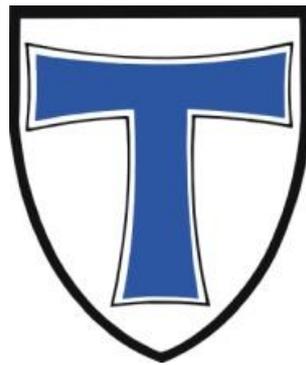


# **Der Effekt von Adipokinen beim Knochenaufbau bei rheumatischen Erkrankungen**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)  
des Fachbereichs Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Susann Junker  
geb. am 20.02.1987  
in Dresden

Gießen/Bad Nauheim, 2014



**Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt und von Prof. Dr. U. Müller-Ladner und für den Fachbereich 08 von Prof. Dr. M. Martin angeleitet.**

**Prüfungsausschuss:**

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Martin
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Müller-Ladner
3. Prüfer: Prof. Dr. U. Lange
4. Prüfer: Prof. Dr. T. E. Trenczek

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Arthrose .....	1
1.2	Entzündlich-rheumatische Erkrankungen .....	3
1.2.1	Psoriasis-Arthritis .....	3
1.2.2	Ankylosierende Spondylitis.....	6
1.3	Aufbau des Gelenks.....	8
1.4	Knochen und Knochenbildung .....	9
1.5	Osteophyten / Syndesmophyten .....	11
1.6	Wnt-Signalweg .....	13
1.7	Adipokine .....	16
1.7.1	Adiponektin .....	16
1.7.2	Resistin .....	18
1.7.3	Visfatin .....	19
1.8	Zielsetzung .....	21
2	Material.....	23
2.1	Zellen.....	23
2.2	Chemikalien.....	23
2.3	Plastikwaren und sonstige Materialien .....	24
2.4	Medien und Lösungen .....	25
2.5	Enzyme .....	26
2.6	Antikörper und Proteine .....	27
2.7	Molekularbiologische und immunologische Kits.....	29
2.8	Oligonukleotide (Primer).....	30
2.9	Geräte und Software .....	31
3	Methoden.....	32
3.1	Zellbiologische Methoden .....	32
3.1.1	Gewebeentnahme .....	32
3.1.2	Osteophytenpräparation.....	32
3.1.3	Proteinisolation aus Knorpel .....	34
3.1.4	Isolation humaner Osteoblasten .....	34
3.1.5	Passagieren der humanen Osteoblasten.....	35
3.1.6	Einfrieren der humanen Osteoblasten .....	35
3.1.7	Auftauen der humanen Osteoblasten.....	35

3.1.8	Isolation humaner Chondrozyten .....	35
3.1.9	Kultivierung gesunder Chondrozyten.....	36
3.1.10	Zellzahlbestimmung .....	37
3.1.11	Kultivierung von Zellen auf Kammer-Objektträger.....	37
3.1.12	Stimulierungsexperimente.....	37
3.2	Mineralisierungs-Assay .....	41
3.3	Histologische und immunologische Methoden .....	42
3.3.1	Entparaffinieren von Gewebeschnitten .....	42
3.3.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung .....	42
3.3.3	Masson-Trichrom-Färbung.....	42
3.3.4	Toluidin-Blau-Färbung.....	43
3.3.5	TRAP-Färbung .....	44
3.3.6	Immunhistochemie und Immunzytochemie .....	44
3.3.7	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	45
3.3.8	SDS-PAGE und Western Blot.....	45
3.4	Entwicklung einer Osteophyten-Klassifizierung.....	49
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	50
3.5.1	RNA-Isolation .....	50
3.5.2	Reverse Transkription .....	51
3.5.3	Real-Time-PCR .....	51
3.6	Statistische Auswertung .....	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Klassifizierung der Osteophyten .....	54
4.1.1	Makroskopische Analyse.....	54
4.1.2	Histologische Analyse .....	54
4.2	Charakterisierung der Osteophyten .....	60
4.2.1	Allgemeine Charakterisierung.....	61
4.2.2	Charakterisierung der Adipokinexpression und DKK1 .....	63
4.3	Adipokinexpression in isolierten OA-OB und OA-CH.....	71
4.4	Analyse des Visfatingehalts im Knorpel von OA-Osteophyten.....	73
4.5	Effekt von Adipokinen auf OA-OB .....	74
4.5.1	Effekt der Adipokine auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren durch OA-OB .....	74
4.5.2	Effekt der Adipokine auf die OB-spezifische Genexpression.....	77
4.5.3	Effekt der Adipokine auf die Mineralisierung durch OA-OB.....	78
4.5.4	Effekt der Adipokine auf den Wnt-Signalweg bei OA-OB.....	79

4.6	Effekt der Modulation des Wnt-Signalwegs auf die Adipokinproduktion von OA-OB .....	83
4.7	Effekt von Adiponektin auf den p38-MAPK Signalweg in OB .....	84
4.8	Effekt von Visfatin auf Chondrozyten .....	85
4.8.1	Effekt von Visfatin auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren und VEGF durch OA-CH .....	85
4.8.2	Effekt von Visfatin auf die CH-spezifische Genexpression .....	86
4.8.3	Effekt von Visfatin auf den Wnt-Signalweg bei OA-CH .....	87
4.9	Effekt der Induktion des Wnt-Signalwegs auf die Visfatin-produktion von CH .....	91
4.10	Analyse der Adipokin-Serumspiegel bei PsA- und AS-Patienten .....	91
4.10.1	Adipokin-Serumspiegel und Osteophytenbildung bei der PsA .....	91
4.10.2	Adipokin-Serumspiegel und Syndesmophytenbildung bei der AS .....	95
5	Diskussion .....	98
5.1	Technische Probleme der Experimente .....	99
5.2	Charakterisierung von OA-Osteophyten .....	100
5.2.1	Einteilung von OA-Osteophyten .....	100
5.2.2	Expression von Adipokinen in OA-Osteophyten .....	101
5.3	Effekt der Adipokine auf Osteoblasten und Chondrozyten .....	103
5.3.1	Effekt der Adipokine auf Osteoblasten .....	103
5.3.2	Effekt von Visfatin auf Chondrozyten .....	106
5.4	Effekt der Adipokine auf den Wnt-Signalweg .....	107
5.5	Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Adipokinexpression in OA-OB und -CH .....	110
5.6	Adiponektin-Effekt über p38-MAPK-Signalweg .....	112
5.7	Adipokin-Serumspiegel bei rheumatischen Erkrankungen .....	113
5.7.1	Adipokin-Serumspiegel bei PsA .....	113
5.7.2	Adipokin-Serumspiegel bei AS .....	114
5.8	Adipokine im therapeutischen Kontext .....	116
6	Zusammenfassung .....	121
7	Summary .....	123
8	Abkürzungen .....	125
9	Referenzen .....	128
10	Publikationen .....	140

# 1 Einleitung

Unter rheumatischen Erkrankungen versteht man Krankheitsbilder, welche vor allem mit Schmerzen und Funktionseinschränkungen des Bewegungssystems einher gehen, aber auch krankhafte, vor allem chronisch-entzündliche Veränderungen des Bindegewebes oder des Gefäßsystems. Betroffen sind dabei vor allem Gelenke und die Wirbelsäule, sowie Muskeln und Sehnen. Je nach Krankheitsbild können jedoch auch innere Organe, das Nervensystem oder die Haut betroffen sein. Zu den entzündlich-rheumatischen Erkrankungen gehören unter anderem die rheumatoide Arthritis (RA), die ankylosierende Spondylitis (AS) und die Psoriasis-Arthritis (PsA). Die Arthrose (*Osteoarthritis*, OA) gehört noch zu den degenerativen rheumatischen Erkrankungen und zeichnet sich vor allem durch Knorpelabbau aus, jedoch treten dabei sehr häufig lokale Entzündungs- und Regenerationsprozesse in Form von Osteophytenbildung an den Gelenkrändern auf. Diese Prozesse sind auch bei der PsA und AS zu beobachten. Desweiteren gibt es rheumatische Schmerz-Syndrome wie die Fibromyalgie und durch Stoffwechselstörungen verursachte Erkrankungen des Bewegungssystems, wie Osteoporose oder Gicht.

## 1.1 Arthrose

Die zu den degenerativen rheumatischen Erkrankungen zählende OA ist eine der häufigsten Formen der Arthritis und betrifft das gesamte Gelenk. Die OA kann prinzipiell an jedem Gelenk auftreten, betrifft aber am häufigsten Knie, Hüfte, Hände sowie die Wirbelsäule [1]. Das Risiko an OA zu erkranken steigt mit dem Alter. Bereits 6% aller über 30-jährigen haben regelmäßig Schmerzen in den Knien und auch im Röntgenbild bereits Anzeichen einer OA [2]. Man geht davon aus, dass weltweit 30 - 50% aller Menschen über 65 Jahren von OA betroffen sind [3]. Weitere Risikofaktoren für das Erkranken an OA sind beispielsweise Übergewicht, ein vorangegangenes Trauma oder eine genetische Prädisposition[4].

Pathophysiologisch äußert sich die OA durch die Degeneration des Gelenkknorpels, Knochenneubildung an den Gelenkrändern (Osteophytenbildung), sklerotische Veränderungen des subchondralen Knochens, einer Entzündung des Synoviums und einer Verdickung der Gelenkkapsel [5]. Dies führt zu Schmerzen in den betroffenen Gelenken, welche durch Bewegung zunehmen und durch Ruhe gemildert werden. Zudem kommt es zu einer Gelenksteifigkeit am Morgen und nach Ruhe. Das betroffene Gelenk wird im weiteren Krankheitsverlauf zunehmend instabiler und die Funktionalität nimmt ab [6].

Die Diagnose erfolgt üblicherweise durch eine klinische Untersuchung und mittels Röntgenaufnahmen, wenn die Krankheit bereits fortgeschritten ist. Abb. 1 A zeigt einen Patient mit einer Arthrose des Knies (Gonarthrose), Abb. 1 B zeigt eine Röntgenaufnahme eines Kniegelenks, welches typische OA-Symptome, wie Fehlstellung, Gelenkspaltverschmälerung und Osteophytenbildung aufweist. Um andere Ursachen für die Gelenkbeschwerden auszuschließen, wie beispielsweise die entzündliche RA oder eine Gicht, kann die Magnetresonanztomographie (MRT) angewendet werden.



Abb. 1: Patient mit Arthrose im Knie mit Schwellung und Fehlstellung (A) und Röntgenaufnahme eines OA-Kniegelenks mit asymmetrischer Gelenkspaltverschmälerung, subchondraler Sklerosierung, Osteophytenbildung und Fehlstellungen (B). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. U. Lange, Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim.

Die Behandlung der frühen OA erfolgt zunächst ohne Medikamente. Durch Training und Physiotherapie soll die allgemeine Fitness sowie die lokale Muskelkraft erhöht und die betroffenen Gelenke mobilisiert werden. Auch eine Gewichtsreduktion kann hilfreich sein, um die Schmerzen zu reduzieren und die Gelenkfunktion zu verbessern. Ist dies nicht ausreichend, können leichte Schmerzmittel wie beispielsweise Paracetamol verabreicht werden. Die Schmerzmitteldosis kann mit der Zeit verändert und den Bedürfnissen der Patienten angepasst werden. Zusätzlich können auch Wärme- oder Kälteanwendungen und manuelle Therapien hilfreich sein, um die Symptome zu lindern [6]. Ist das Gelenk bereits so stark geschädigt, sodass es zu einem Funktionsverlust kommt, dann reichen diese Therapien oft nicht mehr aus. Dann wird eine chirurgische Entfernung des Gelenks und der Ersatz mit einer künstlichen Prothese erforderlich, um die Lebensqualität des Patienten zu verbessern. In 95% aller Fälle kann der Gelenkersatz die Wiederherstellung der Gelenkfunktion ermöglichen [7]. Am häufigsten werden Knie- und Hüftgelenke ersetzt.

## 1.2 Entzündlich-rheumatische Erkrankungen

Entzündlich rheumatische Erkrankungen werden in der Regel durch ein fehlgeleitetes und gegen sich selbst gerichtetes Immunsystem verursacht und verlaufen meist chronisch. Die fehlgeleitete Immunreaktion führt zu Entzündungen in verschiedenen Geweben, insbesondere des Bewegungsapparats, wodurch es zu Gelenkschmerzen, einer Bewegungseinschränkung und im chronisch autoimmunen Verlauf schließlich zu einer deutlichen Verminderung der Lebensqualität kommt.

Die häufigste Form der entzündlich-rheumatischen Erkrankungen ist die RA, sie betrifft etwa 1% der Bevölkerung. [8]. Üblicherweise tritt die Krankheit zuerst in den kleinen Gelenken der Hände und Füße auf, breitet sich dann aber häufig auch auf größere Gelenke aus [9]. Im Gegensatz zur OA treten die Gelenkentzündungen zudem meist symmetrisch auf. Bei der RA kommt es zuerst zu einer Entzündung im Synovium und einem verstärkten und invasiven Wachstum des Synovialgewebes, was zur Aktivierung verschiedener Zellen und schließlich zur Zerstörung des Gelenkknorpels und des Knochens führt [10]. Nach der akuten entzündlichen Phase kommt es zur chronischen Phase, welche für die Patienten oftmals weniger schmerzhaft ist, allerdings schreitet die Gelenkzerstörung auch in dieser Phase weiter voran, wodurch es ohne therapeutische Intervention zu einer massiven Deformation bis hin zum vollständigen Funktionsverlust der Gelenke kommen kann [11]. Anders als bei der degenerativen OA oder den ebenfalls entzündlichen Erkrankungen PsA und AS kommt es bei der RA eher selten zur Osteophytenbildung. Oftmals deuten Osteophyten bei RA-Patienten auf das Vorhandensein einer sekundären OA hin [12].

### 1.2.1 Psoriasis-Arthritis

Die PsA ist eine üblicherweise Rheumafaktor-negative, entzündliche Arthritis, welche mit einer Psoriasis der Haut assoziiert ist. Das heißt, dass neben den Gelenken auch Haut und Nägel betroffen sind [13]. Etwa 2-3% der Bevölkerung leiden an einer Arthritis bzw. einer Psoriasis. Bei Patienten mit einer Psoriasis steigt die Häufigkeit, zusätzlich an einer entzündlichen Arthritis zu erkranken, jedoch auf 6-42% an. Ebenso steigt die Häufigkeit einer Psoriasis-Erkrankung bei Patienten mit entzündlicher Arthritis auf 7% an. Somit kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Häufigkeit einer entzündlichen Arthritis, welche mit verschiedenen Formen der Psoriasis assoziiert ist. Die exakte Prävalenz der PsA ist allerdings unbekannt, da es einerseits wenige generell akzeptierte Klassifikations- und Diagnose-

Kriterien gibt und andererseits die Diagnose oft schwierig ist. Dies kann dadurch bedingt sein, dass gelegentlich zunächst keine oder nur eine sehr geringe Beteiligung der Haut vorliegt, beispielsweise in Form von geringfügigen Veränderungen an den Nägeln. Verschiedene Berichte beschreiben daher das Vorkommen der PsA mit 3,4-8 von 100.000 Personen pro Jahr [14-16].

Bei den meisten PsA-Patienten kommt es zunächst zum Ausbruch der Psoriasis und innerhalb der ersten 10 Jahre entwickeln sich die Arthritis-Symptome, welche oftmals schubweise auftreten. Bei der PsA gibt es eine Vielzahl von Merkmalen bei der Gelenkbeteiligung, die sich von einer RA unterscheiden. Alle Gelenke können betroffen sein, typisch ist jedoch ein Befall der Finger- und Zehengelenke sowie der Kniegelenke. Auch Becken und Wirbelsäule können betroffen sein, weshalb die PsA auch zu den Spondylo-Arthropatien gezählt wird. Im Gegensatz zur RA kommt es bei der PsA in der Regel zu einem asymmetrischen Gelenkbefall, also zu einem Befall unterschiedlicher Gelenke der rechten und linken Körperhälfte. Ebenfalls typisch für die PsA ist neben dem Gelenkbefall auch der Befall von benachbartem Weichgewebe. Dabei sind insbesondere die Sehnen und Sehnenansätze betroffen, aber auch die Bänder oder die Schleimbeutel [17].

Die PsA kann sich in jedem Alter entwickeln, auch bereits in der Kindheit. Am häufigsten tritt sie im Alter von 30 bis 50 Jahren auf. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Die PsA-Patienten leiden meist unter Steifigkeit, Schwellung der Gelenke sowie einer Druckempfindlichkeit der Gelenke und umliegenden Bänder und Sehnen. Oft kommt es zu einer Enthesitis, einer Entzündung der Sehnenansätze und durch die Beteiligung der Sehnen und Bänder auch zum Auftreten einer Daktylitis, den sogenannten "Wurstfingern", bei der der gesamte Finger entzündet ist. Neben der Destruktion der Gelenke in Form von Erosionen kommt es bei der PsA auch zur Bildung von Osteophyten. Bei Beteiligung der Wirbelsäule kann es zur Bildung von Parasyndesmophyten kommen. Die Symptome können sowohl mild als auch sehr massiv sein und korrelieren üblicherweise nicht mit dem Schweregrad der Hautbeteiligung [18]. In Abb. 2 sind Beispiele für die klinische Manifestation der PsA dargestellt.



Abb. 2: Hände eines PsA-Patienten mit typischen Hautveränderungen und sogenannten "Wurstfingern" der rechten Hand, welche ein deutliches Zeichen für Entzündungen der Gelenke dieser Finger sind (A). Röntgenbild der Hände eines PsA-Patienten, bei dem Gelenkveränderungen an diversen Fingergelenken erkennbar sind (B, Pfeile). Fuß eines PsA-Patienten mit einer sogenannten "Wurstzehe" und Nagel-Psoriasis (C). Röntgenbild der Füße eines PsA-Patienten mit Gelenkveränderungen der großen Zehen (D, Pfeile). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. U. Lange, Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim.

Auch genetische Faktoren spielen in der Pathogenese eine Rolle. So ist die PsA üblicherweise mit dem humanen Leukozyten-Antigen (HLA) Klasse I assoziiert, wohingegen HLA Klasse 2 mit der RA assoziiert ist. Insbesondere HLA-B27 tritt bei der PsA überdurchschnittlich häufig auf [17]. Neuere Genomweite Assoziationsstudien deuten auf weitere spezifisch veränderte Genorte hin [19, 20]. Bei einer serologischen Untersuchung findet man häufig eine Erhöhung von Entzündungsparametern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Andere serologische Marker wie der Rheuma-Faktor sind bei der PsA hingegen nur selten nachweisbar. Serologische Parameter und der Nachweis von HLA-B27 sind neben den klinischen Manifestationen wichtige Diagnosekriterien für die PsA [17]. Für die Behandlung der PsA gibt es verschiedene Möglichkeiten. Um die muskuloskeletalen Beschwerden zu lindern, können nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAIDs) wie Ibuprofen, Diclofenac oder Coxibe eingesetzt werden. Bei lokalisierten aktiv entzündeten Gelenken, Enthesitis oder Daktylitis kann auch eine lokale Injektion von Kortikosteroiden hilfreich sein. Von einer systemischen Gabe von Kortikosteroiden wird meist abgesehen, da sich dies oft negativ auf die Haut auswirkt. Befindet sich die Erkrankung in einer aktiven Phase mit vielen betroffenen Gelenken und erhöhtem CRP und ESR, kommen oft krankheitsmodifizierende anti-rheumatische Medikamente (DMARDs) wie Methotrexat,

Leflunomid oder Sulfasalazin zum Einsatz. Bei Patienten, welche die DMARDs nicht gut vertragen bzw. bei denen diese Substanzen keine ausreichende Wirkung zeigen, können Biologika eingesetzt werden. Hier werden vor allem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Inhibitoren wie Adalimumab, Etanercept, Golimumab, Certolizumab oder Infliximab, in jüngster Zeit auch IL-12/ IL-23-Inhibitoren (Ustekinumab) eingesetzt. Je eher eine PsA erkannt und behandelt wird, umso besser ist die Prognose [21].

### **1.2.2 Ankylosierende Spondylitis**

Die AS, auch bekannt als Morbus Bechterew, ist eine chronische, Rheumafaktor-negative, entzündlich-rheumatische Erkrankung, die zu den Spondylarthropathien zählt, da sie vor allem das Achsenskelett mit Iliosakralgelenk und Wirbelsäule betrifft. Üblicherweise beginnt die Krankheit in einem Alter von 20 bis 30 Jahren, allerdings gibt es auch eine juvenile Form, bei der die Symptome bereits vor dem 16. Lebensjahr beginnen. Männer sind etwa dreimal häufiger betroffen und Frauen haben oft auch einen milderen Krankheitsverlauf. Insgesamt liegt die Prävalenz der AS bei 0,1 bis 1,4 Prozent, abhängig von der ethnischen Herkunft. Auch Umweltfaktoren und die Prävalenz für HLA-B27 spielen eine Rolle bei der Entwicklung der Krankheit und ihrem Fortschreiten [22].

Die AS kann in verschiedenen Schweregraden auftreten, angefangen von einer isolierten Sakroiliitis bis zur vollständigen Ankylose der Wirbelsäule. Zudem können auch die peripheren Gelenke betroffen sein oder eine Beteiligung der inneren Organe vorliegen. Üblicherweise beginnt die Erkrankung in den Sakroiliakalgelenken und befällt später die Wirbelsäule, wodurch es zur Verknöcherung des Achsenskeletts kommen kann. Dies führt zu einer immer stärker werdenden Versteifung und kann im Endstadium eine vollständige Ankylose der Sakroiliakalgelenke und der Wirbelsäule bedeuten, wodurch die Patienten massiv in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind [23].

Die Diagnose AS wird oft erst 5 bis 7 Jahre nach dem Auftreten der ersten Symptome gestellt. Dies liegt vor allem daran, dass in den Frühstadien der Erkrankung noch keine eindeutige Sakroiliitis im Röntgenbild nachweisbar ist. Dennoch leiden die Patienten bereits an tiefliegenden entzündlichen Rückenschmerzen [24]. Als Diagnosekriterien gelten nach wie vor die modifizierten New York Kriterien von 1984. Diese Kriterien sind: 1) tiefliegender Rückenschmerz und Steifigkeit länger als 3 Monate, welche sich durch Bewegung verbessert jedoch nicht durch Ruhe; 2) Einschränkungen in der Bewegung der Lendenwirbelsäule; 3) Einschränkungen in der Brustkorbausdehnung relativ zu den Normwerten entsprechend des

Alters und des Geschlechts; 4) bilaterale Sakroiliitis Grad 2 (Sklerose und einige Erosionen); 5) unilaterale Sakroiliitis Grad 3 oder höher (deutliche Erosionen, Pseudodilatation des Gelenkspalts, teilweise Ankylose). Die Diagnose gilt als gesichert, wenn ein radiologisches Kriterium (4, 5) mit mindestens einem klinischen Kriterium (1-3) assoziiert ist. Um möglichst eine frühe Diagnose stellen zu können, ist ein MRT oft hilfreicher als Röntgen oder Computer-Tomographie, um die Veränderungen der Sakroiliakalgelenke zu erkennen [25]. In Abb. 3 sind Beispiele für die klinische Manifestation der AS dargestellt.

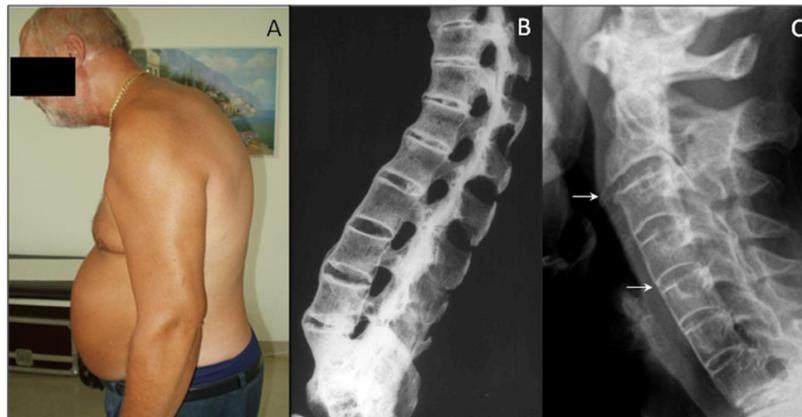


Abb. 3: AS-Patient mit Versteifungen der Wirbelsäule und der dadurch bedingten Haltung, welche ein normales Aufrichten oder anheben des Kopfes unmöglich macht (A). Röntgenaufnahme einer Lendenwirbelsäule eines AS-Patienten mit durchgängiger Verknöcherung (B). Röntgenaufnahme der Halswirbelsäule eines AS-Patienten mit noch nicht verbundenen Syndesmophyten (Pfeile) und Verknöcherungen der Wirbel (C). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. U. Lange, Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim.

Eine Therapie der AS soll vor allem den Schmerzen und dem Fortschreiten der Krankheit entgegen wirken und die Patienten so lange wie möglich mobil halten. Wichtig ist dafür regelmäßige Bewegung und die Aufklärung des Patienten, welche Übungen hilfreich sind. Dies erfolgt üblicherweise in Form von Physiotherapie [26]. Der Einsatz von NSAIDs dient der Schmerzreduktion und der Verminderung der Steifigkeit der Patienten. Bei Patienten mit aktivem, persistierendem Verlauf sollten diese Medikamente dauerhaft angewendet werden [27]. Glukokortikoide können lokal an den akut entzündeten Stellen eingesetzt werden, eine systemische Gabe ist jedoch nicht sinnvoll [28]. Auch der Einsatz von DMARDs ist bei der AS nicht effizient und somit nicht indiziert [29]. Bei Patienten mit persistierender hoher Krankheitsaktivität sollten TNF-Inhibitoren oder IL-12/ IL-23-Inhibitoren eingesetzt werden, der Einsatz anderer Biologika bei AS ist derzeit nicht indiziert [30]. Da es mit zunehmendem Fortschreiten der Ankylose der Wirbelsäule für die Patienten immer schwieriger wird, aufrecht zu stehen oder nach vorne zu schauen, kann in extremen Fällen auch eine Aufrichtungsoperation durchgeführt werden [28].

### 1.3 Aufbau des Gelenks

Die echten Gelenke bestehen aus zwei oder mehr aneinandergrenzenden Knochen, welche an ihren Grenzflächen mit hyalinem Knorpel bedeckt sind. Dazwischen befindet sich ein mit Synovialflüssigkeit gefüllter Gelenkspalt. Das Gelenk ist von einer Gelenkkapsel mit innenliegendem Synovium umgeben (Abb. 4). Das Synovium kann in eine äußere, sehr zellreiche Schicht, dem "*lining layer*" und der innerern Schicht, dem "*Sublining*" unterteilt werden. Die visköse Synovialflüssigkeit wird von den Zellen des Synoviums, den Synoviozyten, produziert und dient dazu, dass die Gelenkoberflächen übereinander gleiten können, wodurch die Beweglichkeit des Gelenks gegeben ist [31]. Außerdem erfolgt die Versorgung des Knorpels mit Nährstoffen über die Synovialflüssigkeit, da Knorpel kaum Gefäße aufweist. Auch Abfallprodukte werden über die Synovialflüssigkeit abtransportiert [32].

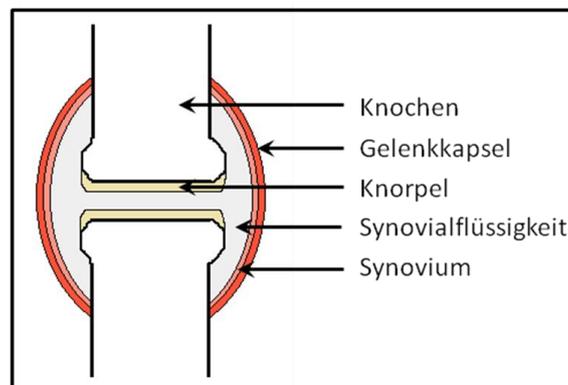


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung eines gesunden humanen echten Gelenks bestehend aus Knochen, Knorpel, Gelenkspalt mit Synovialflüssigkeit und Gelenkkapsel mit Synovium.

Der hyaline Gelenkknorpel besteht aus einer avaskulären, alymphatischen und aneuralen extrazellulären Matrix (EZM) und darin eingelagerten Chondrozyten (CH). Die CH produzieren die Knorpelmatrix und liegen in Knorpelzellhöfen vor, die auch als Chondrone oder Lakunen bezeichnet werden [33]. Die EZM besteht zu 65 bis 80% aus Wasser. 12 bis 25% der EZM sind Kollagene und weitere 10% machen Proteoglykane und Glykosaminoglykane aus. Kollagen Typ II ist mit 85 bis 95% das häufigste Kollagen, aber auch die Kollagene Typ IX, X und XI sind im Knorpel vorhanden ([34]). Weitere Proteine, die im Knorpel vorkommen, sind beispielsweise die Proteoglykane Aggrekan, Perlekan und Versikan oder das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure. Die Zusammensetzung des Knorpels mit dem hohen Wasseranteil erlaubt eine reibungslose Bewegung des Gelenks, wobei die Last absorbiert und gleichmäßig verteilt wird [35].

Neben den echten Gelenken gibt es unechte Gelenke, zu denen unter anderem die Verbindungen der Wirbelkörper der Wirbelsäule zählen. Die einzelnen Wirbelkörper sind über den Faserknorpel der Bandscheiben und über die Wirbelbogengelenke miteinander verbunden [36]. Aufgrund der Struktur der Bandscheiben wirken sie zugfest wie ein Band aber gleichfalls auch stoßresistent wie typischer Gelenkknorpel. Dadurch erlaubt die Bandscheibe der Wirbelsäule komplexe dreidimensionale Bewegungsabläufe, vertikale Kompression und Distraktion, Flexion-Extension, Seitneigung und axiale Rotation [37]. Die Bandscheiben bestehen aus einem zentralen Kern, dem Nukleus pulposus, welcher gelartig ist und sehr viel Wasser enthält. Bei Kompressionen der Wirbelsäule wirkt der Nukleus pulposus wie eine Flüssigkeit und verteilt die Last gleichmäßig auf den Wirbelkörper. Der daraus resultierende Flüssigkeitsdruck wird durch den außenliegenden Annulus fibrosus ausgeglichen. Der Annulus fibrosus besteht aus konzentrischen Lamellen aus Kollagenfasern, welche in alternierenden Richtungen angeordnet sind. Benachbarte Lamellen sind lose durch Kollagen- und Elastin-Fasern miteinander verbunden [38]. Der schematische Aufbau der Wirbelkörper mit den Bandscheiben ist in Abb. 5 dargestellt.

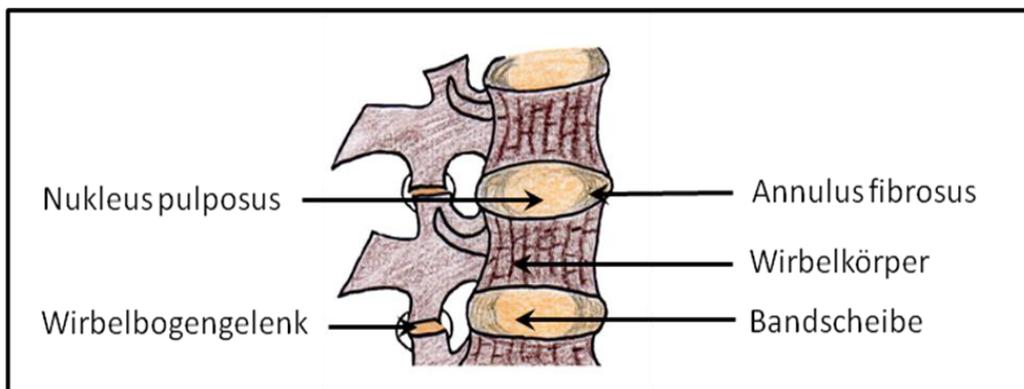


Abb. 5: Schematische Darstellung der Wirbelkörper verbunden über die Wirbelbogengelenke und die Bandscheiben, bestehend aus äußerem Annulus fibrosus und innerem Nukleus pulposus.

## 1.4 Knochen und Knochenbildung

Das Knochengewebe ist sehr hart und gegen Druck- und Zug- wie auch Dreh- und Biegebelastungen sehr stabil. Es enthält zelluläre Bestandteile, wie die Knochen-aufbauenden Osteoblasten (OB), Osteozyten und die Knochen-abbauenden Osteoklasten (OK) sowie EZM. Die Knochengrundsubstanz, das Osteoid, besteht zu 35% aus organischen Bestandteilen (Kollagen, Proteoglykane, Glykosaminoglykane) und zu 65% aus anorganischen Bestandteilen, die Hydroxyl-Apatit-Kristalle, welche Kalziumphosphat, Kalziumkarbonat, Magnesiumphosphat und Alkalisalze enthalten [39]. Zudem wird der Knochen außen von der

Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Es dient der Regeneration und der vaskulären und nervösen Versorgung des Knochens. Außerdem vermittelt es die Verbindung von Bändern und Sehnen mit der Hartschicht. Lamellenknochen unterteilt man in die kompakte äußere Schicht, den kortikalen Knochen, sowie das innenliegende Geflecht von Knochenbälkchen, dem trabekulären Knochen. Im Innern der Knochen befindet sich außerdem das in Markräumen vorliegende Knochenmark, welches in das rote, blutbildende Knochenmark und das gelbe, fettspeichernde Knochenmark unterteilt wird ([40]). In Abb. 6 ist schematisch der Aufbau eines Lamellenknochens dargestellt.

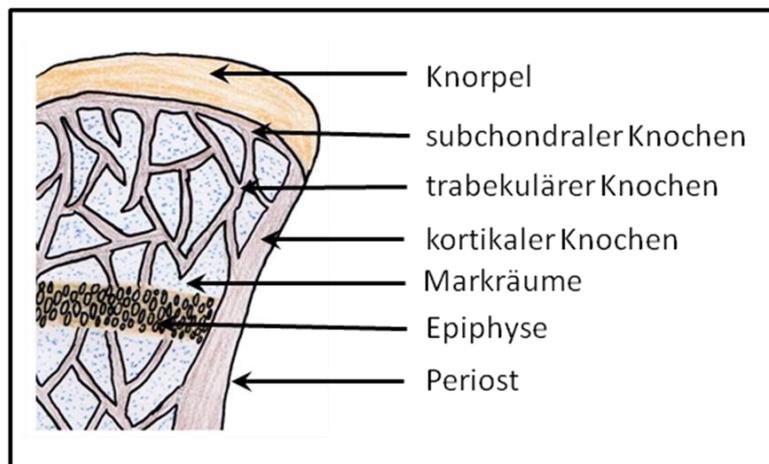


Abb. 6: Schematischer Aufbau eines Lamellenknochens mit aufliegendem Knorpel, subchondralem Knochen, einem schwammartigen Geflecht aus trabekulärem Knochen mit dazwischen befindlichen Markräumen, der äußeren Schicht des kortikalen Knochens sowie der für das Längenwachstum verantwortlichen Epiphyse.

Knochengewebe kann auf verschiedene Arten gebildet werden: Man unterscheidet zwischen der direkten (desmalen) Knochenbildung (Ossifikation) und der indirekten (chondralen) Ossifikation. Die desmale Ossifikation findet nur in der Embryonalentwicklung statt und führt zur Knochenbildung direkt aus einer bindegewebigen Vorstufe. Dabei differenzieren mesenchymale Zellen zu OB, welche das Osteoid aufbauen. Durch diese Art der Knochenbildung werden die Schädelknochen gebildet, ebenso wie Teile des Schlüsselbeins und der Rippen [33, 39]. Die chondrale Ossifikation findet bei der Bildung aller anderen Knochen statt. Bei der chondralen Ossifikation wird zuerst ein Modell aus hyalinem Knorpel angelegt, welches anschließend verknöchert. Man unterscheidet perichondrale und enchondrale Ossifikation, abhängig vom Ausgangspunkt der Verknöcherung. Bei der perichondralen Ossifikation werden OB aus dem Perichondrium abgesondert. Von diesen wird dann Osteoid ringförmig um das Knorpelmodell angelagert, wodurch eine Knochenmanschette entsteht. Dies ermöglicht das Dickenwachstum des Knochens [39]. Zudem schneidet die Knochenmanschette die Nährstoffversorgung der CH im angelegten

Knorpelmodell ab, wodurch diese hypertroph werden und vermehrt Kollagen Typ X statt Typ II produzieren und es zur Matrixmineralisierung kommt. Zudem exprimieren die hypertrophen CH spezifische Marker wie Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 und MMP-13 und den vaskulären Endothelzell-Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF). OK beginnen Teile der Knochenmanschette abzubauen, wodurch sich Kanäle bilden, durch die von VEGF angelockt Blutgefäße und mesenchymale Stammzellen in das Knorpelmodell einwandern können [41, 42]. Dadurch kommt es schließlich zur enchondralen Ossifikation, die im Inneren des Knochens stattfindet. Mesenchymzellen entwickeln sich dort in Knochen-aufbauende OB und in Knorpel-abbauende Chondroklasten, die den OK sehr ähnlich bzw. mit diesen identisch sind [43]. Nach Abbau des Knorpels lagern sich die OB auf die verbliebenen Reste der mineralisierten Knorpelsubstanz und bilden einen Osteoidüberzug, welcher vor allem aus Kollagen Typ I besteht. Auf diese Weise entstehen Knochenbälkchen, die als Vorläufer des trabekulären Knochens dienen. Sie werden relativ schnell wieder von OK abgebaut, um die Bildung des definitiven Knochengewebes zu ermöglichen [39]. Das Osteoid wird schließlich mineralisiert, indem Kalziumphosphate in den Mitochondrien der OB akkumulieren. Anschließend werden Kalziumphosphat-haltige Matrixvesikel gebildet, welche zudem alkalische Phosphatase (ALP) und andere Enzyme enthalten, die zur Steigerung der Phosphationenkonzentration führen. Nachdem die Vesikel-Membran aufgelöst wurde, werden Mikroapatit-Kristalle im Extrazellulärraum freigesetzt und initiieren Kristallbildung und -wachstum an den Nukleationsorten der Kollagenfasern. OB, welche vollständig von Osteoid eingeschlossen wurden, entwickeln sich zu inaktiven Osteozyten. Die enchondrale Ossifikation dient dem Längenwachstum der Knochen über die Epiphyse und findet bei Wundheilungsprozessen nach Knochenbrüchen statt [33].

## **1.5 Osteophyten / Syndesmophyten**

Osteophyten sind wichtige Merkmale verschiedener rheumatischer Erkrankungen. Neben der degenerativen OA treten sie auch bei entzündlichen Erkrankungen wie der PsA und der AS auf. Es werden drei verschiedene Formen von Osteophyten unterschieden: die Traktions-Sporne an den Ansatzstellen von Bändern und Sehnen, die entzündlichen Sporne, welche durch die Syndesmophyten bei der AS repräsentiert werden und die echten Osteophyten, auch Osteochondrophyten genannt. Letztere entstehen aus dem Periost und über dem Knochen an der Verbindungsstelle zwischen Knorpel und Knochen [44]. Es ist unklar, ob die Entstehung von Osteophyten an den Gelenkrändern eine funktionelle Adaption oder ein pathologisches

Phänomen ist. Möglicherweise entstehen sie aufgrund der pathologischen Veränderungen im Gelenk als Adaption an die entstandene Instabilität und dienen als Reparaturmechanismus. Es ist aber nicht auszuschließen, dass sie aufgrund normaler Umbauprozesse sekundär zu den Gelenkveränderungen entstehen, da es aufgrund des veränderten Gelenkmilieus zur Chondrogenese von Vorläuferzellen aus dem Periost kommt [45].

Die Mechanismen zur Entstehung von Osteophyten sind noch nicht vollständig verstanden. Man geht allerdings davon aus, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Periost oder dem Synovium an der Grenze von Knochen und Knorpel zur Proliferation angeregt werden und sich zu CH entwickeln [46]. Diese geben dann Matrixmoleküle wie Aggrecan in das Gewebe des sich entwickelnden Osteophyten ab. Während seiner gesamten Entwicklung ist der Osteophyt mit einer Schicht fibroblastoider Zellen bedeckt, welche zum Wachstum des Osteophyten beitragen. Die CH im Zentrum des Osteophyten werden schließlich hypertroph, wodurch es zur enchondralen Ossifikation und somit zur Bildung von Knochen und Markhöhlen kommt. Ein voll entwickelter Osteophyt ist in den suchondralen Knochen integriert und noch immer mit einer Schicht fibroblastenartiger Zellen bedeckt [47].

Zur Entstehung von Osteophyten tragen verschiedene Faktoren bei. Inwieweit mechanische Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist unklar, da experimentelle Modelle auch das Entstehen von Osteophyten an Gelenken paralysierter Extremitäten zeigen konnten. Dies schließt jedoch nicht aus, dass mechanische Faktoren dennoch wichtig sind [48]. Auch Wachstumsfaktoren, die von Makrophagen aus dem Synovialgewebe sezerniert werden, scheinen eine Rolle bei der Osteophytenbildung zu spielen [49]. Besonders wichtig scheint der Tumor-Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) für die Osteophytenbildung zu sein, da experimentell gezeigt werden konnte, dass in murinen Gelenken, in welche TGF- $\beta$  injiziert wurde, eine ähnliche Osteophytenbildung abläuft wie bei OA-Modellen in der Maus [50].

Die Mechanismen, die zur Bildung von Syndesmophyten an der Wirbelsäule führen, sind ebenfalls nur unvollständig bekannt. Bei der AS handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung, welche in der Regel mit einer Enthesitis an den Wirbelkörpern bzw. den Sakroiliakalgelenken einher geht. Die Ansatzstellen der Sehnen und Bänder werden dabei durch das Einwandern von Entzündungszellen verändert [51]. Knochen wird bei gesunden Personen kontinuierlich abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt. Allerdings ist dieser Prozess bei der AS aus dem Gleichgewicht. Anders als bei der RA kommt es hier nicht nur zu verstärktem Knochenabbau sondern auch zu verstärkter Knochenneusynthese. Diese umfasst vor allem die äußeren Bänder und die äußeren Schichten des Annulus fibrosus und führt zur Bildung verknöchelter Sporne, den Syndesmophyten, an den Wirbelkörpern. Diese können

schließlich fusionieren und somit zur Verknöcherung der betroffenen Bereiche führen. Die Bildung dieser Syndesmophyten entspricht dabei im Wesentlichen der von Osteophyten an echten Gelenken [52].

Neben TGF- $\beta$  scheint bei der Syndesmophytenbildung bei AS auch der Wnt-Signalweg eine wesentliche Rolle zu spielen. Wird im Tiermodell experimentell der Wnt-Inhibitor Dickkopf 1 (DKK1) ausgeschaltet, so kommt es zu massiver Osteophytenbildung an peripheren Gelenken sowie zur Fusion der Sakroiliakalgelenke [53, 54]. Auch geringe Serumlevel des Wnt-Inhibitors Sklerostin führen zur vermehrten Syndesmophytenbildung, wohingegen höhere DKK1-Konzentrationen vor Syndesmophytenbildung schützen können [55]. In Abb. 7 ist ein Beispiel verschiedener Osteophytenarten der Wirbelsäule dargestellt.

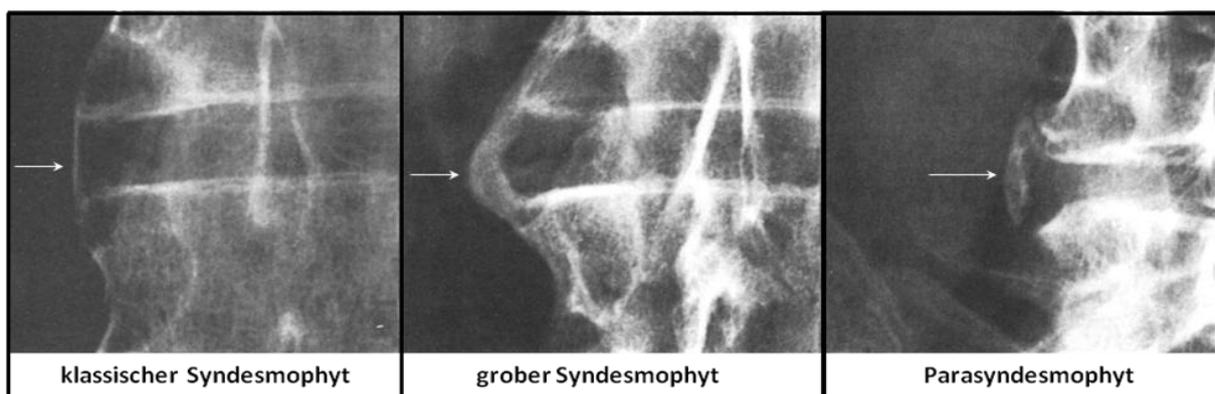


Abb. 7: Beispiele zweier Syndesmophyten bei AS und eines Parasyndesmophyten bei PsA. Links ist ein klassischer AS-Syndesmophyt dargestellt, welcher zwei Wirbelkörper durch eine schmale, gerade Knochenbrücke miteinander verbindet. In der Mitte ist ein grober AS-Syndesmophyt zu erkennen, der eine deutlich breitere und nach außen gewölbte Knochenbrücke zwischen zwei Wirbelkörpern bildet. Rechts ist ein PsA-Parasyndesmophyt dargestellt. Die Knochenspanne setzt im Gegensatz zu Syndesmophyten nicht an der Kante des Wirbelkörpers an, sondern etwas darüber am Sehnenansatz. Zudem werden die beiden Wirbelkörper nicht vollständig miteinander verbunden. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. U. Lange, Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim.

## 1.6 Wnt-Signalweg

Die Bezeichnung "Wnt" setzt sich aus den Wörtern "*Wingless*" und "*Int1*" zusammen. 1982 wurde das *Int1*-Gen als bevorzugte Integrationsstelle des MMTV-Virus identifiziert, welches das Homolog zum Segmentpolaritätsgen *Wingless* in der Fruchtfliege darstellt [56]. Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen Ereignissen in der Embryonalentwicklung, jedoch auch in der adulten Gewebe-Homöostase. Er wirkt pleiotrop und hat Effekte auf mitogene Stimulation sowie auf die Spezifikation des Zellschicksals und der Zell-Differenzierung [57]. Nach der Identifikation einer ursächlichen Mutation im LRP5-

Gen bei Patienten mit dem Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom, wurde verstärkt der Fokus auf den Wnt-Signalweg und seine Rolle bei der Regulation der Knochenmasse und der Knochen-Zell-Funktion gelegt. [56].

Der Wnt-Signalweg ist in drei verschiedene Signalwege unterteilt: Den kanonische Wnt-Signalweg, auch  $\beta$ -Catenin-Weg genannt, den *Wnt/Planar cell polarity*-Signalweg und den Kalzium-abhängigen Wnt-Signalweg [58]. Dabei ist der kanonische Wnt-Signalweg am besten untersucht. Die Regulation des kanonischen Wnt-Signalwegs erfolgt durch eine Vielzahl von Mechanismen (Abb. 8). Ohne aktivierendes Signal wird  $\beta$ -Catenin durch den sogenannten "*destruction complex*" gebunden. Dieser setzt sich aus *Adenomatous polyposis coli* (APC), Axin, Glykogensynthase Kinase-3 (Gsk3) und Caseinkinase (CKI) zusammen. Durch Gsk3 wird  $\beta$ -Catenin an spezifischen Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert und anschließend durch die E3-Ubiquitin-Ligase  $\beta$ -Trcp ubiquitiniert. Danach erfolgt der Abbau von  $\beta$ -Catenin durch das 26S Proteasom. Dadurch kann  $\beta$ -Catenin nicht in den Zellkern transloziert werden und somit auch keine Zielgene aktivieren. Der Signalweg wird aktiviert, sobald ein Wnt-Protein am Rezeptor der Frizzled-Familie und den Wnt-Korezeptor Lrp5/6 bindet. Dadurch kommt es zur Auflösung des "*destruction complex*", wodurch  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut wird, im Zytoplasma akkumuliert und schließlich in den Zellkern translozieren kann. Dort kann es dann an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie binden und somit Zielgene aktivieren [59].

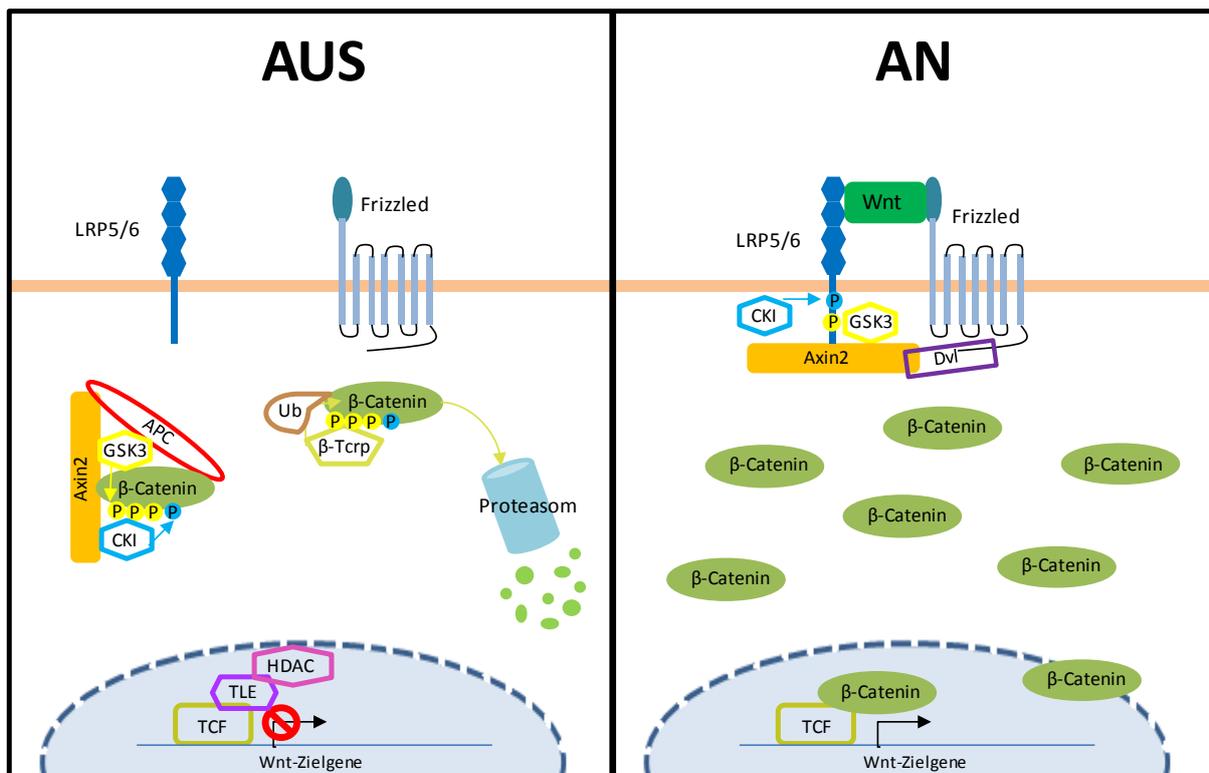


Abb. 8: Der kanonische Wnt-Signalweg (Abbildung modifiziert nach MacDonald *et al*, 2009). Inaktiver Signalweg (A):  $\beta$ -Catenin wird durch den "destruction complex" (APC, Axin, Gsk-3, CKI) gebunden und durch Gsk-3 phosphoryliert. Anschließend wird  $\beta$ -Catenin durch  $\beta$ -Trcp ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Zielgene können somit nicht abgelesen werden. Aktiver Signalweg (B): Bindung eines Wnt-Liganden an LRP5/6 und Frizzled führt zur Anlagerung von Axin an die Membran und die Auflösung des "destruction complex".  $\beta$ -Catenin akkumuliert im Zytoplasma, transloziert schließlich in den Zellkern und induziert dort zusammen mit Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie die Genexpression.

Für die Aktivierung des Wnt-Signalwegs ist es nötig, räumliche Nähe zwischen einem Frizzled-Rezeptor und dem Korezeptor Lrp5/6 herzustellen [60]. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von PPPSPxS-Motiven im C-Terminus von Lrp6 durch GSK-3 und CKI [61]. An diese kann Axin binden, wodurch es zur Auflösung des „destruction complex“ kommt,  $\beta$ -Catenin nicht mehr phosphoryliert und im Proteasom abgebaut wird. Stattdessen kann  $\beta$ -Catenin in den Zellkern translozieren und zusammen mit TCF-Transkriptionsfaktoren an Konsensussequenzen 5'-AAGATCAAAGG-3' binden und die Genexpression von Wnt-Zielgenen wie *Axin2* oder *Naked* induzieren [58].

Aufgrund der Komplexität dieses Signalwegs gibt es auch viele Stellen, an denen regulatorische Proteine ansetzen können. Die *secreted frizzled-related proteins* (sFRPs) haben die Möglichkeit, sowohl an Frizzled-Rezeptoren als auch Wnt-Proteine zu binden, wodurch der kanonische Wnt-Signalweg inhibiert wird [62]. Auch andere lösliche Inhibitoren, wie Mitglieder der Dickkopf-Familie (DKK1, DKK2, DKK4) oder Sklerostin (SOST), können

den kanonischen Wnt-Signalweg blockieren, indem sie an den LRP5/6-Rezeptor binden [63, 64].

