Aus dem Department für Kleintiere und Pferde der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut/Klinik für Pferde

Abteilung der regenerativen Medizin (LeiterIn: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Florien Jenner Dipl.ACVS Dipl.ECVS)

Der Einfluss von fetalem Kälberserum auf die Alterung von Chondrozyten in vitro

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von Laura Göbel

Wien, September 2021

Betreuerin

Univ. Prof. Dr.med. vet. Florien Jenner, Dipl. ACVS, Dipl. ECVS

Co-Betreuerin

Priv.-Doz. Dr.med.vet. Iris Ribitsch PhD

Betreuerin

Dr.med. vet. Gabriele Gradner, Dipl. ECVS

GutachterIn

Dr. Gabriele Gradner Dipl. ECVST

1. Stand d	les Wissens	7
1.1. Gel	enkknorpel	7
1.2. Ost	teoarthritis	8
1.3. Die	Rolle von Seneszenz in der Entstehung und Progression von	
Osteoa	rthritis	11
1.3.1.	Grundlagen der zellulären Seneszenz	13
1.3.2.	Telomerinduzierte zelluläre Seneszenz	15
1.3.3.	Spannungsinduzierte zelluläre Seneszenz	17
1.3.4.	Onkogeninduzierte zelluläre Seneszenz	18
1.4. Ser	neszenz in Osteoarthritis	19
1.4.1.	SASP	19
1.4.2.	Angeborenes Immunsystem und lokale Entzündung im Gelenk	20
1.4.3.	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)	23
1.4.4.	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	24
1.4.5.	Metalloproteasen	25
1.4.6.	Der ATM-p53-p21- Weg – DNA-damage-response (DDR)	26
1.4.7.	Proteinaggregate und Amyloide	27
1.4.8.	Metabolische Entzündung	28
1.4.9.	Pro-inflammatorische Zytokine	29
1.4.10.	Alarmine	30
1.4.11.	NOTCH-Signalweg	31
1.4.12.	Epigenetik	32
1.5. Der	zeitige Therapiemöglichkeiten	32
1.6. Ans	satz der Zellverjüngung	41
1.7. Ver	gleich Zellkultursystem Monolayer vs. Explant	42
2. Materia	l und Methoden	45
2.1. Ver	suchsgrundlagen	45
2.2. Ver	wendete Materialien, Reagenzien und Gerätschaften	46
2.3. Her	rstellung von Medien und Lösungen	50
2.4. Pro	bengewinnung	51
2.5. We	iterverarbeitung der Probengruppe 1 (nativer Knorpel)	52

2.6. W	eiterverarbeitung der Probengruppe 2 (Explants)	52
2.7. W	eiterverarbeitung der Probengruppe 3	53
2.8. AI	Igemeine Arbeitsschritte	54
2.8.1.	RNS-Extraktion	54
2.8.1	I.1. Homogenisierung der Probengruppe 1	54
2.8.1	1.2. RNS-Extraktion	54
2.8.1	1.3. RNS-Isolation	55
2.8.2.	DNAse-Behandlung	56
2.9. Ar	nalyse der Genexpression	56
2.10.	Methoden zur Analyse	56
2.10.1.	PCA	56
2.10.2.	Differentiellen Expressionsanalyse	57
2.10.3.	Datenauswertung	58
3. Ergeb	nisse	60
3.1. Pr	incipal component analysis (PCA)	60
3.2. Zı	usammenfassung der differentiellen Expressionsanalyse	62
3.3. Na	ativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS	66
3.3.1.	Top-up regulierte Gene	66
3.3.2.	Top-down regulierte Gene	69
3.3.3.	Knorpel- und Seneszenz-assoziierte Gene	71
3.4. Na	ativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS	75
3.4.1.	Top-up regulierte Gene	75
3.4.2.	Top-down regulierte Gene	78
3.4.3.	Knorpel-, und Seneszenz-assoziierte Gene	80
3.5. C ł	hondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS	84
3.5.1.	Top-up regulierte Gene	84
3.5.2.	Top-down regulierte Gene	86
3.5.3.	Knorpel-, OA- und Seneszenz-assoziierte Gene	88
4. Diskus	ssion	92
11 04	wsiologische Gene im gesunden Knorpol	0.2
4.1. P	a Droliforativo Eunktionsgruppo	
4.2. Pr	o-rionerauve runkuonsyluppe	
4.J. FU	ankionsyruppe der Apopiose	

4.4. Hypertrophie	
4.5. Dedifferenzierung – Funktiontionsgruppe Chondrozytenprotek 98	tiv/-degenerativ
4.6. Funktionsgruppe der Inflammation und Entzündungsmediatore Einfluss von Eicosanoiden im FCS	en – der 102
4.7.Seneszenz-assoziierte Gene	104
5. Zusammenfassung	107
6. Summary	110
7. Anhang	112
7.1. Literaturverzeichnis	112
7.2. Abbildungs-/Tabellenverzeichnis	122
7.3. Abkürzungsverzeichnis	125

1. Stand des Wissens

1.1. Gelenkknorpel

Der Gelenkknorpel hat eine hyaline Struktur und gewährleistet die reibungsfreie Bewegung des Gelenks (Goodrich und Nixon 2006; Adams and Stashk's Lameness in horses, 6. Auflage; edited 2011 by Baxter G.). Dies ist essenziell für eine schmerzfreie Bewegung und einen großen Bewegungsradius eines Gelenks. Der Gelenkknorpel setzt sich zusammen aus 1-12 % Chondrozyten und der extrazellular Matrix (ECM) (Goodrich und Nixon 2006). Die ECM wiederum besteht zu 75 % aus Wasser, 15 % Kollagen Typ 2 und 10 % Proteoglykanen (Goodrich und Nixon 2006). Zu den Proteoglykanen zählen Aggrekan und Glykosaminoglykane (GAG), wie Hyaluronan. Aggrekane sind mit ca. 85 % Anteil an den Proteoglykanen die am häufigsten vorhandenen Coreproteine im hyalinen Knorpel (Decker et al. 2015).

Gelenkknorpel ist avaskulär und aneural (Ortved und Nixon 2016). Die Versorgung der Chondrozyten mit Nährstoffen erfolgt durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit, welche sich im Gelenk befindet und von den Synoviozyten produziert wird (Zayed et al. 2018). Bei Bewegung und dadurch wechselnder Be- und Entlastung des Knorpels, strömt die Synovia um und in den Knorpel, sodass dieser ständig mit Nährstoffen versorgt wird (Adams and Stashk's Lameness in horses, 6. Auflage; edited 2011 by Baxter G.)

Der Gelenkknorpel ist zwischen 1,5-2,0 mm dick (McIlwraith et al. 2011) und lässt sich histologisch und funktionell in drei Schichten unterteilen (Decker et al. 2015). Die oberflächliche Zone, welche am weitesten entfernt vom Knochen liegt, besteht aus flachen, länglichen Chondrozyten, während die Zellen in der mittleren und tiefen Zone groß und rund sind (Decker et al. 2015).

Die Ausrichtung der Chondrozyten in der obersten Zone erfolgt entlang der Hauptbewegungsachse (Decker et al. 2015). Die Hauptaufgabe dieser Zone besteht darin Scherkräften aufzunehmen und zu verteilen (Decker et al. 2015).

Die mittlere Zone wird durch säulenartig gestapelte, große, runde Chondrozyten aufgebaut, welche hauptverantwortlich für die Produktion und Erhaltung aller ECM-Komponenten, wie Kollagen Typ 2 und Aggrekan, sind (Decker et al. 2015).

Die tiefe Zone ist direkt oberhalb des Knochens lokalisiert (Decker et al. 2015). Die Chondrozyten erscheinen mikroskopisch nochmals größer und runder als jene in der mittleren Zone. Sie produzieren ebenfalls Komponenten der ECM und sorgen für die adäquate Kraftübertragung auf den darunterliegenden subchondralen Knochen (Decker et al. 2015).

Hyaliner Knorpel ist, aufgrund der Organisation der Chondrozyten, perfekt geeignet für das Aushalten von mechanischer Belastung und für reversible Verformung (Zayed et al. 2018). Bei physiologischer Belastung kann der Knorpel um 40 % in seiner Höhe komprimiert werden (Adams and Stashk's Lameness in horses, 6. Auflage; edited 2011 by Baxter G.). Aggrekane sind mitverantwortlich für die hohe Elastizität, während die in Fibrillen organisierten Kollagen Typ 2 Fasern die Form und Stabilität gewährleisten (Decker et al. 2015). Der Knorpel schützt den darunter liegenden subchondralen Knochen vor Reibung und wirkt stoßdämpfend (Ortved und Nixon 2016). Bei jeder Art der Bewegung ist dieser unterschiedlichen Kräften, wie Scher-, Zug- oder Druckkräften ausgesetzt. Je nach Zeitpunkt im Belastungsablauf und Lokalisation im Gelenk variieren diese biophysikalischen Kräfte deutlich (Guilak 2011). Die Veränderungen werden von den Chondrozyten mittels lonenkanälen, integrinvermittelten ECM-Verbindungen und Membran-Deformation registriert und ins Zellinnere weitergeleitet (Guilak 2011). Dort werden Signalwege aktiviert, welche für die Knorpelhomöostase bedeutend sind und das Verhältnis von anabolen und katabolen Faktoren regulieren (Guilak 2011). Außerdem wird bei Belastung das in der ECM enthaltene Wasser in Bewegung versetzt und sorgt so für eine gleichmäßige Druckverteilung auf die Gesamtfläche des subchondralen Knochens (Buckwalter 1998). Vor allem bei punktuellen Belastungen des Knorpels ist dies essenziell, um eine optimale Druckübertragung zu gewährleisten und mögliche Folgen zu minimieren (Buckwalter 1998).

Durch die Avaskularität und die hohen Stressbelastungen, welche auf den Gelenkknorpel wirken, sind sowohl seine eigenen als auch die therapeutischen Regenerationsmöglichkeiten stark beschränkt.

1.2. Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die sowohl beim alternden Tier als auch beim Menschen, eine große Herausforderung an die Medizin stellt (Zayed et al. 2018). OA ist definiert als progressiver Gelenkknorpelverlust mit unterschiedlich stark ausgeprägten Veränderungen im umgebenden Weichteilgewebe, subchondralen Knochen und der Synovialmembran (McIlwraith und Vachon 1988), aber ohne systemische Auswirkungen (Brandt et al. 2008). Als entscheidende Konsequenz steht dabei der Abbau der Kollagen Typ 2 Fasern im Fokus, welche zu einem Auflockern und Auflösen der ECM führt, in deren Folge die Funktion des Knorpels nicht mehr gegeben ist (Brandt et al. 2008). Dafür verantwortlich sind morphologische, biochemische, molekulare und biomechanische Veränderungen in der ECM und der Chondrozyten (Brandt et al. 2008). In weiterer Folge kommt es zu Veränderungen aller Strukturen im Gelenk (Goldring und Otero 2011).

Mögliche Ursachen für die Entwicklung von OA sind mechanische Faktoren, wie Über- und Fehlbelastung und Traumata, Entzündungen aber auch epigenetische Einflüsse (Brandt et al. 2008).

Jede anormale Belastung, z. B. durch Gelenkfehlstellungen oder Ausgleichsbewegungen aufgrund von Schmerzen, aber auch akute Überbelastung, führt zu einer Verschiebung in der Knorpelhomöostase zu Gunsten der Produktion von katabolen Produkten, wie Zytokine und Entzündungsmediatoren (Issa und Griffin 2012). Zu den Entzündungsmediatoren zählen Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-10, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Aggrekanasen, Prostaglandin E2 (PGE2), und Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β) (Issa und Griffin 2012).

Diese führen zu einer deutlichen Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Synovia, welche den Knorpel dauerhaft schädigen, in dem sie Chondrozytenapoptose und stressbedingte Hochregulation von diversen Kinasen, wie MMPs und TNF- α , verursachen (Goldring und Otero 2011).

Zusammenfassend kann man sagen, dass anormale Gelenkbelastung zum Verlust von Proteoglykanen und des Kollagennetzwerkes und damit zur Degeneration der ECM im Knorpel beitragen kann (Goldring und Otero 2011) und dass sich in weiterer Folge eine Entzündung in allen an der Gelenkbildung beteiligten Strukturen entwickelt.

Zusätzlich können sich, bei Verschiebung der Knorpelhomöostase durch Zunahme kataboler Faktoren, Stoffwechselprodukte im Gelenk ansammeln, welche weiteren

oxidativen Stress verursachen. Man spricht zusammenfassend von einer "damage associated molecular pattern" (DAMP) (Vinatier et al. 2018). Auf diese Weise wird das angeborene Immunsystem aktiviert (Berenbaum 2013, Orlowsky und Kraus 2015, Rahmati et al. 2016), auf dessen Funktion in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen werden wird.

Ein weiterer wichtiger Prävalenzfaktor für die Entstehung von OA ist das Alter. Beim physiologischen Altern entsteht eine gering- bis mittelgradige chronische Entzündung, weswegen der Begriff "Inflammaging" (englisch: *"Inflammation"* – Entzündung; *"Aging"* – Altern) etabliert wurde (Mobasheri et al. 2015).

Mit steigendem Alter werden Mitochondrien dysfunktional, welche sich in den Zellen akkumulieren und so oxidativen Stress im Knorpel erhöhen. Der fehlende Abbau der Mitochondrien ist des funktionellen Limits der Autophagenkapazität geschuldet (Mobasheri et al. 2015). Aufgrund des oxidativen Stresses kommt es zur Bildung von Multi-Entzündungsprotein-Komplexen, den sogenannten Inflammasomen (Mobasheri et al. 2015). Beide stören die Zellhomöostase empfindlich und führen zur Veränderung des Phänotyps, verursachen Apoptose und anormale Expression von Entzündungsmediatoren, wie NOs, Cyclooxygenase (COX) und MMPs (Goldring und Otero 2011). Diese greifen wiederum das Kollagennetzwerk an und führen zur Matrixdegeneration – es entsteht ein Knorpeldefekt.

Knorpeldefekte stellen sich als Verlust der ECM dar. Sie können als Fibrillation, Ulzerationen oder vollständige Knorpelschädigung bis auf den subchondralen Knochen auftreten (Brandt et al. 2008). Neben der Schädigung des Knorpels wird auch die Synovialmembran und der subchondrale Knochen beeinträchtigt (Brandt et al. 2008). Die Entzündung wird durch die in der Synovia befindlichen Entzündungsmediatoren, Chemokine und Zytokine im Gelenk verteilt. Ein klinischer Verdacht auf OA kann durch die orthopädische Untersuchung entstehen und mithilfe von Röntgenbildern bestätigt werden (Ebell 2018). Zu den variablen, radiologisch sichtbaren Veränderungen gehören subchondrale Sklerose und Lyse, Verkleinerung bzw. Asymmetrie des Gelenkspaltes, Osteophytenbildung, osteochondrale Fragmente und Ankylosen (Brandt et al. 2008). Allerdings korrelieren die röntgenologischen Veränderungen oft nicht mit den klinischen Auffälligkeiten (Brandt et al. 2008, Ebell 2018). Auch hochgradige radiologische Veränderungen können asymptomatisch oder mit geringen klinischen Auffälligkeiten einhergehen (Brandt et al. 2008). Dies kann auf den gebildeten Faserknorpel zurückzuführen sein.

Die klinischen Symptome beginnen meist mit vermehrter Gelenkfüllung und Schmerzen. Beide treten gemeinsam auf, aufgrund von mechanischen und/oder chemischen Stimuli (Brandt et al. 2008). Später im Verlauf ist der Bewegungsumfang des Gelenks in Folge von Fibrosierung eingeschränkt und es tritt Krepitation auf (Brandt et al. 2008). Es sind auch Kardinalsymptome von Entzündung klinisch zu beobachten, die aber nur auf das betroffene Gelenk beschränkt sind (Brandt et al. 2008). Zusätzlich nimmt die Viskosität der Synovialflüssigkeit aufgrund der Reduktion des Hyaluronsäuregehalts ab (Tnibar et al. 2015). Infolgedessen sinkt die Gleitfähigkeit im Gelenk und die Schutzfunktion der Synovia für den Knorpel, wodurch die morphologische Integrität der Knorpeloberfläche verändert wird (Svala et al. 2017).

Die körpereigene Heilung besteht in der Bildung von Faserknorpel, welcher vorwiegend aus Kollagen Typ 1 Fasern besteht und im Vergleich zu Kollagen Typ 2 Fasern eine schlechtere biomechanische und biochemische Qualität aufweist. So ist der "reparierte" Knorpel anfälliger für erneute Verletzungen (Brandt et al. 2008).

1.3. Die Rolle von Seneszenz in der Entstehung und Progression von Osteoarthritis

Eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Osteoarthritis spielt die sogenannte *Zellseneszenz*. Zelluläre Seneszenz ist definiert als der Wachstumsstillstand von Zellen, welche eine gewisse Anzahl an Mitosen durchlaufen haben (Mobasheri et al.

2015). Neben der Förderung des Alterungsprozesses und der Entwicklung von altersbedingten Erkrankungen, ist Seneszenz auch als zentraler, aber positiver Mechanismus in der Embryologie und bei der Unterdrückung der Krebsentwicklung zu finden (Vinatier et al. 2018).

Seneszenz kann in fast allen Zellen und Gewebearten auftreten. Nur wenige Zellen bilden eine Ausnahme, zu ihnen zählen Keimzellen (Martin und Buckwalter 2001), embryonale Stammzellen, die meisten Krebszellen und einige Zellen des Immunsystems (z.B.: aktivierte T-Zellen) (Campisi 2013). Diese besitzen das Telomerase-Enzym, aufgrund dessen die Verkürzung der Telomere verhindert wird, wodurch Seneszenz vorgebeugt werden kann (Martin und Buckwalter 2001).

Chondrozyten, die physiologischerweise eine sehr niedrige Mitoserate aufweisen, haben in Idealumgebung viel Zeit, bis es zum Einsetzten von Seneszenz kommt (Martin und Buckwalter 2001). Allerdings können sich Telomerverkürzungen, welche folglich zu Seneszenz führen, über Jahrzehnte akkumulieren oder durch krankheitsbedingte, erhöhte Zellteilung ausgelöst werden (Martin und Buckwalter 2001).

Wie bereits erwähnt können diverse Ursachen zu Synovitis und Stress der Chondrozyten und Synoviozyten im Gelenk führen. Auf diese mitogenen Stimuli hin beginnen sich die Knorpelzellen verstärkt zu teilen, die Telomere werden schneller als physiologisch verkürzt und Seneszenz wird induziert (Campisi 2013, Martin und Buckwalter 2001). In der Folge kommt es sekundär zu Veränderungen im umgebenden Gewebe (Brandt et al. 2008). Es ist unter anderem mit Sklerose des subchondralen Knochens, Synovitis und Osteophytenbildung zu rechnen (Brandt et al. 2008).

Mit dem Eintritt in die Seneszenz kommt es zu Veränderungen an der Zelle. Der normale Phänotyp und die normale Stoffwechselaktivität gehen verloren, die Zelle wird empfänglicher gegenüber katabolen und pro-inflammatorischen Faktoren und zeigt eine verminderte Reaktion auf anabole Faktoren (Mobasheri et al. 2015). Jedoch bleiben sie sekretorisch aktiv, aber produziert andere Faktoren, Chemokine und Zytokine als gesunde Zellen (Childs et al. 2015). lhr Sekretionsprofil wird als "senescent-associated-secretory-phenotype" (SASP) bezeichnet, durch welchen Immunzellen angelockt werden (Vinatier et al. 2018).

Die Chondro- und Synoviozyten werden allerdings nicht aufgrund dieser phänotypischen Veränderungen vom Körper abgebaut, sondern bleiben bestehen und sezernieren weiterhin Botenstoffe, sogenannte Alarmine (Jeon et al. 2018). Über diese werden weitere Immunzellen in das Gelenk gelockt (Höhn et al. 2017). Gleichzeitig werden von Chondrozyten weniger extrazelluläre Matrixkomponenten synthetisiert (Vinatier et al. 2018). Mit der Veränderung des Sekretoms hin zum SASP schaffen und erhalten sich die Zellen ein entzündliches Milieu und fördern die Degeneration des Gelenkknorpels. Es kommt zur Ausbildung eines Teufelskreises (Berenbaum 2013). Über parakrine Interaktion mit den Nachbarzellen werden diese ebenfalls seneszent und der Knorpelmatrixverlust breitet sich sukzessive über den gesamten Gelenkknorpel aus (Höhn et al. 2017, Toh et al. 2016).

Um die Bedeutung der Seneszenz in der Entstehung und Progredienz von OA besser zu verstehen wird im Folgenden genauer auf die Mechanismen zellulärer Seneszenzen und auf deren Folgen eingegangen.

1.3.1. Grundlagen der zellulären Seneszenz

Die Seneszenz wurde erstmals von Hayflick und Moorhead 1961 beschrieben, die den Verlust der Teilungsfähigkeit von Zelllinien *in vitro* nach einer gewissen Anzahl von Mitosen feststellten (Mobasheri et al. 2015).

Die anfängliche Annahme, dass Seneszenz als Zeichen des Alters von Zellen auftritt, ist revidiert worden (Magalhães und Passos 2018). Der Alterungsprozess ist ein zeitlich fortschreitender Verfall, der an die Lebenszeit gekoppelt ist (Campisi 2013, Höhn et al. 2017). Dahingegen ist Seneszenz auch im jüngeren Altern, selbst in der Embryogenese bereits zu finden. In der Embryogenese durchlaufen unter anderem Zellen im apikalen ektodermal Kamm und im dorsalen Teil des Neuralrohrs, als Teil ihrer Entwicklung, eine Phase, in der seneszente Zellen aus diesen Bereichen für den Gewebeumbau zuständig sind (Calcinotto et al. 2019). Während in der Embryogenese die seneszenten Zellen nach

Ausübung ihrer Funktion vom Immunsystem abgebaut werden, werden diese bei der Alterung im Gewebe akkumuliert und können eine DNA-damage-response (DDR; DNS-Schadenantwort) aktivieren (Magalhães und Passos 2018).

Obwohl es einige bekannte Ursachen gibt, die zu Zellseneszenz führen, sind die exakten Mechanismen noch nicht vollständig erforscht. Es wird jedoch angenommen, dass mechanische Faktoren, wie Über- oder Fehlbelastung und Traumata, Entzündungen und veränderte Epigenetik ursächlich sind (Mobasheri et al. 2015). Daraufhin kommt es zu Veränderungen der Telomerlänge, DNS-Schäden, oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen, welche Seneszenz *in vivo* auslösen können (Vinatier et al. 2018).

Hierbei kommt es zum irreversiblen Mitosestopp der Zellen in der G1- oder frühen S-Phase (McCulloch et al. 2017). Die Zellen reagieren folglich nicht mehr auf mitogene Stimuli und können auch nicht wieder in den Zellzyklus eintreten (Campisi 2013).

Seneszente Zellen weisen eine Kombination aus verschiedenen Charakteristika auf, anhand derer die Seneszenz erkannt werden kann. Allen voran ist der irreversible Teilungsstopp ein essenzieller Punkt (McCulloch et al. 2017). Diesem zugrunde liegt oft die reduzierte Telomerlänge und erhöhte ROS Produktion (Mobasheri et al. 2015). Des Weiteren entwickeln sie eine Hyperplasie (Mobasheri et al. 2015). Darüber hinaus ist die Genexpression der als Tumorsuppressoren bekannten Faktoren p21, p16^{INK4a} und p53 und die senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -Gal)-Aktivität erhöht (Campisi 2013). Weiterhin zeigen Zellen Veränderungen in der intrazellulären Protein Expression und Veränderungen im Sekretom hin zum SASP (Campisi 2013).

