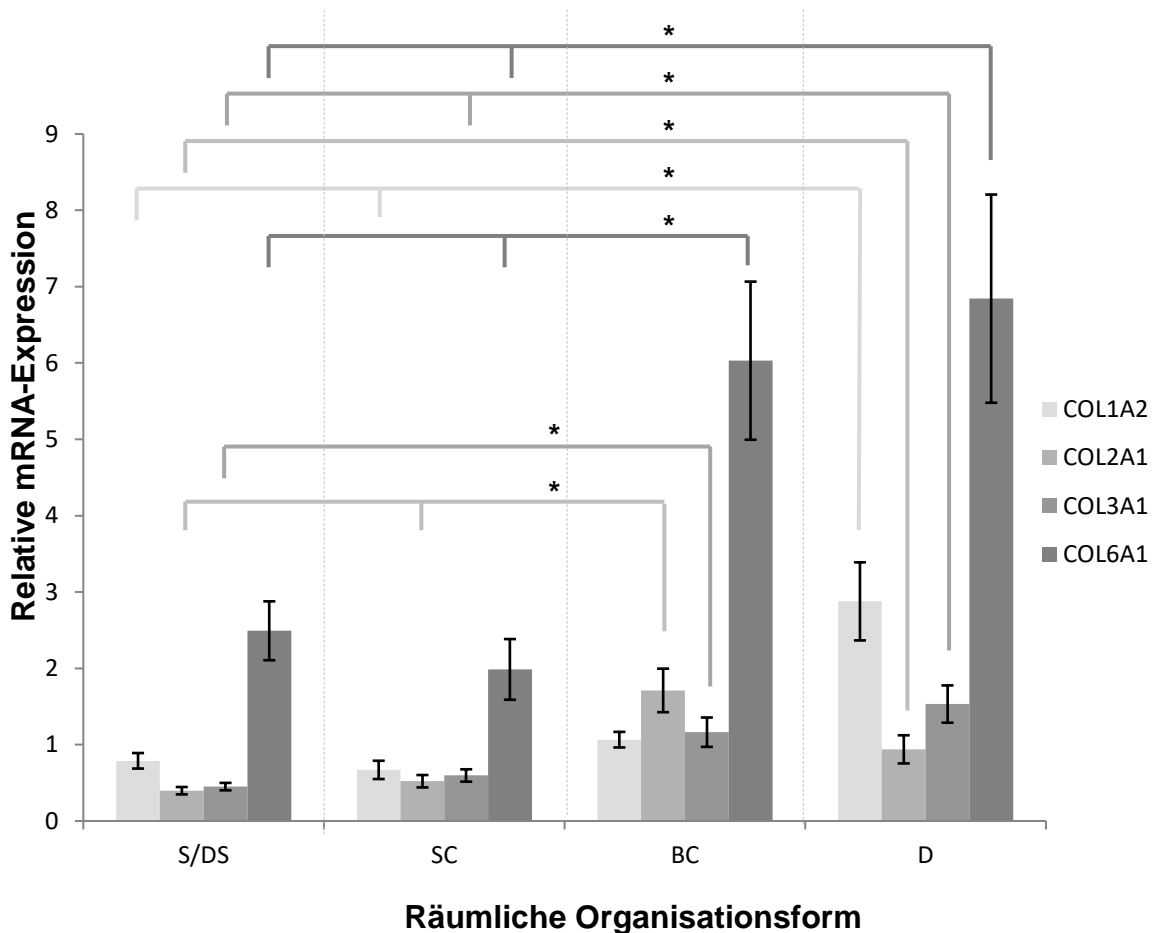


Abbildung 19: Übersicht über die durchschnittliche relative COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform humaner superfizieller Chondrozyten. Dargestellt ist ein Balkendiagramm der durchschnittlichen relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), II (COL2A1), III (COL3A1), VI (COL6A1) in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform humaner superfizieller Chondrozyten (S/DS=Strings/Doublestrings, SC=Small Clusters, BC=Big Clusters, D=Diffus). Signifikante Expressionsunterschiede ($p < 0,05$) innerhalb eines bestimmten Kollagen Typs wurden jeweils über entsprechend farbige Signifikanzbalken dargestellt. Angegeben wurde der Standardfehler (Fehlerbalken). Signifikante Unterschiede wurden anhand des ANOVA-on-Ranks-Tests und anschließenden post-hoc Test identifiziert (S/DS: $n=21$ Proben und $n=315$ Knorpelzylinder, SC: $n=11$ Proben und $n=165$ Knorpelzylinder, BC: $n=11$ Proben und $n=165$ Knorpelzylinder, D: $n=12$ Proben und $n=180$ Knorpelzylinder).

Es wurde für die mRNA-Expressionen aller untersuchten Kollagen-Typen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten gefunden. Alle untersuchten relativen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI

(COL6A1)) wurden signifikant ($p < 0,05$) mehr in diffus verteilten Chondrozyten als in Strings/Doublestrings organisierten Chondrozyten exprimiert. Außerdem wurde mit Ausnahme der relativen Kollagen Typ II (COL2A1) mRNA Expression, für alle übrigen untersuchten Kollagenexpressionen eine signifikant ($p < 0,05$) höhere mRNA-Expression in diffus verteilten Chondrozyten gegenüber Chondrozyten in der Organisationsform Small Clusters gefunden. Darüber hinaus wurde, außer für die relative Kollagen Typ I (COL1A2) mRNA Expression, für alle untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen signifikant ($p < 0,05$) höhere mRNA-Expressionen in Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Big Clusters gegenüber Chondrozyten in Strings/Doublestrings gefunden. Für die relative Kollagen Typ II (COL2A1) - und Kollagen Typ VI (COL6A1) mRNA-Expression wurden signifikant ($p < 0,05$) höhere mRNA-Expressionen in in Big Clusters organisierten Chondrozyten gegenüber in Small Clusters organisierten Chondrozyten gefunden (s. Abbildung 19).

Die größte Expressionssteigerung wurde für die relative Kollagen Typ I (COL1A2) - mRNA-Expression von Small Clusters organisierten Chondrozyten zu einer diffusen Verteilung mit einer 4,3-fachen durchschnittlichen Steigerung der relativen COL1A2 mRNA-Expression gefunden. Die größte durchschnittliche relative Kollagen Typ II (COL2A1) - mRNA-Steigerung betrug 4,3 von in Strings/Doublestrings zu in Big Clusters organisierten Chondrozyten. Eine durchschnittlich 3,4-fache Steigerung der relativen Kollagen Typ III (COL3A1) - mRNA Expression wurde zwischen in Strings/Doublestrings organisierten Chondrozyten und diffus verteilten Chondrozyten gefunden. Für die relative Kollagen Typ VI (COL6A1) mRNA-Expression betrug die größte Expressionssteigerung 3,4 von in Small Clusters organisierten Chondrozyten zu diffus verteilten Chondrozyten (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht über die relative Änderung der mRNA- Expression von Kollagen Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1) von Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Diffus und Big Clusters (X) im Verhältnis zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen (Y, hier Strings/Doublestrings, Small Clusters). Das Verhältnis der verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von diffus und in Big Clusters organisierten Chondrozyten zu Chondrozyten in anderen räumlichen Organisationsformen wurde hierbei als Quotient der jeweiligen Kollagen mRNA-Expressionen gebildet (Mittelwerte der organisationsspezifischen Kollagen mRNA Expression). Alle Spalten wurden mit X codiert und alle Zeilen mit Y. Das Kollagen mRNA-Expressionsverhältnis wurde nach der Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Abbildung 19). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurden mit „-“ gekennzeichnet. Das größte Verhältnis bezüglich einer jeweiligen Kollagen mRNA-Expression wurde durch Fettdruck hervorgehoben.

	$\left(\frac{X}{Y}\right)$	X=Big Clusters	X=Diffus
Kollagen Typ I (COL1A2)	Y=Strings/Doublestrings	-	3,65-fache mRNA Expression
	Y=Small Clusters	-	4,29-fache mRNA Expression
Kollagen Typ II (COL2A1)	Y=Strings/Doublestrings	4,30-fache mRNA Expression	2,36-fache mRNA-Expression
	Y=Small Clusters	3,28-fache mRNA-Expression	-
Kollagen Typ III (COL3A1)	Y=Strings/Doublestrings	2,58-fache mRNA-Expression	3,40-fache mRNA-Expression
	Y=Small Clusters	-	2,57-fache mRNA-Expression
Kollagen Typ VI (COL6A1)	Y=Strings/Doublestrings	2,42-fache mRNA Expression	2,75-fache mRNA Expression
	Y=Small Clusters	3,04-fache mRNA Expression	3,45-fache mRNA Expression

3.5 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in verschiedenen räumlichen Organisationsformen

3.5.1 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings

Es wurden die relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter in superfiziellen Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings humaner Kniegelenkskondylen untersucht (s. Abbildung 20). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht. Außerdem sollte geklärt werden, ob es Korrelationen zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen superfizieller Chondrozyten in der definierten räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings gibt.

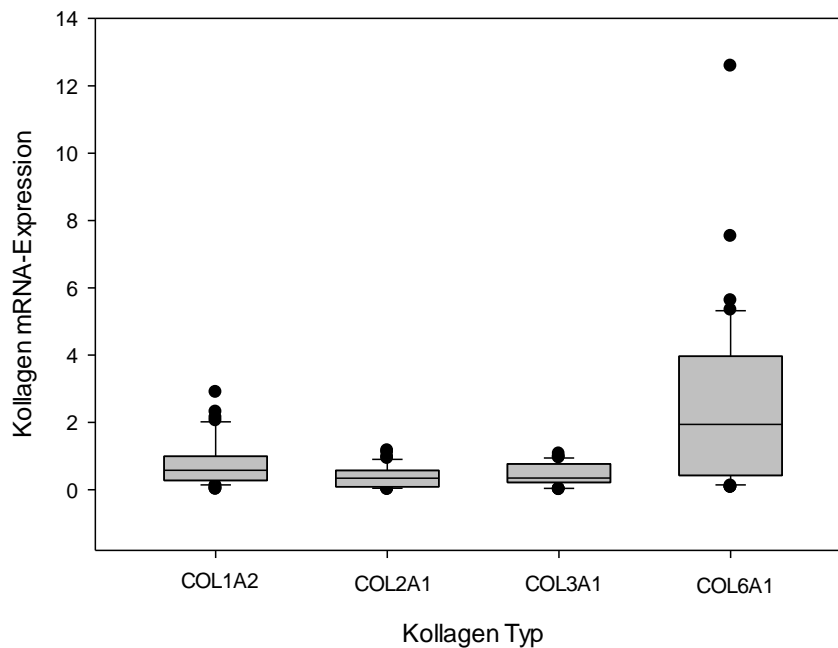


Abbildung 20: Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings. Dargestellt ist jeweils ein Boxplot der COL1A2-, COL2A1-, COL3A1- COL6A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten der superfiziellen Zone, deren räumliche Organisationsform vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch als Strings/Doublestrings klassifiziert wurde. Signifikante Unterschiede wurden anhand des ANOVA-on-Ranks Test mit anschließendem Post-Hoc Test ermittelt und wurden in Tabelle 20 hellgrau hervorgehoben. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) wurden als schwarze Punkte dargestellt (n=21 Proben und n= 315 Knorpelzylinder).

Die relative COL6A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Strings war gegenüber allen übrigen untersuchten Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1)) signifikant ($p < 0,05$) höher (p-Werte siehe Tabelle 20). Hierbei wurde COL6A1 durchschnittlich 3,2 -fach mehr als COL1A2 I, 6,3-fach mehr als COL2A1 und 5,5-fach mehr als COL3A1 exprimiert (s. Tabelle 21). Außerdem wurde COL1A2 um durchschnittlich das 3,4-fache signifikant höher ($p < 0,05$) exprimiert als COL2A1 (s. Tabelle 20 und Tabelle 21).

Eine signifikante ($p < 0,05$) positive Korrelation wurde zwischen der COL6A1 mRNA-Expression und den mRNA-Expressionen von COL1A2 und COL3A1 gefunden. Zudem korrelierte die COL3A1 mRNA-Expression signifikant ($p < 0,05$) mit den mRNA-Expressionen von COL1A2 und COL2A1 (s. Tabelle 22).

Tabelle 20: Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings. Dargestellt sind hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests ermittelt wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA-on-ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression ergab. Nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede sind dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, sind mit X gekennzeichnet (Strings/Doublestrings: $n=21$ Proben und $n= 315$ Knorpelzylinder).

Unterschiede in der Kollagenexpression humaner Chondrozyten-Strings/-Doublestrings	COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
COL2A1	x	$p > 0,05$	$p < 0,05$
COL3A1	x	x	$p < 0,05$

Tabelle 21: Verhältnisse der relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings. Die Verhältnisse der mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen in als Strings/Doublestrings organisierten Chondrozyten, wurde als Quotient der Mittelwerte der verschiedenen stringspezifischen Kollagen mRNA-Expressionen gebildet. Alle Spalten wurden mit X und alle Zeilen mit Y codiert. Der Quotient wurde nach der Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (Tabelle 20). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurden mit „-“ gekennzeichnet

Verhältnis verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen von Chondrozyten Strings/Doublestrings ($\frac{X}{Y}$)	X= COL6A1	X= COL1A2
Y= COL1A2	3,16-fache mRNA Expression	-
Y= COL2A1	6,27-fache mRNA Expression	3,41-fache mRNA Expression
Y= COL3A1	5,53-fache mRNA Expression	-

Tabelle 22.: Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings. Dargestellt ist der Korrelationskoeffizient (K), welcher anhand des Pearson-Produkt-Moment ermittelt wurde, und der entsprechende p-Wert für die Korrelation zwischen jeweils zwei verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in der Organisationsform Strings/Doublestrings. Ist der Korrelationskoeffizient zwischen zwei unterschiedlichen Kollagen mRNA-Expressionen positiv, so steigen beide Kollagenexpressionsprofile gemeinsam linear an. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben. Nicht signifikante Korrelationen wurden dunkelgrau codiert. Korrelationen, welche nicht sinnvoll waren oder schon ermittelt wurden, wurden mit einem X codiert (Strings/Doublestrings: n=21 Proben und n= 315 Knorpelzylinder).

Korrelationen verschiedener Kollagenexpressionen humaner Chondrozyten-Strings/Doublestrings		COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	K	0,0995	0,496	0,567
	p	0,531	0,00083	0,00111
COL2A1	K	x	0,600	0,246
	p		<0,0001	0,121
COL3A1	K	x	x	0,342
	p			0,0287

3.5.2 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in der räumlichen Organisationsform Small Clusters

Es wurden die relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter in superfiziellen Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters untersucht (s. Abbildung 21). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Small Clusters gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht. Außerdem sollte geklärt werden, ob es Korrelationen zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen superfizieller Chondrozyten in der definierten räumlichen Organisationsform Small Clusters gibt.

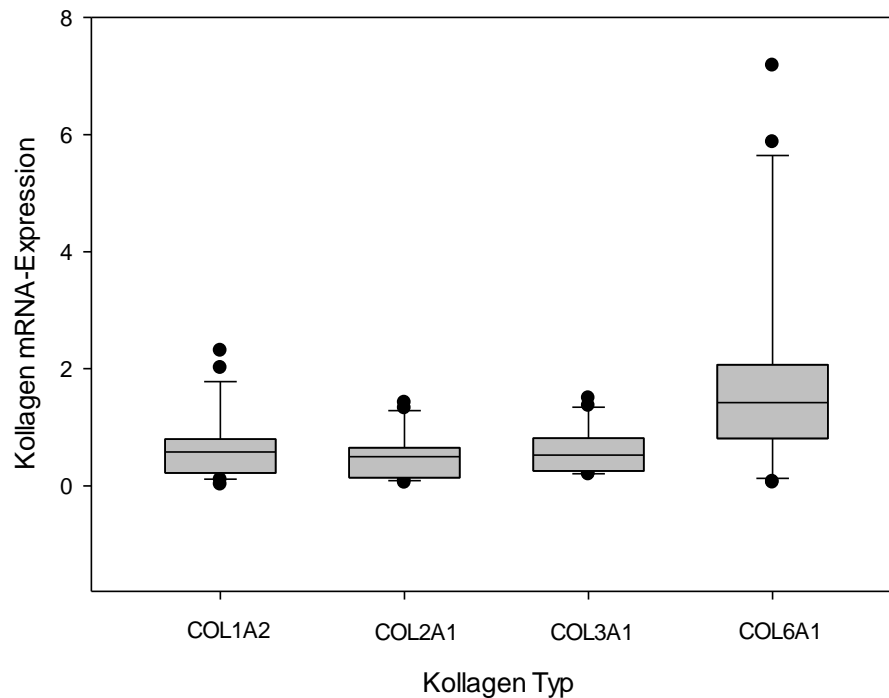


Abbildung 21.: Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters. Dargestellt ist jeweils ein Boxplot der COL1A2-, COL2A1-, COL3A1- COL6A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten der superfiziellen Zone, deren räumliche Organisationsform vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch als Small Clusters klassifiziert wurde. Signifikante Unterschiede wurden anhand des ANOVA -on-Ranks Test mit anschließendem Post-Hoc Test ermittelt und wurden in Tabelle 23 hellgrau hervorgehoben. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) wurden als schwarze Punkte dargestellt (n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder).