Für den Knochenumbau ist der Wnt-Signalweg von essenzieller Bedeutung. Er steuert z.B. die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in CH oder OB. Ist der Wnt-Signalweg in den Vorläuferzellen inaktiv, so kommt es zur Differenzierung von CH, ist er jedoch aktiv, werden vermehrt OB gebildet [65]. Zusätzlich wird auch der Knochenumbau durch den Wnt-Signalweg reguliert. In ausgereiften OB steuert der Wnt-Signalweg die Expression von Osteoprotegerin (OPG), was einen Einfluss auf die OK-Differenzierung und -Aktivität hat, wodurch die Knochenresorption gesteuert wird [66].

## **1.7 Adipokine**

Adipokine sind bioaktive Substanzen, welche vor allem von Zellen des Fettgewebes, den Adipozyten, gebildet werden [67]. Sie haben vielfältige Effekte auf den Organismus und sind mit der Entstehung verschiedener Krankheiten assoziiert. Neben Effekten auf den Metabolismus spielen sie beispielsweise auch bei rheumatischen Erkrankungen eine Rolle. Inzwischen sind bereits viele Adipokine bekannt, wie z.B. Adiponektin, Resistin, Visfatin, Leptin oder Omentin [67, 68].

### **1.7.1 Adiponektin**

Das Adipokin Adiponektin ist eines der bekanntesten Adipokine und wird vor allem von Adipozyten sezerniert und ins Serum abgegeben [69]. Im Serum liegt Adiponektin in sehr hohen Konzentrationen von 3-30 µg/ml vor, womit es etwa 0,01% der Gesamt-Proteinmenge im Serum ausmacht [70]. Bei Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom, Typ 2 Diabetes oder krankhafter Fettleibigkeit ist die Serumkonzentration erniedrigt. Der Adiponektin-Serumspiegel steigt, wenn die Körperfettmasse reduziert wird. Somit ist Adiponektin anders als die meisten anderen Adipokine negativ mit der Körperfettmasse und dem Body-Mass-Index (BMI) korreliert [71].

Bei humanem Adiponektin handelt es sich um ein ca. 30 kDa großes Protein, welches vom AMP1-Gen kodiert wird [72]. Es besteht aus 244 Aminosäuren und ähnelt in seiner Struktur dem Komplementfaktor C1q. Am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid gefolgt von 22 Kollagen-Tripelhelix-Wiederholungen und einer globulären Domäne am C-Terminus [73]. Die Struktur des Adiponektinmoleküls ist schematisch in Abb. 9 A dargestellt. Die globuläre Domäne weist eine starke Homologie zu den globulären Domänen von Kollagen Typ VIII und Typ X auf [74]. Im

Serum kommt Adiponektin in verschiedenen Isoformen vor: Als Trimer (*Low Molecular Weight Form*, LMW), als Hexamer bestehend aus zwei Trimeren (*Middle Molecular Weight Form*, MMW) und als oligomere Form bestehend aus 4 bis 6 Trimeren (*High Molecular Weight Form*, HMW). Desweiteren existiert noch die globuläre Form, die nur aus der Kopf-Domäne des Adiponektin-Trimers besteht und durch proteolytische Spaltung entsteht [67, 68]. Abb. 9 B zeigt schematisch die verschiedenen Adiponektin-Isoformen.

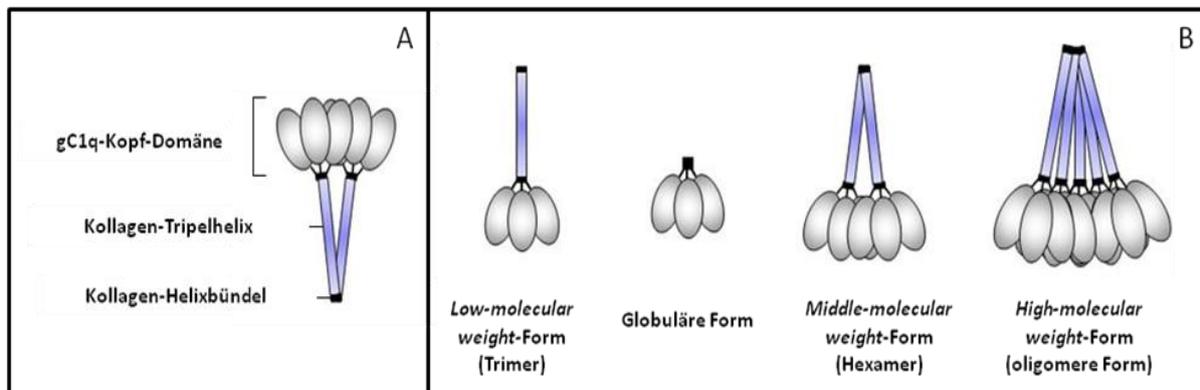


Abb. 9: Schematische Darstellung des Adiponektin-Hexamers bestehend aus der gC1q-Kopf-Domäne, Kollagen-Tripelhelix und Helixbündel (A) sowie der Adiponektin-Isoformen: Trimer, Hexamer, oligomere (hochmolekulare) und globuläre Form (B). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Kiran Khawaja, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Es ist bekannt, dass die unterschiedlichen Isoformen verschiedene Funktionen ausüben [75] und durch selektive Rezeptorbindung auch unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren können [76]. Beispielsweise ist das HMW-Adiponektin im Stande in humanen Monozyten IL-6 zu induzieren. Die Lipopolysaccharid (LPS)-vermittelte IL-6-Abgabe kann das HMW-Adiponektin nicht vermindern, wohingegen das LMW-Adiponektin die LPS-induzierte IL-6-Abgabe reduzieren und zudem die IL-10-Sekretion induzieren kann [75]. Somit scheint nur die LMW-Form antiapoptotische Eigenschaften bei diesen Zellen zu haben [77].

Derzeit sind drei Adiponektin-Rezeptoren bekannt: AdipoR1, AdipoR2 [78] und PAQR3, die zur Progesteron und Adiponektin Rezeptor (PAQR) Familie gehören [79]. AdipoR1 und AdipoR2 sind die Haupt-Adiponektinrezeptoren *in vivo* und vermitteln vor allem die metabolischen Effekte des Adiponektins [78]. Die Rezeptoren weisen sieben Transmembrandomänen auf, welche jedoch keine signifikante Homologie mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder anderen Säugerproteinen zeigen [80]. Man findet AdipoR1 und AdipoR2 vor allem auf Leberzellen [81], sie kommen jedoch auch auf weiteren Zellen wie Muskelzellen, Fettzellen [82] und Makrophagen [83] vor.

Adiponektin weist diverse metabolische Effekte auf: Es wirkt sich z.B. positiv auf die Insulin-Resistenz oder die Leberfunktion aus. Jedoch besitzt Adiponektin auch ein immunmodulatorisches Potenzial. Es kann das Wachstum myelomonozytärer Vorläuferzellen und die Makrophagen-Funktion hemmen [84], ebenso wie die durch TNF $\alpha$  induzierte Monozytenadhäsion. Außerdem kann Adiponektin die Expression von Adhäsionsmolekülen reduzieren [85]. Es konnte beobachtet werden, dass sich bei einer Ko-Kultivierung von Adipozyten und Makrophagen die Zellen gegenseitig beeinflussen, indem Adiponektin durch Induktion pro-inflammatorischer Zytokine reduziert wird [86]. Daraus wurde geschlossen, dass Adiponektin vorwiegend anti-inflammatorisch wirkt [86]. Jedoch zeigt sich bei Patienten mit RA, dass Adiponektin in vergleichsweise hohen Mengen in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu OA-Patienten vorliegt [87]. Im Synovium ist Adiponektin besonders in der synovialen Deckzellschicht und um Gefäße lokalisiert. Außerdem führte die Stimulation synovialer Fibroblasten mit Adiponektin zur Sekretion von IL-6 und proMMP-1, Faktoren die zur Entzündung und zum Matrixabbau in der RA beitragen [88].

### **1.7.2 Resistin**

Bei Resistin handelt es sich um ein Adipokin, welches 12,5 kDa groß ist. Es gehört zur Familie der cysteinreichen sekretorischen Proteine und formt multimere Strukturen [89]. Die Proteinfamilie weist ein N-terminales Signalpeptid auf, gefolgt von einer prozessierten N-terminalen Domäne von 28 bis 44 Aminosäureresten, welche nur geringe Homologien innerhalb der Familie aufweisen, sowie eine hochkonservierte Cystein-reiche C-terminale Domäne mit 57 bis 60 Aminosäureresten. Den Namen Resistin erhielt es aufgrund seiner Fähigkeit, Insulin-Resistenz auszulösen [90]. Im Serum liegt Resistin in verschiedenen Isoformen vor, als Trimer oder als Hexamer [91]. Obwohl Resistin als Protein entdeckt wurde, welches in der Maus an der Adipozytendifferenzierung beteiligt ist, kommt es beim erwachsenen Menschen kaum in Adipozyten vor [89]. Beim erwachsenen Menschen wird Resistin vor allem von Monozyten und Makrophagen produziert [92].

Die Resistin-Konzentration in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten ist im Vergleich zu OA-Patienten erhöht [87]. Die Serumkonzentration von Resistin ist ebenfalls bei RA-Patienten erhöht und zudem mit Entzündungsmarkern korreliert. Auch ist Resistin im Vergleich zu OA-Patienten verstärkt im Synovium von RA-Patienten nachweisbar, besonders

in den Zellen des "*lining layer*" sowie in Makrophagen, B- und insbesondere Plasmazellen [93].

Die Resistin-Serum-Level in Menschen liegen normalerweise zwischen 7 bis 22 ng/ml, sind bei Patienten mit Diabetes oder Adipositas jedoch deutlich erhöht. Außerdem korrelieren erhöhte Resistin-Level mit Entzündungsmarkern, Erkrankungen der Koronararterien, kardiovaskulären Erkrankungen und mit dem metabolischen Syndrom [94].

Die Stimulation von Makrophagen mit Resistin führte zur Sekretion einer Reihe proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ). Auch wird die Translokation von NF $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) in den Zellkern durch Resistin induziert. Im Mausmodell konnte durch lokale Injektion von Resistin in die Gelenke eine Arthritis induziert werden. Dies alles lässt darauf schließen, dass Resistin ein pro-inflammatorisches Potenzial bei Arthritiden besitzt [95].

### 1.7.3 Visfatin

Visfatin wurde ursprünglich als Wachstumsfaktor für nicht-aktivierte B-Zellen (PBEF, *pre-B cell colony-enhancing factor*) entdeckt. Das Visfatin-Gen ist 2,4 kb groß, das Molekulargewicht des Proteins beträgt 52 kDa [96]. Visfatin weist insulinähnliche Eigenschaften auf und ist in der Lage, an einen spezifischen Subtyp des Insulinrezeptors zu binden, welcher nur eine geringe Insulin-Affinität besitzt. Dadurch kommt es zur Aktivierung von insulinähnlichen Signalkaskaden, was nahe legt, das Visfatin insulinähnliche Effekte hat. Allerdings war es bisher nicht möglich, die funktionelle Bedeutung von Visfatin im Insulinstoffwechsel konkret zu klären. Zwar könnten die insulinähnlichen Effekte von physiologischer Relevanz sein, allerdings sprechen die im Vergleich zum Insulin sehr geringen Mengen des Visfatins im Serum nicht dafür, dass es einen bedeutenden Einfluss auf den Blutzuckerspiegel hat [97].

Visfatin ist zusätzlich unter dem Namen Nampt, aufgrund seiner Wirkung als Nikotinamide-Phosphoribosyltransferase, bekannt. Damit wird Visfatin als "Adipokin-Enzym" angesehen. Die Enzymaktivität des Visfatins wird durch eine homodimere Konformation vermittelt, durch die eine enzymatisch aktive Bindungsstelle entsteht [98]. Visfatin ist in den Biosyntheseweg von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) involviert, indem es Nikotinamid in Nikotinamid-Mononukleotide umwandelt. Es repräsentiert den limitierenden Faktor dieser enzymatischen Reaktion [99].

In der Synovialflüssigkeit und im Serum von RA-Patienten kommt Visfatin verstärkt vor [87, 100]. Außerdem wird Visfatin neben Fettzellen auch von Zellen der "lining layer", Lymphozytenaggregaten und Gefäß-Endothelzellen exprimiert. Zudem weist Visfatin proinflammatorisches Potenzial auf. Es kann humane Leukozyten aktivieren und kostimulatorische Moleküle auf Zelloberflächen und proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF) in Monozyten induzieren [95]. Bei der RA kann Visfatin in synovialen Fibroblasten z.B. durch IL-6 und Onkostatin M induziert werden [101]. Außerdem scheint Visfatin in der Lage zu sein, Fibroblasten und Neutrophile vor Apoptose zu schützen [102]. Zudem konnten Brentano *et al.* eine Korrelation des Visfatin-Spiegels mit dem Grad der Entzündung sowie der Krankheitsaktivität bei RA-Patienten zeigen [103].

Auch auf die OA scheint Visfatin einen Einfluss zu haben, da es von CH im OA-Knorpel produziert wird [104]. Außerdem zeigte diese Studie, dass Visfatin die Synthese von MMP-3 und MMP-13 sowie die Expression von ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase*) 4 und 5 in CH förderte, was eine katabolische Funktion andeutet. Diese Daten weisen darauf hin, dass Visfatin in arthritischen Erkrankungen einen Einfluss auf die Entzündung sowie das Überleben entzündungsrelevanter und destruktionsvermittelnder Zellen nimmt [105].

## 1.8 Zielsetzung

Bei rheumatischen Erkrankungen wie der OA, der PsA und der AS kommt es in der Regel zur zunehmenden Gelenkzerstörung. Dennoch lassen sich bei diesen Erkrankungen oft auch fehlgesteuerte Reparaturmechanismen in Form von unkontrollierter Knochenneubildung an den Gelenkrändern beobachten. Die daraus resultierenden Osteophyten findet man sowohl an peripheren Gelenken, aber auch an der Wirbelsäule, wobei man bei der AS von einer Syndesmophytenbildung an der Wirbelsäule spricht. Die Genese und Pathophysiologie der Osteophyten-/ Syndesmophyten-Bildung ist noch weitgehend ungeklärt, man geht jedoch von lokalem Stress und Entzündungsreaktionen als Auslöser der Osteophytenbildung aus. Zudem wird vermutet, dass eine gesteigerte lokale OB-Funktion vorliegt.

Über die Interaktionen zwischen Fett- und Knochengewebe ist nicht viel bekannt, obwohl Adipositas ein bekannter Risikofaktor für OA ist. Zudem erhöht eine vorliegende Adipositas das Risiko einer OA auch an nicht-gewichttragenden Gelenken. Die Adipokine, Botenstoffe welche vorwiegend von Fettzellen gebildet werden, werden mit der Pathogenese der RA in Zusammenhang gebracht. Auch lassen sich die Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin im Serum von Patienten mit entzündlichen und degenerativen rheumatischen Erkrankungen messen. Es ist jedoch nicht viel darüber bekannt, welche Rolle diese Stoffe bei Erkrankungen spielen, bei denen es zum vermehrten Knochenanbau kommt, wie bei der OA, PsA oder AS.

Das Ziel dieser Arbeit war es somit, den Einfluss von Adipokinen auf die Bildung von Osteophyten bzw. Syndesmophyten zu untersuchen. Dafür wurden die folgenden Punkte überprüft:

- Die Charakterisierung von OA-Osteophyten insbesondere hinsichtlich der Adipokin-Expression von Adiponektin, Resistin und Visfatin
- Analyse des Effekts der Adipokine auf Osteoblasten und Chondrozyten von OA-Patienten
- Untersuchung der Wirkung der Adipokine auf den Wnt-Signalweg
- Modulation des Wnt-Signalwegs und Analyse des daraus resultierenden Effekts auf die Adipokin-Expression
- Untersuchung der Adipokin-Serumspiegel von Adiponektin, Resistin und Visfatin bei PsA- und AS-Patienten, insbesondere im Zusammenhang mit der Osteophytenbildung
- Mögliche klinische Konsequenz der Adipokine bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen im Vergleich mit primär degenerativen rheumatischen Erkrankungen

Die Experimente sollen neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Osteophytenbildung bei primär degenerativen und chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen mit Hauptaugenmerk auf die Adipokine erbringen. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Veränderungen von Adipokinspiegeln den Knochenanbau in Form von Osteophyten bzw. (Para)Syndesmophyten beeinflussen.

## 2 Material

### 2.1 Zellen

Tab. 1 Verwendete Zellen

Bezeichnung	Hersteller
Humane CH von Patienten mit OA	Aus Kniegelenken, selbst isoliert
Humane OB von Patienten mit OA	Aus Kniegelenken, selbst isoliert
Normale humane artikuläre Chondrozyten vom Knie (gesunde CH)	Lonza, Allendale, USA

### 2.2 Chemikalien

Tab. 2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Alizarin-Rot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5x AMV-Puffer	Promega, Mannheim
Antibiotikum/ Antimykotikum	PAA Laboratories, Cölbe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck, Darmstadt
Aquatex	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Glycerolphosphat	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercapto-Ethanol	Merck-Schüchhardt, Hohenbrunn
Chondrozyten-Basalmedium + <i>Supplement-Mix</i>	Lonza, Allendale, USA
<i>Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail</i> Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> ) / Ham's F12	PAA Laboratories, Cölbe
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gel-Ladepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	PAA Laboratories, Cölbe
MEM ( <i>Modified Eagles Medium</i> ), Hepes, GlutaMax <sup>TM</sup> (Gibco <sup>®</sup> )	Life Technologies, Darmstadt
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-EDTA	Roth, Karlsruhe
Natrium-Fluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Tab. 2 - Fortsetzung

Bezeichnung	Hersteller
Natrium-Oxycholat	Sigma, St. Louis, USA
Paraffin	Merck, Darmstadt
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	PAA Laboratories, Cölbe
PCR-Nucleotidmix	Roche Diagnostics, Mannheim
peqGOLD Protein-Marker 10 - 170 kDa	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Penicilin/ Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
physiologische NaCl-Lösung, 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<i>Random primer</i> p(DN)6 (2 µg/µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-freies destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Applied Biosystems, Darmstadt
RNasin (RNase-Inhibitor)	Promega, Mannheim
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40 (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfat</i> )	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Toluidin-Blau	Roth, Karlsruhe
Trinatrium-Citrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle nichtgenannten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Karlsruhe oder Sigma-Aldrich, Taufkirchen bezogen.

## 2.3 Plastikwaren und sonstige Materialien

Tab. 3 Verwendete Plastikwaren und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
15 und 50 ml Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
25 und 75 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
5100 <i>Cryo 1°C Freezing Container</i>	Nalgene/ Fisher Scientific, Schwerte
6-/ 12-/ 24-Lochplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Adhäsions-Objektträger Superfrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Amersham Hyperfilm <sup>TM</sup> ECL	GE Healthcare, München
Einfrierröhrchen (Cryo.s <sup>TM</sup> )	Greiner bio-one, Frickenhausen
Erlenmeyerkolben (nicht adhäsiv)	Corning, Amsterdam, Niederlande
Extra thick Blotting Paper	Bio-Rad Laboratories, München
Immobilon Transfer Membran	Millipore, Bedford, USA
Lab Tek <i>Chamber slides</i> (Kammer-Objektträger, 4-/ 8-Kammern)	Nalge Nunc International, Langenselbold
<i>LightCycler</i> Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Gel-Gießkammer <i>Mini Protean 3 Multi-Casting Chamber</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Gel-Laufkammer <i>Mini Protean II/ Mini Protean Tetra System</i>	Bio-Rad Laboratories, München
Zellsieb (70 µm)	BD Bioscience, Heidelberg

## 2.4 Medien und Lösungen

Tab. 4 Verwendete Medien und Lösungen: Sofern nicht anders vermerkt, erfolgt die Lagerung bei Raumtemperatur (RT)

Bezeichnung	Bestandteile
Alizarin-Rot-Lösung	0,25 g Alizarin-Rot in 12,5 ml dH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 M HCL pH 4,2 einstellen
CAPS-Puffer (10x)	0,1 M CAPS ( <i>3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid</i> ) und 0,05% SDS in dH <sub>2</sub> O lösen, mit 2 N NaOH auf pH 11,0 einstellen
Chondrozyten-medium	500 ml DMEM/ Ham's F12, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 25µg/ml Amphotericin, 10 mM HEPES, Lagerung 4°C
Chondrozyten-medium (kommerziell, gesunde CH)	Basalmedium (Lonza) 500ml, Zugabe des Supplement-Mixes (R3-IGF-1, bFGF, Transferrin, Insulin, FBS und Gentamicin/ Amphotericin-B)
Einfriermedium	FCS, 10% DMSO, Lagerung 1 Woche 4°C
Entwickler (Silberfärbung)	3 g Natriumcarbonat in 50 ml dH <sub>2</sub> O lösen, 25 µl 37% Formaldehyd und 1 ml Thiosulfat-Lösung zugeben, frisch ansetzen
Eosin-Lösung	1% Eosin, dH <sub>2</sub> O; filtrieren, dunkel lagern; vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure zugeben
Fixierer (Silberfärbung)	50 ml 96% Ethanol (EtOH), 12 ml Essigsäure, 0,1 ml 37% Formaldehyd, 100 ml dH <sub>2</sub> O
Hämatoxylin-Lösung	0,1% Hämatoxylin, 0,2 g/l Natriumjodat, 50 g/l Kaliumaluminiumsulfat; vollständig in dH <sub>2</sub> O lösen; 50 g/l Chloralhydrat, 1 g/l Zitronensäure; filtrieren, dunkel lagern
Lämmli-Puffer (4x)	0,8 g SDS, 4 ml 100% Glycerin, 2,4 ml 1 M Trislösung, 0,01% Bromphenolblau, auf 10 ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen, Lagerung bei -20°C, Zugabe von 50 mM DTT und 10% beta-Mercapto-EtOH frisch vor Gebrauch
Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris-Base, 144,0 g Glycin und 10,0 g SDS in 1000 ml dH <sub>2</sub> O lösen, Lagerung 4°C
Lysepuffer A (Kernextrakte)	10 mM HEPES, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM KCl, Lagerung bei 4°C, frisch 0,5 mM DTT und auf 10 ml eine Protease-Inhibitor-Tablette zugeben
Lysepuffer B (Kernextrakte)	20 mM HEPES, 25% Glycerin, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA, Lagerung bei 4°C, frisch 0,5 mM DTT und auf 10 ml eine Protease-Inhibitor-Tablette zugeben
Mineralisierungs-Medium	Osteoblastenmedium + 5 mM Glycerolphosphat + 100 µg/ml Ascorbinsäure, frisch ansetzen
Natrium-Citrat-Puffer	2,94 g Trinatrium-Citrat-Dihydrat in 1000 ml dH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 M HCL auf pH 6,0 anpassen, 500 µl TWEEN 20 zufügen
Natrium EDTA-Lösung (20%)	100g EDTA-Dinatriumsalz in 500 ml dH <sub>2</sub> O lösen und mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
Osteoblasten-medium	500 ml MEM GlutaMax, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, Lagerung bei 4°C
Osteoblasten-medium, serumfrei	500 ml MEM GlutaMax, 100 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, Lagerung bei 4°C
Proteinase K-Lösung	5 ml dH <sub>2</sub> O + 250 µl TRIS (1 M, pH 8) + 50 µl NaEDTA (0,5 M, pH 8) + 2,5 µl Proteinase K

Tab. 4 - Fortsetzung

Bezeichnung	Bestandteile
Proteinlysepuffer	0,05 M Tris + 1% Nonidet P40 in dH <sub>2</sub> O lösen, auf 10 ml davon eine Proteaseinhibitor-Tablette frisch dazugeben
RIPA (Radioimmuno-precipitation assay) -Lysis-Puffer	150 mM NaCl, 50mM Tris, 1% Nonidet P40, 10% Glycerin, 0,5% Natrium-Oxychololat, 0,1% SDS, 25 mM Natrium-Fluorid, 2 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>3</sub> in dH <sub>2</sub> O lösen und pro 10 ml 1 Protease-Inhibitor Tablette zufügen, frisch ansetzen
Sammelgel 6%	750 µl Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (40 %) + 3 ml dH <sub>2</sub> O + 1,25 ml Trenngelpuffer + 10 µl TEMED + 20 µl 10% APS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Base, 0,4% SDS in dH <sub>2</sub> O lösen, mit konzentrierter HCl auf pH 6,76 einstellen, Lagerung bei 4°C
Silbernitrat-Lösung (Silberfärbung)	0,1 g Silbernitrat in 50 ml dH <sub>2</sub> O lösen, 37,5 µl 37% Formaldehyd zugeben, frisch ansetzen
Stop-Lösung (Silberfärbung)	18,6 g EDTA in 1000 ml dH <sub>2</sub> O lösen, mit NaOH pH 7,5 einstellen
TBST ( <i>Tris buffered saline</i> TWEEN 20)-Puffer (10 x)	0,1 M TRIS + 1,5 M NaCl + 1% TWEEN-20 in dH <sub>2</sub> O lösen
Thiosulfat-Lösung (Silberfärbung)	0,2 g Natriumthiosulfat in 1000 ml dH <sub>2</sub> O lösen
Transferpuffer	1x CAPS-Puffer + 10% Methanol
TRAP ( <i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i> )-Lösung	Lösung I: 4,5 ml dH <sub>2</sub> O + 50 µl Naphtol + 200 µl Azetatlösung + 100 µl Tartatlösung Lösung II: 50 µl Fast Garnet + 50 µl Natriumnitrit Vorsichtiges Mischen von Lösung I und II
Trenngel 10%/12%	3/ 3,75 ml Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (40 %) + 6/ 5,25 ml dH <sub>2</sub> O + 3 ml Trenngelpuffer + 20 µl TEMED + 40 µl 10% APS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Base, 0,4% SDS in dH <sub>2</sub> O lösen, mit konzentrierter HCl auf pH 8,8 einstellen, Lagerung 4°C

## 2.5 Enzyme

Tab. 5 Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
AMV <i>Reverse Transcriptase</i>	Promega, Mannheim
Kollagenase	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Pronase	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Quiagen, Hilden
Trypsin (5 g/l)/ EDTA (2 g/l)	PAA Laboratories, Cölbe

## 2.6 Antikörper und Proteine

Tab. 6 Anti-humane Primärantikörper für immunhistochemische (IHC), immunzytochemische (IZC) und Westernblot (WB) Analysen

Antigen Name /	Isotyp	Verdünnung	Antigen-Demas-kierung	Block-Substanz	Inkubation	Hersteller
Adiponektin (IHC)	IgG aus Ziege	1:50 in 2% HS	Hitze	10% PS/PBS	über Nacht, 4°C	R&D Systems, Wiesbaden
Adiponektin (IZC)	IgG1 κ aus Maus	1:100 in 2% HS	/	10% PS/PBS	1 h, RT	abcam, Cambridge, UK
Alkalische Phosphatase (IHC, IZC)	IgG aus Kaninchen	1:100 in PBS	Proteinase K	5% MP/PBS	1 h, RT	ATLAS Antibodies, Stockholm, Schweden
β-Catenin (WB)	IgG aus Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	/	5% BSA/TBST	über Nacht, 4°C	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
CD 3 (IHC)	IgG1 κ aus Maus	1:50 in PBS	Hitze	2% BSA/PBS	über Nacht, 4°C	R&D Systems, Wiesbaden
CD 16 (IHC)	IgG1 κ aus Maus	1:50 in PBS	Hitze	5% MP/PBS	über Nacht, 4°C	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
CD 20 (IHC)	IgG2a κ aus Maus	1:50 in PBS	Hitze	2% BSA/PBS	über Nacht, 4°C	DAKO, Hamburg
Cyclophilin B (WB)	IgG aus Kaninchen	1:1000 in 5% MP/TBST	/	5% MP/TBST	über Nacht, 4°C	abcam, Cambridge, UK
DKK1 (IHC)	IgG1 κ aus Maus	1:50 in PBS	Proteinase K	5% MP/PBS	über Nacht, 4°C	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Kollagen Typ I (IHC)	IgG1 κ aus Maus	1:500 in PBS	Proteinase K	5% BSA/PBS	1 h, RT	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Kollagen Typ II (IHC, IZC)	IgG1 κ aus Maus anti Huhn	1:500 in PBS	Proteinase K	5% BSA/PBS	1 h, RT	Millipore, Terneucula, USA
Kollagen Typ IV (IHC)	IgG1 κ aus Maus	1:100 in PBS	Proteinase K	5% MP/PBS	1 h, RT	DAKO, Hamburg

Tab. 6 - Fortsetzung

Antigen / Name	Isotyp	Verdünnung	Antigen-Demas-kierung	Block-Substanz	Inkubation	Hersteller
p-38 MAPK (WB)	IgG aus Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	/	5% MP/TBST	über Nacht, 4°C	Cell Signalling Technology, Bosten, USA
phospho-p-38 MAPK (WB)	IgG aus Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBST	/	5% MP/TBST	über Nacht, 4°C	Cell Signalling Technology, Bosten, USA
Resistin (IHC, IZC)	IgG2b $\kappa$ aus Maus	1:100 in PBS	Hitze	5% MP/PBS	1 h, RT	R&D Systems, Wiesbaden
Visfatin (IHC, IZC)	IgG2a $\kappa$ aus Maus	1:100 in PBS	Hitze	5% MP/PBS	1 h, RT	Enzo Life Science, Lörrach

Tab. 7 Verwendete Isotypkontrollen, die Verdünnungen wurden entsprechend der Konzentration der primären Antikörper eingesetzt

Bezeichnung	Hersteller
Kaninchen IgG	abcam, Cambridge, UK
Maus IgG1 $\kappa$	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG2a $\kappa$	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG2b $\kappa$	abcam, Cambridge, UK
Ziege IgG	R&D Systems, Wiesbaden

Tab. 8 Sekundärantikörper für IHC, IZC und WB Analysen

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) Anti-mouse, -rabbit</i>	Anti-Maus, Anti-Kaninchen	/	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (G) Anti-goat</i>	Anti-Ziege	/	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
<i>Polyclonal goat Anti Rabbit Immunglobulins/HRP</i>	Anti-Kaninchen	1:2000	DAKO, Hamburg

Tab. 9 Verwendete Blockierungsreagenzien

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
BSA (bovines Serum Albumin)	2%, 5%	Roth, Karlsruhe
Milchpulver (MP)	5%	Roth, Karlsruhe
Normalserum aus dem Pferd (PS)	2%, 10%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 10 Verwendete Proteine

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
humanes Adiponektin Wildtyp-Mix	10 µg/ml	BioVendor, Heidelberg
humanes DKK1	500 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
humanes Resistin Monomer	70 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
humanes Resistin Multimer	70 ng/ml	PeptoTech, Hamburg
humanes SOST/Sklerostin	500 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
humanes Visfatin	100 ng/ml	Adipogen, San Diego, USA
humanes Wnt 3a	200 ng/ml / 20 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden

## 2.7 Molekularbiologische und immunologische Kits

Tab. 11 Verwendete molekularbiologische und immunologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix</i>	Thermo Scientific, Schwerte
<i>Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>AEC Substrate Kit</i>	Vector Laborat., Burlingame, USA
<i>Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare, München
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
<i>BioRad Assay (Bradford)</i>	Bio-Rad Laboratories, München
<i>Human Adiponectin ELISA Kit, High Sensitivity</i>	Biovendor, Heidelberg
<i>Human Adiponectin ELISA Kit</i>	Biosensis, Thebarton, Australien
<i>Human CCL2/MCP-1 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human CXCL1/Gro-alpha Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human Dkk-1 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human IL-1β/ IL-1F2 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human IL-6 Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human Resistin ELISA Kit</i>	Biovendor, Heidelberg
<i>Human Resistin ELISA Kit</i>	RayBiotech, Norcross, USA
<i>Human SOST Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Human VEGF Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems, Wiesbaden
<i>Lumi-Light Western Blotting Substrate</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Nampt (Visfatin/PBEF) (human) ELISA Kit</i>	Adipogen, Liestal, Schweiz
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNase-free DNase Set</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Super Signal West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Scientific, Schwerte
<i>Taq PCR Master Mix Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Trichrome Stain (Masson) Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

## 2.8 Oligonukleotide (Primer)

Tab. 12 Oligonukleotide, bezogen von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen und mit entionisiertem dH<sub>2</sub>O jeweils eine Arbeitskonzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	MgCl <sub>2</sub> (mM)	T <sub>a</sub> (°C)
18s fw 18s rev	CGGCTACCACATCCAAGGAA GCTGGAATTACCGCGGCTGC	Referenzgen für Real-Time-PCR	3,0	50-65
ADAMTS5 fw ADAMTS5 rev	AAGCTTTGTGTCACGGTAGG TGACCCCTTAAATGTCCTCA	Primer für ADAMTS 5	4,0	53
Aggrekan fw Aggrekan rev	TCCCTCACCATCCCCTGCTA GCAGTGAGACCTTGTCCTGA	Primer für Aggrecan	4,5	57
ALPL fw ALPL rev	CAAGCACTCCCACCTTCATCT GTTGTTCTGTTTCAGCTCGT	Primer für ALP	3,5	57
Axin 2 fw Axin 2 rev	GCAAACCTTTCGCCAACCCTG CTCTGGAGCTGTTTCTTACTGCC	Primer für Axin2	3,0	65
β-Catenin fw β-Catenin rev	CGACACCAAGAAGCAGAGAT AGCCTTTATCAGAGGCCAGT	Primer für β-Catenin	3,0	57
Coll1 fw Coll1 rev	CAAGATGTGCCACTCTGACT AGTCTCCATGTTGCAGAAGA	Primer für Kollagen Typ I	3,5	53
Coll2 fw Coll2 rev	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC ACCACGATCACCTTGACTC	Primer für Kollagen Typ II	4,0	53
COL10A1 fw COL10A1 rev	AATGCCTGTGTCTGCTTTTA AGTCCTTGGGTCATAATGCT	Primer für Kollagen Typ X	4,0	57
gla fw gla rev	CTTCTTTCCTCTTCCCCTTG CCACAGATTCTCTTCTGGA	Primer für Osteocalcin	4,0	55
MMP9 fw MMP9 rev	CCGGACCAAGGATACAGTTT CAGTGAAGCGGTACATAGGG	Primer für MMP9	3,0	53
MMP13 fw MMP13 rev	TCTACACCTACACCGGCAAA TTAGGGTTGGGGTCTTCATC	Primer für MMP13	4,0	50
OPG fw OPG rev	AGATGTCCAGATGGGTTCTT TGAGTTAGCAGGAGACCAAA	Primer für Osteoprotegerin	6,0	57
RunX fw RunX rev	TCACAAATCCTCCCAAGTA GGCGGTCAGAGAACAATA	Primer für RunX2	3,5	57
Sox9 fw Sox9 rev	ACCCGTCTACACACAGCTCA AGGGAATTCTGGTTGGTCTCT	Primer für sox9	4,5	53
sp7 fw sp7 rev	TGCTTGAGGAGGAAGTTCAC AGGTCACTGCCACAGAGTA	Primer für Osterix	3,5	57
TNFSF11 fw TNFSF11 rev	GCACATCAGAGCAGAGAAAAG GTCGGTGGCATTAAATAGTGA	Primer für RANK-Ligand	3,0	54

## 2.9 Geräte und Software

Tab. 13 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
kombiniertes Einbettssystem EG 1150 (Paraffinausgießstation und Kühlplatte)	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DMI 6000 B (Mikroskop)	Leica Microsystems, Wetzlar
LEICA DFC 295 (polychrome Kamera)	Leica Microsystems, Wetzlar
LEICA DFC 345 FX (monochrome Kamera)	Leica Microsystems, Wetzlar
Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Nano-Drop	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Light Cycler 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
LC Carousel Centrifuge 2.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Optimax X-Ray Film Prozessor	Protec Medizintechnik GmbH & CoKG, Steinheim
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories, München
Trans-Blot SD Cell	Bio-Rad Laboratories, München

Tab. 14 Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Leica Application Suite V4.0.0	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler Software 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Magellan 5	Tecan, Crailsheim
ND-1000 V3.5.2	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Quantity One	Bio-Rad Laboratories, München

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Gewebeentnahme**

Die Entnahme der humanen Knorpel-Knochenplatten erfolgte im Rahmen von Gelenkersatzoperationen in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie des Markuskrankenhauses in Frankfurt und der Abteilung für Orthopädie und orthopädische Chirurgie des Universitätskrankenhauses Gießen/Marburg mit Standort Gießen. Es lag die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten vor, das Gewebe zu Forschungszwecken zu verwenden und die Verwendung erfolgte nach Genehmigung durch die Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Gewebe stammten von Patienten mit einer gesicherten OA [106] und wurden für die histologische Analyse der Osteophyten verwendet und fotografisch dokumentiert. Zudem wurden die Knochen-Knorpel-Platten zur Isolation von CH und OB verwendet.

#### **3.1.2 Osteophytenpräparation**

OA-Osteophyten an den Rändern der Gelenke sind deutlich erkennbar und lassen sich leicht farblich und morphologisch von der normalen Gelenkoberfläche unterscheiden. Üblicherweise erscheint der Knorpel von Osteophyten heller als der Knorpel der Gelenkoberfläche. Auch die Oberfläche ist unregelmäßiger, sodass Osteophyten makroskopisch gut identifizierbar sind (Abb. 10 A und B). Die Knochen-Knorpelplatten des Schienbeinkopfes und der Femurkondylen mit den randständigen Osteophyten von 12 verschiedenen OA-Patienten wurden fotografisch dokumentiert und die Höhe und Breite der Osteophyten gemessen. Die Osteophyten wurden anschließend mithilfe eines Skalpells von der Knochen-Knorpel-Platte abgetrennt. In einigen Fällen war das Gewebe zu hart, um die Osteophyten mit dem Skalpell zu entnehmen, in diesen Fällen wurde eine Liston-Knochensplitterzange verwendet. Die Osteophyten wurden so nah wie möglich an der ehemaligen Gelenkoberfläche abgetrennt, um einen Einschluss von zusätzlichem Material des Originalgelenks zu minimieren (Abb. 10 C).

Nach dem Abtrennen der Osteophyten wurden diese in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 24 h in einer 4% igen Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden

die Gewebe nach zweimaligem Waschen für 5 min in PBS für 6 Wochen in einer 20%igen Natrium-EDTA-Lösung (pH 7,4) entkalkt. Dabei wurde die Natrium-EDTA-Lösung einmal wöchentlich gewechselt. Danach wurden sie erneut 2 x 5 min in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanol (EtOH)-Reihe dehydriert (50% EtOH/PBS für 30 min, 75% EtOH/PBS für 60 min, 96% EtOH/PBS für 90 min, 100% EtOH 2 x 90 min). Anschließend wurden mit dem Intermedium Benzoesäure-Methylester über Nacht letzte Wasserreste aus den Geweben entfernt. Die Osteophyten wurden im Anschluss in Xylol überführt (2 x 45 min) und schließlich bei 62°C für 6 min mit flüssigem Paraffin gemischt. Zum Schluss wurden die Osteophyten je 60 min in reines Paraffin eingelegt, welches dreimal gewechselt wurde. Nach einer Inkubation über Nacht in flüssigem Paraffin wurden die Gewebe mit Hilfe eines kombinierten Einbettsystems (EG 1150; Leica Microsystems) in Paraffin eingebettet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Osteophyten im Längsschnitt von der äußeren Grenze bis zur Ansatzstelle mit dem Gelenkknochen in der Histologie zu betrachten sein würden, wie in Abb. 10 D schematisch dargestellt. Nach dem Abkühlen des Paraffins konnten die gegossenen Blöcke aus den Einbettformen gelöst und bei Raumtemperatur gelagert werden. Um das Schneiden der Blöcke am Mikrotom zu erleichtern, wurden diese vorher über Nacht bei 4°C gekühlt. Es wurden 5 µm dicke Serienschritte der Gewebe angefertigt, welche anschließend bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert wurden.

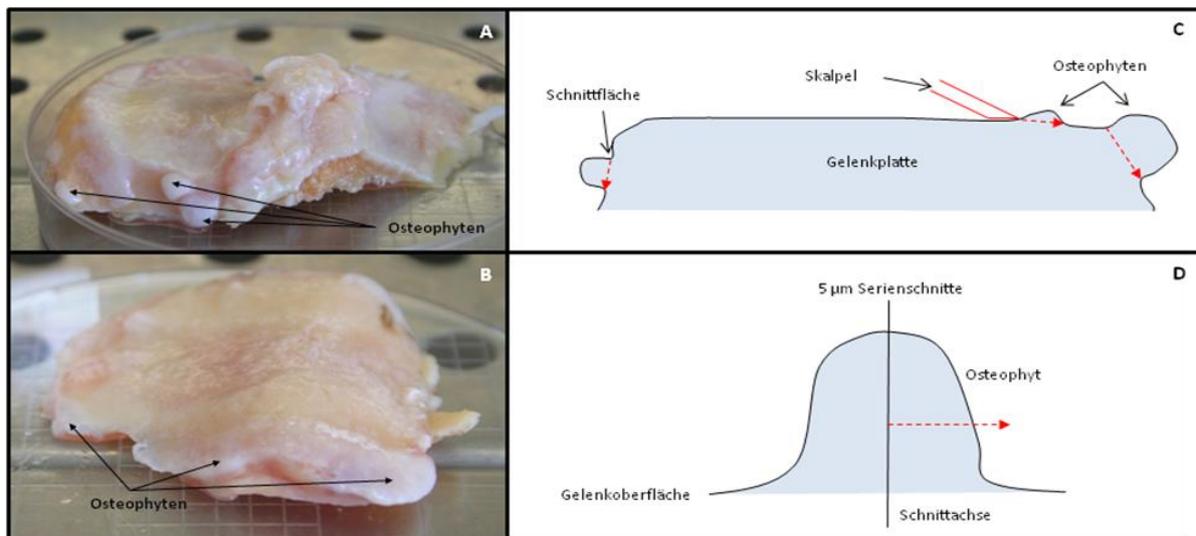


Abb. 10: A und B zeigen zwei verschiedene Knochen-Knorpelplatten mit verschieden großen und geformten Osteophyten (schwarze Pfeile). C zeigt schematisch, wie die Osteophyten von der Gelenkoberfläche abgetrennt wurden. In D ist schematisch dargestellt, in welcher Schnittebene die Osteophyten in Serie geschnitten wurden.

### 3.1.3 Proteinisolation aus Knorpel

Die Unterschiede zwischen dem Knorpel des ursprünglichen Gelenks und der Knorpelschicht, welche die Osteophyten bedeckt, wurden verglichen, indem von beiden Arealen Teile des Knorpels mit einem Skalpell von der Knochenoberfläche abgetrennt wurden. Diese wurden in einem Mörser mit Hilfe von flüssigem Stickstoff so fein wie möglich zermahlen und anschließend in Proteinlysepuffer (siehe Tab. 4) aufgenommen. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben des *BCA Protein Assay Kits* (Pierce Biotechnology). Das Knorpel-Lysat wurde bis zur weiteren Untersuchung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.4 Isolation humaner Osteoblasten

Für die Isolation humaner OB wurden ca. 5 x 5 mm große Knochenstücke aus der Unterseite der Knochen-Knorpelplatten von OA-Patienten mit einem Skalpell herausgetrennt. Dabei wurde darauf geachtet, ausschließlich Knochen zu entnehmen, um eine Kontamination mit anderen Zellen zu vermeiden. Die entnommenen Knochenstücke wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit sterilem PBS durch starkes Schütteln gewaschen um möglichst alle losen Bestandteile und nicht-osteoblastäre Zellen zu entfernen. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, bis die Waschlösung keine Trübung mehr aufwies und die Knochenstücke etwas durchscheinend wirkten. Anschließend wurden die Knochenstücke für 5 min bei  $37^{\circ}\text{C}$ , einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem  $\text{CO}_2$ -Gehalt von 5% in einer 10 ml-Lösung mit 2,5 g/l Trypsin und 1 g/l EDTA im Brutschrank inkubiert, um letzte noch nicht ausgewaschene nicht-adhärente Zellen zu entfernen. Die Reaktion wurde danach mit 10 ml Osteoblastenmedium (OBM) gestoppt. Nach Abnehmen der Lösung wurden je ca. 5 Knochenstücke in eine  $75\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche (ZKF) gegeben und mit 12 ml OBM überschichtet. Aus diesen Knochenstücken wuchsen die OB innerhalb der folgenden 5 bis 7 Tage aus. In den ersten 7 Tagen erfolgte kein Mediumwechsel, anschließend wurde das Medium alle 3 bis 4 Tage gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten. Danach konnten die Zellen passagiert oder für spätere Experimente eingefroren werden.

### **3.1.5 Passagieren der humanen Osteoblasten**

Die OB wurden unter sterilen Bedingungen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 5 min mit 5 ml 1x Trypsin/EDTA bei 37°C zum Ablösen der Zellen vom Boden der ZKF inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml OBM gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit OBM resuspendiert und die OB jeweils zur Hälfte (1:2) oder zu einem Drittel (1:3) in eine neue 75 cm<sup>2</sup>-ZKF ausgesät.

### **3.1.6 Einfrieren der humanen Osteoblasten**

Für die Langzeitlagerung der OB wurden die Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-ZKF bei einer Konfluenz von ca. 90% wie in 3.1.5 beschrieben abgelöst und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 4 ml vorgekühltem Einfriermedium (siehe Tab. 4) aufgenommen, je 2 ml in zwei Einfrierröhrchen gegeben und diese in ein Einfriergefäß gestellt. Es erfolgte eine Lagerung über Nacht bei -80°C. Am nächsten Tag wurden die OB für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.1.7 Auftauen der humanen Osteoblasten**

Die OB wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C in einem Wasserbad vorsichtig aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtes OBM überführt und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml OBM aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-ZKF mit 10 ml OBM überführt. Um eventuell verbliebenes DMSO zu entfernen, wurde nach ca. 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **3.1.8 Isolation humaner Chondrozyten**

Für die Isolation humaner CH wurde der noch erhaltene Gelenkknorpel der Knochen-Knorpelplatten von OA-Patienten mit einem Skalpell vom Knochen gelöst. Dabei wurde darauf geachtet, eine Kontamination mit anderen Geweben, wie dem umliegenden Synovialgewebe oder den Osteophyten, auszuschließen. Auch stark angegriffene Knorpelareale mit vielen Blutgefäßen oder Zeichen einer Entzündung wurden aus diesem Grund nicht für die CH-Isolation verwendet. Der isolierte Knorpel wurde 2-3 x mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit dem Skalpell in sehr kleine Stücke von maximal 10 mm<sup>2</sup> (ca. 2 mm x 5 mm) geschnitten. Das Gewicht des isolierten Knorpels wurde für die

Berechnung der benötigten Verdaulösungen mit Pronase und Kollagenase gemessen. Pro Gramm Knorpel wurde bei beiden Enzymen ein Volumen von 10 ml verwendet. Es wurde eine entsprechende Menge Pronase für 0,2% v/v in Ham's F12-Medium, supplementiert mit 5% FCS und 1% Antibiotikum/Antimykotikum, gelöst. Die Lösung wurde mit einem nicht-proteinbindenden 0,2 µm-Filter sterilfiltriert. Die Knorpelstücke wurden in dieser Lösung in einem sterilen, abgedeckten Erlenmeyerkolben für 2 Stunden bei 37°C in einem Wasserbad unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der Knorpel erneut 3-5 x mit PBS gewaschen, wobei mindestens die Hälfte des Verdaulösungsvolumens verwendet wurde. Für den zweiten Verdauschritt wurden 2000 U/ 10 ml Kollagenase eingesetzt, was bei 370 U/ mg einer Kollagenasemenge von 5,4 mg Kollagenase pro 10 ml Verdaulösung entsprach. Die Kollagenase wurde ebenfalls in Ham's F12-Medium, supplementiert mit 5% FCS und 1% Antibiotikum/Antimykotikum, gelöst und steril filtriert. In der Kollagenase-Verdaulösung wurde der Knorpel für 16-18 h in einem sterilen, abgedeckten Erlenmeyerkolben bei 37°C in einem Wasserbad unter leichtem Schwenken inkubiert. Der verdaute Knorpel wurde am nächsten Tag über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 µl Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Chondrozytenmedium (CHM) aufgenommen und gelöst. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die CH in gewünschter Menge direkt auf das benötigte Zellkulturformat ausgesät, um weitere Passagierungen zu vermeiden und somit die Gefahr der Dedifferenzierung der CH zu minimieren. Die Kultivierung der CH erfolgte bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95% sowie einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

### **3.1.9 Kultivierung gesunder Chondrozyten**

Die kommerziell erworbenen normalen artikulären CH vom Knie (gesunde CH) wurden, wie in Abschnitt 3.1.6 für OB beschrieben, vorsichtig im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in 15 ml des kommerziellen Chondrozytenmediums (kCHM) aufgenommen. Die Verwendung des kCHM erfolgte, da nur dann vom Hersteller die Garantie für das erfolgreiche verwenden der erworbenen Zellen angegeben war. Laut Herstellerangaben befinden sich in einem Einfriergefäß mindestens  $7,5 \times 10^5$  Zellen, welche in Passage 2 eingefroren wurden. Die Zellen wurden direkt ausgesät, da laut Herstellerangaben ein Zentrifugationsschritt für die Zellen belastender wäre, als sie für ca. 24 h einer verdünnten DMSO-Konzentration auszusetzen. Die gesunden CH wurden bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgt nach 24 h, um das DMSO aus der Kultur zu entfernen. Anschließend

wurde das kCHM alle 2 bis 3 Tage gewechselt bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 90%. Danach wurden die Zellen entsprechend der OA-CH für Stimulierungsexperimente ausgesät.

### **3.1.10 Zellzahlbestimmung**

Für die Bestimmung der Zellzahl der OA-OB, OA-CH und gesunden CH wurde ein Teil der Zellen in PBS resuspendiert und kurz mit einem Tropfen Trypanblau inkubiert. Anschließend wurden die ungefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Gesamtzellmenge mittels des verwendeten Verdünnungsfaktors berechnet.

### **3.1.11 Kultivierung von Zellen auf Kammer-Objektträger**

Um die Adipokin-Expression der OB und CH *in vitro* zu überprüfen, wurden die jeweiligen Zellen auf 8- bzw. 4-Kammer-Objektträgern kultiviert. Dafür wurden die OB wie in 3.1.5 beschrieben von der ZKF abgelöst, anschließend gezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml bzw.  $2 \times 10^4$  Zellen/ml auf 8- bzw. 4-Kammer-Objektträgern ausgesät. Die CH wurden direkt nach der Isolation ausgezählt und in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml bzw.  $4 \times 10^4$  Zellen/ml auf 8- bzw. 4-Kammer-Objektträgern ausgesät. Die Zellen wurden bis zur gewünschten Konfluenz (80-90%) mit den entsprechenden Medien kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte 24 h nach Aussaat und danach alle 2 oder 3 Tage.

### **3.1.12 Stimulierungsexperimente**

#### **3.1.12.1 Stimulierung von OA-OB mit Adipokinen**

Für die Stimulierungsexperimente wurden OB in Passage 1 oder Passage 2 verwendet, um eine Dedifferenzierung der Zellen zu vermeiden. Die OB wurden wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben abgelöst, anschließend gezählt und in einer Konzentration von  $6 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung auf 12-Lochplatten in OBM ausgesät, was in der Regel einer Konfluenz von ca. 80% entsprach. Nach 24 h konnten die Zellen mit den Adipokinen Adiponektin, Resistin und Visfatin stimuliert werden. Eine unstimulierte Kontrolle wurde stets mitgeführt. Die Stimulierungsdauer betrug in der Regel 17 h, es wurde allerdings auch eine Zeitkinetik über 24, 48 und 72 h durchgeführt. Im Anschluss an die Stimulierungen wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) abgenommen und für die Messung verschiedener Faktoren mittels

*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend wurde eine Zelllyse zur Isolation von RNA durchgeführt.