Auch zeigen sie Veränderungen in der Reaktion auf Wachstumsfaktoren. Die Zellen verfügen über eine erhöhte Sensitivität für katabole und pro-inflammatorische Faktoren und reagieren mit einer verringerten Antwort auf anabole Faktoren (Toh et al. 2016).

Morphologisch sind die Zellen vergrößert, bilden oft multiple Vakuolen und werden Mehrkernhaltig (Chandeck und Mooi 2010). Die Kerne enthalten Bereiche dicht gepackter, transkriptionell stillgelegter DNS, sogenannte heterochromatische Herde (senescenceassociated heterochromatic foci; SAHF) (Chandeck und Mooi 2010), welchen eine Stabilisierung des seneszenten Phänotyps zugesprochen werden (Chandeck und Mooi 2010).

Auch wenn *in vivo* die genauen Ursachen für zelluläre Seneszenz derzeit nicht eindeutig geklärt sind, können *in vitro* allgemein drei verschiedene Kategorien unterschieden werden (Lowe et al. 2016). Die telomerinduzierte Seneszenz (replikative Seneszenz, RS), die spannungsinduzierte Seneszenz (SIPS) und die onkogen induzierte Seneszenz (OIS) (Vinatier et al. 2018). Diese Arten unterscheiden sich in der aktivierenden Signalkaskade. Allerdings sind für die Chondrozyten nur die RS und die SIPS von Bedeutung (Ashraf et al. 2016).

Während bei der RS durch übermäßige Mitose die Telomerverkürzung als Faktor eine Rolle spielt, wird die SIPS durch extrinsische Stressoren, wie DNS-Schäden oder oxidativen Stress, hervorgerufen (Toh et al. 2016).

Neben der Unterscheidung zwischen den verschiedenen Arten der Seneszenzinduktion, kann auch zwischen der Wirkungsweise unterschieden werden. Im Falle von Chondroseneszenz, dem Schwerpunkt dieser Arbeit, werden bei der direkten Form seneszenzinduzierende Gene, Chemokine und Zytokine (bspw. IL-1β, p53, p16, p21, p38MAPK) hoch reguliert, während bei der indirekten Art chondroprotektive Faktoren (bspw. SOX-9, IGF-1) herunterreguliert werden (Ashraf et al. 2016).

1.3.2. Telomerinduzierte zelluläre Seneszenz

Die telomerinduzierte zelluläre Seneszenz, auch replikative Seneszenz (RS) genannt, tritt durch Verkürzung der Telomere unter eine kritische Länge auf (Martin und Buckwalter 2001). Die Telomere bestehen aus Ribonukleotidproteinstrukturen, befinden sich an den Enden der DNS-Stränge und schützen vor chromosomaler Instabilität und Mutation, indem sie den Verlust von Basenpaaren chromosomaler DNS verhindern (Martin und Buckwalter 2001). Jedoch geht bei jeder Mitose ein Stück der Telomerlänge verloren (Martin und Buckwalter 2001). Da mit steigendem Alter auch die Anzahl der durchlaufenen Mitosen zunimmt, sinkt gleichzeitig die Telomerlänge. Sobald die kritische Telomerlänge unterschritten wird, kommt es zum Teilungsstopp und die Zellen gehen in Seneszenz (Martin und Buckwalter 2001), wobei die Tumorsupressorgene p53 und p21 aktiviert werden (Magalhães und Passos 2018).

Mit jeder durchlaufenen Mitose werden von den Telomerenden 100 bis 200 Basenpaare nicht repliziert (Martin und Buckwalter 2001). Nach 50 Mitosen (sog. Hayflick-Grenze; in vitro beschrieben (Mobasheri et al. 2015)) wird die minimalste Telomerlänge, welche für die Replikation notwendig ist, von 5-7,6 kbp unterschritten (Martin und Buckwalter 2001). Infolge können keine Schleifenstrukturen mehr gebildet werden, welche für eine erfolgreiche Replikation erforderlich sind (Chandeck und Mooi 2010). Diese Schleifenstrukturen sind über sogenannte Shelterin-Proteine miteinander verbunden (Chandeck und Mooi 2010, Vinatier et al. 2018), welche verhindern, dass DNS-Reparaturmechanismen Doppelstrangbruch einen mit einem freien Chromosmenende verwechseln (Chandeck und Mooi 2010). Dieser essenzielle Mechanismus schützt vor falsch eingeleiteten DNS-Reparaturmechanismen, durch die es zu chromosomaler Instabilität kommen könnte (Chandeck und Mooi 2010). Sind die Telomere zu kurz, werden die Doppelstrang-DNS-Enden freigelegt, was eine dauerhafte DNS-Damage-Response (DDR; dt: DNS-Schadensantwort) und RS zu Folge hat (Chandeck und Mooi 2010, Childs et al. 2015, Martin und Buckwalter 2001).

RS kann in Folge von hohem Alter, Entzündung oder Verletzungen auftreten (Mobasheri et al. 2015). Es ist anzumerken, dass nur Zelltypen, die kein Telomerase-Enzym besitzen, von dieser Art der Seneszenz betroffen sein können (Martin und Buckwalter 2001). Die Wirkung des Enzyms besteht in der Wiederherstellung der Telomere nach jeder durchlaufenen Mitose (Magalhães und Passos 2018). So nutzen sich die Telomere nicht nennenswert ab und folglich können sich diese Zellen unendlich oft teilen. Dieser Mechanismus ist besonders bei sich schnell teilenden Zelllinien, wie Keimzellen oder Stammzellen ausgeprägt (Chandeck und Mooi 2010, Martin und Buckwalter 2001). Zelllinien, denen das Telomerase-Enzym nicht eigen ist, gehen bei erhöhter mitotischer Aktivität schneller in einen seneszenten Zustand über (Martin und Buckwalter 2001). Wie bereits erwähnt weisen Chondrozyten in physiologischer Umgebung eine sehr geringe Teilungsrate auf, aber zeigen im entzündeten Milieu oder bei Verletzungen eine deutlich erhöhte mitotische Aktivität (Goldring und Otero 2011). Dadurch nutzen sich die Telomere verstärkt ab und sie werden seneszent.

Im Falle von Gelenkknorpel führt diese Seneszenz zu einer Veränderung der Matrixstruktur, des Metabolismus und der molekularen Zusammensetzung des Knorpels (Mobasheri et al. 2015). Die Matrixstruktur wird durch den Abbau der Proteoglykane aufgelockert und im Zellmetabolismus entsteht SASP und morphologische Zellveränderungen (Mobasheri et al. 2015). Daraus resultieren Veränderungen der mechanischen Eigenschaften, die den Knorpel anfälliger für weitere Stressoren und Verletzungen machen (Toh et al. 2016).

1.3.3. Spannungsinduzierte zelluläre Seneszenz

Die spannungsinduzierte Seneszenz, wird auch stress induced prematur senescence (SIPS;*deutsch:* Stressinduzierte vorzeitige Seneszenz) genannt.

Oxidativen Stress und DNS-Schäden, ohne oder nur von geringer Telomerverkürzung begleitet, induzieren SIPS (Ashraf et al. 2016). Als Folge der DNS-Schäden kommt es zur Aktivierung von DDR (Magalhães und Passos 2018). Durch DNS-Schäden an den Telomeren, dauert die Reparatur deutlich länger und es bleibt einer persistierende DDR-Aktivität bestehen (Magalhães und Passos 2018).

Diese blockiert den Zellzyklus, in dem die Tumorsuppressorgene p53 und p16^{lnk4a} aktiviert werden (Bu et al. 2017). Auf die genauen Signalkaskaden wird später in dieser Arbeit noch weiter eingegangen.

Oxidativer Stress kann durch intrinsische oder extrinsische Stressoren hervorgerufen werden.

Zu den intrinsischen Stressoren gehören fehlerhafter Mitochondrienmetabolismus, Entzündung und beeinträchtigte antioxidative Abwehr (Bu et al. 2017), während extrinsische Ursachen neurotoxische Medikamente oder mechanischer Stress sind (Lepetsos und Papavassiliou 2016).

Infolgedessen werden vermehrt ROS, wie Stickoxid (NO) und Superoxid-Anionen produziert (Lepetsos und Papavassiliou 2016. Dies kann zur Seneszenz und Apoptose von Chondrozyten führen (Bu et al. 2017).

1.3.4. Onkogeninduzierte zelluläre Seneszenz

1997 beschrieben Serrano et al. zum ersten Mal die onkogeninduzierte zelluläre Seneszenz (OIS), welche im Zusammenhang mit der onkogenen Aktivierung von Ras-Proteinen steht (Serrano et al. 1997).

Die OIS ist eine antiproliferative Reaktion der Zellen auf onkogene Signale (Chandeck und Mooi 2010). Ihr Auftreten wird einerseits als elementar in der Tumorgenese diskutiert, andererseits ist ihre negative Wirkung als genetischer Stressor bei vielen degenerativen Erkrankungen bekannt (Chandeck und Mooi 2010, Liu et al. 2018).

Wie bei den vorangegangenen Seneszenzformen, ist bei OIS die SA-β-Gal Aktivität und SASP Produktion erhöht und es kommt zur Aktivierung von DDR und Autophagen (Liu et al. 2018).

Zu den onkogenen Signalen zählen die Inaktivierung von Genen, die für die Tumorsupression zuständig sind, beispielsweise p53, p21, Retinoblastom (RB) und die aktivierende Mutation von Genen für bestimmte Proteine, wie p16^{Ink4a} und p19ARF (Chandeck und Mooi 2010, Liu et al. 2018).

Durch unangemessen hohe mitogene Stimuli wird das Gen CDKN2A (Synonym: INK4A oder ARF) zur verstärkten Expression von p16^{lnk4a} und p19ARF animiert (Tao und Levine 1999). In weiterer Folge können sowohl p16^{lnk4a} als auch p19ARF entweder einen Proliferationsstopp oder die Apoptose von Zellen induzieren (Chandeck und Mooi 2010). Erhöhte Teilungssignale werden beispielsweise durch Ras-, BRAF- oder AKT-Proteine induziert (Chandeck und Mooi 2010, Liu et al. 2018). Diese Proteine sind unter anderem für ihr Vorkommen in der Tumorätiologie, als sogenannte Proto-Onkogene bekannt (Chandeck und Mooi 2010).

Bei der OIS sind bis dato drei wichtige Signalwege bekannt, die alle in der Aktivierung von NF-kB und damit in der Entstehung des Seneszenzphänotyps münden (Liu et al. 2018). Diese Signalwege sind der BRAF/MEK/ERK-Weg, der PI3K/AKT/mTOR-Weg und der

GAT4-Weg, welcher mittels Ataxia telangiectasia mutated (ATM) und ATR aktiviert wird (Liu et al. 2018).

Nichtsdestotrotz ist die Relevanz von OIS für die Entstehung von OA als eher gering einzuordnen, weswegen in der weiteren Arbeit nicht näher auf diese Form eingegangen werden soll.

1.4. Seneszenz in Osteoarthritis

In den folgenden Kapiteln wird auf einzelne Faktoren genauer eingegangen werden, welche für die Entwicklung von Seneszenz im Gelenkknorpel von Bedeutung sind.

1.4.1. **SASP**

Jede Knorpelzelle sezerniert ein spezifisches Sekretom, über welches sie mit den Nachbarzellen kommunizieren und ein ideales Milieu für sich schafft (Tchkonia et al. 2013).

Mit dem Eintreten der Seneszenz verändern sich die Inhaltsstoffe im Sekretom, hin zum sogenannten senescence-associated secretory phenotype (SASP), einem wichtigen Erkennungsmerkmal seneszenter Zellen (Childs et al. 2015).

Je nach Ursache (Martin und Buckwalter 2001) und Dauer der Seneszenz (Childs et al. 2015) unterscheidet sich die Zusammensetzung und das Verhältnis der enthaltenen Faktoren, Zytokine und Chemokine. Immer enthalten sind pro-inflammatorische Zytokine und matrixdegenerierende Enzyme, Wachstumsfaktoren, Fibronektin und ROS (Höhn et al. 2017). Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören allen voran IL-6, IL-8, IL-1ß, TNF-α und eine Vielzahl von Monozyten-Chemoattraktant-Proteinen (*monocyte chemoattractant proteins*; MNC), Makrophagen-Entzündungsproteinen (*macrophage inflammatory proteins*; MIP) und Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktoren (*granulocyte/macrophage stimulating factors*; GM-CSF) (Campisi 2013, Toh et al. 2016).

Das SASP ist eine DDR (Tchkonia et al. 2013) und die Funktion besteht in der Anlockung von Immunzellen, Makrophagen und Natürlichen Killer-(NK-)Zellen in die Synovia (Liu et al. 2018), um seneszente Zellen zu eliminieren (Campisi 2013) und eine chronische Entzündung zu etablieren (Campisi 2013). Des Weiteren kann über enthaltene Faktoren, wie wachstumsregulierende Onkogene (*growth regulated oncogenes;* GRO), Amphiregulin und den vaskulär endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor;*VEGF) die Zellproliferation und Angiogenese stimuliert werden (Campisi 2013). Über das SASP erfolgt die Ausbreitung der OA über den gesamten Gelenkknorpel (Tchkonia et al. 2013).

Die Produktion des SASP wird allen voran durch den NF- κ B und das Gen p38 hervorgerufen (Campisi 2013, Childs et al. 2015, Liu et al. 2018, Vinatier et al. 2018), während die Sekretion der im SASP enthaltenen Faktoren autokrin über IL-1 β aufrechterhalten wird (Childs et al. 2015). Um die Bildung des SASP via NF- κ B zu starten, bindet IL-1 α an den Plasmamembranrezeptor IL-1R (Campisi 2013). In Folge wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, welche die Aktivierung von NF- κ B zum Ziel hat (Campisi 2013). Dieses beeinflusst dann die Protein- und Gensynthese für IL-6 und IL-8 (Campisi 2013).

Der SASP entsteht als Reaktion auf vermehrt oxidativen Stress, Telomerverkürzung, DNS-Schäden und als Folge von (epi-)genetischen Schäden (Campisi 2013). Sobald die schnell auftretende DDR abgeklungen ist und die langsamere, permanente DDR eintritt, werden bestimmte Proteine, wie beispielsweise ATM und Checkpointkinase 2 (CHK2), hochreguliert (Berenbaum 2013, Campisi 2013), welche dann die SASP-Produktion auslösen (Campisi 2013).

1.4.2. Angeborenes Immunsystem und lokale Entzündung im Gelenk

Entzündungen im Gelenk, wie sie auch im Rahmen einer OA auftreten, führen zum Anstieg von pro-inflammatorischen Mediatoren in der Synovia (Goldring und Otero 2011). Es sind eine große Menge an pro-inflammatorischen Zytokinen bekannt, wovon IL-1, IL-2, IL-6 und IL-12 die am meisten erforschten sind (Rahmati et al. 2016). Zusätzlich sind die pro-inflammatorischen Mediatoren NO, MMP, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und

Interferon-y (INF-y) in einer zentralen Rolle (Rahmati et al. 2016), um eine Entzündung zu triggern. Die Mediatoren werden von Immunzellen, Chondrozyten, Synoviozyten und Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise Makrophagen, sezerniert (Rahmati et al. 2016). Zusätzlich werden weitere Immunzellen angelockt und aktiviert, sodass sich die Entzündung verstärkt (Rahmati et al. 2016).

Die Hauptimmunzellen, die bei OA eine Rolle spielen, stammen von dem angeborenen Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist ein unspezifisches Abwehrsystem und stellt eine wichtige Komponente bei der Entstehung von lokalen Entzündungen im Gelenk dar (Berenbaum 2013).

Um das Immunsystem zu aktivieren, muss entweder das Milieu eines Pathogen assoziierten molekularen Musters (*pathogen associated molecular pattern;* PAMP) (Berenbaum 2013) oder eines Schaden assoziierten molekularen Muster (*damage associated molecular pattern;* DAMP) vorherrschen (Orlowsky und Kraus 2015).

DAMPs können durch Gewebetraumata, Mikrotrauma durch Überbelastung, oder bei altersbedingtem ECM-Abbau entstehen (Orlowsky und Kraus 2015). In der Synovia sind die Faktoren der PAMPs und DAMPs gelöst, können dort an Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptor;* PRR) binden (Berenbaum 2013) und verursachen eine sterile Entzündung im Gelenk (Orlowsky und Kraus 2015). Diese PRRs befinden sich auf der Oberfläche von Immunzellen, innerhalb von Immunzellen oder frei löslich im Blut, sind aber auch auf Chondrozyten und Synoviozyten zu finden (Berenbaum 2013). Die Hauptform von PRRs, die für OA bedeutend sind, sind die sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLR), welche im Knorpel mit Veränderungen im Sinne von OA verstärkt exprimiert werden (Berenbaum 2013, Rahmati et al. 2016). Sie sind auf der Zellmembran lokalisiert und werden in erster Linie von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Orlowsky und Kraus 2015). Durch Aktivierung von TLRs werden intrazelluläre Enzymkaskaden induziert, welche bei OA zur Aktivierung von NF-κB und damit Ausprägung von phänotypischen Veränderungen (Orlowsky und Kraus 2015) und Expression von matrixdegenerierenden Enzymen führt (Rahmati et al. 2016). PAMPs und DAMPs zählen zu den sogenannten Alarminen und fungieren als endogene Alarmsignale (Jeon et al. 2018). Im Bereich der OA zählen IL-33, high mobility group box 1 (HMGB1) und Produkte des zugrunde gehenden Knorpels, wie Hyaluronan, Keratansulfat, oligomerische Knorpelmatrixproteine (Jeon et al. 2018), Fibronektin und Tenascin-C (Berenbaum 2013) zu der Gruppe der DAMPs und damit zu den Alarminen. Sie führen zur Aktivierung des Immunsystems, speziell der T-Helferzellen 2 (Miller 2011). Die Immunzellen haben ein vielfältiges Aufgabengebiet. Neben der Anlockung und Modulation von weiteren Immunzellen, sind sie in der Stammzelldifferenzierung, Gefäßentwicklung und ECM-Synthese beteiligt (Jeon et al. 2018).

Durch das erhöhte Level an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie es bei OA vorliegt, und den höheren Anteil von katabolen Stoffwechselprodukten in der Synovia, wird ein sich selbst verstärkender Teufelskreis ausgelöst. Es entsteht zunehmend mehr oxidativer Stress, wodurch die weitere Produktion von NO angeregt wird (Lepetsos und Papavassiliou 2016) und zeitgleich kommt es zur schnelleren Alterung von Chondrozyten. Diese beschleunigte Alterung ist auf die Hemmung der Autophagie zurückzuführen (Mobasheri et al. 2015). Autophagie ist ein Mechanismus, welcher Proteine und Zellorganellen, die nicht mehr benötigt werden oder dysfunktional sind, abbaut (Vinatier et al. 2018). Bei der Immunantwort werden intrazelluläre Pathogene abgebaut und deren Antigene präsentiert (Vinatier et al. 2018). Die Autophagie ist daher essenziell, um die Integrität und die Funktion des Knorpels aufrechterhalten zu können (Vinatier et al. 2018).

Wenn das pro-inflammatorische Milieu der Seneszenz bei Chondrozyten vorliegt, kommt es zur Hemmung der Autophagie, wodurch es zur Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen, Bildung dysfunktioneller Mitochondrien und Proteinaggregaten im Gelenk kommt (Mobasheri et al. 2015). In weiterer Folge kommt es zum Anstieg der ROS (Mobasheri et al. 2015), welche wiederum die Produktion von Interleukinen, im speziellen IL-1β, steigern (Mendes et al. 2003).

IL-1β ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin und führt über diverse Wege, die im folgenden Kapitel genauer beschrieben werden, unter anderem zum ECM-Abbau (Mendes et al. 2003).

1.4.3. Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)

Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, kurz NF-κB, ist ein intrazellulärer mechano-sensitiver Transkriptionsfaktor (Issa und Griffin 2012) und im Zusammenhang mit progressiven Gelenkveränderungen eine wichtige Komponente (Choi et al. 2019). Dieser Faktor wird als Signalweg für viele OA induzierende Wege benötigt und kann die Expression diverser Zielgene bewirken (Choi et al. 2019).

Je nach Belastungsstärke des Knorpels wird dieser Faktor über intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert oder inhibiert (Issa und Griffin 2012). Zyklisch moderate Belastung hemmt dessen Aktivität, während statische und hochbelastende Kräfte selbigen aktiviert (Issa und Griffin 2012). Oxidativer Stress (Lepetsos und Papavassiliou 2016), Entzündungsmediatoren, Adipokine oder HMGB1 führen ebenfalls zur Aktivierung von NF-ĸB (Choi et al. 2019).

Nach Aktivierung ist NF-ĸB hauptverantwortlich für die Transkription diverser Gene, welche im SASP enthalten sind (Calcinotto et al. 2019, Goldring und Otero 2011, Magalhães und Passos 2018), wie MMPs, NO, COX2, IL-1 (Goldring und Otero 2011). So wird die SASP Sekretion direkt und indirekt gesteigert (Vinatier et al. 2018). Außerdem wird die Synthese von MMP-13 in Chondrozyten gesteigert, indem E74 like factor 3 (ELF3) und growth arrest and DNA-damage-inducible 45ß (GADD45ß) aktiviert werden (Choi et al. 2019, Goldring et al. 2011). Zudem werden pro-inflammatorische Mediatoren, wie PGE2 und RO vermehrt exprimiert (Issa und Griffin 2012).

NF-κB ist aber auch mit seiner biphasischen Wirkung an der Chondrozytenapoptose beteiligt. Zum einen verhindert es den TNF-induzierten Zelltod, aber es kann auch pro-apoptotische Funktionen haben, je nach Stimulus und zellumgebenden Milieu (Choi et al. 2019).

Bei OA ist NF-κB direkt und indirekt verantwortlich für die Hypertrophie der Chondrozyten (Choi et al. 2019), für gesteigerte Knorpelmatrixdegeneration, Entzündungsgeschehen (Choi et al. 2019) und in Folge Seneszenz.

Der Faktor NF-κB liegt im Ruhezustand durch Bindung an IkappaB-Proteine inaktiviert im Zytoplasma vor (Choi et al. 2019). Um den Faktor zu aktivieren, muss die Bindung zum Inaktiviator phosphoryliert werden (Choi et al. 2019). Erst dann gelangt NF-κB in den Zellkern und kann dort die Transkription der Gene induzieren (Choi et al. 2019). Die Phosphorylierung von IkappaB kann aufgrund von defekter p62-vermittelter Autophagie (GAT4-Weg), über Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (p38MAPK), den RIG-1RF-Weg oder erhöhten oxidativen Stress, erhöhte ROS und erhöhte Advanced Glycation Endproducts (AGE) getriggert werden (Vinatier et al. 2018).

1.4.4. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine schädliche Form des Sauerstoffs und werden im allgemeinen Sprachgebrauch häufiger als Sauerstoffradikale bezeichnet. Zu der Gruppe der ROS gehören unter anderem Stickoxid (NO) und Superoxid-Anion (Mobasheri et al. 2015). Sie können in nicht-toxischen Mengen zur Aufrechterhaltung von physiologischen Funktionen, der sogenannten Redox Biologie, agieren (Bu et al. 2017), oder aber in erhöhter, toxischer Menge bei pathologischen Veränderungen, wie Entzündungen (Bu et al. 2017), mitochondrialer Dysfunktion (Vinatier et al. 2018) oder zur Abwehr von pathogenen Erregern (Mobasheri et al. 2015), entstehen.