Die relative COL6A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der superfiziellen Zone, welche mikroskopisch als Chondrozyten-Small Clusters definiert wurden, unterschied sich signifikant ($p < 0,05$) von allen übrigen untersuchten Kollagenexpressionsprofilen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1); p-Werte siehe Tabelle 23)). Hierbei wurde COL6A1 durchschnittlich 2,9-fach höher als COL1A2, 3,8-fach höher als COL2A1 und 3,3-fach höher als COL3A1 exprimiert (Tabelle 24). Zwischen den Expressionsprofilen von COL1A2, COL2A1, COL3A1 wurden keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede gefunden (s. Tabelle 23).

Eine signifikante ($p < 0,05$) positive Korrelation für in Small Clusters organisierte superfizielle Chondrozyten wurde zwischen der relativen mRNA-Expression von COL2A1 und COL3A1 gefunden. Außerdem korrelierte die relative COL6A1 mRNA-Expression signifikant ($p < 0,05$) positiv sowohl mit der relativen COL2A1 mRNA-Expression als auch mit der relativen COL3A1 mRNA-Expression. Die übrigen Kollagenexpressionen korrelierten nicht signifikant miteinander (s. Tabelle 25).

Tabelle 23: Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters. Dargestellt sind hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests ermittelt wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA on ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression ergab. Nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede sind dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet (Small Clusters: $n=11$ Proben und $n= 165$ Knorpelzylinder).

Unterschiede in der Kollagenexpression humaner Chondrozyten- Small Clusters	COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
COL2A1	x	$p > 0,05$	$p < 0,05$
COL3A1	x	x	$p < 0,05$

Tabelle 24: Verhältnisse der relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters. Die Verhältnisse der mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen in als Small Clusters organisierten Chondrozyten wurde als Quotient der Mittelwerte der verschiedenen Small-Cluster-spezifischen Kollagen mRNA-Expressionen gebildet. Alle Spalten wurden mit X und alle Zeilen mit Y codiert. Der Quotient wurde nach Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 23). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurden mit „-“ gekennzeichnet.

Verhältnis verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen von Chondrozyten Small Clusters ($\frac{X}{Y}$)	X= COL6A1
Y= COL1A2	2,96-fache mRNA-Expression
Y= COL2A1	3,81-fache mRNA-Expression
Y= COL3A1	3,33-fache mRNA-Expression

Tabelle 25: Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Small Clusters. Dargestellt ist der Korrelationskoeffizient (K), welcher anhand des Pearson-Produkt-Moment ermittelt wurde, und der entsprechende p-Wert für die Korrelation zwischen jeweils zwei verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Small Clusters. Ist der Korrelationskoeffizient zwischen zwei unterschiedlichen Kollagen mRNA-Expressionen positiv, so steigen beide Kollagenexpressionsprofile gemeinsam linear an. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben. Nicht signifikante Korrelationen wurden dunkelgrau kodiert. Korrelationen, welche nicht sinnvoll waren oder schon ermittelt wurden, wurden mit einem X codiert (Small Clusters: n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder).

Korrelationen verschiedener Kollagen-expressionen humaner Chondrozyten-Small Clusters		COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	K	0,0445	0,417	0,189
	p	0,844	0,0538	0,399
COL2A1	K		0,723	0,569
	p	x	0,000143	0,00567
COL3A1	K			0,446
	p	x	x	0,0377

3.5.3 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in der räumlichen Organisationsform Big Clusters

Es wurden die relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter in superfiziellen Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters untersucht (s. Abbildung 22). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Big Clusters gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht. Außerdem sollte geklärt werden, ob es Korrelationen zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen superfizieller Chondrozyten in der definierten räumlichen Organisationsform Big Clusters gibt.

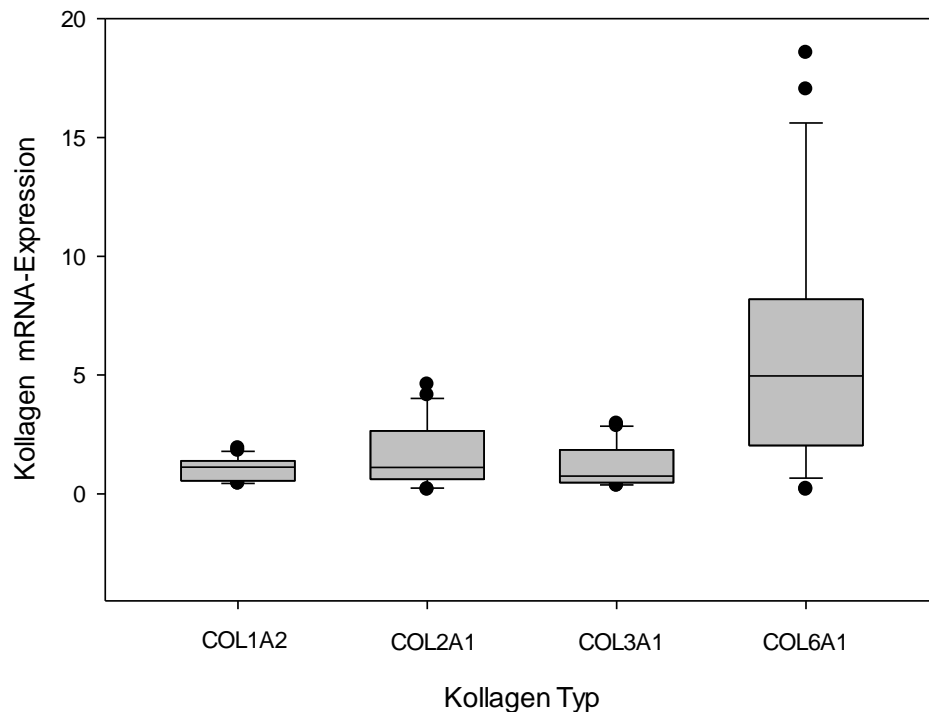


Abbildung 22: Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters. Dargestellt ist jeweils ein Boxplot der COL1A2-, COL2A1-, COL3A1- COL6A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten der superfiziellen Zone, deren räumliche Organisationsform vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch als Big Clusters klassifiziert wurde. Signifikante Unterschiede wurden anhand des ANOVA-on-Ranks Test mit anschließendem Post-Hoc Test ermittelt und wurden in Tabelle 26 hellgrau hervorgehoben. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) wurden als schwarze Punkte dargestellt (n=11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder).

Die relative COL6A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der superfiziellen Zone, welche mikroskopisch als Chondrozyten-Big Clusters definiert wurden, unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) von allen übrigen untersuchten Kollagenexpressionsprofilen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1): p-Werte siehe Tabelle 26). Hierbei wurde COL6A1 durchschnittlich 5,6-fach höher exprimiert als COL1A2, 3,5-fach höher als Kollagen COL2A1 und 5,1-fach höher als COL3A1 (Tabelle 27). Zwischen den übrigen Expressionsprofilen konnten keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede gefunden werden (s. Tabelle 26).

Eine signifikante ($p < 0,05$) positive Korrelation für in Big Clusters organisierte Chondrozyten wurde zwischen der relativen COL2A1 mRNA-Expression und der COL6A1 mRNA-Expression, sowie zwischen den relativen mRNA-Expressionen von COL6A1 und COL3A1 gefunden. Außerdem korrelierte die relative COL3A1 mRNA-Expression ($p < 0,05$) sowohl signifikant mit der relativen COL1A2 mRNA-Expression als auch mit der COL2A1 mRNA-Expression. Zwischen den übrigen untersuchten Kollagenexpressionsprofilen wurden keine signifikanten Korrelationen gefunden (s. Tabelle 28).

Tabelle 26: Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters. Dargestellt ist hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests ermittelt wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA on ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression ergab. Nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede wurden dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet (Big Clusters: $n = 11$ Proben und $n = 165$ Knorpelzylinder).

Unterschiede in der Kollagenexpression humaner Chondrozyten-Big-Clusters	COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	p>0,05	p>0,05	p<0,05
COL2A1	x	p>0,05	p<0,05
COL3A1	x	x	p<0,05

Tabelle 27: Verhältnisse der mRNA-Expressionen verschiedener relativer Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters. Die Verhältnisse der relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen in als Big Clusters organisierten Chondrozyten, wurde als Quotient der Mittelwerte der verschiedenen Big-Clusters-spezifischen Kollagen mRNA-Expressionen gebildet. Alle Spalten wurden mit X und alle Zeilen mit Y codiert. Der Quotient wurde nach Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 26). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurden mit „-“ gekennzeichnet.

Verhältnis verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen von Chondrozyten Big Clusters ($\frac{X}{Y}$)	X= COL6A1
Y= COL1A2	5,66-fache mRNA-Expression
Y= COL2A1	3,52-fache mRNA-Expression
Y= COL3A1	5,18-fache mRNA-Expression

Tabelle 28: Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Big Clusters. Dargestellt wurde der Korrelationskoeffizient (K), welcher anhand des Pearson-Produkt-Moment ermittelt wurde, und der entsprechende p-Wert für die Korrelation zwischen jeweils zwei verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Big Clusters. Ist der Korrelationskoeffizient zwischen zwei unterschiedlichen Kollagen mRNA-Expressionen positiv, so steigen beide Kollagenexpressionsprofile gemeinsam linear an. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben. Nicht signifikante Korrelationen wurden dunkelgrau codiert. Korrelationen, welche nicht sinnvoll waren oder schon ermittelt wurden, wurden mit einem X codiert (Big Clusters: n= 11 Proben und n= 165 Knorpelzylinder).

Korrelationen verschiedener Kollagen-expressionen humaner Chondrozyten-Big Clusters		COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	K	0,303	0,49	0,535
	p	0,171	0,0276	0,0103
COL2A1	K	x	0,697	0,711
	p		0,000309	0,000205
COL3A1	K	x	x	0,152
	p			0,5

3.5.4 Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in einer diffusen räumlichen Organisationsform

Es wurden die relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter in superfiziellen Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen mit einer diffusen räumlichen Organisationsform untersucht (s. Abbildung 23). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht. Außerdem sollte geklärt werden, ob es Korrelationen zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen superfizieller Chondrozyten in einer diffusen räumlichen Organisationsform gibt.

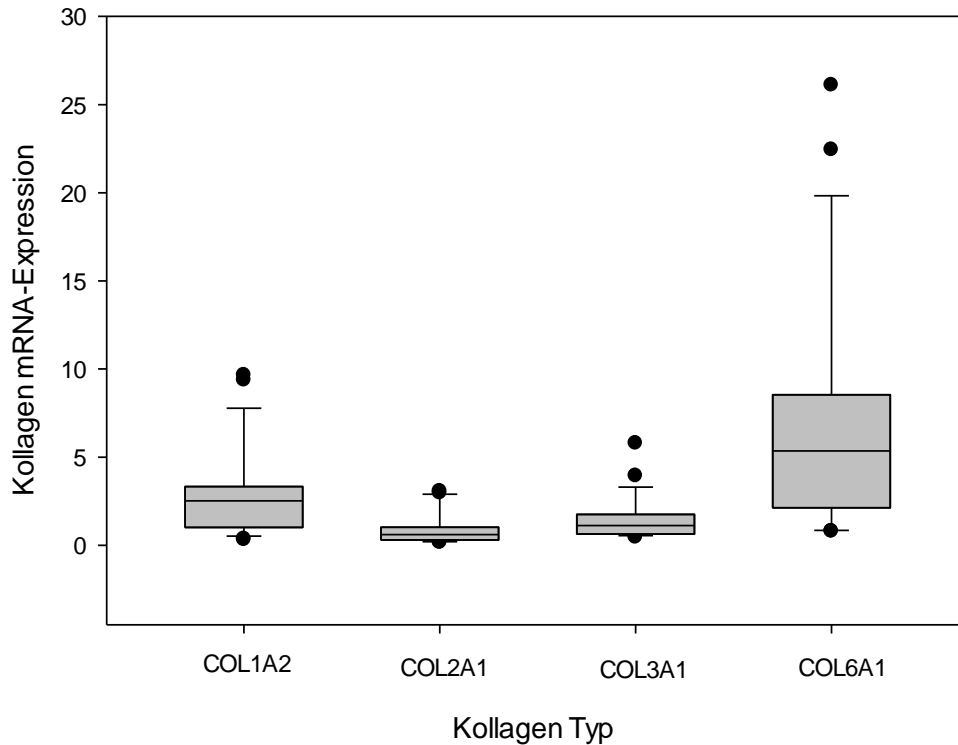


Abbildung 23: Vergleich verschiedener relativer Kollagen-mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in Chondrozyten der superfiziellen Zone mit einer diffusen räumlichen Organisationsform. Dargestellt ist jeweils ein Boxplot der COL1A2-, COL2A1-, COL3A1- COL6A1 mRNA-Expression humaner Chondrozyten der superfiziellen Zone, deren räumliche Organisationsform vor der Genexpressionsanalyse mikroskopisch als diffus klassifiziert wurde. Signifikante Unterschiede wurden anhand des ANOVA -on-Ranks Test mit anschließendem Post-Hoc Test ermittelt und wurden in Tabelle 29 hellgrau hervorgehoben. Die Boxplots zeigen den Median, die 25te und 75te Perzentile, sowie die Fehlerbalken innerhalb der 10ten und 90ten Perzentile. Ausreißer (Datenpunkte außerhalb der 10ten oder 90ten Perzentile) wurden als schwarze Punkte dargestellt (n=12 Proben und n= 180 Knorpelzylinder)

Die relative COL6A1 mRNA-Expression von Chondrozyten der superfiziellen Zone, welche mikroskopisch als Chondrozyten mit einer diffusen Organisationsform definiert wurden, unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) von dem relativen COL2A1 und dem COL3A1 mRNA-Expressionsprofil (p -Werte siehe Tabelle 29). Hierbei wurde COL6A1 im Durchschnitt 7,3-fach höher exprimiert als COL2A1 und 4,5-fach höher als COL3A1 (s. Tabelle 30). Außerdem wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der relativen COL1A2 und COL2A1 mRNA Expression gefunden, wobei COL1A2 durchschnittlich 3-fach höher exprimiert wurde als COL2A1 (s. Tabelle 29 und Tabelle 30). Zwischen den übrigen Expressionsprofilen

konnten keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede gefunden werden (s. Tabelle 30).

Eine signifikante ($p < 0,05$) positive Korrelation wurde in diffus verteilten Chondrozyten der superfiziellen Zone zwischen der relativen mRNA-Expression von COL6A1 und COL3A1 gefunden. Außerdem korrelierte die relative COL1A2 mRNA-Expression sowohl signifikant ($p < 0,05$) positiv mit der COL3A1 als auch mit der COL6A1 mRNA-Expression. Die übrigen Kollagenexpressionen korrelierten nicht signifikant miteinander (s. Tabelle 31).