### 3.1.12.2 Stimulierung von OA-OB mit Wnt-3a, DKK1 und SOST, Kostimulation mit Adipokinen

Die OB wurden wie in Abschnitt 3.1.12.1 beschrieben auf 12-Lochplatten ausgesät und nach 24 h mit Wnt-3a, einem Aktivator des Wnt-Signalwegs, bzw. mit DKK1 oder SOST, den Inhibitoren des Wnt-Signalwegs, stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Kostimulation mit den auf den Wnt-Signalweg einwirkenden Substanzen und den Adipokinen. Die Stimulierungsdauer betrug 24 h. In Tab. 15 sind die Komponenten und Bedingungen dieser Stimulierung aufgeführt. Nach 24 h wurde der ZKÜ abgenommen und für die Analyse verschiedener Faktoren mittels ELISA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Tab. 15 Schema der Stimulierung von OB mit Wnt-3a, DKK1 und SOST, sowie der Kostimulation mit den Adipokinen Adiponektin, Resistin und Visfatin über 24 h

Bezeichnung	Medium
Negativ-Kontrolle	OBM
BSA-Kontrolle	OBM + BSA (in gleicher Konzentration eingesetzt wie bei Wnt-3a, DKK1 und SOST als Trägerprotein enthalten → 50 µg BSA pro 1 µg Protein)
Wnt-3a	OBM + 20 ng/ml Wnt-3a
DKK1	OBM + 500 ng/ml DKK1
SOST	OBM + 500 ng/ml SOST
Wnt-3a + Adiponektin	OBM + 20 ng/ml Wnt-3a + 10 µg/ml Adiponektin
Wnt-3a + Resistin	OBM + 20 ng/ml Wnt-3a + 70 ng/ml Resistin
Wnt-3a + Visfatin	OBM + 20 ng/ml Wnt-3a + 100 ng/ml Visfatin
DKK1 + Adiponektin	OBM + 500 ng/ml DKK1 + 10 µg/ml Adiponektin
DKK1 + Resistin	OBM + 500 ng/ml DKK1 + 70 ng/ml Resistin
DKK1 + Visfatin	OBM + 500 ng/ml DKK1 + 100 ng/ml Visfatin
SOST + Adiponektin	OBM + 500 ng/ml SOST + 10 µg/ml Adiponektin
SOST + Resistin	OBM + 500 ng/ml SOST + 70 ng/ml Resistin
SOST + Visfatin	OBM + 500 ng/ml SOST + 100 ng/ml Visfatin
Adiponektin	OBM + 10 µg/ml Adiponektin
Resistin	OBM + 70 ng/ml Resistin
Visfatin	OBM + 100 ng/ml Visfatin

### 3.1.12.3 Stimulierung von OA-OB mit Adipokinen zur Analyse des Wnt-Signalwegs

Zur Analyse, ob die Adipokine einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg haben, wurden OB wie in Abschnitt 3.1.12.1 beschrieben auf 12-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die OB für 2, 4 und 6 h mit Adiponektin, Resistin und Visfatin stimuliert. Die Negativ-Kontrolle blieb unstimuliert, als Positiv-Kontrolle wurden OB mit 200 ng/ml Wnt-3a stimuliert. Jeweils nach 2, 4 und 6 h wurde die Stimulierung beendet, der ZKÜ entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend die RNA isoliert.

Desweiteren wurden OB mit 80% Konfluenz auf 25 cm<sup>2</sup>-ZKF ausgesät. Nach 24 h wurden die OB für 4 h mit Adiponektin, Resistin und Visfatin stimuliert. Die Negativ-Kontrolle blieb unstimuliert, als Positiv-Kontrolle wurden die OB mit 200 ng/ml Wnt-3a stimuliert. Nach 4 h wurde der ZKÜ abgenommen und für ELISA-Analysen von verschiedenen Faktoren bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend abgelöst. Die Zellpellets wurden für eine Kernextraktions-Analyse verwendet.

### 3.1.12.4 Stimulierung von OA-OB mit Adiponektin zur Analyse des p38 MAPK-Signalwegs

Für die Analyse des p38 MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) - Signalwegs wurden OB wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben abgelöst, gezählt und  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in OBM in 6-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die OB für 30 min mit serumfreiem OBM kultiviert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit Adiponektin in serumfreiem OBM für 10 min. Die Negativ-Kontrolle blieb unstimuliert. Nach 10 min wurde der ZKÜ entfernt, die OB mit PBS gewaschen und anschließend eine Proteinlyse mit 100 µl RIPA-Lysispuffer (siehe Tab. 4) für 30 min auf Eis durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology) nach Herstellerangaben gemessen und das Lysat bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.1.12.5 Stimulierung von OA-CH und gesunden CH

Für die Stimulation von primären OA-CH wurden die Zellen direkt nach der Isolation gezählt und auf 12-Lochplatten ausgesät ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung). Die Stimulierungen wurden somit direkt in Passage 0 durchgeführt. Die kommerziell erworbenen gesunden CH wurden laut Herstellerangaben in Passage 2 eingefroren und nach dem Auftauen zudem ein weiteres

Mal passagiert (siehe Abschnitt 3.1.5 äquivalent zu OB, Verwendung des kCHM). Somit wurden die gesunden CH in Passage 4 stimuliert. Es wurden ebenfalls 150.000 Zellen/Vertiefung auf 12-Lochplatten ausgesät. 24 bis 48 h nach Aussaat wurden sowohl die OA-CH als auch die gesunden CH für 24 h mit Visfatin, Wnt-3a oder Visfatin und Wnt-3a stimuliert. Das Stimulierungsschema ist in Tab. 16 dargestellt. Nach 24 h wurde der ZKÜ abgenommen und für eine Analyse verschiedener Faktoren mittels ELISA bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend wurde die RNA isoliert.

Tab. 16 Schema der Stimulierung von OA-CH sowie gesunde CH mit Visfatin, Wnt-3a, sowie der Kostimulation über 24 h

Bezeichnung	Medium
OACH Negativ-Kontrolle	CHM
OACH BSA-Kontrolle	CHM + BSA (in gleicher Konzentration eingesetzt wie bei Wnt-3a, als Trägerprotein enthalten $\rightarrow$ 50 $\mu\text{g}$ BSA pro 1 $\mu\text{g}$ Protein)
OACH Wnt-3a	CHM + 20 ng/ml Wnt-3a
OACH Visfatin	CHM + 100 ng/ml Visfatin
OACH Wnt-3a + Visfatin	CHM + 20 ng/ml Wnt-3a + 100 ng/ml Visfatin
Gesunde CH Negativ-Kontrolle	kCHM
Gesunde CH BSA-Kontrolle	kCHM + BSA (in gleicher Konzentration eingesetzt wie bei Wnt-3a als Trägerprotein enthalten $\rightarrow$ 50 $\mu\text{g}$ BSA pro 1 $\mu\text{g}$ Protein)
Gesunde CH Wnt-3a	kCHM + 20 ng/ml Wnt-3a
Gesunde CH Visfatin	kCHM + 100 ng/ml Visfatin
Gesunde CH Wnt-3a + Visfatin	kCHM + 20 ng/ml Wnt-3a + 100 ng/ml Visfatin

### 3.1.12.6 Stimulierung von CH (OA und gesund) mit Visfatin zur Analyse des Wnt-Signalwegs

Zur Prüfung, ob Visfatin einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg in CH hat, wurden OA-CH sowie gesunde CH wie in Abschnitt 3.1.12.5 beschrieben auf 12-Lochplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 2, 4 und 6 h mit Visfatin stimuliert. Die Negativ-Kontrolle blieb unstimuliert, als Positiv-Kontrolle wurde mit 200 ng/ml Wnt-3a stimuliert. Jeweils nach 2, 4 und 6 h wurde die Stimulierung beendet, der ZKÜ entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend die RNA isoliert.

Desweiteren wurden OA-CH und gesunden CH auf 25  $\text{cm}^2$ -ZKF ausgesät. Dafür wurden  $7,5 \times 10^5$  Zellen pro 25  $\text{cm}^2$ -ZKF ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für 4 h mit Visfatin stimuliert. Die Negativ-Kontrolle blieb unstimuliert, als Positiv-Kontrolle wurden je eine

Flasche mit OA-CH und gesunden CH mit 200 ng/ml Wnt-3a stimuliert. Nach 4 h wurde der ZKÜ abgenommen und für ELISA-Analysen bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend abgelöst. Die Zellpellets wurden für eine Kernextraktions-Analyse verwendet.

### 3.2 Mineralisierungs-Assay

Der Mineralisierungs-Assay wurde verwendet, um den Einfluss bestimmter Stimuli (z.B. Adipokine) auf die Matrix-Mineralisierung durch OA-OB zu vergleichen. OB in Passage 1 oder Passage 2 wurden auf 24-Lochplatten in OBM ausgesät ( $3 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung). Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit OBM, dem für die Mineralisierung Glycerolphosphat und Ascorbinsäure zugesetzt wurde (Mineralisierungs-Medium, siehe Tab. 4). Für die Untersuchung der Auswirkungen der Adipokine auf die Mineralisierungs-Aktivität der OB wurden die Zellen mit Adiponektin, Resistin und Visfatin (siehe Tab. 10) stimuliert. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur mit Mineralisierungs-Medium behandelt. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit Mineralisierungs-Medium und den entsprechenden Stimulanzen. Nach 14 bzw. 21 Tagen wurde der Mineralisierungs-Assay beendet. Die OB wurden hierzu 2 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10% Formaldehyd fixiert. Nach 10 min wurde das Formaldehyd gewechselt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit destilliertem Wasser ( $dH_2O$ ) erfolgte eine 2 min Inkubation mit einer Alizarin-Rot-Lösung zum Anfärben der gebildeten Matrix. Schließlich wurden die Vertiefungen mehrfach mit  $dH_2O$  gewaschen und anschließend bei RT im Dunkeln getrocknet. Bis zur Quantifizierung der Matrixfärbung konnten die 24-Lochplatten bei 4°C im Dunkeln bis zu einer Woche gelagert werden.

Für die Quantifizierung [107] wurde den gefärbten und getrockneten Vertiefungen 200  $\mu$ l 10%iger Essigsäure zugegeben. Die Platten wurden zum Lösen des Alizarin-Rot 3 min geschüttelt, anschließend wurde die Matrix vollständig vom Boden gelöst und mit dem Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde für 10 min bei 85°C inkubiert und dann sofort für 5 min auf Eis gestellt. Nach einer 15 min Zentrifugation bei 12.000 rpm (*rounds per minute*) wurden 125  $\mu$ l des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 50  $\mu$ l 10%iges Natriumhydroxid zum Neutralisieren hinzugegeben. Schließlich erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) am Nano-Drop bei 530 nm. Die OD gibt hierbei die Mineralisierungs-Aktivität an. Je höher die OD, umso mehr Alizarin-Rot wurde eingelagert und umso höher war somit die Mineralisierung.

### 3.3 Histologische und immunologische Methoden

#### 3.3.1 Entparaffinieren von Gewebeschnitten

Um die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte anfärben zu können, wurden diese zuerst entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden die Schnitte 3 x für je 5 min in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden EtOH-Reihe (100%, 96%, 70% und 50% EtOH) für je 3 min und abschließend für 3 min in dH<sub>2</sub>O rehydriert.

#### 3.3.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für eine histologische Übersicht über die Gewebestruktur wurden die Gewebe nacheinander für jeweils 10 min mit Hämatoxylin bzw. Eosin (H/E) gefärbt und anschließend jeweils mit Leitungswasser gespült. Danach wurden sie in einer aufsteigenden EtOH-Reihe (50%, 70%, 96% und 100% EtOH) für je 5 min inkubiert und 3 x 5 min in Xylol dehydriert. Die Gewebeschnitte wurden dann mit dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas zur späteren lichtmikroskopischen Auswertung bedeckt.

Das basische Hämatoxylin bewirkt hierbei eine Färbung von sauren bzw. basophilen Strukturen, insbesondere des Zellkerns mit der darin enthaltenen DNA sowie dem basophilem Zytoplasma. Das Spülen in Leitungswasser erhöht den pH-Wert der Färbelösung, was zu einem Umschlag der vorher rötlich-braunen Farbe in ein blau-violett führt. Das saure Eosin färbt alle basischen Strukturen rot bzw. rosa. Damit werden vor allem die im Zytoplasma befindlichen Proteine, Mitochondrien und Kollagen angefärbt. Durch die H/E-Färbung erscheinen die Zellkerne blau-violett, Erythrozyten und eosinophile Granula rot und das Zytoplasma rot/rosa.

#### 3.3.3 Masson-Trichrom-Färbung

Zur Differenzierung des Knochen-Knorpelgewebes der Osteophyten wurde eine modifizierte Masson-Trichrom-Färbung (*Trichrome Stain (Masson) Kit*, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte nach dem Entparaffinieren für 15 min mit Bieberich Scarlet-Acid-Fuchsin gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde für 2 min unter Leitungswasser ausgespült. Anschließend erfolgte zudem eine Entfärbung für 15 min mit Molybdätophosphorsäure/Wolframatophosphorsäure/dH<sub>2</sub>O-Lösung (1:1:2). Danach wurden die Schnitte für 20 min mit Anilin-Blau gefärbt. Nach einer Entfärbung mit 1% Essigsäure für

5 min wurden die Schnitte 2 min unter Leitungswasser gespült. In einer aufsteigenden EtOH-Reihe von je 2 x 2 min 96% und 100% EtOH und 2 x 2 min Inkubation in Xylol wurden die Gewebe dehydriert und dann mit Entellan und einem Deckglas bedeckt und zur weiteren Auswertung konserviert.

Bei dieser Färbung werden zuerst acidophile Strukturen wie das Zytoplasma, Muskeln und Kollagenfasern mit Bieberich Scarlet-Acid-Fuchsin rot gefärbt. Anschließend erfolgt eine Entfärbung mit Phosphosäuren, wodurch der Farbstoff aus Kollagenfasern entfernt wird, während Muskelzellen rot bleiben. Bei sehr dichten Gewebestrukturen kann es jedoch vorkommen, dass das Bieberich Scarlet-Acid-Fuchsin nicht vollständig aus den Kollagenfasern entfernt werden kann. Anschließend wird Kollagen blau gefärbt durch das Anilin-Blau. Es kann jedoch abhängig von der Dichte des Gewebes zu einer Rotfärbung in Teilen des trabäkulären Knochens kommen, was laut Cruber eine Färbung des Osteoids anzeigt und so eine Unterscheidung zum ausgereiften, blau gefärbten Knochen ermöglicht [108].

### **3.3.4 Toluidin-Blau-Färbung**

Zur Identifikation des Knorpels in den Osteophyten wurde eine Toluidin-Blau-Färbung der Gewebeschnitte durchgeführt. Dafür wurden diese nach dem Entparaffinieren für 10 min mit einer 0,01%igen Toluidin-Blau-Lösung gefärbt und anschließend kurz in dH<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden EtOH-Reihe von je 2 x 2 min 96% und 100% EtOH und 2 x 2 min Inkubation in Xylol dehydriert und dann mit Entellan und einem Deckglas bedeckt und zur weiteren Auswertung konserviert. Bei dieser Färbung kommt es zu einer metachromatischen violetten Färbung der Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knorpels, insbesondere der Proteoglykane.

### 3.3.5 TRAP-Färbung

Für die Identifikation von OK in den Osteophyten erfolgte eine Färbung der für OK typischen Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (*tartrat-resistant acid phosphatase*, TRAP) mit dem *Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit* (Sigma-Aldrich). Nach dem Entparaffinieren der Gewebeschnitte wurden diese für 2 h mit der auf 37°C erwärmten TRAP-Lösung (siehe Tab. 4) in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert, was zu einer Violettfärbung der OK führt. Anschließend wurden die Präparate mit dH<sub>2</sub>O gespült und eine Kernfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Nach erneutem Spülen in Leitungswasser wurden die Schnitte mit dem Eindeckmedium Aquatex und einem Deckglas bedeckt und zur weiteren Auswertung konserviert.

### 3.3.6 Immunhistochemie und Immunzytochemie

Mittels Immunhistochemie wurde die Lokalisation von Adipokinen sowie bestimmter Zellmarker im Gewebe untersucht. Die Gewebeschnitte der Osteophyten wurden wie unter 3.3.1 beschrieben entparaffiniert und in dH<sub>2</sub>O sowie PBS gewässert. Anschließend wurde eine Antigen-Demaskierung der Formaldehyd-fixierten Gewebe mit Proteinase K (5 min Proteinase K-Lösung, siehe Tab. 4, bei 37°C) oder durch Hitze (erhitzter Natrium-Citrat-Puffer, siehe Tab. 4, für 60 min bei 60°C) durchgeführt. Nach Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 10 min mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert um endogene Peroxidasen zu blocken. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte das Blocken von unspezifischen Bindungen mit 2% bzw. 5% BSA, 5% Magermilchpulver/PBS (MP/PBS) oder 10% Pferdeserum (PS) (siehe Tab. 9) für 30 min in einer feuchten Kammer bei RT. Anschließend wurde die Blockierungslösung abgenommen und die Schnitte dann mit dem primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C (siehe Tab. 6) inkubiert. Isotyp-übereinstimmende IgG-Seren aus Maus, Ziege oder Kaninchen (siehe Tab. 7) wurden parallel als Isotypkontrolle verwendet. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen oder Kreuzreaktivitäten des sekundären Antikörpers wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der statt der Zugabe des primären Antikörpers das Blockierungsserum auf dem Schnitt belassen wurde, jedoch alle weiteren Schritte parallel mitgeführt wurden. Zusätzlich wurde noch eine Reagenzkontrolle ohne Primär- und Sekundärantikörper mitgeführt. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen, danach erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Histofine (Nihirei Biosciences, Tab. 8). Nach erneutem Waschen mit PBS wurde das nach Herstellerangaben angesetzte

AEC-Substrat (Vector-Laboratoies) auf die Schnitte gegeben. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und die Reaktion nach spätestens 30 min mit dH<sub>2</sub>O gestoppt. Anschließend wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und die Präparate dann mit Aquatex und einem Deckglas eingedeckt und konserviert. Nach dem Trocknen wurden die Präparate fotografisch dokumentiert und die Objektträger anschließend im Dunkeln gelagert.

Um die Produktion der Adipokine auch *in vitro* nachzuweisen, wurde eine immunzytochemische Färbung der Zellen durchgeführt. Dafür wurden die auf Kammer-Objektträgern kultivierten Zellen mit 4% Formaldehyd für 30 min fixiert. Anschließend wurden sie direkt verwendet oder bei -20°C zwischengelagert. Die immunzytochemische Färbung erfolgte analog zur Immunhistochemie, allerdings war eine Antigen-Demaskierung hierbei nicht nötig. Desweiteren erfolgte das Blocken endogener Peroxidasen in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 min bei 4°C. Alle weiteren Schritte erfolgten entsprechend der Immunhistochemie.

### **3.3.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Zum Messen der Konzentrationen verschiedener Proteine (Tab. 11) wurden ELISA-Untersuchungen mit Patientenserum von AS- und PsA-Patienten, mit Zellkulturüberstand von OB und CH und mit Knorpel-Proteinlysaten nach Herstellerangaben durchgeführt. Je nach ELISA (siehe Tab. 11) wurden die Seren, Proteinlysate bzw. ZKÜ unverdünnt oder entsprechend der Herstellerangaben verdünnt eingesetzt.

### **3.3.8 SDS-PAGE und Western Blot**

#### **3.3.8.1 SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld. Dafür wurden Poly-Acrylamid-Gele mit Hilfe einer Gel-Gießkammer Mini Protean 3 (BioRad) hergestellt. Zuerst wurde ein 10- bzw. 12%iges Trenngel (siehe Tab. 4) gegossen, wobei die Glasplatte zu etwa 3/4 gefüllt und danach sofort mit Iso-Propanol überschichtet wurde, um eine klare Trennlinie zu erhalten. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Iso-Propanol entfernt und das 6%ige Sammelgel (siehe Tab. 4) darüber gegossen. In das Sammelgel wurde vor dem

Polymerisieren ein Gelkamm mit 10 oder 15 Taschen gebracht. Das fertige Gel wurde nach vollständigem Polymerisieren direkt verwendet oder über Nacht feucht bei 4°C gelagert.

Die Gele wurden in eine mit Laufpuffer gefüllten Mini Protean II Gel-Laufkammer (BioRad) eingespannt und mit den entsprechenden Proben beladen. Alle Proben waren zuvor entsprechend der Daten der Proteinbestimmung (*BioRad-Assay*, *BCA-Assay*) auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht und mit Gel-Ladepuffer (Sigma-Aldrich) versetzt worden. Als Kontrolle wurde zudem in einer Tasche 5 µl peqGold-Proteinmarker (peqlab Biotechnologie) aufgetragen. Der Gel-Lauf erfolgte für ca. 2 h bei 130 Volt bis zum Austreten der Banden des Ladepuffers aus dem Gel. Die Gele wurden anschließend aus der Laufkammer entnommen und von den Glasplatten getrennt und konnten nun mittels Silberfärbung gefärbt oder für einen Western Blot verwendet werden.

### 3.3.8.2 Western Blot und immunologische Detektion

Bei einem Western Blot werden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen und können anschließend immunologisch detektiert werden. Dafür wurde eine Immobilon-Transferrmembran (Millipore) für 10 s in Methanol und anschließend für 10 min in Transferpuffer (siehe Tab. 4) inkubiert. In Transferpuffer angefeuchtetes Blot-Papier wurde auf die Elektrodenplatte des Blot-Gerätes gelegt. Darauf wurde luftblasenfrei die angefeuchtete Membran aufgelegt und auf diese wiederum das Poly-Acrylamid-Gel mit den aufgetrennten Proteinen. Ein weiteres angefeuchtetes Blot-Papier wurde aufgelegt und das Transfersystem verschlossen. Der Blot erfolgte bei 120 mA und für 30 min pro Gel. Wurden bei einem Blot mehrere Gele gleichzeitig verwendet, wurde die Zeit entsprechend der Anzahl der Gele erhöht. Anschließend wurde das obere Blot-Papier entfernt und die Banden des Protein-Markers mit dem Ende einer Büroklammer auf die Membran übertragen.

Danach wurde die Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß gebracht und für 60 min bei Raumtemperatur mit Blocking-Reagenz (siehe Tab. 9) unter Rotation inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 6) über Nacht bei 4°C unter Rotation. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (siehe Tab. 4) für je 15 min wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (siehe Tab. 8) unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut 3 x mit TBST gewaschen und dann in Frischhaltefolie in eine Licht-undurchlässige Film-Kassette gelegt und mit einem Western-Blot Detektionssystem nach Herstellerangaben inkubiert. Ein Amersham Hyperfilm

(GE Healthcare) wurde aufgelegt und nach anfänglich 5 min Exposition mit dem Optimax X-Ray Film Prozessor (Protec Medizintechnik) entwickelt. Je nach Intensität der Banden wurde die Belichtungszeit des Films verringert oder verlängert bis die Banden klar erkennbar waren. Die Auswertung der Bandenintensität erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Programms Quantity One (BioRad).

### 3.3.8.3 Nachweis von $\beta$ -Catenin in Kernextrakten

Da es nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu einer Akkumulierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern kommt, wurden zum Proteinnachweis von  $\beta$ -Catenin mittels Western Blot Kernextrakte von OB und CH nach entsprechender Stimulierung hergestellt, um die mögliche Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu überprüfen. Zur Herstellung von Kernextrakten wurden die abgelösten Zellen für 40 min in kaltem PBS gewaschen, für 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert und dann in 400  $\mu$ l Lysepuffer A (siehe Tab. 4) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 s auf einem Vortexmischer durchmischt und für 10 s zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss je nach Menge des Ausgangsmaterials in 20-100  $\mu$ l Lysepuffer B (siehe Tab. 4) aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C zwischengelagert. Das Messen der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *BioRad Assay* (Bradford) nach Angaben des Herstellers.

Anschließend wurde eine SDS-PAGE mit den Kernextrakten durchgeführt. Dafür wurde ein 10%iges Poly-Acrylamid-Gel (siehe Tab. 4) verwendet und je nach Ausgangsmenge 1-2  $\mu$ g Kernextrakt versetzt mit Gel-Ladepuffer sowie der peqGold-Proteinmarker aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die Gele aus der Laufkammer entnommen, von den Glasplatten getrennt und anschließend entsprechend des peqGold-Proteinmarkers unterhalb der 70 kDa Bande horizontal geteilt. Der untere Teil des Gels wurde für eine Silberfärbung als Ladungskontrolle verwendet und dafür für 2 h in Fixierer (siehe Tab. 4) gelegt. Anschließend wurde das Gel 3 x 2 min in 50% EtOH geschwenkt und dann 1 min in Thiosulfat-Lösung (siehe Tab. 4) inkubiert. Nach dreimaligem Schwenken in dH<sub>2</sub>O für 2 min wurde das Gel für 20 min in Silbernitrat-Lösung (siehe Tab. 4) inkubiert und anschließend 2 x 20 s in dH<sub>2</sub>O gespült. Die Entwicklung des Gels erfolgte im Entwickler (siehe Tab. 4) bis zum Auftreten der Banden. Nach erneutem spülen in dH<sub>2</sub>O wurde das Gel für mindestens 10 min in Stop-Lösung (siehe

Tab. 4) inkubiert und nach erneutem Spülen in dH<sub>2</sub>O in Frischhaltefolie gelegt, fotografisch dokumentiert und bei 4°C gelagert.

Die obere Hälfte des Gels wurde für den Western Blot verwendet. Da hierbei nur halbe Gele verwendet wurden, verringerte sich die Blot-Zeit auf 15 min pro Gel bei 120 mA. Nach dem Blot wurde die Membran mit 5% BSA/ TBST geblockt. Als Primärantikörper wurde  $\beta$ -Catenin (Tab. 6) verwendet, Sekundärantikörper war entsprechend *Polyclonal goat Anti Rabbit Immunglobulins/HRP* (Tab. 8, Verdünnung 1:2000 in 5% BSA/ TBST) und als Detektionssystem wurde das *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 3.3.8.4 Analyse des p38 MAPK-Signalwegs

Zur Analyse des p38 MAPK-Signalwegs wurde die Phosphorylierung der p38 MAPK mittels West Blot untersucht. Dafür wurden für die SDS-PAGE 12% Poly-Acrylamid-Gele verwendet. Abhängig von der mittels *BCA-Assays* (Pierce Biotechnology) ermittelten Proteinkonzentration wurden die Proben mit Lämmli-Puffer (siehe Tab. 4) versetzt und in gleicher Konzentration auf je zwei Gele aufgetragen. SDS-PAGE und Western Blot wurden durchgeführt wie in 3.3.8.1 und 3.3.8.2 beschrieben. Für die immunologische Detektion wurden beide Membranen zuerst mit 5% MP/TBST geblockt. Anschließend wurde eine Membran mit dem Primärantikörper gegen gesamt-p38 MAPK und die andere gegen phospho-p38 MAPK (siehe Tab. 6) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde jeweils *Polyclonal goat Anti Rabbit Immunglobulins/HRP* (siehe Tab. 8, Verdünnung 1:2000 in 5% MP/TBST) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem *Super Signal West Dura Extended Duration Substrate Kit* (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Nach der Detektion von gesamt-p38 MAPK und phospho-p38 MAPK wurden die Membranen mehrfach mit TBST gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper gegen Cyclophilin B (siehe Tab. 6) als Ladungskontrolle inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde entsprechend *Polyclonal goat Anti Rabbit Immunglobulins/HRP* (siehe Tab. 8, Verdünnung 1:2000 in 5% MP/ TBST) verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben.

### 3.4 Entwicklung einer Osteophyten-Klassifizierung

Die Gewebeschnitte der Osteophyten wurden zur Differenzierung der verschiedenen Gewebekompartimente mit Masson-Trichrom (siehe Abschnitt 3.3.3), Toluidin-Blau (siehe Abschnitt 3.3.4) sowie immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ II (siehe Abschnitt 3.3.6 und Tab. 6) gefärbt. Mit Hilfe der Masson-Trichrom-Färbung konnte eine Differenzierung von Knochengewebe sowie Knorpel und einer darüber liegenden nicht-knorpeligen Bindegewebs-Deckschicht erzielt werden. Die Toluidin-Blau-Färbung sowie die immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ II diente der exakten Identifizierung der Knorpelareale.

Die gefärbten Osteophyten wurden mikroskopisch dokumentiert und die Größe der verschiedenen Gewebe-Areale sowie des gesamten Osteophyten wurde mit dem Analyse-Werkzeug der Leica Application Suite V4.0.0 Software ausgemessen. Anschließend wurden die prozentualen Anteile des Bindegewebes, des Knorpels und des Knochens, bestehend aus trabekulärem Knochen und Markräumen, errechnet (Abb. 11). In dem dargestellten Beispiel betrug die Knochenfläche  $3,6 \text{ mm}^2$  (Abb. 11 B), die Fläche des Bindegewebes betrug  $3,8 \text{ mm}^2$  (Abb. 11 C) und die Fläche des gesamten Osteophyten betrug  $9,6 \text{ mm}^2$  (Abb. 11 D), woraus sich eine Knorpelfläche von  $2,2 \text{ mm}^2$  ergab. Zur Differenzierung von Knorpel und Bindegewebe wurde neben der Masson-Trichrom-Färbung auch die Toluidin-Blau-Färbung bzw. die Kollagen Typ II Färbung verwendet. Dieser repräsentative Osteophyt hatte somit einen Knochenanteil von 37,5%, einen Knorpelanteil von 22,9% und einen Anteil von Bindegewebe von 39,6%.

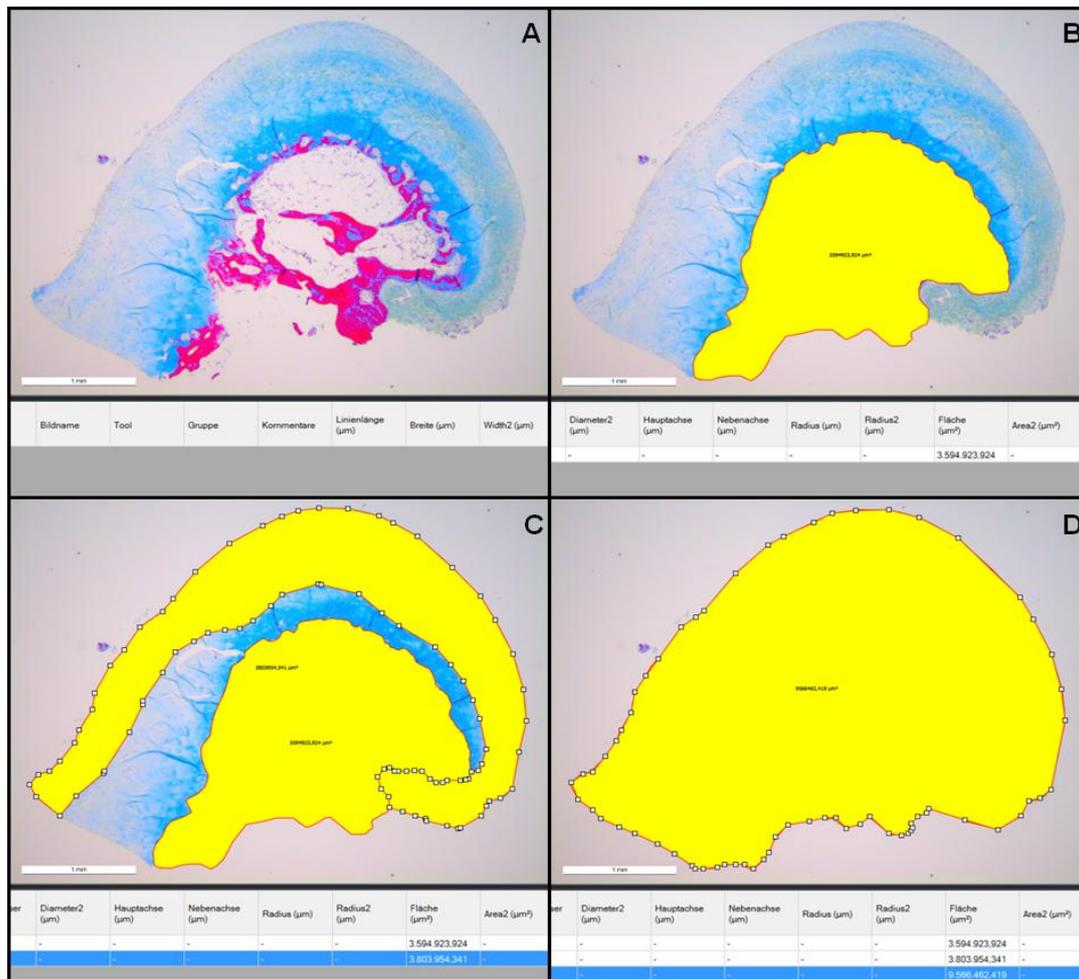


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahme eines Osteophyten in 25-facher Vergrößerung (A), Messung der Fläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) der verschiedenen Osteophyten-Gewebe: Knochen (B), Bindegewebe (C) und des gesamten Osteophyten (D). Die Messungen wurden mit Hilfe der Leica Application Suite V4.0.0-Software (Leica Microsystems) durchgeführt.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 RNA-Isolation

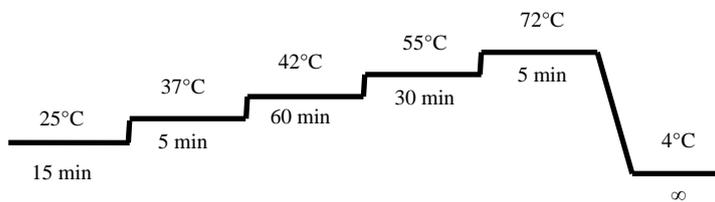
Die RNA-Isolation kultivierter Zellen wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) durchgeführt. Nach den entsprechenden Stimulierungsexperimenten und dem Waschen der Zellen mit PBS wurden jeweils 350  $\mu\text{l}$  RLT-Lysepuffer, versetzt mit 0,1%  $\beta$ -Mercapto-EtOH, für die Zelllyse zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend der Herstellerangaben des Kits durchgeführt. Zur Minimierung von DNA-Kontaminationen wurde ein DNase-Verdau von 30 min mit dem *RNase-free DNase Set* (Qiagen) durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nano-Drops bestimmt. Bis zum weiteren Gebrauch wurde die isolierte RNA bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.5.2 Reverse Transkription

Für die weiteren Untersuchungen der RNA mittels PCR musste diese in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurden abhängig von der RNA-Konzentration 300-1000 ng RNA eingesetzt. Bis zu 1000 ng RNA (max. 14,5 µl, auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O) wurden zusammen mit 0,5 µl *Random primer* p(DN)6 (2 µg/µl) für 2 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der folgende Ansatz zugefügt:

5 x AMV-Puffer	5 µl
PCR Nucleotid-Mix (10 mM)	2,5 µl
AMV Reverse Transkriptase (10 U/µl)	2 µl
RNase Inhibitor (RNasin) (40 U/µl)	0,5 µl

Die reverse Transkription lief unter folgendem Programm im PCR-Cycler (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) ab:



Bis zum weiteren Gebrauch wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.5.3 Real-Time-PCR

Zur Quantifizierung der in cDNA umgeschriebenen RNA wurde eine semi-quantitative *Real-Time-PCR* mittels eines *Light Cyclers* (Roche Diagnostics) unter Verwendung des *ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix* (Thermo Scientific) durchgeführt. Der sich in der Lösung befindliche, schwach fluoreszierende Farbstoff *SYBR Green* bindet an die neu entstehenden DNA-Doppelstränge, wodurch die Fluoreszenz verstärkt wird. Nach jeder Elongationsphase wird die Fluoreszenz in der Kapillare gemessen. Je mehr Zyklen der PCR durchlaufen sind, umso mehr doppelsträngiges PCR-Produkt liegt vor, wodurch auch die Fluoreszenz proportional dazu zunimmt. Für eine relative Quantifizierung wurde in einem parallelen Ansatz ein Referenzgen (hier die 18s-Untereinheit der ribosomalen RNA) gemessen.

Die Primer-Spezifität wurde in einer Schmelzkurvenanalyse überprüft, da *SYBR Green* unabhängig der Sequenz an alle DNA-Doppelstränge binden kann. Um unspezifische

Produkte auszuschließen, wurde die Temperatur kontinuierlich von 50 bis 99°C erhöht und die DNA-Doppelstränge somit aufgeschmolzen. Auf diese Weise wird der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt und die gemessene Fluoreszenz nimmt ab. Das gewünschte PCR-Produkt besitzt eine spezifische Schmelztemperatur, welche sich von der Schmelztemperatur von Primer-Dimeren und anderen unspezifischen PCR-Produkten unterscheidet. Treten bei der Schmelzkurvenanalyse mehrere Spitzen auf, so liegen in der Reaktion unspezifische Produkte vor und eine Quantifizierung kann nicht zuverlässig durchgeführt werden. Um dies auszuschließen, müssen die Bedingungen der *Real-Time-PCR* vor der Quantifizierung für alle verwendeten Primer-Paare (siehe Tab. 12) hinsichtlich Anlagerungs-Temperaturen ( $T_a$ ) und  $MgCl_2$ -Konzentration optimiert werden. Zudem sollte ein Referenzgen gewählt werden, das ein möglichst breites Spektrum an optimalen  $T_a$  aufweist, damit es parallel zu den zu testenden Genen analysiert werden kann. Da dies für die gewählte Gensequenz der 18s-Untereinheit der ribosomalen RNA der Fall ist, wurde dieses als Referenzgen verwendet. Für die Effizienz-Analyse im Light Cycler wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) zur Ermittlung einer Standardkurve verwendet und dabei verschiedene  $MgCl_2$ -Konzentrationen (z.B. 3 mM, 4 mM, 5 mM) und  $T_a$  getestet. Die Amplifikation erfolgte nach Herstellerangaben (Roche). Mit Hilfe der Light Cycler Software konnte aus der Standardkurve eine Steigung (*slope*; lg der Konzentration vs. ct-Wert) ermittelt werden, mit deren Hilfe die Effizienz der PCR errechnet werden konnte. Dafür wurde die Formel:  $Effizienz = 10^{(-1/slope)}$  verwendet. Da unter optimalen PCR-Bedingungen eine Verdopplung des PCR-Produktes pro Zyklus erfolgt, was einer Effizienz von 2 entspricht, sollte die Effizienz bei  $2 \pm 0,05$  liegen um optimale Bedingungen für die relative Quantifizierung zu erhalten. Man geht erst ab einer Änderung der Genexpression um mindestens den Faktor 2 von tatsächlichen, reproduzierbaren Veränderungen aus. Dies würde einer Verdopplung bzw. Halbierung der Genexpression entsprechen. Alle Werte zwischen 0,5 (Halbierung) und 2 (Verdopplung) könnten auch aus Schwankungen der experimentellen Methode resultieren.

Der Real-Time-PCR-Ansatz pro Kapillare setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

cDNA	2 $\mu$ l
<i>ABsolute QPCR SYBR Green Capillary Mix</i>	10 $\mu$ l
Primer forward	0,5 $\mu$ l
Primer reverse	0,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (3,0 mM - 6 mM)	x $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O auf 20 $\mu$ l auffüllen	

Nachdem die Ansätze in die Kapillaren pipettiert und diese verschlossen wurden, wurden sie in das LC-Karussell überführt und in der LC Carousel Centrifuge 2.0 zentrifugiert. Anschließend wurde das LC-Karussell in den *Light Cycler* transferiert und das PCR-Programm gestartet:

95°C	15 min	Initiale Denaturierung
95°C	15 sec	Denaturierung
x °C	25 sec	Anlagerung (35-55 Zyklen)
72°C	30 sec	Elongation/Fluoreszenz-Messung

Nach Beendigung des PCR-Programms wurde die Schmelzkurve durch den kontinuierlichen Temperaturanstieg von 50°C auf 99°C (0,1°C/s) ermittelt. Nach dem Abkühlen auf 40°C wurde der Lauf beendet.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Student-t-Verteilung bzw. dem nichtparametrischen Mann-Whitney U Test mit den Programmen Microsoft Excel und Graph Pad Prism mit einer statistischen Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$ .

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Klassifizierung der Osteophyten**

#### **4.1.1 Makroskopische Analyse**

Ein System zur Zuordnung der verschiedenen Osteophyten wurde entwickelt, um humane Osteophyten entsprechend ihrer Charakteristika einzuteilen. Dafür wurden alle Osteophyten je eines Kniegelenks von 12 OA-Patienten nach Kniegelenks-Ersatzoperation zuerst bezüglich ihrer Größe und Morphologie und nachfolgend anhand histologischer Eigenschaften untersucht. Die Osteophyten waren an verschiedenen Seiten der Gelenkränder lokalisiert und unterschieden sich zum Teil stark in ihrer Größe und Form (Abb. 7 A und B). Das Alter und das Geschlecht der Patienten zeigte keine Korrelation mit der Anzahl vorhandener Osteophyten. Solange der intraartikuläre Raum nicht als begrenzender Faktor wirkte, konnten die Osteophyten größer werden als in räumlich beengten Randbereichen des Gelenks. War der intraartikuläre Raum begrenzt, so blieben sie kleiner und wiesen eine dichtere Knochenstruktur auf. Daher konnte die Größe der Osteophyten nicht einem bestimmten Typus von Osteophyten zugeordnet werden.

Somit ermöglichte die makroskopische Analyse keine klare Einteilung der Osteophyten in verschiedene Typen. Aufgrund dessen wurden für die Klassifizierung der Osteophyten ausschließlich histologische Merkmale verwendet.

#### **4.1.2 Histologische Analyse**

##### **4.1.2.1 Auswahl geeigneter Färbemethoden**

H/E bzw. Masson-Trichrom gefärbte Serienschnitte wurden verwendet, um die verschiedenen Gewebe der Osteophyten zu unterscheiden. Zusätzlich wurde eine Toluidin-Blau-Färbung und eine immunhistochemische Färbung für Kollagen Typ II durchgeführt, um lockeres Bindegewebe histologisch vom Knorpel zu unterscheiden.

Die Osteophyten konnten in drei Kompartimente unterteilt werden: Die Kappe bestehend aus lockerem Bindegewebe und dem Knorpel in noch nicht verknöcherten Osteophyten sowie zusätzlich das knöcherne Areal bestehend aus trabekulärem Knochen mit den Markräumen in Osteophyten mit Knochenanteil. An den Übergangszonen von Knorpel und Knochen konnten

oft Umbauzonen gefunden werden, die OB, OK und gelegentlich Blutgefäße enthielten. Bei einigen Osteophyten war jedoch wenig Knorpel vorhanden, so dass in diesen Fällen das Bindegewebe direkt an den Knochen anschloss.

Die Differenzierung zwischen den verschiedenen Geweben war unter Verwendung der H/E- sowie der Masson-Trichrome-Färbung möglich. Mit der H/E-Färbung konnten der Knorpel mit der Bindegewebes-Kappe, die Umbauzonen und der Knochen differenziert werden (Abb. 12 A, C). Die Masson-Trichrom-Färbung ermöglichte zudem eine Unterscheidung in ausgereiften Knochen (blau) und Knochen, der noch osteoidartige Strukturen aufwies (rot, siehe Abschnitt 3.3.3). Die Bindegewebs-Kappe konnte anhand der Strukturunterschiede vom Knorpel klar abgegrenzt werden. Zudem stellte sich die Blau-Färbung des nicht-knorpeligen Bindegewebes durch die Masson-Trichrom-Färbung in den meisten Fällen heller als die des Knorpels dar. Wegen der einfacheren Differenzierung von Knorpel und Bindegewebs-Kappe in der Masson-Trichrom-Färbung im Vergleich zur H/E-Färbung wurde für die Klassifizierung der Osteophyten die Masson-Trichrom-Färbung verwendet.

Zusätzlich wurde zur exakteren Differenzierung von Knorpel und Bindegewebs-Kappe eine Toluidin-Blau-Färbung zur Darstellung der Proteoglykane des Knorpels bzw. eine immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ II durchgeführt. Die violette Färbung des Knorpels, die mit Toluidin-Blau erzielt wurde, reflektierte die Darstellung der Gewebe mittels Kollagen Typ II-Färbung gut, jedoch war die Knorpeldifferenzierung nach immunhistochemischer Färbung gegen Kollagen Typ II deutlicher. Für die Klassifizierung der Osteophyten wurden deshalb die Masson-Trichrom-Färbung und die immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ II verwendet, da mit diesen Färbungen die verschiedenen Gewebe am besten zu differenzieren waren und für eine Klassifizierung der Osteophyten ausreichten.

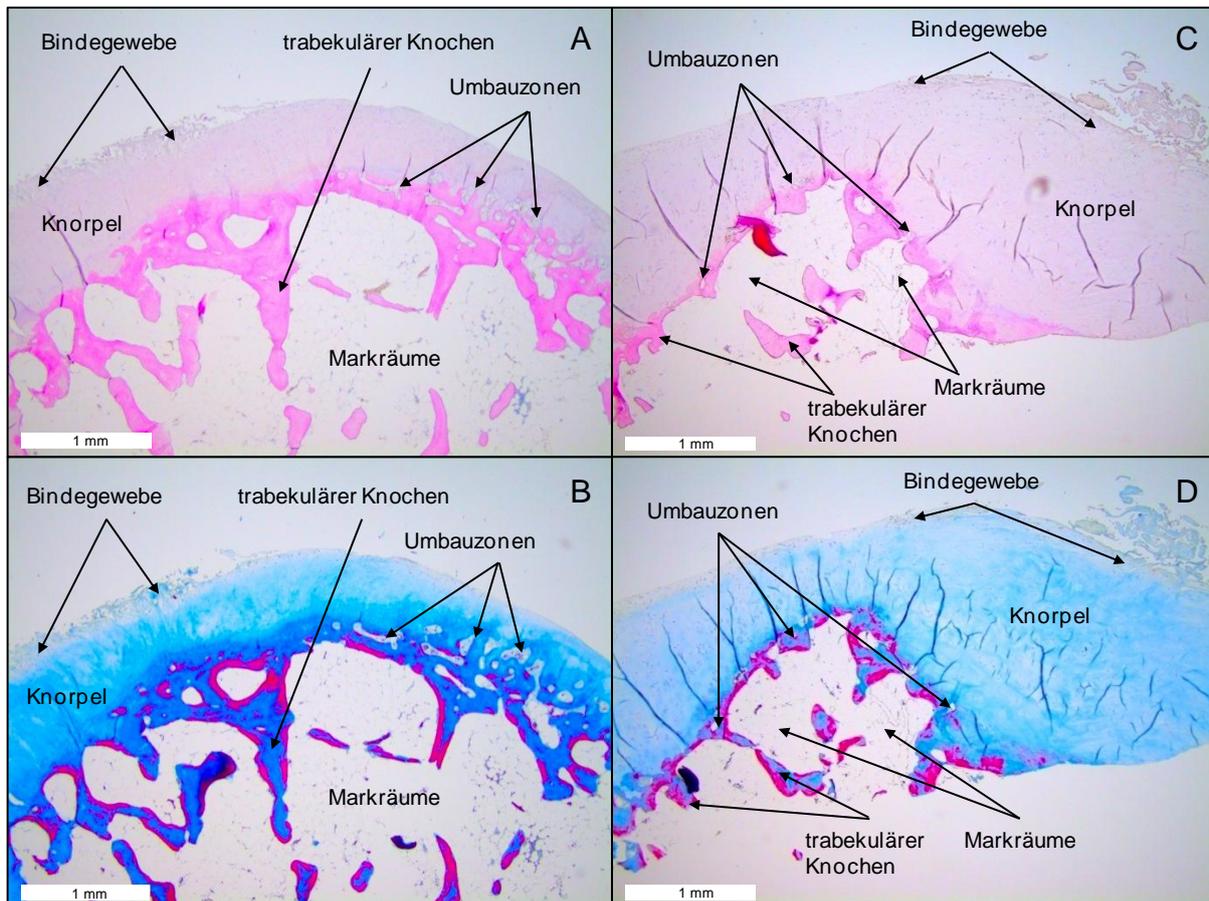


Abb. 12: Darstellung der in Osteophyten vorhandenen Gewebe am Beispiel von zwei verschiedenen Osteophyten gefärbt mit H/E (A, C) und Masson-Trichrom (B, D). Mittels H/E-Färbung ist der Knorpel mit Bindegewebs-Kappe in blass-rosa und der trabekuläre Knochen in pink sowie die Markräume mit den Knochenmarkszellen abgrenzbar. Mit der Masson-Trichrom-Färbung erscheinen die Bindegewebs-Kappe in blassem blau, der Knorpel hellblau und der trabekuläre Knochen dunkelblau bzw. dichte Areale stellen sich rot dar.

#### 4.1.2.2 Etablierung einer Osteophyten-Klassifizierung

Alle isolierten Osteophyten wurden in Serienschnitten mit H/E, Masson-Trichrom, Toluidin-Blau und immunhistochemisch gegen Kollagen Typ II gefärbt und der gesamte Osteophyt, die Bindegewebs-Kappe sowie das Knochenkompartiment separat mittels der Leica Application Suite V4.0.0 Software ausgemessen (siehe Abb. 11). Der prozentuale Anteil an Bindegewebe, Knorpel und Knochenkompartiment wurde in % des gesamten Osteophyten berechnet. Die histologische Analyse ermöglichte eine Klassifizierung der Osteophyten in 4 Typen:

Typ A Osteophyten: Die Osteophyten bestehen ausschließlich aus Knorpel und lockerem Bindegewebe. Eine Verknöcherung ist nicht erkennbar (Beispiel siehe Abb. 13). Die Osteophyten des Typs A repräsentieren den einfachsten Osteophytenotyp. Nur wenige

Osteophyten des Typs A waren in den untersuchten OA-Gelenken nach Kniegelenkersatzoperation vorhanden. Lediglich 5,2% aller Osteophyten waren dem Typ A zuzuordnen.

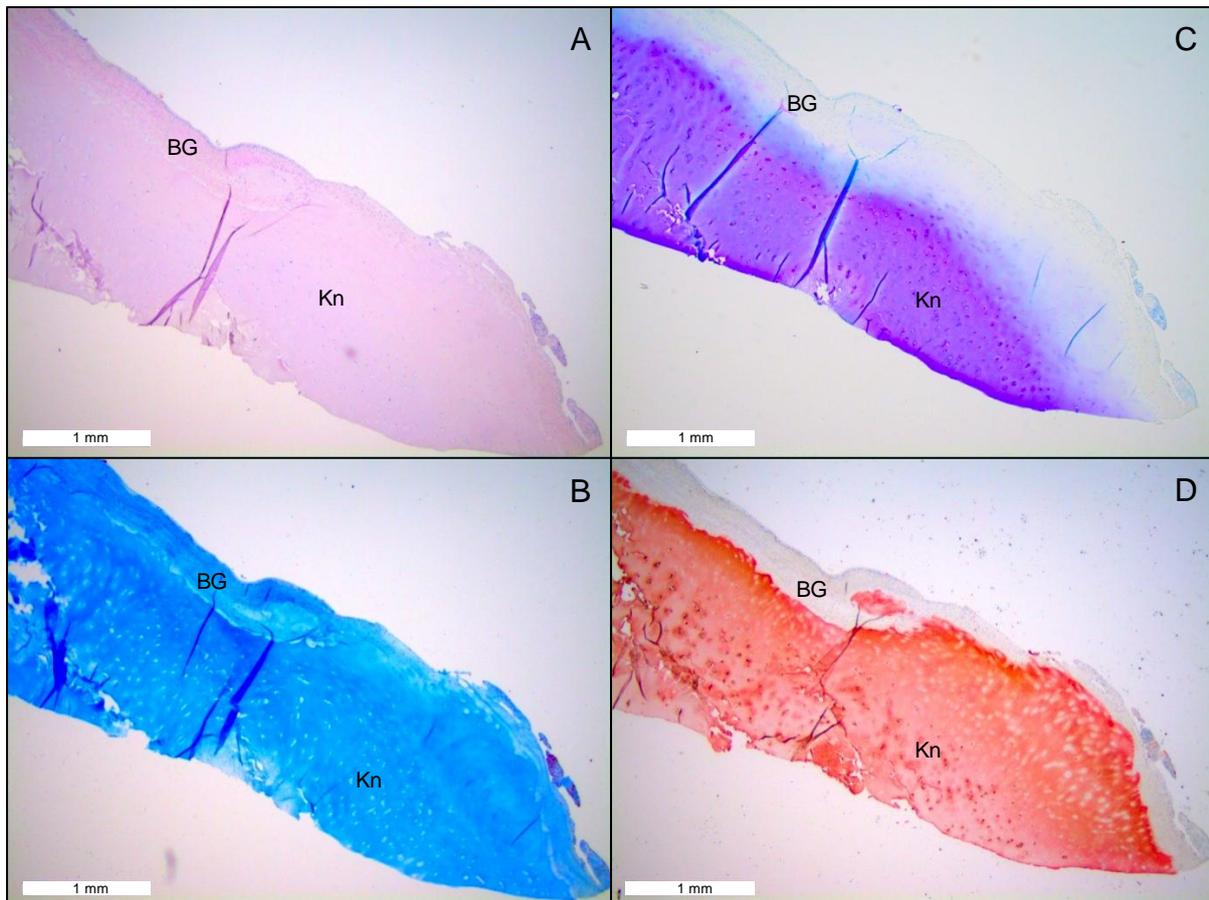


Abb. 13: Typ A Osteophyt in 25-facher Vergrößerung. Der Osteophyt wurde histochemisch mit H/E (A), Masson-Trichrom (B), Toluidin-Blau (C) und immunhistochemisch auf Kollagen Typ II (D) gefärbt. Keine Knochenanteile sind erkennbar, der Osteophyt setzt sich in diesem Beispiel aus 82,3% Knorpel und 17,7% lockerem Bindegewebe zusammen. Die immunhistochemische Färbung gegen Kollagen Typ II ermöglicht die klare Abgrenzung des Knorpels von der Bindegewebs-Kappe. Mit der Toluidin-Blau-Färbung konnte der Knorpel ebenfalls dargestellt werden, allerdings ist nicht der gesamte Knorpelbereich positiv für die angefärbten Proteoglykane.