Liegt eine hohe, toxische Konzentration von ROS im Gewebe vor, führt dies zu oxidativem Stress für die Zellen und in der Folge kann es zu Telomerverkürzung und Seneszenz kommen (Vinatier et al. 2018).

Durch die verursachten Schäden kommt es zu einer DDR, welche die Gen-Expression von p53 und p21 stabilisiert. Dies erfolgt durch die Aktivierung von p38MAPK (Jeon et al. 2018) und der Verringerung der Synthese von IL-1Rezeptor Antagonisten (Ashraf et al. 2016). In der Folge kommt es zur Aktivierung von NF-kB und Hemmung der Aggrekan- und Kollagen Typ 2-Synthesen (Ashraf et al. 2016), Knorpelmatrixdegeneration und Seneszenzinduktion (Ashraf et al. 2016).

ROS sind außerdem direkte Mediatoren von p16, welches ebenfalls Seneszenz und Zelldedifferenzierung unterstützt (Ashraf et al. 2016).

Weiters wird die Aktivität von Aggrekanase und MMP hochreguliert (Jeon et al. 2018), wodurch es zur Spaltung von Hyaluronsäure (HA), Chondrozytenapoptose und ECM-Degeneration kommt.

1.4.5. Metalloproteasen

Metalloproteasen sind Enzyme, welche Proteine spalten können und daher eine wichtige Rolle in der Entstehung von OA einnehmen (Rahmati et al. 2016). Im Knorpel sind vor allem 2 Arten von Metalloproteasen zu finden: Disintegrin- und Metalloproteinasen (*A Disintegrin and Metalloproteinase with thrombospondin motifs;* ADAMTS) und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (Rahmati et al. 2016). Durch das Zusammenspiel beider Arten von Metalloproteasen kommt es zur Knorpelmatrixdegeneration, da ADAMTS die Aggrekane an Stellen schneiden, an die MMPs nicht gelangen können (Kelwick et al. 2015).

OA Chondrozyten produzieren eine Vielzahl an matrixdegenerierenden Enzymen, darunter MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-13, MMP-14 und ADAMTS-4 und ADAMTS-5 (Goldring et al. 2011). Vor allem MMP-13, auch Kollagenase 3 genannt, ist für seine Kollagen Typ 2 schädigende Wirkung bekannt (Goldring et al. 2011). Es wird von seneszenten Chondrozyten, Synoviozyten und Immunzellen exprimiert, was in den Teufelskreis aus Knorpeldegeneration, Entzündung und Seneszenz hineinwirkt (Goldring et al. 2011).

Werden Metalloproteasen in übermäßiger Zahl aktiviert, kommt es zum gesteigerten Abbau der ECM, der Knorpel nimmt Schaden und das Krankheitsbild der OA wird vorangetrieben (Rahmati et al. 2016, Wang et al. 2014).

Zu der Gruppe der ADAMTS zählen Kollagenasen und Aggrekanasen (Rahmati et al. 2016).

Die verschiedenen ADAMTS Typen unterscheiden sich im Aufbau eines Abschnittes, wodurch sie unterschiedliche Aufgaben haben (Kelwick et al. 2015). Während ADAMTS-4 und ADAMTS-5 unter anderem Aggrekan spalten können, spaltet ADAMTS-13 den von-Willebrand-Faktor (Kelwick et al. 2015).

Durch den Abbau der Aggrekane im Knorpel wird die Kollagenmatrix freigelegt, welche dann wiederum von MMP-13 abgebaut werden kann (Kelwick et al. 2015).

Sowohl die ADAMTS als auch die MMPs können in ihrer Wirkung über den Gewebehemmer der Metalloproteasen (TIMP) gehemmt werden (Kelwick et al. 2015).

1.4.6. Der ATM-p53-p21- Weg – DNA-damage-response (DDR)

Die DDR ist ein Komplex aus zellulären Mechanismen, welche bei DNS-Schäden aktiviert werden, um Mutationen vorzubeugen und das genetische Material intakt vererben zu können (Jackson und Bartek 2009). DNS-Schäden können als Einzelstrangbrüche, oder seltener als Doppelstrangbrüche auftreten (Jackson und Bartek 2009). Je nach Ursache und Form der Läsion werden unterschiedliche Signalwege aktiviert (Jackson und Bartek 2009), wobei in dieser Arbeit auf den für OA relevanten ATM-p53-p21 Weg eingegangen werden soll.

Viele Seneszenzauslöser führen zu genomischen Schäden, welche DDR als Reaktion auslöst (Campisi 2013).

Ursachen für DNS-Strangbrüche können durch Entzündungen und Infektionen entstandene ROS sein (Jackson und Bartek 2009), oder freigelegte Telomerenden durch gesteigerte Mitoseraten oder Alterung der Zelle ((Childs et al. 2015) Fig. 1). Je nach Effektivität der Reparaturmechanismen, kann die Zelle den Zellzyklus wieder aufnehmen, geht in replikative Seneszenz oder in Apoptose ((Childs et al. 2015) Fig. 1).

Bei frei werden der Telomerenden, wie es bei OA der Fall ist, werden zu diesen Doppelstrangbrüchen die Proteinkinase ATM rekrutiert und aktiviert (Jackson und Bartek 2009). Das Signal wird von ATM an CHK2 weitergeleitet, welche dann in Kombination gemeinsam die CDK-Aktivität reduzieren (Jackson und Bartek 2009). Die Hemmung von CDK2 führt zum Zellzyklusstopp und gibt so die Möglichkeit für die Reparatur der DNS-Schäden (Jackson und Bartek 2009).

Kann die Beschädigung repariert werden, wird die CDK-Hemmung aufgelöst und die Zelle gelangt zurück in den normalen Zellzyklus (Jackson und Bartek 2009). Wenn eine Reparatur aufgrund zu starker Schäden und daher chronischer DDR-Aktivierung nicht möglich ist, wird die Apoptose, oder bei nicht hinreichender Reparatur, die Zellseneszenz eingeleitet (Jackson und Bartek 2009).

ATM stabilisiert das Gen p53 und erhöht dessen Expression (Childs et al. 2015, Jackson und Bartek 2009). Zudem wird durch ATM das Transkriptionsziel von p53, das Gen p21, verstärkt synthetisiert (Childs et al. 2015). Die Expression von p21 wird ebenfalls durch CHK1 und CHK2 verstärkt (Jackson und Bartek 2009).

Bei starker DNS-Schädigung kommt es zur Akkumulation von p53 im Gewebe und führt so zur Apoptose der Chondrozyten (Jackson und Bartek 2009). Aufgrund der abgestorbenen Zellen wird der Clearance Mechanismus hochreguliert ((Childs et al. 2015) Fig. 1), woraufhin sich eine Entzündung etabliert ((Childs et al. 2015) Fig. 1).

1.4.7. Proteinaggregate und Amyloide

Oxidativer Stress wird durch eine Imbalance der ROS begünstigt und hat eine schädliche Wirkung auf Proteine im Allgemeinen (Höhn et al. 2017). Bei OA kommt es durch den negativen ROS Einfluss zur Bildung und Ansammlung von fehlerhaft gefalteten Proteinen, Peptiden und Amyloiden in den Chondrozyten (Rahmati et al. 2017). Generell kommt es in seneszenten Zellen zur verstärkten Akkumulation von oxidierten Proteinen, als in jüngeren Zellen (Rahmati et al. 2017).

Lagern sich abnormale oder dysfunktionale Proteine zusammen entstehen sogenannte Proteinaggregate (Höhn et al. 2017). Zur Akkumulation kann es aufgrund von fehlender Aktivität des abbauenden Systems, dem proteosomalen System, kommen (Höhn et al. 2017). Durch die Bildung von unlöslichen Aggregaten dysfunktionaler Proteine kann die Genexpression verändert werden und sie nehmen so am Alterungsprozess der Zellen teil (Höhn et al. 2017).

Amyloide begünstigen Zelltod und Zellorganellenfunktionsstörungen (Rahmati et al. 2017). In der Pathogenese von OA ist Tranthyretin das wichtigste Amyloid (Rahmati et al. 2017). Sammelt sich dieses an, wird die Apoptose der Chondrozyten und die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase*; iNOS), gefördert (Rahmati et al. 2017).

Das proteosomale System ist als hauptproteolytisches System zuständig für das Erkennen und den Abbau von un- und fehlgefalteten und oxidierten Proteinen in der Zelle (Höhn et al. 2017). Beim Verlust der Proteostase kommt es zur Ansammlung von toxischen Proteinaggregaten, welches einen starken Mitspieler der Seneszenz und der Alterung dar (Höhn et al. 2017).

Das Kern-Proteosom 20S ist mitverantwortlich für den Abbau von nicht mehr gebrauchten, kaputten und fehlerhaften Proteinen (Höhn et al. 2017). Bei entzündlichen

Prozessen ist dies fundamental, um die Funktion der Proteostasen aufrechtzuerhalten (Höhn et al. 2017).

Eine Unterart von diesem, das i20S, wird durch TNF-α, IFN-y und/oder durch Lipopolysaccharide aktiviert (Höhn et al. 2017). Es weist auf oxidierte Proteine eine stark proteolytische Wirkung auf und ist für die Ausbildung des Major Histokompatibilitätskomplex-1 (MHC-1) für die Immunantwort essenziell (Höhn et al. 2017). Bei Störung des Proteostase-Systems werden Chondrozyten mit pathologischen Veränderungen schneller arretiert (Höhn et al. 2017).

1.4.8. Metabolische Entzündung

Adipositas, Nährstoffüberschuss oder Vitamin-D-Mangel können eine systemische Entzündung verursachen und führen zu vermehrtem oxidativem Stress, in dessen Folge Zelldysfunktion und Seneszenz entstehen (Wang et al. 2015). Die so entstehende systemische Entzündung wird als metabolisches Syndrom, oder metabolische Entzündung bezeichnet und kann ebenfalls Auslöser für OA sein (Wang et al. 2015).

Adipositas stellt nicht nur mechanischen Stress für das Gelenk dar (Issa und Griffin 2012), sondern führt durch den veränderten Metabolismus zum systemischen Anstieg pro-inflammatorischer Mediatoren (Issa und Griffin 2012).

Eine Vielzahl der so entstehenden pro-inflammatorischen Mediatoren sind ebenfalls an der Entstehung von OA beteiligt und stören intraartikulär den Abbau oxidierter Proteine (Berenbaum 2013, Issa und Griffin 2012).

Eine Quelle für pro-inflammatorische Zytokine, im Rahmen des metabolischen Syndroms, sind Adipozyten (Wang et al. 2015). Sie bedingen einen katabolen Knorpelumbau und hemmen die Synthese von ECM-Komponenten (Ashraf et al. 2016, Mobasheri et al. 2015, Wang et al. 2015).

IL-6 und IL-1 stimulieren die Synthese von Akut-Phase-Proteinen (Wang et al. 2015). Diese steigern die Expression von COX-2 und Knorpelabbauenzymen, wodurch ein Teufelskreis aus neu entstehenden Entzündungsmediatoren und sich verstärkender Entzündung und ECM-Abbau entsteht (Wang et al. 2015). Die MMP-13 Synthese in seneszenten Chondrozyten kann durch systemisch erhöhte Leptinwerte vermittelt werden, wie sie bei Adipositas zu finden sind (Griffin et al. 2010, Issa und Griffin 2012). Leptin wirkt verstärkend auf die Ausprägung von OA, indem es iNOS, COX-2, PGE), IL-6 und IL-8 co-stimuliert (Issa und Griffin 2012).

Ein Nährstoffüberschuss von Cholesterol, Lipiden und Glucose stört die Integrität des systemischen Stoffwechsels (Wang et al. 2015). Als Folge des gestörten Systems kommt es zu einer erhöhten Lipidperoxidation in den Synoviozyten und Chondrozyten, worauf wiederum ein erhöhter Knorpelabbau als Reaktion folgt (Wang et al. 2015).

1.4.9. **Pro-inflammatorische Zytokine**

Pro-inflammatorische Zytokine sind entzündungsfördernde Proteine, die parakrin oder autokrin wirken und einen katabolen Zustand im Knorpel herbeiführen (Mobasheri et al. 2015).

Diverse Interleukine, IFN-y, TNF- α und GM-CSF gehören in diese Gruppe (Campisi 2013, Toh et al. 2016). Vor allem die Zytokine IL-1ß und TNF- α sind an der Zerstörung des Knorpels bei OA beteiligt (Goldring et al. 2011).

Zu Beginn jeder Entzündung sind Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten an der Bildung der pro-inflammatorischen Faktoren beteiligt und deren Aktivierung abhängig von der NF-kB Aktivität (Rahmati et al. 2016). Diese Zellen befinden sich frei in der Synovialflüssigkeit und ermöglichen so die gleichmäßige Verteilung der Zytokine im gesamten Gelenkgewebe (Rahmati et al. 2016).

Pro-inflammatorische Mediatoren führen in ihren Zielzellen, den Chondrozyten, zu einer Dysregulation der Expression von katabolen und anabolen Faktoren, zu Gunsten der katabolen Seite (Goldring et al. 2011). Die aktivierten Chondrozyten produzieren vermehrt MMPs und ADAMTS, welche die Knorpelmatrixdegeneration vorantreiben (Goldring et al. 2011).

Neben der Entstehung von Entzündungen, sind die Mediatoren auch in der Aufrechterhaltung und Ausbreitung dieser beteiligt (Rahmati et al. 2016).

Ein wichtiges Interleukin in der Pathogenese von OA ist das IL-1. Es gibt zwei Isoformen: das IL-1 α und das IL-1 β (Guilak et al. 2004). IL-1 α ist im Frühstadium von OA zu finden, während IL-1 β eher im fortgeschrittenen Stadium vorhanden ist (Guilak et al. 2004). Das Zytokin IL-1 β aktiviert, ebenso wie ROs, die p53-p21-pRB-Signalkaskade (Ashraf et al. 2016) und hat dahingehend eine wichtige Funktion bei der Entstehung und Ausprägung von OA (Goldring et al. 2011).

Außerdem induziert es Caveolin-1 (CAV-1), welches kleine Einbuchtungen in der Zellmembran, sogenannte Caveolae, bildet (Tchkonia et al. 2013) und positiv mit OA in Verbindung gebracht wird (Tchkonia et al. 2013, Vinatier et al. 2018). Durch die Überexpression von CAV-1 kommt es zum Anstieg der p38MAPK und die Chondrozyten werden in ihrer Fähigkeit Kollagen Typ 2 und Aggrekan zu produzieren gestört (Tchkonia et al. 2013).

CAV-1 führt zudem direkt zum gesteigerten ECM-Abbau durch eine Erhöhung der Synthese von NO und Aggrekanase (Tchkonia et al. 2013).

Das Vorhandensein von pro-inflammatorischen Zytokinen in erhöhter Menge führen zur Hemmung der Aktivität von Autophagen (Mobasheri et al. 2015). Diese sind als Schutzmechanismus im Knorpel tätig. Sind diese weniger stark aktiv, wird der Alterungsprozess beschleunigt, was wiederum den Verlauf von OA beschleunigt (Mobasheri et al. 2015).

1.4.10. Alarmine

Alarmine sind endogene Alarmsignale, die bei Zelluntergang durch Gewebeschäden, Stress oder Apoptose, entstehen (Miller 2011). Sie führen zu einer Aktivierung des Immunsystems und schaffen so eine entzündliche Umgebung und verstärkte Knorpelmatrixdegeneration (Kukolj et al. 2019). Neben den bereits erwähnten Alarminen DAMPs und PAMPs (Jeon et al. 2018), sind in der Pathogenese von OA vor allem IL-33 (Miller 2011) und HMGB1 (Jeon et al. 2017) hervorzuheben.

HMGB1 ist ein extrazelluläres Alarmin, welches im Zellkern aktivierter Zellen exprimiert wird, bevor es zur SASP Produktion kommt (Jeon et al. 2017) und wirkt Osteoklasten aktivierend (Aulin et al. 2020). Bei Zellapoptose oder während der Immunantwort kommt es zur Verlagerung aus dem Zellkern ins Zytosol und von dort erfolgt die Freisetzung in

den extrazellular Raum (Aulin et al. 2020, Vinatier et al. 2018). Es bindet u.a. an TLR2 und TLR4 und kann Komplexe mit IL-1β oder Fibronektinfragmenten bilden, wodurch die Entzündung und die Synthese von MMPs vorangetrieben werden (Aulin et al. 2020).

Nach Aktivierung von p53 wird HMGB1 vermehrt sezerniert und induziert so über die Aktivierung von NF-κB die SASP Produktion (Vinatier et al. 2018).

IL-33 wird bei Zellapoptose massiv freigesetzt (Kukolj et al. 2019). Auf der Zelloberfläche von Immunzellen befinden sich die Rezeptoren ST2 (IL-1R1) und IL-1 Rezeptor-Accessoire-Protein (IL-1RAcP), an welche IL-33 andockt ((Miller 2011) Fig. 1). Bei Aktivierung der Rezeptoren, wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche in der Aktivierung von NF-kB und MAP-Kinase mündet ((Miller 2011) Fig 1).

1.4.11. NOTCH-Signalweg

Zellen haben auf ihrer Oberfläche viele Rezeptoren und Liganden, unter anderen den NOTCH-Rezeptor und den Jagged-Liganden. Die Interaktion der zwei Komponenten ist ein wichtiger Weg der Zell-Zell-Kommunikation und bekannt als NOTCH-Signalweg (Tian et al. 2017).

Dieser spezielle Signalweg ist an der Ausbildung der Zelldifferenzierung und -proliferation beteiligt (Tian et al. 2017). Außerdem ist er von Bedeutung in der Embryogenese, kommt aber u.a. auch in der Pathogenese von OA zum Tragen (Tian et al. 2017).

In einer Studie von Tian et.al (2017) wurde gezeigt, dass die NOTCH-Aktivierung über den JAG1-Liganden aufgrund der Hemmwirkung dieses Mechanismus auf die zelluläre Seneszenz zu einer höheren Lebenserwartung von Stammzellen führt.

Via NOTCH-Signalweg wird die Produktionen von Col2 durch SOX9 gehemmt ((Ashraf et al. 2016) Fig. 2). SOX9 ist eine wichtige Komponente in den Regelabläufen der Synthese fast aller Gene, die für die Aggrekan- und Kernproteinsynthese benötigt werden (Ashraf et al. 2016). Die Hemmung von SOX9 führt so nicht nur zur verminderten Produktion von ECM-Komponenten, sondern verstärkt auch die Bildung von ROS und MMPs deutlich (Ashraf et al. 2016).

1.4.12. Epigenetik

Die Epigenetik umfasst die Änderung der Genaktivität, welche zu Veränderungen des Phänotyps, bei gleichbleibender DNS, führen (Barter et al. 2012). Dabei ermöglichen epigenetische Mechanismen der Zelle auf exogene Umwelteinflüsse schnell zu reagieren und stellen so ein Risikofaktor für die Entwicklung von OA dar (Barter et al. 2012). Es ist bislang nicht eindeutig bekannt, ob es einen Zusammenhang zwischen der epigenetisch bedingten Alterung und der zellulären Seneszenz gibt (McCulloch et al. 2017). Die drei bekannten Mechanismen sind: a) die DNS-Methylierung unter Einbeziehung von CpG-Inseln; b) Histonmodifikation; c) regulierende microRNAs (miRNA) (McCulloch et al. 2017).

Die DNS-Methylierung geht meist mit Suppression der Genexpression an Promotorstellen einher, an denen die Methylierung stattfindet (Barter et al. 2012). Eine Menge von Metalloproteasen-Promotoren zeigen eine Hypomethylierung in osteoarthritischen Knorpelzellen, wodurch die Expressionsänderung erklärt werden könnte (Barter et al. 2012). Betroffen sind u.a. MMP-13 und ADAMTS-4 (Barter et al. 2012), deren Expression in OA gesteigert ist (McCulloch et al. 2017). Es ist allerdings nicht geklärt, ob die DNS-Methylierung als Folge oder Ursache der OA zu bewerten ist (McCulloch et al. 2017).

Die Histonmodifikation ist wichtig für die Ausprägung von aktiven und inaktiven genomischen Regionen (Barter et al. 2012). Dadurch ist die Histon-Deacetylase für die Entstehung von katabolen Faktoren im Knorpel mitverantwortlich (Barter et al. 2012).

miRNA sind kleine, nicht-codierende RNS-Abschnitte, die eine wichtige Rolle in der Genexpression und Entstehung von Pathologien einnehmen (Barter et al. 2012). Als Knorpelspezifisch wird die miRNA-140 angesehen (Barter et al. 2012). Sie ist im osteoarthritischen Knorpel vermindert aufzufinden (Barter et al. 2012). Beim Menschen wurde ihre Funktion in der Unterdrückung von ADAMTS-5 und erhöhter Expression von Aggrekan festgestellt (Barter et al. 2012). SOX9 wird durch miRNA-145 unterdrückt und MMP-13 wird durch miRNA-146a und miRNA-27 moduliert (Barter et al. 2012).

1.5. Derzeitige Therapiemöglichkeiten

Alle derzeitig möglichen Behandlungsansätze für OA haben das Ziel die vorhandene Entzündung im Gelenk zu minimieren, Schmerzen zu nehmen und den Teufelskreis von Entzündung und Knorpeldegeneration zu durchbrechen (Ortved und Nixon 2016, Zayed et al. 2018). Auf diesem Wege soll die Progredienz der Knorpeldegeneration verlangsamt, oder im besten Fall angehalten werden.

Die Therapie umfasst medikamentelle, chirurgische und/oder physikalische Ansätze und sollte stets in Kombination angewandt werden, um den größtmöglichen Effekt zu erreichen (Goodrich und Nixon 2006, van Weeren und Back 2016).

Hierfür kommen häufig systemische nicht-steroidales Antiphlogistikum (NSAID), systemische Polysulfat Glykosaminoglykane (PSGAG) (Bogers 2018), intraartikular (i. a.) Hyaluronsäure, i. a. Polyacrylamid Hydrogel (PAHG) (Tnibar et al. 2015), operative Eingriffe und i. a. zellbasierte Methoden zum Einsatz (Bogers 2018).

Eine echte Regeneration (*Restitutio ad integrum*) im Sinne von Wiederaufbau von Col2 Fasern und anderen Matrixkomponenten erfolgt, aufgrund der fehlenden Blut- und Nervenversorgung (Ortved und Nixon 2016), allerdings in keinem Fall (van Weeren und Back 2016).

Als **physikalische Therapie** werden unter anderem Bewegungs- und Haltungsmanagement, Stoßwellentherapie (Contino 2018) und Osteopathie/Chiropraktik verstanden (van Weeren und Back 2016). Die Auswahl der Methoden ist groß, sodass die einzige Limitation in der Zielsetzung besteht, welche symptomatische Komponente durch die Übungen verbessert werden soll (Contino 2018). Physikalische Therapie führt zur Balanceverbesserung, einem besseren Körpergefühl und Propriozeption, Koordinationsund Bewegungsradiussteigerung und kann dem Muskelabbau durch neuromuskuläre Stimulation entgegenwirken (Contino 2018).