Tabelle 29: Paarweiser Vergleich verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) von Chondrozyten der superfiziellen Zone mit einer diffusen räumlichen Organisationsform. Dargestellt ist hellgrau kodiert signifikante p-Werte ($p < 0,05$), welche anhand von Post Hoc Tests ermittelt wurden, sofern ein vorhergehender ANOVA on ranks-Test signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich der relativen COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression ergab. Nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede wurden dunkelgrau kodiert. Vergleiche, die nicht sinnvoll waren oder bereits durchgeführt wurden, wurden mit X gekennzeichnet (Diffus: $n = 12$ Proben und $n = 180$ Knorpelzylinder).

Unterschiede der Kollagenexpression humaner diffus verteilter Chondrozyten	COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
COL2A1	x	$p > 0,05$	$p < 0,05$
COL3A1	x	x	$p < 0,05$

Tabelle 30: Verhältnisse der mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) in superfiziellen Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform. Die Verhältnisse der relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen in diffus organisierten Chondrozyten, wurde als Quotient der Mittelwerte der verschiedenen diffus-spezifischen Kollagen mRNA-Expressionen gebildet. Alle Spalten wurden mit X und alle Zeilen mit Y codiert. Der Quotient wurde nach Formel Verhältnis= X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche Expressionen errechnet (s. Tabelle 29). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und wurde mit „-“ gekennzeichnet.

Verhältnis verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen von diffus verteilten Chondrozyten ($\frac{X}{Y}$)	X= COL1A2	X= COL6A1
Y= COL2A1	3,10-fache mRNA-Expression	7,29-fache mRNA-Expression
Y= COL3A1	-	4,47-fache mRNA-Expression

Tabelle 31: Korrelation verschiedener relativer Kollagen Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) humaner superfizieller Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform. Dargestellt ist der Korrelationskoeffizient (K), welcher anhand des Pearson-Produkt-Moment ermittelt wurde, und der entsprechende p-Wert für die Korrelation zwischen jeweils zwei verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten mit einer diffusen räumlichen Organisationsform. Ist der Korrelationskoeffizient zwischen zwei unterschiedlichen Kollagen mRNA-Expressionen positiv, so steigen beide Kollagenexpressionsprofile gemeinsam linear an. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben. Nicht signifikante Korrelationen wurden dunkelgrau codiert. Korrelationen, welche nicht sinnvoll waren oder schon ermittelt wurden, wurden mit einem X codiert gekennzeichnet (Diffus: n= 12 Proben und n=180 Knorpelzylinder).

Korrelationen verschiedener Kollagen-expressionen humaner diffus verteilter Chondrozyten-		COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	K	-0,000558	0,94	0,889
	p	0,998	<0,0001	<0,0001
COL2A1	K	x	0,0611	0,222
	p		0,777	0,297
COL3A1	K	x	x	0,812
	p			<0,0001

3.6 Zusammenfassung: Vergleich verschiedener relativer Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen in verschiedenen räumlichen Organisationsformen

Es wurden die relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter in superfiziellen Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen mit verschiedenen räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) untersucht (Abbildung 24). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob es signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen von superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen gibt und somit ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht. Außerdem sollte geklärt werden, ob es Korrelationen zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen gibt.

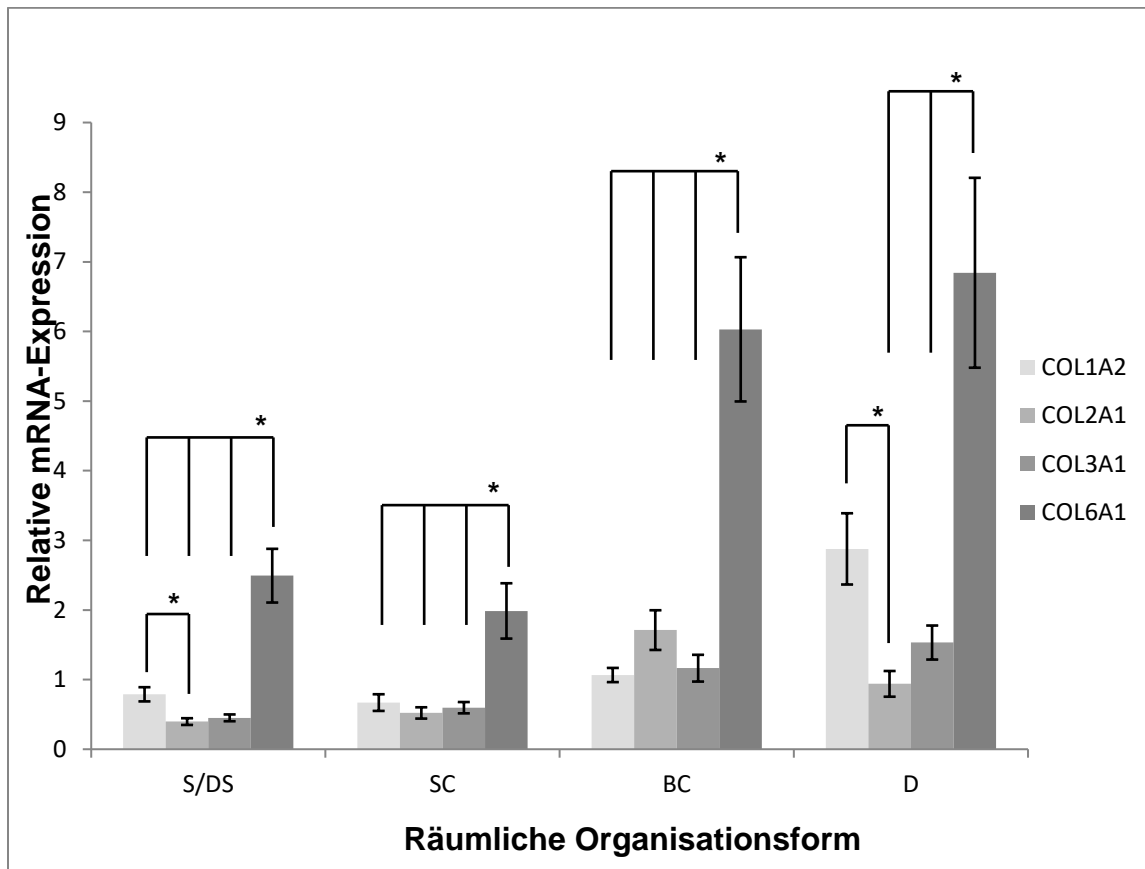


Abbildung 24: Übersicht über den Vergleich der durchschnittlichen relativen COL1A2, COL2A1, COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression innerhalb verschiedener räumlicher Organisationsformen humaner superfizieller Chondrozyten. Dargestellt ist ein Balkendiagramm der durchschnittlichen relativen mRNA-Expressionen verschiedener Kollagen-Typen (Typ I (COL1A2), II (COL2A1), III (COL3A1), VI (COL6A1) in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform humaner superfizieller Chondrozyten (S/DS=Strings/Doublestrings, SC=Small Clusters, BC=Big Clusters, D=Diffus). Signifikante Expressionsunterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen innerhalb einer definierten räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten wurden jeweils über entsprechende Signifikanzbalken dargestellt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden anhand des ANOVA on Ranks Tests und anschließendem Post-Hoc Text ermittelt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an (S/DS: $n=21$ Proben und $n=315$ Knorpelzylinder, SC: $n=11$ Proben und $n=165$ Knorpelzylinder, BC: $n=11$ Proben und $n=165$ Knorpelzylinder, D: $n=12$ Proben und $n=180$ Knorpelzylinder).

In Chondrozyten mit den räumlichen Organisationsformen Strings/Doublestrings, Small Clusters und Big Clusters war die relative COL6A1 mRNA Expression signifikant ($p < 0,05$) höher als die relative COL1A2, COL2A1 und COL3A1 mRNA-Expression. In diffus verteilten Chondrozyten war die relative COL6A1 mRNA Expression signifikant ($p < 0,05$) höher als die relative COL2A1 und COL3A1 mRNA-Expression. Zusammenfassend ließ sich sagen, dass die COL6A1 mRNA Expression gegenüber der COL1A2, COL2A1 und COL3A1 mRNA Expression in allen

räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten am höchsten exprimiert wurde. In Chondrozyten organisiert in Strings/Doublestrings und in diffus verteilten Chondrozyten war die relative COL1A2 mRNA-Expression signifikant ($p < 0,05$) höher als die relative COL2A1 mRNA-Expression. Zudem war die relative COL2A1 mRNA-Expression von Chondrozyten in der Organisationsform Big Clusters signifikant ($p < 0,05$) höher als COL3A1 mRNA-Expression (s. Abbildung 24)

In Chondrozyten der Organisationsformen Strings/Doublestrings, Small Clusters und einer diffusen Verteilung war jeweils das Verhältnis zwischen der relativen COL6A1 und COL2A1 mRNA-Expression am größten gegenüber den ermittelten Verhältnissen der übrigen Kollagen mRNA-Expressionen (s. Tabelle 32). Hierbei war die relative COL6A1 mRNA-Expression in Strings/Doublestrings 6,3-fach, in Small Clusters 3,8-fach und in einer diffusen Verteilung der superfiziellen Chondrozyten 7,3-fach höher als die relative COL2A1 mRNA-Expression. Eine Ausnahme stellte die Kollagen mRNA-Expression in Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Big Clusters dar. Hier wurde das größte Verhältnis zwischen der relativen COL1A2 und COL6A1 mRNA-Expression gefunden, wobei COL6A1 5,6-fach höher exprimiert wurde als COL1A2. Aber auch in in Big Clusters organisierten superfiziellen Chondrozyten war die relative COL6A1 mRNA-Expression 3,5-fach höher als die relative COL2A1 mRNA-Expression, was etwa demselben Verhältnis entsprach wie bei in Small Clusters organisierten Chondrozyten. Besonders hervorzuheben war dabei die Steigerung des Verhältnisses der relativen COL6A1 und COL2A1 mRNA-Expression von in Big Clusters organisierten Chondrozyten zu diffus verteilten superfiziellen Chondrozyten mit einem Sprung von einer 3,5-fach höheren relativen COL6A1 mRNA Expression zu einer 7,3-fach höheren COL6A1 mRNA-Expression im Verhältnis zur relativen COL2A1 mRNA-Expression (s. Tabelle 32). Die Korrelationen zwischen den verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) waren sehr heterogen verteilt und folgten keiner klaren Systematik. Es fiel jedoch auf, dass die COL1A2 und die COL2A1 mRNA-Expression in keinem der untersuchten räumlichen Organisationsstadien superfizieller Chondrozyten

signifikant miteinander korrelierten. Alle anderen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen hingegen korrelierten abwechselnd in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten miteinander, aber ohne eine erkennbare Systematik (s. Tabelle 33).

Tabelle 32 Übersicht über die Verhältnisse der mRNA- Expression von Kollagen Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1) innerhalb definierter räumlicher Organisationsformen superfizieller Chondrozyten (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus). Die Verhältnisse der relativen mRNA- Expression verschiedener Kollagen Typen wurden aus dem Quotienten der jeweiligen durchschnittlichen Kollagen mRNA Expressionen von superfiziellen Chondrozyten innerhalb einer definierten räumlichen Organisationsform berechnet. Dabei wurden alle Spalten mit X codiert und alle Zeilen mit Y. Der Quotient wurde nach der Formel Verhältnis =X/Y gebildet. Quotienten wurden nur für signifikant unterschiedliche mRNA-Expressionen errechnet (s. Abbildung 24). Quotienten für nicht signifikant unterschiedliche Expressionen wurden nicht errechnet und sind mit „-“ gekennzeichnet. Das größte Verhältnis der mRNA Expression zwischen zwei Kollagen-Typen innerhalb einer räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten wurde jeweils durch Fettdruck hervorgehoben.

	$\left(\frac{X}{Y}\right)$	X= COL1A2	X= COL6A1
Strings/ Doublestrings	Y= COL1A2	-	3,16-fache mRNA Expression
	Y= COL2A1	3,41-fache mRNA Expression	6,27-fache mRNA Expression
	Y= COL3A1	-	5,53-fache mRNA Expression
Small Clusters			X= COL6A1
	Y= COL1A2	-	2,96-fache mRNA Expression
	Y= COL2A1	-	3,81-fache mRNA Expression
	Y= COL3A1	-	3,33-fache mRNA Expression
Big Clusters			X= COL6A1
	Y= COL1A2	-	5,66-fache mRNA Expression
	Y= COL2A1	-	3,52-fache mRNA Expression
	Y= COL3A1	-	5,18-fache mRNA Expression
Diffus		X= COL1A2	X= COL6A1
	Y= COL2A1	3,10-fache mRNA Expression	7,29-fache mRNA Expression
	Y= COL3A1	-	4,47-fache mRNA Expression

Tabelle 33: Übersicht über die Korrelation zwischen verschiedenen relativen Kollagenexpressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) innerhalb definierter Organisationsformen superfizieller Chondrozyten der humanen Kniegelenkskondyle. In der Tabelle sind die paarweisen Korrelationen verschiedener Kollagenexpressionen von humanen superfiziellen Chondrozyten mit definierten räumlichen Organisationsformen dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten (K) und dazu gehörige p-Werte wurden anhand des Pearson-Produkt-Moments ermittelt. Ist der Korrelationskoeffizient positiv und signifikant, so steigen beide Kollagenexpressionen linear an. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben. Korrelationen, welche nicht sinnvoll waren oder schon ermittelt wurden, wurden mit einem X codiert.

	Korrelationen verschiedener Kollagenexpressionen		COL2A1	COL3A1	COL6A1
Strings/ Doublestrings	COL1A2	K p	0,0995 0,531	0,496 0,00083	0,567 0,000111
	COL2A1	K p	x	0,600 <0,0001	0,246 0,121
	COL3A1	K p	x	x	0,342 0,0287
Small Clusters	COL1A2	K p	0,0445 0,844	0,417 0,0538	0,189 0,399
	COL2A1	K p	x	0,723 0,000143	0,569 0,00567
	COL3A1	K p	x	x	0,446 0,0377
Big Clusters	COL1A2	K p	0,303 0,171	0,49 0,0276	0,535 0,0103
	COL2A1	K p	x	0,697 0,000309	0,711 0,000205
	COL3A1	K p	x	x	0,152 0,5
Diffus	COL1A2	K p	-0,000558 0,998	0,94 <0,0001	0,889 <0,0001
	COL2A1	K p	x	0,0611 0,777	0,222 0,297
	COL3A1	K p	x	x	0,812 <0,0001

3.7 Vergleich des Verhältnisses der COL1A2 - und COL2A1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde das Verhältnis der mRNA-Expression von COL1A2 und COL2A1 als Differenzierungsmarker von superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen untersucht. Diese Untersuchung erfolgte unter der Fragestellung, ob superfizielle Chondrozyten in Abhängigkeit ihrer räumlichen Organisationsform ihr Differenzierungsverhalten ändern.