Abkürzungen: BG: Bindegewebe; Kn: Knorpel

Typ B Osteophyten: Diese Osteophyten bestehen vorwiegend aus einer Bindegewebs-Kappe und Knorpel. Zusätzlich weisen sie kleine knöcherne Areale auf, welche jedoch weniger als 20% des gesamten Osteophyten ausmachen (Beispiel siehe Abb. 14). Genauso wie Typ A Osteophyten lagen nur wenige Osteophyten des Typs B in den untersuchten Gelenken von OA-Patienten vor. Nur 4,4% aller untersuchten Osteophyten waren dem Typ B zuzuordnen.

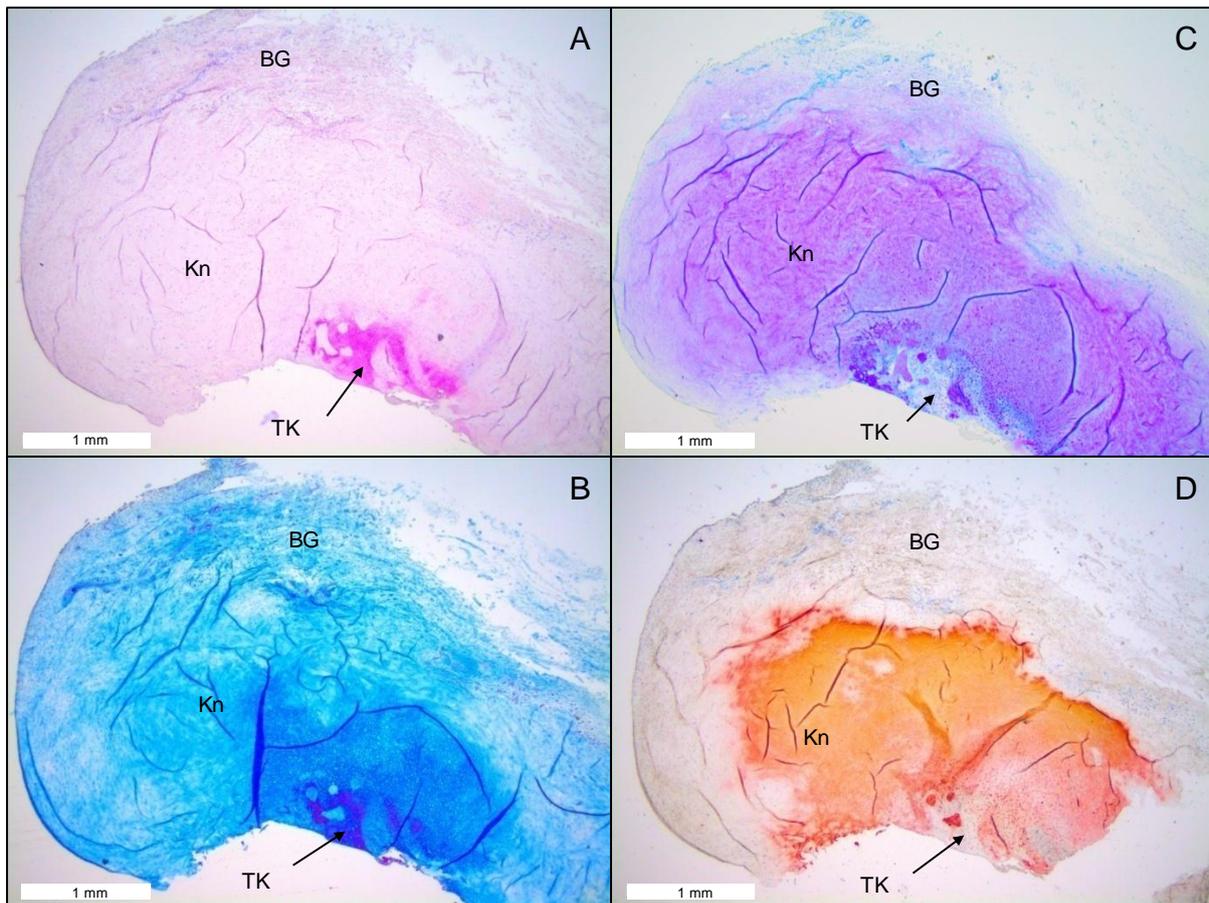


Abb. 14: Typ B Osteophyt in 25-facher Vergrößerung. Der Osteophyt wurde histochemisch mit H/E (A), Masson-Trichrom (B), Toluidin-Blau (C) und immunhistochemisch auf Kollagen Typ II (D) gefärbt. Der Osteophyt besteht in diesem Beispiel zu 58,5% aus lockerem Bindegewebe, 40,7% aus Knorpel und zu weniger als 20% aus Knochen (0,8%). Markräume sind nicht erkennbar.

Abkürzungen: BG: Bindegewebe; Kn: Knorpel; TK: trabekulärer Knochen

Die meisten der vorhandenen Osteophyten wiesen einen Knochenanteil von mehr als 20% des gesamten Osteophyten auf. Diese Osteophyten wurden in zwei weitere Gruppen unterteilt und als Typ C und Typ D bezeichnet. Besonders für die Unterscheidung der Osteophyten des Typs C und D war zur Zuordnung der Osteophyten die immunhistochemische Färbung auf Kollagen Typ II bzw. die Toluidin-Blau-Färbung notwendig, um den Knorpel vom lockeren Bindegewebe abzugrenzen.

Typ C Osteophyten: Typ C Osteophyten machten 26,3% aller untersuchten Osteophyten aus. Der lockere Bindegewebsanteil beträgt bei diesen Osteophyten mehr als 10% des gesamten Osteophyten. Zudem enthalten diese Osteophyten Knorpel und große knöcherne Areale, die mehr als 20% des gesamten Osteophyten ausmachen (Beispiel siehe Abb. 15).

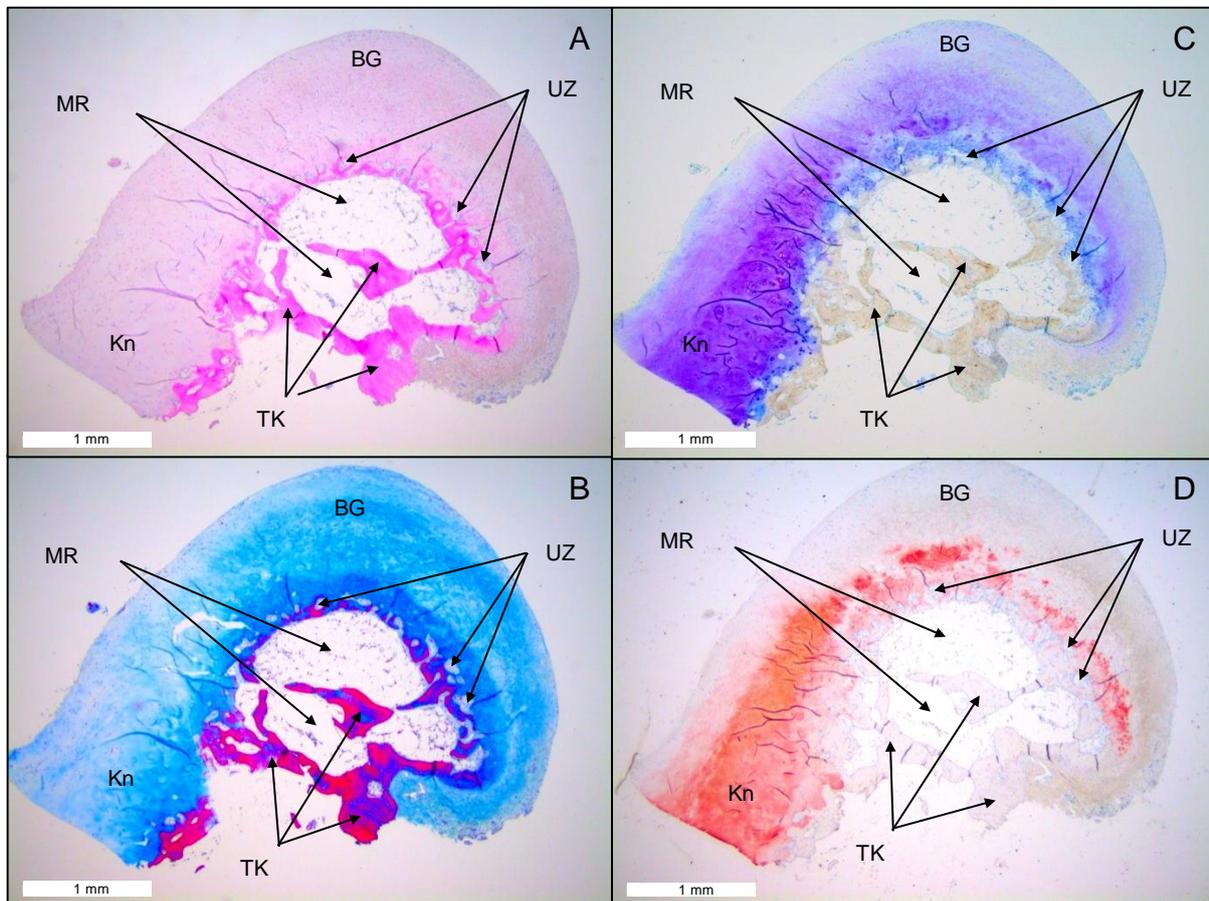


Abb. 15: Typ C Osteophyt in 25-facher Vergrößerung. Der Osteophyt wurde histochemisch mit H/E (A), Masson-Trichrom (B), Toluidin-Blau (C) und immunhistochemisch auf Kollagen Typ II (D) gefärbt. Wie charakteristisch für Typ C Osteophyten, besteht auch dieser Osteophyt aus einem großen Anteil an lockerem Bindegewebe, welcher mehr als 10% des gesamten Osteophyten ausmacht (39,6% in diesem Beispiel). Desweiteren enthält der dargestellte Osteophyt 22,9% Knorpel und einen großen knöchernen Anteil mit trabekulärem Knochen, Markräumen und vielen Umbauzonen an der Grenze zum Knorpel (37,5%).

Abkürzungen: BG: Bindegewebe; Kn: Knorpel; MR: Markräume; TK: trabekulärer Knochen; UZ: Umbauzonen

**Typ D Osteophyten:** Die am häufigsten vorhandenen Osteophyten der untersuchten Gelenke gehörten zum Typ D (64,1% aller untersuchten Osteophyten). Diese Osteophyten enthielten einen Bindegewebsanteil von weniger als 10% des gesamten Osteophyten, einen Knorpelanteil sowie knöcherne Areale, die mehr als 20% des gesamten Osteophyten ausmachen (Beispiel siehe Abb. 16).

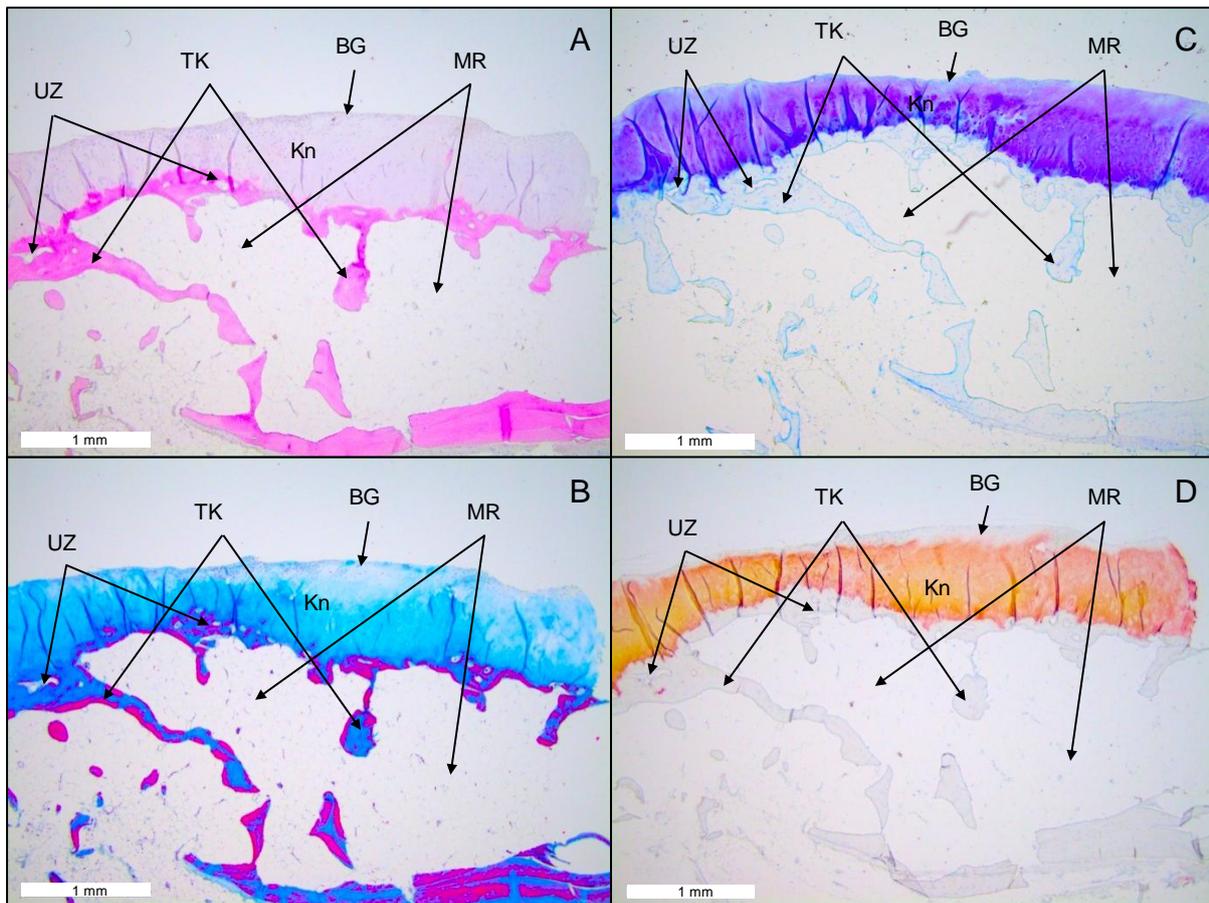


Abb. 16: Typ D Osteophyt in 25-facher Vergrößerung. Der Osteophyt wurde histochemisch mit H/E (A), Masson-Trichrom (B), Toluidin-Blau (C) und immunhistochemisch auf Kollagen Typ II (D) gefärbt. Der gezeigte Osteophyt enthält einen Knorpelanteil von 17% mit einer kleinen Bindegewebs-Kappe (weniger als 10% des gesamten Osteophyten, 3,4% in diesem Beispiel) und einem knöchernen Anteil mit Umbauzonen, trabekulärem Knochen und den darin enthaltenen Markräumen (79,6% in diesem Beispiel).

Abkürzungen: BG: Bindegewebe; Kn: Knorpel; MR: Markräume; TK: trabekulärer Knochen; UZ: Umbauzonen

## 4.2 Charakterisierung der Osteophyten

Für die Charakterisierung der Osteophyten wurden Färbungen zum Nachweis von OB, OK, Knorpel mit CH und verschiedenen Immunzellen durchgeführt. Zum Nachweis der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierzu wurden Serienschnitte der entkalkten, in Paraffin eingebetteten Osteophyten aller vier Typen verwendet. Neben den Adipokinen wurden folgende Marker zum Nachweis unterschiedlicher Zelltypen verwendet: OK wurden mittels TRAP-Färbung identifiziert. Immunhistochemisch wurden OB durch Färbung der alkalischen Phosphatase (ALP) nachgewiesen. Blutgefäße wurden durch Kollagen Typ IV-Färbung dargestellt. Immunzellen wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD3 (T-Zellen), CD20 (B-Zellen (außer

Plasmazellen)) und CD16 (Makrophagen, Monozyten, Neutrophile, natürliche Killerzellen) angefärbt. Zusätzlich erfolgte der immunhistochemische Nachweis des Wnt-Antagonisten DKK1 in den OA-Osteophyten.

#### 4.2.1 Allgemeine Charakterisierung

Bei Osteophyten des Typs A konnten keine OB oder OK nachgewiesen werden. Wie unter 4.1.2.2 erwähnt, sind Umbauzonen bei diesen Osteophyten nicht vorhanden. Blutgefäße konnten bei zwei von drei analysierten Osteophyten des Typs A im lockeren Bindegewebe nachgewiesen werden (Abb. 17 A), ebenso wie CD16 positive Zellen in allen drei Osteophyten (Abb. 17 B). T-Zellen konnten vereinzelt in einem der drei untersuchten Osteophyten nachgewiesen werden, B-Zellen waren in keinem der untersuchten Osteophyten detektierbar.

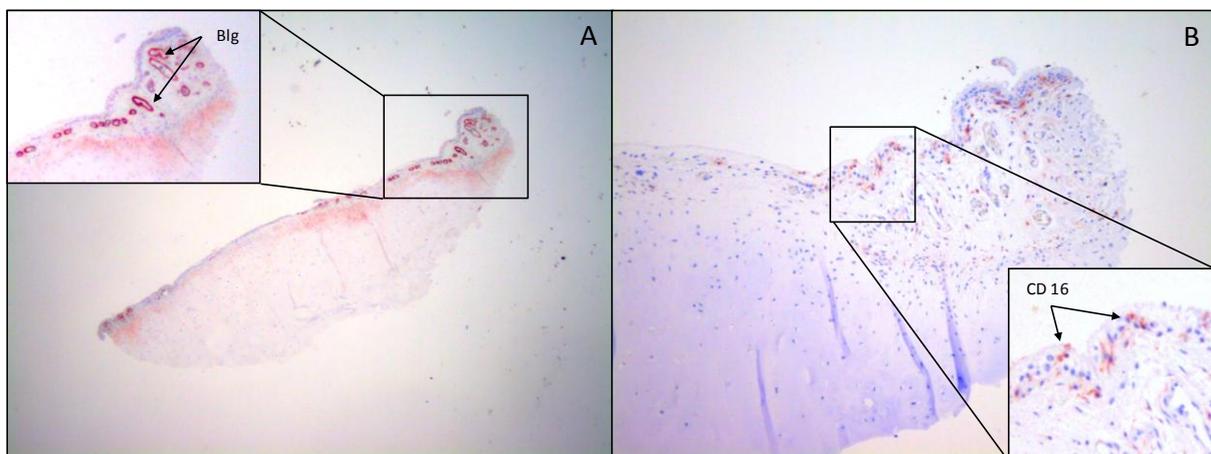


Abb. 17: Osteophyt des Typs A in 25-facher Vergrößerung mit immunhistochemisch durch Kollagen Typ IV angefärbten Blutgefäßen (Blg) im lockeren Bindegewebe (A) und in 100-facher Vergrößerung mit CD16 positiven Zellen in der äußeren Zellschicht des lockeren Bindegewebes (B).

Im Gegensatz dazu waren in 100% der Osteophyten des Typ B, welche bereits einen kleinen Knochenanteil aufwiesen, OB und OK in den Umbauzonen nachweisbar. Auch Blutgefäße konnten im Bindegewebe oder in den Umbauzonen aller untersuchten Osteophyten des Typs B detektiert werden. Immunzellen fanden sich bei diesen Osteophyten des Typs B insbesondere in Form von CD16 positiven Zellen (Abb. 18 B, C), welche bei allen analysierten Geweben dieses Typs nachweisbar waren. Die CD16 positiven Zellen waren teilweise innerhalb der Markräume sowie im lockeren Bindegewebe lokalisiert. B-Zellen konnten vereinzelt in zwei der drei analysierten Gewebe detektiert werden, bei einem davon

innerhalb eines Blutgefäßes. T-Zellen konnten nur in einem der drei analysierten Gewebe im Bereich der Markräume detektiert werden (Abb. 18 A).

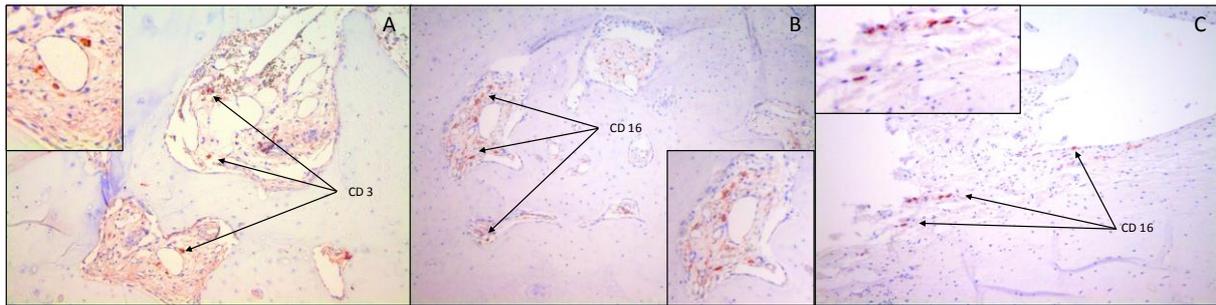


Abb. 18: Typ B Osteophyt in 100-facher Vergrößerung mit CD3 positiven T-Zellen in den Markräumen des Osteophyten (A) und CD16 positive Zellen in den Markräumen (B) und im lockeren Bindegewebe des Osteophyten (C).

Osteophyten des Typs C enthielten bereits einen großen Knochenanteil und wiesen somit deutliche Umbauzonen mit OB und OK auf. Kollagen Typ IV positive Blutgefäße waren bei diesen Osteophyten ebenfalls in allen analysierten Osteophyten detektierbar. CD3 positive T-Zellen waren nur in einem der vier analysierten Osteophyten in den Markräumen nachweisbar (Abb. 19 A), CD16 und CD20 positive Zellen konnten in allen analysierten Osteophyten in den Markräumen oder in Blutgefäßen gefunden werden (Abb. 19 B, C).

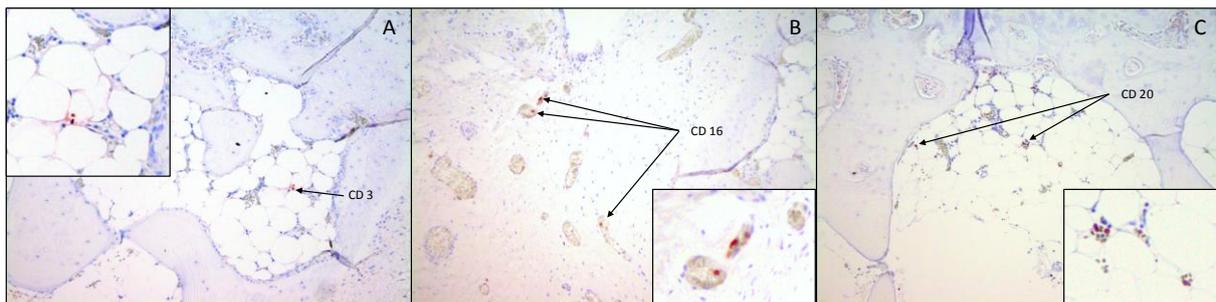


Abb. 19: Osteophyt des Typ C in 100-facher Vergrößerung mit CD3 positiven T-Zellen in den Markräumen (A), CD16 positiven Zellen innerhalb von Blutgefäßen (B) und CD20 positiven Zellen innerhalb von Markräumen des dargestellten Typ C Osteophyten (C).

Bei Osteophyten des Typs D waren ebenfalls bei allen analysierten Geweben Umbauzonen mit OB und OK nachweisbar, ebenso wie Kollagen Typ IV positive Blutgefäße in den Arealen des lockeren Bindegewebes, der Umbauzonen und in den Markräumen (Abb. 20 A). CD16 positive Zellen konnten in allen analysierten Typ D Osteophyten in Markräumen und im lockeren Bindegewebe detektiert werden (Abb. 20 B). CD20 positive B-Zellen waren in drei der vier analysierten Osteophyten in den Markräumen nachweisbar (Abb. 20 C), CD3 positive T-Zellen jedoch nur in einem der vier Gewebe. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tab. 17 dargestellt.

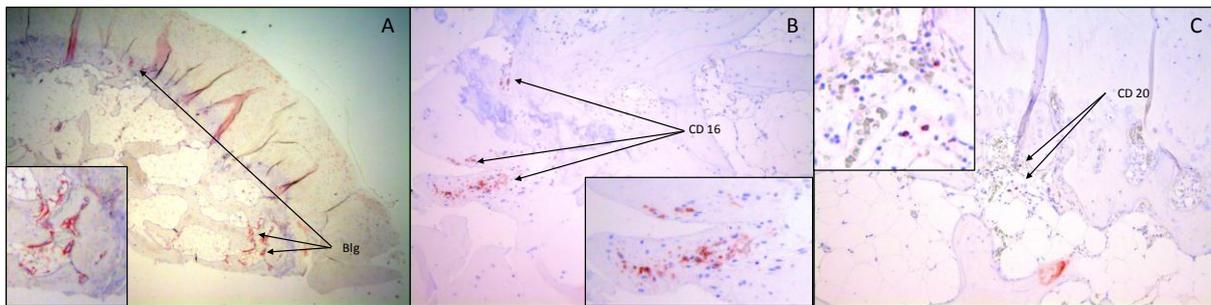


Abb. 20: Typ D Osteophyt in 25-facher Vergrößerung mit Kollagen Typ IV positiven Blutgefäßen (Blg) vor allem innerhalb der Umbauzonen und Markräume (A) und in 100-facher Vergrößerung mit CD16 positiven Zellen in Arealen des Bindegewebes (B) sowie CD20 positiver Zellen innerhalb der Markräume (C).

Tab. 17 Präsenz von Umbauzonen, OB, OK, Blutgefäßen (Blg) und CD3, CD20 und CD16 positiver Zellen in Osteophyten des Typs A, B (je drei analysierte Osteophyten), C und D (je vier analysierte Osteophyten):

Osteophyten- typ	Umbau- zonen	ALP OB	TRAP OK	Blg	CD3 T-Zellen	CD20 B-Zellen	CD16
Typ A	0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	0/3	3/3
Typ B	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	2/3	3/3
Typ C	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	4/4	4/4
Typ D	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	3/4	4/4

#### 4.2.2 Charakterisierung der Adipokinexpression und DKK1

Adiponektin konnte bei Osteophyten des Typs A in Zellen des lockeren Bindegewebes detektiert werden, besonders in der äußeren Zellschicht (Abb. 21 D). Außerdem war Adiponektin sehr häufig in den Zellen der Blutgefäße nachweisbar, insofern Gefäße in den Osteophyten vorhanden waren. Resistin war ebenfalls in Zellen des lockeren Bindegewebes nachweisbar, jedoch weniger im Vergleich zu Adiponektin (Abb. 21 E). Auch Visfatin war in Zellen des lockeren Bindegewebes lokalisiert, wobei hier eine verstärkte Färbung der Bindegewebszellen zu beobachten war, welche nahe dem Übergang zum Knorpel lagen (Abb. 21 F). Zudem zeigte sich bei Visfatin eine Färbung von im Knorpel gelegenen CH, welche jedoch nicht generalisiert auf alle CH des jeweiligen Knorpels zutraf (Abb. 21 F). Neben dem Osteophyten im in Abb. 21 dargestellten Beispiel war auch Synovialgewebe angeschnitten. Dieses wies ebenfalls eine sehr deutliche Färbung der Synoviozyten mit Adiponektin auf und schwächer auch mit Resistin und Visfatin (Abb. 21 D, E, F). Außerdem waren die Zellen der Blutgefäße deutlich Adiponektin-positiv (Abb. 21 D).

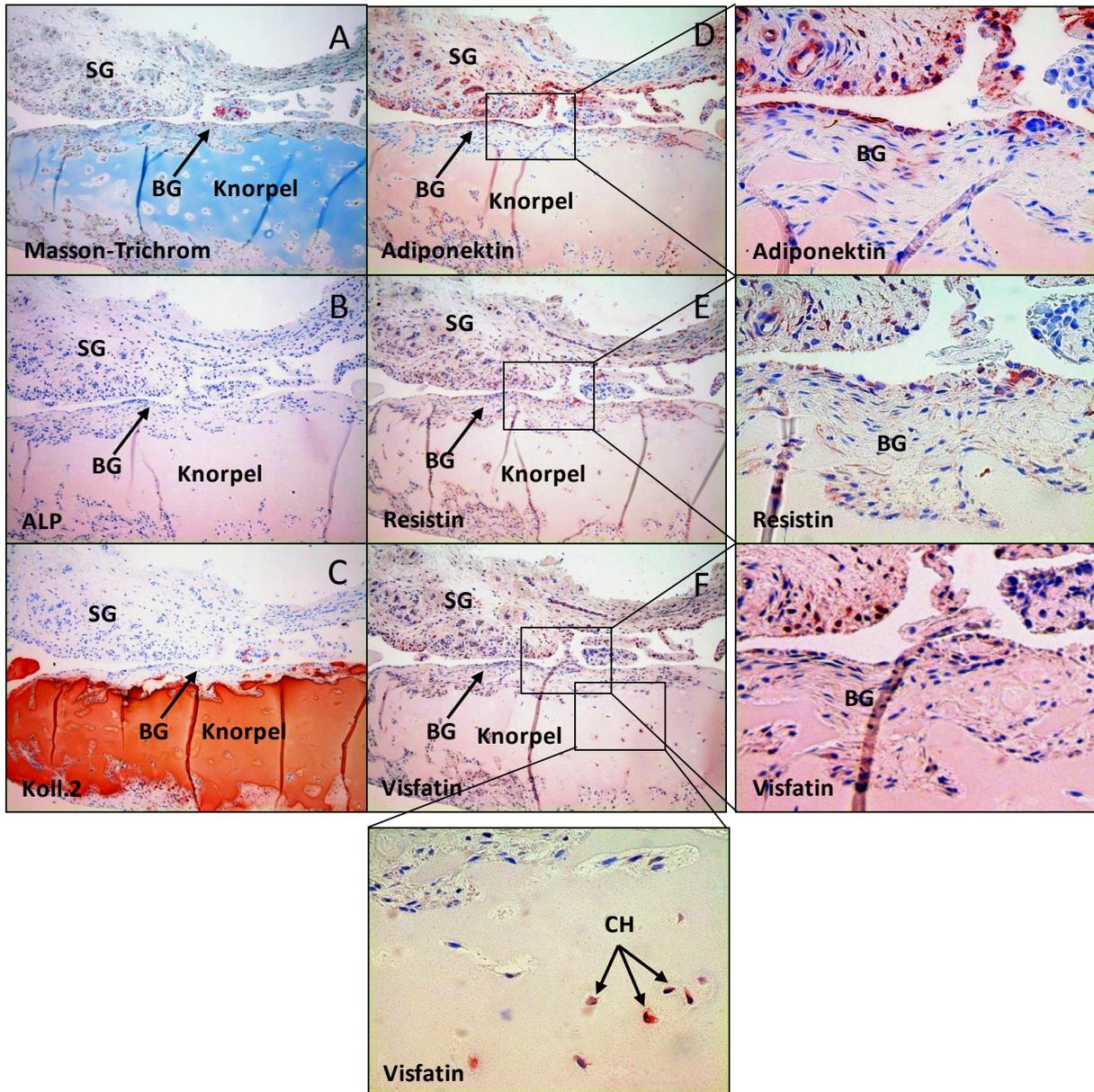


Abb. 21: Typ A Osteophyt in 100-facher Vergrößerung mit anliegendem Synovialgewebe. Der Osteophyt wurde histologisch gefärbt mit Masson-Trichrom (A) und immunohistochemisch auf ALP (B), Kollagen Typ II (C), Adiponektin (D), Resistin (E) und Visfatin (F). Ausschnitte der Adipokin-gefärbten Schnitte in 400-facher Vergrößerung sind rechts daneben bzw. für Visfatin auch darunter dargestellt. Neben den Zellen des Synovialgewebes wiesen auch die Zellen des lockeren Bindegewebes eine Färbung gegen Adiponektin, Resistin und Visfatin auf. Dabei ist Adiponektin vor allem in der äußeren Zellschicht des lockeren Bindegewebes detektierbar, während Resistin und Visfatin verstärkt in den Bindegewebszellen an der Knorpelgrenze vorliegen. Visfatin zeigt eine Ko-Lokalisation mit CH im Knorpel.

Abkürzungen: BG: Bindegewebe, CH: Chondrozyten, SG: Synovialgewebe.

Bei Osteophyten des Typs B wiesen das lockere Bindegewebe sowie der Knorpel eine ähnliche Färbung mit Adiponektin, Resistin und Visfatin auf wie Typ A Osteophyten. Alle drei Adipokine waren im lockeren Bindegewebe detektierbar (Abb. 22 D, E, F). Adiponektin war dabei vor allem in den äußeren Zellschichten des lockeren Bindegewebes detektierbar (Abb. 22 D), während Resistin und Visfatin stärker in den Bindegewebszellen zu finden waren (Abb. 22 E, F), welche an den Knorpel bzw. Knochen angrenzen. An der Bindegewebs-Knorpel- bzw. Knochengrenze waren in einigen Fällen auch ALP-positive OB detektierbar. Auch bei den Osteophyten des Typs B konnte Visfatin bei zwei von drei analysierten Osteophyten in CH im Knorpel nachgewiesen werden. Adiponektin war bei allen drei untersuchten Osteophyten in Zellen der Blutgefäße (Abb. 22 D) detektierbar. Da bei Typ B Osteophyten bereits Knochenanteile vorhanden waren, waren auch Umbauzonen mit OB und OK vorhanden. In allen drei untersuchten Typ B Osteophyten waren OB positiv für Adiponektin (Abb. 22 D), Resistin (Abb. 22 E) und Visfatin (Abb. 22 F). Auch OK waren in allen drei untersuchten Osteophyten Resistin-positiv (Abb. 22 E), jedoch nur in zwei von drei Osteophyten auch Visfatin-positiv (Abb. 22 E).

Die Osteophyten des Typs C wiesen größere Knochenareale als Typ B Osteophyten und einen größeren Anteil lockeren Bindegewebes als Typ D Osteophyten auf. Auch bei Typ C Osteophyten war die Verteilung der Adipokine im Bindegewebe ähnlich wie bei Typ A und B (Abb. 23 G, H, I), wobei Adiponektin die stärkste Färbung von Bindegewebszellen aufwies. Adiponektin war in allen vier analysierten Osteophyten ebenfalls in Zellen der Blutgefäße und in zwei von vier untersuchten Osteophyten in OB detektierbar (Abb. 23 J). Resistin und Visfatin wiesen bei Osteophyten des Typs C in drei von vier untersuchten Osteophyten eine Ko-Lokalisation mit Osteoblasten bzw. Osteoklasten auf (Abb. 23 K, L). Visfatin zeigte zudem auch bei Typ C Osteophyten bei einem der vier analysierten Osteophyten eine Lokalisation in CH im Knorpel auf.

Bei Osteophyten des Typs D war die Adipokin-Lokalisation ähnlich dem Typ C. Allerdings konnten die Adipokine zwar in den Zellen des lockeren Bindegewebes detektiert werden, da diese Areale bei Typ D Osteophyten jedoch deutlich kleiner waren als bei Typ C, waren entsprechend wenige Zellen des Bindegewebes mit den Adipokinen angefärbt. In allen vier untersuchten Typ D Osteophyten konnte Adiponektin in Zellen der Blutgefäße und in drei der vier analysierten Osteophyten kolokalisiert mit OB nachgewiesen werden. Resistin konnte bei allen vier Osteophyten kolokalisiert mit OB und OK nachgewiesen werden. Visfatin-positive OB und OK fanden sich jeweils in zwei der vier analysierten Osteophyten. In zwei der vier

Osteophyten konnten auch Visfatin-positive CH nachgewiesen werden. Ein Beispiel eines Typ D Osteophyts ist in Abb. 24 dargestellt.

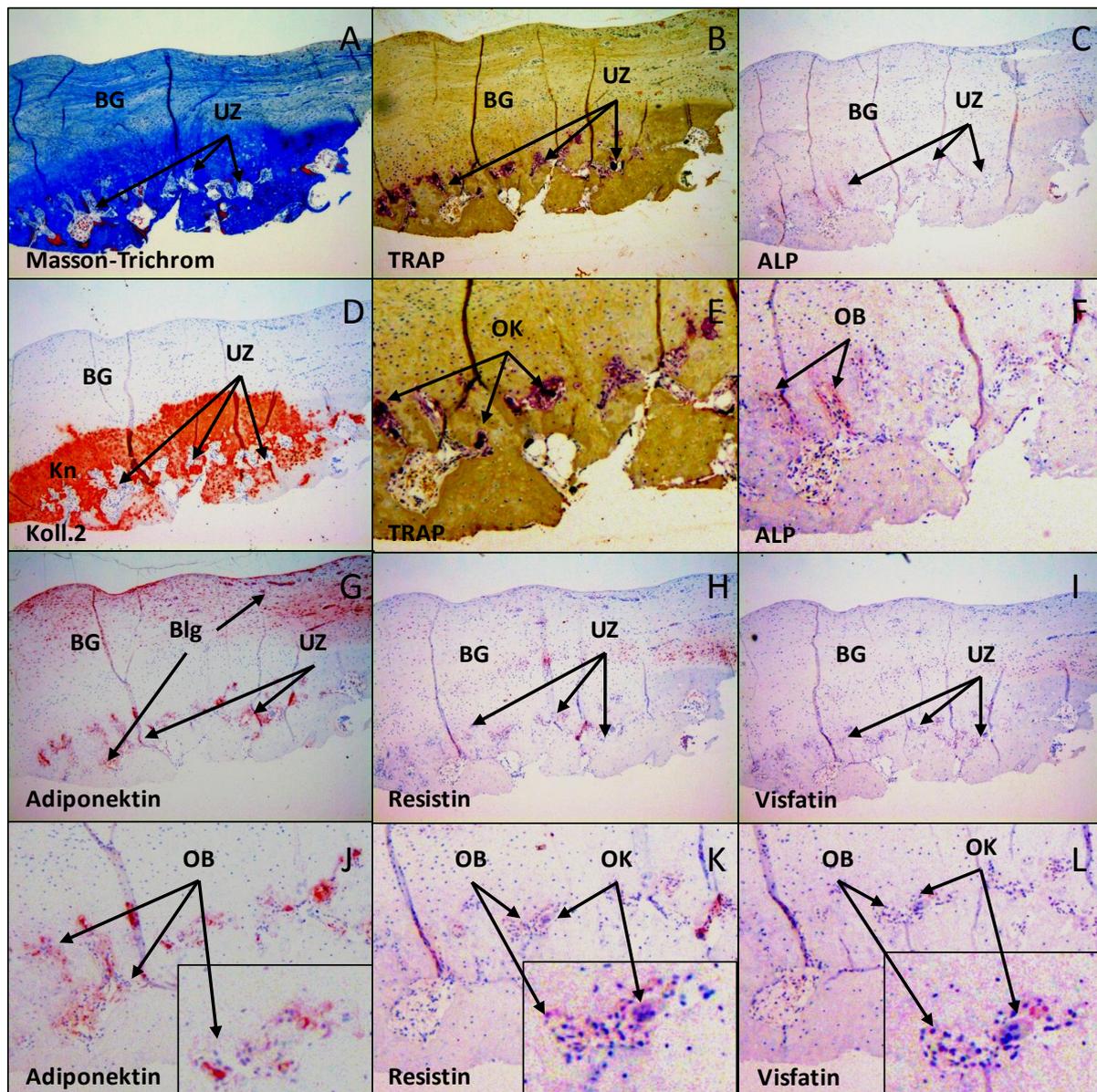


Abb. 22: Osteophyt des Typ B gefärbt mit Masson Trichrom (A), TRAP (B, E), ALP (C, F), Kollagen Typ II (D), sowie den Adipokinen Adiponektin (G, J), Resistin (H, K) und Visfatin (I, L). Erkennbar sind viele Umbauzonen an der Grenze zwischen Knorpel und Knochen, welche viele TRAP-gefärbte OK aufwiesen (B, E), ebenso wie ALP-positive OB (C, F). Am Übergang zwischen lockerem Bindegewebe und Knorpel waren ebenfalls ALP-positive Zellen detektierbar (C). Adiponektin konnte in Zellen der Blutgefäße sowie des lockeren Bindegewebes und in den OB detektiert werden (G, J). Resistin zeigte im Vergleich zu Adiponektin eine deutlich geringere Lokalisation in den Zellen des lockeren Bindegewebes, jedoch eine Lokalisation mit den OB und OK (H, K). Visfatin zeigte in diesem Beispiel keine Färbung der Zellen des lockeren Bindegewebes, allerdings in ALP-positiven Zellen (I). Auch OB und OK in den Umbauzonen wiesen eine leicht-positive Färbung gegen Visfatin auf (L).

Abkürzungen: BG: Bindegewebe, Blg: Blutgefäße, Kn: Knorpel, OB: Osteoblasten, OK: Osteoklasten, UZ: Umbauzonen.

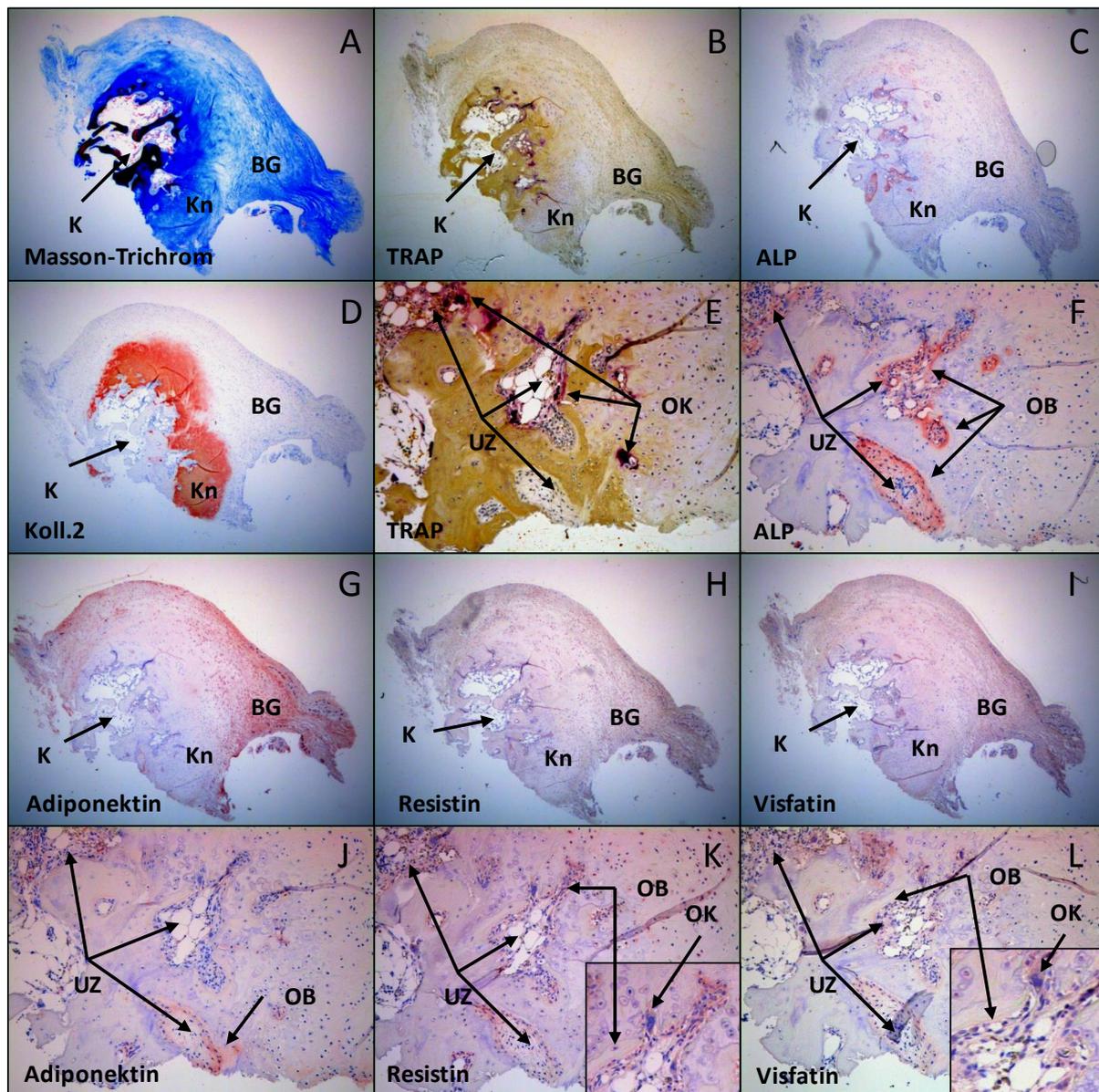


Abb. 23: Typ C Osteophyt in 25-facher bzw. 100-facher Vergrößerung. Der Osteophyt wurde gefärbt mit Masson Trichrom (A), TRAP (B, E), ALP (C, F), Kollagen Typ II (D), Adiponektin (G, J), Resistin (H, K) und Visfatin (I, L). Das lockere Bindegewebe weist eine deutliche Färbung mit Adiponektin auf (G). Die im Knochen befindlichen Umbauzonen enthalten viele ALP-positive OB (C, F) und TRAP-positive OK (B, E). Eine Ko-Lokalisation der ALP- und TRAP-positiven Zellen mit Visfatin (L) und Resistin (K) ist erkennbar. Adiponektin zeigt sich kolokalisiert mit ALP-positiven Zellen (J).

Abkürzungen: BG: Bindegewebe, K: Knochen, Kn: Knorpel, OB: Osteoblasten, OK: Osteoklasten, UZ: Umbauzonen.

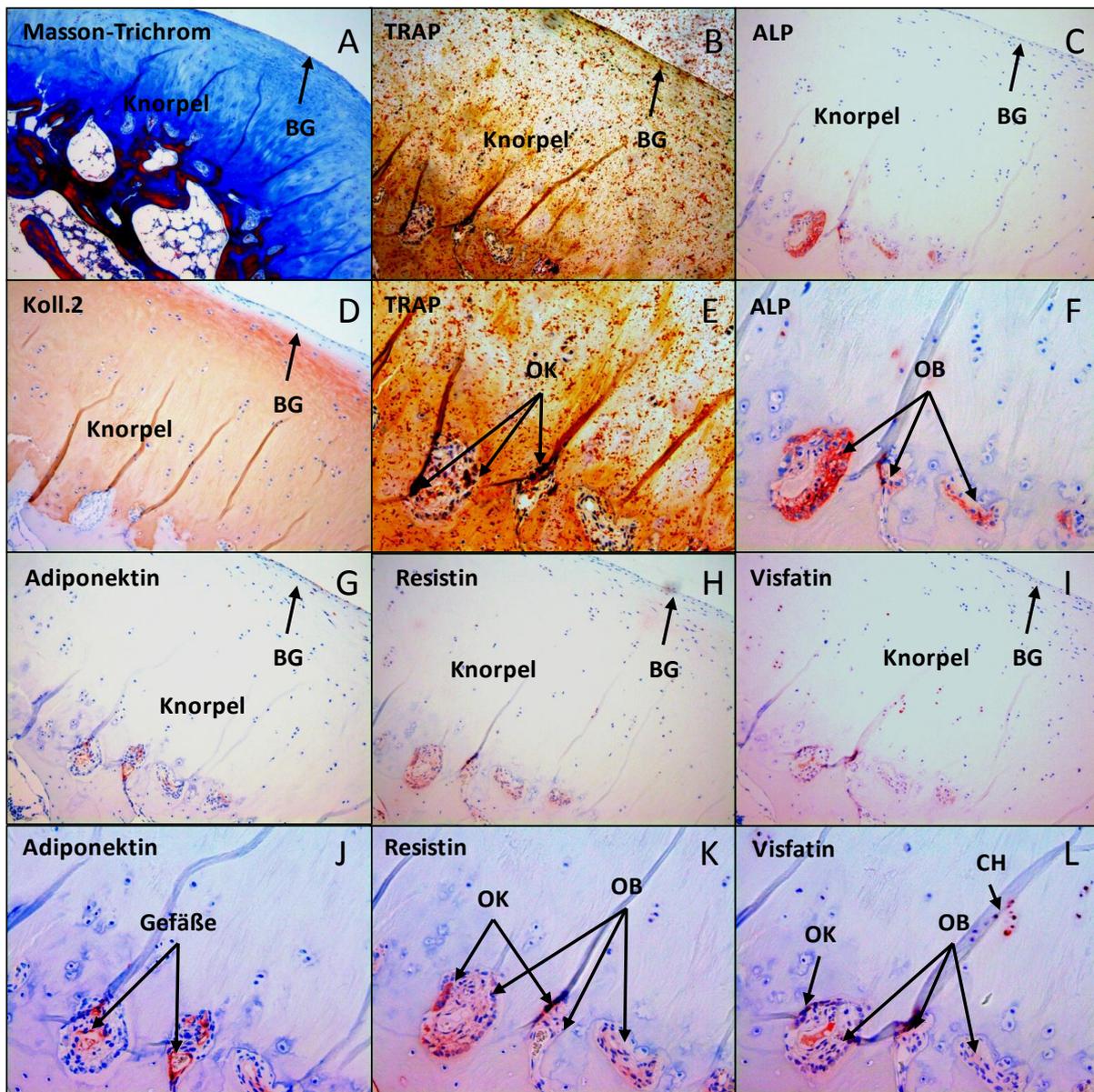


Abb. 24: Typ D Osteophyt in 100-facher bzw. 200-facher Vergrößerung. Der Osteophyt wurde gefärbt mit Masson Trichrom (A), TRAP (B, E), ALP (C, F), Kollagen Typ II (D), Adiponektin (G, J), Resistin (H, K) und Visfatin (I, L). Das lockere Bindegewebe zeigt eine Färbung der äußeren Zellschicht mit Adiponektin (G). Die im Knochen befindlichen Umbauzonen enthalten ALP-positive OB und TRAP-positive OK, welche eine Ko-Lokalisation mit Visfatin (L) und Resistin (K) aufweisen. Die Blutgefäße innerhalb der Umbauzonen sind Adiponektin gefärbt (J). Einige CH im Knorpel zeigen eine Visfatin-Färbung (L).

Abkürzungen: BG: Bindegewebe, CH: Chondrozyten, OB: Osteoblasten, OK: Osteoklasten.

Die Verteilung der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin in den jeweiligen Arealen der Osteophyten ist zusammenfassend in Tab. 18 dargestellt.

Tab 18: Übersicht über die Lokalisation der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin in Typ A – D Osteophyten. Adiponektin war in Blutgefäßen (Bgl), Adiponektin, Resistin und Visfatin im lockeren Bindegewebe (BG) und OB, Resistin und Visfatin in OK und Visfatin zusätzlich in CH von Osteophyten der Stadien A, B (je drei analysierte Osteophyten) sowie C und D (je vier analysierte Osteophyten) nachweisbar:

Typ	Adip. BG	Adip. Bgl	Adip. OB	Res. BG	Res. OB	Res. OK	Vis. BG	Vis. OB	Vis. OK	Vis. CH
A	3/3	2/3	0/3	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	3/3
B	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	3/3	2/3	2/3
C	4/4	4/4	2/4	3/4	3/4	3/4	4/4	3/4	3/4	1/4
D	4/4	4/4	2/4	3/4	4/4	4/4	3/4	2/4	3/4	2/4

Zusätzlich zu der Adipokinexpression wurde die Expression des Wnt-Inhibitors DKK1 im Gewebe der Osteophyten untersucht. Dabei zeigte sich, dass DKK1 in Osteophyten des Typs A in Chondrozyten detektiert werden konnte (Abb. 25 A, B), in den Osteophyten der Stadien B, C, und D konnte DKK1 allerdings in im Knochen eingebetteten Osteozyten detektiert werden (Abb. 25 C-H).