Kontrollierte Bewegung trägt zur Verbesserung der klinischen Symptome bei (Issa und Griffin 2012) und kann das OA Risiko bei adipösen Tieren minimieren (Issa und Griffin 2012). Cardio-Training, scheint überdies unabhängig vom Gewichtsverlust, einen positiven Einfluss auf die Gelenkgesundheit zu haben (Issa und Griffin 2012). Das Führen des Pferdes über unterschiedliche Untergründe und Stangen oder die Arbeit mit Balancekissen führt zu einer besseren Körperwahrnehmung und Koordination (Contino 2018). Steht ein Unterwasserlaufband zur Verfügung, ist dies eine bessere Alternative zur Bewegung an

der Hand oder einem Landlaufband (Contino 2018). Es wird eine bessere gleichmäßige Belastung der Vordergliedmaßen, eine bessere Haltungskontrolle und ein erhöhter Bewegungsradius des betroffenen Gelenks erzielt (Contino 2018). Je nach Zielsetzung kann mit einem niedrigen Wasserpegel der Bewegungsradius gesteigert werden, oder mit einem hohen Wasserpegel die Auftriebskraft erhöht und somit die Belastung auf die Gelenke vermindert werden (Contino 2018).

Die **Stoßwellentherapie** kommt besonders bei low-motion Gelenken zum Einsatz und führt zu einer reduzierten Lahmheit (Contino 2018). Da nur lokal angewandt, hat es minimale Nebenwirkungen und wird meist gut toleriert (Contino 2018).

Zu dem Einsatz von physikalischen Therapien werden oft Medikamente kombiniert. Am häufigsten werden systemisch zu verabreichende **NSAIDs** genutzt. Diese sind analgetisch, antipyretisch und anti-inflammatorisch wirksam (Goodrich und Nixon 2006). Indem die COX-Aktivität gehemmt wird, kommt es zur negativen Beeinflussung der Prostaglandinproduktion (Goodrich und Nixon 2006). Überwiegend werden hierbei die Wirkstoffe Phenylbutazon, Flunixin meglumine, Ketoprofen, Naproxen und Carprofen eingesetzt (Goodrich und Nixon 2006).

Ebenfalls systemisch wirksam, da intravenös gespritzt, sind Polysulfatierte Glycosaminoglykane (**PSGAGs**) (Contino 2018). Sie gehören zu der chondroprotektiven Medikamentengruppe **PSGAGs** (Goodrich und Nixon 2006). gelten als krankheitsmodifizierend (Goodrich und Nixon 2006), reduzieren Lahmheit und sind gut für die Behandlung von Synovitis geeignet (Contino 2018). Ihre Wirkung ist die Hemmung diverser lysosomaler Enzyme (MMPs, IL-1, PGE2), die für das Absterben von Chondrozyten verantwortlich sind (Goodrich und Nixon 2006). Bei der i. a. Injektion von PSGAGs wird von einer erhöhten Gefahr für Gelenksepsis berichtet, weswegen diese oft mit Antibiotika (125 mg Amikain) kombiniert wird (Contino 2018). Der Einsatz dieser Gruppe ist besonders bei Pferden mit metabolischen Erkrankungen, wie Hufrehe oder EMS, eine gute Alternative zu Kortikoisteroiden (Contino 2018).

Es wird von einigen möglichen **Nahrungsergänzungsmittel** berichtet, die zumindest im Humanbereich unterstützend eingenommen werden können. Dazu zählen Methylsulfonylmethane, Kurkuma, Ingwer und *Harpagophytum* (Teufelsklaue) (Fuggle et al. 2020). Allerdings sind hierzu nur sehr limitierte klinische Studien im Humanbereich vorhanden, bei denen oft auch keine Verbesserung der OA Symptomatik erzielt werden konnte (Fuggle et al. 2020, Gregory et al. 2008). Häufig wird auch von gastrointestinalen Nebenwirkungen berichtet (Fuggle et al. 2020). Daher und aufgrund von fehlenden Informationen zu potenziellen Langzeitfolgen ist davon abzuraten (Gregory et al. 2008).

Collagene, wie Glucosamine und Chondroitin, können sowohl oral als auch i. a. zum Einsatz kommen, wobei Glucosamin Sulfat zu bevorzugen ist (Gregory et al. 2008). Diese oralen Kollagene sind reich an Aminosäuren (Fuggle et al. 2020) und sollen durch die Supplementierung die endogene Kollagenproduktion im Gelenkknorpel anregen (Fuggle et al. 2020). Obwohl es verschiedene Formen von i. a. und p. o. Kollagenen gibt, sind derzeit keine Daten vorhanden, die den Einsatz in der OA Therapie unterstützen, auch wenn milde symptomatische und funktionelle Verbesserungen im Humanbereich gezeigt werden konnten (Fuggle et al. 2020, Gregory et al. 2008).

Eine von Vaishy et al durchgeführte Literaturrecherche im Jahr 2019 ergab, dass es einen mäßigen Zusammenhang zwischen **Vitamin D** Mangel und der Progression von OA beim Menschen gibt, aber die Vitamin D Supplementierung in der Therapie von OA keine Rolle spielt (Vaishya et al. 2019). Die generelle Effektivität bei OA ist umstritten. Eine Studie aus Indien (2013) konnte Verbesserungen der Schmerzhaftigkeit und der Gelenkfunktion feststellen, Studien aus Großbritannien (2016), USA (2013) und Australien (2016) wiederum nicht (Fuggle et al. 2020).

Im Gegensatz zu systemischen Medikamenten haben intraartikuläre Injektionen den Vorteil, dass sie lokal eine hohe Bioverfügbarkeit aufweisen, wenige systemische Nebenwirkungen haben und sofort am Wirkungsort vorhanden sind (Jones et al. 2019). Der Nachteil besteht allerdings darin, dass abhängig von der Molekülgröße die Medikamente unterschiedlich schnell aus der Synovialflüssigkeit wieder ausgewaschen werden (Jones et al. 2019). Beispielsweise zeigen Studien, dass HA beim Menschen nach rund 26h nicht mehr im Gelenk vorhanden ist und ausgespült wurde (Jones et al. 2019).

Aus der Gruppe der **Glucocorticoide** kommen Triamcinolon (TA), Celeston oder Methylprednisolon Acetat i. a. zum Einsatz (McIlwraith und Lattermann 2019). Sie werden als potente anti-inflammatorische Medikamente durch Hemmung der Synthese und Ausschüttung mehrere löslicher Mediatoren, wie Prostaglandinen, MMP-1, -3, -13 und IL-1 gerne in der OA Therapie eingesetzt (McIlwraith und Lattermann 2019). Durch Hemmung der Prostaglandinsynthese findet auch eine Schmerzlinderung statt (McIlwraith und Lattermann 2019). Während Methylprednisolon einen schädlichen Effekt auf den Knorpel hat, wird TA sowohl krankheitsmodifizierende als auch symptommodulierende Wirkungen nachgewiesen (McIlwraith und Lattermann 2019). Nach i. a. Injektion von TA sind Pferde weniger lahm und in der Synovialflüssigkeit ist eine niedrigere Proteinkonzentration und eine höhere Hyaluronankonzentration nachweisbar (McIlwraith und Lattermann 2019). Zusätzlich werden seltener entzündliche Infiltrate in der Synovialmembran gefunden (McIlwraith und Lattermann 2019).

Vielfach wird TA gemeinsam mit HA angewendet. Es ist indirekt bewiesen, dass die anti-inflammatorische Wirkung von TA und die chondroprotektive Wirkung von HA gemeinsam das klinische Bild deutlich effektiver verbessern als einzeln angewandt (McIlwraith und Lattermann 2019).

Glucocoticoide sind bei Pferden mit metabolischen Erkrankungen nicht indiziert (Contino 2018).

Hyaluronsäure kommt natürlich im Körper vor und wird von Fibroblasten, Synoviozyten und Chondrozyten produziert (Gupta et al. 2019). HA ist für die Viskosität der Synovialflüssigkeit verantwortlich und gewährleistet so eine gute Gleitfähigkeit zwischen den Gelenkknorpelflächen (Gupta et al. 2019). Bei OA ist die physiologisch vorkommende HA-Konzentration in der Synovia geringer als bei gesunden Pferden (Gupta et al. 2019). Seit den frühen 1970er Jahren wird HA regelmäßig mit positivem Erfolg angewendet (Gupta et al. 2019), obwohl der genaue Wirkungsmechanismus immer noch nicht geklärt ist (Freitag et al. 2016). Sicher ist aber, dass HA freie Sauerstoffradikale abfängt, die Makrophagenchemotaxis hemmt und die Bildung und Freisetzung von Prostaglandinen vermindert (Goodrich und Nixon 2006). Allerdings ist der Wirkungsgrad der anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Wirkung abhängig von der Applikationsart und dem Molekulargewicht des verwendeten HA (Gupta et al. 2019).
HA, oder andere Viskosupplemente, werden bei milden bis schweren OA-Fällen angewandt (Freitag et al. 2016). Oftmals kommt HA in Kombination mit mesenchymale Stammzellen (MSC) oder als Transportmedium bei i. a. Injektionen zum Einsatz (Freitag et al. 2016). Es schafft ein Milieu, in dem MSCs sehr gut proliferieren und sich in Richtung Chondrogenese entwickeln können (Freitag et al. 2016). Die Anwendung von reinem HA führt zu reduzierter Lahmheit, besserer Belastung der Gliedmaßen, reduzierten Schmerzen und einer besseren Beweglichkeit des Gelenks (Gupta et al. 2019).

Polyacrylamid Hydrogel (PAHG) wird in der Praxis immer häufiger verwendet, da es, ebenso wie HA, intraartikulär einen positiven krankheitsmodifizierenden Effekt aufweist (Tnibar et al. 2015). PAHG besteht aus Polymergel, sterilem Wasser und zu 2,5 % aus vernetzten Polyacrylamiden (Tnibar et al. 2015). Es wird nicht resorbiert oder aus dem Gelenk gewaschen und bleibt so länger im Gelenk bestehen als HA (Tnibar et al. 2015). Der genaue Wirkmechanismus ist auch hier noch unklar, aber es erhöht die Gleitfähigkeit im Gelenk und die Elastizität der Synovialmembran (Tnibar et al. 2015). Außerdem soll es die Synoviozyten vor pro-inflammatorischen Zytokinen in der Synovia schützen und so Schmerzen lindern (Tnibar et al. 2015).

Zu den **zellbasierten Therapien** zählen die Injektion von MSC, autolog konditioniertem Serum (ACS) und platelet-rich-plasma (PRP) (Bogers 2018). Seltener kommt auch autologes Proteinserum (APS) zum Einsatz (Bogers 2018).

Das Ziel der zellbasierten Methoden ist, die geschädigten Zellen zu erneuern oder komplett zu ersetzten (Bogers 2018). Die dafür notwendigen Bestandteile können aus Blut, Knochenmark oder Fettgewebe gewonnen werden und enthalten Produkte, die im Körper in nur sehr geringen Konzentrationen vorliegen, wie Stammzellen, anti-inflammatorische Zytokine und/oder Wachstumsfaktoren (Bogers 2018).

MSCs sind multipotente Zellen und werden für die Therapie von OA meistens aus dem Knochenmark gewonnen (Fuggle et al. 2020). MSCs können sich zu drei Gewebetypen, je

nach Milieu, ausdifferenzieren, Fett, Knorpel und Knochen (Fuggle et al. 2020). Sie besitzen immunmodulatorische und anti-inflammatorische Eigenschaften (Fuggle et al. 2020) und sollen so bei der Kontrolle der Entzündung und Minderung der Schmerzen helfen (Mariñas-Pardo et al. 2018). Durch den Einsatz von autologen MSC-Quellen sollen immunologische Reaktionen vermindert werden (Fuggle et al. 2020). Trotzdem besteht die Vermutung, wie bei dem i. a. Einsatz von HA, dass die MSCs schnell aus dem Gelenk ausgewaschen werden (Mariñas-Pardo et al. 2018).

Einigkeit besteht darin, dass Schmerzen und Funktion des betroffenen Gelenks verbessert werden (Fuggle et al. 2020). Bei chirurgisch verursachter OA konnten ebenfalls strukturelle Verbesserungen des Gelenkknorpels festgestellt werden. Durch die Applikation von HA und autologem Knochenmark konnte *in vivo* eine verbesserte Integration des Gewebes und eine erhöhte Bildung von Kollagen Typ 2 Fasern im Ziegenmodell histologisch beobachtet werden (Saw et al. 2009).

Als Knorpelveränderungen im Sinne von OA sind diffuse ECM-Verluste häufiger als fokale Läsionen zu beobachten. Daher ist die Implantation von MSCs mittels Scaffolds nicht zielführend, weshalb die MSCs direkt ins Gelenk injiziert werden (Freitag et al. 2016).

Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA) ist der kompetitive Antagonist des Hauptentzündungsmediator IL-1 bei OA (Bogers 2018). Durch Inkubation des Patientenblutes mit Borosilicat Glasperlen wird das Serum konzentriert und es liegt ein erhöhter Anteil von den entzündungshemmenden Zytokinen IL-10, IL-4, IGF-1, TGF- β und am wichtigsten IL-1RA vor (Bogers 2018). Das so entstandene Präparat heißt **ACS** oder auch **IRAP**. Je nach angewandter Technik kann man zwischen IRAP1 und IRAP2 unterscheiden (Bogers 2018), welche sich im enthaltenen Verhältnis IL-1 zu IL-1RA unterscheiden (Bogers 2018). Da in IRAP die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α ebenfalls in erhöhter Konzentration vorliegen, wird vermutet, dass der ausschlaggebende Punkt für den effektiven Wirkungsgrad des Präparats im Verhältnis von IL-1 zu IL-1RA liegt (Bogers 2018).

IL-1RA wirkt in erster Linie dem Chondrozytenabbau entgegen (Zayed et al. 2018). Allerdings wurde der Therapieeffekt des IRAP aufgrund des IL-1RA noch nicht nachgewiesen, sondern wird nur vermutet, da dieses in erhöhter Konzentration vorliegt (Bogers 2018). Da im Humanbereich *in vivo* eine geringe Clearancezeit festgestellt wurde, ist möglicherweise nicht das enthaltene Zytokinprofil verantwortlich (Bogers 2018).

In vitro Studien berichten von einer deutlichen Lahmheitsverbesserung, verringerter Synovialmembrandicke und verringerten Knorpelfibrillationen (Bogers 2018).

Eine spezielle Form des ACS ist das **APS**. Im Gegensatz zu IRAP ist keine Inkubation notwendig, weswegen die Konzentration des Zytokinprofils geringer ist (Bogers 2018). Trotz alledem sind 12 x mehr Leukozyten und 1,6 x mehr Plättchen enthalten als im "normalen" Blut. Da in diesem Präparat eine erhöhte Konzentration von Leukozyten vorliegt, ist auch der Anteil von IL-1RA und IL-10 erhöht (Bogers 2018). Der klinische Outcome bei APS ist stark vom Schweregrad der OA abhängig (Bogers 2018).

Bei Injektion von **platlet-rich-plasma (PRP)**, auf Deutsch plättchenreichem Plasma, werden Wachstumsfaktoren mittels der Plättchen und Zytokine mittels der Leukozyten ins Gelenk eingebracht (Bogers 2018). Im Vergleich zum normalen Blut sind 3-5 x höhere Plättchenkonzentration, aber eine geringere Leukozytenkonzentration enthalten (Bogers 2018). Die enthaltenen Faktoren, z. B. platlet-derived growth factor (PDGF), fibroblast-like growth factor (FGF), TGF- β , vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF) und insulin-like growth factor (IGF)-1 (Fuggle et al. 2020), sollen die Zellproliferation, Zellmigration, Angiogenese und ECM-Synthese stimulieren (Fuggle et al. 2020).

Allerdings wurde die genaue Wirkungsweise bislang nur im Humanmodell, nicht im Pferdemodell, nachgewiesen (Bogers 2018). Die Anwendung von purem PRP hat beim Pferd in einigen OA-Studien nennenswerte Erfolge erzielt, allerdings gibt es zu wenige und zu aussageschwache Studien, als dass diese Ergebnisse eine effektive Aussagekraft hatten (Bogers 2018).

Das Präparat wird durch Zentrifugation des Patientenblutes gewonnen (Fuggle et al. 2020). Im separierten Plasma sind 95 % der Zellen Plättchen (Fuggle et al. 2020). Nach der Applikation ist weder systemisch noch lokal mit gröberen Nebenwirkungen zu rechnen (Fuggle et al. 2020). Es sind leichte symptomatische, aber keine strukturellen Verbesserungen, zu erwarten (Fuggle et al. 2020). Das Team um Asjid et al hat nachgewiesen, dass PRP einen hemmenden Effekt auf die Chondrozytenapoptose und damit auf den ECM-Abbau hat (Asjid et al. 2019). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien haben aufgezeigt, dass die enthaltenen Wachstumsfaktoren einen anabolischen Effekt auf die Proteoglykane und die Col2 Synthese haben (Asjid et al. 2019), wobei die Wirkung vermutlich auf die Anwesenheit von IL-1RA zurückzuführen ist. Dadurch wird die NF-κB Aktivierung und infolgedessen die Produktion von matrixabbauenden Proteinen gehemmt (Asjid et al. 2019). Je nach Tier und etwaiger Vorbehandlung mit NSAIDs, Hydratationszustand und Uhrzeit der Blutabnahme, variiert das Verhältnis von Plättchen und Leukozyten stark (Bogers 2018). Nachts und im Dehydriertenzustand ist mit einer erhöhten Leukozytenkonzentration und bei NSAID-Vorbehandlung mit erhöhter Plättchenkonzentration zu rechnen (Bogers 2018).

Es gibt chirurgische Maßnahmen, die die körpereigenen Reparaturmechanismen anregen sollen. Dazu gehören autologe Chondrozyten Implantation (ACI), Mosaikplastik und arthroskopisch durchgeführte Mikrofrakturen (Freitag et al. 2016).

Die Operationsvarianten sind auf den Versuch der Reparatur von fokalen Defekten beschränkt und daher bei diffusen Veränderungen, wie sie bei OA häufiger sind, nicht einsetzbar (Freitag et al. 2016).

Die **Mikrofraktur-Op**, auch Osteoplastik genannt, soll die Heilungsreaktion im defekten Knorpel stimulieren (Freitag et al. 2016). Hierfür wird ein Loch durch die subchondrale Platte des Knorpels bis in den darunterliegenden Markraum gestanzt (Freitag et al. 2016), welches die Migration von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark bis auf die Gelenkoberfläche ermöglicht (Freitag et al. 2016). Allerdings haben histologische Untersuchungen ergeben, dass der so entstehende Knorpel mehr Ähnlichkeiten mit Kollagen Typ 1-reichem Faserknorpel, als mit typischem hyalinem Gelenkknorpel hat (Freitag et al. 2016).

Bei lokalen Defekten bis zu 9 mm Größe kann die **Mosaikplastik** eine operative Möglichkeit darstellen (Freitag et al. 2016). Hierbei wird innerhalb einer Operation ein Knorpeltransplantat aus dem nicht-gewichtstragenden Bereich des Gelenkknorpels entnommen und in den Defekt eingesetzt (Freitag et al. 2016). Zwischen der

subchondralen Platte und dem eingesetzten Knorpelstück soll sich Faserknorpel als eine Art "Kleber" bilden (Freitag et al. 2016). Nachdem mehrere Studien auf eine Resorption der chondralen Schicht des Transplantats und Degeneration der umgebenden Knorpeloberfläche hinweisen, wird diese Operation immer seltener angewandt (Freitag et al. 2016). Im Vergleich zu diesem Outcome ist das der ACI langfristig besser und wird als geeignetere Alternative angewandt (Freitag et al. 2016).

Das **ACI** erfolgt in zwei Operationen. Zuerst wird eine Knorpelbiopsie aus dem nicht-gewichtstragenden Gelenkknorpel entnommen und im Labor kultiviert (Fuggle et al. 2020). Dabei vermehren sich die Chondrozyten. Diese werden unter einem Flap in der zweiten Operation in den Defekt eingebracht (Freitag et al. 2016, Fuggle et al. 2020). Allerdings hat sich bei langfristiger Beobachtung herausgestellt, dass diese Technik nicht für ausgeprägte OA geeignet ist, sondern einen potenziell erfolgreicher Therapieansatz für die symptomatische Therapie von Knorpelveränderungen im Frühstadium darstellt (Freitag et al. 2016).

Arthrodesis ist eine weitere chirurgische Therapie, um auf lange Zeit Schmerzen verhindern zu können (Chapman et al. 2019). Es gilt als Goldstandard bei der Therapie von traumatisch bedingten Abrissen des Unterstützungsbandes vom Metakarpophalangealgelenk (MKP) oder Metatarsophalangealgelenk (MTP) (Chapman et al. 2019). Die Technik kann aber auch bei mittel- bis hochgradiger OA des MKP oder MTP zum Einsatz kommen, um eine adäquate Lebensqualität generieren zu können. Langfristig kann das Pferd damit als Koppel- oder Zuchtpferd eingesetzt werden (Chapman et al. 2019).

1.6. Ansatz der Zellverjüngung

Conboy et al. zeigte in einer inspirierenden Studie, dass alte Organismen unter dem Einfluss eines jungen Milieus verjüngt werden können (Conboy et al. 2005). Sie konnten zeigen, dass die Zellproliferation zunimmt, Proteinaggregate abgebaut werden und die Telomerlänge stabilisiert wird (Conboy und Rando 2012). In den Studien werden parabiotische Paarungen mit Mäusen durchgeführt. Dabei werden zwei Mäuse so miteinander verbunden, dass sie sich einen gemeinsamen Körperkreislauf teilen (Conboy et al. 2005). Die wesentliche Erkenntnis dieser Studie liegt darin, dass die erhöhte Zellproliferation bzw. Heilung von Muskelverletzungen der älteren Mäuse nicht auf das Zirkulieren von jungen Stammzellen zurückzuführen ist, sondern auf die Verjüngung der vorhandenen Zellen (Conboy et al. 2005). Daraus resultiert die Schlussfolgerung, dass das verminderte regenerative Potenzial älterer Organismen mit dem die Zelle umgebenden Milieu zusammenhängt, was wiederum vielversprechend für zukünftige Therapieansätze erscheint (Conboy et al. 2005).

Werden adulte Zellen in jungem Serum kultiviert, wird bei diesen Zellen eine Hochregulation der NOTCH-Liganden, gesteigerte Proliferationsrate und gesteigerte Differenzierungsfähigkeit beobachtet (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005). Durch vorherige Kultivierung in einem jungen Milieu waren Zellen überdies weniger anfällig für die hemmenden Effekte aus dem alten Milieu (Carlson und Conboy 2007). Sie entwickelten eine Mikro-Nische, in welcher sie zeitweise geschützt waren (Carlson und Conboy 2007).

Bemerkenswert ist, dass auch der Kulturüberstand von jungen Zellkulturen ausreicht, um die Zellen in ihrer Entwicklung zu beeinflussen (Carlson und Conboy 2007).

Diese Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die Modulation des Milieus alte Zellen zu einer Verjüngung anregen und regenerative Prozesse in Gang gesetzt werden können (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005).

Das Gelenk-Milieu bei Osteoarthritis wird dominiert von pro-inflammatorischen und katabolen Faktoren (Issa und Griffin 2012). Werden diese inhibitorischen Faktoren durch ein junges Milieu verdünnt oder gar ersetzt könnte dies zu einer Verbesserung der Regenerationsfähigkeit der Zellen führen (Carlson und Conboy 2007).

1.7. Vergleich Zellkultursystem Monolayer vs. Explant

Um ideale Kulturbedingungen und eine möglichst realitätsnahe Simulation der *in vivo* Gegebenheiten repräsentieren zu können, benötigt es optimale Kultursysteme. Dafür gibt es verschiedene Ansätze, unter anderem die Monolayer-Zellkultur und die Explant-Kultur.