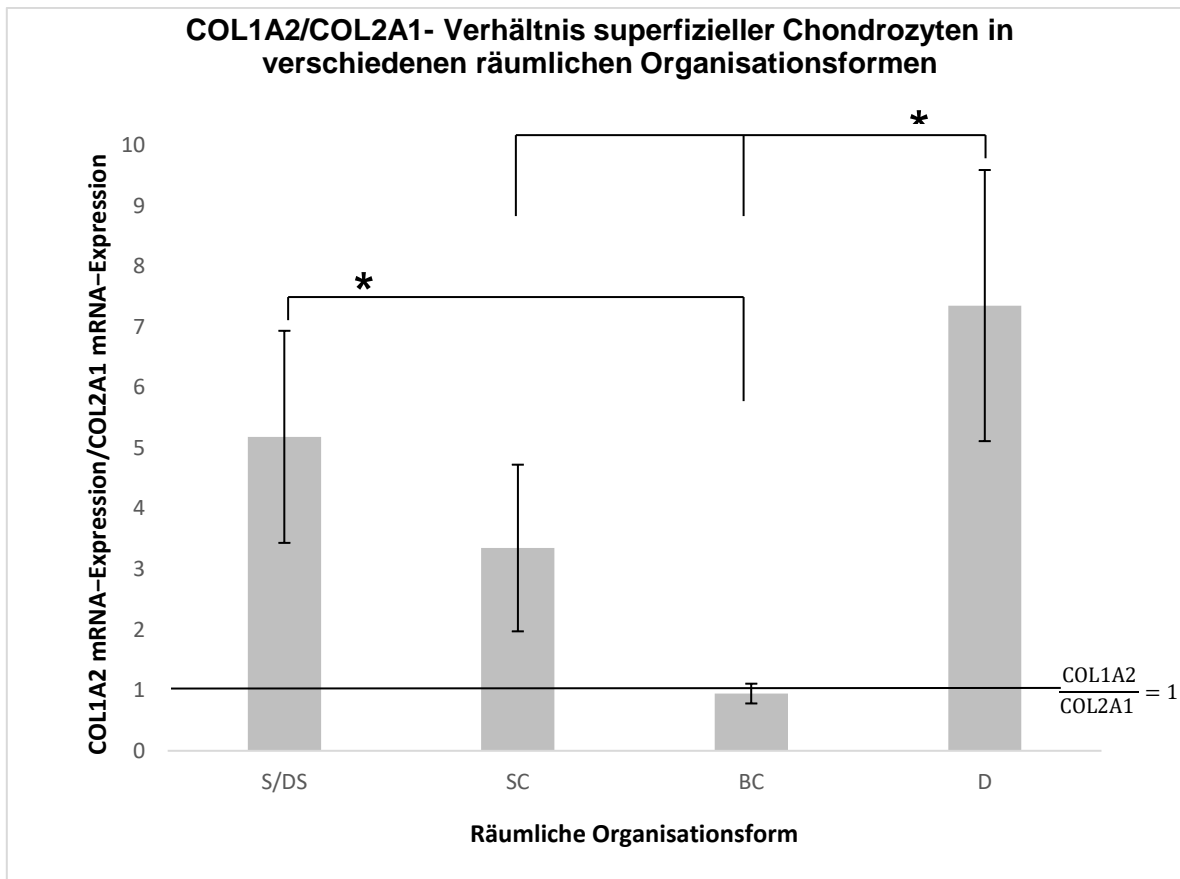


Abbildung 25: Verhältnis der relativen COL1A2 mRNA-Expression zu der relativen COL2A1 mRNA-Expression superfizieller Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen. Dargestellt ist ein Balkendiagramm des COL1A2/COL2A1-mRNA-Expressionsverhältnisses (Y-Achse) in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten (X-Achse: S/DS= Strings/Doublestrings, SC=Small Clusters, BC= Big Clusters, D= Diffus). Ein COL1A2/COL2A1 mRNA-Expressionsverhältnis kleiner 1 stellt einen chondrogen differenzierten Phänotyp der Chondrozyten in hyalinem Knorpelgewebe dar. Ein Verhältnis größer 1 weist auf einen zunehmend dedifferenzierten Phänotyp der superfiziellen Chondrozyten aus humanem hyalinem Knorpelgewebe hin. Es wurde der Mittelwert aller organisationsform-spezifischen

COL1A2/COL2A1-Verhältnisse errechnet. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden anhand des ANOVA on Ranks Test und anschließendem Post-hoc-Tests errechnet. Die Fehlerbalken geben jeweils den Standardfehler an. Die durchgezogene schwarze Linie markiert ein COL1A2/COL2A1- mRNA-Expressionsverhältnis von 1 (S/DS: $n=21$ Proben und $n= 315$ Knorpelzylinder, SC: $n=11$ Proben und $n= 165$ Knorpelzylinder, BC: $n= 11$ Proben und $n= 165$ Knorpelzylinder, D: $n= 12$ Proben und $n=180$ Knorpelzylinder).

Es wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bzgl. des Verhältnisses COL1A2 mRNA-Expression/ COL2A1 mRNA-Expression von superfiziellen Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) zwischen diffus verteilten Chondrozyten und Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Big und Small Clusters gefunden. Darüber hinaus wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) des COL1A2/COL2A1- Verhältnisses zwischen Chondrozyten der Organisationsform Big Clusters und Strings/Doublestrings gefunden. Das mittlere COL1A2/COL2A1-Verhältniss superfizieller Chondrozyten der Organisationsform Big Clusters war dabei als einziges COL1A2/COL2A1-Verhältnis kleiner 1 (s. Abbildung 25).

3.8 Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die Korrelation (Pearson-Produkt-Moment) zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) humaner Kniegelenkskondylen untersucht. Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht und in welcher Beziehung die untersuchten phänotyp-relevanten Funktionsparameter zueinander stehen.

3.8.1 Korrelation der relativen COL1A2 und COL2A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen

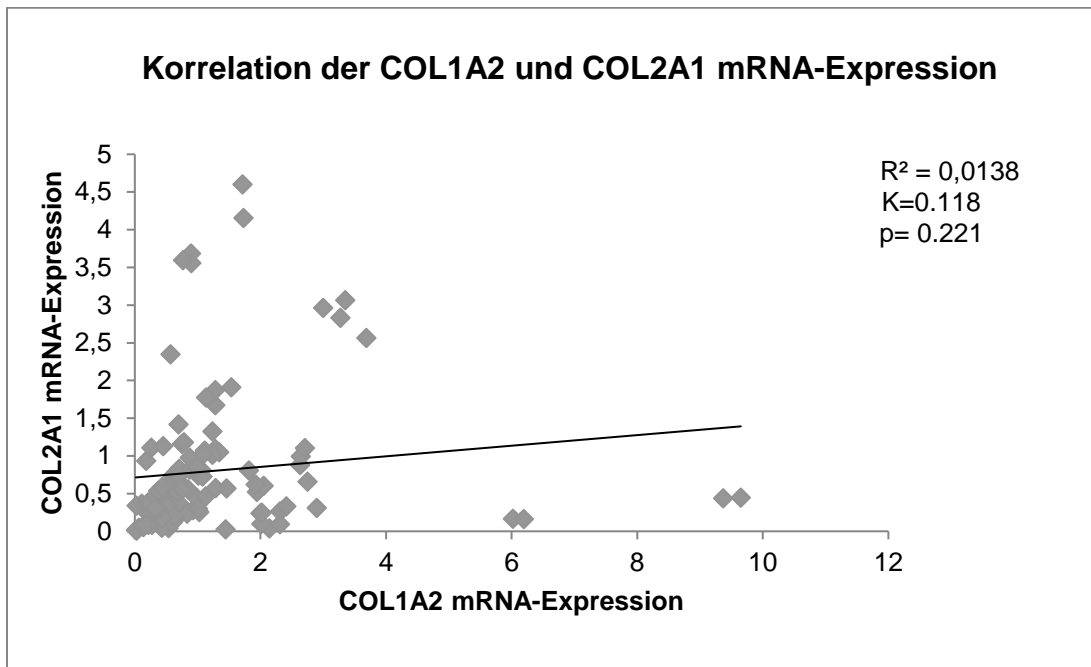


Abbildung 26: Korrelation der relativen COL1A2 und COL2A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen. Dargestellt ist ein Scatterplot, in welchem anhand einer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) die Korrelation der COL1A2 und COL2A1 mRNA Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten visualisiert wurde. Hierbei stellt jeder Datenpunkt einen analysierten Knorpelzylinder dar, in welchem eine definierte räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten (z.B. Strings/Doublestrings) gefunden wurde und dessen relative COL1A2 und COL2A1 mRNA Expression untersucht wurde. Dabei wurde jedem Datenpunkt auf der horizontalen Achse die zugehörige COL1A2 mRNA-Expression und auf der vertikalen Achse die entsprechende COL2A1 mRNA-Expression zugeordnet. Je höher die Korrelation zwischen der COL1A2 und der COL2A1 mRNA-Expression ist, desto näher liegen alle Datenpunkte an der Trendlinie und desto mehr nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Idealwert 1 an. Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des Pearson-Produkt-Moments ermittelt ($n=55$ Proben und $n= 825$ Knorpelzylinder).

Zwischen der relativen COL1A2 und COL2A1 mRNA-Expression wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,0138$ keine signifikante Korrelation ($p > 0,05$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten gefunden (s. Abbildung 26).

3.8.2 Korrelation der relativen COL1A2 und COL3A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

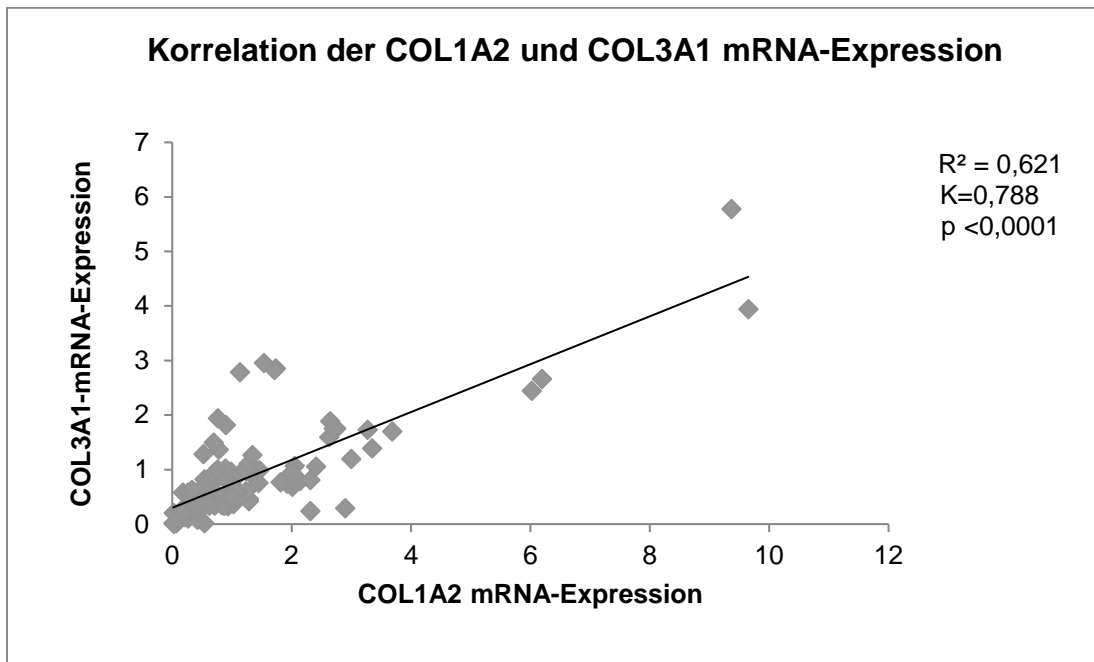


Abbildung 27: Korrelation der relativen COL1A2 und COL3A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen. Dargestellt ist ein Scatterplot, in welchem anhand einer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) die Korrelation der COL1A2 und COL3A1 mRNA Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten visualisiert wurde. Hierbei stellt jeder Datenpunkt einen analysierten Knorpelzylinder dar, in welchem eine definierte räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten (z.B. Strings/Doublestrings) gefunden wurde und dessen COL1A2 und COL3A1 mRNA Expression untersucht wurde. Dabei wurden jedem Datenpunkt auf der horizontalen Achse die zugehörige COL1A2 mRNA-Expression und auf der vertikalen Achse die entsprechende COL3A1 mRNA-Expression zugeordnet. Je höher die Korrelation zwischen der COL1A2 und der COL3A1 mRNA-Expression ist, desto näher liegen alle Datenpunkte an der Trendlinie und desto mehr nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Idealwert 1 an. Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des Pearson-Produkt-Moments ermittelt ($n=55$ Proben und $n= 825$ Knorpelzylinder).

Zwischen der relativen COL1A2 und COL3A1 mRNA-Expression konnte mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,621$ eine signifikante Korrelation ($p < 0,0001$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten gefunden werden (s. Abbildung 27).

3.8.3 Korrelation der relativen COL1A2 und COL6A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

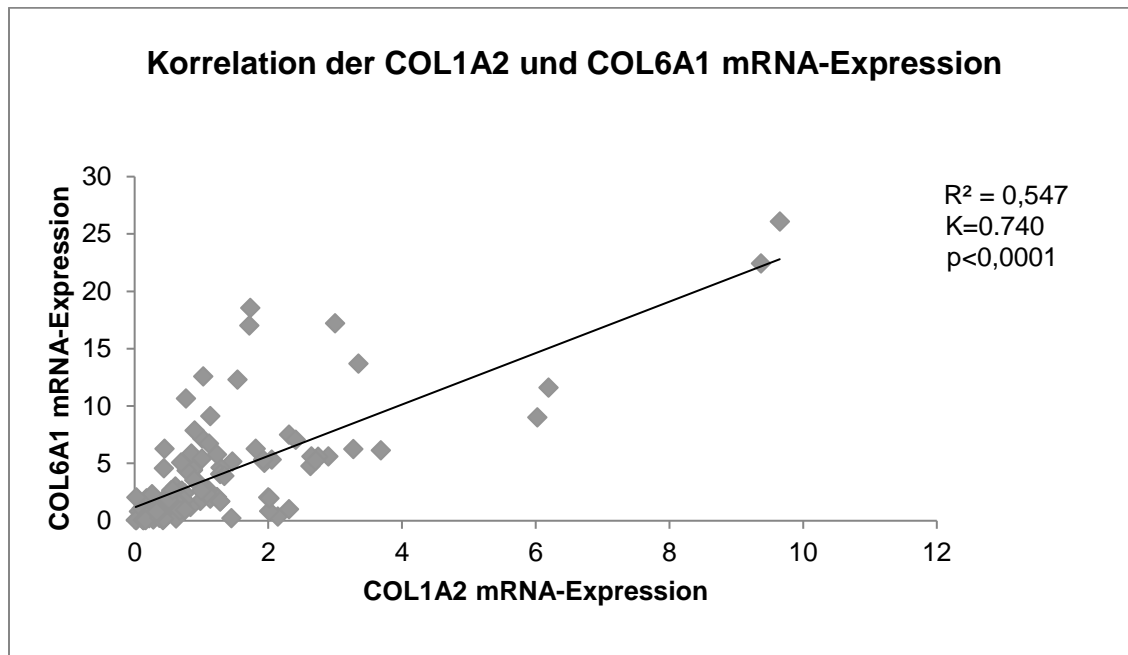


Abbildung 28: Korrelation der relativen COL1A2 und COL6A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen. Dargestellt ist ein Scatterplot, in welchem anhand einer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) die Korrelation der COL1A2 und COL6A1 mRNA Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten visualisiert wurde. Hierbei stellt jeder Datenpunkt einen analysierten Knorpelzylinder dar, in welchem eine definierte räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten (z.B. Strings/Doublestrings) gefunden wurde und dessen COL1A2 und COL6A1 mRNA Expression untersucht wurde. Dabei wurde jedem Datenpunkt auf der horizontalen Achse die zugehörige COL1A2 mRNA-Expression und auf der vertikalen Achse die entsprechende COL6A1 mRNA-Expression zugeordnet. Je höher die Korrelation zwischen der COL1A2 und der COL6A1 mRNA-Expression ist, desto näher liegen alle Datenpunkte an der Trendlinie und desto mehr nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Idealwert 1 an. Signifikante Korrelationen ($p<0,05$) wurden mit Hilfe des Pearson-Produkt-Moments ermittelt ($n=55$ Proben und $n= 825$ Knorpelzylinder).

Zwischen der relativen COL1A2 und COL6A1 mRNA-Expression wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,547$ eine signifikante Korrelation ($p<0,0001$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten gefunden (s. Abbildung 28).