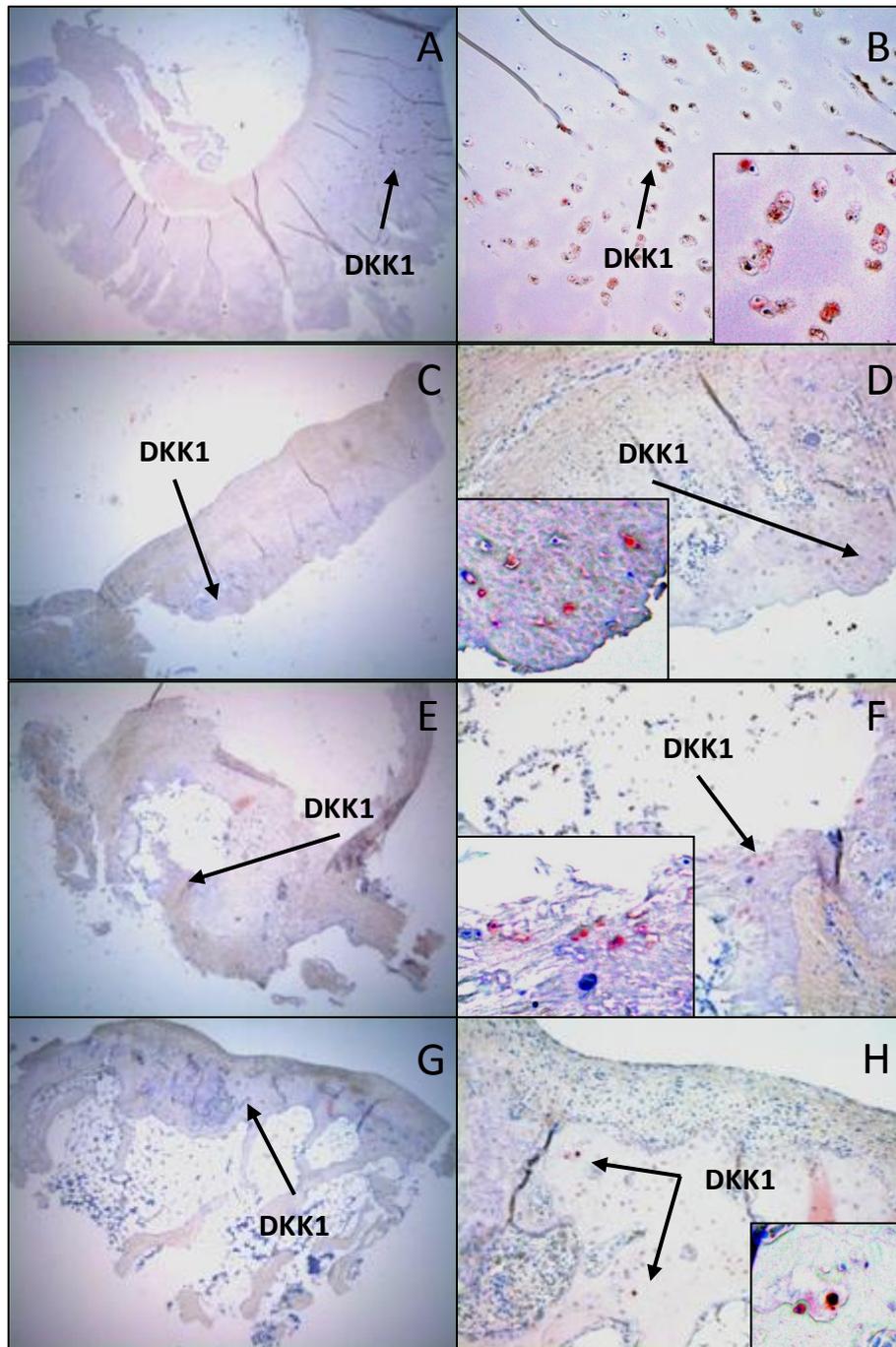


Abb. 25: Osteophyten der Typen A (A, B), B (C, D), C (E, F) und D (G, H) in 25-facher (A, C, E, G) bzw. 100-facher (B, D, F, H) Vergrößerung immunhistochemisch gefärbt gegen DKK1. Bei Typ A Osteophyten sind DKK1 positive CH nachweisbar. Bei Osteophyten der Typen B, C und D sind DKK1 positive Osteozyten im Knochen nachweisbar.

### 4.3 Adipokinexpression in isolierten OA-OB und OA-CH

Die Expression der Adipokine durch OB und CH wurde *in vitro* in kultivierten, primären Zellen verifiziert. Dafür wurden die isolierten, humanen OB bzw. CH von OA-Patienten auf Kammerobjektträgern kultiviert. Diese wurde schließlich fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass kultivierte OA-OB Adiponektin, Resistin und Visfatin exprimieren (Abb. 26). 100% der OA-OB waren positiv für Adiponektin und Visfatin (Abb. 26 A, C), 85% der OA-OB zeigten eine positive Resistin-Färbung (Abb. 26 B).

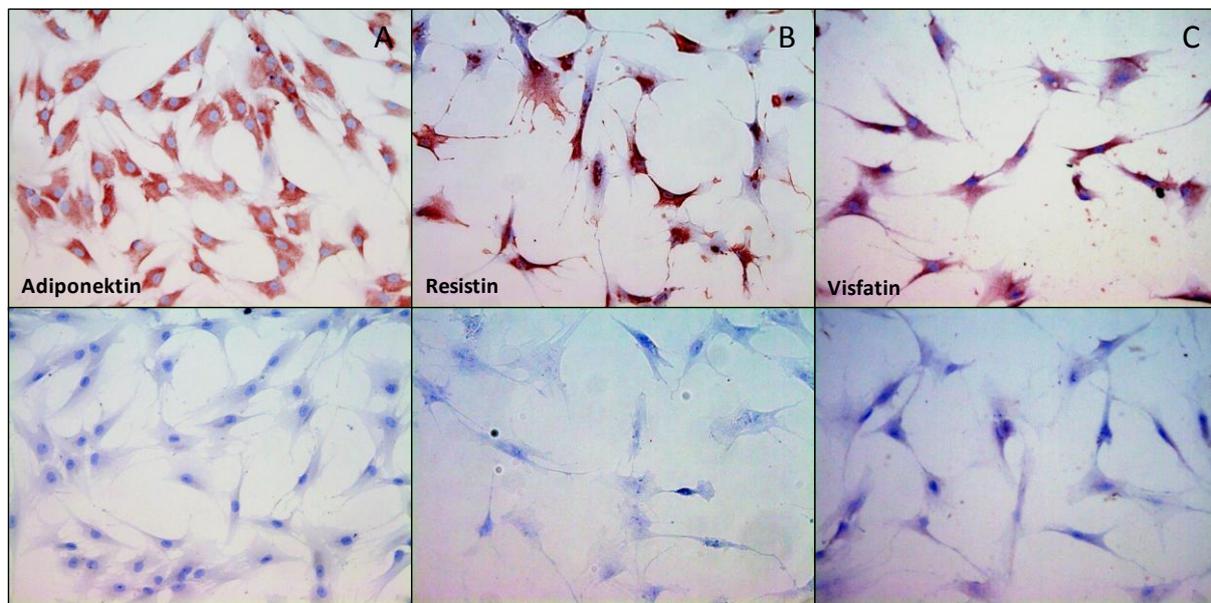


Abb. 26: Auf Kammerobjektträgern kultivierte OA-OB in 200-facher Vergrößerung wurden immunzytochemisch mit Adiponektin (A, oben), Resistin (B, oben) und Visfatin (C, oben) gefärbt. Als Kontrolle für die Spezifität der Färbung dienten die entsprechenden Isotypkontrollen, welche jeweils unterhalb der Adipokinfärbung dargestellt ist. Zur Kernfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. 100% der OA-OB waren positiv für Adiponektin (A) und Visfatin (C). 80% der Zellen zeigten eine positive Resistin-Färbung.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Adiponektin-Rezeptoren Adipo-R1, Adipo-R2 und PAQR3 auf den OA-OB immunzytochemisch nachzuweisen waren (Abb. 27). 100% der untersuchten OA-OB waren positiv für alle drei Adiponektinrezeptoren, wobei AdipoR1 jeweils die intensivste Färbung aufwies.

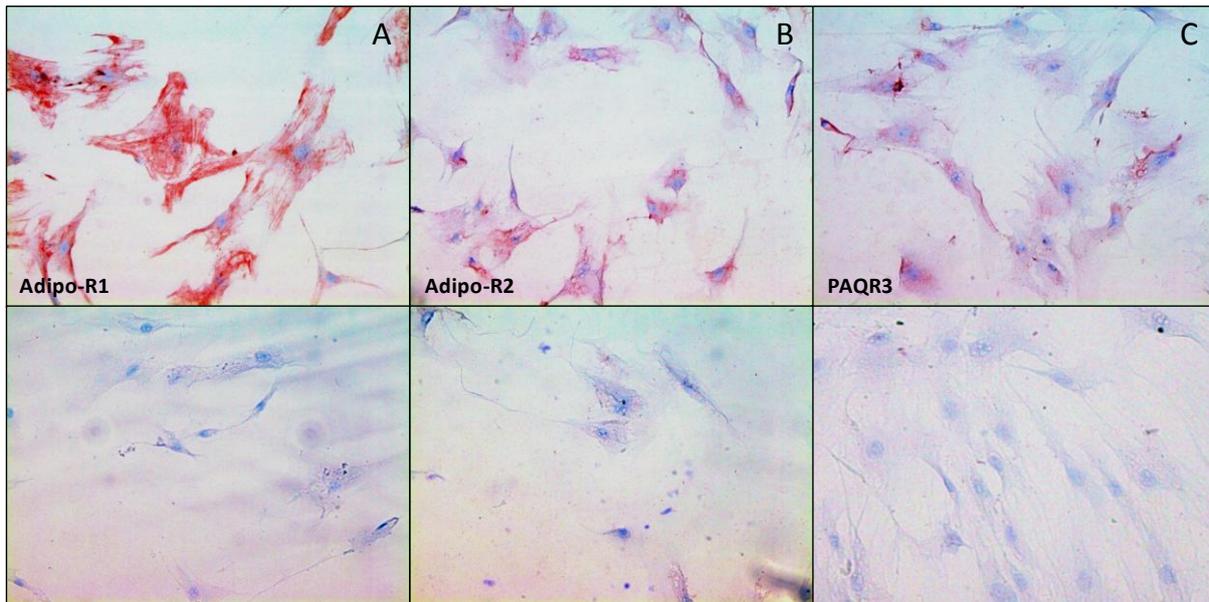


Abb. 27: Auf Kammerobjektträger kultivierte OA-OB in 200-facher Vergrößerung wurden immunzytochemisch gefärbt mit AdipoR1 (A, oben), AdipoR2 (B, oben) und PAQR3 (C, oben). Als Kontrolle für die Spezifität der Färbung dienten die entsprechenden Isotypkontrollen, welche jeweils unter der Adipokinfärbung dargestellt ist. Zur Kernfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. 100% der OA-OB waren positiv für alle drei Adiponektin-Rezeptoren.

Die Visfatin-Expression der CH konnte *in vitro* auf den auf Kammerobjektträgern kultivierten CH immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen Visfatin bestätigt werden (Abb. 28). Adiponektin und Resistin waren in den Osteophyten nicht in Chondrozyten nachweisbar und wurden daher nicht gefärbt. 85% der kultivierten CH waren stark positiv für Visfatin, 15% der CH zeigten eine deutlich schwächere Färbung.

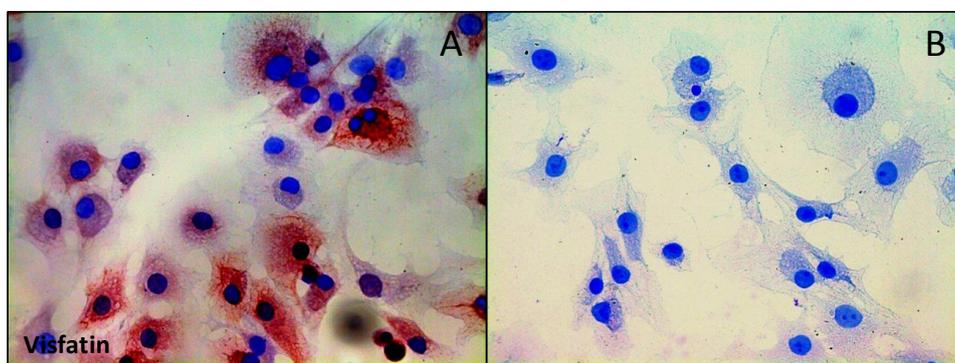


Abb. 28: Auf Kammerobjektträger kultivierte CH in 200-facher Vergrößerung wurden immunzytochemisch gefärbt gegen Visfatin (A) bzw. der dazugehörigen Isotypkontrolle (B). Als Kerngegenfärbung diente Hämatoxylin. 85% der CH zeigten eine stark positive Visfatin-Färbung, 15% der CH waren schwächer gefärbt, wobei vor allem größere, unförmige CH eine stärkere Färbung aufwiesen.

#### 4.4 Analyse des Visfatingehalts im Knorpel von OA-Osteophyten

Bei der immunhistochemischen Charakterisierung der Osteophyten hat sich gezeigt, dass ein Teil der CH im Osteophytenknorpel Visfatin exprimierten. Isolierte CH wiesen ebenfalls eine positive Färbung für Visfatin auf. Zur Überprüfung dieser Beobachtung im Knorpel, wurde der Visfatingehalt von Osteophytenknorpel und von nicht-osteophytärem OA-Knorpel auf den Knochen-Knorpelplatten desselben Gelenks bestimmt. Die Visfatinkonzentration von Proteinlysaten aus gemahlenem OA-Knorpel und Osteophytenknorpel (siehe Abschnitt 3.1.3) wurde mittels ELISA quantifiziert und die Werte bezogen auf den Gesamtproteingehalt normalisiert. Dabei ergab sich im Vergleich zum OA-Knorpel eine höhere Visfatinkonzentration in Osteophytenknorpel von  $164,6\% \pm 103,6\%$ , die jedoch nicht signifikant ist. Wie in Abb. 29 dargestellt, lagen große Unterschiede zwischen den analysierten Proben der einzelnen Patienten vor. Bei einigen Patienten waren keine Unterschiede zwischen Osteophytenknorpel und nicht-osteophytären OA-Knorpel nachweisbar ( $\blacklozenge, +$ ). Bei anderen Patienten war mehr Visfatin im Osteophytenknorpel als im OA-Knorpel vorhanden ( $\times, *, \blacksquare$ ). Bei zwei der sieben untersuchten Patientengeweben konnte mehr Visfatin im nicht-osteophytären OA-Knorpel als im Osteophytenknorpel nachgewiesen werden ( $\blacktriangle, \bullet$ ), wobei sich bei Patient  $\bullet$  das Visfatinlevel im nicht-osteophytären OA-Knorpel deutlich von den anderen Patienten unterschied. Bei den anderen Patienten lagen die Visfatinwerte im OA-Knorpel zwischen 0 und 50 ng Visfatin/ml Knorpellösung und beim Osteophytenknorpel zwischen 3 und 100 ng/ml, bei Patient  $\bullet$  lag das Visfatinlevel im OA-Knorpel deutlich höher im Vergleich zu den anderen Patienten bei 186 ng/ml und im Osteophytenknorpel bei 110 ng/ml.

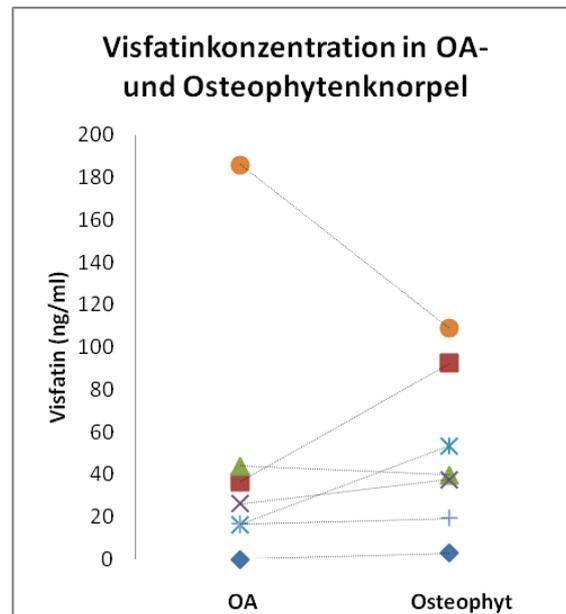


Abb. 29: Visfatinkonzentration in nicht-osteophytären OA-Knorpel im Vergleich mit Osteophytenknorpel desselben Gelenks. Bei den meisten Patienten sind die Visfatinlevel im nicht-osteophytären OA-Knorpel und im Osteophytenknorpel annähernd gleich oder leicht unterschiedlich ( $\diamond$ ,  $+$ ,  $\times$ ,  $\triangle$ ). Bei den Patienten  $\ast$ ,  $\blacksquare$  war deutlich mehr Visfatin im Osteophytenknorpel nachweisbar als im normalen OA-Knorpel. Patient  $\bullet$  wies insgesamt deutlich höhere Visfatinlevel im Knorpel auf im Vergleich zu den anderen Patienten, wobei bei diesem Patienten der Visfatingehalt im OA-Knorpel deutlich höher war als im Osteophytenknorpel.

## 4.5 Effekt von Adipokinen auf OA-OB

### 4.5.1 Effekt der Adipokine auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren durch OA-OB

Für die Untersuchung des Einflusses der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren durch primäre isolierte Osteoblasten verschiedener Patienten (nachfolgend Populationen genannt), wurden Stimulierungs-Experimente durchgeführt und die Zellkulturüberstände der Zellen mittels ELISA analysiert.

Die Konzentrationen der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6, sowie der Chemokine IL-8, MCP-1 und GRO $\alpha$  wurde mit den Konzentrationen in den Überständen unstimulierter Zellen verglichen. Die Analysen zeigten starke populationsabhängige und somit von Patienten abhängige Unterschiede bereits in der Basisproduktion der meisten untersuchten Zytokine und Chemokine.

Nach Stimulierung der OB mit Adiponektin kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Abgabe von  $260,2\% \pm 280\%$ ,  $p = 0,041$ . Die IL-8-Abgabe erhöhte sich signifikant um  $489,4\% \pm 456,6\%$ ,  $p = 0,043$ . Auch die Abgabe von MCP-1 erhöhte sich signifikant um

207,6%±104,6%,  $p = 0,017$ . Um die populationsabhängigen Unterschiede zu zeigen, sind die Änderungen der absoluten Konzentrationen von IL-6, IL-8 und MCP-1 der analysierten Populationen in Abb. 30 dargestellt.

Eine Abgabe von IL-1 $\beta$  konnte weder bei den unstimulierten Kontrollen noch bei den mit Adipokinen stimulierten Proben beobachtet werden. Auch das Chemokin GRO $\alpha$  lag unabhängig einer Stimulation in zu geringen Konzentrationen vor, um im verwendeten ELISA detektiert zu werden. Das Chemokin IL-8 kam populationsabhängig vor allem im ZKÜ der unstimulierten Proben ebenfalls in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs vor. Bei diesen Populationen wurden die nicht messbaren Proben auf null gesetzt.

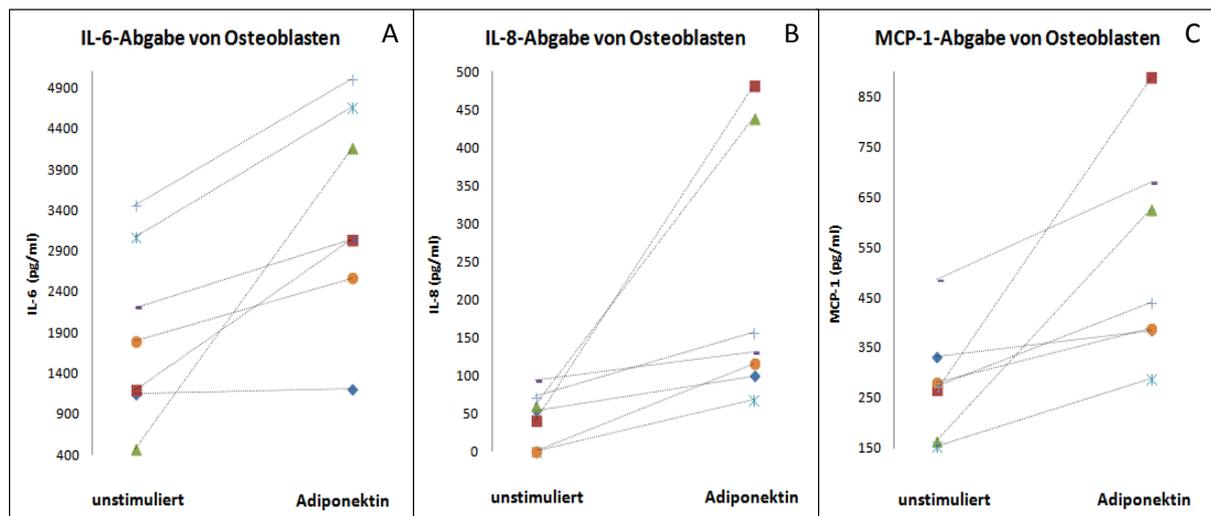


Abb. 30: Vergleich der Proteinkonzentrationen von IL-6 (A), IL-8 (B) und MCP-1 (C) von unstimulierten mit Adiponektin-stimulierten OB-Populationen. Man erkennt die stark variierenden Basislevel der einzelnen Populationen, besonders im Fall von IL-6 und MCP-1. Alle drei Entzündungsmediatoren werden nach Adiponektin-Stimulation verstärkt abgegeben, jedoch reagieren einige Populationen deutlich stärker auf Adiponektin ( $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ).

Die OB wurden desweiteren mit Resistin (Monomer und das physiologisch aktive Multimer) und Visfatin stimuliert. Die IL-6-Abgabe war nach Resistin-Stimulation nicht signifikant um 122,1%±63,5% (Monomer) bzw. 112,1%±29,8% (Dimer) erhöht. Die Visfatin-Stimulation führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung der IL-6-Konzentration um 120,2%±15,2%. In Abb. 31 sind die Konzentrationsänderungen der absoluten Konzentrationen für die analysierten Populationen dargestellt. Für IL-8 und MCP-1 konnten ebenfalls keine signifikanten Konzentrationsänderungen nach Resistin- bzw. Visfatin-Stimulation detektiert werden.

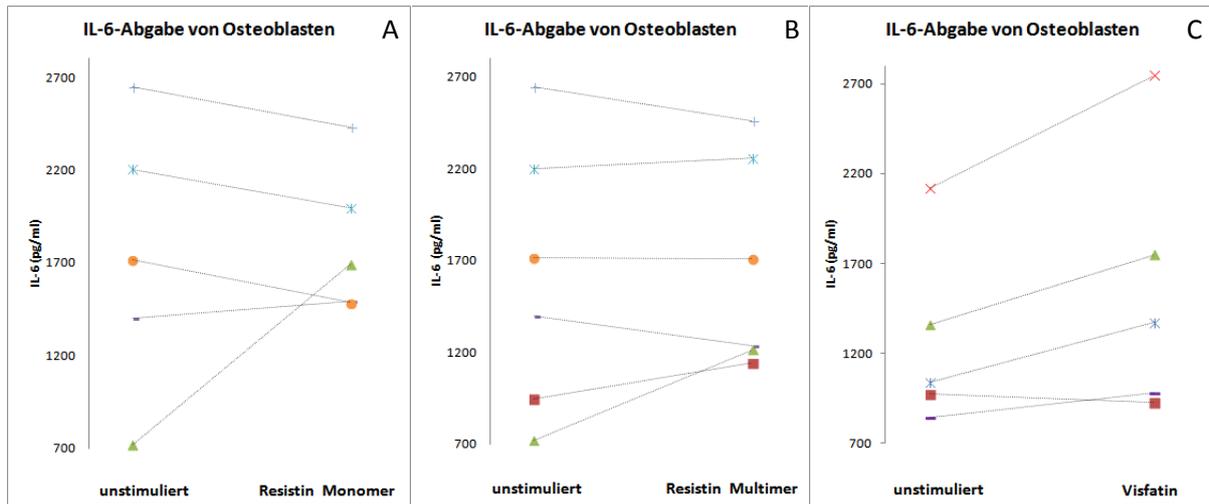


Abb. 31: Vergleich der IL-6-Konzentration von unstimulierten mit Resistin Monomer (A), Resistin Multimer (B) oder Visfatin (C) stimulierten OB-Populationen. Die IL-6 Basislevel unterscheiden sich sehr stark abhängig von der analysierten Population. Resistin hat unabhängig vom Dimerisierungsstatus keinen Effekt auf die untersuchten Populationen, abgesehen von Population ▲, wo eine Induktion von IL-6 nach Resitin-Stimulation zu erkennen ist. Visfatin führt bei den untersuchten Populationen zu einer Induktion von IL-6, nur bei OB-Population ■ ist eine leichte Reduktion des IL-6-Spiegels nach der Stimulation zu erkennen.

Zusätzlich zu der Stimulierung mit Adiponektin, Resistin und Visfatin über 17 h wurde ein Zeitkinetik-Experiment durchgeführt, da insbesondere bei Resistin und Visfatin keine Veränderungen nach 17 h detektierbar waren. Dafür wurden drei OB-Populationen für jeweils 24 h, 48 h und 72 h mit Adiponektin, Resistin und Visfatin stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und MCP-1 wurden anschließend mittels ELISA bestimmt. Auch nach längerer Stimulierung der OB von bis zu 72 h zeigte sich keine Induktion von IL-6, IL-8 und MCP-1 durch Resistin oder Visfatin. Die durch Adiponektin induzierte Abgabe von IL-6 erhöhte sich mit der Zeit bis nach 48 h Stimulation und fiel nach 72 h wieder auf das 24 h Niveau ab. Die MCP-1-Abgabe steigerte sich ebenfalls über 48 h und blieben auch nach 72 h Stimulation mit Adiponektin auf demselben Level wie nach 48 h. Die IL-8-Level erhöhten sich nach Adiponektin-Stimulation über die Zeit von 24 h bis 72 h. Die Werte für die durch die Adipokine induzierten Änderung in der IL-6, MCP-1 und IL-8-Abgabe sind in Tab. 19 zusammengefasst. Bei IL-6 und MCP-1 wurde die prozentuale Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle errechnet. Da die unstimulierte Kontrolle bei IL-8 nicht im messbaren Bereich lag, wurden die Differenz-Werte angegeben. Abb. 32 zeigt die graphische Darstellung dieser Ergebnisse.

Tab. 19 Induktion von IL-6, MCP-1 (prozentuale Induktion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle) und IL-8 (Differenz zwischen unstimulierter Kontrolle und stimulierter Probe) nach Stimulation mit Adiponektin, Resistin bzw. Visfatin für 24 h, 48 h und 72 h.

Stimulationszeit	IL-6 (%)	MCP-1 (%)	IL-8 (pg/ml)
Adiponektin 24h	168,7±47,6	163,4±45,0	122,77±126,84
Adiponektin 48h	236,9±34,4	229,3±43,5	192,41±66,53
Adiponektin 72h	177,2±65,4	230,0±76,4	289,08±158,09
Resistin 24h	104,7±17,9	92,7±17,8	nicht messbar
Resistin 48h	144,5±55,7	114,0±12,3	nicht messbar
Resistin 72h	87,2±5,5	93,2±9,2	nicht messbar
Visfatin 24h	106,1±15,1	96,2±34,0	nicht messbar
Visfatin 48h	94,6±5,9	97,4±23,3	nicht messbar
Visfatin 72h	100,2±12,5	93,2±9,8	nicht messbar

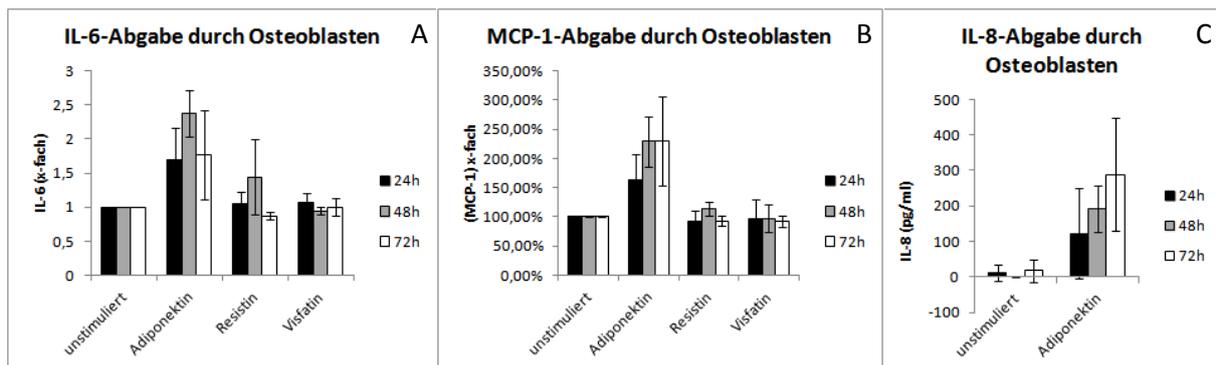


Abb. 32: Abgabe von IL-6 (A), MCP-1 (B) und IL-8 (C) durch OB nach Stimulation mit Adiponektin (A, B, C), Resistin (A, B) und Visfatin (A, B), n=3. Zeitabhängige Erhöhung von IL-6, MCP-1 und IL-8 nach Adiponektin-Stimulation. Resistin und Visfatin zeigen keine Induktion von IL-6 und MCP-1. Eine IL-8-Induktion durch Resistin oder Visfatin konnte nicht gemessen werden.

#### 4.5.2 Effekt der Adipokine auf die OB-spezifische Genexpression

Der Einfluss der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin auf die Genexpression von OB-spezifischen Genen wurde mittels *Real-Time-PCR* anhand folgender Parameter untersucht: Die OB-Aktivitätsmarker alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (gla), die für die OB-Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren RunX und Osterix (sp7), die Matrixkomponenten Kollagen Typ I (Koll 1) und Kollagen Typ 10 (Koll 10), die OK-Differenzierung regulierenden Faktoren Osteoprotegerin (OPG) und RANK-Ligand (RankL) sowie ein Zielgens des Wnt-Signalwegs, Axin2, je nach 17 h Adipokin-Stimulation.

Wie in Abb. 33 graphisch dargestellt, konnte bei keinem der untersuchten Gene eine signifikante Änderung der Genexpression um mindestens den Faktor 2 detektiert werden. Nur nach Resistin-Stimulation konnte bei Osterix (sp7) eine nicht signifikanter Regulation von 239,4%±172,5% detektiert werden.

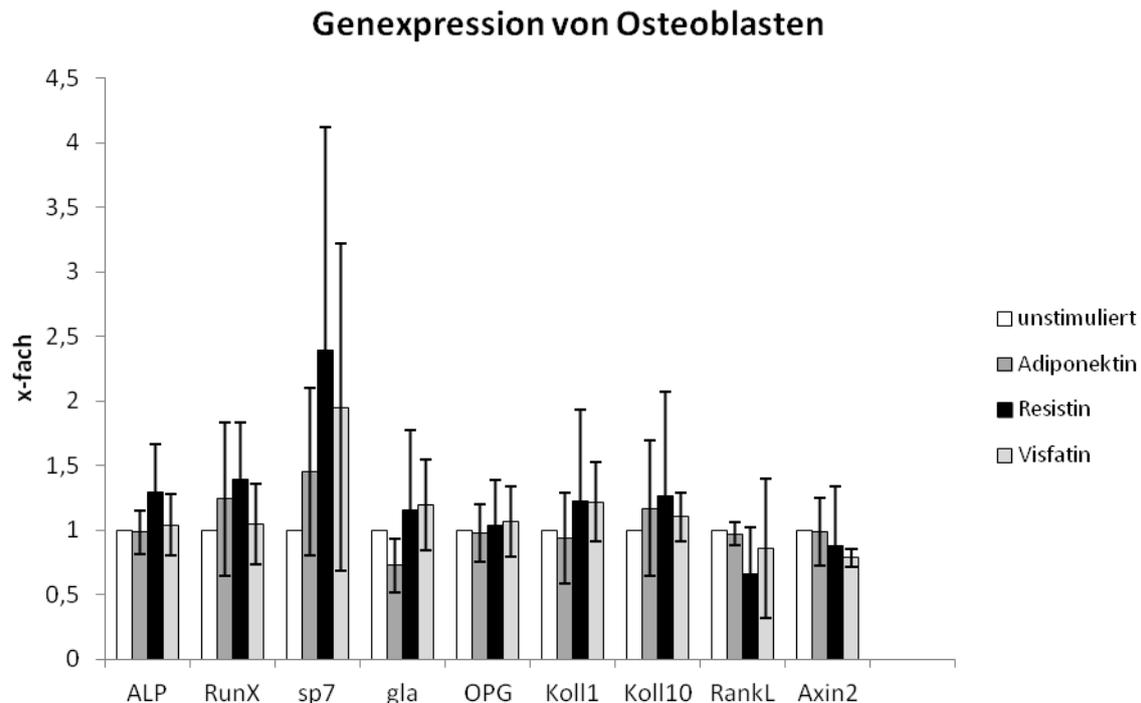


Abb. 33: Regulationsfaktoren OB-spezifischer Gene nach 17 h Stimulation mit Adiponektin (ALP, RunX, sp7, Koll10: n=5; gla, OPG, Koll1: n=8; RankL, Axin2: n=3) Resistin (ALP, RunX, sp7, Koll10: n=4; gla, OPG, Koll1: n=7; RankL, Axin2: n=3) und Visfatin (ALP, RunX, sp7, gla, OPG, Koll1, Koll10, RankL: n=5; Axin2: n=3). Die jeweilige unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde für alle Parameter auf 1 gesetzt.

Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Genexpression möglicherweise eine längere Stimulationsdauer benötigt, wurden die OB für 24 h, 48 h und 72 h mit Adiponektin, Resistin und Visfatin stimuliert und anschließend die Genexpression der oben genannten Gene mittels *Real-Time-PCR* untersucht. Allerdings führte auch eine längere Stimulationsdauer mit den Adipokinen nicht zu einer signifikanten Änderung der Genexpression der oben genannten Gene um mindestens den Faktor 2.

### 4.5.3 Effekt der Adipokine auf die Mineralisierung durch OA-OB

Ein Mineralisierungsassay (siehe Abschnitt 3.2) wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob Adipokine die Matrix-Mineralisierung durch OA-OB beeinflussen. Die OB wurden für 14 bzw. 21 Tage mit Mineralisierungsmedium mit bzw. ohne Adiponektin, Resistin oder Visfatin kultiviert. Nach Beenden des Versuchs wurde die durch die OB gebildete Matrix mit Alizarin-Rot angefärbt und anschließend fotografisch dokumentiert. Dies ist in Abb. 34 A beispielhaft für drei verschiedene OB-Populationen dargestellt. Optisch ließen sich keine Unterschiede in der Stärke der Mineralisierung feststellen. Die Quantifizierung der Mineralisierung erfolgte

modifiziert nach Gregory *et al.* (siehe Abschnitt 3.2), indem die Menge des an die Matrix gebundenen Alizarin-Rot photometrisch ermittelt wurde. Die Quantifizierung ergab eine nicht-signifikante Verstärkung der Mineralisierung durch Adiponektin ( $109,57\% \pm 14,54\%$ ), Resistin ( $107,41\% \pm 12,63\%$ ) und Visfatin ( $104,24\% \pm 6,91\%$ ) wie in Abb. 34 B graphisch dargestellt.

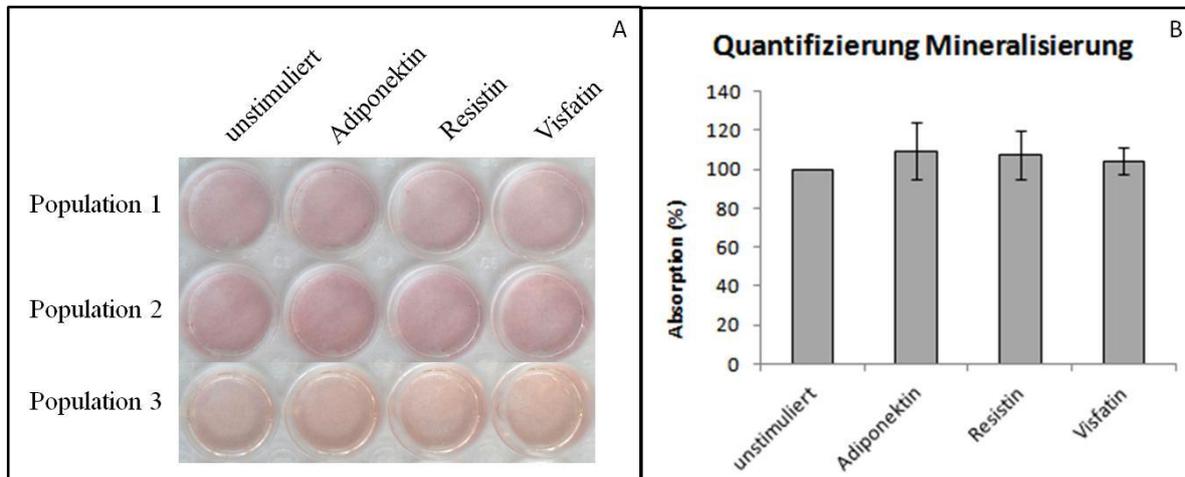


Abb. 34: Mit Alizarin-Rot angefärbte, durch OA-OB mineralisierte Matrix nach 14 d Inkubation mit Mineralisierungsmedium (unstimuliert) und zusätzlicher Stimulation mit Adiponektin, Resistin oder Visfatin (A). Quantifizierung der Mineralisierungsaktivität der OB nach 14 d Inkubation mit Mineralisierungsmedium und Stimulation mit Adiponektin, Resistin oder Visfatin. Angegeben ist die Absorption des Alizarin-Rot in Prozent in Abhängigkeit von der unstimulierten Kontrolle,  $n=5$  (B).

#### 4.5.4 Effekt der Adipokine auf den Wnt-Signalweg bei OA-OB

##### 4.5.4.1 Analyse von $\beta$ -Catenin nach Adipokin-Stimulation

Anhand von Kernextrakten von OB wurde mittels Western Blot Analyse untersucht, ob Adipokine möglicherweise auf den Wnt-Signalweg Einfluss nehmen. OB-Kulturen wurden hierfür 4 h mit Adiponektin, Resistin oder Visfatin stimuliert. Die Kernextrakte (Punkt 3.3.8.3) der Zellen wurden gewonnen und hinsichtlich ihres  $\beta$ -Catenin-Gehaltes untersucht.

Der Proteingehalt der Kernextrakte wurde bestimmt, allerdings lagen die Proteinkonzentrationen stets im unteren Messbereich des verwendeten Assays. Ausgehend von den gemessenen Werten wurde für die SDS-Page für alle Proben die gleiche Menge an Protein aufgetragen. Jedoch zeigte sich anhand der als Ladungskontrolle dienenden Silberfärbung, dass dennoch Schwankungen in der Ladungsmenge auftraten. Auch die Silberfärbung selbst stellte sich bei dieser Methode oft als problematisch dar, da auch sie trotz ihrer hohen Sensitivität teilweise zu schwache Signale aufgrund des limitierten primären

humanen Zellmaterials lieferte, um als Ladungskontrolle verwendet zu werden. Aus diesen Gründen waren die Ergebnisse des Western Blots nur schwer auswertbar. In Abb. 35 A ist ein Beispiel eines  $\beta$ -Catenin Western Blots mit dazugehöriger Silberfärbung dargestellt. Abb. 35 B zeigt die dazugehörige Auswertung, die mit Hilfe des Programmes Quantity One (BioRad) vorgenommen wurde.

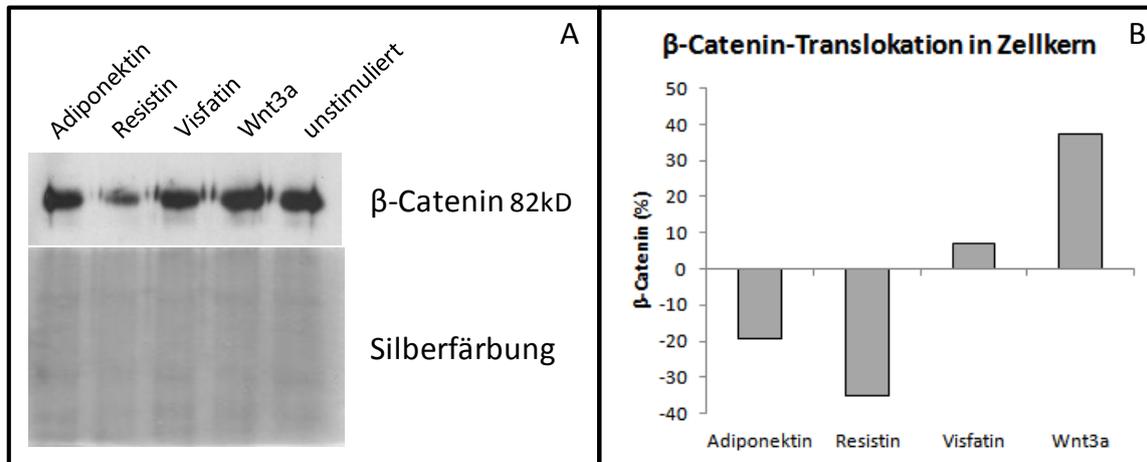


Abb. 35: Beispielhafte Darstellung eines Western Blots gegen  $\beta$ -Catenin auf Kernextrakten von OB. Stimulation für 4 h mit Adiponektin, Resistin und Visfatin, Wnt3a diene als Positivkontrolle. Als Ladungskontrolle wurde die dazugehörige Silberfärbung der unteren Hälfte des SDS-Gels verwendet (A). Auswertung des Western Blots im Vergleich mit der Silberfärbung als Ladungskontrolle. Dargestellt ist  $\beta$ -Catenin in Prozent abhängig von der unstimulierten Kontrolle, welche als Basis auf null gesetzt wurde (B).

Anhand des oben gezeigten Beispiels zeigt sich eine verstärkte Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern, wenn die Zellen mit Wnt3a, das als Positivkontrolle diene, stimuliert wurden. Desweiteren war eine Reduktion der Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern nach Adiponektin-Stimulation (ca. 20%) und Resistin-Stimulation (ca. 35%) erkennbar. Da diese Ergebnisse sich jedoch mit anderen Populationen nicht wiederholen ließen, wurde eine alternative Methode zur Untersuchung des Einflusses der Adipokine auf den Wnt-Signalweg angewendet.

#### 4.5.4.2 Analyse der Axin2-Expression nach Adipokin-Stimulation

Da mit den Western Blot Untersuchungen anhand von Kernextrakten aufgrund des limitiert verfügbaren Zellmaterials keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde die Genexpression von Axin2 als Zielgen des Wnt-Signalwegs mittels Real-Time PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 36 graphisch dargestellt. Die Positivkontrolle Wnt3a zeigt eine signifikante Steigerung der Axin2-Genexpression um den Faktor  $407,6\% \pm 4,1\%$

(2 h),  $1260,7\% \pm 699,1\%$  (4 h) und  $2142,7\% \pm 498,2\%$  (6 h). Die mit den Adipokinen stimulierten Proben zeigen jedoch trotz teilweisem Erreichen von signifikanten Werten ( $n = 4$ ) keine physiologisch relevante Veränderungen der Axin2-Genexpression über dem Regulationsfaktor von  $\pm 2$ .

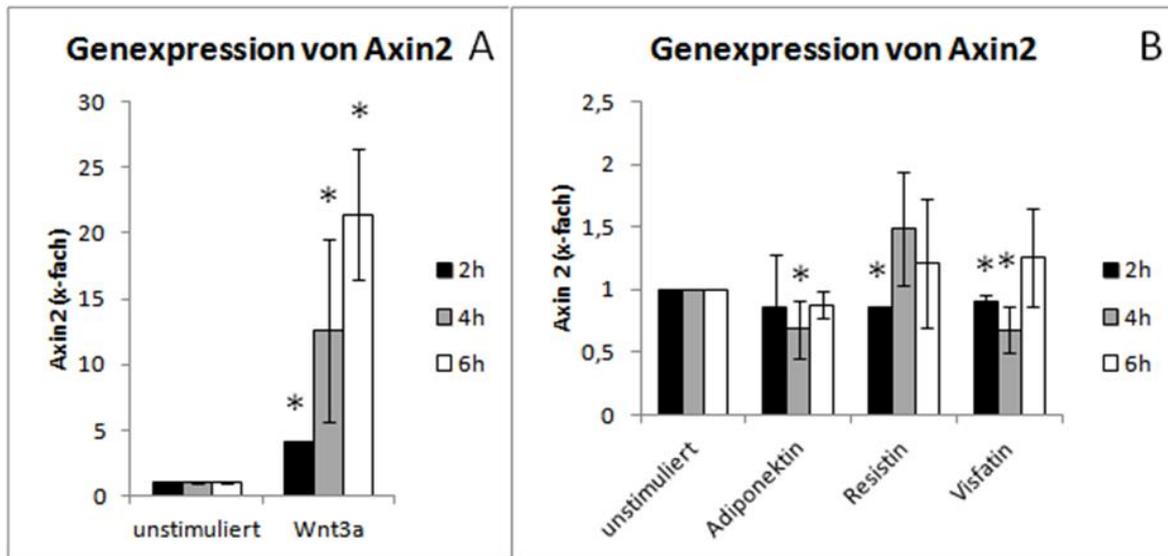


Abb. 36: Regulationsfaktoren der Genexpression von Axin2 von OB stimuliert mit der Positivkontrolle Wnt3a (A) und mit Adiponektin, Resistin und Visfatin (B). Die unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt. Durch Wnt3a wird die Axin2-Expression über die Zeit erhöht, während Adiponektin, Resistin und Visfatin keinen physiologisch relevanten Effekt auf die Axin2-Expression haben. Daten sind signifikant ab  $p < 0,05$  (\*),  $n = 4$ .

#### 4.5.4.3 Effekt der Adipokine auf die Wnt-Inhibitoren DKK1 und SOST

Zur Prüfung, ob die Adipokine möglicherweise einen indirekten Einfluss auf den Wnt-Signalweg haben, wurden OB mit den Adipokinen Adiponektin, Resistin und Visfatin stimuliert und anschließend die Menge der abgegebenen Wnt-Inhibitoren DKK1 und SOST mittels ELISA gemessen. Die Stimulation der OB mit den Adipokinen über 4 h führte zu keinen signifikanten Änderungen der DKK1-Abgabe wie in Abb. 37 graphisch dargestellt. SOST konnte mit dem verwendeten ELISA im ZKÜ der stimulierten OB nicht nachgewiesen werden.

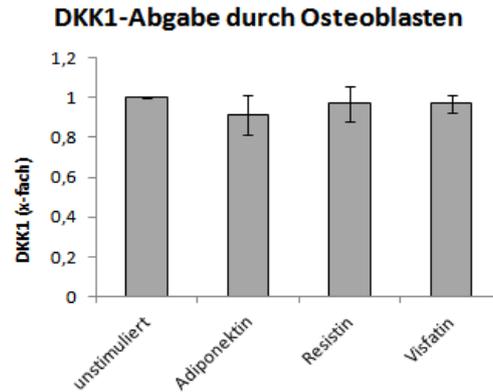


Abb. 37: Regulationsfaktoren der DKK1-Abgabe von OB nach 4 h Stimulation mit Adiponektin ( $0,91 \pm 0,1$ ), Resistin ( $0,97 \pm 0,09$ ) oder Visfatin ( $0,97 \pm 0,04$ ),  $n=7$ . Die unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt.

#### 4.5.4.4 Effekt der Kostimulation von Adipokinen mit Wnt3a, DKK1 und SOST

Um zu untersuchen, ob eine Modulation des Wnt-Signalwegs in Kombination mit den Adipokinen einen Effekt auf die OB hat, wurden Kostimulationen durchgeführt. Die Stimulation der OB mit Wnt3a sowie der Kostimulation mit den Adipokinen führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der IL-6-Abgabe (Wnt3a:  $65,15\% \pm 20,16\%$ ; Wnt3a + Adiponektin:  $81,76\% \pm 21,97\%$ ; Wnt3a + Resistin:  $66,4\% \pm 8,25\%$ ; Wnt3a + Visfatin:  $78,41\% \pm 13,42\%$ ). Die Stimulation der OB mit DKK1 sowie der Kostimulation mit den Adipokinen führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung der IL-6-Abgabe (DKK1:  $124,03\% \pm 14,34\%$ ; DKK1 + Adiponektin:  $168,25\% \pm 4,29\%$ ; DKK1 + Resistin:  $125,15\% \pm 8,0\%$ ; DKK1 + Visfatin:  $153,34\% \pm 16,73\%$ ). Die Ergebnisse sind in Abb. 38 graphisch dargestellt. Eine Stimulation der OB mit SOST führte zum Absterben der Zellen, ebenfalls bei einer Kostimulation mit den Adipokinen.

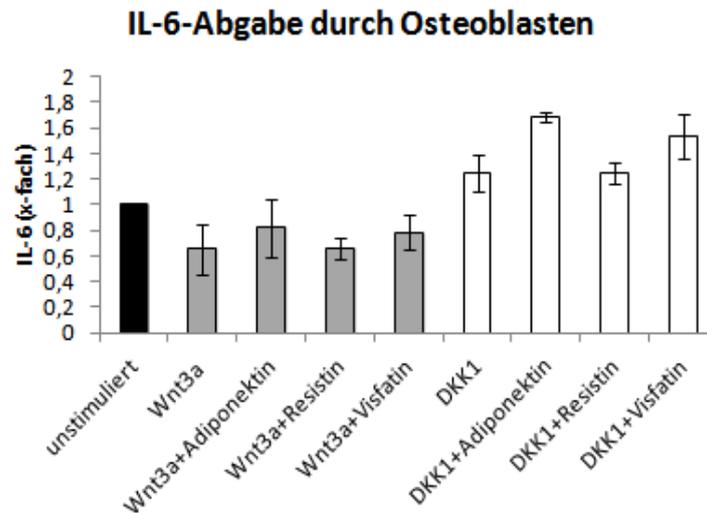


Abb. 38: IL-6-Abgabe durch OB nach 24 h Stimulation mit Wnt3a, DKK1 sowie der Kostimulation mit jeweils Adiponektin, Resistin und Visfatin, n=3. Die unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt. Die mit Wnt3a stimulierten Proben zeigten unabhängig von der Adipokin-Kostimulation eine nicht signifikante Reduktion der IL-6-Abgabe, wohingegen die mit DKK1-stimulierten Proben unabhängig von der Adipokin-Kostimulation eine Erhöhung der IL-6-Abgabe zeigten.

#### 4.6 Effekt der Modulation des Wnt-Signalwegs auf die Adipokinproduktion von OA-OB

Es wurde überprüft, ob es durch eine Modulation des Wnt-Signalweges in den Osteoblasten zu einer veränderten Expression der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin kommt. Die intrinsische Adipokinproduktion von OB wurde mittels ELISA gemessen. Die Adiponektin-Level die nach 24 h in den ZKÜ abgegeben wurden, waren zu gering um sie mittels ELISA detektieren zu können ( $< 1,56$  ng/ml). Dies war auch nach Stimulation mit Wnt3a bzw. DKK1 der Fall. Auch die abgegebenen Visfatin-Level lagen populationsabhängig unterhalb der Nachweisgrenze ( $< 0,125$  ng/ml) des ELISAs. Nach Stimulation mit Wnt3a bzw. DKK1 konnte auch hier keine einheitliche Veränderung in der Visfatin-Abgabe detektiert werden. Die Stimulation von Wnt3a bzw. DKK1 führt zu keiner signifikanten Veränderung der Resistin-Abgabe (Abb. 39).

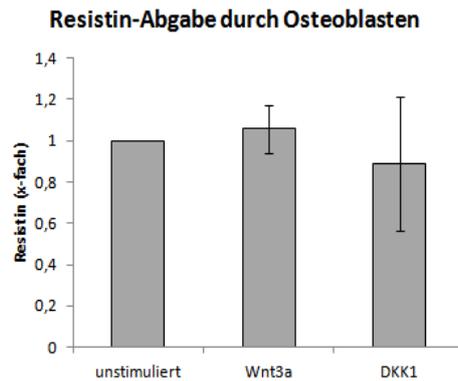


Abb. 39: Regulationsfaktor der Resistinabgabe von OB nach 24 h Stimulation mit Wnt3a ( $1,06 \pm 0,12$ ) bzw. DKK1 ( $0,89 \pm 0,32$ ),  $n=4$ . Die unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt.

#### 4.7 Effekt von Adiponektin auf den p38-MAPK Signalweg in OB

Da bekannt ist, dass Adiponektin beispielsweise in Fibroblasten seine Wirkung über den p38-MAPK-Signalweg vermittelt, wurde dieser Signalweg untersucht, da eine Adiponektin-abhängige Induktion pro-entzündlicher Faktoren in OA-OB beobachtet werden konnte und der Wnt-Signalweg durch die Adipokine nicht verändert wurde. Dafür wurde die Phosphorylierung von p38-MAPK (p38-Phospho) mittels Western Blot im Vergleich zum gesamten p38-MAPK (p38-Total) detektiert. Als Ladungskontrolle zur Normalisierung der Proben diente Cyclophilin B. Ein Beispiel für den Western Blot ist in Abb. 39 A dargestellt. Die Untersuchung verschiedener OB-Populationen zeigte, dass bei einigen Populationen eine verstärkte Phosphorylierung von p38-MAPK nach Adiponektin-Stimulation auftrat. Dies war bei 3 von 5 analysierten Populationen der Fall. Bei den anderen beiden Populationen konnte eine geringfügige Reduktion der Phosphorylierung nach Adiponektin-Stimulation detektiert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 40 B graphisch dargestellt.