Diese beiden Kultursysteme unterscheiden sich in der Bearbeitung der Zellen vor der Kultivierung. Die Überführungmöglichkeiten der Zellen von *in vivo* nach *in vitro* können

hierbei in zwei verschiedenen Methoden unterteilt werden: enzymatische und nicht-enzymatische Methoden (Hendijani 2017). Aus der enzymatischen Verarbeitung entsteht der Monolayer, aus der nicht-enzymatischen Bearbeitung die Explant-Kultur. Der bedeutendste Unterschied ist, ob die Zellen für den Kultivierungszeitraum aus ihrem *in vivo* Zellverband herausgelöst (enzymatisch; Monolayer) werden oder in ihrem Zellverband bestehen bleiben (nicht-enzymatisch; Explant) (Hendijani 2017).

Im Monolayer, ein zweidimensionales Zellkultursystem, werden die Zellen vor der Kultivierung mittels enzymatischer Isolierung aus ihrem Zellverband gewonnen (Hendijani 2017). Während der Kultivierung wachsen die Zellen als Ein-Zellschicht auf ihrer Unterlage, bis sie die gesamte Unterlage ausfüllen und es zur Zellkontakthemmung (Konfluenz) kommt (https://pages.binder-world.com/zellkultur (Zugriff: 03.02.2021)). Damit die Zellen nach Konfluenz nicht absterben, ist ein regelmäßiges Passagieren auf eine neue Unterlage mit neuem Medium nötig (https://pages.binder-world.com/zellkultur (Zugriff: 03.02.2021)).

Bei der Explantationstechnik werden die Zellen nicht aus ihrem Zellverband gelöst, sondern mit einem Fragment, aus dem *in vivo* Zustand nach *in vitro* überführt (Hendijani 2017, Resau et al. 1991). So können Beziehungen zwischen den einzelnen Zelltypen in der Kultivierung mitwirken (Resau et al. 1991). Im Vergleich zum Monolayer weisen die so gewonnenen Zellen eine höhere Proliferationsrate auf (Hendijani 2017).

Knorpelzellen werden für das Explantmodell als Stanzbiopsie mit ECM und subchondralem Knochen gewonnen (vgl. Kapitel 3 Material und Methoden). Die ECM bildet dabei nicht nur ein Gerüst, sondern ist verantwortlich für biochemische und biomechanische Signale. Diese sind *in vivo* essenziell für die Gewebedifferenzierung und -homöostase und können daher auch *in vitro* von Nutzen sein (Hendijani 2017). Die ECM selbst stellt des Weiteren ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und Zytokine dar (Hendijani 2017). Außerdem werden über Interaktionen zwischen Zelloberflächenrezeptoren und ECM-Proteine intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst (Hendijani 2017).

Aufgrund dessen, dass der Verarbeitungsschritt der enzymatischen Isolierung, im Vergleich zum enzymatischen Aufschluss für das Monolayer, der Zellen wegfällt, ist das Explantmodel weniger arbeitsintensiv und kostengünstiger (Hendijani 2017).

Die Überlebensrate von Zellen, die mittels 60 min Trypsin aus ihrem Zellverband ausgelöst werden, sinkt auf 85 % herab (Hendijani 2017). Außerdem sind nicht-enzymatisch gelöste Zellen weniger proteolytischem Stress ausgesetzt (Hendijani 2017).

Beim Vergleich von MSC, die einmal mittels enzymatischer Methode und einmal im Explantmodel isoliert und kultiviert wurden, werden in ihren Hauptmerkmalen deutlich weniger Unterschiede gefunden als zu erwarten ist (Hendijani 2017). Auch wurden keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich ihrer immunogenen und immunsuppressiven Aktivität festgestellt (Hendijani 2017).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Effekts von *in vitro* Monolayer und Explant Kultur mit und ohne fötalem Kälberserum (FCS) auf Chondrozyten geriatrischer (> 20 Jahre) equiner Donoren.

In der vorliegenden Diplomarbeit wird die Hypothese getestet, dass Kultur mit FCS zu einer "Verjüngung" (reduzierte Genexpression von Seneszenz-assoziierten Markern) der geriatrischen Chondrozyten führt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsgrundlagen

Das Ziel des Versuchs war herauszufinden, ob fetales Kälberserum (FCS) im Kulturmedium einen Einfluss auf die Seneszenz von adulten Chondrozyten hat. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde von sechs Pferden im Alter von über 20 Jahren Knorpelproben von den Femorkondylen entnommen. In der Folge wurden die Chondrozyten in unterschiedlichen Medien mit und ohne FCS kultiviert und die Seneszenzmarker nachfolgend analysiert.

Die Tiere sind an der Universitätsklinik für Pferde Wien aufgrund von Erkrankungen unterschiedlicher Genese euthanasiert worden. Anamnestisch und klinisch waren keine Orthopädischen Erkrankungen nachweisbar. Die Tiere wurden nicht speziell für dieses Projekt euthanasiert, sodass keine Meldung an die Ethik- und Tierschutzkommission nötig war.

Die Verarbeitung der Proben erfolgte im Labor der Forschungseinrichtung Veterinary Tissue Engineering and Regenerative Medicine (VETERM).

Je Tier wurden drei Probengruppen gebildet (Aufteilung siehe Tab. 1), wovon jeweils die Hälfte einer Probengruppe in dem Kulturmedium 1 (mit FCS) und in dem Kulturmedium 2 (ohne FCS) kultiviert wurden. Tab. 1 Gruppenaufbau

Probenbezeichnung	Synonym	Besonderheit,
		Kultivierung
Probengruppe 1	Nativer Knorpel	nach der Entnahme in
		Flüssigstoff schock
		gefroren
Probengruppe 2	Explants – 3D	Kultivierung in
		Well-Platten
Probengruppe 3	Isolierte Chondrozyten	Kultivierung in
		Zellkulturflaschen als
		Monolayer

2.2. Verwendete Materialien, Reagenzien und Gerätschaften

Tab. 2 Verwendete Reagenzien und Medien

Reagenzien	Firma	Bezeichnung im
		Text
Amphotericin B	Biochrom	Amphotericin
Betamercapto-Ethanol	SIGMA-ALDRICH	Betamercapto-Ethan
Chloroform	SIGMA-ALDRICH	Chloroform
Collagenase-Pulver	Gibco (Thermo Fisher Scientific	Collagenase-Pulver
	(Life Technologies))	

DEPC Wasser	Invitrogen (Thermo Fisher	DEPC Wasser
	Scientific (Life Technologies))	
DMEM low glucose	Gibco	DMEM
Dulbecco's Modified		
Eagle's Medium		
DNase Inaktivierungsreagenz	Thermo Fisher Scientific (Life	DNase
	Technologies)	Inaktivierungsreagen
		Z
DNase Puffer	Thermo Fisher Scientific (Life	DNase Puffer
	Technologies)	
Fetales Kälber Serum,	Capricorn (LOT: CP17-1858)	FCS
hitzeinaktiviert		
Flüssiger Stickstoff	-	Stickstoff
Glycoblue	Invitrogen (Thermo Fisher	Glycoblue
	Scientific (Life Technologies))	
Isopropanol	Carl Roth	Isopropanol
Nukleasefreies Wasser	Invitrogen (Thermo Fisher	nukleasefreies
	Scientific (Life Technologies))	Wasser
PBS,	Gibco (Thermo Fisher Scientific	PBS
Phosphat buffered saline	(Life Technologies))	
Penicillin/Streptomycin	SIGMA-ALDRICH	Antibiotikum (AB)
rDNase	Invitrogen (Thermo Fisher	rDNase
	Scientific (Life Technologies))	
StemMacs Basismedium	Miltenyi	StemMacs
Supplement	Miltenyi	Supplements

TRIzol Reagent	Invitrogen	(Thermo	Fisher	TRIzol
	Scientific (Li	fe Technolog	gies))	
Trizolmercapto-Ethanol				Trizolmercapto-Etha
				nol
Wasch-Ethanol	Fisher Biore	agents		EtOH, Ethanol

Tab. 3 Verwendete Materialien

	Firma, Chargennummer	Bezeichnung im
		Text
6-Well-Platte	Sarstedt	Well-Platte
Biopsiestanze,		Biopsiestanze
6mm Durchmesser		
Cryotube, 1,8 ml	Sarstedt	Cryotube
Einmalkanüle		Kanüle
Einmalrasierer	Bic	Rasierer
Einmalspritze	B.Braun	Spritze
Eppendorf Röhrchen 1,5 ml,	Sarstedt	Eppendorf Röhrchen
2 ml		
Falcon, 15 ml, 50ml	Falcon	Falcon
Glasbecher	Simax	Glasbecher,
		Becherglas
Pinzette	KLS Martin	Pinzette
Pipettenspitze	Biozym	Pipette
Skallpellgriff	Swann-Morton	Skalpell
Skalpellklinge	B.Braun	Skalpell

Spatel	Roth	Spatel
Sterile Handschuhe	Starlab	Sterile Handschuhe
Thermoscientific Sterilfilter, 0,2 μm	Merck Millipore	Sterilfilter
Zellkluturflasche T75	Sarstedt	Zellkulturflasche; T75 Flasche
Zellsieb, 100 µm	Greiner bio-one	Zellsieb

Tab. 4 Verwendete Gerätschaften

	Hersteller; Land	Bezeichnung im
		Text
Brutschrank Heracell 240i, CO2	Thermo Fisher Scientific; US	Inkubator
Inkubator		
Cryopulverizations Gerät	BIOspec; Deutschland	BioPulverizer
BioPulverizer		
Equivalent zu 59012MS		
Magnetrührer	IKA (Modell: Colorsquid)	Magnetrührer
Mikroskop	Olympus (Modell: CKX41)	Mikroskop
Minispin	my FUGE mini CENTRIFUGE	Minispin Zentrifuge
Pipettenboy	EPPENDORF; Deutschland	Pipette
Vortex	MS3 basic (IKA); Deutschland	Vortex
Waage	Sartorius (Modell: TE601)	Waage
Wärmeblock	BIOER (Modell: Thermocell	Wärmeblock
	Cooling & Heating Block)	

Workbench	-	Workbench
Zentrifuge (Rotanta 460R)	Hettich; Deutschland	Zentrifuge

2.3. Herstellung von Medien und Lösungen

Die im folgenden aufgelisteten Medien und Lösungen wurden im Vorfeld vorbereitet und im Rahmen des Versuches verwendet.

Herstellung der Collagenase-Lösung:

Für die Herstellung von 50 ml Collagenase-Lösung wurden 50 mg Collagenase-Pulver in einem sterilen Becherglas abgewogen. Das Pulver wurde mit 5 ml PBS in Lösung gebracht und mittels einer Kanüle in eine sterile Spritze aufgezogen. Durch einen Sterilfilter wurde die Lösung in ein neues, steriles Gefäß filtriert. Mit 45 ml PBS wurde die Lösungsmenge auf insgesamt 50 ml aufgefüllt und danach je 0,5 ml Penicillin/Streptomycin und Amphotericin hinzugefügt.

Herstellung der Kulturmedien:

Es wurden zwei verschiedene Kulturmedien (KM) zu je 50 ml hergestellt. Das Kulturmedium 1 (KM_1) mit FCS, das Kulturmedium 2 (KM_2) ohne FCS (Zusammensetzung siehe Tab. 5).

Die Herstellung erfolgte am Anfang für beide Kulturmedien gemeinsam. Hierfür wurden 97,6 ml StemMacs, 1 ml Penicillin / Streptomycin und 1,4 ml Supplements in einem Gefäß miteinander vermengt. Dies stellt das KM_1 dar. Für die Herstellung des KM_2 wurde von der Mischung 45 ml in ein neues Gefäß überführen und mit 5 ml FCS vermengt.

<i>l</i> acs	Well-1
llin/Streptomycin	Well-2
ements	T75-1
	T75-2
lacs	Well-3
llin/Streptomycin	Well-4
ements	T75-3
	T75-4
	illin/Streptomycin ements Macs illin/Streptomycin ements

Tab.	5 Zusammensetzung	und Verwendung	g Kulturmedien
	0		

2.4. Probengewinnung

Nach Euthanasie des Pferdes wurde dieses im Bereich des Knies medial und lateral ausrasiert und der Bereich großzügig mit Alkohol gereinigt und desinfiziert. Mit sterilen Handschuhen wurde das Femortibialgelenk mittels Skalpells vertikal eröffnet und nach kaudal aufgeklappt, sodass die Gelenkfläche der Femorkondylen sichtbar waren. Die Probenentnahme erfolgte aus makroskopisch unveränderten Gelenkknorpelbereichen. Nach dem Wechsel zu einem neuen sterilen Paar Handschuhe wurden mittels Biopsiestanze 16 Proben (Probengruppe 2; Explants) entnommen und in einem Falcon, gefüllt mit PBS + 1 % Penicillin/Stremtpoycin + 1 % Amphotericin gesammelt. Für die Probengruppe 1 und 3 wurden mittels eines Skalpells Gelenkknorpelschuppen gewonnen in zwei weiteren Falcons, gefüllt und mit PBS + 1 % Penicillin/Stremtpoycin + 1 % Amphotericin, gesammelt. Die Knorpelstückchen für die Probengruppe 1 werden direkt in Cryotubes gegeben und nach Beschriftung sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren (snap freezen). Die Knorpelstückchen für Probengruppe 3 wurden in einem 50 ml Falcon mit 30 ml PBS + 1 % Penicillin/Streptomycin & 1 % Amphotericin) aufbewahrt, bis zur Überbringung ins Labor.

2.5. Weiterverarbeitung der Probengruppe 1 (nativer Knorpel)

Die Cryotubes mit den enthaltenen Knorpelstücken wurden aus dem Transportbehältnis in die Kühleinheit im Labor verbracht, wo sie bis zur Weiterverarbeitung bei – 80° C gelagert wurden.

2.6. Weiterverarbeitung der Probengruppe 2 (Explants)

Auf der Workbench wurden sterile Well-Platten platziert, wovon je Platte vier Wells genutzt wurden. Das PBS aus den Falcons wurde verworfen. Die Well-1 und -2 wurden mit je 2 ml KM_1 befüllt und je vier Explants pro Well mit der Knorpelseite nach unten darin platziert. Die Well-3 und -4 wurden mit je 2 ml KM_2 befüllt und ebenfalls je vier Explants pro Well mit der Knorpelseite nach unten platziert (siehe Tab. 6). Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37° C bei 5 % CO₂-Konzentration für 7 Tage. Täglich erfolgte eine makroskopische und mikroskopische Kontrolle auf Kontaminationen. An Tag 2 wurden die Explants mit einer sterilen Pinzette in ein 50 ml Falcon mit PBS gegeben und das KM der Well-Platte gewechselt. Das Falcon wurde vorsichtig geschwenkt und danach wurden die Explants wieder in eine Well-Platte mit dem jeweiligen Kulturmedium gesetzt. Am Tag 4 erfolgte ein weiterer KM-Wechsel. Nach sieben Tagen wurde der Knorpel mit einem Skalpell vom Knochen gelöst, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei - 80° C gelagert.

Wellnummer	Kulturmedium
Well-1	Kulturmedium 1
Well-2	Kulturmedium 1
Well-3	Kulturmedium 2
Well-4	Kulturmedium 2

Tab. 6 Probengruppe 2 Aufbau

2.7. Weiterverarbeitung der Probengruppe 3

Das PBS aus den Falcons wurde auf der Workbench verworfen. Die Knorpelschuppen wurden in einer Petrischale mittels Skalpells und Pinzette in 1-2 mm große Stücke geschnitten und in ein steriles Becherglas gegeben. In dieses wurde Collagenase-Lösung zur Digestion hinzugegeben, sodass die Probenstücke schwammen und ein Rührfisch hinzugefügt. Das Glas wurde im Inkubator auf den Magnetrührer platziert und dort für 6 h belassen. Nach Ablauf der Zeit wurde das Becherglas aus dem Inkubator genommen und die gleiche Menge an KM (DMEM + 10 % FCS + 1 % AB) wie Kollagenase-Lösung zur Verdünnung hinzugeben. Ein Zellsieb wurde auf ein 50 ml Falcon gesetzt und mit einer Pipette den KM / Kollagenase-Mix durchlaufen gelassen. Zum Verdünnen wurde etwas PBS in das Falcon dazugeben. Das Falcon wurde daraufhin bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 440 g zentrifugiert, danach der Überstand abgenommen und die Pellets mit 20 ml PBS resuspensiert. Diese wurden dann zu gleichen Teilen auf zwei 15 ml Falcons aufgeteilt und erneut für 5 Minuten bei 440 g zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets mit je 10 ml PBS resuspensiert und ein weiteres mal mit den gleichen Einstellungen zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand verworfen und ein Pellet mit 10 ml KM 1, das andere Pellet mit 10 ml KM 2 resuspensiert. Die Zellen wurden in je eine T75 Kulturflasche ausgesät und in den Inkubator geben. Die Inkubation erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie im Abschnitt 3.6. beschrieben. Am Tag 2 wurde der Überstand abgenommen und bei 440 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Pellets werden mit dem jeweiligen Kulturmedium resuspensiert und in die ursprünglichen T75 Flaschen, mit frischem Medium, ausgesät. An Tag 4 erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 7 Tagen wurden die Zellen wie folgt geerntet. Dafür wurden ca. 4 ml Trizol und 40 µl Betamercapto-Ethanol mit einer 5 ml Pipette aufgezogen und mehrmals über die Zellen in der Kulturfalsche gespült. Mittels Mikroskops wurde das vollständige Ablösen der Zellen kontrolliert. Die 4 ml wurden zu gleichen Teilen auf 4 Cryotubes aufgeteilt und bei -80 °C gelagert bis zur Weiterverarbeitung. Für die spätere RNS-Isolierung ist es wichtig die exakte Menge des Inhaltes der Cryotubes zu kennen.

2.8. Allgemeine Arbeitsschritte

2.8.1. RNS-Extraktion

2.8.1.1. Homogenisierung der Probengruppe 1

Für die Homogenisierung des nativen Knorpels, wurde der BioPulverizer für eine Minute in flüssigen Stickstoff getaucht, um heruntergekühlt zu werden. Danach wurden die Knorpelschuppen aus den Cryotubes entnommen und in jeweils eine Mulde des BioPulverizers platziert. 500 µl flüssiger Stickstoff wurde mithilfe eines 1,5 ml Eppendorf Röhrchens auf den Chip geschüttet, um eine andauernde Kühlung zu gewährleisten. Ein zuvor ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühlter Edelstahl Stößel wurde in jedem Well platziert und mit einem Hammer eine Minute darauf geschlagen, sodass eine Pulverisierung der Knorpelschuppen stattfand. Um das feste, gefrorene Pulver zugänglich zu machen, wurde nach Ablauf der Zeit der Stößel und die zylindrische Edelstahlhülle entfernt. Mit einem ebenfalls vorgekühlten Spatel wurde das Pulver in ein 2 ml Eppendorf Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.8.1.2. RNS-Extraktion

Vorab wurde die Zentrifuge auf 4°C heruntergekühlt. Nach dem Auftauen der Probengruppe 1 und 2, wurde dem homogenisierten Pulver 1 ml Trizol (+ 10 μ l β -Mercaptoethanol) zugegeben.

Die Mischung wurde bei höchster Geschwindigkeit für 5 Minuten gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Eppendorf Röhrchen überführt.

Die folgenden Schritte sind für die Verarbeitung aller drei Probengruppen gleich.

Zu der aufgetauten Probe wurde 200 µl Chloroform pro 1 ml TRIzol (Verhältnis 1:5) zugegeben. Durch Schütteln wurde die Probe gemischt und anschließend für 5 Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diese für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4° C zentrifugiert.

Dabei trennt sich die Probe in drei Phasen: eine untere, pinkfarbene Phenol-Chloroform Phase, eine weißliche Interphase in der Mitte und ganz oben eine klare, wässrige Phase. In der obersten Phase befindet sich die gelöste RNS. Diese wurde mittels Pipette in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und die transferierte Menge genau notiert.

2.8.1.3. RNS-Isolation

Um die RNS aus der wässrigen Phase zu isolieren, wurde die überführte Flüssigkeit mit der gleichen Volumenmenge an DEPC Wasser verdünnt. Isopropanol wurde entsprechend der folgenden Formel hinzugegeben:

(x μl wässrige Phase (wP) + x μl DEPC Wasser) * 0,8 = μl Isopropanol

Werden 200 µl wP gewonnen, dann werden 320 µl Isopropanol zugegeben. Zum Anfärben der RNS wurden 2 µl Glycoblue je Probe hinzugefügt, durch schütteln gründlich gemischt und anschließend für 10-15 Minuten bei 4° C inkubiert. Bei 13.000 rpm und 4° C wird die Probe anschließend für 10 Minuten zentrifugiert. Wenn ein blaues Pellet am Boden sichtbar war, wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. War kein Pellet sichtbar, wurde der Überstand behalten und erneut bei den genannten Einstellungen zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit 75 % EtOH gewaschen und erneut bei 14.000 rpm und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Für das Waschen wurde pro 1 ml TRIzol Reagent 1 ml Ethanol genutzt.

Nach dem Zentrifugieren wurde der vorangegangene Ethanol-Waschschritt, inklusive der Zentrifugation, wiederholt. Im Anschluss wurde der Überstand abpipettiert und die Probe mit der Minispin Zentrifuge kurz runter gespinnt und der restliche EtOH mit der 10 µl Pipette abgenommen. Das Pellet wurde mit offenem Eppendorf-Deckel für 5 Minuten luftgetrocknet. Zum Schluss wurden 20 µl nucleasefreies Wasser dem Pellet zugesetzt und das Pellet sollte sich ohne Pipettieren lösen.

2.8.2. DNAse-Behandlung

Der Wärmeblock wurde auf 37° C vorgeheizt. Die nötigen Reagenzien, bestehend aus DNase Puffer zu je 3 µl, rDNase zu 1 µl und DNase Inaktivierungsreagenz, wurden aufgetaut.

Die Mengenangabe bezieht sich auf eine Probe zu 20 μ l RNS. Bei Herstellung des Mastermix (MM) für eine Anzahl x an Proben, muss das MM für x + 1 Probe hergestellt werden. Das Totalvolumen eines MM pro Probe sind 10 μ l, wofür je 3 μ l DNase Puffer, 1 μ l rDNase und 6 μ l nukleasefreies Wasser vermischt werden.

Existieren beispielsweise 5 Proben, muss der MM für 6 Proben hergestellt werden, mit insgesamt 18 µl DNase Puffer, 6 µl rDNase und 36 µl nukleasefreiem Wasser.

Zu jeder Probe wurden je 10 μ I MM hinzugegeben und bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden 3 μ I DNase-Inkativierungsreagenz pro Probe hinzugefügt und gut vermischt. Nach 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut vorsichtig geschwenkt und anschließend bei 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss sollten 2 Phasen sichtbar sein. In der oberen, klaren Phase befindet sich die RNS, welche in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Bis zur weiteren Nutzung erfolgt die Lagerung der RNS bei – 80° C.

2.9. Analyse der Genexpression

Die RNS-Proben werden bei – 80° C an das Labor TamiRNA gesendet und dort mittels RNASeq analysiert.

2.10. Methoden zur Analyse

2.10.1. PCA

Die Principal component analysis (PCA) (*deutsch:* Hauptkomponentenanalyse) ist eine Clusteranalyse und wird genutzt, um mittels zweier Hauptkomponenten (HK) in einem großen Datensatz Variation hervorzuheben und so starke Muster im Datensatz übersichtlich darzustellen (https://setosa.io/ev/principal-component-analysis/ Zugriff:25.04.2021).