3.8.4 Korrelation der relativen COL2A1 und COL3A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen

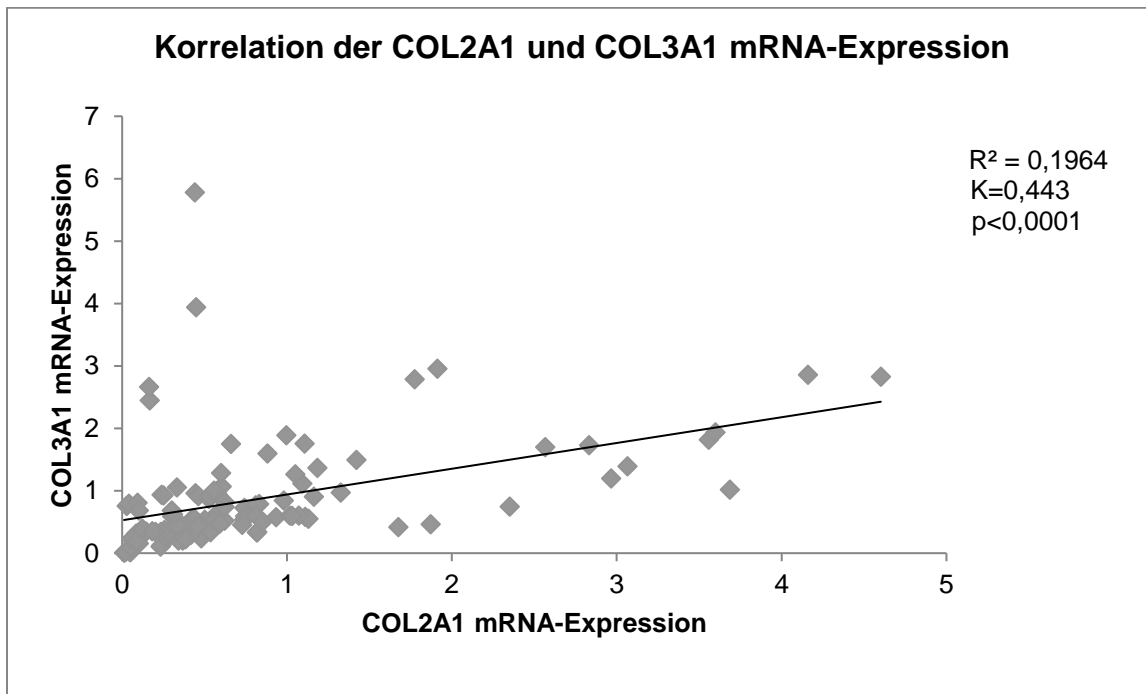


Abbildung 29: Korrelation der relativen COL2A1 und COL3A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenksskondylen. Dargestellt ist ein Scatterplot, in welchem anhand einer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) die Korrelation der COL2A1 und COL3A1 mRNA Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten visualisiert wurde. Hierbei stellt jeder Datenpunkt einen analysierten Knorpelzylinder dar, in welchem eine definierte räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten (z.B. Strings/Doublestrings) gefunden wurde und dessen COL2A1 und COL6A1 mRNA Expression untersucht wurde. Dabei wurde jedem Datenpunkt auf der horizontalen Achse die zugehörige COL2A1 mRNA-Expression und auf der vertikalen Achse die entsprechende COL3A1 mRNA-Expression zugeordnet. Je höher die Korrelation zwischen der COL2A1 und der COL3A1 mRNA-Expression ist, desto näher liegen alle Datenpunkte an der Trendlinie und desto mehr nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Idealwert 1 an. Signifikante Korrelationen ($p<0,05$) wurden mit Hilfe des Pearson-Produkt-Moments ermittelt ($n=55$ Proben und $n= 825$ Knorpelzylinder).

Zwischen der relativen COL2A1 und COL3A1 mRNA-Expression wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,1964$ eine signifikante Korrelation ($p<0,0001$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten gefunden (s. Abbildung 29).

3.8.5 Korrelation der relativen COL2A1 und COL6A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenksskondylen

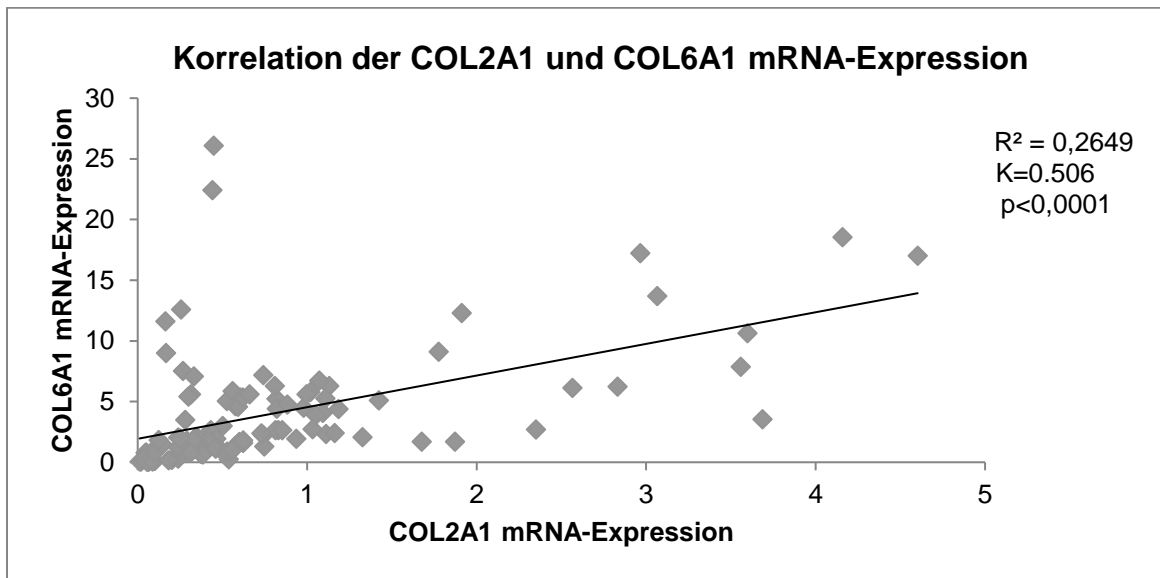


Abbildung 30: Korrelation der relativen COL2A1 und COL6A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenksskondylen. Dargestellt ist ein Scatterplot, in welchem anhand einer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) die Korrelation der COL2A1 und COL6A1 mRNA Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten visualisiert wurde. Hierbei stellt jeder Datenpunkt einen analysierten Knorpelzylinder dar, in welchem eine definierte räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten (z.B. Strings/Doublestrings) gefunden wurde und dessen COL2A1 und COL6A1 mRNA Expression untersucht wurde. Dabei wurde jedem Datenpunkt auf der horizontalen Achse die zugehörige COL2A1 mRNA-Expression und auf der vertikalen Achse die entsprechende COL6A1 mRNA-Expression zugeordnet. Je höher die Korrelation zwischen der COL2A1 und der COL6A1 mRNA-Expression ist, desto näher liegen alle Datenpunkte an der Trendlinie und desto mehr nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Idealwert 1 an. Signifikante Korrelationen ($p<0,05$) wurden mit Hilfe des Pearson-Produkt-Moments ermittelt ($n=55$ Proben und $n= 825$ Knorpelzylinder).

Zwischen der relativen COL2A1 und COL6A1 mRNA-Expression wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,2649$ eine signifikante Korrelation ($p<0,0001$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten gefunden (s. Abbildung 30).

3.8.6 Korrelation der COL3A1 und COL6A1 mRNA- Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

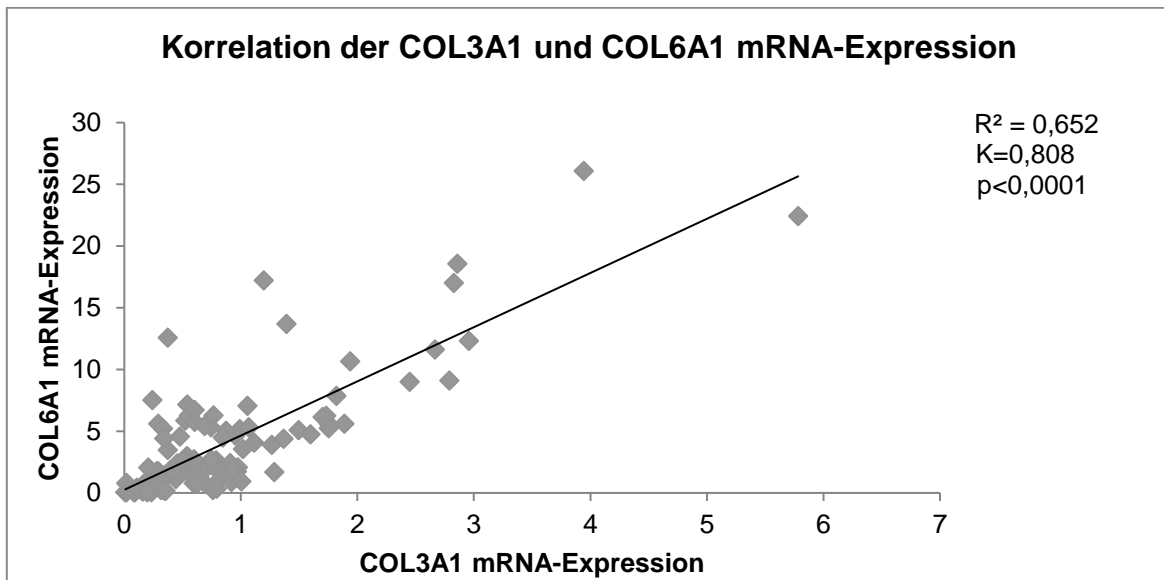


Abbildung 31: Korrelation der COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen. Dargestellt ist ein Scatterplot, in welchem anhand einer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß (R^2) die Korrelation der COL3A1 und COL6A1 mRNA Expression über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten visualisiert wurde. Hierbei stellt jeder Datenpunkt einen analysierten Knorpelzylinder dar, in welchem eine definierte räumliche Organisation der superfiziellen Chondrozyten (z.B. Strings/Doublestrings) gefunden wurde und dessen COL3A1 und COL6A1 mRNA Expression untersucht wurde. Dabei ist jedem Datenpunkt auf der horizontalen Achse die zugehörige COL3A1 mRNA-Expression und auf der vertikalen Achse die entsprechende COL6A1 mRNA-Expression zugeordnet. Je höher die Korrelation zwischen der COL3A1 und der COL6A1 mRNA-Expression ist, desto näher liegen alle Datenpunkte an der Trendlinie und desto mehr nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Idealwert 1 an. Signifikante Korrelationen ($p<0,05$) wurden mit Hilfe des Pearson-Produkt-Moments ermittelt ($n=55$ Proben und $n= 825$ Knorpelzylinder).

Zwischen der COL3A1 und COL6A1 mRNA-Expression konnte mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,652$ eine signifikante Korrelation ($p<0,0001$) in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten gefunden werden (s. Abbildung 31).

3.8.7 Zusammenfassung der Korrelationen verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die Korrelation (Pearson-Produkt-Moment) zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) humaner Kniegelenkskondylen untersucht. Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht und in welcher Beziehung die untersuchten phänotyp-relevanten Funktionsparameter zueinander stehen.

Tabelle 34: Übersicht über die Korrelationen verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1) über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen. In der Tabelle sind die paarweisen Korrelationen verschiedener Kollagenexpressionen von humanen superfiziellen Chondrozyten über alle räumlichen Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters, Diffus) dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten (K) und dazu gehörige p-Werte wurden anhand des Pearson-Produkt-Moments ermittelt. Ist der Korrelationskoeffizient positiv und signifikant, so steigen beide Kollagenexpressionen linear an. Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) wurden hellgrau hervorgehoben. Nicht signifikante Korrelationen ($p > 0,05$) wurden dunkelgrau hervorgehoben. Korrelationen, welche nicht sinnvoll waren oder schon ermittelt wurden, wurden mit einem X codiert (n=55 Proben und n= 825 Knorpelzylinder).

Korrelation verschiedener relativer Kollagenexpressionen		COL2A1	COL3A1	COL6A1
COL1A2	K	0,118	0,788	0,740
	p	0,221	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
COL1A2	K	x	0,443	0,506
	p		$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
COL3A1	K	x	x	0,808
	p			$p < 0,0001$

Die relative COL1A2 mRNA-Expression korrelierte nicht signifikant ($p > 0,05$) mit der COL2A1 mRNA-Expression. Alle übrigen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) korrelieren positiv signifikant ($p < 0,0001$) miteinander (s. Tabelle 34). Somit stiegen alle korrelierenden Kollagen mRNA-Expressionen im Verlauf der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten von Strings über Clusters bis zu einer diffusen Verteilung gemeinsam linear an.

3.9 Korrelation verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) mit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Es wurde die Korrelation (Spearman-Rank-Test) zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) als phänotyp-relevante Funktionsparameter und den räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen untersucht (s. Tabelle 35). Diese Untersuchung wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob ein Zusammenhang zwischen phänotyp-relevanten Funktionsparametern und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten besteht.

Tabelle 35: Korrelation zwischen verschiedenen relativen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen und deren räumlichen Organisationsformen. Dargestellt ist der Korrelationskoeffizient zwischen verschiedenen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) und der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten mit den entsprechenden p-Werten, welche anhand des Spearman-Rank-Tests ermittelt wurden. Für den Spearman-Rank-Test war es notwendig die räumliche Organisationsformen superfizieller Chondrozyten mit absoluten Zahlen zu kodieren (z.B. 1= Strings/Doublestrings; 2= Small Clusters etc.). Ein positiver Korrelationskoeffizient weist auf einen linearen Anstieg der jeweiligen Kollagen mRNA Expression in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten von in Strings organisierten Chondrozyten bis zu Chondrozyten mit einer diffusen Verteilung hin. Signifikante Korrelationen wurden hellgrau hervorgehoben

Korrelation der Kollagenexpression mit der räumlichen Organisation	COL1A2	COL2A1	COL3A1	COL6A1
Korrelationskoeffizient	0,459	0,385	0,554	0,395
p-Wert	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001

Alle untersuchten relativen Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) korrelierten signifikant ($p<0,05$) mit der räumlichen Organisation humaner Chondrozyten der superfiziellen Zone (s. Tabelle 35). Die höchsten Korrelationskoeffizienten zeigten die COL3A1 und COL1A2 mRNA-Expression. Dies deutete darauf hin, dass COL3A1 und COL1A2 und nicht COL2A1 und COL6A1 mit dem Verlust der Organisation die höchsten relativen Änderungen zeigten.

4 Diskussion

4.1 Etablierung des Protokolls zur mRNA-Extraktion aus Chondrozyten der superfiziellen Zone humaner Kniegelenk Kondylen

Zur Untersuchung der organisationsspezifischen mRNA-Expression der Kollagen-Typen I (COL1A2), II (COL2A1), III (COL3A1) und VI (COL6A1) in humanen Chondrozyten, war es notwendig ein geeignetes Protokoll zur mRNA-Extraktion zu etablieren. Hierfür wurde im Wesentlichen eine Extraktion mittels Kieselgelmembranen gegen eine Trizol-basierte Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987) mit TriFast® (peqLab) verglichen. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Zellfärbungsmethoden, Homogenisierungsverfahren und eines vorhergehenden Schockfrierens der Knorpelzylinder untersucht. Aus den Untersuchungen ging hervor, dass eine Kombination aus einer mRNA-Extraktion mittels Kieselgelmembran-Säulchen und einer Trizol-basierten mRNA-Extraktion die am besten praktikabel war. Zudem bestätigen die Daten von von Ruetzger et al., dass eine Kombination der beiden Extraktionsmethoden der jeweiligen Einzelmethode überlegen ist (Ruetzger et al., 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass eine vorhergehende DAPI-Färbung der Knorpelzylinder keinen negativen Einfluss auf das spätere PCR-Ergebnis (Ct-Wert) hatte. Darüber hinaus führte ein der Homogenisation vorgeschalteter Schockgefrierschritt mittels eines Rotor-Stator-Homogenisators zu einer Verbesserung der extrahierten mRNA-Menge. So wurde die mRNA aus durchschnittlich 15 ± 3 Knorpelzylindern mit einer Konzentration von $6,93 \text{ ng}/\mu\text{l}$ und mit einem Reinheitsgrad von $A_{260}/A_{280} = 1,62$ isoliert. Grundsätzlich beträgt der Idealwert bezüglich der Reinheit $A_{260}/A_{280} = 2,0$. In der Literatur ist üblicherweise eine mRNA-Reinheit von $>1,8$ das Einschlusskriterium (McKenna et al., 2000, Gebhard et al., 2003, Ruetzger et al., 2010). Allerdings werden sehr oft keine Reinheitswerte angegeben (Aigner et al., 2006a, Miosge et al., 2004, Fitzgerald et al., 2004). Ein detaillierter Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden ergab für eine Extraktionsmethode, die unserer sehr ähnlich war (Kombi Trizol/Säulchen), einen Reinheitsgrad von $1,79$ (Ruetzger et al., 2010), sodass der in der vorliegenden Arbeit

erreichte Reinheitsgrad von mir als völlig akzeptabel beurteilt wird. Mögliche Verunreinigungsquellen sind Reste der Extraktionsmedien wie etwa Phenol- und Ethanolrückstände oder aber zurückgebliebene Proteine oder Kohlenhydrate des Probenmaterials. Die Einführung zusätzlicher Waschschriffe während der Extraktion könnten zwar das Problem beheben, jedoch besteht bei zusätzlichen Waschschriffen die Gefahr, dass vermehrt mRNA verloren geht. Außerdem ist der Einfluss von Verunreinigungen durch beispielsweise Schwebeteilchen oder Probenrückstände bei geringen mRNA-Konzentrationen wesentlich größer als etwa bei der zehnfachen mRNA-Menge, sodass die photometrische Messung der mRNA-Konzentration und –Reinheit bei niedrigen mRNA-Konzentrationen wesentlich fehleranfälliger ist. Aus diesem Grund würde eine zusätzliche Konzentration der RNA durch Vakuum-Lypholisation möglicherweise hilfreich sein. Ein weiteres Potential liegt in einer feineren Homogenisation z.B über Homogenisierungsverfahren, bei denen das Gewebe in speziellen Röhrrchen, welche Keramikkügelchen enthalten, sehr fein homogenisiert wird (VWR International, 2016). Weitere Vorteile dieser Homogenisationsform gegenüber des in dieser Arbeit verwendeten Rotor-Stator-Homogenisator, wäre eine erhöhte Standardisierung, sowie die Möglichkeit mehrere Proben gleichzeitig zu homogenisieren.