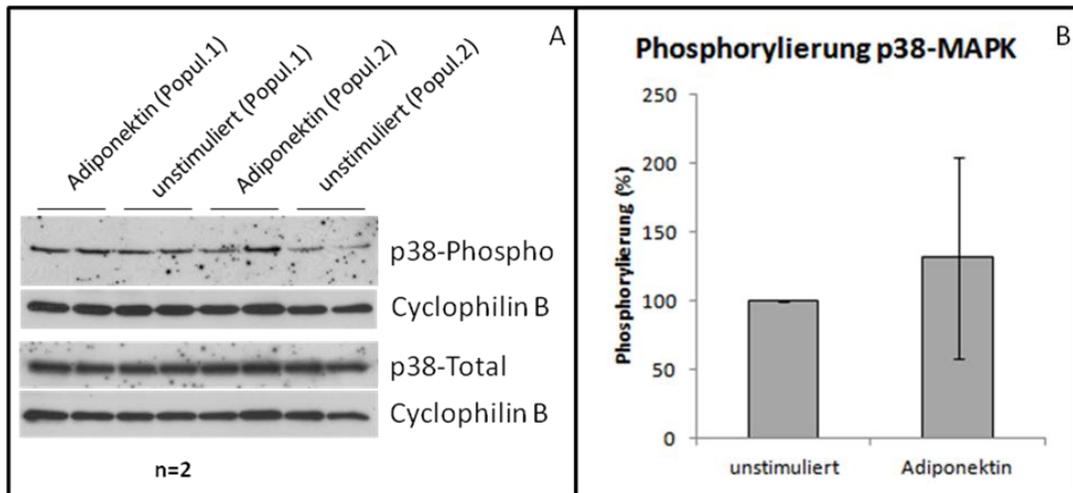


Abb. 40: Beispiel für einen Western Blot mit zwei OB-Populationen zur Detektion von p38-Phospho und p38-Total nach Adiponektin-Stimulation. Als Ladungskontrolle diente Cyclophilin B (A). Prozentuale Änderung der Phosphorylierung von p38-MAPK bei OB nach 10 min Stimulation mit Adiponektin ( $126,32\% \pm 81,84\%$ ;  $n=5$ ) (B).

## 4.8 Effekt von Visfatin auf Chondrozyten

### 4.8.1 Effekt von Visfatin auf die Abgabe von Entzündungsmediatoren und VEGF durch OA-CH

Da sich bei der Charakterisierung der Osteophyten gezeigt hatte, dass Visfatin in CH nachweisbar war, wurde der Einfluss von Visfatin auf CH überprüft. Hierfür wurden OA-CH für 17h mit Visfatin stimuliert, anschließend wurde die Abgabe von Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-8 und IL-1 mittels ELISA untersucht. Ebenfalls analysiert wurde die Abgabe des Wachstumsfaktors VEGF.

Die Entzündungsparameter IL-1 und IL-8 waren mit den ELISA-Untersuchungen weder im ZKÜ der unstimulierten, noch der Visfatin-stimulierten OA-CH nachweisbar. Im Fall der IL-6 Sekretion zeigte sich nach 24 h Visfatin-Stimulation eine Erhöhung der IL-6-Abgabe ( $2654,37\% \pm 3831,58\%$ ,  $p = 0,13$ ). Allerdings zeigten sich im bezug auf die IL-6-Sekretion durch CH große populationsabhängige Unterschiede, wodurch keine statistische Signifikanz erreicht wurde ( $n = 7$ ).

Der Wachstumsfaktor VEGF konnte ebenfalls im ZKÜ der CH detektiert werden. Die Stimulation mit Visfatin führte zu keiner signifikanten Änderung der VEGF-Abgabe der CH ( $104,16\% \pm 8,23\%$ ,  $p = 0,9$ ). Zusätzlich zu den OA-CH wurde eine Population gesunder CH analysiert. Es konnte keine relevante Veränderung in der IL-6- oder der VEGF-Abgabe durch diese CH detektiert werden.

In Abb. 41 sind die Konzentrationsänderungen der IL-6- und VEGF-Abgabe der einzelnen Populationen graphisch dargestellt. Die gesunden CH sind in der Grafik als rote Punkte mit roter Linie dargestellt (●—●).

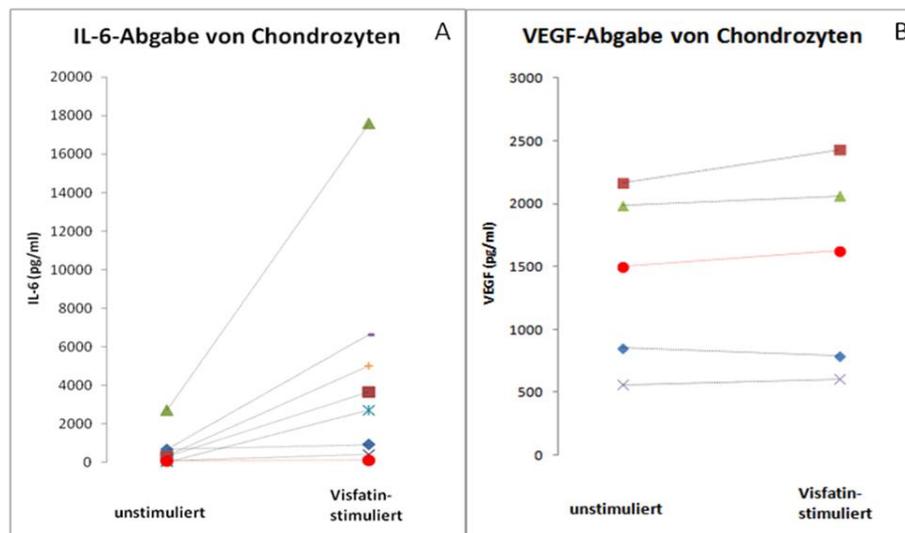


Abb. 41: Vergleich der Proteinkonzentrationen von IL-6 (A) und VEGF (B) von unstimulierten mit Visfatin-stimulierten OA-CH-Populationen sowie einer gesunden CH-Population (●—●). Es war keine Änderung der IL-6-Abgabe durch gesunde CH nach Visfatin-Stimulation erkennbar, fünf der sieben untersuchten OA-CH-Populationen zeigen eine deutliche Steigerung der IL-6-Abgabe nach Stimulation mit Visfatin. Auf die VEGF-Abgabe hatte Visfatin weder bei den OA-CH noch den gesunden CH einen Einfluss.

#### 4.8.2 Effekt von Visfatin auf die CH-spezifische Genexpression

Der Einfluss von Visfatin auf die Expression CH-spezifischer Gene wurde mittels *Real-Time* PCR untersucht. Die Expression der Gene für die Matrixkomponenten Kollagen Typ I (Koll1), Kollagen Typ II (Koll2), Kollagen Typ X (Koll10) und Aggrecan, der Matrix-Abbauenden Enzyme ADAMTS5, MMP9 und MMP13, des Transkriptionsfaktors sox9 sowie des für den Wnt-Signalweg wichtigen Proteins  $\beta$ -Catenin wurden analysiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion von Koll2 ( $64,48\% \pm 25,84\%$ ,  $p = 0,015$ ) und Koll10 ( $80,19\% \pm 16,11\%$ ,  $p = 0,03$ ). Desweiteren war die Genexpression von MMP9 ( $320,82\% \pm 264,7\%$ ,  $p = 0,1$ ) und MMP13 ( $290,64\% \pm 237,99\%$ ,  $p = 0,1$ ) erhöht, erreichte jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung keine Signifikanz ( $n = 5$ ). Die übrigen analysierten Gene zeigten keine signifikanten bzw. physiologisch relevanten Veränderungen in ihrer Genexpression (Abb. 42).

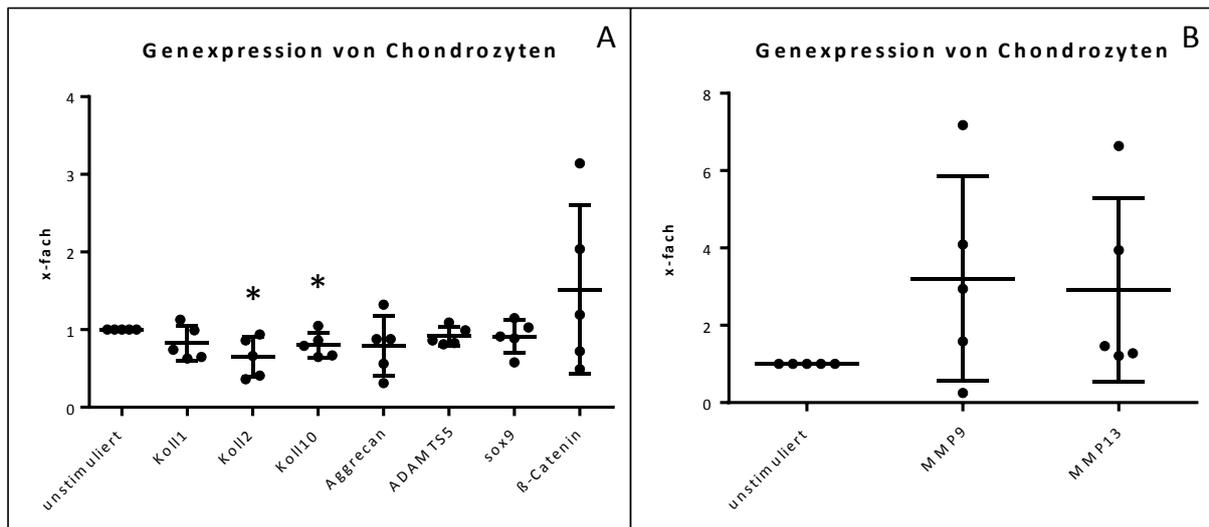


Abb. 42: Genexpression von Koll1, Koll2, Koll10, Aggrecan, ADAMTS 5, sox9,  $\beta$ -Catenin (A) und MMP9 und MMP13 (B) nach 24 h Stimulation von CH mit Visfatin. Die unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde jeweils auf 1 gesetzt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Genexpression von Kollagen Typ II und Kollagen Typ X (A) sowie eine nicht signifikante aber physiologisch relevante Steigerung der Genexpression von MMP9 und MMP13 (B) nach Stimulation mit Visfatin. Die Expression aller übrigen Gene wurde durch Visfatin-Stimulation nicht beeinflusst. Das Signifikanzniveau entspricht  $p < 0,05$  (\*),  $n = 5$ .

### 4.8.3 Effekt von Visfatin auf den Wnt-Signalweg bei OA-CH

#### 4.8.3.1 Analyse von $\beta$ -Catenin nach Visfatin-Stimulation von OA-CH

Der Einfluss von Visfatin auf den Wnt-Signalweg wurde mittels Western Blot Analyse von Kernextrakten von CH hinsichtlich ihres  $\beta$ -Catenin-Gehaltes untersucht. Allerdings traten wie auch bei der Untersuchung von OB bei den CH aufgrund der sehr geringen Proteinmengen Probleme mit der Auswertbarkeit der Ergebnisse der Western Blot Analyse auf. Ein Beispiel eines Western Blots gegen  $\beta$ -Catenin mit dazugehöriger Silberfärbung ist in Abb. 43 A dargestellt. Abb. 43 B zeigt die Auswertung mit Hilfe des Programmes Quantity One.

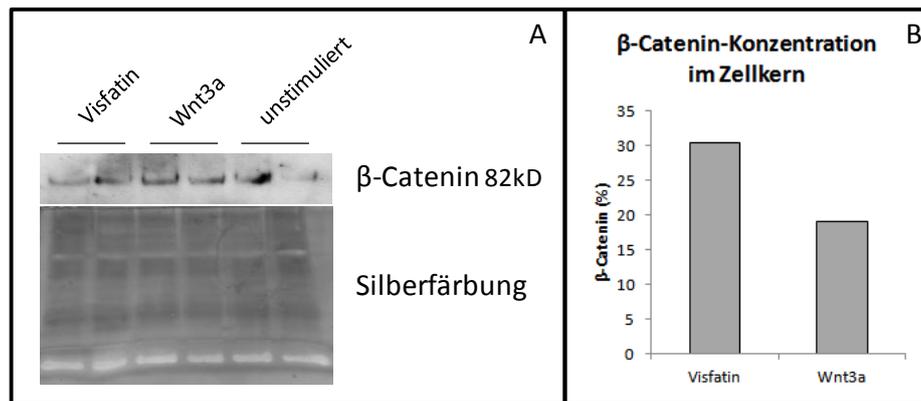


Abb. 43: Beispielhafte Darstellung eines Western Blots gegen  $\beta$ -Catenin auf Kernextrakte von CH. Stimulation für 4 h mit Visfatin, Wnt3a diente als Positivkontrolle. Als Ladungskontrolle wurde die dazugehörige Silberfärbung der unteren Hälfte des SDS-Gels verwendet (A). Auswertung des Western Blots im Vergleich mit der Silberfärbung als Ladungskontrolle. Dargestellt ist  $\beta$ -Catenin in Prozent abhängig von der unstimulierten Kontrolle, welche als Basis auf null gesetzt wurde (B).

Anhand des oben gezeigten Beispiels ist eine verstärkte Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern nach Stimulation der Zellen mit Visfatin (ca. 30%) und Wnt3a (ca. 20%) erkennbar. Allerdings ließen sich diese Ergebnisse nicht mit anderen Populationen reproduzieren, weshalb eine alternative Methode zur Untersuchung des Einflusses von Visfatin auf den Wnt-Signalweg angewendet wurde.

#### 4.8.3.2 Analyse der Axin2-Expression in OA-CH nach Visfatin-Stimulation

Die Genexpression von Axin2 wurde mittels *Real-Time* PCR untersucht, um den Einfluss von Visfatin auf den Wnt-Signalweg zu analysieren. Die Stimulation der OA-CH mit Visfatin für 2 h ( $114,49\% \pm 21,91\%$ ,  $p=0,23$ ), 4 ( $97,33\% \pm 36,71\%$ ,  $p=0,91$ ) und 6 h ( $125,68\% \pm 52,64\%$ ,  $p=0,52$ ) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Axin2-Genexpression. Die Stimulierung mit der Positivkontrolle Wnt3a für 2 h ( $154,51\% \pm 31,14\%$ ,  $p=0,08$ ), 4 h ( $216,23\% \pm 76,91\%$ ,  $p=0,06$ ) und 6 h ( $302,21\% \pm 63,37\%$ ,  $p=0,002$ ) zeigte eine Verstärkung der Axin2-Genexpression im zeitlichen Verlauf (Abb. 44 A).

Die Analyse der Genexpression von Axin2 der gesunden CH (Abb. 44 B) zeigte eine Verringerung der Axin2-Genexpression nach Visfatin-Stimulation nach 2 h (61,99%), 4 h (69,79%) und 6 h (41,67%). Die Stimulation mit Wnt3a führte zu einer Verstärkung der Axin2-Genexpression nach 2 h (203,21%), 4 h (348,22%) und 6 h (240,83%).

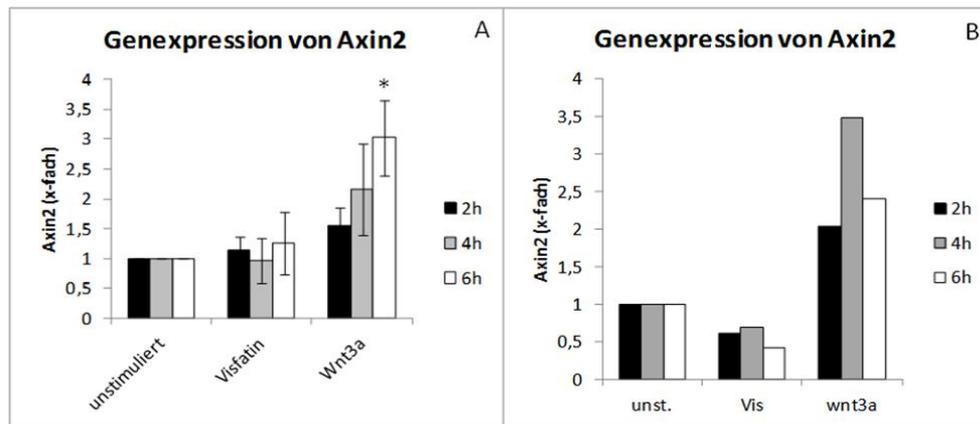


Abb. 44: Axin2-Genexpression in OACH (A, 2h, 4h: n = 4; 6h: n = 3) und gesunden CH (B, n = 1) nach Stimulation mit Visfatin und Wnt3a, Daten sind signifikant ab  $p < 0,05$  (\*). Die unstimulierte Kontrolle diente als Basis und wurde auf 1 gesetzt. Die Stimulation von OA-CH mit Visfatin zeigte keinen Einfluss auf die Axin2-Genexpression, wohingegen bei den gesunden CH die Axin2-Genexpression durch Visfatin reduziert wurde. Wnt3a verstärkte die Axin2-Genexpression bei OA-CH sowie bei den gesunden CH.

#### 4.8.3.3 Effekt von Visfatin auf Wnt-Inhibitoren

Mittels ELISA wurde untersucht, ob Visfatin Einfluss auf die Sekretion der Wnt-Inhibitoren DKK1 und SOST durch CH nimmt. Die Level der beiden Inhibitoren im ZKÜ von OACH waren jedoch stimulationsunabhängig unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs. Somit ist keine Aussage dazu möglich, ob Visfatin in OA-CH zu einer Veränderung der Sekretion von Wnt-Inhibitoren führt.

#### 4.8.3.4 Effekt der Kostimulation von Visfatin mit Wnt3a

Um zu untersuchen, ob die Induktion des Wnt-Signalwegs in Kombination mit Visfatin einen Effekt auf die Zytokinproduktion von OA-CH hat wurden Kostimulationen mit Visfatin und Wnt3a über 24 h durchgeführt und anschließend die Sekretion von IL-6 und VEGF mittels ELISA bestimmt. Die Stimulation der OA-CH (Abb. 45 A, B) mit Wnt3a führte zu einer verstärkten IL-6-Abgabe ( $368,2\% \pm 69,94\%$ ) und einer verminderten VEGF-Abgabe ( $56,71\% \pm 0,32\%$ ). Die Kostimulation mit Wnt3a und Visfatin führte zu einem synergistischen Effekt, der sich in einer weiteren Steigerung der IL-6-Sekretion ( $1564,86\% \pm 1795,49\%$ ) zeigte. Allerdings bestanden populationsabhängige Schwankungen hinsichtlich der IL-6 Sekretion nach Kostimulation mit Wnt3a und Visfatin. Die VEGF-Sekretion war ebenfalls vermindert ( $63,45\% \pm 7,68\%$ ), allerdings zeigte sich hier kaum ein Unterschied zu den nur mit Wnt3a stimulierten Zellen.

Die Stimulation von gesunden CH (Abb. 45 C, D) mit Wnt3a führte zu einer leichten Verringerung der IL-6-Abgabe (78,4%) und der VEGF-Abgabe (74,5%) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (= 100%). Auch die Kostimulation mit Visfatin resultierte in einer geringfügigen Verminderung der IL-6-Sekretion (73,51%) sowie der VEGF-Sekretion (78,52%), die allerdings dem Wert nach Zugabe von Wnt3a allein entsprach.

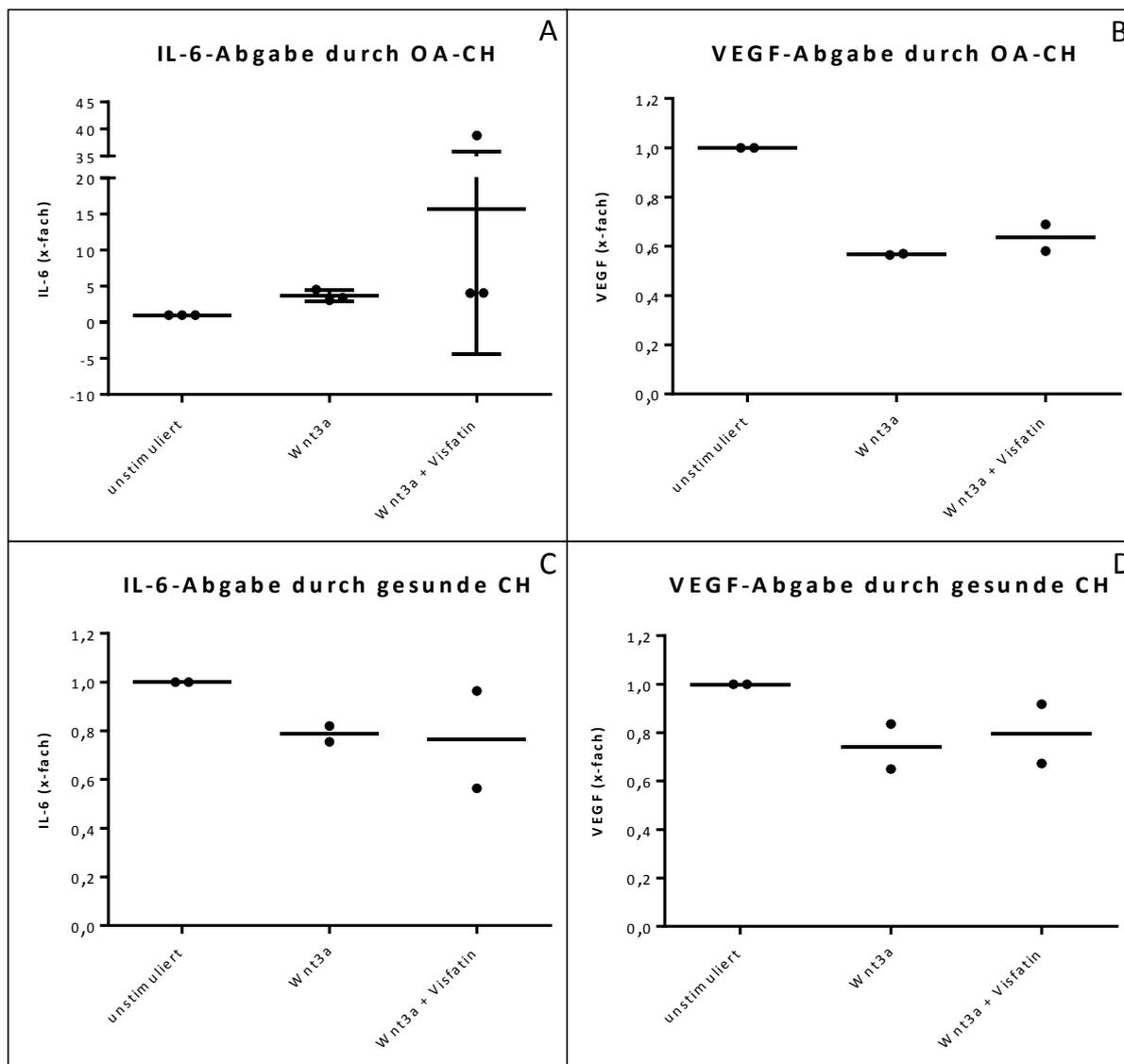


Abb. 45: Regulationsfaktoren der IL-6-Abgabe von OA-CH (A) und gesunden CH (C) sowie der VEGF-Abgabe von OA-CH (B) und gesunden CH (D) nach 24 h Stimulation mit Wnt3a sowie der Kostimulation von Wnt3a mit Visfatin, n=3 (A), n = 2 (B), n = 1 (dargestellt sind zwei experimentelle Replikate; C+D). Wnt3a erhöht die IL-6-Abgabe von OA-CH, was bei Kostimulation mit Visfatin nochmals gesteigert wird. Die VEGF-Abgabe wird durch Wnt3a unabhängig von der Kostimulation mit Visfatin reduziert. Bei gesunden CH wirkt Wnt3a unabhängig von der Visfatin-Kostimulation reduzierend auf IL-6 und VEGF.

## 4.9 Effekt der Induktion des Wnt-Signalwegs auf die Visfatinproduktion von CH

Eine Veränderung der Visfatin-Expression der OA-CH durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs mittels des Wnt-Proteins Wnt3a wurde untersucht, indem die intrinsische Visfatinproduktion der CH mit Hilfe eines ELISAs gemessen wurde. Die durch die CH abgegebenen Visfatinkonzentrationen variierten stark populationsabhängig und lagen an der unteren Nachweisgrenze des ELISAs ( $< 0,125$  ng/ml) bzw. zum Teil darunter. Deshalb war eine statistische Auswertung nicht möglich, allerdings zeigten die OA-CH keine verstärkte Visfatinproduktion nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs.

## 4.10 Analyse der Adipokin-Serumspiegel bei PsA- und AS-Patienten

### 4.10.1 Adipokin-Serumspiegel und Osteophytenbildung bei der PsA

Die mögliche Korrelation der Serum-Konzentrationen von Adiponektin, Resistin und Visfatin mit der Entstehung von Osteophyten wurde bei PsA-Patienten untersucht. Dafür wurden uns freundlicherweise PsA-Serumproben von der Arbeitsgruppe (AG) Rheumatologie (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, Medizinische Klinik 3) zur Verfügung gestellt. Dort wurden auch die Patientendaten (Tab. 20) erhoben sowie Mikro-CT-Analysen der Fingergrundgelenke 2-4 hinsichtlich des Vorhandenseins von Osteophyten und Erosionen durchgeführt. Diese Daten wurden uns für die statistische Auswertung und Korrelationsanalyse zur Verfügung gestellt.

Tab. 20 Patientendaten der 27 untersuchten PsA-Patienten (Erhoben von der AG Rheumatologie, FAU Erlangen).

Patientendaten	PsA-Patienten
Alter (Jahre)	53,93±11,34
Geschlecht (% , ♂ / ♀)	44,4 / 55,6
CRP	6,37±14,0
BSG	15,52±10,49
Krankheitsdauer (Monate)	106,85±106,51
DAS28	3,48±1,76
Osteophyten (Anzahl)	10,74±7,16
Erosionen (Anzahl)	3,41±5,65

Es wurden die Serumspiegel von Adiponektin, Resistin und Visfatin von 27 PsA-Patienten mittels ELISA gemessen. Anschließend wurden die Mikro-CT-Analysen bezüglich der Anzahl von Osteophyten ausgewertet. Da es beim Krankheitsbild der PsA nicht nur zum Knochenaufbau in Form von Osteophyten kommt sondern auch zu degenerativen Ereignissen in Form von Erosionen, wurden auch diese mit in die Auswertung einbezogen. Die Patienten wurden hinsichtlich ihrer Osteophytenanzahl unterschieden: (0-5 Osteophyten: n=9, 6-10 Osteophyten: n=5, 11-15 Osteophyten: n=7, mehr als 15 Osteophyten: n=6). Ebenfalls erfolgte die Unterscheidung anhand der Anzahl von Erosionen: (0-2 Erosionen: n = 16, 3-5 Erosionen: n=7, mehr als 5 Erosionen: n=4). Anschließend erfolgte die Analyse der Adipokin-Serumspiegel hinsichtlich der Anzahl der Osteophyten bzw. der Erosionen.

Es zeigte sich hierbei, dass die Serumspiegel von Adiponektin, Resistin und Visfatin nicht von der Anzahl an Osteophyten (Abb. 46) oder Erosionen (Abb. 47) an den Fingergrundgelenken 2-4 abhängig sind.

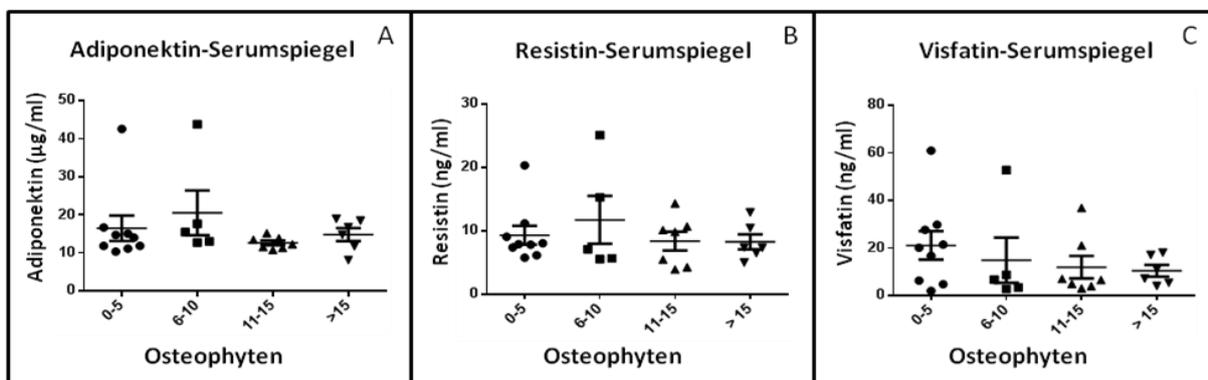


Abb. 46: Serumspiegel von Adiponektin (A), Resistin (B) und Visfatin (C) gemessen bei 27 PsA-Patienten in Abhängigkeit von der Osteophytenanzahl an den Fingergrundgelenken 2-4. Es waren keine signifikanten Unterschiede in den Adipokin-Serumspiegeln abhängig von der Osteophytenanzahl nachweisbar.

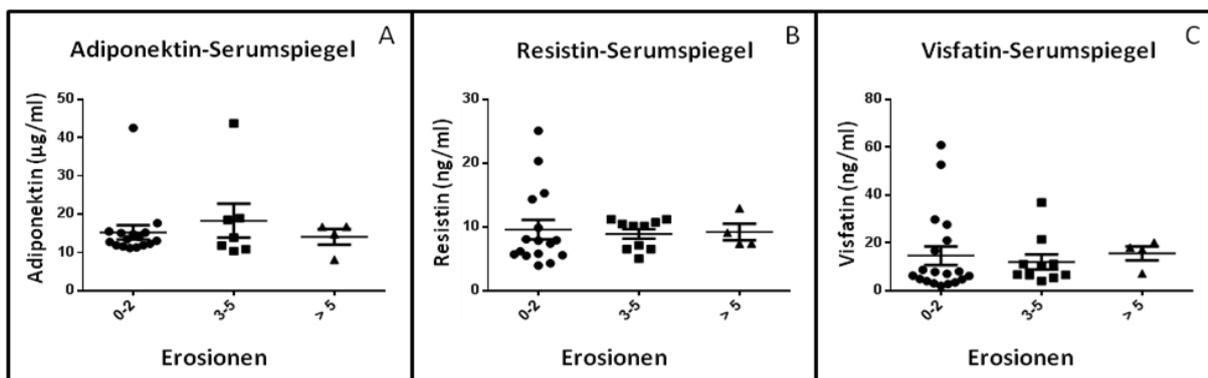


Abb. 47: Serumspiegel von Adiponektin (A), Resistin (B) und Visfatin (C) gemessen bei 27 PsA-Patienten in Abhängigkeit von der Anzahl an Erosionen der Fingergrundgelenke 2-4. Es waren keine signifikanten Unterschiede in den Adipokin-Serumleveln abhängig von der Erosionsanzahl nachweisbar.

Zusätzlich wurden verschiedene Parameter wie Alter, Geschlecht, CRP, DAS28 und die Krankheitsdauer (siehe Tabelle 20) mit dem gemessenen Serumspiegeln von Adiponektin, Resistin und Visfatin korreliert. Auch hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 48). Die Adipokin-Serumspiegel der hier analysierten Parameter wurden zudem mit der Osteophytenanzahl korreliert. Allerdings konnten dabei ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

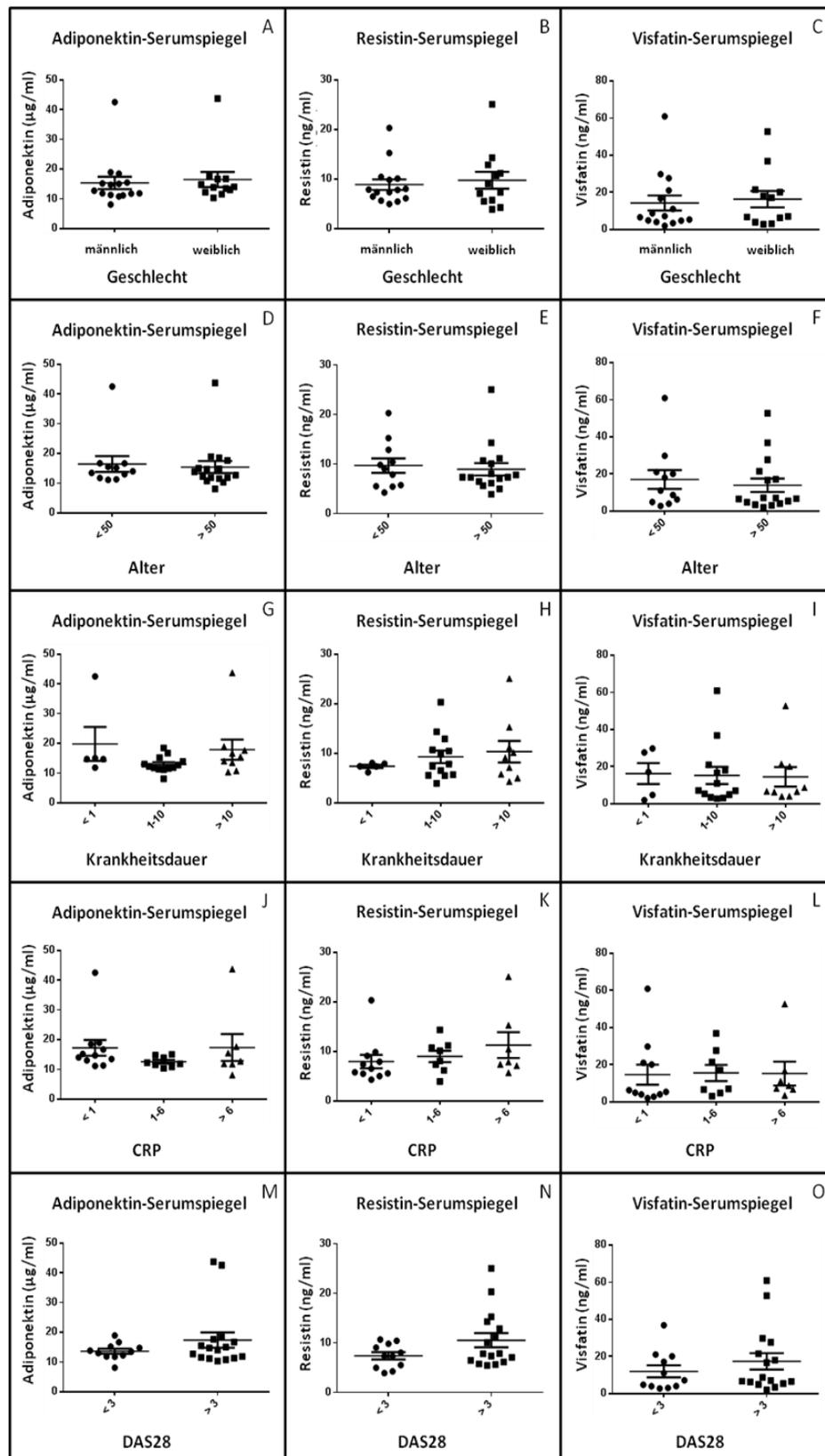


Abb. 48: Serumpiegel von Adiponektin (A, D, G, J, M), Resistin (B, E, H, K, N) und Visfatin (C, F, I, L, O) im Vergleich mit dem Geschlecht (männlich n=12, weiblich n=15), dem Alter (unter 50 Jahre n=11, über 50 Jahre n=16), der Krankheitsdauer (bis zu 1 Jahr n=5, 1 bis 10 Jahre n=13, länger als 10 Jahre n=9), dem CRP (unter 1 n=11, 1 bis 6 n=8, über 6 n=7) und dem DAS28 (bis 3 n=11, über 3 n=16). Es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

#### 4.10.2 Adipokin-Serumspiegel und Syndesmophytenbildung bei der AS

Die Serum-Konzentrationen von Adiponektin, Resistin und Visfatin wurden bei AS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bestimmt. Innerhalb der AS-Patienten wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Adipokinspiegeln und der Knochenneubildung in Form von Syndesmophyten besteht. Für die Analyse der Adipokin-Serumspiegel bei AS-Patienten wurden uns freundlicherweise Serumproben von der AG Rheumatologie (Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin) zur Adipokinmessung zur Verfügung gestellt. Die Messung der Serum-Konzentration von Adiponektin, Resistin und Visfatin erfolgte mittels ELISA, hierbei war die Probenschlüsselung nicht bekannt (Pseudonymisiert). Im Serum von 86 AS-Patienten und von 26 gesunden Kontrollen wurden die Konzentrationen von Adiponektin, Resistin und Visfatin analysiert. Die statistische Auswertung der Daten zur Einbeziehung klinischer Parameter erfolgte durch die AG Rheumatologie (Charité Berlin), welche die gemeinsamen Ergebnisse zur Darstellung in dieser Promotionsarbeit freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Die Serumspiegel von Resistin und Visfatin waren signifikant höher in den AS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Resistin:  $11,64 \pm 10,57$  ng/ml vs.  $6,61 \pm 3,16$  ng/ml,  $p = 0,0134$ ; Visfatin:  $20,87 \pm 48,32$  ng/ml vs.  $3,57 \pm 2,854$  ng/ml,  $p = 0,0153$ , Mann Whitney U Test). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen AS-Patienten und gesunden Kontrollen hinsichtlich der Adiponektinspiegel im Serum ( $12,74 \pm 4,73$  µg/ml vs.  $14,5 \pm 5,31$  µg/ml,  $p = 0,1848$ ).

Des Weiteren wurde eine Unterscheidung der AS-Patienten hinsichtlich der im Röntgenbild der Wirbelsäule nachweisbaren Progression von Knochenneubildung innerhalb von zwei Jahren nach Beginn der Untersuchung vorgenommen. Von den 86 untersuchten AS-Patienten zeigten 28 Patienten eine derartige Progression in Form von Syndesmophyten-Neubildung bzw. -Wachstum nach zwei Jahren. Es zeigte sich, dass Patienten mit Fortschreiten der Krankheit nach zwei Jahren deutlich geringere Adiponektin-Serumspiegel bei Untersuchungsbeginn aufwiesen als Patienten ohne Progression (Abb. 49 A). Die Resistin-Serumspiegel von Patienten mit oder ohne Progression nach zwei Jahren wiesen jedoch keine Unterschiede auf (Abb. 49 B). Die Visfatin-Serumspiegel von Patienten mit Progression waren hingegen signifikant höher als die der Patienten ohne Progression (Abb. 49 C).

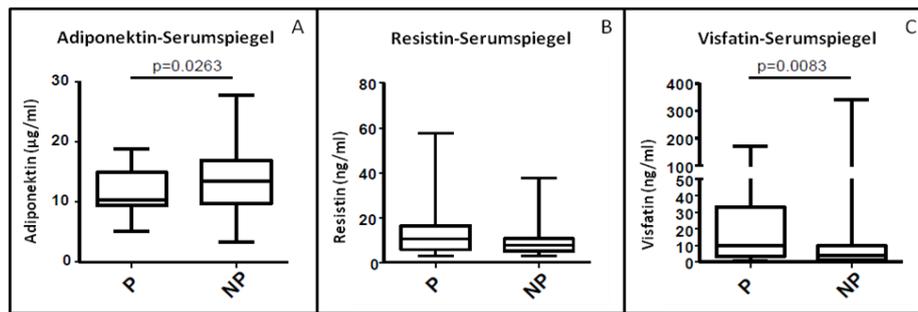


Abb. 49: Serumspiegel von Adiponektin (A), Resistin (B) und Visfatin (C) gemessen bei AS-Patienten mit Progression der Krankheit nach zwei Jahren (P, n = 28) und Patienten ohne Progression nach zwei Jahren (NP, n = 58). Es zeigen sich signifikant höhere Adiponektin-Serumspiegel bei Patienten ohne Progression nach zwei Jahren, sowie signifikant höhere Visfatin-Serumspiegel bei Patienten mit Progression nach zwei Jahren. Die Resistin-Serumspiegel unterschieden sich nicht bezogen auf die Krankheits-Progression. Die Daten sind signifikant ab  $p < 0,05$ . Graphik zur Verfügung gestellt von der AG Rheumatologie (Charité Berlin).

Ebenfalls untersucht wurden die Adipokin-Serumspiegel hinsichtlich eines Zusammenhangs zu Geschlecht, BMI, Entzündungsmarkern sowie weiterer klinischer Marker. Dabei hat sich gezeigt, dass Adiponektin- und Resistin-Level bei weiblichen AS-Patienten signifikant höher waren als bei männlichen AS-Patienten. Die Visfatin-Level zeigten hingegen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Abb. 50).

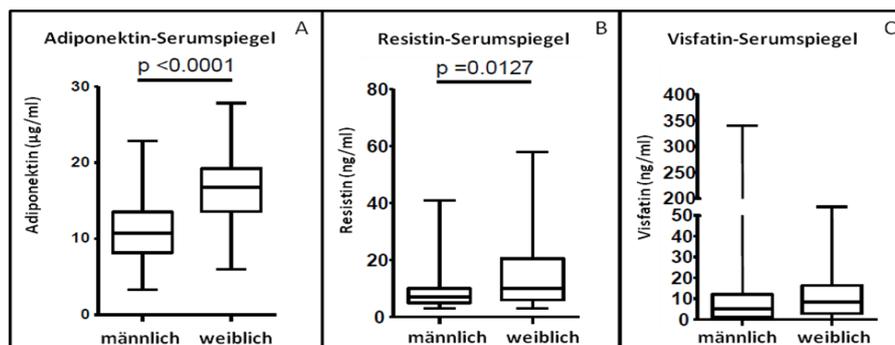


Abb. 50: Vergleich der Serumspiegel von Adiponektin (A), Resistin (B) und Visfatin (C) zwischen männlichen und weiblichen AS-Patienten. Es zeigten sich signifikant höhere Adiponektin- und Resistin-Serumspiegel bei weiblichen Patienten. Die Visfatin-Serumspiegel zeigten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Die Daten sind signifikant ab  $p < 0,05$ . Graphik zur Verfügung gestellt von der AG Rheumatologie (Charité Berlin).

Weiterhin zeigte sich, dass bei weiblichen AS-Patienten die Adiponektin-Serumspiegel von Patienten mit Progression über zwei Jahre signifikant geringer waren als bei Patienten ohne Progression (Abb. 51 A), wohingegen die Resistin-Serumspiegel weiblicher Patienten mit Progression deutlich höher waren als bei Patienten ohne Progression ( $p = 0,0635$ , Abb. 51 B). Bei den männlichen AS-Patienten konnten keine Unterschiede für die Adiponektin-Serumspiegel (Abb. 51 C) und Resistin-Serumspiegel (Abb. 51 D) zwischen Patienten mit oder ohne Progression über zwei Jahre gefunden werden.

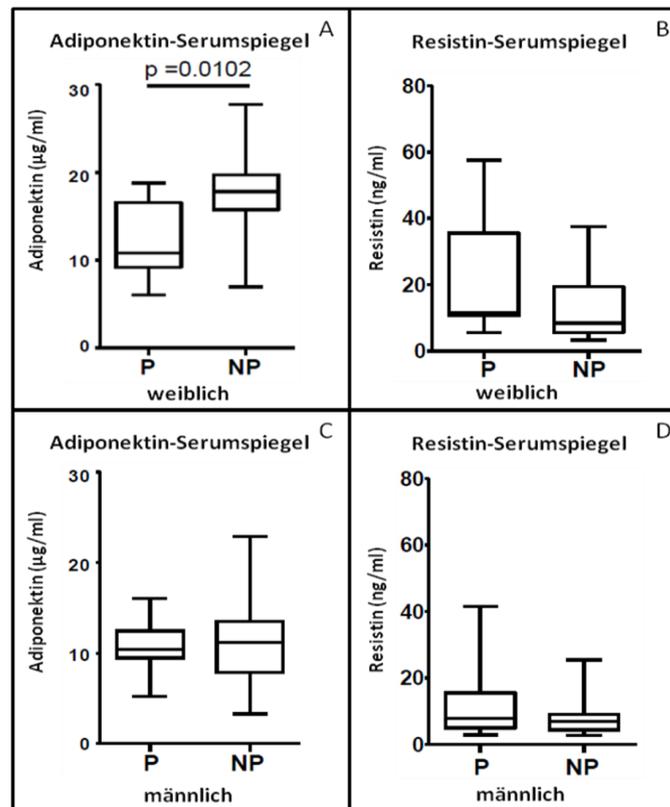


Abb. 51: Vergleich der Serumspiegel von Adiponektin (A, C) und Resistin (B, D) bei weiblichen und männlichen AS-Patienten mit Progression nach zwei Jahren (P, weiblich: n = 9, männlich: n = 19) und ohne Progression nach zwei Jahren (NP, weiblich: n = 20, männlich: n = 38). Es zeigten sich signifikant höhere Adiponektin-Serumspiegel bei weiblichen Patienten ohne Progression über zwei Jahre. Die Resistin-Serumspiegel von weiblichen Patienten mit Progression nach zwei Jahren waren deutlich, jedoch nicht signifikant erhöht. Bei den männlichen Patienten zeigten sich weder bei den Adiponektin- noch bei den Resistin-Serumspiegeln ein progressionsabhängiger Unterschied. Daten sind signifikant ab  $p < 0,05$ ). Graphik zur Verfügung gestellt von der AG Rheumatologie (Charité Berlin).

Die Korrelation der Adipokin-Serumspiegel mit dem BMI ergab eine negative Korrelation ( $r_s$ : Spearman-Korrelations-Koeffizient) der Adiponektin-Serumspiegel von männlichen AS-Patienten ( $r_s = -0,3668$ ,  $p = 0,0054$ ), jedoch keine Korrelation bei weiblichen AS-Patienten ( $r_s = 0,009$ ,  $p = 0,9625$ ). Für die Serumspiegel von Resistin und Visfatin ergab sich keine Korrelation zum BMI, weder bei männlichen, noch bei weiblichen AS-Patienten. Zudem ergab sich eine signifikante Korrelation von Resistin mit dem CRP bei den weiblichen AS-Patienten ( $r_s = 0,447$ ), Adiponektin und Visfatin zeigten keine Korrelation mit dem CRP. Alter, Krankheitsdauer, klinische Aktivität oder funktionelle Beeinträchtigung korrelierten ebenfalls nicht mit den Adipokin-Serumspiegeln.

## 5 Diskussion

Osteophyten und Syndesmophyten treten häufig bei rheumatischen Erkrankungen wie OA, PsA und AS auf. Die Mechanismen und der Grund ihrer Entstehung sind noch weitgehend unverstanden. Es könnte sich bei der Neubildung von Osteophyten um einen fehlgeleiteten Reparaturmechanismus handeln, welcher normalerweise positive Effekte wie z.B. die Erhöhung der Stabilität betroffener Gelenke zum Ziel hat [47]. In den meisten Fällen führen Osteophyten jedoch zu Schmerzen und Einschränkungen der Bewegungsfreiheit, besonders in Form der Syndesmophyten bei der AS [109].

Bei rheumatischen Erkrankungen ist das Gleichgewicht zwischen Resorption und Knochenneubildung, das normalerweise im Prozess des Knochenumbaus herrscht, gestört. Der Knochenabbau durch OK ist gegenüber der Knochenneubildung durch OB verschoben, so dass es z.B. bei der RA und der PsA zur Knochenerosion kommt [110]. Bei den entzündlichen Spondylarthritiden wie der AS, OA oder der PsA kommt es im Gegensatz zur RA zusätzlich auch zur Bildung von Osteophyten bzw. Syndesmophyten, was zumindest lokal eine gesteigerte OB-Funktion nahe legt. Zudem wird davon ausgegangen, dass der Wnt-Signalweg bei diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, da er zentral an der Differenzierung und Aktivierung von OB beteiligt ist [111].

Im Hinblick auf die Pathophysiologie der RA wurden Adipokine, Substanzen, die vor allem vom Fettgewebe sezerniert werden, in den Forschungsfokus gerückt, vor allem da Adipokine wie z.B. Adiponektin oder Resistin erhöht im Serum oder der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten vorliegen [67, 87]. Einige Adipokine scheinen an den gelenkzerstörenden Prozessen der RA beteiligt zu sein, beispielsweise durch die Verstärkung der Produktion matrixdegradierender Substanzen [88]. Inwieweit die Adipokine auch an dem Matrixumbau bzw. dem Knochenaufbau in Form von Osteophyten z.B. bei der OA beteiligt sind, wurde bisher noch nicht im direkten Kontext der OA untersucht. Gerade für die OA sind Adipokine möglicherweise von zentraler Bedeutung, da Übergewicht, das positiv mit den meisten Adipokinen korreliert ist, ein Risikofaktor der OA, nicht nur an Gewicht-tragenden Gelenken ist [112]. Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigte sich daher mit der Analyse der Adipokine hinsichtlich ihrer möglichen Beteiligung an der Osteophytenbildung bei der degenerativen OA bzw. entzündlichen Spondylarthropathien wie der AS und der PsA. Dafür wurde untersucht, ob Adipokine in OA-Osteophyten exprimiert werden und welche Wirkung sie auf Zellen des Knorpel- und Knochenaufbaus bzw. den Wnt-Signalweg haben. Zusätzlich

wurden Korrelationsanalysen zwischen den Adipokin-Serumleveln und der Osteophyten- und Syndesmophytenbildung durchgeführt.

## 5.1 Technische Probleme der Experimente

Bei den verschiedenen Untersuchungen sind an einigen Stellen experimentelle Probleme aufgetreten. Da die Untersuchungen zur Wirkung der Adipokine auf OA-OB und OA-CH mit isolierten Primärzellen von verschiedenen Patienten durchgeführt wurden, traten starke Populationsschwankungen bereits im Basislevel der untersuchten Faktoren auf, was das Erreichen von signifikanten Werten deutlich erschwerte. Dieses Problem ist jedoch, insbesondere bei der Verwendung von Primärzellen von verschiedenen Patienten, bekannt, da individuelle Unterschiede, sowie das Geschlecht, der Hormonstatus, BMI oder Medikation Einfluss auf Zellen und Gewebe nehmen können. Die verfügbaren Patientendaten wurden entsprechend auf mögliche Unterschiede hin untersucht, es war jedoch nicht immer möglich, alle Daten vollständig zur Verfügung gestellt zu bekommen. Bei den vorhandenen Daten fanden sich jedoch keine Hinweise, die die teils stark voneinander abweichenden Basislevel einiger Proteine, wie z.B. die untersuchten Entzündungsmediatoren IL-6, IL-8 und MCP-1, eindeutig erklären könnten.

Des Weiteren stand zur Isolierung der Primärzellen nur begrenztes Ausgangsmaterial zur Verfügung, wodurch unter Vermeidung extensiven Passagierens nur eine begrenzte Zellzahl für die dargestellten Untersuchungen zur Verfügung stand. Dies führte insbesondere bei der Analyse von Protein-Kernextrakten aus OB- und CH-Kulturen zur Analyse des Wnt-Signalwegs mittels Western Blot dazu, dass die für den Versuch eingesetzte Ausgangsmenge an Protein so gering war, dass die exakte Proteinmenge mit gängigen Methoden nicht zuverlässig bestimmt werden konnte. Zudem wurden Kernextrakte eingesetzt, weshalb trotz Verwendung gleicher Zellzahlen nach der Kernextraktion nur sehr geringe und ungleiche Proteinmengen vorhanden waren. Desweiteren musste die Ladungskontrolle mittels Silberfärbung des Gelabschnitts unterhalb des gesuchten Proteins durchgeführt werden. Jedoch zeigte sich auch dabei, dass oft zu wenig Protein vorlag, so dass eine Auswertung dieser Analysen nicht zuverlässig möglich war. Deshalb wurden die Veränderungen des Wnt-Signalwegs alternativ auf RNA-Ebene mittels Real-Time-PCR vergleichend analysiert.

Ein weiterer Punkt, der sich bei den Untersuchungen als Problem dargestellt hatte, war die Sensitivität einiger der verwendeten ELISA-Kits. Bei einigen untersuchten Proteinen wie Sklerostin, IL-1 oder GRO $\alpha$  lag die in den ZKÜ abgegebene Menge unterhalb der

Nachweisgrenze der ELISAs, teilweise war auch dies populationsabhängig, beispielsweise für IL-8. Somit war es bei einigen Proteinen wie beispielsweise den Adipokinen Adiponektin oder Visfatin nicht möglich, quantifizierbare Aussagen zu treffen.

Ebenfalls problematisch war die große Heterogenität der verschiedenen Osteophyten, die von den Kniegelenken nach Ersatz-Operation isoliert und anschließend histologisch analysiert wurden. Deshalb wurde eine Klassifizierung der Osteophyten in vier verschiedenen Typen vorgenommen um eine Charakterisierung der Osteophyten durchführen zu können.