Die Varianzwerte der Achsen geben dabei die Streuung der Proben in ihren zwei Hauptwerten an. Die erste HK erfasst aus allen Daten so viel Streuung (Varianz) wie möglich, die zweite HK erfasst die zweithäufigste Varianz in den Daten (Gansser O. 2017; Dimensionsreduktion mit PCA und EFA; https://cbs.dtu.dk/chipcourse/Lectures/ ClusteringPCA_2010.pdf (Zugriff: 26.04.2021)). Diese beiden HK werden auf der x-Achse und der y-Achse eines Diagramms angegeben. Mithilfe von zwei HK ist es meistens möglich alle Daten zubeschreiben und Gemeinsamkeiten hervorzuheben, ohne die Diskriminierung der einzelnen Proben zuverlieren.

2.10.2. Differentiellen Expressionsanalyse

Die Bezeichnung "differentielle Expression"(DE) eines Gens beschreibt in der Statistik die Tatsache, dass ein Gen in zwei Vergleichskonditionen unterschiedlich stark exprimiert wird. Aus dem DE-Wert des Gens für die jeweilige Gruppe kann in Folge der sogenannte *Fold Change* (FC) berechnet werden. Dieser gibt den Quotienten des Gens aus den zu vergleichenden Konditionsgruppen wieder.

$$FC = \frac{DE(A)}{DE(B)}$$
$$A < B \rightarrow FC = 0 - 1$$
$$A > B \rightarrow FC = 1 - \infty$$

Ist der DE(A)-Wert kleiner, als der DE(B)-Wert, ist der FC zwischen 0-1.

Ist der DE(A)-Wert größer, als der DE(B)-Wert, ist der FC zwischen 1-∞.

$$FC = 1 - \infty \rightarrow \log FC \text{ positiv}$$
$$FC = 0 - 1 \rightarrow \log FC \text{ negativ}$$

Um den FC von mehreren Genen aus der gleichen Vergleichsgruppe optisch besser miteinander vergleichen zu können, können diese auf einem Diagramm dargestellt werden. Um eine bessere und gleichmäßigere Skalierung erzielen zu können, wird hierfür der Logarithmus (log) verwendet. Der FC zwischen 0-1 wird negativ, der FC zwischen 1- ∞ wird positiv) (McCarthy und Smyth 2009).

So ist der logFC eines Gens negativ, wenn in der Gruppe A der DE-Wert kleiner ist, als in der Gruppe B. Dementsprechend ist der FC eines Gens positiv, wenn der DE-Wert eines Gens in der Gruppe A größer ist, als in der Gruppe B.

2.10.3. Datenauswertung

Aufgrund der sehr großen gewonnen Datenmenge wird in der Auswertung der mittels RNASeg gewonnen Genexpressionsraten nur auf die drei Vergleichsgruppen "Nativer Knorpel", "Chondrozyten in Monolayer Kultur mit FCS" und "Chondrozyten ohne FCS und "Chondrozyten in Monolayer Kultur mit FCS" eingegangen werden. Aus den resultierenden drei Vergleichen werden jeweils die 20 Top-up und 20 Top-down regulierten Gene mit Fokus auf sechs für diese Arbeit besonders relevante Funktionsgruppen: pro-inflammatorisch, anti-inflammatorisch, apoptotisch, proanti-apoptotisch, chondroprotektiv, chondrodegenerativ, pro-proliferativ und Entzündungsmediator, mittels Gene-NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/), UniProt (https://www.uniprot.org/) und Ensembl Genome Browser (https://www.ensembl.org/horse/) ausgewertet. Zusätzlich werden für jeden Vergleich die differenziell regulierten bekannten Knorpel- (ACAN, COL2, SOX9) und Seneszenzmarker-Gene (Tab. 7) sowie weitere Faktoren, die mit chondrogener Phänotypregulation (BMP2, BMP6) oder als Entzündungsmediatoren oder transcriptional Regulators mit Seneszenz (MRC1, HMGB1, PI3, SIN3A, RBP1) assoziiert sind, gesucht und ausgewertet.

Funktion/Gruppierung	Gene
Pro-inflammatorische Zytokine	IL-1,-2,-6,-7, -8,-12, TNF-αIFN-y, GM-CDF, OSM
Chemokine	CCL2, CCL4, Groa

Tab. 7: Seneszenzmarker in cartilage and	I OA (Coryell et al. 2021, Jeon et al.2018)
--	---

Biomarker für zelluläre Seneszenz	CDKN2A (p16 ^{INK4a}), SA-ß-Gal, p53,		
	p21, PI3K		
Proteasen/Matrixdegenerative Enzyme	ADAMTs4, ADAMTs5, ADAMTs7,		
	MMP-1,-3,-8,-10, -13,-14,		
Wachstumsfaktoren	TGFb, IGFBP		

3. Ergebnisse

3.1. Principal component analysis (PCA)

In dem Scores Plot der PCA ist auf der X-Achse die 1. HK dargestellt, welche 24,13 % der totalen Varianz beschreibt, während die 2. HK auf der Y-Achse 10,94 % der totalen Varianz von beschreibt.

Die Proben der nativen Knorpel (hellblaue Dreiecke) befinden sich im linken, oberen Quadranten mit einer Spannweite von -49,801 bis -23,759 auf der X-Achse und 60,738 bis 12,799 auf der Y-Achse.

Die Explantproben (orange), sowohl mit (Vierecke), als auch ohne (Kreise) FCS Zusatz im Kulturmedium, befinden sich im Bereich -32,565 bis -16,541 (X-Achse) und 0,142 bis -34,551 (Y-Achse).

Die Proben des Chondrozyten-Monolayers (grün), mit (Vierecke) und ohne (Kreise) FCS als Zusatz im Kulturmedium, liegen im Bereich 32,028 bis 58,125 (X-Achse) und 13,594 bis -7,967 (Y-Achse).

Sowohl die Probengruppen der Monolayer, als auch jene der Explants stellen sich als Cluster dar. Die Nativproben weisen mehr Streuung in ihren zwei HK auf (Abb. 1).

Darüber hinaus ist deutlich zu sehen, dass die Proben der Explants zwar hinsichtlich ihrer HK näher jenen des nativen Knorpels angenähert sind als die Monolayer Proben, jedoch grenzen sie sich trotzdem als Gruppe von den beiden anderen Vergleichsgruppen ab.

Durch die Verarbeitung und Kultivierung der Chondrozyten für die Monolayer-Kultur entsteht in der HK 1 eine größere Varianz im Vergleich zum nativen Knorpel. In anderen Worten, die Monolayer-Kultur führt durch die Lösung der Zellen aus ihrem Verband und die dafür nötigen Bearbeitungsschritte zu einer Veränderung der Zelleigenschaften im Vergleich zum nativen Gewebe. Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss der Monolayer Kultur auf die Genexpression von Chondrozyten im Vergleich zu nativem Knorpel zu analysieren, um zu veranschaulichen, wie wichtig es ist diesen Einfluss bei der Planung und Interpretation von Experimenten zu berücksichtigen.



Abb 1: Principal component analysis (PCA) mit Clusterbildung in den Probengruppen.

Es sind die sechs Proben der jeweiligen Probengruppe graphisch in ihren zwei Hauptkomponenten (HK) dargestellt. In Grün die Proben der 2D Kultur (isolierte Chondrozyten), als Kreis in der Kultur ohne FCS, als Quadrat in der Kultur mit FCS. In Orange sind die Proben der 3D (Explants) dargestellt, als Kreis in der Kultur ohne FCS, als Quadrat in der Kultur mit FCS. Als blaue Dreiecke sind die nativen Knorpelproben eingetragen. In den jeweiligen Probengruppen sind Clusterbildungen sowohl in der 2D Kultur als auch in der 3D Kultur erkennbar. Die Varianz der HK-Werte sind hier bei der Kultivierung mit und ohne FCS sehr ähnlich. Die HK der nativen Proben weisen eine höhere Streuung zueinander auf. Die 2D-Kultur führt durch die Lösung der Zellen aus ihrem Verband und die dafür nötigen Bearbeitungsschritte zu einer Veränderung der Zelleigenschaften im Vergleich zum nativen Gewebe. Dieser Bearbeitungsschritt hat einen größeren Einfluss auf die Zellen als die Kultivierung per se.

3.2. Zusammenfassung der differentiellen Expressionsanalyse

In Zahlen ausgedrückt, stellen sich die differenziell exprimierten (DE) Gene zwischen den Vergleichsgruppen Nativer Knorpel, Explant, Chondrozyten Monolayer Kultur mit (+) und ohne (-) FCS) wie folgt dar (Tab. 8. und Abb. 2): Grün dargestellt sind die hochregulierten Gene (logFC>2), im Vergleich die Regulationswerte der ersten Gruppe zur zweiten Gruppe, in Rot die herunterregulierten Gene (logFC<2)

Vergleichsgruppen	Anzahl	hochregulierter	Anzahl	runterregulierte
	Gene		Gene	
Chondrozyten – FCS vs.	6		13	
Chondrozyten + FCS				
Explant – FCS vs.	423		521	
Chondrozyten – FCS				
Explant – FCS vs.	16		19	
Chondrozyten + FCS				
Explant – FCS vs.	19		16	
Explant + FCS				
Nativer Knorpel vs.	153		225	
Chondrozyten – FCS				
Nativer Knorpel vs.	162		272	
Chondrozyten + FCS				
Nativer Knorpel vs.	55		88	
Explant – FCS				
Nativer Knorpel vs.	74		122	
Explant + FCS				

Tab. 8 Anzahl der regulierten Gene je Vergleichsgruppe



Abb. 2 Zusammenfassung der differentiellen Expression

Es ist eine Zusammenfassung der differentiellen Expression der hoch- und runterregulierten Gene der Vergleichsgruppen dargestellt. In Grün die Anzahl der hochregulierten Gene, in Rot die herunterregulierten Gen. Auf der X-Achse sind die Vergleichsgruppen aus Kombination der fünf Probengruppen (Chondrozyten ohne FCS, Chondrozyten mit FCS, Explants mit FCS, Explants ohne FCS, nativer Knorpel) als Balken dargestellt. Die Anzahl der DE-Gene können auf der Y-Achse abgelesen werden.



Abb. 3 Venn Diagramm A) aller differentiell exprimierten Gene, B) der gemeinsamen differentiell hoch- bzw C) herunter-regulierten Gene.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit habe ich mich auf den Vergleich der Monolaver Kulturen (Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS, Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS) mit nativem Knorpel konzentriert. Von den im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS" 1117 differenziell (302 Gene hoch-, 815 Gene herunter-) regulierten Genen waren 863 mit den 1230 (338 Gene hoch-, 892 Gene herunter-) im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" differenziell regulierten Genen überlappend – davon sind 863 nur zwischen den Vergleichen nativen Knorpels mit den beiden Monolayer-Kulturen und 6 zwischen allen 3 Vergleichen geteilt (Abb. 3 Fig.A). Mit den 19 differenziell (6 Gene hoch-, 13 Gene herunter-reguliert) des Vergleichs "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" Vergleiche teilten sich die "Nativer Knorpel VS. Chondrozyten - FCS" und "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" 8 resp. differenziell 11 exprimierte Gene (Abb. 3 Fig.A). Im Vergleich "Nativer Knorpel VS. Chondrozyten - FCS" waren entsprechend nur 246 differentiell exprimierte Gene für diesen Vergleich unique (Abb. 3 Fig.A), für den Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" 356 und für "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" 6. Von den 302 im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS" hochregulierten Genen waren 249 mit dem Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" und 0 mit "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" geteilt und 53 unique (Abb. 3 Fig.B). Von den 338 im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" hochregulierten Genen waren 0 mit "Chondrozyten - FCS vs. Chondrozyten + FCS" geteilt und 89 unique (Abb. 3 Fig.B). Von den 6 im Vergleich "Chondrozyten - FCS VS. Chondrozyten + FCS" hochregulierten Genen waren alle unique (Abb. 3 Fig.B).

Von den 815 im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS" herunterregulierten Genen waren 615 mit dem Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" und 5 mit "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" geteilt und 195 unique (Abb. 3 Fig.C). Von den 892 im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS" herunterregulierten Genen waren 9 mit "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" geteilt und 268 unique 13 (Abb. 3 Fig.C). Von den im Vergleich "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" herunterregulierten Genen waren 4 unique (Abb. 3 Fig.C). Der Unterschied zwischen nativem Knorpel und Monokultur war also deutlicher ausgeprägt (mehr differenziell exprimierte Gene) als der Unterschied zwischen Kultur mit und ohne Zusatz von FCS.

In den folgenden Kapiteln wird auf die 20 Topregulierten Gene und jene die im Literaturteil, als Seneszenz-assoziierte Gene beschrieben wurden, genauer eingegangen werden.

3.3. Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS

In diesem Kontrast wird die Genexpression von nativen Knorpelzellen zu Chondrozyten, die mit FCS kultiviert wurden, verglichen (Abb 3.LogFC der relevanten Gene in der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS). Die exakten logFC-Werte und die Gen-Nummern sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

3.3.1. Top-up regulierte Gene

Die folgenden 20 Gene wurden im Vergleich Nativer Knorpel zu Chondrozyten kultiviert mit FCS verstärkt exprimiert.

Das Gen C1QB codiert das Protein complement C1q B chain, welches die erste Komponente des Serumkonplementsystems und Teil des angeborenen Immunsystems ist. Im Vergleich wird es im nativen Knorpel 13,28-mal logFC stärker exprimiert, als in den kultivierten Chondrozyten.

Lymphocyte activating 3 (LAG3) ist Teil des adaptiven Immunsystems, hemmt die IL-2-Produktion und fördert die durch natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität. Es ist 11,88-mal logFC stärker im nativen Knorpel exprimiert.

Die Superoxide Dismutase 3 ist ein Schutzmechanismus des Extrazellularraums vor toxischen Einflüssen durch reaktive Sauerstoffintermediate. Diese entstehen bei der Umwandlung von Superoxidradikalen in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. SOD3 wird im nativen Knorpel 11,83-mal logFC stärker exprimiert, als in den mit FCS kultivierten Chondrozyten.

TRYOBP ist das Gen für das Transmembran immune signaling adaptor- Protein. dieses wird 11,49-mal logFC stärker im nativen Knorpel exprimiert. Es ist Teil des apoptotischen Signalwegs im Rahmen von zellulären Abwehrreaktionen und Teil des angeborenen Immunsystems. TYROBP steigert die IL-1- β -Produktion, IL-6-Produktion und die TNF-Biosynthese. Das Gen führt zur negativen Regulation von IL-10 und der TGF- β 1.

Das am fünft stärksten exprimierte Gen (logFC 11,02) in diesem Vergleich ist ein neues Gen mit dem Gennamen LOC100061154, dem membrane-spanning 4-domains subfamily A member 6A. Für das Humanegen wurde eine mögliche Beteiligung als Bestandteil eines multimeren Rezeptorkomplexes an der Signaltransduktion beschrieben.

Das Cartilage intermediate layer protein (CILP) ist verantwortlich für die negative Regulation des IGF-Rezeptor-Signalwegs. Des Weiteren spielt es wahrscheinlich eine Rolle bei der Knorpelgerüstbildung. CILP kann TGF- β 1 interagieren und dessen Wirkung hemmen. Wird es über-exprimiert, kann eine Chondrozytenwachstumshemmung und beeinträchtigte Matrixreparatur die Folge sein. CILP wird 10,84-mal logFC stärker im nativen Knorpel exprimiert.

ACAP5 codiert für acid phosphatese 5, tartrate resistant. Es ist an der Dephosphorylierung von Osteopontin / Knochensialoprotein beteiligt. Im nativen Knorpel wird es 10,83-mal logFC stärker exprimiert, als in der Vergleichskultur.

Complement C1q C chain hat die gleichen Funktionen wie bereits oben erwähntes C1QB. Es wird im Vergleich zu mit FCS kultivierten Chondrozyten 10,73-mal logFC stärker im nativen Knorpel gebildet.

Amelotin (AMTN) ist ein Promotor der Kalziumphosphatmineralisierung und wird 10,64-mal logFC mehr im Nativen Knorpel exprimiert.

C-C motif chemokine (LOC100630171) wurde im nativen Knorpel 10,51-mal logFC stärker exprimiert. LogFC 10,48-mal stärker wurde das C-C motif chemokine 14 (LOC100071548) ausgebildet. Beide fungieren als zelluläre Antwort auf INF- γ , IL-1 und TNF. Neben der Beteiligung an Entzündungsreaktionen regulieren sie die GTPase-Aktivität und die ERK1- und ERK2-Kaskaden.

Das Molekül CD163 wird 10,34-mal logFC mehr im nativen Knorpel synthetisiert. Es ist an der Aktivität des Scavenger-Rezeptors beteiligt.

Die Bindung von Chondrozyten, Fibroblasten und Osteoblasten wird durch Chondroadherin (CHAD) gefördert. Es gibt Hinweise darauf, dass CHAD eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation von Chondrozyten spielt. Bei dem nativen Knorpel wird dieses Gen 10,21-mal logFC mehr exprimiert, als in den mit FCS kultivierten Chondrozyten.

Das phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4) wurde 10,18-mal logFC stärker gebildet im nativen Knorpel. PEBP4 hemmt die Aktivierung des Raf-1/MEK/ERK-Wegs und die JNK-Auslagerung und fördert so den Widerstand gegen TNF-induzierte Apoptose.

Cathepsin C (CTSC) ist für die positive Regulierung des apoptotischen Signalwegs mitverantwortlich. Im Nativen Knorpel wurde es 9,98-mal logFC mehr exprimiert.

CYTL1, das Cytokine like 1, ist an diversen Prozessen im Knorpel beteiligt, u.a. der Knorpelhomöostase und der Chondrozytendifferenzierung. Im Vergleich zu in FCS kultivierten Chondrozyten wurde es im nativen Knorpel 9,71-mal logFC mehr ausgebildet.

Mitwirkend an der GTP-Bindung ist der GTPase, IMAP family member 6 (GIMAP6). Dieses wurde in seiner Expression 9,60-mal logFC mehr gefördert.

Für das immunoglobulin-like transcript 11 A (ILT11A), welches 9,51-mal logFC mehr exprimiert wurde im nativen Knorpel, wurde im Human-bereich folgende Funktionen gefunden. Es hemmt die Produktion von IL-12 und -13, fördert die Bildung von IL-10, -1β , -6, TNF und der MAPK-Kaskade. Des Weiteren ist es bei der Auslösung von angeborenen Immunreaktionen und Entzündungsreaktionen beteiligt.

Die hemoglobin subunit epsilon (LOC100068926) ist an zellulären Oxidations-, Entgiftungs und Wasserstoffperoxid-Abbauprozessen beteiligt. Im nativen Knorpel wurde es 9,49-mal logFC stärker exprimiert.

STRA6, signaling receptor and transporter of retinol STRA6, wirkt als Retinol-Transporter durch die Zellmembran. Dieses kam im nativen Knorpel 9,47-mal logFC mehr vor, als in den mit FCS kultivierten Chondrozyten.

3.3.2. Top-down regulierte Gene

Die nachfolgenden Gene sind in der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS in ihrer Expression am deutlichsten vermindert.

Am deutlichsten wurde Angiopiotin 1 (ANGPT1), mit einem logFC-Wert von -10,91 herunterreguliert. Dieses ist an der Regulierung der Angiogenese, der der TNF-Produktion und der I-*k*B-Kinase/NF-*k*B-Signalkaskade beteiligt. Außerdem hemmt es die an der Immunantwort beteiligte Zytokinproduktion.

Non-SMC condensin I complex subunit G (NCAPG) ist der Zellteilung der der mitotischen Chromosomenkondensation beteiligt. Im nativen Knorpel wurde es -10,87-mal logFC schwächer exprimiert.

Die Cyclin dependent kinase 1 wird über das Gen CDK1 im Nativen Knorpel -10,43-mal logFC weniger gebildet. CDK1 spielt im Zellzyklus eine wichtige Rolle. Es fördert den G2-M-Übergang und den G1-S-Übergang. In manchen Zellen wird CDK1 für den Eintritt in die S-Phase und damit die Mitose benötigt.

An der Chromosomensegregation beteiligt ist das Centromere protein 1 (CENP1). Es wurde im nativen Knorpel -10,12-mal logFC schwächer gebildet.

Haptoglobin (LOC100067869) kann mit Hämoglobin Komplexe bilden, welche über den bereits erwähnten CDK163-Scavenger-Rezeptor abgebaut werden. Es wirkt als Antioxidans, ist antibakteriell wirksam und ist in diversen Stellen der Akutphasereaktion beteiligt. Mit einem logFC-Wert von -9,91 wird es deutlich schwächer exprimiert im nativen Knorpel, als in der Vergleichsgruppe. Als zelluläre Antwort auf IL-1, auf mechanischen Stimulus, auf TGF- β und auf TNF wirkt ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1). Im nativen Knorpel wurde es -9,79-mal logFC schwächer ausgebildetet. Es fördert außerdem apoptotische Prozesse und die DDR-Signaltransduktion via p53.

Das Gen CSTA codiert für Cystatin A, ein intrazellulärer Thiol-Proteinase-Inhibitor. Dieses wird im nativen Knorpel -9,77-mal logFC weniger stark exprimiert als in der Vergleichsgruppe.

Der Chromativ licensing and DNA replication factor 1 (CDT1) ist wichtig für den Übergang von G1-S im mitotischen Zellzyklus und ist ein DNS-Replikations-Checkpoint. Mit einem logFC-Wert von -9,75 wurde es deutlich schwächer im nativen Knorpel exprimiert.

Ebenfalls an der Regulation und Koordination von mitotischen Prozessen ist das Gen ASPM (assembly factor for spindle micrutubules) beteiligt. Es wurde im nativen Knorpel -9,75-mal logFC weniger exprimiert.

Das epithelial cell transformin 2-Protein wird durch das Gen ECT2 codiert und -9,66-mal logFC schwächer im nativen Knorpel gebildet. ECT2 wirkt an der positiven Regulierung von apoptotischen Prozessen, der GTPase-Aktivität und der I-*k*B-Kinase/NF-*k*B-Signalisierung mit. Außerdem ist es an dem Transportmechanismen von Proteinen in den Zellkern beteiligt.

KIF11 bildet das kinesin family member 11 aus. Es ist ein Motorprotein, welches für die Etablierung einer bipolaren Spindel während der Mitose benötigt wird. Mit einem logFC-Wert von -9,65 wird es im nativen Knorpel sehr deutlich schwächer exprimiert.

Als negativer Regulator der Kollagenmatrixablagerung ist das Gen CTHRC1 wirksam. Das codierte Protein ist collagen triple helix repeat containing 1. Des Weiteren ist CTHRC1 an der Förderung der Osteoblastendifferenzierung und -proliferation und bei des Wnt-Signalweg beteiligt. Der logFC-Wert beträgt -9,63.

Die Zelladhäsion wird unter anderem durch das Gen MPDZ vermittelt. Multirple PDZ domain crumbs cell polarity complex component hat einen logFC-Wert von -9,60 im nativen Knorpel.

Möglicherweise eine Rolle bei Transportvorgängen zwischen Golgi und endoplasmatischem Retikulum in der Zelle hat ERGIC and golgi 2. Im nativen Knorpel wird es -9,60-mal logFC schwächer exprimiert, als in den mit FCS kultivierten Chondrozyten. Mit einem logFC-Wert von -9,58 wird das Gen PI3 im nativen Knorpel deutlich weniger stark gebildet. Peptidase inhibitor 3 hat ein Peptidase-Inhibitor, ist Teil der angeborenen Immunantwort und der antibakteriellen humoralen Antwort.