Eine höhere mRNA-Ausbeute wäre außerdem wünschenswert, da in dieser Arbeit relativ viele Knorpelzylinder (15 ± 3) notwendig waren, um ein suffizientes Extraktionsergebnis (mRNA-Menge in ausreichender Reinheit) zu erhalten. Dennoch handelt es sich hierbei um eine vergleichsweise geringe Gewebemenge, da üblicherweise mehrere 100mg Gewebe benötigt werden (McKenna et al., 2000, Martin et al., 2001, Tchetina et al., 2005, Ruettger et al., 2010). Daher war es erforderlich die Knorpelzylinder verschiedener Patienten zu „poolen“, also zusammenzufassen, da das Knorpelmaterial eines Patienten in der Regel nicht ausreichte, um 15 ± 3 Knorpelzylinder eines Chondrozytenverteilungsmusters zu gewinnen. Wären nun beispielsweise nur fünf Knorpelzylinder nötig, um genügend mRNA zu gewinnen, könnte man die Expressiondaten musterabhängig pro Patient erheben, da ein poolen der Knorpelstanzen verschiedener Patientenproben entfallen würde. Eine wei-

tere mögliche Option wäre eine qRT-PCR der mRNA einzelner Zellen bzw. Zellgruppen mittels Laser Capture Microdissection (Bonner et al., 1997). Mit diesem Verfahren wäre der Vergleich der mRNA-Expression verschiedener Zielgene selektiver Zellen/ Zellgruppen aus dem selben Gewebestück möglich, sodass z.B. die mRNA-Expression verschiedener Kollagen Typen von Chondrozyten der Organisationsform Strings/Doublestrings direkt mit benachbarten Chondrozyten einer anderen räumlichen Organisationsform verglichen werden könnte.

4.2 Unterschiede verschiedener relativer Kollagen mRNA-Expressionen in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen

4.2.1 Kollagen Typ I (COL1A2)

Es wurde gezeigt, dass die relative COL1A2 mRNA-Expression in diffus verteilten Chondrozyten signifikant ($p < 0,05$)-höher war, als in Chondrozyten mit der Organisationsform Strings/Doublestrings und Small Clusters (s. Tabelle 11; Abbildung 15). Dabei betrug die größte COL1A2 mRNA-Expressionssteigerung 4,29 von Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Small Clusters zu diffus verteilten superfiziellen Chondrozyten (s. Tabelle 12). Miosge et. al sowie Aigner et al. zeigten, dass mit zunehmendem OA-Grad die Kollagen Typ I mRNA-Expression ansteigt (Miosge et al., 2004, Aigner et al., 2006a). Daher entsprechen unter diesem Gesichtspunkt diffus verteilte Chondrozyten funktionell einem späterem OA-Grad als superfizielle Chondrozyten der Organisationsformen Strings/ Doublestrings und Small Clusters. Somit ist die OA-typische COLA1A2 mRNA-Expression in diffus verteilten Chondrozyten am stärksten ausgeprägt.

4.2.2 Kollagen Typ II (COL2A1)

Es wurde gezeigt, dass die relative COL2A1 mRNA-Expression in als Big Clusters organisierten Chondrozyten signifikant ($p < 0,05$) höher war, als in den Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings und Small Clusters. Außerdem war die relative COL2A1 mRNA-Expression signifikant ($p < 0,05$) höher in diffus verteilten superfiziellen Chondrozyten gegenüber in Strings/Doublestrings organisierte Chondrozyten (s. Abbildung 16 und Tabelle 13). Dabei exprimierten in Big Clusters organisierte Chondrozyten im Durchschnitt 4,3-fach mehr COL2A1 mRNA als Chondrozyten der Organisationsform Strings/Doublestrings (s. Tabelle 14). Sowohl Aigner et al. als auch Miosge et al. zeigten, dass die Kollagen Typ II Expression unter Progression der OA zunimmt (Aigner et al., 1992, Miosge et al., 2004, Aigner et al., 2006a, Aigner et al., 2001). Da Kollagen Typ II das klassische Kollagen des gesunden hyalinen Gelenkknorpels darstellt, lässt sich daraus schließen, dass die erhöhte Kollagen Typ II Expression ein Versuch der Chondrozyten darstellt, die geschädigte EZM zu regenerieren (Hermansson et al., 2004). Dieser Reparaturversuch scheint in Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters am stärksten ausgeprägt zu sein, da hier die signifikant ($p < 0,05$)-höchste relative COL2A1 mRNA-Expression gefunden wurde. Dafür sprechen auch die Untersuchungen des COL1A2/COL2A1-Expressionsverhältnisses, welche zeigten dass in Big Cluster organisierte Chondrozyten das stärkste chondrogene mRNA-Expressionsprofil ($\text{COL1A2/COL2A1} < 1$) aufwiesen (s. Abbildung 25).

4.2.3 Kollagen Typ III (COL3A1)

Es wurde gezeigt, dass die relative COL3A1 mRNA-Expression in diffus verteilten Chondrozyten signifikant ($p < 0,05$) höher ist als in Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings und Small Clusters. Außerdem exprimierten in Big Clusters organisierte superfizielle Chondrozyten signifikant ($p < 0,05$) mehr COL3A1 mRNA als superfizielle Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings. Die größte durchschnittliche COL3A1 mRNA Expressionssteigerung betrug 3,4 von in Strings/Doublestrings organisierten Chondrozyten zu diffus verteilten Chondrozyten. Aigner et al. zeigte, dass mit Voranschreiten des OA-Prozesses die Kollagen Typ III Expression signifikant zunimmt (Aigner et al., 2006a, Gebhard et al., 2003, Aigner et al., 2001). Daher repräsentieren unter diesem Gesichtspunkt diffus verteilte Chondrozyten ein späteres OA-Stadium als superfizielle Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings und Small Clusters. Da Kollagen Typ III mit der Reparatur von Matrixschäden assoziiert ist, lässt sich die verstärkte Kollagen Typ III Expression als Regenerationsversuch der unter OA-Progression entstehenden EZM-Schäden deuten (Wu et al., 2010, Felka et al., 2016). Allerdings ist Kollagen Typ III mit einer Fibrosierung des Knorpelgewebes assoziiert, sodass hier nicht von einer Reparatur der ursprünglichen Kollagenarchitektur des hyalinen Knorpelgewebes auszugehen ist (Li et al., 2012).

Dieser fibrotische Reparaturversuch findet bei Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters und diffus verteilten superfiziellen Chondrozyten statt, da in diesen räumlichen Organisationsformen die COL3A1 mRNA Expression signifikant ($p < 0,05$) erhöht ist (im Vergleich zu Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestring).

4.2.4 Kollagen Typ VI (COL6A1)

Es wurde gezeigt, dass die relative COL6A1 mRNA-Expression sowohl in diffus verteilten Chondrozyten als auch in Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters signifikant ($p < 0,05$) höher war, als in Chondrozyten mit den Organisationsformen Strings/Doublestrings und Small Clusters. Dabei betrug die größte durchschnittliche COL6A1 mRNA-Expressionsteigerung 3,45 von Chondrozyten in der räumlichen Organisationsform Small Clusters zu diffus verteilten Chondrozyten. Es wurde bereits gezeigt, dass die Kollagen Typ VI Expression in humanen Chondrozyten unter Progression der OA steigt (Aigner et al., 2006a, Aigner et al., 2001). Da Kollagen Typ VI ein wesentlicher Bestandteil der PZM ist und gezeigt wurde, dass insbesondere die superfiziellen Chondrozyten unter OA-Progression ihre schützende PZM verlieren (Hambach et al., 1998a, Söder et al., 2002, Felka et al., 2016) ist die erhöhte Kollagen Typ VI Expression Ausdruck des Regenerationsversuchs der beschädigten PZM. Zusammenfassend können erstmals in der Literatur beschriebene OA- bedingte mRNA- Expressionsveränderungen auf spezifische Organisationsstadien superfizieller Chondrozyten zurückgeführt werden, und die räumlichen Organisationformen superfiziellen Chondrozyten repräsentieren unterschiedliche mRNA-Expressionsstadien der OA.

4.3 Vergleich verschiedener Kollagenexpressionen (I, II, III, VI) superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen mit klassifizierter räumlichen Organisationsformen

Innerhalb einer definierten räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten wurden überwiegend signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen der COL6A1 mRNA-Expression und den anderen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), II (COL2A1), III (COL3A1)) gefunden. Hierbei war die COL6A1 mRNA-Expressionen stets mehrfach höher als die Expression der anderen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen. Hieraus ergibt sich eine Dominanz der COL6A1 Expression gegenüber den anderen untersuchten Kollagenen. Es ist jedoch zu beachten, dass in dieser Arbeit nur die $\alpha 1$ - Kette der drei verschiedenen α -Ketten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) von Kollagentyp VI untersucht wurde. Sowohl laborinterne nicht publizierte Daten (Andrea Egler), als auch die wissenschaftliche Literatur weisen bislang darauf hin, dass die Expression aller drei α -Ketten des Kollagentyp VI mit zunehmenden OA-Grad zunimmt (Hambach et al., 1998a, Pullig et al., 1999). Diese These wird auch gestützt durch immunhistologische Untersuchungen von Hambach et al., welche zeigen konnten, dass alle drei α -Ketten von Kollagen Typ VI in der PZM im Wesentlichen gleich verteilt sind (Hambach et al., 1998a). Darüber hinaus wird diskutiert, dass es für Chondrozyten einfacher ist die sie umgebende PZM zu regenerieren, als das weiter entfernte in Arkaden-organisierte Kollagen Typ II- Netzwerk (Hambach et al., 1998a). Hierfür sprechen auch Untersuchungen, bei denen isolierte Chondrozyten in Agarosegel kultiviert wurden und beobachtet werden konnten, wie Chondrozyten unmittelbar nach der Kultivierung damit beginnen, das Kollagen Typ VI- Netzwerk der PZM wieder zu regenerieren (Chang and Poole, 1996). Möglicherweise ist dies als eine erste „Selbstschutzmaßnahme“ vor äußeren Einflüssen zu verstehen und hebt die zentrale Rolle der PZM hervor. Das Überwiegen der COL6A1 mRNA-Expression gegenüber den übrigen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Abbildung 24) deutet darauf hin, dass Chondrozyten in allen arthrotisch veränderten Organisationen vornehmlich mit dem Regenerati-

onsversuch ihrer PZM beschäftigt zu sein scheinen. Dies ist in Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen (Hambach et al., 1998b), welche ein signifikantes Turnover von Kollagen Typ VI in gesundem, nicht-degeneriertem hyalinen Knorpel zeigte. Aufgrund der relativ geringen Kollagen Typ II mRNA-Expression scheint die Regeneration des Kollagen Typ II-Netzwerks demgegenüber in den Hintergrund zu treten. Allerdings scheint dieser Regenerationsverlust der PZM erfolglos zu sein, da trotz der erhöhten Kollagen Typ VI Expression die schützende PZM verloren geht, vor allem in der superfiziellen Zone (Hambach et al., 1998a, Felka et al., 2016).

Für die Korrelationen zwischen einzelnen Kollagen mRNA-Expressionen in verschiedenen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten wurde kein einheitliches Korrelationsprofil gefunden (s. Tabelle 33). Es ließ sich aufgrund der heterogenen Verteilung der Korrelation keine allgemeingültige Aussage treffen. Diese Heterogenität ist typisch in OA-erkrankten Chondrozyten und wurde bereits von Aigner et. al beschrieben (Aigner et al., 1993, Aigner et al., 2007).

4.4 Korrelation verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen über alle räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenkskondylen

Die COL1A2 mRNA-Expression korrelierte nicht mit COL2A1 mRNA-Expression. Alle übrigen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)) korrelierten signifikant miteinander. Dabei war die Korrelation stets positiv, dass bedeutete alle korrelierenden Kollagen mRNA-Expressionen stiegen im Verlauf der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten von Strings über Clusters bis zu einer diffusen Verteilung gemeinsam linear an. Die Tatsache, dass Kollagen Typ II und Typ I nicht korrelieren, überrascht nicht vor dem Hintergrund, dass Kollagen Typ II klassischerweise von sich differenzierenden Chondrozyten exprimiert wird, wohingegen Kollagen Typ I ein Dedifferenzierungsmarker für Chondrozyten darstellt (Schnabel et al., 2002, Benya et al., 1978, Benya and Shaffer, 1982, Marlovits et al., 2004, Gebhard

et al., 2003). Daher werden COL1A2 und COL2A1 während des Dedifferenzierungsvorgangs unabhängig voneinander exprimiert (Aigner et al., 1993, Benya et al., 1978), was sowohl die nicht vorhandene Korrelation, als auch die sich ändernde COL1/COL2- Ratio zeigte (s. Abbildung 25 und Abbildung 26). Darüber hinaus wurde bereits von Aigner et al. gezeigt, dass die Expression von COL1A2 und COL2A1 in OA betroffenem Knorpelgewebe unabhängig erfolgt (Aigner et al., 1993). Die Tatsache, dass hingegen die übrigen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen positiv miteinander korrelierten, könnte vor dem Hintergrund, dass COL2A1 und COL6A1 wichtige Matrixbestandteile in gesundem Knorpelgewebe darstellen, als ein allgemeiner Ausdruck des Reparaturversuchs der EZM und PZM gedeutet werden (Gelse et al., 2003, Young et al., 2000, Söder et al., 2002). Auch COL3A1 ist mit Regenerationsversuchen von Matrixschäden assoziiert (Young et al., 2000, Eyre et al., 2006, Wotton and Duance, 1994, Wu et al., 2010), wobei hierbei jedoch zu beachten ist, dass Kollagen Typ III mit einer Fibrosierung einhergeht (Li et al., 2012) und somit nicht von einer Reparatur der ursprünglichen hyalinen Kollagenarchitektur auszugehen ist. Somit sind im Stadium des völligen Organisationsverlusts (diffuse Chondrozytenverteilung), sowohl Dedifferenzierungsmarker als auch Matrixreparatur- und Fibrosemarker am höchsten exprimiert.