## **5.2 Charakterisierung von OA-Osteophyten**

### **5.2.1 Einteilung von OA-Osteophyten**

Für die Charakterisierung der OA-Osteophyten wurde ein System entwickelt, das verschiedene Typen von Osteophyten definiert. Diese Definition ist insofern wichtig, da unterschiedliche Faktoren möglicherweise in verschiedenen Stadien der Osteophytenentstehung und Entwicklung beteiligt sein könnten. Die Osteophyten Typen waren zunächst an potenzielle Entwicklungsstadien angelegt, jedoch lassen sich diese nicht als "Stadien" definieren, da die untersuchten Osteophyten aus OA-Gelenken im Endstadium der Arthrose und somit aus stark erodierten Gelenken stammten. Legt man die in der Maus definierte Osteophytenentwicklung basierend auf den Untersuchungen von van der Kraan und Kollegen zu Grunde [47], kann man daraus schließen, dass Osteophyten, die noch keine Verknöcherung aufwiesen (Typ A), einen frühen Zeitpunkt der Osteophytenentwicklung darstellen. Osteophyten des Typ D stellen hingegen den Endpunkt der Osteophytenentwicklung dar. Alter und Genese der einzelnen Osteophyten lassen sich zum Zeitpunkt der Entnahme jedoch nicht bestimmen. Die meisten bereits existierenden histologischen Klassifikationssysteme für die Osteophytenentwicklung beziehen sich auf Tiermodelle [113, 114]. Diese Modelle lassen sich jedoch nur schwer auf die Situation beim Menschen übertragen. Dies liegt unter anderem daran, dass bei Tiermodellen die tatsächliche Entwicklung der Osteophytenbildung im Verlauf und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden kann, was beim Menschen nur schwer mittels bildgebender Verfahren bzw. histologisch nicht durchführbar ist. Auch werden bei Tiermodellen oft die gesamten Gelenke in die Evaluierung der Klassifikationssysteme mit einbezogen [115], was beim Menschen ebenfalls nicht möglich ist, da nur Teile des Gelenks bei der Ersatz-OP entfernt werden und somit zur Analyse verfügbar sind. Die histologische Klassifizierung der Osteophyten, die von

Little und Kollegen [115] vorgeschlagen wurde, kann ebenfalls nicht vollständig auf den Menschen übertragen werden. Der *Score* des gesamten Gelenks wird bei Little *et al.* von 0-3 angelegt: 0: kein Osteophyt, 1: vorwiegend knorpelhaltig, 2: Knorpel und Knochen, 3: vorwiegend Knochen. *Score* 0 kann bei der Analyse von Osteophyten beim Menschen keine Anwendung finden, da hier kein *Score* für das gesamte Gelenk sondern nur für die Osteophyten selbst, die auf den entfernten Knochen-Knorpelplatten zum Zeitpunkt der Gelenkersatz-OP vorliegen, angewendet werden kann. Außerdem unterscheidet der *Score* von Little *et al.* nicht zwischen Knorpel und lockerem Bindegewebe. Letzteres ist bei menschlichen Osteophyten jedoch teilweise sehr dominant und wurde daher in die in dieser Promotionsarbeit entwickelten Klassifizierung mit einbezogen, wodurch vier Typen von Osteophyten, die im menschlichen OA-Gelenk beobachtet werden konnten, unterschieden werden. Dies war insbesondere darum wichtig, da die untersuchten Adipokine teils stark im Bindegewebsanteil der Osteophyten exprimiert wurden. In Anlehnung an die Osteophytenentwicklung in der Maus [47, 115] kann also davon ausgegangen werden, dass Typ A, bestehend nur aus Knorpel und der Bindegewebskappe, einen frühen Entwicklungszeitpunkt darstellt. Typ B Osteophyten mit Knorpel, Bindegewebskappe und nur geringem Knochenanteil (max. 20%) scheinen somit ein fortgeschritteneres Osteophytenstadium zu reflektieren, während Typ C und Typ D mit Verknöcherungen von mehr als 20% Osteophyten das Endstadium der Osteophytenentwicklung darstellen und sich nur in der Menge des lockeren Bindegewebes voneinander unterscheiden. Inwieweit dies jedoch verschiedene Entwicklungsstadien widerspiegelt oder ob eine Arretierung der Osteophytenentwicklung durch lokale Gegebenheiten im Gelenk stattfindet, kann aufgrund der vorgenommenen Endpunkt-Analyse nicht gesichert werden. Allerdings erlaubt die histologische Einteilung der Osteophyten eine Zuordnung von z.B. der Adipokinexpression zu den verschiedenen Typen der Osteophyten.

### **5.2.2 Expression von Adipokinen in OA-Osteophyten**

Eine histologische Analyse von humanen OA-Osteophyten hinsichtlich der Adipokinexpression wurde bisher nicht durchgeführt. In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass Adipokine nicht nur durch umliegendes Gewebe, wie dem Synovialgewebe, dem intraartikulärem Fettgewebe oder durch Akkumulation in der Synovialflüssigkeit [95] in die Nähe von Osteophyten gelangen, sondern dass sie direkt in den Osteophyten durch verschiedene Zelltypen gebildet werden. Die fibroblastoiden Zellen des

lockeren Bindegewebes, welche vermutlich vom Synovialgewebe oder dem Periost ausgehend den Beginn der Osteophytenentwicklung darstellen [47], weisen insbesondere die Expression von Adiponektin, aber in geringerer Menge auch von Visfatin und Resistin auf. Wie bereits für das Synovialgewebe beschrieben [116], findet man auch in OA-Osteophyten eine deutliche Expression von Adiponektin durch Zellen der Blutgefäße. Außerdem konnte Adiponektin in 50% der hier analysierten Osteophyten auch kolokalisiert mit OB nachgewiesen werden. Es wurde bereits beschrieben, dass Resistin in murinen und humanen OB und OK vorkommt [117]. Auch in dieser Promotionsarbeit zeigte sich eine Expression von Resistin in den Zellen des Knochenbaus in OA-Osteophyten. Visfatin konnte ebenfalls in OB und OK in OA-Osteophyten detektiert werden. Zudem zeigte Visfatin in 8 von 14 untersuchten Osteophyten eine Expression durch CH im Knorpel, wobei nicht alle CH eines Osteophytes positiv für Visfatin waren. Laiguillon *et al.* konnte zeigen, dass Visfatin zwar vor allem vom Synovialgewebe in OA-Gelenken produziert wird, jedoch auch von Knorpel und dem subchondralen Knochen [118]. Die beschriebene Expression von Visfatin in CH, OK und OB konnte in der vorliegenden Promotionsarbeit zudem in OA-Osteophyten nachgewiesen werden.

Die Expression von Adiponektin, Resistin und Visfatin in OA-OB konnte *in vitro* bestätigt werden. Auch die Visfatin-Expression durch CH konnte in kultivierten Zellen verifiziert werden, wobei hier entgegen der Situation im Knorpel nahezu alle CH Visfatin exprimierten. Möglicherweise ist dies auf Kulturartefakte zurückzuführen, da bereits gezeigt werden konnte, dass besonders primäre CH, welche wie in unserem Fall im einschichtigen Zellrasen wachsen, relativ schnell dedifferenzieren können [119]. Allerdings wurden für diese Promotionsarbeit die CH direkt nach der Isolation untersucht und nicht passagiert. Dennoch liegt nicht die Situation im Gewebe vor, da die CH in Kultur außerhalb ihres Matrixverbandes vorliegen. Zudem erhalten die Zellen durch das Kulturmedium in Abwesenheit der Extrazellulärmatrix des Knorpels andere Stimuli als im Gewebeverband. Interessanterweise könnten die Visfatin-positiven CH im OA-Osteophyten-Knorpel hypertroph sein, da *in vitro* verstärkt die Zellen Visfatin-positiv gefärbt waren, die einen hypertrophen Phänotyp aufweisen. Bei der Knochenentwicklung durch chondrale Ossifikation werden zuerst die Chondrozyten des Knorpelmodells hypertroph, bevor es zum Einwandern von Knochenbildenden Zellen und zur Mineralisierung der Matrix kommt. Dieser Mechanismus könnte auch bei der Osteophytenbildung eine Rolle spielen, weshalb es interessant wäre dies zu überprüfen. Entsprechende Doppelmarkierungen auf Hypertrophiemarker im Osteophyten wurden aus Zeitgründen jedoch im Rahmen der Promotionsarbeit nicht durchgeführt.

Sollten die Adipokine bei der Osteophytenbildung eine Rolle spielen, so kann man anhand des Expressionsmusters folgendes schlussfolgern: Adiponektin konnte vor allem im lockeren Bindegewebe und Visfatin in CH detektiert werden. Dies sind Gewebe, welche früh in der Osteophytenentwicklung eine Rolle spielen, also könnten Adiponektin und Visfatin möglicherweise an der frühen Bildung der Osteophyten beteiligt sein. Die Analyse des Visfatingehalts im Knorpel von OA-Osteophyten im Vergleich zum OA-Gelenkknorpel zeigte lediglich eine Tendenz, dass vermehrt Visfatin im Osteophytenknorpel als im normalen Gelenkknorpel des OA-Gelenks vorhanden ist. Dies könnte darauf hindeuten, dass Visfatin bei der Entstehung bzw. dem Umbau von OA-Osteophyten im Bereich des Knorpels beteiligt ist. Die Detektion von Resistin und Visfatin in OB und OK könnte hingegen darauf hindeuten, dass sie beim Knochenumbau in späteren Stadien der OA-Osteophyten von Bedeutung sind. Daher wurde im weiteren Verlauf der Promotionsarbeit untersucht, welchen Einfluss die Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin auf kultivierte CH und OB, also den Zellen des Knorpel- und Knochenaufbaus, haben.

## **5.3 Effekt der Adipokine auf Osteoblasten und Chondrozyten**

### **5.3.1 Effekt der Adipokine auf Osteoblasten**

Adiponektin ist bekannt für sein immun-modulatorisches Potenzial. Allerdings agiert dieses unterschiedlich bei verschiedenen Erkrankungen bzw. in den betroffenen Geweben. Bei Erkrankungen wie dem metabolischen Syndrom oder bei kardiovaskulären Erkrankungen gilt Adiponektin als vorwiegend anti-inflammatorisch [120]. Allerdings sind bei diesen Erkrankungen die Adiponektin-Spiegel niedrig, wodurch die durch Adiponektin induzierten anti-entzündlichen Effekte reduziert sind [121]. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie dem systemischen *Lupus erythematoses* oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie dem Morbus Crohn wurden die Adiponektin-Spiegel dagegen als erhöht beschrieben [122-124]. Auch bei der chronisch entzündlichen RA sind die lokalen Adiponektin-Spiegel im Gelenk erhöht [124]. Bei diesen Erkrankungen induziert Adiponektin bei zentralen krankheitsrelevanten Zellen, wie beispielsweise den synovialen Fibroblasten bei der RA, die Bildung pro-inflammatorischer Proteine wie IL-6 [125]. In dieser Promotionsarbeit führte die Stimulation von OA-OB mit Adiponektin zu einer signifikant verstärkten Sekretion der Entzündungsmediatoren IL-6, IL-8 und MCP-1. Dieser Effekt war abhängig von der Stimulationsdauer. Allerdings variierte der pro-inflammatorische Effekt von

Adiponektin stark zwischen den untersuchten Zellen der verschiedenen Patienten. Dies lässt darauf schließen, dass Adiponektin eine pro-inflammatorische Wirkung auf die OA-OB hat, sich die Effektstärke jedoch stark bei den verschiedenen Patienten unterscheiden kann. Auch Lee und Kollegen [126] zeigten eine Induktion von IL-6 und IL-8 in OB durch Adiponektin, was sich mit den in dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnissen deckt. In deren Experimenten waren die Effekte des Adiponektins bei gleicher Stimulationskonzentration jedoch deutlich stärker und unterlagen geringeren Schwankungen als in dieser Promotionsarbeit, jedoch wurden von Lee und Kollegen kommerziell erhältliche OB aus arthrotischen Gelenken verwendet und keine Primärzellen [126].

Im Fall von Resistin und Visfatin zeigten diverse Studien das pro-inflammatorische Potenzial dieser Adipokine, beispielsweise auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes [127, 128] aber auch im Kontext chronisch-entzündlicher Gelenkerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [129, 130]. Die Stimulation von OA-OB mit diesen beiden Adipokinen zeigte interessanterweise in unseren Experimenten keinen Effekt auf die Zytokinabgabe durch Resistin und auch die durch Visfatin vermittelte geringe Verstärkung der IL-6-Abgabe war nicht signifikant. Somit scheinen Resistin und Visfatin im Vergleich zu Adiponektin keine pro-inflammatorischen Effekte auf die OA-OB auszuüben. Auch durch längere Stimulationsdauer konnte keine Induktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Resistin und Visfatin in den OA-OB beobachtet werden. Eine Studie von Thommesen und Kollegen zeigte eine Induktion von IL-6 in murinen prä-OB (MC3T3-E1-Zellen) durch Resistin [117] und Laiguillon und Kollegen konnten eine deutlich gesteigerte Expression von IL-6- und MCP-1-mRNA in murinen OB nach Stimulation mit Visfatin nachweisen [118]. Dies konnte für die bei dieser Promotionsarbeit verwendeten primären humanen OB von OA-Patienten jedoch nicht gezeigt werden.

Um zu überprüfen, ob die Adipokine Einfluss auf die Differenzierung oder die Aktivität der OB nehmen, wurde der Effekt von Adiponektin, Resistin und Visfatin auf die verschiedenen Aktivitätsmarker von OB analysiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Adiponektin und auch Resistin Einfluss auf die OB-Proliferation und Aktivität haben [117, 131, 132]. Bei den in den jetzigen Experimenten untersuchten OA-OB konnten allerdings durch Adiponektin, Resistin oder Visfatin keine signifikanten Veränderungen in den analysierten Genen detektiert werden. Allerdings wurden in dieser Promotionsarbeit primäre humane Zellen verwendet, während viele dieser Studien an murinen Zellen durchgeführt wurden [117, 132]. So konnten Oshima *et al.* bei murinen OB eine Erhöhung der ALP-Expression nach Adiponektin-Stimulation zeigen [132], was in dieser Promotionsarbeit mit humanen OA-OB

nicht bestätigt werden konnte. Luo *et al.* konnte eine Erhöhung der RANKL-Expression sowie eine verminderte OPG-Expression nach Adiponektin-Stimulation von primären humanen OB zeigen, jedoch wurden im dabei keine OB von Arthrose-Patienten verwendet, sondern normale OB aus trabekulärem Knochen, welche von Patienten mit einem Trauma isoliert wurden [131]. Dies ließ sich in dieser Promotionsarbeit anhand von primären humanen OA-OB ebenfalls nicht bestätigen. Resistin erhöhte in murinen OB die Genexpression von Kollagen Typ I und reduzierte die RANKL-Expression [117]. Im Gegensatz dazu nahm Resistin bei den in dieser Promotionsarbeit verwendeten humanen OA-OB jedoch keinen Einfluss auf die Expression dieser Gene. Somit scheinen die Adipokine bei den humanen OA-OB im Gegensatz zu murinen OB oder normalen humanen OB keinen Einfluss auf die Differenzierung bzw. die Aktivität zu nehmen.

Adiponektin induzierte die Sekretion von pro-entzündlichen Faktoren in OA-OB. Daher wurde untersucht, ob die Adipokine die Mineralisierungsaktivität der OB verändern, obwohl die Aktivitätsmarker der OA-OB durch Adipokin-Stimulation nicht signifikant verändert wurden. Allerdings konnten auch hier keine Unterschiede im Mineralisierungsverhalten der nicht stimulierten und Adipokin-stimulierten Zellen festgestellt werden. Bei Untersuchungen an murinen OB [132] hatte sich zwar eine Verstärkung der Matrixmineralisierung nach Adiponektin-Stimulation gezeigt, doch ebenso wie die ALP-Expression war die Mineralisierung nach Adiponektin-Stimulation von humanen OA-OB in dieser Promotionsarbeit nicht signifikant verändert. Da jedoch keine Aktivierungsmarker durch die Adipokine hinsichtlich ihrer Expression beeinflusst wurden, war zu erwarten, dass auch die Mineralisierung durch die Adipokine nicht verändert wird. Demnach scheint im Gegensatz zu Resistin und Visfatin vorwiegend Adiponektin auf OA-OB zu wirken, wobei pro-entzündliche Faktoren freigesetzt werden, jedoch die OB-Funktion nicht direkt beeinflusst zu werden scheint. Allerdings ist bekannt, dass pro-entzündliche Faktoren wiederum die zentralen Zellen des Knochenstoffwechsels beeinflussen [133-135].

### 5.3.2 Effekt von Visfatin auf Chondrozyten

Laiguillon *et al.* konnte zeigen, dass Visfatin auf normale murine CH wirkt, indem es beispielsweise die Expression von IL-6 und MCP-1 erhöht. VEGF oder Kollagen Typ X wurden in murinen CH durch Visfatin nicht beeinflusst [118]. Auch bei den im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten humanen OA-CH zeigte sich im Gegensatz zu den humanen OA-OB eine deutliche Verstärkung der IL-6-Abgabe auf Proteinebene nach Visfatin-Stimulation. Wie schon in der Studie von Laiguillon *et al.* für normale murine CH beschrieben [118], hatte Visfatin auch bei den primären humanen OA-CH keinen Effekt auf die VEGF-Abgabe. Im Gegensatz zu den OA-CH konnte in den verwendeten gesunden CH keine verstärkte IL-6-Abgabe durch Visfatin hervorgerufen werden. Da jedoch nur eine Population untersucht wurde, kann man aufgrund der starken Varianzen zwischen den Zellpopulationen verschiedener Personen bzw. Patienten nicht mit Sicherheit schlussfolgern, dass es bei der IL-6-Sekretion nach Visfatin-Stimulation spezifische Unterschiede zwischen gesunden und OA-CH gibt. Allerdings wäre es möglich, dass die CH von OA-Patienten bereits aktiviert sind und deshalb sensitiver auf den Visfatin-Stimulus reagieren als die Zellen von gesunden Spendern. Somit wurden die Daten der gesunden CH als Basislinie betrachtet. Eine Aktivierung der CH könnte aufgrund des inflammatorischen Milieus im OA-Gelenk begründet sein. Gosset und Kollegen konnten zeigen, dass mit IL-1 $\beta$  stimulierte CH verstärkt Visfatin produzieren, was laut Gosset *et al.* einen pro-degradativen und pro-inflammatorischen CH-Phänotyp darstellen könnte. Charakterisiert ist dieser u.a. durch die Induktion von MMP-3, MMP-13 und der Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> [104]. Ein direkter Vergleich der im Rahmen dieser Promotionsarbeit gewonnenen Daten der gesunden CH mit den OA-CH wird auch dadurch erschwert, dass die gesunden Zellen sich in einer späteren Passage befanden als die selbst isolierten OA-CH. Zudem wurde für die gesunden CH ein anderes Medium zur Kultivierung verwendet, da die Firma ausschließlich für die Zellen garantiert, wenn das empfohlene Medium verwendet wurde, welches jedoch aus Kostengründen nicht ebenfalls für die OA-CH verwendet wurde.

Die Analyse der Genexpression verschiedener CH-relevanter Gene ergab in dieser Promotionsarbeit nach Stimulierung mit Visfatin eine signifikante, allerdings vermutlich nicht physiologisch relevante Suppression der Transkription der Gene für Kollagen Typ II und Kollagen Typ X. Die Expression der Gene von MMP-9 und MMP-13 wiesen eine Hochregulation auf, welche jedoch starken populationsbedingten Schwankungen unterlag und somit keine Signifikanz erreichte. Die Induktion Matrix-degradierender Enzyme wie MMP-3

oder MMP-13 durch Visfatin in OA-CH konnte auch in anderen Studien gezeigt werden [104]. Zudem beschrieben Yammani *et al.* eine Hemmung der Proteoglycan-Produktion durch Visfatin in normalen humanen CH aus dem Knöchel [136, 137]. Der inhibierende Effekt auf die Proteoglycan-Synthese konnte in dieser Promotionsarbeit hinsichtlich Aggrekan nicht bestätigt werden. Dennoch lässt sich aus den Ergebnissen und dem bisherigen Kenntnisstand schlussfolgern, dass Visfatin negativ auf OA-CH bzw. auf die Knorpelmatrix durch die gesteigerte Produktion Matrix-abbauender Substanzen auswirkt. Möglicherweise spielt es jedoch beim Hypertrophie-Prozess der Chondrozyten eine Rolle, jedoch konnte die dafür typische Steigerung der Kollagen Typ X Produktion hier nicht nachgewiesen werden. Damit scheint Visfatin eher zur Knorpeldegeneration bei der OA beizutragen und weniger an der Osteophytenbildung direkt beteiligt zu sein.

Die Reaktion der für die Osteophytenbildung wichtigen Zellen, den OB und CH [47], auf die Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin war relativ gering. Adiponektin induziert Entzündungsfaktoren bei OA-OB, ebenso Visfatin bei den OA-CH. Zudem zeigte Visfatin bei den OA-CH einen Einfluss in Richtung des destruktiven Prozesses des Knorpelabbaus. Zentrale Funktionen, die bei der Entstehung von Osteophyten bei der OA relevant sein könnten, wie beispielsweise Aktivierungsmarkern von OB und CH bzw. Matrix-Mineralisierung durch OB, wurden nicht direkt durch die verwendeten Adipokine beeinflusst. Somit scheint zusammenfassend vorwiegend die lokale Entzündung aber nicht der Knorpel- und Knochenumbau im OA-Osteophyten durch Adiponektin und Visfatin beeinflusst zu werden.

## 5.4 Effekt der Adipokine auf den Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein wichtiger Regulator des Knochenauf- und -umbaus [65, 66]. Bei rheumatischen Erkrankungen ist der Wnt-Signalweg bei den Veränderungen des Knochens zentral involviert. Bei der chronisch-entzündlichen RA findet man beispielsweise verschiedene Inhibitoren des Wnt-Signalwegs, wie DKK1 oder sFRPs, vermehrt an durch Entzündung bedingten Erosionsstellen [138]. Entfernt man DKK1 mittels Applikation neutralisierender Antikörper aus dem Serum im Maus-Arthritismodell (Kollagen-induzierte Arthritis), so entstehen weniger Erosionen in den Gelenken der Tiere. Allerdings konnte bei den so behandelten Mäusen vermehrt die Bildung von Osteophyten beobachtet werden, die eher untypisch für eine RA sind [53]. Auch bei den Spondylarthritiden wie AS und PsA

scheint der Wnt-Signalweg zum Ungleichgewicht zwischen Osteoblastogenese und Osteoklastogenese beizutragen und mitverantwortlich für die vermehrte Bildung von Osteophyten bzw. Syndesmophyten zu sein [54, 55]. In Mausexperimenten zeigte sich, dass eine konstitutionelle Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Signalings unter Verwendung von transgenen Mausstämmen zu einem OA-ähnlichen Phänotyp in artikulären CH führte [139].

Es ist bekannt, dass der Wnt-Signalweg nicht nur für die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten (aktiv) oder Chondrozyten (inaktiv) eine wichtige Rolle spielt, sondern auch die Differenzierung und Proliferation dieser Zellen beeinflusst [140]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg auch mit Entzündungen assoziiert ist. Beispielsweise finden sich bei der entzündlichen RA verschiedene Wnt-Proteine wie Wnt1 oder Wnt5a verstärkt im Synovialgewebe [141, 142]. Auch konnte gezeigt werden, dass synoviale Fibroblasten von RA-Patienten verstärkt Wnt5a exprimieren und dass diese Zellen auch verstärkt die Entzündungsmediatoren IL-6 und IL-8 produzieren. Normale synoviale Fibroblasten die mit Wnt5a transfiziert wurden, zeigten ebenfalls eine verstärkte Produktion dieser Entzündungsmediatoren auf vergleichbarem Level wie die RA-Zellen [142]. Blockiert man allerdings die Wnt5a Expression in synovialen Fibroblasten von RA-Patienten, so kommt es zu einer deutlich geringeren IL-6 Produktion dieser Zellen [141]. Auch in anderen Zellen, wie beispielsweise Monozyten, dendritischen Zellen oder Makrophagen spielt das Wnt-Signalling in Verbindung mit Entzündung eine wichtige Rolle. Durch mikrobielle Stimuli wie LPS wurde eine verstärkte Expression von Wnt5a in diesen Zellen hervorgerufen [143], was in Makrophagen nachgewiesen, wiederum zu einer verstärkten Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-6 oder IL-8 führte [144]. Rauner und Kollegen konnten nachweisen, dass inflammatorische Stimuli die Expression von Wnt-Proteinen in Stromazellen des Knochenmarks und in Osteoblasten verstärken konnten, was wiederum zu einer Induktion von Entzündungsmediatoren führte [145]. Weiterhin konnte bereits für die Adipozytendifferenzierung gezeigt werden, dass auch Zytokine wie IL-6 bzw. TNF- $\alpha$  den Wnt-Signalweg direkt beeinflussen. Die Stimulation von Prä-Adipozyten mit diesen Zytokinen führte zu einer deutlichen Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma, wodurch es auch zu erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegeln im Zellkern kam, was die Adipozytendifferenzierung hin zu einem inflammatorischen Phänotyp beeinflusste [146].

Die Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin zeigten im Rahmen dieser Promotionsarbeit zwar keinen direkten Effekt auf die OB- und CH-Aktivierung, jedoch führten sowohl Adiponektin in OB wie auch Visfatin in CH zu einer Induktion von Entzündungsparametern. Da Entzündung Einfluss auf den Wnt-Signalweg nehmen bzw. vom

Wnt-Signalweg beeinflusst werden kann [141-146], wurde in dieser Promotionsarbeit untersucht, ob die Adipokine den Wnt-Signalweg in OA-OB oder OA-CH beeinflussen, entweder direkt durch Aktivierung oder Inaktivierung des Wnt-Signalwegs oder indirekt durch Veränderungen der Sekretion von Wnt-Inhibitoren. Weiterhin wurde im Gegenzug untersucht, ob eine Induktion des Wnt-Signalwegs die Adipokinexpression verändert.

Bei den untersuchten OA-OB ließ sich der Wnt-Signalweg mit der Positivkontrolle Wnt3a wie erwartet aktivieren. Die Stimulation der OA-OB mit Adiponektin, Resistin und Visfatin führte zwar zu signifikanten Ergebnissen, die eine Unterdrückung der Axin2 Genexpression zeigen, allerdings erreichte diese Regulation nicht den Faktor 2 und ist somit vermutlich nicht von physiologischer Relevanz. Es ist also davon auszugehen, dass die untersuchten Adipokine keinen direkten Einfluss auf den Wnt-Signalweg in OA-OB nehmen. Auch die Induktion von Entzündungsparametern durch Adiponektin zeigte keinen Effekt auf das  $\beta$ -Catenin-abhängige Wnt-Signalling. Zusätzlich wurde die Sekretion der Wnt-Inhibitoren DKK1 und Sklerostin gemessen, da diese Inhibitoren des Wnt-Signalwegs ebenfalls den Knochenauf- oder Abbau wie erwähnt indirekt regulieren können [53]. Sklerostin war im ZKÜ der OA-OB mittels ELISA nicht nachweisbar. Sklerostin wird vor allem von ausgereiften Osteozyten produziert und wurde auch durch Adipokine nicht in OB induziert. Die Messung von DKK1 ergab allerdings, dass Adipokine auch keinen Einfluss auf die DKK1-Sekretion durch OA-OB nehmen. Auch eine direkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch die drei Adipokine konnte nicht nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass Adiponektin, Resistin und Visfatin keinen direkten Einfluss auf zentrale Zellen der Osteophytenbildung nehmen, den OA-OB, sondern möglicherweise über die Induktion von pro-entzündlichen Faktoren indirekt auf die Zellen des Knochenbaus wirken.

Auch bei den CH wurde die Genexpression von Axin2 nach Visfatin-Stimulation untersucht, da nur Visfatin im Bereich des Osteophyten von CH exprimiert wird. Die Positivkontrolle Wnt3a zeigte nach 6 Stunden eine signifikante Hochregulation der Axin2-Expression in den OA-CH und ebenso eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in den gesunden CH. Nach Visfatin-Stimulation zeigte sich bei den OA-CH jedoch keine signifikante oder physiologisch relevante Veränderung der Axin2-Expression. Somit wird durch Visfatin auch in OA-CH der Wnt-Signalweg nicht direkt modifiziert. Allerdings konnten indirekte Veränderungen des Wnt-Signalwegs bei den CH ebenfalls nicht nachgewiesen werden, da sowohl Sklerostin als auch DKK1 nicht messbar induziert wurden (siehe Abschnitt 5.1). Zusammenfassend kann man somit sagen, dass Adiponektin, Resistin und Visfatin keinen direkten oder indirekten Einfluss auf den Wnt-Signalweg in OA-OB und OA-CH nehmen.

Inwieweit sie möglicherweise dennoch die Osteophytenbildung begünstigen, indem sie beispielsweise OK negativ regulieren, wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht untersucht und kann daher nicht ausgeschlossen werden, da bekannt ist, dass die Osteoklastendifferenzierung durch Entzündung beeinflusst werden kann [133-135].

## **5.5 Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Adipokinexpression in OA-OB und -CH**

Adiponektin, Resistin und Visfatin werden durch verschiedene Zellen der verschiedenen Osteophyten-Typen exprimiert. Jedoch scheinen diese in der Pathogenese der Osteophytenbildung keinen direkten Einfluss über den Wnt-Signalweg auf die Aktivierung und Funktion von OA-OB sowie OA-CH zu haben. Allerdings könnte die Induktion des Wnt-Signalwegs die Adipokinexpression in diesen Zellen beeinflussen. So führte die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in murinen artikulären CH experimentell zu einem OA-ähnlichen Phänotyp [139]. Aus diesem Grund wurde die Adipokin-Sekretion von OA-OB nach Stimulation mit dem Wnt-Aktivator Wnt3a und dem Wnt-Inhibitor DKK1 sowie die Visfatin-Sekretion von OA-CH untersucht. Eine messbare Induktion von Adiponektin und Visfatin konnte durch den Wnt-Aktivator Wnt3a nicht nachgewiesen werden und verblieb jeweils unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs. Demnach scheint die Sekretion dieser beiden Adipokine durch Aktivierung oder Hemmung des Wnt-Signalwegs nicht verstärkt zu werden. Auch für Resistin zeigte sich, dass weder die Aktivierung des Wnt-Signalwegs noch seine Hemmung eine Auswirkung auf die im ELISA messbaren Resistin-Konzentrationen hatte. Da die OB zwar mittels IHC und ICC nachweisbar Adiponektin, Resistin und Visfatin produzieren, werden diese entweder nur in geringen Mengen im Zellkultursystem abgeben oder andere Faktoren führen zur Freisetzung der Adipokine durch OB, beispielsweise Entzündungsfaktoren. Weiterhin erhalten die OB im Gewebe Signale von umliegender Matrix und anderen Zelltypen, welche die Abgabe der Adipokine begünstigen könnten. Außerdem sind die Zellen im Gewebeverband der Osteophyten nicht die einzige Adipokinquelle, da diese Adipokine auch im Fettgewebe oder dem Synovialgewebe gebildet werden bzw. auch über das Blut und die Synovialflüssigkeit in die Nähe der Osteophyten gelangen.

Auch die Sekretion von Visfatin durch OA-CH wurde überprüft. Obwohl die Visfatin-Level im ZKÜ der OA-CH populationsabhängig stark variierten und teilweise unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs lagen, war ersichtlich, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs die Visfatin-Expression in OA-CH nicht beeinflusst. Allerdings zeigten die Messungen des

Visfatingehalts im Knorpel, dass dort teilweise hohe Mengen an Visfatin vorliegen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das Visfatin Matrix-assoziiert vorliegt oder über die Synovialflüssigkeit in den Knorpel gelangt. Zusätzlich können auch CH mit Visfatin aus der Synovialflüssigkeit in Kontakt kommen. Dies könnte dann zur vom Wnt-Signalweg unabhängigen Induktion Matrix-abbauender Substanzen wie MMP9 oder MMP13 in den CH durch Visfatin führen.

Um den beschriebenen Zusammenhang mit der Freisetzung von Entzündungsmediatoren und den Adipokinen zu analysieren, wurde überprüft, ob die Modulation des Wnt-Signalwegs Einfluss auf die durch die Adipokine vermittelte Freisetzung von Entzündungsfaktoren durch OB und CH hat, bzw. ob der Effekt der Adipokine, insbesondere des Adiponektins bei OB und des Visfatins bei CH, durch Aktivierung oder Inhibierung des Wnt-Signalwegs beeinflusst wird. Dafür wurden die OB mit den Adipokinen und zusätzlich mit Wnt3a oder den Wnt-Inhibitoren DKK1 oder Sklerostin kostimuliert.

Die Stimulation der primären OB mit Sklerostin führte unabhängig der Adipokin-Kostimulation zum Absterben der Zellen. Es wurde beschrieben, dass Sklerostin Apoptose in OB auslösen kann [147], was sich bei den in dieser Promotionsarbeit verwendeten OA-OB bestätigte und auch durch die Zugabe der Adipokine nicht veränderte. Die durch Sklerostin induzierte Apoptose der OB könnte einen Regulationsmechanismus für die Osteophytenbildung darstellen. So hätten verringerte Sklerostin-Spiegel bei OA-Patienten eine erhöhte OB-Zahl zur Folge, wodurch die Osteophytenbildung begünstigt würde. So zeigten Mabey und Kollegen, dass bei OA-Patienten signifikant geringere Sklerostin-Spiegel vorliegen als bei gesunden Kontrollen. Zudem konnten sie eine inverse Korrelation der Sklerostin-Spiegel in Plasma und Synovialflüssigkeit mit der Schwere der OA nachweisen [148]. Diese Zusammenhänge wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit jedoch nicht weiter verfolgt.

Die Stimulation der OA-OB mit Wnt3a zeigt eine geringe Verminderung der IL-6-Abgabe. Dies war auch nach Kostimulation mit den Adipokinen zu beobachten, auch bei Adiponektin, welches üblicherweise eine Induktion von IL-6 in den OA-OB zur Folge hatte. Somit scheint die Induktion des kanonischen Wnt-Signalwegs in den OA-OB eher zu einer anti-entzündlichen Reaktion zu führen, welche auch durch das im RA-Kontext pro-entzündliche Adiponektin nicht verändert wird. Allerdings waren die Veränderungen sehr gering und es ist fraglich, inwieweit sie eine tatsächliche physiologische Relevanz aufweisen. Die Kostimulation mit DKK1 ergab ebenfalls keine signifikanten Veränderungen, wobei eher eine

verstärkte IL-6-Abgabe durch DKK1 zu beobachten war. Die Kostimulation der OB mit DKK1 und den Adipokinen zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in der IL-6-Abgabe. Jedoch erreichte die Kostimulation von Adiponektin mit DKK1 die stärksten Effekt bezüglich der erhöhten IL-6-Abgabe, was jedoch sehr wahrscheinlich auf den pro-entzündlichen Effekt des Adiponektins zurückzuführen ist. Auch hier waren die Veränderungen jedoch sehr gering, was den physiologischen Effekt des DKK1 auf die IL-6-Sekretion durch OA-OB in Frage stellt.

Die Kostimulation von OA-CH bzw. gesunden CH mit Visfatin und Wnt3a wurde ebenfalls bezüglich der IL-6- bzw. VEGF-Abgabe untersucht. Die Steigerung der IL-6-Abgabe bei OA-CH war auch bei der Kostimulation mit Wnt3a sehr deutlich. Jedoch zeigte bereits die Stimulation mit Wnt3a allein eine verstärkte IL-6-Sekretion, wenn auch diese mit Visfatin verstärkt werden konnte. Auf die VEGF-Sekretion scheint Wnt3a einen leicht reduzierenden Effekt zu haben. Gesunde CH werden durch Wnt3a bzw. eine Kostimulation mit Visfatin nicht beeinflusst. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in OA-CH die Entzündung fördert, wie es bereits für andere Zellen wie den synovialen Fibroblasten bei der RA oder auch Makrophagen gezeigt werden konnte [142-144].

## **5.6 Adiponektin-Effekt über p38-MAPK-Signalweg**

Da Adiponektin pro-entzündliche Effekte auf die OA-OB hatte, jedoch nicht den Wnt-Signalweg induzierte, wurde untersucht, ob der p38-MAPK-Signalweg aktiviert wird. Es ist bekannt, dass Adiponektin z.B. in Fibroblasten über diesen Signalweg pro-entzündlich wirken kann [149]. Die OA-OB reagierten nach Stimulierung mit Adiponektin populationsabhängig mit einer Aktivierung dieses Signalwegs. Dies spiegelt auch die Varianz bezüglich der Reaktivität der unterschiedlichen OB-Populationen auf die Adiponektin-Stimulation mit nachfolgender Sekretion von Entzündungsmediatoren wieder, bei der einige Populationen nur schwach oder gar nicht reagierten. Demnach scheint auch bei OA-OB die Signaltransduktion von Adiponektin über Wnt-unabhängige Signalwege, wie dem der p38-MAPK abzulaufen. Dies entspricht weiteren Untersuchungen, bei denen der p38-MAPK-Signalweg zentral zu den Adipokin-vermittelten Effekten in verschiedenen Zelltypen beiträgt [116, 130, 149].

## 5.7 Adipokin-Serumspiegel bei rheumatischen Erkrankungen

### 5.7.1 Adipokin-Serumspiegel bei PsA

Bei der PsA liegen teilweise veränderte Adipokin-Spiegel im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor [150]. Unter anderem konnten höhere Konzentrationen der Adipokine Leptin und Omentin im Serum von PsA-Patienten nachgewiesen werden, wohingegen Adiponektin in geringerer Konzentration vorlag. Resistin wies in dieser Studie keine Unterschiede zu gesunden Kontrollen auf [150]. Eine Korrelation der Adipokin-Spiegel mit auftretenden Erosionen an den Knochen bei der PsA zeigte zwar keinen Effekt der untersuchten Adipokine im Bezug auf die Erosionen, Adiponektin zeigte sich allerdings negativ korreliert mit der Anzahl von OK [150]. Inwieweit die Adipokin-Spiegel jedoch mit der Osteophytenentwicklung korreliert sind, wurde bisher noch nicht untersucht. Daher wurden in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe in Erlangen (AG Rheumatologie, FAU Erlangen) Serumproben von PsA-Patienten hinsichtlich ihres Adipokin-Gehalts analysiert und mit der Anzahl von Osteophyten an den Fingergrundgelenken 2 bis 4 korreliert. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen der Osteophytenanzahl oder der Anzahl von Erosionen mit den Serumspiegeln von Adiponektin, Resistin und Visfatin nachgewiesen werden. In einer Studie von Xue *et al.* konnten ebenfalls keine Unterschiede der Adiponektin-Spiegel zwischen erosiver und nicht-erosiver PsA festgestellt werden [150], was mit den dargestellten Daten unserer Experimente übereinstimmt. Weiterhin konnten keine Korrelationen der Adipokin-Spiegel mit dem Geschlecht, dem Alter, der Krankheitsdauer, dem CRP oder dem DAS28 festgestellt werden. Auch eine Korrelation dieser Parameter mit der Osteophytenanzahl erbrachte keine Zusammenhänge mit den Adipokin-Serumspiegeln. Somit konnte in dieser Promotionsarbeit kein Zusammenhang von Adiponektin, Resistin oder Visfatin auf die PsA bzw. die Osteophytenbildung bei der PsA festgestellt werden. Jedoch wurde hier nur ein Zeitpunkt analysiert und keine Analyse hinsichtlich des Einflusses der Adipokin-Spiegel auf eine mögliche Progression durchgeführt, da Progressionsdaten zum Zeitpunkt der Analyse nicht verfügbar waren. Demnach konnte dieser Aspekt in dieser Promotionsarbeit für die PsA nicht untersucht werden.

Die vorausgegangenen Analysen zur Wirkung von Adipokinen auf die Osteophytenbildung bei der OA haben keine Hinweise ergeben, dass Adiponektin, Resistin oder Visfatin Auswirkungen auf die Entstehung von Osteophyten bei der OA haben. Der Wnt-Signalweg

wurde durch die Adipokine nicht beeinflusst und auch eine Steigerung der Osteoblastenaktivität konnte nicht festgestellt werden. Es zeigten sich lediglich Effekte auf Entzündungsmediatoren vorwiegend durch Adiponektin. Bei der PsA konnten zudem keine Zusammenhänge zwischen den Adipokin-Serumspiegeln und der Entstehung von Osteophyten gefunden werden.

### **5.7.2 Adipokin-Serumspiegel bei AS**

Die Adipokin-Spiegel in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sind im Vergleich zu OA erhöht und teilweise mit den entzündlichen Prozessen bei der RA korreliert [87, 95]. Auch im Serum von RA-Patienten finden sich im Vergleich zu OA höhere Resistin- und Visfatin-Spiegel [67, 95]. Bei Studien zur PsA und der AS wurden die Serumspiegel einiger Adipokine als erhöht beschrieben [151-153]. Inwieweit die Adipokin-Serumspiegel jedoch mit der Bildung von Osteophyten oder Syndesmophyten zusammenhängen, wurde bisher nicht untersucht.

Die Analyse der Serumspiegel von Adiponektin, Resistin und Visfatin bei Patienten mit AS wurde in Kooperation mit der AG Rheumatologie (Charité Berlin) durchgeführt. Hierbei wurden die Adipokin-Spiegel der Seren von AS-Patienten mit gesunden Kontrollen verglichen. Dabei zeigte sich, dass Resistin und Visfatin im Gegensatz zu Adiponektin in AS-Patienten signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht sind. Dies bestätigt vorangegangene Analysen, bei denen Resistin erhöht im Serum von AS-Patienten detektiert wurde [152] bzw. kein Unterschied in den Adiponektin-Spiegeln von AS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen nachweisbar war [153]. Jedoch zeigten sich bei Adiponektin und Resistin signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede der Serumspiegel. Wie auch bei Toussirot und Kollegen [153] waren die Adiponektin-Spiegel im Serum der weiblichen AS-Patienten deutlich höher als bei männlichen Patienten. Dies konnte in unseren Analysen auch für Resistin nachgewiesen werden. Visfatin wies keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede auf.

Die Serumspiegel von Adiponektin zeigten eine negative Korrelation mit dem BMI bei männlichen Patienten, was sich mit den Daten von einer vorhergehenden Publikation von Nawrocki und Kollegen deckt [71]. Eine Korrelation von Adiponektin mit dem BMI bestand bei weiblichen AS-Patienten jedoch nicht. Interessanterweise korrelierten die Adiponektin-Serumspiegel weder bei männlichen noch bei weiblichen AS-Patienten mit dem CRP. Es ist jedoch bekannt, dass eine Behandlung von Patienten mit chronisch-entzündlich

rheumatischen Erkrankungen mit TNF-Inhibitoren keinen eindeutigen Effekt auf die Adiponektin-Spiegel hat [154, 155]. Daher scheinen die Serumspiegel von Adiponektin nicht direkt von einer aktiven Entzündung bzw. Entzündungsfaktoren abzuhängen, was sich in dieser Promotionsarbeit bestätigt. Die Resistin-Serumspiegel weiblicher AS-Patienten korrelierten positiv mit dem CRP, wohingegen bei männlichen AS-Patienten keine Korrelation mit dem CRP vorlag. Eine Studie, bei der keine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen AS-Patienten gemacht wurde, zeigte keine Korrelation der Resistin-Serumspiegel mit dem CRP [152]. Bei der RA konnte jedoch eine Korrelation zwischen Resistin-Serumspiegel und Entzündungsmarkern wie dem CRP festgestellt werden [156]. Dies scheint somit zumindest bei den weiblichen AS-Patienten ebenfalls der Fall zu sein. Zudem wirkte sich in einer Studie die Therapie mit TNF-Inhibitoren reduzierend auf die Resistin-Serumspiegel von RA-Patienten aus [157]. Dies spricht dafür, dass Resistin einen Einfluss auf die entzündlichen Prozesse bei der RA und möglicherweise auch der AS hat bzw. die Entzündungsaktivität auf die Resistin-Spiegel Einfluss nimmt. Die Visfatin-Serumspiegel waren nicht mit dem CRP korreliert, was auch bereits für die RA gezeigt werden konnte [158]. Visfatin scheint somit nicht im Zusammenhang mit den systemischen Entzündungsparametern bei diesen Erkrankungen zu stehen. Dafür spricht ebenfalls, dass neben Patienten mit chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen auch OA-Patienten höhere Visfatin-Spiegel aufweisen [159].

Die Adiponektin-Spiegel zu Untersuchungsbeginn waren bei Patienten mit einer röntgenologischen Progression (Bildung neuer Syndesmophyten, Wachstum bereits vorhandener Syndesmophyten) in den folgenden zwei Jahren signifikant geringer als bei Patienten ohne Progression. Dies war besonders deutlich, wenn man ausschließlich die weiblichen Patienten analysierte. Bei den männlichen AS-Patienten waren die Adiponektin-Level zu Untersuchungsbeginn unabhängig davon, ob in den folgenden zwei Jahren eine Progression stattfand. Bei Patienten mit RA korrelierten hohe Adiponektin-Spiegel mit einer verstärkten Zerstörung der Gelenke, also der Krankheitsprogression [160]. Im Gegensatz dazu gingen in dieser Promotionsarbeit vor allem bei den weiblichen Patienten hohe Adiponektin-Spiegel mit einem reduzierten Voranschreiten der Verknöcherung der Wirbelsäule, also der Krankheitsprogression einher. Demnach scheint Adiponektin bei der AS im Gegensatz zur RA eher einen positiven Effekt zu haben. Möglicherweise sind die höheren Adiponektin-Spiegel im Serum weiblicher AS-Patienten auch der Grund dafür, dass die Krankheit bei Frauen in der Regel milder verläuft. Allerdings muss man hierbei beachten, das

Krankheitsprogression bei der RA Knochenabbau bedeutet, wobei bei der AS der Knochenaufbau als Progression zu sehen ist.

Resistin scheint im Gegensatz zu Adiponektin nicht mit der röntgenologischen Progression assoziiert zu sein. Auch geschlechtsspezifische Unterschiede bei den Resistin-Spiegeln von Patienten mit oder ohne Progression in den folgenden zwei Jahren waren nicht feststellbar. Somit scheint Resistin im Gegensatz zu Adiponektin mehr am entzündlichen Krankheitsgeschehen beteiligt zu sein, dafür aber keinen Einfluss auf die Bildung bzw. das Wachstum von Syndesmophyten bei der AS zu nehmen.

Die Visfatin-Serumspiegel zu Untersuchungsbeginn waren bei AS-Patienten mit röntgenologischer Progression in den folgenden zwei Jahren signifikant höher als bei Patienten ohne Progression. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden dabei nicht nachgewiesen. Chen *et al.* gibt die Osteophyten als eine der zentralen Quellen von Visfatin im OA-Gelenk an [159], was dafür sprechen würde, dass Visfatin neben gelenkzerstörenden Eigenschaften auch die Entstehung der Osteophyten fördert. Dies würde sich im Rahmen der bei AS durchgeführten Untersuchung zur Syndesmophytenbildung bestätigen. Allerdings weisen die in dieser Promotionsarbeit durchgeführten Analysen an OA-OB und OA-CH nicht auf einen fördernden Einfluss von Visfatin auf das Osteophytenwachstum hin. Abgesehen von einer pro-entzündlichen Wirkung des Visfatins auf die OA-CH sowie die Induktion Matrix-degradierender Faktoren konnten keine Effekte des Visfatins nachgewiesen werden. Die Ergebnisse in dieser Promotionsarbeit deuten somit eher darauf hin, dass Visfatin eine Matrix-zerstörende Funktion bei der OA aufweist und weniger an der Osteophytenbildung beteiligt ist. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass Visfatin dazu führt, dass die CH im Knorpel der Osteophyten verstärkt hypertroph werden und somit die Knochenbildung fördert.

## 5.8 Adipokine im therapeutischen Kontext

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass Adiponektin, Resistin und Visfatin, welche beispielsweise in der RA-Pathologie eine wichtige Rolle spielen [67], keinen direkten Einfluss auf die Osteophytenbildung bei der OA und basierend auf den dargestellten serologischen Korrelationsanalysen ebenso nicht bei PsA zu nehmen scheinen. Adiponektin, Resistin und Visfatin zeigen bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der RA, dass sie sowohl die Entzündung als auch die Destruktion der Gelenke fördern [67, 95]. Auch bei den im Rahmen dieser Promotionsarbeit gewonnenen Daten hat sich das pro-entzündliche Potenzial zumindest von Adiponektin und Visfatin im Gelenk gezeigt. Murine Studien zeigten

zudem auch Resistin eher als Entzündungs- und Destruktions-fördernd [117], auch wenn sich dies in dieser Promotionsarbeit anhand humaner Primärzellen im OA-Kontext nicht bestätigen konnte. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Adipokine, zumindest Adiponektin und Visfatin, auch bei der OA die lokale Entzündung fördern, jedoch scheinen sie insgesamt eher an der Destruktion beteiligt zu sein und keinen Einfluss auf die Knochenneubildung zu haben. So scheint Visfatin eher die Gelenk-zerstörenden Prozesse zu fördern, da es in OA-CH die Expression Matrix-abbauender Substanzen wie MMP-9 und MMP-13 erhöht und somit die Gelenkerosion bei der OA zu verstärken. Besonders bei der OA besteht häufig das Problem des Übergewichts [4], was mit erhöhten Resistin- und Visfatin-Spiegeln bzw. verringerten Adiponektin-Spiegeln einher geht. Dennoch scheinen die Veränderungen in den Adipokin-Spiegeln, die mit der OA-Pathologie einhergehende Osteophytenentwicklung nicht zu beeinflussen. Auch die lokal erhöhten Adiponektin-Spiegel in den Gelenken fördern zwar die Entzündung, nehmen aber auf die zentralen Zellen der Knorpel- und Knochenbildung keinen direkten Einfluss. Bei der entzündlichen AS hingegen finden sich Hinweise, dass die Adiponektin- und Visfatin-Spiegel im Serum das Fortschreiten der Krankheit, auch im Hinblick auf die Syndesmophytenbildung, beeinflussen können. Wobei höhere Adiponektin-Spiegel sich eher positiv auf die Progression auswirken, wird das Fortschreiten der Krankheit durch hohe Visfatin-Spiegel begünstigt. Adiponektin verhält sich bei der AS also eher protektiv, ähnlich wie es bei kardiovaskulären Erkrankungen oder dem metabolischem Syndrom eher anti-inflammatorisch wirkt [120]. Der Einfluss von Adiponektin, Resistin und Visfatin auf die untersuchten degenerativen und chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen ist schematisch in Abb. 52 dargestellt.

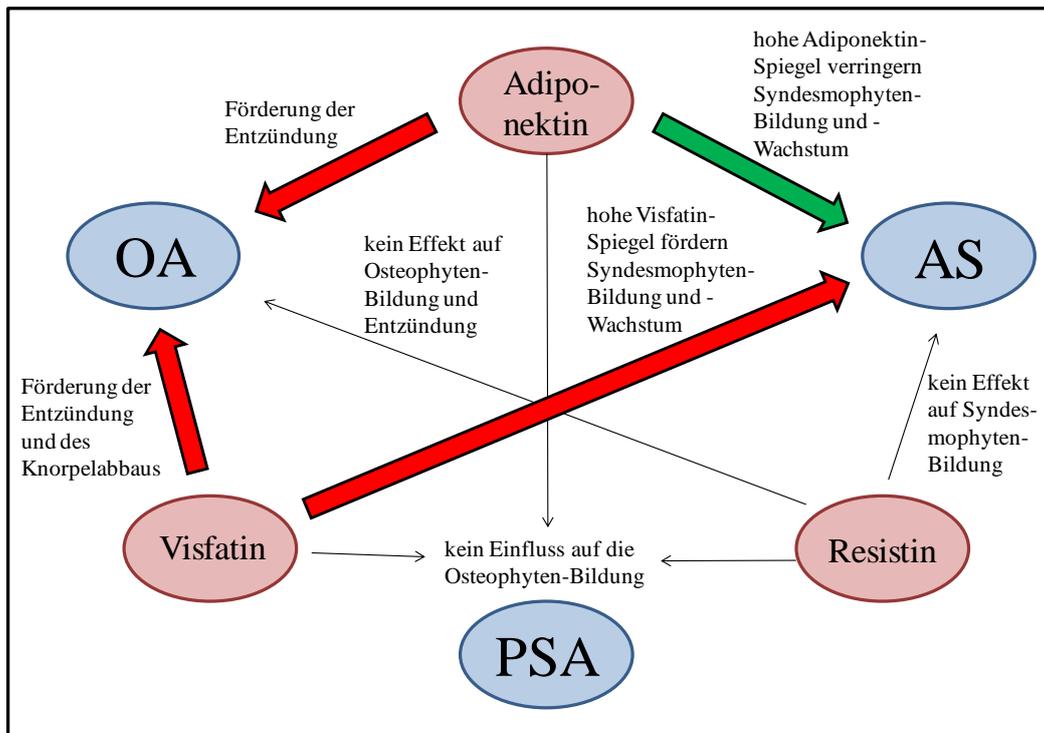


Abb. 52 Schematische Darstellung des Einflusses der Adipokine Adiponektin, Resistin und Visfatin auf die untersuchten primär degenerativen und chronisch-entzündlichen Erkrankungen OA, AS und PsA.