CCNB1 codiert für das Protein cyclin B1, welches im mitotischen Zellzyklus am Übergang der Phase G2 in Phase M beteiligt ist. Im nativen Knorpel wird es -9,50-mal logFC weniger stark ausgebildet, als in der Vergleichsgruppe.

Das über das Gen CXCL6 ausgebildete Protein C-X-C motif chemokine ligand 6 ist neben der Chemotaxis von Neutrophilen und Leukozyten auch Chemokin-vermittleten Signalwegen und Entzündungsreaktionen beteiligt. Im Vergleich zu in FCS kultivierten Chondrozyten wird dieses Gen im nativen Knorpel -9,44-mal logFC weniger stark exprimiert.

NUSAP1 wird -9,40-mal logFC schwächer im Nativen Knorpel gebildet. Das codierte Protein, nucleolar and spindle associated protein 1, ist an der mitotischen Zytokinese beteiligt.

Trophinin associated protein (TROAP) ist an der Zelladhäsion. Es wurde im nativen Knorpel -9,31-mal logFC weniger stark ausgebildet.

Hemmend wirkt das aus dem Gen FRMD7 gebildete Protein FERM domain containing 7 auf die Proteinbildung. Im Vergleich nativer Knorpel zu Chondrozyten mit FCS im Kulturmedium wurde es -9,30-mal logFC schwächer exprimiert.

3.3.3. Knorpel- und Seneszenz-assoziierte Gene

Von den Seneszenzmarker-Genen (Tab.7) wurde in dieser Vergleichsgruppe folgende außerhalb der Top 20 regulierten Gene gefunden:

Aggrecan ist Hauptbestandteil in der ECM, beteiligt an der Chondrozytenentwicklung und der Kollagenfibrillen-Organisation und wurde mit 6,28-mal logFC stärker im nativen Knorpel als in der Zellkultur exprimiert.

Das Gen SIN3A codiert für das Protein SIN3 transcription regulator family member A. Neben der Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist dieses auch für die Hemmung der Apoptose mitverantwortlich. Des Weiteren fördert es denn Zellübergang der G2/M-Phase in der Mitose und die Trankription durch die RNS-Polymerase II. Es wurde 1,71-mal logFC stärker im nativen Knorpel, als in der Chondrozytenkultivierung mit FCS exprimiert.

SOX9, codierend für das Protein SRY-box transcription factor 9, wurde 3,45-mal logFC mehr im nativen Knorpel gebildet. Die Funktionsweise kann, je nach umgebendem Milieu, sehr unterschiedlich sein. Es kann den Wnt-Signalweg, die Chondrozytendifferenzierung, Teile des Immunsystems und die Apoptose hemmen. Darüber hinaus kann es den Aufbau und die Organisation der ECM, die Chondrozytendifferenzierung und -proliferation fördern. Außerdem wirkt es am Notch-Signalweg und den ERK1- und ERK2-Kaskaden mit.

SOX9 kann ebenso als Reaktion der Zelle auf mechanischen Stimulus, TGF- β oder IL-1 gebildet werden.

BMP6 ist an Entzündungs- und Immunreaktion beteiligt. Im nativen Knorpel wurde es 2,54-mal logFC häufiger exprimiert als in der FCS-haltigen Zellkultur. Es ist sowohl in osteoarthrotischem als auch gesundem Knorpel exprimiert.

Bone morphogenetic protein 2 (BMP2) wurde -2,04-mal logFC seltener im nativen Knorpel exprimiert. Es kann sowohl die Expression von Col2, ACAN und SOX9, als auch von Col10, einem Hypertrophymarker, erhöhen.

TIMP1 ist ein metallopeptidase inhibitor 1 und kann die Wirkung von MMPs und ADAMs hemmen. Es kann aber auch als Zelldifferenzierung und -apoptose regulierender Wachstumsfaktor wirken. Im nativen Knorpel wurde es -2,2217317-mal logFC schwächer synthetisiert, als in der Kultivierung mit FCS.

Das retinol binding protein 1 (RBP1) wurde mit einem logFC-Wert von -6,23 deutlich schwächer im nativen Knorpel, als in der Vergleichsgruppe exprimiert. Die Depletion des RBP1 führt zur Zellseneszenz und der Erhöhung der Expression von p21 und p16.

Die Matrixmetallopeptidase 1 (MMP1) spaltet Kollagene Typ I, II, III, VII und X. Im nativen Knorpel wurde dieses -7,5153748-mal logFC weniger stark exprimiert als in der Chondrozytenkultur mit FCS im Medium.

MMP13, Matrixmetallopeptidase 13, ist matrixdegenerativ wirksam, in dem es Fibronektin, Kollagene I, II, III, IV, X und XIV und Aggrekan abbaut. Darüber hinaus ist es für die embryonale Knochenentwicklung und Verknöcherung notwendig. Es wurde -8,93-mal logFC seltener im nativen Knorpel synthetisiert.


Knorpel vs. Chondrozyten + FCS

Zur Veranschaulichung der LogFC-Werte der relevanten Gene der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS sind diese Werte der 20 top-up (rot), der 20 top-down (grün) und der sieben seneszenz-relevanten Gene (blau) auf der Y-Achse eingetragen.

Tab. 9 Liste der 20 Top-up, der 20 Top-down regulierten und der differenziell exprimiertenSeneszenz-assoziierten Gene des Vergleichs "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS"inkl. Genname, logFC-Wert und, falls zutreffend, Funktionsgruppe (pro-inflammatorisch,
anti-inflammatorisch,
pro- apoptotisch,
anti-apoptotisch, chondroprotektiv,
chondrodegenerativ, pro-proliferativ, Entzündungsmediator) und Seneszenz-Assoziation

	Gen-Name	logFC	Funktionsgruppe	Seneszenz (J/N)
Top-up	C1QB	13,2821788	Entzündungsmediator	N
	LAG3	11,8847394	Entzündungsmediator	N
	SOD3	11,8319595	Chondroprotektiv	N

	TYROBP	11,4905795	Entzündungsmediator,	Ν
			pro-apoptotisch,	
			pro-inflammatorisch	
	LOC100061154	11,0196322		N
	CILP	10,837618	Chondrodegenerativ	J
	ACP5	10,8323499		Ν
	C1QC	10,7327087	Entzündungsmediator	Ν
	AMTN	10,6397108	Chondroprotektiv	Ν
	LOC100630171	10,5140627	Entzündungsmediator	N
	LOC100071548	10,4843191	Entzündungsmediator	N
	CD163	10,33756	Pro-inflammatorisch	N
	CHAD	10,2061496	Chondroprotektiv	N
	PEBP4	10,1809003	Anti-apoptotisch	N
	CTSC	9,9849745	Pro-apoptotisch	N
	CYTL1	9,7077273	Chondroprotektiv	Ν
	GIMAP6	9,6049384		Ν
	ILT11A	9,5141365	Entzündungsmediator	Ν
	LOC100068926	9,4997688		Ν
	STRA6	9,4690247		Ν
	ANGPT1	-10,9066819	Anti-inflammatorisch,	Ν
			Entzündungsmediator	
	NCAPG	-10,8733458	Pro-proliferativ	N
	CDK1	-10,4347058	Pro-proliferativ	N
	CENPI	-10,1232586	Pro-proliferativ	N
ЧN	LOC100067869	-9,909201		N
Top-dov	ANKRD1	-9,7972225	Entzündungsmediator,	N
			pro-apoptotisch	
	CSTA	-9,7796074		N
	CDT1	-9,7489111	Pro-proliferativ	Ν
	ASPM	-9,7485976	Pro-proliferativ	N
	ECT2	-9,6557773	Pro-apoptotisch	N
	KIF11	-9,6496472	Pro-proliferativ	Ν

	CTHRC1	-9,6323574	Chondroprotektiv	N
	MPDZ	-9,6033739		N
	ERGIC2	-9,5978675		N
	PI3	-9,5797682	Entzündungsmediator	N
	CCNB1	-9,4981809	Pro-proliferativ	N
	CXCL6	-9,4399639	Pro-inflammatorisch,	N
			Entzündungsmediator	
	NUSAP1	-9,3935334	Pro-proliferativ	N
	TROAP	-9,3093826		N
	FRMD7	-9,2918053		N
ar	ACAN	6,2802435	Chondroprotektiv	N
uzr	SOX9	3,494773	Chondroprotektiv,	N
szel			Pro-proliferativ	
orpel - und Sene ker	SIN3A	1,7124319	Entzündungsmediator	J
	TIMP1	-2,2217317	Chondroprotektiv	J
	RBP1	-6,2292018	Chondroprotektiv	J
	MMP1	-7,5153748	Chondrodegenerativ	J
Knc	MMP13	-8,9262719	Chondrodegenerativ	J

3.4. Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS

In dieser Kondition wurde die Genexpression von nativen Knorpelproben im Vergleich zu Chondrozyten ohne FCS im Kulturmedium ausgewertet (Abb.4. LogFC der relevanten Gene in der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS). Die exakten logFC-Werte und die Gen-Nummern sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

3.4.1. **Top-up regulierte Gene**

Das Gen C1QB (complement C1q B chain) wurde logFC 13,52-mal stärker exprimiert im nativen Knorpel. Es stellt die erste Komponente des Serumkomplementsystems und Teil des angeborenen Immunsystems dar.

MHC class II DR α chain ist an der Ausbildung von MHC-Klasse-II-Proteinkomplexen und der adaptiven Immunantwort beteiligt. Im nativen

Knorpel wurde es logFC 12,20-mal verstärkt exprimiert.

Im Vergleich wurde das Protein membrane-spanning 4-domains subfamily A member 6A (LOC100061154) logFC 11,15-mal stärker im nativen Knorpel ausgebildet. Es stellt einen integralen Bestandteil der Membran dar.

Der ankyrin repeat domain 37 (ANKRD37) wurde logFC 11,03-mal mehr im nativen Knorpel exprimiert. Es hemmt die IL-12 und -13-Bildung, fördert die IL-10, -1β , -6 und TNF-Produktion. Außerdem ist von Bedeutung bei der angeborenen Immunantwort und der Förderung der MAPK-Kaskade.

AMTN (Amelotin) wurde logFC 11,03-mal stärker im nativen Knorpel als in den Chondorzyten exprimiert und ist ein Promotor der Kalziumphosphatmineralisierung.

Die gleiche Funktion wie C1QB hat das verwandte Gen C1QC (complement C1q C chain). Dieses wurde logFC 11,02-mal schwächer ausgebildet.

Das Cartilage intermediate layer protein (CILP) ist verantwortlich für die Hemmung des IGF-Rezeptor-Signalwegs. CILP wird logFC 10,70-mal stärker im nativen Knorpel exprimiert.

Für die Regulation der Produktion von VEGF, TGF und Wnt-Signalwegs mitverantwortlich ist das NDRG family member 2-Protein (NDRG2). Außerdem hemmt es die ERK1- und ERK2-Kaskade und die Zytokinproduktion. NDRG2 wird im nativen Knorpel logFC 10,70-mal weniger synthetisiert.

Das Gen MARCO codiert für das Protein macrophage receptor with collagenous structure, welches an der apoptotischen Zellbeseitigung beteiligt ist. Es entsteht logFC 10,46-mal öfters im nativen Knorpel.

An der Rezeptor-vermittelten-Endozytose und der Phagozytose mitbeteiligt ist das Gen MSR1, welches für den macrophage scavenger receptor 1 codiert. Im nativen Knorpel wurde es logFC 10,46-mal stärker exprimiert.

Das Molekül CD163 wird logFC 10,41-mal mehr im nativen Knorpel gefördert. Es ist an der Aktivität des Scavenger-Rezeptors beteiligt.

Als zelluläre Antwort auf INF- γ , TNF und IL-1 ist das C-C motif chemokine (LOC100630171) vorhanden. Des Weiteren ist es an Entzündungsreaktionen, der

Förderung der ERK1- und ERK2-Kaskade und der GTPase-Aktivität beteiligt. Im nativen Knorpel wurde das Gen im Vergleich zu den kultivierten Chondrozyten logFC 10,32-mal stärker exprimiert.

Eine Rolle in der Regulierung des Wachstums und der Proliferation von Chondrozyten spielt möglicherweise Chondroadherin (CHAD). Es fördert die Bindung von Osteoblasten, Fibroblasten und Chondrozyten. Es wurde logFC 10,13-mal mehr im nativen Knorpel gebildet.

Das Gen ILT11A wurde im nativen Knorpel logFC 10,05-mal vermehrt exprimiert. Es wurde keine Funktion in der Onlinesuche gefunden.

Das SOD3-Gen ist ein Schutzmechanismus des Extrazellularraums vor toxischen Einflüssen durch reaktive Sauerstoffteile. Es wird logFC 10,04-mal stärker exprimiert im nativen Knorpel, als in den ohne FCS kultivierten Chondrozyten.

An der Knorpel-Homöostase und der Chondrozytendifferenzierung beteiligt ist das Protein cytokine like 1 (CYTL1), welches im nativen Knorpel logFC 10,04-mal mehr gebildet wird.

CLEC12A codiert für das Protein C-type lectin domain family 12 member A. Im nativen Knorpel wurde es logFC 10,04-mal gebildet als in den kultivierten Chondrozyten. Es stellt einen inhibitorischen Signalweg für natürliche Killerzellen dar und hemmt die Aktivität von Signalrezeptoren.

GIMAP6 (GTPase, IMAP family member 6) wurde im logFC 9,86-stärker exprimiert. Es ist für die GTPase-Bindung mitverantwortlich.

Für das Gen mit der Nummer ENSECAG00000024882 (logFC 9,77) wurde während der Onlinesuche weder ein Genname noch eine Funktion gefunden.

Das Protein lymphocyte activating 3 wird von dem Gen LAG3 codiert. Im nativen Knorpel wurde es logFC 9,76-mal stärker ausgebildet, als in den ohne FCS kultivierten Chondrozyten. LAG3 ist Teil der adaptiven Immunantwort, senkt die IL-2-Produktion und fördert die Zytotoxizität, welche durch natürliche Killerzellen vermittelt wird.

3.4.2. **Top-down regulierte Gene**

Das non-SMC condensin I complex subunit G Protein wurde in dieser Vergelichsgruppe am stärksten herrunterreguliert. Es wurde logFC -10,50-mal schwächer im nativen Knorpel, als in den kultivierten Chondrozyten ohne FCS-Zusatz im Kulturmedium ausgebildet. NCAPG ist bei der Zellteilung von Bedeutung.

CDK1 codiert für die cyclin dependent kinase 1 und wurde im nativen Knorpel logFC -10,12-mal schwächer exprimiert. Diese Kinase ist für den Beginn der Mitose zuständig. Sie fördert den Übergang von der Phase G2 in die M-Phase und den G1-S-Übergang des Zellzyklus.

Für das Gen TROAP, welches logFC -10,07 schwächer ausgebildet wurde im nativen Knorpel, wurde keine Funktion gefunden.

Das Protein solute carrier family 1 member 2 (SLC1A2) ist ein Anionen-Transmembran-Transporter für L-Glutamat im symport mit Natrium. Die Expression war im nativen Knorpel logFC -10,05-mal weniger.

Das C-X-C motif chemokine ligand 6 (CXCL6) wirkt in der Leukozyten- und Neutrophilen-Chemotaxis, Entzündungsreaktionen und humoraler antimikrobieller Immunantwort mit. Die Expression war im nativen Knorpel logFC -9,96-mal schwächer als in der Vergleichsgruppe.

Ein integraler Bestandteil der Membran und in Transportvesikel-Membranen ist das Protein carbonic anhydrase 4 (CA4). Im nativen Knorpel wurde es logFC -9,99-mal schwächer exprimiert.

Für die DNS-Replikation und für die Mitose notwendig ist das Gen CDT1, codierend für das chromatin licensing and DNA replication factor 1- Protein. Außerdem hilft es bei der Regulation am G1 / S-Übergang des Zellzyklus mit. Die Exprimierung im nativen Knorpel war logFC -9,99-mal tiefer.

Das Centromere Protein I, gebildet von dem CENPI-Gen, wurde im nativen Knorpel logFC -9,66-mal niedriger exprimiert. Es ist an dem mitotischen Zellzyklus und der Chromosomensegregation mit wirksam.

KIF11 ist ein Motorprotein, welches in mitotischen Zellen für die Spindelbildung und in nicht-mitotischen Zellen für den Transport von sekretorischen Proteinen aus dem Golgikomplex zur Zelloberfläche benötigt wird. Es wurde logFC -9,51-mal niedriger ausgebildet im nativen Knorpel.

Im Vergleich zu den kultivierten Chondrozyten wurde im nativen Knorpel das Gen ECT2 logFC -9,50-mal schwächer exprimiert. Das epithelial cell transforming 2 Protein ist an apoptotischen Prozessen, der GTPase-Aktivität, dem Proteintransport und der I-*k*B-Kinase/NF-*k*B positiv beteiligt.

LogFC -9,41-mal tiefer wurde das Gen RRM2 im nativen Knorpel exprimiert. Das Protein ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 ist an der Desoxyribonukleotid-Biosyntheseprozess und der Oxidoreduktase-Aktivität beteiligt.

Für die Zelladhäsion mit verantwortlich ist das Protein multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component, welches logFC -9,40-mal schwächer im nativen Knorpel ausgebildet wurde.

Die Matrix Metallopeptidase 13 (MMP13) wurde im nativen Knorpel logFC -9,35-mal tiefer exprimiert als in der Vergleichsgruppe. MMP13 hat Metalloendopeptidase- und Metallopeptidase-Aktivität.

Die Aurora kinase B (AURKB) wurde im nativen Knorpel logFC -9,34-mal schwächer ausgebildet. AURKB ist an der Histon H3-S28 Phosphorylierung, der negativen Regulation der Proteinbildung und von apoptotische Prozessen der B-Zellen beteiligt. Außerdem fördert es die Regulierung der Telomerase-Aktivität und der Telomererhaltung durch die Telomerase.

Im mitotische Zellzyklus mitbeteiligt ist CCNB1 (cyclin B1). Es greift positiv am G2-M-Übergang ein. Im nativen Knorpel wurde es im Vergleich zu den kultivierten Chondrozyten logFC -9,30-mal tiefer exprimiert.

Aufgrund der Etablierung der mitotischen Spindellokalisation ist NUSAP1, das nucleolar and spindle associated protein1, ebenfalls an der mitotischen Zellteilung beteiligt. Es wurde logFC -9,22-mal schwächer ausgebildet.

LogFC -9,22-mal tiefer gebildet wurde ERGIC2. Es spielt eine mögliche Rolle bei Transportvorgängen zwischen endoplasmatischen Reticulum und dem Golgi. RFC4 codiert für das Protein replication factor C subunit 4. Dieses DNS-Reparatur, der DNS-Polymerase-Aktivität und der DNS-Replikation beteiligt. Im nativen Knorpel wurde es logFC -9,19-mal seltener exprimiert.

Das Lipopolysaccharide binding protein ist ein Akut-Phase-Protein, wird als Abwehrmechanismus gegen grampositive und gramnegative Bakterien gebildet und Teil des angeborenen Immunsystems. Des Weiteren spielt es eine Rolle in der Makrophagenaktivierung und der Leukozyten- und Neutrophilen-Chemotaxis. Es hemmt die TNF-Produktion und fördert die IL-6 und IL-8-Produktion. LBP wurde im nativen Knorpel logFC -9,12-mal seltener exprimiert.

Die phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1) wurde logFC -9,11-mal seltener gebildet. PSAT1 hat katalytische Aktivität und katalysiert die Umwandlung von 3-Phosphohydroxypyruvat zu Phosphoserin und von 3-Hydroxy-2-oxo-4phosphonooxybutanoat zu Phosphohydroxythreonin.

3.4.3. Knorpel-, und Seneszenz-assoziierte Gene

MRC1 codiert für mannose receptor C-type 1 Protein, welches im nativen Knorpel 9,34-mal logFC mehr exprimiert wurde, als in der Vergleichsgruppe. Es wird u.a. als Reaktion auf INF- γ und IL-4 gebildet.

Je nach umgebendem Milieu hat SOX9 verschiedene Funktionen. Es ist an der ERK1- und ERK2-Kaskade, der Organisation der ECM und des Chondrozytenwachstums beteiligt. Es kann eine hemmende Wirkung auf den WNT-Signalweg, die Apoptose, die Chondrozytendifferenzierung und die Knochenmineralisierung haben. Außerdem wird es als Zellantwort auf TGF- β , IL-1 und mechanische Stimuli vermehrt exprimiert. Dementgegen kann SOX9 die Transkription durch RNS-Polymerase II, die Chondrozytenproliferation und -differenzierung fördern. In diesem Vergleich wurde es 2,61-mal logFC intensiver im nativen Knorpel exprimiert.

HMGB1 codiert für ein redoxsensitives Protein, welches für die DNS-Reparatur essenzial ist. Außerdem ist es sehr stark an der Koordination und Ausprägung des adaptiven und des angeborenen Immunsystems beteiligt, indem es die immunologische Toleranz fördert und als DAMP-Molekül im Gewebe die Immunreaktion verstärkt. Es vermittelt die Freisetzung diverser, u.a. entzündlicher und immunologischer, Chemokine und Zytokine, wie bspw. TNF, INF- γ , IL-1, IL-6, IL-8 und CXCL10. Des Weiteren wird die ERK1- und ERK2-Kaskade und die NIK/NF-*k*B-Signalisierung gefördert. Im nativen Knorpel wurde es, im Vergleich zur Kultivierung der Chondrozyten mit FCS , -1,04-mal logFC schwächer exprimiert.

Die Matrixmetallopeptidase 1 wurde im nativen Knorpel -7,71-mal logFC seltener gebildet, als in der Vergleichsgruppe. Es spaltet Kollagene Typ I, II, III, VII und X.

Mit einem logFC-Wert von -8,78 wurde das Gen PI3, codierend für peptidase inhibitor 3, deutlich schwächer im nativen Knorpel exprimiert. Es hemmt die Peptidase-Aktivität und ist an der Modulierung der Immunantwort beteiligt.

MMP13 wurde im nativen Knorpel -9,35-mal logFC tiefer synthetisiert, als in der Chondrozytenkultur inkl. FCS im Kulturmedium. Dieses spaltet, ähnlich wie MMP1, Kollagen Typ I, II, III und X, aber auch Kollagen Typ IV und XIV. Darüber hinaus ist es bedeutend für den Abbau von ECM-Komponenten, wie Fibronektin, Aggrekan oder Tenascin C (TNC).



Abb. 5. LogFC der relevanten Gene in der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS

Zur Veranschaulichung der LogFC-Werte der relevanten Gene der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS sind diese Werte der 20 top-up (rot), der 20 top-down (grün) und der sechs seneszenz-relevanten Gene (blau) auf der Y-Achse eingetragen.