4.5 COL1A2/COL2A1-Verhältnis als Marker der Differenzierung

Es wurde gezeigt, dass das COL1A2/COL2A1- mRNA-Expressionsverhältnis als Marker der Differenzierung humaner Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels sich zwischen unterschiedlichen räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten signifikant unterscheidet. Dabei ist die Kollagen Typ I mRNA-Expression als Marker der zunehmenden Dedifferenzierung und die Kollagen Typ II-Expression als Marker der vollständigen Differenzierung zu Chondrozyten des hyalinen Gelenkknorpels gewählt worden. Nähert sich das Verhältnis beider Expressionen einem Wert kleiner 1, so überwiegt die Kollagen Typ II mRNA-Expression die Kollagen Typ I mRNA Expression und es ist von einem weitgehend differenzierten phänotyp der Chondrozyten auszugehen. Überwiegt jedoch die Kol-

lagen Typ I mRNA-Expression gegenüber der Kollagen Typ II mRNA-Expression, so ist das Verhältnis größer 1, was wiederum für einen zunehmend dedifferenzierten Phänotyp der Chondrozyten spricht (Schnabel et al., 2002, Benya et al., 1978, Benya and Shaffer, 1982, Marlovits et al., 2004, Gebhard et al., 2003). Es wurde beobachtet, dass die superfiziellen Chondrozyten ausgehend von der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings zunehmend bis zu Chondrozyten der räumlichen Organisationsform Big Clusters ein abnehmendes COL1A2/COL2A1-mRNA-Expressionsverhältnis zeigen. Dies kann als Reparaturversuch interpretiert werden. In Big Cluster organisierte Chondrozyten weisen als einzige räumliche Organisationsform ein COL1A2/COL2A1- mRNA-Expressionsverhältnis kleiner 1 auf, sodass hier die chondrogene mRNA-Expression bzw. der Matrixreparaturversuch am stärksten ausgeprägt zu sein scheint. Anscheinend kommt es während des Übergangs von Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters zu diffus verteilten Chondrozyten zu einer schlagartigen Dedifferenzierung, bei der die COL1A2 mRNA-Expression die COL2A1 mRNA -Expression um das 7-fache übersteigt (s. Abbildung 25). Diese plötzliche Dedifferenzierung könnte mit dem Verlust der schützenden PZM zusammenhängen (Felka et al., 2016). Dabei scheinen superfizielle Chondrozyten eine besondere Rolle einzunehmen, da bei Untersuchungen an Gelenkknorpelgewebe, bei welchen alle Knorpelzonen miteinbezogen wurden, bisher keine signifikanten Änderungen der Differenzierungsmarker gefunden wurden (Gebhard et al., 2003).

4.6 Korrelation verschiedener Kollagenexpressionen (I, II, III, VI) mit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten aus humanen Kniegelenkskondylen

Alle untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I, II, III, VI) korrelierten signifikant mit der räumlichen Organisation humaner Chondrozyten der superfiziellen Zone (s. Tabelle 35). Den höchsten Korrelationskoeffizienten zeigte die relative COL3A1 mRNA-Expression. In dieser Arbeit wurde somit erstmals ein Zusammenhang zwischen der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten und deren Genexpression phänotyp-relevanter Funktionsparametern gezeigt.

4.7 Zusammenfassung: Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten und deren mRNA-Expression verschiedener Kollagen-Typen als phänotyp relevante Funktionsparameter gefunden (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1)). Dabei wurden alle untersuchten phänotyp-relevanten Funktionsparameter ausgehend von superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Strings/Doublestrings über Chondrozyten-Clusters bis zu diffus verteilten superfiziellen Chondrozyten signifikant zunehmend exprimiert. Die Zunahme der relativen mRNA-Expression verschiedener Kollagen Typen wurde als Reparaturversuch der Chondrozyten im Rahmen der während der OA-Progression auftretenden Matrixschäden interpretiert. Unter diesem Gesichtspunkt stimmten die Ergebnisse mit bisherigen Untersuchungen der Kollagen mRNA-Expression überein (Gebhard et al., 2003, Aigner et al., 2006a, Miosge et al., 2004). Diesbezüglich ist davon auszugehen, dass die Änderung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten von Strings/Doublestrings über Clusters zu einer diffusen Verteilung der superfiziellen Chondrozyten ein Ausdruck der OA-Progression ist und die Änderung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten auf Basis der in dieser Arbeit erhobenen Expressionsdaten als verschiedene „Stadien“ des OA-Prozessen definiert werden können. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die superfiziellen Chondrozy-

ten während der Transformation von Strings/Doublestrings über Small Clusters bis hin zu Big Clusters zunehmend einen reparativen Phänotyp aufweisen wobei in Big Cluster organisierte Chondrozyten den reparativsten Phänotyp (COL1A2/COL2A1 < 1, s. Abbildung 25) aufwiesen. Es wurde jedoch eine ausgeprägte Dedifferenzierung von superfiziellen Chondrozyten mit der räumlichen Organisationsform Big Clusters zu einer diffusen Verteilung der superfiziellen Chondrozyten gefunden. Diese ausgeprägte Dedifferenzierung der superfiziellen Chondrozyten scheint mit dem sukzessiven Verlust der PZM zusammenzuhängen, da Chondrozyten in der Organisationsform Big Clusters im Vergleich zu vorhergehenden Organisationsformen (Strings/Doublestrings, Small Clusters) ihr PZM nahezu vollständig verloren haben (Felka et al., 2016). Die besondere Rolle der PZM für superfizielle Chondrozyten zeigt sich auch in der signifikant ($p < 0,05$) höheren COL6A1 mRNA-Expression gegenüber den anderen untersuchten Kollagen mRNA-Expressionen (COL1A2, COL2A1, COL3A1), so dass die untersuchten Chondrozyten vornehmlich mit der Reparatur oder der Instandhaltung ihrer PZM beschäftigt waren. Dies wurde bisher nicht für spezifische Organisationsformen gezeigt, aber wurde generell als These in (Hambach et al., 1998b) formuliert. Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Änderung der räumlichen Organisationsformen humaner superfizieller Chondrozyten in der Reihenfolge ausgehend von Strings/ Doublestrings über Small und Big Clusters bis hin zu einer diffusen Verteilung der superfiziellen Chondrozyten als Stadien der Osteoarthrose definiert werden können, da bereits bekannte Änderungen der mRNA-Expressionen der untersuchten Kollagentypen (Gebhard et al., 2003, Aigner et al., 2006a, Miosge et al., 2004) auf diese zurückgeführt werden können. Da andersherum die einzelnen Stadien der räumlichen Organisation definierte und signifikant unterschiedliche mRNA-Expressionen darstellen, könnten die einzelnen Stadien und vor allem die Frühstadien (Doublestrings) in Zukunft als „bild-basierte Biomarker der Osteoarthrose“ Anwendung finden. Somit wäre die räumliche Organisationsform superfizieller Chondrozyten prinzipiell als Diagnostik-Tool verwendbar, indem zum Beispiel die Multi-Photon-

Second-Harmonic-Generation-Mikroskopie (Campagnola and Loew, 2003) intraoperativ zum Einsatz käme.

Bekanntermaßen zeigen OA-betroffene Chondrozyten eine Heterogenität in ihren zellulären Antworten und speziell in ihrer Genexpression (Aigner et al., 2007). Diese Heterogenität des Phänotyps benachbarter Chondrozyten (Aigner et al., 2007) kann in dieser Arbeit erklärt werden. In 82 % aller untersuchten Knorpelproben waren Chondrozyten in mindestens zwei oder mehreren unterschiedenen Organisationsformen angeordnet (Tabelle 10). Da verschiedene Organisationsformen typische, voneinander signifikant unterschiedliche Expressionsprofile besaßen, und da in den untersuchten Kondylen stets zwei oder mehrere Organisationsformen eng benachbart vorkamen, kann die bekannte Heterogenität der OA-Chondrozyten erstmals auf die Heterogenität verschiedener, eng benachbarter Organisationsformen mit jeweils typischen Expressionsprofilen zurückgeführt werden.

Um besser verstehen zu können wie und warum superfizielle Chondrozyten ihre räumliche Organisationsform unter Progression der OA ändern, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. In dieser Arbeit wurde mit der Untersuchung verschiedener Kollagen mRNA-Expressionen (Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1), Typ VI (COL6A1) ausschließlich anabole Prozesse des Knorpelmatrixmetabolismus untersucht. Es sollen Untersuchungen des katabolen Matrixmetabolismus, wie etwa die mRNA-Expression von Matrix-Metalloproteasen und Kollagenasen in Abhängigkeit der räumlichen Organisationsformen superfizieller Chondrozyten, durchgeführt werden (Goldring et al., 2011, Tchetverikov et al., 2005). Darüber hinaus sollen Untersuchungen folgen, welche klären sollen, ob und welche Mediatoren (z.B TGFs oder Interleukine) die räumliche Organisationsformen superfizieller Chondrozyten beeinflussen und was eine selektive Blockierung dieser Mediatoren bewirkt (Sandell and Aigner, 2001). Desweiteren sollen die in dieser Arbeit erhobenen mRNA-Expressionsdaten mit immunhistochemischen Färbungen verglichen werden, um eine Diskrepanz zwischen Phänotyp der Chondrozyten und dem tatsächlichen Vorhandensein der produzierten Matrixbestandteile

im Verlauf der Änderung der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten zu untersuchen. Eine mögliche Diskrepanz zwischen mRNA-Expression und der tatsächlichen Formierung im Gewebe (Felka et al., 2016) deutet sich bereits beim Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Kollagen Typ VI mRNA Expressionsdaten und dem Vorhandensein der PZM in verschiedenen Stadien der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten an. So ist die COL6A1 mRNA-Expression in diffus verteilten Chondrozyten am höchsten, jedoch ist in diesem Stadium der räumlichen Organisation keine PZM mehr nachweisbar (Felka et al., 2016).

5 Zusammenfassung der Arbeit

Osteoarthrose (OA), im deutschen allgemein bekannt als „Arthrose“, ist eine bislang nicht vollständig verstandene Erkrankung des gesamten Gelenks. Derzeit gibt es keine diagnostischen und therapeutischen Strategien, um OA in einem frühen Stadium zu erkennen und das Endstadium der OA zu vermeiden. Die Knorpelzellen (Chondrozyten) innerhalb der obersten Knorpelschicht, der sogenannten superfiziellen Zone, sind in spezifischen räumlichen Organisationsformen angeordnet (Strings, Doublestrings, Small Clusters, Big Clusters und Diffus). Diese räumliche Organisation ist gelenk- und spezienspezifisch und wird als ein „biologischer Fingerabdruck“ verstanden. Spezifische Formen der räumlichen Organisation gehen mit progredienter OA verloren, so dass im Endstadium der OA ein kompletter Verlust dieser Organisation vorliegt. Dieser komplette Verlust mit fortschreitender OA wurde experimentell im humanen Knorpel nachgestellt (Felka et al., 2016). Diese Arbeit implizierte die frühe Chondrozytenproliferation als einen Mechanismus des Organisationsverlustes während der OA-Progression. Aufgrund dieser Veränderungen könnte die räumliche Organisation superfizieller Chondrozyten als ein bildbasierter Biomarker zur Früherkennung der OA verwendet werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob anhand der räumlichen Organisationsform superfizieller Chondrozyten funktionell unterschiedliche Chondrozyten-Anordnungen im Gewebe identifiziert werden können. Initial wurden verschiedene mRNA-Extraktions-Protokolle evaluiert, um ein optimiertes Protokoll mit einer adäquaten Reinheit und mRNA-Gehalt zu etablieren. Mit diesem Protokoll wurde mittels qRT-PCR die relative mRNA-Expression der Kollagene Typ I, II, III und VI in Abhängigkeit der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten humaner Kniegelenke analysiert. Die mRNA-Expression der Kollagene Typ I (COL1A2), Typ II (COL2A1), Typ III (COL3A1) und Typ VI (COL6A1)) nahm mit Veränderungen der Organisation signifikant zu ($p < 0,05$), ausgehend von Chondrozyten in der Organisationsform Strings/Doublestrings über solche in Small und Big Clusters bis hin zu einer diffusen Verteilung, welche einen kompletten Verlust der Organisation

darstellt (s. Abbildung 19). Zusätzlich korrelierte die mRNA-Expression aller untersuchten Kollagene bis auf Kollagen Typ I und II signifikant und positiv miteinander ($p < 0,05$). Unter Berücksichtigung bereits beschriebener Expressionsprofile von OA-Chondrozyten (Gebhard et al., 2003, Aigner et al., 2006a, Miosge et al., 2004) wurde dies als Versuch interpretiert, die während der OA-Progression auftretenden Matrixschäden zu reparieren. In allen räumlichen Organisationformen exprimierten superfizielle Chondrozyten am stärksten Kollagen Typ VI (s. Abbildung 24). Da Kollagen Typ VI vorwiegend in der perizellulären Matrix (PZM) vorhanden ist (Söder et al., 2002, Hambach et al., 1998a), handelt es sich vermutlich um den Versuch der Chondrozyten, ihre schützende PZM zu regenerieren. Vor dem Hintergrund, dass die PZM in der Organisationsform Clusters und mit diffusem Verlust der Organisation sukzessive verloren geht (Felka et al., 2016), erscheint dieser Regenerationversuch jedoch erfolglos. Weiterhin zeigten Chondrozyten in Strings/Doublestrings, Small Clusters und Big Clusters einen eher reparativen Phänotyp. Beim Übergang von Big Clustern zu einer diffusen Verteilung trat ein Verlust des reparativen Phänotyps und eine Dedifferenzierung auf (s. Abbildung 25). Dieses Phänomen könnte mit dem vollständigen Verlust der PZM in diesen Stadien zusammenzuhängen (Felka et al., 2016).

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen der räumlichen Organisation superfizieller Chondrozyten und ihrer mRNA Expression besteht (s. Tabelle 35). Aufgrund dieser Korrelationen und signifikanter Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen verschiedenen Organisationsformen können nun funktionell unterschiedliche Chondrozytenpopulationen im Gewebe anhand ihrer Organisation erkannt werden. Somit identifizierte die vorliegende Arbeit die räumliche Organisation als einen Marker unterschiedlicher Funktionszustände humaner superfizieller Chondrozyten auf mRNA-Expressions-Niveau. Somit definiert die räumliche Organisation verschiedene Stadien der Osteoarthrose funktionell und könnte in Zukunft als „bild-basierter Biomarker der Osteoarthrose“ im Sinne eines diagnostischen Tools Anwendung finden. Zum Abschluss erarbeitete die vorliegende Arbeit eine Erklärung für die beschriebene, aber nicht verstan-

dene Phänotyp-Heterogenität OA-betroffener Chondrozyten (Aigner et al., 2007). Diese wird erstmals auf die Heterogenität verschiedener, eng benachbarter Organisationsformen mit jeweils typischen Expressionsprofilen zurückgeführt.

6 Literaturverzeichnis

- AIGNER, T., BERTLING, W., STÖSS, H., WESELOH, G. & VON DER MARK, K. 1993. Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 91, 829.
- AIGNER, T., FUNDEL, K., SAAS, J., GEBHARD, P. M., HAAG, J., WEISS, T., ZIEN, A., OBERMAYR, F., ZIMMER, R. & BARTNIK, E. 2006a. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 54, 3533-3544.
- AIGNER, T., SACHSE, A., GEBHARD, P. & ROACH, H. 2006b. Osteoarthritis: pathobiology—targets and ways for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*, 58, 128-149.
- AIGNER, T., SÖDER, S., GEBHARD, P. M., MCALINDEN, A. & HAAG, J. 2007. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 3, 391-399.
- AIGNER, T., STÖß, H., WESELOH, G., ZEILER, G. & VON DER MARK, K. 1992. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Archiv B*, 62, 337-345.
- AIGNER, T., ZIEN, A., GEHRITZ, A., GEBHARD, P. M. & MCKENNA, L. 2001. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA–array technology. *Arthritis & Rheumatism*, 44, 2777-2789.
- ARYA, M., SHERGILL, I. S., WILLIAMSON, M., GOMMERSALL, L., ARYA, N. & PATEL, H. R. 2014. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J. & KIRSCH, J. (eds.) 2010. *Anatomie*, Stuttgart: Thieme Verlag.
- BAU, B., GEBHARD, P. M., HAAG, J., KNORR, T., BARTNIK, E. & AIGNER, T. 2002. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis & Rheumatism*, 46, 2648-2657.
- BENNINGHOFF, A. 1925. Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. *Cell and Tissue Research*, 2, 783-862.
- BENYA, P. D., PADILLA, S. R. & NIMNI, M. E. 1978. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15, 1313-1321.
- BENYA, P. D. & SHAFFER, J. D. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30, 215-224.
- BILLINGHURST, R. C., DAHLBERG, L., IONESCU, M., REINER, A., BOURNE, R., RORABECK, C., MITCHELL, P., HAMBOR, J., DIEKMANN, O. & TSCHESCHE, H. 1997. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1534.
- BLAGOJEVIC, M., JINKS, C., JEFFERY, A. & JORDAN, K. 2010. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage*, 18, 24-33.
- BONNER, R. F., EMMERT-BUCK, M., COLE, K., POHIDA, T., CHUAQUI, R., GOLDSTEIN, S. & LIOTTA, L. A. 1997. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 278, 1481-1483.
- CAMPAGNOLA, P. J. & LOEW, L. M. 2003. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature biotechnology*, 21, 1356-1360.