Die Adipokine als therapeutische Angriffsstellen anzusehen, ist dennoch insbesondere bei Adiponektin aufgrund der vielfältigen Funktionen im Metabolismus schwierig. Anhand der im Rahmen dieser Promotionsarbeit gewonnenen Daten ist es sehr wahrscheinlich, dass die Adipokine die Knochenneubildung nicht beeinflussen, sondern das Krankheitsgeschehen in Richtung Entzündung und Destruktion beeinflussen. Deshalb kann man davon ausgehen, dass eine Adipokin-basierte Therapie nicht nur bei der OA sondern auch bei den chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen wie der RA oder der PsA, wo sie klar die Gelenkzerstörung und die Entzündung fördern [67, 151, 156, 157, 160], keine unerwünschten Nebeneffekte im Bezug auf die Knochenneubildung haben. Zudem wirken die Adipokine nicht nur auf die Zellen des Knochen- und Knorpels, sondern auch auf Lymphozyten bzw. Fibroblasten im Gewebe. Einer der problematischsten Effekte bei der RA ist die Migration der synovialen Fibroblasten, welche, wodurch immer neue Gelenke befallen werden, bei denen Knorpel und Knochen durch das Einwandern der Fibroblasten zerstört werden [161]. Es wurde bereits gezeigt, dass Adiponektin in synovialen Fibroblasten bei der RA exprimiert wird [67]. Somit kommt es im Synovium nicht nur verstärkt zur Produktion von Entzündungsmediatoren, sondern auch zur verstärkten Infiltration von Lymphozyten, da durch Adiponektin entsprechende Chemokine verstärkt produziert werden. Desweiteren wird durch Adiponektin auch die Matrixzerstörung durch verstärkte Produktion verschiedener

Matrix-Metallo-Proteinasen gefördert [162]. Resistin ist ebenfalls im Synovium von RA-Patienten verstärkt exprimiert und wird dort neben den Fibroblasten vor allem auch von Makrophagen, Plasmazellen und B-Lymphozyten produziert und trägt vor allem durch sein pro-inflammatorisches Potenzial zur RA-Progression bei [93]. Ähnliches konnte auch für Visfatin gezeigt werden, beispielsweise fördert Visfatin neben der Entzündung auch die Migration von synovialen Fibroblasten in Richtung Visfatin-Expression [129, 130]. Auch auf diese Zellen würde sich eine Adipokin-basierte Therapie durchaus positiv auswirken.

Bisher wurde vorwiegend Visfatin im Kontext der RA als mögliche Option für eine Therapie in Betracht gezogen. Mit Hilfe eines Visfatin-Inhibitors, APO866, konnte die durch Visfatin erhöhte Sekretion von MMP-3, IL-8 und MCP-1 durch humane Fibroblasten erfolgreich inhibiert werden [163]. Bei experimentellen Arthritis-Mausmodellen konnten erhöhte Visfatin-Spiegel im Serum und insbesondere in den von der Entzündung betroffenen Pfoten der Mäuse gemessen werden. Behandelte man diese Tiere bereits frühzeitig mit APO866, so zeigte sich ein deutlich protektiver Effekt auf die Entzündung sowie auf die Gelenkzerstörung. Die behandelten Tiere wiesen signifikant geringere Schwellungen der Pfoten auf, zeigten deutlich weniger Leukozyteninfiltrate in den entzündeten Gelenken und wiesen kaum Anzeichen einer Gelenkzerstörung auf. Auch der mit RA einhergehende Gewichtsverlust war bei den mit APO866 behandelten Tieren weniger ausgeprägt. Zudem zeigten sich geringere RANKL-Spiegel, was auf eine verringerte Knochenresorption hinweist. Weiterhin war ein chondroprotektiver Effekt in Form von reduziertem Proteoglykanverlust und weniger Erosion des artikulären Knorpels nach Visfatin-Inhibition erkennbar [163]. Visfatin scheint somit durchaus als therapeutische Ansatzstelle für die RA-Therapie geeignet zu sein, insbesondere da in diesem Zusammenhang und auch in der hier dargestellten Promotionsarbeit Visfatin vorwiegend auf lokale Entzündungsprozesse Einfluss nimmt. Inwieweit die chondroprotektiven Effekte, die nach Visfatin-Inhibition bei dem RA-Modell erkennbar waren, auch Einfluss auf die Knorpeldestruktion bei der OA nimmt, müsste in einem entsprechenden OA-Tiermodell verifiziert werden. Da jedoch auch bei der OA eher die pro-entzündlichen und pro-destruktiven Effekte des Visfatins im Vordergrund stehen, ist es sehr wahrscheinlich, dass es auch bei der OA-Therapie hilfreich sein könnte. Auch die bei der AS aufgetretenen Zusammenhänge zwischen höheren Visfatinkonzentrationen im Serum und stärkerer Syndesmophytenbildung könnten einen Anhaltspunkt für eine mögliche Therapie durch Visfatin-Inhibition aufzeigen.

Auch eine Adiponektin- oder Resistin-basierte Adipokin-Therapie von rheumatischen Erkrankungen hätte sehr wahrscheinlich positive Effekte auf die Entzündungsprozesse,

insbesondere bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der RA oder PsA. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten bei der OA keine pro-entzündlichen oder knochenbildende Effekte nachgewiesen werden. Mausstudien zeigten jedoch, dass Resistin durchaus das Potenzial besitzt OB und OK hinsichtlich ihrer Differenzierung und Aktivität sowie der Produktion von Entzündungsmediatoren zu beeinflussen [117]. Hier müsste bei einer entsprechenden Therapie zunächst geprüft werden, ob Resistin im entzündlichen Kontext wie bei der RA ähnliche Effekte zeigt. Da Resistin in der Studie von Thommesen *et al.* jedoch vor allem in Richtung Osteoblastenaktivierung gewirkt hat [117], sollten es bei einer Therapie mit Resistin-Inhibition dennoch nicht zu einer unerwünschten gesteigerten Osteophytenbildung kommen. Zudem zeigten sich bei der chronisch-entzündlichen AS nur Zusammenhänge von Resistin mit Entzündung, die Syndesmophytenbildung war unabhängig von der Resistin-Konzentration im Serum. Hierbei wäre eine Resistin-basierte Therapie zur Verminderung der Entzündung vermutlich möglich. Adiponektin als Ansatzstellen für eine Therapie ist ebenfalls schwierig und hängt davon ab, ob man Möglichkeiten findet, diese Therapie lokal auf die betroffenen Gelenke zu beschränken. Systemische Therapien mit Adiponektin würden sich andernfalls negativ auf die metabolischen Effekte auswirken. Allerdings könnte eine lokale Hemmung des Adiponektins sich regulierend auf das Entzündungsgeschehen auswirken. Bei Erkrankungen wie der RA könnte zusätzlich eine Hemmung der Lymphozyteninfiltration sowie die Gelenkdestruktion bewirkt werden. Bei der AS wäre eine Adipokin-basierte Therapie jedoch schwierig, da sich dort gezeigt hat, dass Adiponektin eher weniger mit dem Entzündungsgeschehen korreliert, dafür jedoch Einfluss auf die Syndesmophytenbildung nimmt. Hier wirken höhere Adiponektin-Level eher schützend auf die Syndesmophytenprogression, weshalb eine Hemmung des Adiponektins hier nicht angezeigt wäre.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass eine Adipokin-basierte Therapie der OA oder auch von chronisch-entzündlichen Erkrankungen mit Ausnahme der AS bei Adiponektin vor allem positiv auf das Entzündungsgeschehen auswirken wird und die Gelenk-Destruktion gehemmt wird. Die Gefahr einer unerwünschten Osteophytenbildung durch Adipokin-basierte Therapien ist anhand der in dieser Promotionsarbeit gewonnenen Daten sehr unwahrscheinlich. Allerdings würde eine Adipokin-basierte Therapie der OA die Osteophytenbildung ebenfalls nicht hemmen. Auch eine Anregung von OB oder CH für eventuelle körpereigene Reparatur-Mechanismen würde durch eine solche Therapie nicht erzielt werden.

## 6 Zusammenfassung

Bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen wie der Arthrose (OA), der Psoriasis-Arthritis (PsA) oder der ankylosierenden Spondylitis (AS) kommt es neben destruktiven Prozessen auch zum Knochenaufbau in Form von Osteophyten bzw. Syndesmophyten an den Gelenkrändern. Bei diesem Prozess wird eine gesteigerte Osteoblastenaktivität vermutet, möglicherweise hervorgerufen durch eine Induktion des Wnt-Signalwegs. Die Mechanismen, die zur Entstehung von Osteophyten / Syndesmophyten beitragen, sind noch nicht im Detail bekannt. Möglicherweise könnten jedoch Adipokine, die unter anderem zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis (RA) beitragen, auch bei der Knochenneubildung der hier untersuchten Erkrankungen eine Rolle spielen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Einfluss von Adipokinen (Adiponektin, Resistin, Visfatin) auf die Knochenneubildung, insbesondere bei der OA, der PsA und der AS untersucht.

Ein besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Untersuchung der Expression der Adipokine in Osteophyten aus dem Kniegelenk von OA-Patienten gelegt. Dafür wurde zuerst eine Klassifizierung von verschiedenen Osteophytentypen vorgenommen. Es wurden vier verschiedene Osteophyten-Typen differenziert, die sich anhand ihres Verknöcherungsgrades und des Anteils an lockerem Bindegewebe unterscheiden. Anschließend wurde die Expression der Adipokine in OA-Osteophyten mittels Immunhistochemie untersucht. Es zeigte sich, dass Adiponektin vor allem im lockeren Bindegewebe nachgewiesen werden konnte, teilweise auch in Osteoblasten (OB). Resistin und Visfatin konnten verstärkt in OB und Osteoklasten (OK) nachgewiesen werden, wobei Visfatin auch in Chondrozyten (CH) im Knorpel detektiert werden konnte. Somit könnten Adiponektin und Visfatin eine Rolle bei der frühen Phase der Entstehung von Osteophyten spielen, während Resistin und Visfatin auch beim Umbau und insbesondere der Knochenbildung involviert sein könnten.

Um mögliche Effekte der Adipokine auf die knorpel- und knochenaufbauenden Zellen zu untersuchen, wurden *in vitro*-Analysen mit primären humanen OA-OB und OA-CH durchgeführt. Dabei zeigte sich ein pro-inflammatorischer Effekt von Adiponektin auf OB und von Visfatin auf CH. Zudem erhöhte Visfatin die Expression Matrix-abbauender Moleküle. Somit scheinen die Adipokine bei der OA nicht direkt die Osteophytenbildung zu beeinflussen, sondern eher die Entzündung sowie den Knorpelabbau zu fördern.

Da Entzündungen den Wnt-Signalweg beeinflussen können bzw. davon beeinflusst werden, wurde untersucht, ob die Adipokine darauf Einfluss nehmen. Allerdings konnte weder eine direkte noch indirekte Einflussnahme auf den Wnt-Signalweg durch Adipokine festgestellt

werden. Auch die Modulation des Wnt-Signalwegs zeigte umgekehrt keine Veränderung in der Adipokinexpression. Somit findet eine direkte Beeinflussung der Osteophytenbildung bei der OA zumindest über den Wnt-Signalweg nicht statt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Adiponektin in OB über den bereits aus anderen Zelltypen bekannten p38-MAPK-Signalweg seine pro-entzündlichen Effekte vermittelt.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Adipokine bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (PsA, AS) eine Rolle bei der Osteophyten- bzw. Syndesmophytenbildung spielen. Aus den hierfür durchgeführten Serumanalysen ergab sich folgendes Bild: Bei der PsA konnten keine Zusammenhänge der Adipokin-Spiegel mit der Osteophyten-Anzahl gefunden werden. Bei der AS zeigte sich jedoch ein geschlechtsabhängiger Einfluss von Adiponektin, was sich bei höheren Serum-Spiegeln als protektiv darstellte. Höhere Visfatin-Spiegel wirkten sich dagegen geschlechtsunabhängig negativ auf die Krankheitsprogression aus. Adipokine stehen somit bei der AS, aber nicht bei der PsA, im Zusammenhang mit der Knochenneubildung.

Für mögliche therapeutische Interventionen rheumatischer Erkrankungen mittels Adipokin-Modulation lässt sich schlussfolgern, dass vor allem die Entzündung beeinflusst werden kann. Die Knochenneubildung wird mit Ausnahme der AS dagegen nicht wesentlich beeinflusst. Somit besteht wohl auch bei Erkrankungen ohne Osteophytenbildung, wie der RA, keine Gefahr, dass es durch eine Adipokin-basierte Therapie zu vermehrter Osteophytenbildung kommen könnte. Für die AS könnte sich zumindest eine Visfatin-reduzierende Therapie verringernd auf die Syndesmophytenbildung auswirken. Jedoch kann eine Adipokin-basierte Therapie die Osteophytenbildung bei der OA oder der PsA nicht beeinflussen.

Zusammenfassend lassen sich somit folgende Aussagen treffen:

- Adiponektin, Resistin und Visfatin lassen sich in Osteophyten in den Zellen des Knochen- und Knorpelumbaus in verschiedenen Stadien nachweisen
- Adiponektin und Visfatin fördern bei der OA die Entzündung und den Knorpelabbau
- Der Wnt-Signalweg wird durch die Adipokine weder direkt noch indirekt beeinflusst
- Die Modulation des Wnt-Signalwegs führt zu keiner veränderten Adipokin-Expression
- Die Adipokin-Serumspiegel haben keinen Einfluss auf die Osteophytenbildung der PsA, Adiponektin und Visfatin könnten jedoch Einfluss auf die Syndesmophytenbildung bei der AS nehmen
- Eine Adipokin-basierten Therapie rheumatischer Erkrankungen würde sich vor allem auf das Entzündungsgeschehen auswirken und abgesehen von der AS die Osteophytenbildung nicht beeinflussen

## 7 Summary

### **The effect of adipokines on bone formation in rheumatic diseases**

In various degenerative or chronic inflammatory rheumatic diseases such as osteoarthritis (OA), psoriatic arthritis (PsA) or ankylosing spondylitis (AS), bone neoformation, which is involved in the development of osteophytes and syndesmophytes at the joint margins takes place next to destructive processes. In bone neoformation, an increased osteoblast activity is suspected, potentially caused by induction of the Wnt signalling pathway. The mechanisms that contribute to the formation of osteophytes / syndesmophytes are not yet known in detail. However, adipokines, which contribute to the pathogenesis of other inflammatory rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis (RA) could play a role in this bone neoformation. Therefore, in this dissertation, the influence of adipokines (adiponectin, resistin, visfatin) on bone neoformation was examined especially in OA, PsA and AS.

Here, a distinct emphasis was set on the examination of the expression of adipokines in osteophytes of the knee of OA patients. To facilitate this evaluation, a novel classification of different osteophyte types was established. Four different types of osteophytes were distinguished, which differ by their grade of ossification and the proportion of adjacent connective tissue. Then, the expression of the adipokines in OA osteophytes was investigated by immunohistochemistry. Adiponectin could be detected mainly in the adjacent connective tissue but in part also in osteoblasts (OB). Resistin and visfatin could be detected mainly in OB and osteoclasts (OC), while visfatin could also be detected in chondrocytes (CH) in cartilage. Thus, adiponectin and visfatin may play a role in the early phase of osteophyte development, whereas resistin and visfatin might also be involved in bone remodelling and especially bone neoformation.

To investigate potential effects of adipokines on the cells of cartilage and bone formation, *in vitro* analyses with primary human OA-OB and OA-CH were performed. A pro-inflammatory effect of adiponectin on OB and of visfatin on CH was detectable. In addition, visfatin increased the expression of matrix-degrading molecules. Thus, in OA the adipokines do not appear to directly affect the osteophyte formation but rather promote inflammation and cartilage degradation.

Since inflammation can affect the Wnt signalling pathway or be influenced by it, it was investigated whether Wnt signalling is affected by adipokines. However, neither a direct nor an indirect influence of the adipokines on the Wnt signalling pathway could be observed.

Conversely, the modulation of the Wnt signalling pathway showed no changes on the adipokine expression. Thus, the adipokines have no direct effect on osteophyte formation via the Wnt signalling pathway in OA. However, it could be shown that adiponectin in OB mediates its pro-inflammatory effects via the p38 MAPK pathway, which is already known from other cell types.

It was further investigated whether the adipokines play a role in osteophyte or syndesmophyte development in inflammatory rheumatic diseases (PsA, AS). Serum analyses showed that there were no correlations of adipokine levels with the number of osteophytes in PsA patients. However, for AS patients adiponectin showed a gender-dependent protective influence against disease progression at higher serum levels. Higher visfatin levels had a negative influence on the disease progression regardless of gender. Thus, adipokines show a connection with bone neof ormation in AS but not in PsA.

Regarding potential therapeutic interventions using adipokine modulation in rheumatic diseases, it can therefore be concluded that mostly inflammation may be influenced. Bone neof ormation is not significantly affected - with the exception of AS. Thus, probably also in diseases without osteophyte formation, for example RA, an adipokine-based therapy will not lead to increased osteophyte formation. For AS, a therapy reducing visfatin levels might reduce syndesmophyte development. However, an adipokine-based therapy does not affect the osteophytes formation in OA or PsA.

In summary, the following conclusions can be drawn from the experiments and results:

- Adiponectin, resistin and visfatin can be detected in osteophytes in the cells of the bone and cartilage remodelling at various stages
- In OA, adiponectin and visfatin promote inflammation and cartilage degradation
- The Wnt signalling pathway is neither directly nor indirectly influenced by adipokines
- The modulation of the Wnt signalling pathway leads to no changes in adipokine expression levels
- The adipokine serum levels have no effect on the osteophyte formation in PsA, though, adiponectin and visfatin affect syndesmophyte formation in AS
- An adipokine-based therapy of rheumatic diseases would mainly have an influence on the inflammatory processes and with AS as an exception would not affect osteophyte formation

## 8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAMTs	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ALP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	ankylosierende Spondylitis
BG	Bindegewebe
Blg	Blutgefäße
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serum Albumin
BSG	Blutsenkungs-Geschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CAPS	<i>3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid</i>
CH	Chondrozyten
CRP	C-reaktives Protein
ddH <sub>2</sub> O	RNase-freies destilliertes Wasser
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DKK	Dickkopf
DMARDs	krankheitsmodifizierende anti-rheumatische Medikamente
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
EZM	extrazellulären Matrix
FCS	fötale Kälberserum
gla	Osteocalcin
h	Stunde
ICH	Immunhistochemie

---

IZC	Immunzytochemie
K	Knochen
(k)CHM	(kommerzielles) Chondrozytenmedium
Kn	Knorpel
H/E	Hämatoxylin und Eosin
HLA	humanes Leukozyten Antigen
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MP	Magermilchpulver
MR	Markräume
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NSAIDs	nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PS	Normalserum aus dem Pferd
PsA	Psoriasis-Arthritis
OA	Arthrose ( <i>Osteoarthritis</i> )
OB	Osteoblasten
OBM	Osteoblastenmedium
OD	optische Dichte
OK	Osteoklasten
OPG	Osteoprotegerin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SOST	Sklerostin
sp7	Osterix
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Tumor-Wachstumsfaktor
TK	trabekulärer Knochen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	<i>tartrat-resistant acid phosphatase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U	<i>Unit</i>
ZU	Umbauzonen
VEGF	vaskulärer Endothelzell-Wachstumsfaktor
WB	Western Blot
ZKF	Zellkulturflasche
ZKÜ	Zellkulturüberstand
z.B.	zum Beispiel

## 9 Referenzen

1. Goldring MB, Goldring SR: **Osteoarthritis**. *J Cell Physiol* 2007, **213**(3):626-634.
2. Peach CA, Carr AJ, Loughlin J: **Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis**. *Trends Mol Med* 2005, **11**(4):186-191.
3. Pulsatelli L, Addimanda O, Brusi V, Pavloska B, Meliconi R: **New findings in osteoarthritis pathogenesis: therapeutic implications**. *Ther Adv Chronic Dis* 2013, **4**(1):23-43.
4. Loughlin J: **Genetics of osteoarthritis and potential for drug development**. *Curr Opin Pharmacol* 2003, **3**(3):295-299.
5. Mahjoub M, Berenbaum F, Houard X: **Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis**. *Osteoporos Int* 2012, **23 Suppl 8**:S841-846.
6. Conaghan PG, Dickson J, Grant RL: **Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance**. *Bmj* 2008, **336**(7642):502-503.
7. Callahan CM, Drake BG, Heck DA, Dittus RS: **Patient outcomes following tricompartmental total knee replacement. A meta-analysis**. *Jama* 1994, **271**(17):1349-1357.
8. Young A, Koduri G: **Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007, **21**(5):907-927.
9. Bartok B, Firestein GS: **Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis**. *Immunol Rev* 2010, **233**(1):233-255.
10. Sweeney SE, Firestein GS: **Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation**. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**(3):372-378.
11. Tarner IH, Harle P, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S: **The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive**. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005, **19**(1):19-35.
12. Gynther GW, Tronje G, Holmlund AB: **Radiographic changes in the temporomandibular joint in patients with generalized osteoarthritis and rheumatoid arthritis**. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996, **81**(5):613-618.
13. Moll JM, Wright V: **Psoriatic arthritis**. *Semin Arthritis Rheum* 1973, **3**(1):55-78.
14. Gladman DD, Antoni C, Mease P, Clegg DO, Nash P: **Psoriatic arthritis: epidemiology, clinical features, course, and outcome**. *Ann Rheum Dis* 2005, **64 Suppl 2**:ii14-17.
15. Savolainen E, Kaipainen-Seppänen O, Kröger L, Luosujärvi R: **Total incidence and distribution of inflammatory joint diseases in a defined population: results from the Kuopio 2000 arthritis survey**. *The Journal of Rheumatology* 2003, **30**(11):2460-2468.
16. Söderlin MK, Börjesson O, Kautiainen H, Skogh T, Leirisalo-Repo M: **Annual incidence of inflammatory joint diseases in a population based study in southern Sweden**. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002, **61**(10):911-915.

17. Mease P, Goffe BS: **Diagnosis and treatment of psoriatic arthritis.** *J Am Acad Dermatol* 2005, **52**(1):1-19.
18. Gottlieb A, Korman NJ, Gordon KB, Feldman SR, Lebwohl M, Koo JY, Van Voorhees AS, Elmets CA, Leonardi CL, Beutner KR *et al*: **Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 2. Psoriatic arthritis: overview and guidelines of care for treatment with an emphasis on the biologics.** *J Am Acad Dermatol* 2008, **58**(5):851-864.
19. Bowes J, Barton A: **The genetics of psoriatic arthritis: lessons from genome-wide association studies.** *Discov Med* 2010, **10**(52):177-183.
20. Liu Y, Helms C, Liao W, Zaba LC, Duan S, Gardner J, Wise C, Miner A, Malloy MJ, Pullinger CR *et al*: **A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci.** *PLoS Genet* 2008, **4**(3):e1000041.
21. Gossec L, Smolen JS, Gaujoux-Viala C, Ash Z, Marzo-Ortega H, van der Heijde D, FitzGerald O, Aletaha D, Balint P, Boumpas D *et al*: **European League Against Rheumatism recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**(1):4-12.
22. Dakwar E, Reddy J, Vale FL, Uribe JS: **A review of the pathogenesis of ankylosing spondylitis.** *Neurosurg Focus* 2008, **24**(1):E2.
23. Rudwaleit M, Sieper J: **Diagnose und Frühdiagnose der ankylosierenden Spondylitis (Morbus Bechterew).** *Z Rheumatol* 2004, **158**.
24. Rudwaleit M: **Frühdiagnose und Verlaufsprädiktoren der ankylosierenden Spondylitis und Spondyloarthritis.** *Wien Med Wochenschr* 2008, **158**(7-8):186-190.
25. McVeigh CM, Cairns AP: **Diagnosis and management of ankylosing spondylitis.** *Bmj* 2006, **333**(7568):581-585.
26. Dagfinrud H, Kvien TK, Hagen KB: **Physiotherapy interventions for ankylosing spondylitis.** *Cochrane Database Syst Rev* 2008(1):CD002822.
27. Escalas C, Trijau S, Dougados M: **Evaluation of the treatment effect of NSAIDs/TNF blockers according to different domains in ankylosing spondylitis: results of a meta-analysis.** *Rheumatology (Oxford)* 2010, **49**(7):1317-1325.
28. Braun J, van den Berg R, Baraliakos X, Boehm H, Burgos-Vargas R, Collantes-Estevez E, Dagfinrud H, Dijkmans B, Dougados M, Emery P *et al*: **2010 update of the ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(6):896-904.
29. Braun J, van der Horst-Bruinsma IE, Huang F, Burgos-Vargas R, Vlahos B, Koenig AS, Freundlich B: **Clinical efficacy and safety of etanercept versus sulfasalazine in patients with ankylosing spondylitis: a randomized, double-blind trial.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(6):1543-1551.
30. van der Heijde D, Sieper J, Maksymowych WP, Dougados M, Burgos-Vargas R, Landewe R, Rudwaleit M, Braun J: **2010 Update of the international ASAS recommendations for the use of anti-TNF agents in patients with axial spondyloarthritis.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(6):905-908.
31. Smith MD, Barg E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, Kraan M, Coleman M, Ahern MJ: **Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints.** *Ann Rheum Dis* 2003, **62**(4):303-307.

32. Neu CP, Komvopoulos K, Reddi AH: **The interface of functional biotribology and regenerative medicine in synovial joints.** *Tissue Eng Part B Rev* 2008, **14**(3):235-247.
33. Linß W, Fanghänel J: **Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie**, 1 edn: W. de Gruyter-Verlag; 1998.
34. Salter DM: **(II) Cartilage.** *Cur Orthop* 1998, **12**(4):251-257.
35. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ: **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, **22**(2):351-384.
36. Hochschild J: **Strukturen und Funktionen begreifen 1: Funktionelle Anatomie - Therapierrelevante Details. Grundlagen zur Wirbelsäule, HWS und Schädel, BWS und Brustkorb, obere Extremität**, 3 unveränderte edn: Georg Thieme Verlag; 2005.
37. Izzo R, Guarnieri G, Guglielmi G, Muto M: **Biomechanics of the spine. Part I: spinal stability.** *Eur J Radiol* 2013, **82**(1):118-126.
38. Adams MA: **Basic science of spinal degeneration.** *Surgery (Oxford)* 2012, **30**(7):347-350.
39. Michels H, Neumann C: **Kurzlehrbuch Anatomie**, 1 edn: Urban & Fischer-Verlag 2007.
40. Waldeyer A: **Anatomie des Menschen**, 17 edn: de Gruyter-Verlag; 2003.
41. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z: **Matrix remodeling during endochondral ossification.** *Trends in Cell Biology* 2004, **14**(2):86-93.
42. Staines KA, Pollard AS, McGonnell IM, Farquharson C, Pitsillides AA: **Cartilage to bone transitions in health and disease.** *J Endocrinol* 2013, **219**(1):R1-R12.
43. Hojo H, Ohba S, Yano F, Chung UI: **Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development.** *J Bone Miner Metab* 2010, **28**(5):489-502.
44. Menkes CJ, Lane NE: **Are osteophytes good or bad?** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12 Suppl A**:S53-54.
45. Felson DT, Gale DR, Elon Gale M, Niu J, Hunter DJ, Goggins J, Lavalley MP: **Osteophytes and progression of knee osteoarthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2005, **44**(1):100-104.
46. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T: **In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells.** *J Cell Biochem* 2006, **97**(1):84-97.
47. van der Kraan PM, van den Berg WB: **Osteophytes: relevance and biology.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**(3):237-244.
48. Delaney JP, O'Driscoll SW, Salter RB: **Neochondrogenesis in free intraarticular periosteal autografts in an immobilized and paralyzed limb. An experimental investigation in the rabbit.** *Clin Orthop Relat Res* 1989(248):278-282.
49. Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB: **Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**(8):627-635.

50. van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB: **Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint.** *Lab Invest* 1994, **71**(2):279-290.
51. Sutherland RI, Matheson D: **Inflammatory involvement of vertebrae in ankylosing spondylitis.** *J Rheumatol* 1975, **2**(3):296-302.
52. Machado P, Landewe R, Braun J, Hermann KG, Baker D, van der Heijde D: **Both structural damage and inflammation of the spine contribute to impairment of spinal mobility in patients with ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(8):1465-1470.
53. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C *et al*: **Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling.** *Nat Med* 2007, **13**(2):156-163.
54. Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, David JP, Zwerina J, Richards W, Kronke G, Schett G: **Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(3):592-597.
55. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, Baraliakos X, Listing J, Rudwaleit M, Schett G *et al*: **High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**(4):572-574.
56. Johnson ML, Kamel MA: **The Wnt signaling pathway and bone metabolism.** *Curr Opin Rheumatol* 2007, **19**(4):376-382.
57. Logan CY, Nusse R: **The Wnt signaling pathway in development and disease.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:781-810.
58. Mosimann C, Hausmann G, Basler K: **Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(4):276-286.
59. MacDonald BT, Tamai K, He X: **Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.** *Dev Cell* 2009, **17**(1):9-26.
60. Cong F, Schweizer L, Varmus H: **Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP.** *Development* 2004, **131**(20):5103-5115.
61. Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P, Glinka A, Niehrs C: **Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction.** *Nature* 2005, **438**(7069):867-872.
62. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J: **Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease.** *J Cell Sci* 2008, **121**(Pt 6):737-746.
63. Niehrs C: **Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators.** *Oncogene* 2006, **25**(57):7469-7481.
64. Semenov M, Tamai K, He X: **SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor.** *J Biol Chem* 2005, **280**(29):26770-26775.
65. Hartmann C: **A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis.** *Trends Cell Biol* 2006, **16**(3):151-158.

66. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA *et al*: **Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation.** *Dev Cell* 2005, **8**(5):751-764.
67. Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U: **Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases?** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(5):1159-1169.
68. Frommer KW, Schäffler A, Buchler C, Steinmeyer J, Rickert M, Rehart S, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E: **Adiponectin isoforms: a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis?** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**(10):1724-1732.
69. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: **AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.** *J Biol Chem* 1996, **271**(18):10697-10703.
70. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K *et al*: **Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **257**(1):79-83.
71. Nawrocki AR, Scherer PE: **The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation.** *Curr Opin Pharmacol* 2004, **4**(3):281-289.
72. Vasseur F, Lepretre F, Lacquemant C, Froguel P: **The genetics of adiponectin.** *Curr Diab Rep* 2003, **3**(2):151-158.
73. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M: **Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma.** *J Biochem* 1996, **120**(4):803-812.
74. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K: **cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **221**(2):286-289.
75. Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Wehrwein G, Müller-Ladner U, Scholmerich J, Wrede C, Buechler C: **Different effects of adiponectin isoforms in human monocyte cells.** *J Leukoc Biol* 2006, **79**(4):803-808.
76. Haugen F, Drevon CA: **Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin.** *Endocrinology* 2007, **148**(11):5478-5486.
77. Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y: **Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin.** *Circ Res* 2004, **94**(4):e27-31.
78. Kadowaki T, Yamauchi T: **Adiponectin and adiponectin receptors.** *Endocr Rev* 2005, **26**(3):439-451.
79. Wang L, Wang X, Li Z, Xia T, Zhu L, Liu B, Zhang Y, Xiao F, Pan Y, Liu Y *et al*: **PAQR3 Has Modulatory Roles in Obesity, Energy Metabolism, and Leptin Signaling.** *Endocrinology* 2013, **154**(12):4525-4535.
80. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, Macdonald GA, Prins JB: **Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome.** *Diabetes Obes Metab* 2006, **8**(3):264-280.

81. Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Weiss T, Kirchner S, Laberer S, Scholmerich J, Buechler C: **Regulation of adiponectin receptor 1 in human hepatocytes by agonists of nuclear receptors.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **334**(3):924-929.
82. Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Paschke R: **Growth hormone is a positive regulator of adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes.** *FEBS Lett* 2004, **558**(1-3):27-32.
83. Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B: **Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **314**(1):151-158.
84. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Tenner AJ, Tomiyama Y *et al*: **Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages.** *Blood* 2000, **96**(5):1723-1732.
85. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T *et al*: **Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin.** *Circulation* 1999, **100**(25):2473-2476.
86. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y: **A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(10):2062-2068.
87. Schäffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Scholmerich J, Müller-Ladner U, Gay S: **Adipocytokines in synovial fluid.** *Jama* 2003, **290**(13):1709-1710.
88. Ehling A, Schäffler A, Herfarth H, Tarner IH, Anders S, Distler O, Paul G, Distler J, Gay S, Scholmerich J *et al*: **The potential of adiponectin in driving arthritis.** *J Immunol* 2006, **176**(7):4468-4478.
89. Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L: **Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones.** *Science* 2004, **304**(5674):1154-1158.
90. Nogueiras R, Novelle MG, Vazquez MJ, Lopez M, Dieguez C: **Resistin: regulation of food intake, glucose homeostasis and lipid metabolism.** *Endocr Dev* 2010, **17**:175-184.
91. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: **The hormone resistin links obesity to diabetes.** *Nature* 2001, **409**(6818):307-312.
92. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA: **Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **300**(2):472-476.
93. Senolt L, Housa D, Vernerova Z, Jirasek T, Svobodova R, Veigl D, Anderlova K, Muller-Ladner U, Pavelka K, Haluzik M: **Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**(4):458-463.

94. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C: **Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease.** *Br J Pharmacol* 2012, **165**(3):622-632.
95. Neumann E, Knedla A, Meier F, Tarner IH, Büchler C, Schäffler A, Müller-Ladner U: **Adipozytokine als treibende Faktoren bei rheumatoider Arthritis.** *Z Rheumatol* 2007, **66**(2):139-141.
96. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I: **Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor.** *Mol Cell Biol* 1994, **14**(2):1431-1437.
97. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H *et al*: **Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin.** *Science* 2005, **307**(5708):426-430.
98. Wang T, Zhang X, Bheda P, Revollo JR, Imai S, Wolberger C: **Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD<sup>+</sup> biosynthetic enzyme.** *Nat Struct Mol Biol* 2006, **13**(7):661-662.
99. Luk T, Malam Z, Marshall JC: **Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity.** *J Leukoc Biol* 2008, **83**(4):804-816.
100. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O: **Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**(9):1198-1201.
101. Nowell MA, Richards PJ, Fielding CA, Ognjanovic S, Topley N, Williams AS, Bryant-Greenwood G, Jones SA: **Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(7):2084-2095.
102. Jia SH, Li Y, Parodo J, Kapus A, Fan L, Rotstein OD, Marshall JC: **Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis.** *J Clin Invest* 2004, **113**(9):1318-1327.
103. Brentano F, Schorr O, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D: **Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(9):2829-2839.
104. Gosset M, Berenbaum F, Salvat C, Sautet A, Pigenet A, Tahiri K, Jacques C: **Crucial role of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in matrix degradation and prostaglandin E2 synthesis in chondrocytes: possible influence on osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(5):1399-1409.
105. Stofkova A: **Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity.** *Endocr Regul* 2010, **44**(1):25-36.
106. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M *et al*: **Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association.** *Arthritis Rheum* 1986, **29**(8):1039-1049.

107. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ: **An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction.** *Anal Biochem* 2004, **329**(1):77-84.
108. Gruber HE: **Adaptations of Goldner's Masson trichrome stain for the study of undecalcified plastic embedded bone.** *Biotech Histochem* 1992, **67**(1):30-34.
109. van Tubergen A, Ramiro S, van der Heijde D, Dougados M, Mielants H, Landewe R: **Development of new syndesmophytes and bridges in ankylosing spondylitis and their predictors: a longitudinal study.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**(4):518-523.
110. Gravallese EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR: **Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis.** *Am J Pathol* 1998, **152**(4):943-951.
111. Goldring SR, Purdue PE, Crotti TN, Shen Z, Flannery MR, Binder NB, Ross FP, McHugh KP: **Bone remodelling in inflammatory arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72** Suppl 2:ii52-55.
112. Conde J, Scotece M, Gomez R, Lopez V, Gomez-Reino JJ, Gualillo O: **Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease.** *Arthritis* 2011, **2011**:203901.
113. Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: **Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair.** *J Immunol* 2002, **169**(1):507-514.
114. Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M: **Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(3):180-187.
115. Little CB, Barai A, Burkhardt D, Smith SM, Fosang AJ, Werb Z, Shah M, Thompson EW: **Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3723-3733.
116. Frommer KW, Zimmermann B, Meier FM, Schröder D, Heil M, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S *et al*: **Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**(10):2886-2899.
117. Thommesen L, Stunes AK, Monjo M, Grosvik K, Tamburstuen MV, Kjobli E, Lyngstadaas SP, Reseland JE, Syversen U: **Expression and regulation of resistin in osteoblasts and osteoclasts indicate a role in bone metabolism.** *J Cell Biochem* 2006, **99**(3):824-834.
118. Laiguillon MC, Houard X, Bougault C, Gosset M, Nourissat G, Sautet A, Jacques C, Berenbaum F, Sellam J: **Expression and function of visfatin (Nampt), an adipokine-enzyme involved in inflammatory pathways of osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2014, **16**(1):R38.
119. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J: **Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10**(1):62-70.

120. Ouchi N, Walsh K: **Adiponectin as an anti-inflammatory factor**. *Clin Chim Acta* 2007, **380**(1-2):24-30.
121. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT: **Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease**. *Curr Opin Lipidol* 2007, **18**(3):263-270.
122. Paul G, Schäffler A, Neumeier M, Furst A, Bataillle F, Büchler C, Müller-Ladner U, Scholmerich J, Rogler G, Herfarth H: **Profiling adipocytokine secretion from creeping fat in Crohn's disease**. *Inflamm Bowel Dis* 2006, **12**(6):471-477.
123. Sada KE, Yamasaki Y, Maruyama M, Sugiyama H, Yamamura M, Maeshima Y, Makino H: **Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus**. *J Rheumatol* 2006, **33**(8):1545-1552.
124. Senolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M: **Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis**. *Cytokine* 2006, **35**(5-6):247-252.
125. Fantuzzi G: **Adiponectin and inflammation: consensus and controversy**. *J Allergy Clin Immunol* 2008, **121**(2):326-330.
126. Lee Y-A, Ji H-I, Lee S-H, Hong S-J, Yang H-I, Chul Yoo M, Kim KS: **The role of adiponectin in the production of IL-6, IL-8, VEGF and MMPs in human endothelial cells and osteoblasts: implications for arthritic joints**. *Exp Mol Med* 2013, **46**:e72.
127. Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A: **Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties**. *J Immunol* 2005, **174**(9):5789-5795.
128. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H: **Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties**. *J Immunol* 2007, **178**(3):1748-1758.
129. Fadda SMH, Gamal SM, Elsaid NY, Mohy AM: **Resistin in inflammatory and degenerative rheumatologic diseases**. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2013, **72**(6):594-600.
130. Meier FMP, Frommer KW, Peters MA, Brentano F, Lefèvre S, Schröder D, Kyburz D, Steinmeyer Jr, Rehart S, Gay S *et al*: **Visfatin/Pre-B-cell Colony-enhancing Factor (PBEF), a Proinflammatory and Cell Motility-changing Factor in Rheumatoid Arthritis**. *Journal of Biological Chemistry* 2012, **287**(34):28378-28385.
131. Luo XH, Guo LJ, Xie H, Yuan LQ, Wu XP, Zhou HD, Liao EY: **Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway**. *J Bone Miner Res* 2006, **21**(10):1648-1656.
132. Oshima K, Nampei A, Matsuda M, Iwaki M, Fukuhara A, Hashimoto J, Yoshikawa H, Shimomura I: **Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast**. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **331**(2):520-526.
133. Arboleya L, Castaneda S: **Osteoimmunology: The Study of the Relationship Between the Immune System and Bone Tissue**. *Reumatología Clínica* 2013, **09**(05):303-315.
134. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE: **Osteoimmunology - The hidden immune regulation of bone**. *Autoimmunity Reviews* 2009, **8**(3):250-255.

135. Neumann E, Müller-Ladner U, Frommer KW: **Entzündung und Knochenmetabolismus.** *Zeitschrift für Rheumatologie* 2014, **73**(4):342-348.
136. Jacques C, Holzenberger M, Mladenovic Z, Salvat C, Pecchi E, Berenbaum F, Gosset M: **Proinflammatory actions of visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) involve regulation of insulin signaling pathway and Nampt enzymatic activity.** *J Biol Chem* 2012, **287**(18):15100-15108.
137. Yammani RR, Loeser RF: **Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/visfatin) inhibits insulin-like growth factor-1 signaling and proteoglycan synthesis in human articular chondrocytes.** *Arthritis Res Ther* 2012, **14**(1):R23.
138. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, Condon KW, Iwata K, Burr DB, Gravallese EM: **Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**(9):1572-1585.
139. Zhu M, Tang D, Wu Q, Hao S, Chen M, Xie C, Rosier RN, O'Keefe RJ, Zuscik M, Chen D: **Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice.** *J Bone Miner Res* 2009, **24**(1):12-21.
140. Kubota T, Michigami T, Ozono K: **Wnt signaling in bone metabolism.** *J Bone Miner Metab* 2009, **27**(3):265-271.
141. Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA: **Blockade of Wnt-5A/Frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation.** *Arthritis & Rheumatism* 2001, **44**(4):772-781.
142. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA: **Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, **97**(6):2791-2796.
143. Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N: **The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation,** vol. 108; 2006.
144. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G: **Wnt5A/CaMKII Signaling Contributes to the Inflammatory Response of Macrophages and Is a Target for the Antiinflammatory Action of Activated Protein C and Interleukin-10.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008, **28**(3):504-510.
145. Rauner M, Stein N, Winzer M, Goettsch C, Zwerina J, Schett G, Distler JHW, Albers J, Schulze J, Schinke T *et al*: **WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production.** *Journal of Bone and Mineral Research* 2012, **27**(3):575-585.
146. Gustafson B, Smith U: **Cytokines Promote Wnt Signaling and Inflammation and Impair the Normal Differentiation and Lipid Accumulation in 3T3-L1 Preadipocytes.** *Journal of Biological Chemistry* 2006, **281**(14):9507-9516.
147. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA: **Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation.** *Bone* 2004, **35**(4):828-835.

148. Mabey T, Honsawek S, Tanavalee A, Wilairatana V, Yuktanandana P, Saetan N, Zhan D: **Plasma and synovial fluid sclerostin are inversely associated with radiographic severity of knee osteoarthritis.** *Clinical Biochemistry* 2014, **47**(8):547-551.
149. Chen X, Lu J, Bao J, Guo J, Shi J, Wang Y: **Adiponectin: a biomarker for rheumatoid arthritis?** *Cytokine Growth Factor Rev* 2013, **24**(1):83-89.
150. Xue Y, Jiang L, Cheng Q, Chen H, Yu Y, Lin Y, Yang X, Kong N, Zhu X, Xu X *et al*: **Adipokines in psoriatic arthritis patients: the correlations with osteoclast precursors and bone erosions.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e46740.
151. Eder L, Jayakar J, Pollock R, Pellett F, Thavaneswaran A, Chandran V, Rosen CF, Gladman DD: **Serum adipokines in patients with psoriatic arthritis and psoriasis alone and their correlation with disease activity.** *Ann Rheum Dis* 2013, **72**(12):1956-1961.
152. Kocabas H, Kocabas V, Buyukbas S, Melikoglu MA, Sezer I, Butun B: **The serum levels of resistin in ankylosing spondylitis patients: a pilot study.** *Rheumatol Int* 2012, **32**(3):699-702.
153. Toussirot E, Streit G, Nguyen NU, Dumoulin G, Le Huede G, Saas P, Wendling D: **Adipose tissue, serum adipokines, and ghrelin in patients with ankylosing spondylitis.** *Metabolism* 2007, **56**(10):1383-1389.
154. Derdemezis CS, Filippatos TD, Voulgari PV, Tselepis AD, Drosos AA, Kiortsis DN: **Effects of a 6-month infliximab treatment on plasma levels of leptin and adiponectin in patients with rheumatoid arthritis.** *Fundam Clin Pharmacol* 2009, **23**(5):595-600.
155. Peters MJ, Watt P, Cherry L, Welsh P, Henninger E, Dijkmans BA, McInnes IB, Nurmohamed MT, Sattar N: **Lack of effect of TNFalpha blockade therapy on circulating adiponectin levels in patients with autoimmune disease: results from two independent prospective studies.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**(9):1687-1690.
156. Yoshino T, Kusunoki N, Tanaka N, Kaneko K, Kusunoki Y, Endo H, Hasunuma T, Kawai S: **Elevated serum levels of resistin, leptin, and adiponectin are associated with C-reactive protein and also other clinical conditions in rheumatoid arthritis.** *Intern Med* 2011, **50**(4):269-275.
157. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Unzueta MT, Gonzalez-Juanatey C, Miranda-Filloy JA, Vazquez-Rodriguez TR, De Matias JM, Martin J, Dessein PH, Llorca J: **Anti-TNF-alpha therapy modulates resistin in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2008, **26**(2):311-316.
158. Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Garcia-Unzueta MT, Berja A, Miranda-Filloy JA, de Matias JM, Gonzalez-Juanatey C, Llorca J: **Visfatin is not associated with inflammation or metabolic syndrome in patients with severe rheumatoid arthritis undergoing anti-TNF-alpha therapy.** *Clin Exp Rheumatol* 2010, **28**(1):56-62.
159. Chen WP, Bao JP, Feng J, Hu PF, Shi ZL, Wu LD: **Increased serum concentrations of visfatin and its production by different joint tissues in patients with osteoarthritis.** *Clin Chem Lab Med* 2010, **48**(8):1141-1145.
160. Giles JT, van der Heijde DM, Bathon JM: **Association of circulating adiponectin levels with progression of radiographic joint destruction in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2011, **70**(9):1562-1568.

- 
161. Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnaker E-M, Tarner IH, Robbins PD *et al*: **Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints.** *Nat Med* 2009, **15**(12):1414-1420.
  162. Frommer KW, Zimmermann B, Meier FMP, Schröder D, Heil M, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Brentano F, Gay S *et al*: **Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheumatism* 2010, **62**(10):2886-2899.
  163. Evans L, Williams AS, Hayes AJ, Jones SA, Nowell M: **Suppression of leukocyte infiltration and cartilage degradation by selective inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase: Apo866-mediated therapy in human fibroblasts and murine collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(7):1866-1877.

## 10 Publikationen

Bei unterstrichenem Poster oder Vortrag wurde diese Kongressbeiträge selbst vorgestellt bzw. gehalten.

**S. Junker**, K. Frommer, G. Krumbholz, A. Lehr, S. Rehart, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Adipokine Expression in Osteoarthritis Osteophytes. [abstract]. Arthritis Rheum 2011; 63 Suppl 10 :S712 Poster

**S. Junker**, K. Frommer, G. Krumbholz, A. Lehr, S. Rehart, J. Steinmeyer, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Adipocytokine Expression in Osteophytes of Osteoarthritis Patients [abstract]. Der Internist 2012; 53 Suppl 1 :99 Poster

**S. Junker**, K. Frommer, G. Krumbholz, A. Lehr, S. Rehart, J. Steinmeyer, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann Expression of adipocytokines in osteoarthritis osteophytes [abstract]. Osteoarthritis and Cartilage 2012; 20 Suppl 1 :115 Poster

**S. Junker**, G. Krumbholz, K. Frommer, A. Lehr, U. Lange, S. Rehart, J. Steinmeyer, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann Expression of Adipocytokines in Osteophytes and Osteoblasts of Osteoarthritis Patients [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2012, 71 Suppl 2 :29 Poster

**S. Junker**, G. Krumbholz, K. Frommer, A. Lehr, S. Rehart, J. Steinmeyer, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; The Role of Adipocytokines in Osteophyte Formation in Osteoarthritis. [abstract]. Arthritis Rheum 2012; 64 Suppl 10 :S387 Poster

G. Krumbholz, **S. Junker**, A. Lehr, M. Rickert, G. Schett, S. Rehart, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Visfatin/PBEF in Bone Remodeling of Rheumatoid Arthritis [abstract]. Ann Rheum Dis 2012; 71 Suppl 3 :322 Poster

G. Krumbholz, **S. Junker**, A. Lehr, M. Rickert, U. Lange, S. Rehart, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Effects of Visfatin/ PBEF on osteoblast function in rheumatoid arthritis [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2012, 71 Suppl 2 :42 Poster

U. Lange, T. Wettich, C. Schneider, **S. Junker**, G. Krumbholz, E. Neumann, U. Müller-Ladner; Wirkung einer IL-6R-Inhibition bei TNF-Blocker-vortherapierten Patienten mit rheumatoider Arthritis auf den Knorpel- und Knochenstoffwechsel sowie die Knochendichte – eine 1-jährige Prospektivstudie [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2012, 71 Suppl 2 :81 Poster

**S. Junker**, G. Krumbholz, K. Frommer, S. Rehart, U. Lange, J. Steinmeyer, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; The Role of Adipocytokines in Osteoarthritis Osteophyte Formation [abstract]. Ann Rheum Dis 2013; 72 Suppl 1 :A63 Poster

**S. Junker**, G. Krumbholz, K. Frommer, S. Rehart, U. Lange, J. Steinmeyer, M. Rickert, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Die Rolle von Adipokinen bei der Osteophytenentstehung bei Osteoarthritis [abstract]. Der Internist 2013; 54 Suppl 1 :58 Poster

**S. Junker**, G. Krumbholz, K. Frommer, A. Sachs, U. Lange, S. Rehart, J. Steinmeyer, M. Rickert, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Adipokines in osteoarthritis osteophyte formation [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2013, 72 Suppl 2 :32 Poster

G. Krumbholz, **S. Junker**, A. Lehr, M. Rickert, G. Schett, U. Lange, S. Rehart, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Visfatin /PBEF in Bone Remodelling of Rheumatoid Arthritis [abstract]. Ann Rheum Dis 2013; 72 Suppl 1 :A64 Poster

G. Krumbholz, **S. Junker**, A. Sachs, M. Rickert, G. Schett, U. Lange, S. Rehart, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Effects of Visfatin on the process of bone remodelling in rheumatoid arthritis [abstract]. Der Internist 2013; 54 Suppl 1 :53 Poster

G. Krumbholz, **S. Junker**, U. Lange, M. Rickert, J. Steinmeyer, A. Sachs, S. Rehart, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Adiponectin: modulation of the local inflammatory milieu at sites of bone remodelling in rheumatoid arthritis [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2013, 72 Suppl 2 :47 Poster

U. Lange, G. Krumbholz, **S. Junker**, E. Neumann, U. Müller-Ladner; Sklerodermie: Knochendichteminderung und Assoziation zu Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptor(VDR)-Gens [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2013, 72 Suppl 2 :96 Poster

H. Stracke, G. Krumbholz, **S. Junker**, E. Neumann, U. Müller-Ladner, U. Lange; 2-jährige Prospektivstudie zum Einfluss einer TNF-Blockadetherapie auf den Verlauf von biochemischen Markern des Knochen- und Knorpelstoffwechsels bei rheumatoider Arthritis [abstract]. Zeitschrift für Rheumatologie, 2013, 72 Suppl 2 :99 Poster

G. Krumbholz, **S. Junker**, U. Lange, M. Rickert, J. Steinmeyer, S. Rehart, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Adiponectin: modulation of bone remodelling in rheumatoid arthritis [abstract]. Ann Rheum Dis 2014; 73 Suppl 1 :A18 Poster

**S. Junker**, G. Krumbholz, K. Frommer, S. Rehart, U. Lange, G. Schett, U. Müller-Ladner, E. Neumann; Analysis of the Effect of Adipokines on WNT Signaling in Osteoarthritis Osteoblasts [abstract]. Ann Rheum Dis 2014; 73 Suppl 2 :68 Vortrag

---

## **Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

17.10.2014

Susann Junker

---

## Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich während meiner Doktorarbeit stets unterstützt und durch ihre Hilfsbereitschaft und Geduld zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Medizin. Zudem danke ich ihm für die Möglichkeit, an vielen Kongressen und Seminaren teilnehmen zu dürfen sowie seine motivierende Unterstützung und sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Prof. Dr. Michael Martin danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit im Fachbereich Biologie zu betreuen.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Elena Neumann für ihre Unterstützung und Motivation, ihre hilfreichen Ratschläge und praktischen Anregungen, sowie die sorgfältige Durchsicht meines Manuskripts.

Weiterhin danke ich Dr. Grit Krumbholz und Dr. Klaus Frommer für die Hilfe beim Erlernen verschiedener Techniken und dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Birgit Zimmermann und Dr. Christiane Schönfeld danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und für ihre Ratschläge und Ideen, die mir stets sehr geholfen haben. Ebenso danke ich Dr. Kiran Khawaja für ihre Unterstützung beim Western Blot.

Ich danke Carina Schreyäck für ihre freundschaftliche Unterstützung und ihre Hilfe bei allem was mit den Knochengeweben zu tun hatte und Simone Beninghoff und Maria Schwarz für ihre Unterstützung bei allem was mit der Zellkultur zu tun hatte.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Massimiliano Vasile, Dr. Ingo Tarner, Prof. Dr. Uwe Lange, Dr. Marvin Peters, Dr. Stephanie Lefèvre, Lucija Berninger, Anna Balkenhol, Rosel Engel, Iris Kreis, Christine Kendall, Sina Köppert, Mona Bausch und allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors, die ich vergessen habe, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfe im Laboralltag und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Besonders danke ich meiner Familie, von der ich stets Unterstützung, Rückhalt und Motivation erfahren habe, vor allem meinen Eltern für ihre Hilfe auch in schwierigen Situationen und dafür, dass sie immer für mich da sind, wenn ich sie brauche.