- CHANG, J. & POOLE, C. A. 1996. Sequestration of type VI collagen in the pericellular microenvironment of adult chondrocytes cultured in agarose. *Osteoarthritis and Cartilage*, 4, 275-285.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162, 156-159.
- CLARK, J. M. 1990. The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *Journal of anatomy*, 171, 117.
- CLONTECH LABORATORIES, I. 2010. *Advantage® RT-for-PCR Kit User Manual* [Online]. Mountain View, CA: Clontech Laboratories, Inc. Available: www.clontech.com/xxclt_ibcGetAttachment.jsp?cltemId=17629 [Accessed 12.05.2016 2016].
- COX, R. 1968. [103a] The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods in enzymology*, 12, 120-129.
- DARLING, E. M., HU, J. C. & ATHANASIOU, K. A. 2004. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression. *Journal of orthopaedic research*, 22, 1182-1187.
- DIAB, M., WU, J. & EYRE, D. 1996. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem. J.*, 314, 327-332.
- EGGLI, P. S., HUNZINKER, E. B. & SCHENK, R. K. 1988. Quantitation of structural features characterizing weight-and less-weight-bearing regions in articular cartilage: A stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *The Anatomical Record*, 222, 217-227.
- EYRE, D., WU, J., FERNANDES, R., PIETKA, T. & WEIS, M. 2002. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochemical Society Transactions*, 30, 893-899.
- EYRE, D. R., WEIS, M. A. & WU, J.-J. 2006. Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework. *Eur Cell Mater*, 12, 57-63.
- FELKA, T., ROTHDIENER, M., BAST, S., UYNUK-OOL, T., ZOUHAIR, S., OCHS, B., DE ZWART, P., STOECKLE, U., AICHER, W. & HART, M. 2016. Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology. *Osteoarthritis and Cartilage*.
- FELSON, D. T., LAWRENCE, R. C., DIEPPE, P. A., HIRSCH, R., HELMICK, C. G., JORDAN, J. M., KINGTON, R. S., LANE, N. E., NEVITT, M. C. & ZHANG, Y. 2000. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of internal medicine*, 133, 635-646.
- FELSON, D. T. & ZHANG, Y. 1998. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis & Rheumatism*, 41, 1343-1355.
- FITZGERALD, J. B., JIN, M., DEAN, D., WOOD, D. J., ZHENG, M. H. & GRODZINSKY, A. J. 2004. Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19502-19511.
- GEBHARD, P. M., GEHRITZ, A., BAU, B., SÖDER, S., EGER, W. & AIGNER, T. 2003. Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes. *Journal of orthopaedic research*, 21, 96-101.
- GELSE, K., PÖSCHL, E. & AIGNER, T. 2003. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced drug delivery reviews*, 55, 1531-1546.

- GOLDRING, M. B., OTERO, M., PLUMB, D. A., DRAGOMIR, C., FAVERO, M., EL HACHEM, K., HASHIMOTO, K., ROACH, H. I., OLIVOTTO, E. & BORZÌ, R. M. 2011. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European cells & materials*, 21, 202.
- HAMBACH, L., NEUREITER, D., ZEILER, G., KIRCHNER, T. & AIGNER, T. 1998a. Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 41, 986-996.
- HAMBACH, L., NEUREITER, D., ZEILER, G., KIRCHNER, T. & AIGNER, T. 1998b. Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 41, 986-96.
- HATTORI, S., OXFORD, C. & REDDI, A. H. 2007. Identification of superficial zone articular chondrocyte stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 358, 99-103.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6, 986-994.
- HERMANSSON, M., SAWAJI, Y., BOLTON, M., ALEXANDER, S., WALLACE, A., BEGUM, S., WAIT, R. & SAKLATVALA, J. 2004. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin β A (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 43514-43521.
- HOLLANDER, A., PIDOUX, I., REINER, A., RORABECK, C., BOURNE, R. & POOLE, A. R. 1995. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 96, 2859.
- HUGGETT, J. F., FOY, C. A., BENES, V., EMSLIE, K., GARSON, J. A., HAYNES, R., HELLEMANS, J., KUBISTA, M., MUELLER, R. D. & NOLAN, T. 2013. The digital MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clinical chemistry*, 59, 892-902.
- KEENE, D. R., ENGVALL, E. & GLANVILLE, R. W. 1988. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *The Journal of cell biology*, 107, 1995-2006.
- KINETICS, H. 2016. Available: http://www.humankinetics.com/AcuCustom/Sitename/DAM/086/251art_Main.png [Accessed 24.01.2016].
- KUETTNER, K., AYDELOTTE, M. & THONAR, E. 1991. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 27, 46-48.
- LI, J., GORSKI, D. J., ANEMAET, W., VELASCO, J., TAKEUCHI, J., SANDY, J. D. & PLAAS, A. 2012. Hyaluronan injection in murine osteoarthritis prevents TGFbeta 1-induced synovial neovascularization and fibrosis and maintains articular cartilage integrity by a CD44-dependent mechanism. *Arthritis research & therapy*, 14, 1.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & PAULSEN, F. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- MANKIN, H. J., DORFMAN, H., LIPPIELLO, L. & ZARINS, A. 1971. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 53, 523-537.
- MARLOVITS, S., HOMBBAUER, M., TRUPPE, M., VECSEI, V. & SCHLEGEL, W. 2004. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *Bone & Joint Journal*, 86, 286-295.

- MAROUDAS, A. I. 1976. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature*, 260, 808-9.
- MARTEL-PELLETIER, J., BOILEAU, C., PELLETIER, J.-P. & ROUGHLEY, P. J. 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 22, 351-384.
- MARTIN, I., JAKOB, M., SCHÄFER, D., DICK, W., SPAGNOLI, G. & HEBERER, M. 2001. Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 9, 112-118.
- MCKENNA, L. A., GEHRITZ, A., SÖDER, S., EGER, W., KIRCHNER, T. & AIGNER, T. 2000. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage. *Analytical biochemistry*, 286, 80-85.
- MIOSGE, N., HARTMANN, M., MAELICKE, C. & HERKEN, R. 2004. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochemistry and cell biology*, 122, 229-236.
- MORBIDITY, C. 2010. Mortality Weekly Report Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation—United States, 2007–2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 59, 1261-5.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U. S. N. L. O. M. 2014. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* [Online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/> [Accessed 12.05.2016 2016].
- NIEDERMAYR, A. 2010. *Fluoreszenzmikroskopie* [Online]. Göttingen: Universität Göttingen. Available: <https://lp.uni-goettingen.de/get/text/6741> [Accessed 10.05.2016 2016].
- O'CONNOR, P., ORFORD, C. & GARDNER, D. L. 1988. Differential response to compressive loads of zones of canine hyaline articular cartilage: micromechanical, light and electron microscopic studies. *Annals of the rheumatic diseases*, 47, 414-420.
- PADHYE, V. V., YORK, C. & BURKIEWICZ, A. 1997. Nucleic acid purification on silica gel and glass mixtures. Google Patents.
- POMBO-SUAREZ, M., CALAZA, M., GOMEZ-REINO, J. J. & GONZALEZ, A. 2008. Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. *BMC molecular biology*, 9, 1.
- POOLE, C., AYAD, S. & SCHOFIELD, J. 1988. Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of Cell Science*, 90, 635-643.
- POOLE, C. A., AYAD, S. & GILBERT, R. T. 1992. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of Cell Science*, 103, 1101-1110.
- POOLE, C. A., FLINT, M. H. & BEAUMONT, B. W. 1987. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *Journal of orthopaedic research*, 5, 509-522.
- PRICE, J. S., WATERS, J. G., DARRAH, C., PENNINGTON, C., EDWARDS, D. R., DONELL, S. T. & CLARK, I. M. 2002. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging cell*, 1, 57-65.
- PROMEGA. 2009. *rq1 rnase-free dnase protocol* [Online]. USA: Promega Corporation. Available: <https://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/rq1%20rnase-free%20dnase%20protocol.pdf> [Accessed 14.06.2016 2016].

- PULLIG, O., WESELOH, G. & SWOBODA, B. 1999. Expression of type VI collagen in normal and osteoarthritic human cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, 7, 191-202.
- QUIAGEN. 2011. *Quick-Start-Protocol RNeasy Mini Kit Part 1* [Online]. Available: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=0e32fbb1-c307-4603-ac81-a5e98490ed23&lang=en> [Accessed 17.06.2016 2016].
- RABENBERG, M. 2013. Gesundheitsberichterstattung des Bundes ,Heft 54, Arthrose. Berlin: Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt.
- RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMAN, R. 2008. *Biochemie*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- RICARD-BLUM, S. 2011. The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3, a004978.
- RIESTER, R. 23.05.2014 2014. *RE: Protokoll Trizol Extraktion*.
- ROCHE-DIAGNOSTICS. 2016. *Universal ProbeLibrary Probes* [Online]. Roche Diagnostics. Available: <https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?catalogId=10001&partNumber=3.5.7.1.2.1> [Accessed 24.10.2016 2016].
- ROCHE. 2016. *PCR: Eine ausgezeichnete Methode* [Online]. Roche. Available: http://www.roche.com/pcr_d.pdf [Accessed 12.05.2016 2016].
- ROLAUFFS, B., WILLIAMS, J. M., AURICH, M., GRODZINSKY, A. J., KUETTNER, K. E. & COLE, A. A. 2010. Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 62, 489-498.
- ROLAUFFS, B., WILLIAMS, J. M., GRODZINSKY, A. J., KUETTNER, K. E. & COLE, A. A. 2008. Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints. *Journal of structural biology*, 162, 335-344.
- ROUGHLEY, P. J. & LEE, E. R. 1994. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microscopy research and technique*, 28, 385-397.
- RUETTGER, A., NEUMANN, S., WIEDERANDERS, B. & HUBER, R. 2010. Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis in vivo. *BMC research notes*, 3, 7.
- SANDELL, L. J. & AIGNER, T. 2001. Articular cartilage and changes in arthritis: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 3, 1.
- SCHNABEL, M., MARLOVITS, S., ECKHOFF, G., FICHEL, I., GOTZEN, L., VECSEI, V. & SCHLEGEL, J. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10, 62-70.
- SCHUMACHER, B. L., BLOCK, J., SCHMID, T., AYDELOTTE, M. & KUETTNER, K. 1994. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Archives of biochemistry and biophysics*, 311, 144-152.
- SÖDER, S., HAMBACH, L., LISSNER, R., KIRCHNER, T. & AIGNER, T. 2002. Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage*, 10, 464-470.
- SOPENA JUNCOSA, J., CARRILLO POVEDA, J., RUBIO ZARAGOZA, M., REDONDO GARCÍA, J., SERRA AGUADO, I. & SOLER CANET, C. 2000. Estructura y función del cartílago articular. *Portada: Armas Frente a la Patología Articular*.
- TCHETINA, E. V., SQUIRES, G. & POOLE, A. R. 2005. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *The Journal of rheumatology*, 32, 876-886.

- TCHETVERIKOV, I., LOHMANDER, L., VERZIIL, N., HUIZINGA, T., TEKOPPELE, J., HANEMAAIJER, R. & DEGROOT, J. 2005. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 64, 694-698.
- UNIVERSITÄT BERN, M. F. 2016. *e-Learning Modul der medizinischen Fakultät Universität Bern* [Online]. Bern: Universität Bern Studiendekanat Murtenstrasse 11 CH-3008 Bern. Available: http://e-learning.studmed.unibe.ch/MorphoMed/htmls/print_all.html?morphomed%7Chisto%7Ccourse1%7Cstuetz [Accessed 07.05.2016].
- UYNUK-OOL, T. 2014. Effizienztestung für GAPDH *In*: UYNUK-OOL, T. (ed.).
- VIGNON, E., ARLLOT, M., PATRICOT, L. & VIGNON, G. 1976. The cell density of human femoral head cartilage. *Clinical orthopaedics and related research*, 121, 303-308.
- VON DER MARK, K., GAUSS, V., VON DER MARK, H. & MÜLLER, P. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture.
- VWR INTERNATIONAL, G. 2016. *HOMOGENISATOR PRECELLYS® EVOLUTION* [Online]. Available: https://de.vwr.com/store/asset?assetURI=https://de.vwr.com/stibo/hi_res/std.lang.all/76/13/17597613.pdf [Accessed 27.02.2016].
- WOOLF, A. D. & PFLEGER, B. 2003. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81, 646-656.
- WOTTON, S. & DUANCE, V. 1994. Type III collagen in normal human articular cartilage. *The Histochemical Journal*, 26, 412-416.
- WU, J.-J., WEIS, M. A., KIM, L. S. & EYRE, D. R. 2010. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 18537-18544.
- YOUN, I., CHOI, J.-B., CAO, L., SETTON, L. & GUILAK, F. 2006. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis and cartilage*, 14, 889-897.
- YOUNG, R. D., LAWRENCE, P. A., DUANCE, V. C., AIGNER, T. & MONAGHAN, P. 2000. Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48, 423-432.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde am Siegfried-Weller-Institut der BG Unfallklinik Tübingen unter Betreuung von Bernd Rolauffs durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Bernd Rolauffs. Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Tatjana Uynuk-Ool, Miriam Rothdiener, Rosa Riester und Bernd Rolauffs) von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Bernd Rolauffs durch mich (Jan Schröder).

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

Tübingen, den

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. med. Bernd Rolaufts für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die gemeinsame erfolgreiche Bewerbung für das IZKF-Promotionsstipendium und die Betreuung dieser Arbeit. Vielen Dank für die angenehme und produktive Zusammenarbeit, für motivierende Gespräche und die ständige Unterstützungsbereitschaft.

Frau Franziska Buck für eine hervorragende Zusammenarbeit, gegenseitige Wertschätzung und Unterstützung, den wichtigen Gedankenaustausch und die schöne Arbeitsatmosphäre.

Frau Rosa Riester für die Hilfestellung und die vielen erfahrenen Ratschläge für die Etablierung des mRNA-Extraktionsprotokoll.

Herrn Dr. med. Ulf Hofmann für den wertvollen kritischen Erfahrungsaustausch und motivierende Gespräche.

Frau Tatjana Uynuk-Ool für die Einarbeitung und Betreuung der PCR, sowie den fachlichen Ratschlägen zur Etablierung des mRNA-Extraktionsprotokolls.

Frau Miriam Rothdiener für die grundlegende Einarbeitung der Arbeit im Forschungslabor.

Frau Sina Bast, Lewin Bartolic und Alena Fischer für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen lustige Momente.

Herrn Dr. Thomas Shiozawa für die Bereitstellung von Knorpelproben aus Körperspendern.

Frau Alice Mager für die Bereitstellung und die Einarbeitung in die Handhabung des Rotor-Stator Homogenisators.

Der medizinischen Fakultät Tübingen für die Bereitstellung der Mittel für das IZKF-Promotionskolleg und dem gesamten Team des Promotionskollegs, insbesondere Frau Prof. Dr. Marlies Knipper und Frau Dr. Inka Montero, für die Organisation der Lehrveranstaltungen und den zahlreichen Hilfestellungen.

Meiner Familie für die stetige Unterstützung für das Erreichen meiner Ziele.