Tab. 10 Liste der 20 Top-up, der 20 Top-down regulierten und der differenziell exprimiertenSeneszenz-assoziierten Gene des Vergleichs "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS"inkl. Genname, logFC-Wert und, falls zutreffend, Funktionsgruppe (pro-inflammatorisch,
anti-inflammatorisch, pro- apoptotisch, anti-apoptotisch, chondroprotektiv,
chondrodegenerativ, pro-proliferativ, Entzündungsmediator) und Seneszenz-Assoziation

	Gen-Name	logFC	Funktionsgruppe	Seneszenz (J/N)
	C1QB	13,5238392	Entzündungsmediator	Ν
	DRA	12,1896897	Entzündungsmediator	Ν
	LOC100061154	11,1522598		Ν
	ANKRD37	11,034714	Entzündungsmediator	Ν
	AMTN	11,0297233		Ν
	C1QC	11,0221817	Entzündungsmediator	Ν
	CILP	10,6956231	Chondrodegenerativ	J
	NDRG2	10,6937562	Pro-proliferativ	Ν
٩	MARCO	10,4644004	Pro-apoptotisch	Ν
n-dc	MSR1	10,4242511		Ν
Ĕ	CD163	10,4120423	Pro-inflammatorisch	Ν
	LOC100630171	10,3161344		Ν
	CHAD	10,1252556	Chondroprotektiv	Ν
	ILT11A	10,0455896	Entzündungsmediator	Ν
	SOD3	10,0448353	Chondroprotektiv	Ν
	CYTL1	10,0413396	Chondroprotektiv	Ν
	CLEC12A	10,0374153		Ν
	GIMAP6	9,8552027		Ν
	ENSECAG00000	9,767998		Ν
	024882			

	LAG3	9,7594807	Entzündungsmediator	Ν
	NCAPG	-10,5044397	Pro-proliferativ	Ν
	CDK1	-10,1710384	Pro-proliferativ	Ν
	TROAP	-10,0694418		Ν
	SLC1A2	-10,04663		Ν
	CXCL6	-9,9628154	Pro-inflammatorisch	Ν
	CA4	-9,8972132		Ν
	CDT1	-9,8971749	Pro-proliferativ	Ν
	CENPI	-9,6574771	Pro-proliferativ	Ν
_	KIF11	-9,512191	Pro-proliferativ	Ν
lowr	ECT2	-9,4981827	Pro-inflammatorisch	Ν
p-do	RRM2	-9,4143069		Ν
Ĕ	MPDZ	-9,4037954		Ν
	MMP13	-9,3522601	Chondrodegenerativ	J
	AURKB	-9,3387276	Anti-apoptotisch	Ν
	CCNB1	-9,2749448	Pro-proliferativ	Ν
	NUSAP1	-9,2236499	Pro-proliferativ	Ν
	ERGIC2	-9,2208485		Ν
	RFC4	-9,187444	Anti-apoptotisch	Ν
	LBP	-9,1203723	Pro-inflammatorisch	Ν
	PSAT1	-9,1142902		Ν
-z	MRC1	9,3407865		J
I- und Seneszen marker	ACAN	6,2252878	Chondroprotektiv	Ν
	SOX9	2,6071524	Chondroprotektiv,	Ν
			Pro-proliferativ	
	HMGB1	-1,0403239	Entzündungsmediator	J
orpe	MMP1	-7,712026	Chondrodegenerativ	J
Knc	PI3	-8,7811026	Entzündungsmediator	J

3.5. Chondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS

In der folgenden Kondition wurde die Genexpression von der Kultivierung Chondrozyten ohne FCS zu Chondrozyten mit FCS verglichen. (Abb.5. LogFC der relevanten Gene in der Kondition Chondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS). Die exakten logFC-Werte und die Gen-Nummern sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

3.5.1. Top-up regulierte Gene

Vanin 1 (VNN1) wurde von den Genen mit einem logFC von 2,91 am stärksten hochreguliert in der Kultivierung ohne FCS im Vergleich zu der Kultivierung mit FCS. VNN1 ist Hydrolase-aktiv, die auf Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen wirkt. Des Weiteren ist es an Stoffwechselprozess von Stickstoffverbindungen beteiligt.

Mit einem logFC-Wert von 2,59 wurde COL11A2 bei der Kultivierung ohne FCS-Zusatz stärker exprimiert. Collagen type XI α 2 chain ist ein Strukturbestandteil der ECM und begünstigt die Chondrozyten-Differenzierung und Kollagenfibrillen-Organisation.

SCD codiert für stearoyl-CoA desaturase, einem einfach-ungesättigten Fettsäure-Biosyntheseprozessor. Es wird als Reaktion auf Fettsäuren synthetisiert. Ohne FCS wurde SCD 2,58-mal logFC verstärkt gebildet.

Glutaminyl-peptide cyclotransferase (QPCT) kann mittels seiner Transferase-Aktivität Acylgruppen übertragen. QPCT wurde ohne FCS 2,50-mal logFC mehr exprimiert.

2,45-mal logFC häufiger wurde SLC6A9 exprimiert. Der solute carrier family 6 member 9 ist ein Aminosäure:Natrium-Symporter und kann Glycin durch die Membran transportieren.

Der Nerve growth factor wird von dem Gen NGF codiert. Er reguliert die neuronalen apoptotischen Prozesse negativ und kann als Transmembran-Rezeptor für die Protein-Tyrosin-Kinase wirken. NGF wird 2,32-mal logFC häufiger gebildet.

An der Organisation der ECM beteiligt ist MIA SH3 domain containing (MIA). Dieses wurde ohne FCS 1,87-mal logFC öfter von den Chondrozyten exprimiert.

Das Gen GCH1 wurde 1,83-mal logFC häufiger produziert. Die GTP cyclohydrolase 1 kann an der Dopaminsynthese beteiligt sein. Außerdem kann es die Schmerzempfindlichkeit und die -persistenz beeinflussen.

Für das Gen mit der Nummer ENSECAG00000027666 wurden keine Angaben gefunden. Dieses wurde 1,8-mal logFC mehr in der Kultivierung ohne FCS gebildet.

Fibronectin 1 (FN1) wurde ohne FCS im Kulturmedium 1,79-mal logFC stärker von den Chondrozyten synthetisiert. FN1 wirkt an der Bindung von Chaperonen und Proteoglykanen mit. Neben der Akut-Phase-Reaktion regt es auch die Wundheilung und die Genexpression an. Die Sekretion von TGF- β wird außerdem gehemmt.

An der Chondrozytendifferenzierung mitwirksam ist der solute carrier family 39 member 14 (SLC39A14). Des Weiteren kommt es unterstützend bei der Regulation des G-Protein gekoppelten Rezeptor-Signalweges vor. SLC39A14 wurde ohne FCS 1,78-mal logFC mehr produziert.

OCIAD2 codiert für das Protein OCIA domain containing 2 und wird als Reaktion auf Bakterien vermehrt von den Zellen synthetisiert. In der Kondition kam es in der ersten Gruppe 1,69-mal logFC häufiger vor.

Ebenso wird das chromosome 1 C15orf48 homolog- Protein (C1H15orf48) bei Kontakt zu Bakterien in der Expression verstärkt. In der Kultivierung ohne FCS kam es 1,63-mal logFC häufiger vor als in der Kultivierung mit FCS.

Das Protein DENN domain containing 2D (DENND2D) wurde 1,60-mal logFC höher exprimiert nach der Kultivierung ohne FCS.

Das Gen MIR8995 wurde 1,53-mal logFC intensiver ohne FCS produziert. Es ist für die neutrophile Degranulation und die Regulation des Lipidstoffwechsels mit verantwortlich.

Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 5 (ITIH5) ist an Hyaluronsäure-Stoffwechselprozesses mit wirksam. Ohne FCS im Kulturmedium wurde ITIH5 1,49-mal logFC stärker exprimiert.

Die Retikulumstress-induzierte intrinsische Apoptose wird durch Synoviolin 1 (SYVN1) negativ beeinflusst. Überdies ist es am Weg der Protein-Ubiquitinierung beteiligt. Es wurde 1,46-mal logFC häufiger synthetisiert.

Das Gen RPN1 codiert für das Protein ribophorin I, welches an der Protein-Glykosylierung wirksam ist. Ohne FCS wurde es 1,42-mal logFC öfter produziert.

Der basic helix-loop-helix-family member e41 (BHLHE41) wurde 1,41-mal logFC intensiver exprimiert ohne FCS. BHLHE41 ist ein DNS-bindender Transkriptionsfaktor, der RNS-Polymerase 2-spezifisch wirkt. Des Weiteren reguliert es zirkadian die Genexpression.

SREBF2, das sterol regulatory element binding transcription factor 2-Protein, reguliert negative die Transkription durch RNS-Polymerase 2 und ist eine Zellantwort auf Low-Density-Lipoprotein-Partikel-Stimulus. Ohne FCS im kulturmedium der Chondrozyten wurde es 1,41-mal logFC stärker exprimiert.

3.5.2. Top-down regulierte Gene

Die nachfolgenden Gene wurden in der Vergleichskondition Kultivierung der Chondrozyten ohne FCS vs. Chondrozyten mit FCS in der ersten Gruppe am schwächsten exprimiert.

Interferon induced transmembrane protein 5 (IFITM5) wurde -5,44-mal logFC weniger häufig gebildet. Es ist an der Knochenmineralisierung und der Knochenmorphogenese beteiligt.

IGFBP2, das insulin like growth factor binding protein 2, bindet den IGF und reguliert den IGF-Rezeptor-Signalweg. Außerdem wird die Proliferation aktiver T-Zellen gefördert. Ohne FCS wurde IGFBP2 -3,35-mal logFC seltener exprimiert.

OGN wurde -3,01-mal logFC weniger synthetisiert. Osteoglycin führt in Verbindung mit TGF- β -1 oder TGF- β -2 zur Knochenbildung.

Die Genexpression wird zirkadian von inhibitor of DNA binding 3, HLH (ID3) beeinflusst. Darüber hinaus wirkt es in der Zelldifferenzierung und der negativen Regulierung der Transkription von RNS-Polymerase 2. ID3 wurde -2,77-mal logFC seltener ohne FCS produziert.

Chemotaxis und Genexpression wird von FGF7 (fibroblast growth factor 7) gefördert. Zusätzlich ist das Protein für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-Signalweg und -Bindung mit verantwortlich. In der ersten Gruppe dieses Vergleichs wurde FGF7 -2,60-mal logFC seltenere exprimiert.

-2,48-mal logFC niedriger wurde das Gen LOC100050637 synthetisiert. Interferon-induced transmembrane protein 3 wird als Abwehrreaktion auf Viren, als Antwort auf INF- α , INF- β oder INF- γ gebildet. Für das Gen mit der Nummer ENSECAG00000028911 wurden keine Angaben gefunden. Es wurde in diesem Vergleich -2,43-mal logFC seltener in der Kultivierung ohne FCS gebildet.

Für das Gen GLIPR1, welches für GLI pathogenesis related 1 codiert, wurde keine bei Equiden beschriebene Funktion gefunden. Im Humanbereich wurde die Beeinflussung des Lipidstoffwechsels und die Beteiligung an der neutrophilen Degranulation beschrieben. Es wurde ohne FCS von den Chondrozyten -2,13-mal logFC seltener exprimiert.

An der Signaltransduktion und der Hormontransduktion mitwirkend ist Adrenomedullin (ADM). Dieses wurde in der ersten Gruppe -2,12-mal logFC tiefer exprimiert.

Lumican (LUM) wurde -2,12-mal logFC seltener ohne FCS synthetisiert. LUM ist an der Proteinbildung, der Kollagenbildung, der Kollagenfibrillenorganisation mit wirksam und fördert die Produktion von TGF- β 1.

Das Gen RBP1 ist an der Lipidbindung und Prozessen der Retinsäure-Biosynthese. Es war -2,12-mal logFC niedriger in seiner Expression.

Haptoglobin (LOC100067869) ist ein Antioxidans, ist antibakteriell wirksam und spielt eine Rolle bei der Modulation vieler Aspekte der Akutphasereaktion. In der Kultivierung ohne FCS wurde es -2,11-mal logFC seltener ausgebildet.

Angiopiotin 1 (ANGPT1) kam in der Expression der ersten Gruppe -2,03-mal logFC seltener vor. ANGPT1 senkt die an der Immunantwort beteiligte Zytokinproduktion, regelt die TNF-Produktion und die I-*k*B-Kinase/NF-*k*B-Signalisierung.

Für die Organisation der ECM mit verantwortlich ist ECM2, das extracellular matrix protein 2, welches ohne FCS -1,97-mal logFC niedriger exprimiert wurde. ECM2 kommt darüber hinaus auch in der Kollagen-V-Bindung und der Zell-Substrat-Adhäsion vor.

Tetraspanin 8 (TSPAN8) kam -1,96-mal logFC seltener in der Kultivierung ohne FCS vor. Es ist an der Regulierung der Genexpression wirksam.

Der RNS-Transmembrantransporter SID1 transmembrane family member 2 (SIDT2) wurde -1,87 logFC weniger synthetisiert.

STK17B, die serine/threonine kinase 17b, wurde -1,87-mal logFC sporadischer produziert ohne FCS in dem Kulturmedium der Chondrozyten. Diese Kinase ist bei intrazellulärer Signaltransduktion mitwirksam und fördert apoptotischen Prozesse.

Als negativer Regulator des BMP-Signalwegs fungiert chordin like 1 (CHRDL1). Dieses wurde -1,86-mal logFC weniger häufig in der Kultur ohne FCS exprimiert. -1,86-mal logFC spärlicher war die Expression von EFFEMP1 ausgefallen. Das EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1 senkt die Chondrozytendifferenzierungsrate und bindet den epidermalen Wachstumsfaktor.

Tropomyosin 1 (TPM1) ist bei Muskelkontraktionen, der Organisation von Aktinfilamenten und bei der Aktinfilament-Bindung wirksam. In der Chondrozytenkultur ohne FCS im Medium war die Expression -1,78-mal logFC tiefer, als in der Chondrozytenkultur mit FCS als Zusatz.

3.5.3. Knorpel-, OA- und Seneszenz-assoziierte Gene

Im Zusammenhang mit Seneszenz wurde kein differential exprimiertes Gene in dieser Vergleichsgruppe gefunden.

Die Knorpelmarker ACAN (7,25 logFC) und SOX9 (0,88 logFC), welche beide stärker in der Kultivierung ohne FCS exprimiert wurden, und SUB1, welches -0,55-mal logFC schwächer exprimiert wurde.

Die genauen Funktionen für SOX9 und ACAN können aus den vorangegangenen Kapiteln entnommen werden.





Zur Veranschaulichung der LogFC-Werte der relevanten Gene der Kondition Chondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS sind diese Werte der 20 top-up (rot), der 20 top-down (grün) und der zwei seneszenz-relevanten Gene (blau) auf der Y-Achse eingetragen.

Tab. 11 Liste der 20 Top-up, der 20 Top-down regulierten und der differenziell exprimierten Seneszenz-assoziierten Gene des Vergleichs "Chondrozyten – FCS vs. Chondrozyten + FCS" inkl. logFC-Wert falls Genname, und, zutreffend, Funktionsgruppe anti-inflammatorisch, (pro-inflammatorisch, proapoptotisch, anti-apoptotisch, chondroprotektiv, chondrodegenerativ, pro-proliferativ, Entzündungsmediator) und Seneszenz-Assoziation

dn	Gen-Name	logFC	Funktionsgruppe	Seneszenz (J/N)
Top-	VNN1	2,9129605		Ν

	COL11A2	2,5866568	Chondroprotektiv	Ν
	SCD	2,5754525		Ν
	QPCT	2,499813		Ν
	SLC6A9	2,449865		Ν
	NGF	2,3187208	Pro-apoptotisch	Ν
	MIA	1,8728588	Chondroprotektiv	Ν
	GCH1	1,8281103		Ν
	ENSECAG0000002 7666	1,7982435		Ν
	FN1	1,7873849	Chondroprotektiv,	Ν
			Pro-inflammatorisch	
	SLC39A14	1,7813859	Chondroprotektiv	Ν
	OCIAD2	1,683241		Ν
	C1H15orf48	1,6327667		Ν
	DENND2D	1,5966292		Ν
	MIR8995	1,5258152		Ν
	ITIH5	1,4902104	Chondroprotektiv	Ν
	SYVN1	1,4640219	Anti-apoptotisch	Ν
	RPN1	1,4214215		Ν
	BHLHE41	1,4083783	Pro-proliferativ	Ν
	SREBF2	1,4069335		Ν
uwop-c	IFITM5	-5,4406581		Ν
	IGFBP2	-3,3504436	Anti-inflammatorisch	Ν
То	OGN	-3,0124111		Ν

	ID3	-2,7703713	Chondroprotektiv	Ν
	FGF7	-2,592969	Pro-inflammatorisch	J
	LOC100050637	-2,4766348		Ν
	ENSECAG000002	-2,4268315		Ν
	8911			
	GLIPR1	-2,1294839		Ν
	ADM	-2,1213441		Ν
	LUM	-2,1180557	Chondroprotektiv,	Ν
			Pro-proliferativ,	
			Pro-inflammatorisch	
	RBP1	-2,1155654	Chondroprotektiv	J
	LOC100067869	-2,112471		Ν
	ANGPT1	-2,0349226	Anti-inflammatorisch,	Ν
			Entzündungsmediator	
	ECM2	-1,9703898	Chondroprotektiv	Ν
	TSPAN8	-1,9640516		Ν
	SIDT2	-1,8716065		Ν
	STK17B	-1,8661073	Pro-apoptotisch	Ν
	CHRDL1	-1,8590763	Chondrodegenerativ	Ν
	EFEMP1	-1,8588525	Chondrodegenerativ	Ν
	TPM1	-1,7801737		Ν
orpel- und nesze nz-	SOX9	0,8812416	Chondroprotektiv, Pro-proliferativ	Ν
Sel L				

4. Diskussion

Der Vergleich nativen Knorpels mit Chondrozyten des gleichen Donors, welche in Monolayer Kultur mit und ohne FCS für sieben Tage kultiviert wurde zeigte, dass der Unterschied zwischen nativem Knorpel und Monolayer Kultur (1117 (ohne FCS) bzw. 1230 (mit FCS) differenziell exprimierte Gene) deutlicher war als zwischen Monolayer Kultur mit und ohne FCS (19 differenziell exprimierte Gene). Im Folgenden wird das Vorkommen der Gene entsprechend ihrer Funktionsgruppen diskutiert.

4.1. Physiologische Gene im gesunden Knorpel

Von den Genen, die zu den physiologischen Genen des Gelenkknorpels gehören, wurden zwei (BMP6, FGF2) im Nativen Knorpel, eins (BMP2) in der Kultur mit FCS-Zusatz und eins (SOX9) sowohl in der Monolayerkultur ohne FCS, als auch im Nativen Knorpel differentiell exprimiert.

Dies zeigt, dass die native Knorpelprobe die wenigsten Veränderungen aufweist.

Es gibt fünf Gene, deren Expression *in vivo* typischerweise mit einem gesunden Knorpel in Verbindung gebracht werden. Dies sind BMP, SOX9, TGF-ß, FGF und IGF1, welche für die Aufrechterhaltung der physiologischen Knorpelhomöostase und die Differenzierung der Chondrozyten hauptverantwortlich sind (Kwon et al. 2016, Zhang et al. 2019).

BMP2 kam in der Zellkultur mit FCS vermehrt vor, während **BMP6** vermehrt im nativen Knorpel vorkam.

Beide Gene können sowohl in physiologischem als auch OA-Knorpel gebildet werden (Branly et al. 2018, Kwon et al. 2016, Thielen et al. 2019). Allerdings ist BMP2 für die Expression von Col10, einem typischen Hypertrophiemarker, bekannt (Kwon et al. 2016). Da BMP2 aber auch die Expression von SOX9, Col2 und ACAN, typische Komponenten des gesunden Knorpels, fördert (Branly et al. 2018), kann das vermehrte Vorkommen in der Zellkultur mit FCS auch auf einen positiven Einfluss des FCS für die Zellen hinweisen. Diese Annahme passt mit den Erkenntnissen von Conboy et al. zusammen, die belegen, dass der FCS-Zusatz anti-inflammatorisch wirksam sein kann (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005, Conboy und Rando 2012). BMP6 ist für die Knochenbildung mitverantwortlich (Thielen et al. 2019), indem es während der enchondralen Ossifikation (EO) pro-hypertrophisch wirksam ist (Thielen et al. 2019). Da die Expression von BMP6 physiologisch mit dem Alter abnimmt (Thielen et al. 2019), lässt das gesteigerte Vorkommen in der nativen Knorpelprobe auf hypertrophisch Veränderten Knorpel hinweisen, wie es auch im Bild der OA und Seneszenz auftritt. Dies unterstütz die Überlegung, dass die Knorpelproben, obwohl makroskopisch unauffällig, aufgrund des Alters erste Veränderungen im Sinne von Seneszenz und OA aufweisen.

SOX9 wurde sowohl im Nativen Knorpel als auch in der Kultur ohne FCS (Vergleich der Kultivierungen mit FCS vs. ohne FCS) höher exprimiert. Dass die Expressionsrate von SOX9 sowohl im nativen Knorpel als auch in der Kultur erhöht ist, wurde auch von Lepage et al. (2021) publiziert, was darauf schließen lässt, dass Änderungen in der Expressionsrate von SOX9 aufgrund von Mediumzusätzen erfolgen könnte. Das in diesem Versuch verwendete Medium STEM MAX enthält zwar kein FCS, jedoch gibt es vom Hersteller keine definierten Supplemente. Dass in den Proben der Kultivierungen die chondroprotektiven Gene vermindert waren, unterstütz die Vermutung des Auftretens von Seneszenz.

Obwohl die Expressionsrate von SOX9 im Alter abnimmt (Zhang et al. 2019), war diese im nativen, alten Knorpel deutlich höher als in den *in vitro* Kultivierungen. Der LogFC-Wert für ein Gen ergibt sich aus dem Verhältnis des Wertes von beiden Vergleichsproben. Das bedeutet, dass ein positiver logFC von SOX9 im Vergleich nativer Knorpel vs. Kultur ohne/mit FCS ein Anstieg von SOX9 im nativen Knorpel sein kann, oder eine sehr starke Expressionshemmung in der Zellkultur. Eine mögliche Erklärung für den positiven logFC-Wert von SOX9 in dem nativen Knorpel könnte also eine verminderte Bildung in der Zellkultur aufgrund von Stress sein. Da die Expression von SOX9 bei Hypertrophie und Seneszenz vermindert ist (Rim et al. 2020), kann dies darauf schließen, dass die Spender-Knorpel gesünder waren, als bei dem Alter angenommen. Die vorgefundene Expressionsrate von SOX9 passt mit den Forschungsergebnissen aus Studien, die die essenzielle Funktion von SOX9 für die Knorpelhomöostase nennen (Zhang et al. 2019), überein. SOX9 kann des Weiteren die Expression von Col9

93

induzieren (Kwon et al. 2016), welches ebenfalls im nativen Knorpel gehäuft gebildet wurde.

Die Expression von **FGF2**, als **anti-apoptotisch** wirksames Gen (Kwon et al. 2016), war im nativen Knorpel höher als in beiden Zellkulturen mit und ohne FCS.

Wie für alle Zellen, herrschen auch für Chondrozyten *in vivo* optimale Gegebenheiten, um ihre physiologische Gensynthese und Mitoserate aufrecht zu erhalten. Dafür verantwortlich ist die Knorpelhomöostase, ein feinabgestimmtes Zusammenspiel aus degradierenden und synthetisierenden Faktoren (Bolduc et al. 2019, Zhao et al. 2020). Die Hauptregulatoren dieses Mechanismuses sind die Chondrozyten selbst (Aigner et al. 2007). Nur gesunde, phänotypisch unveränderte Chondrozyten können diese Aufgabe erfüllen und die Homöostase im Gleichgewicht halten. Demnach sollten im nativen Knorpel vor allem Gene der Funktionsgruppe anti-inflammatorisch und chondroprotektiv in großer Zahl exprimiert werden.

Pro-inflammatorisch, anti-apoptotisch und chondrodegenerative Gene sollten im Vergleich zu den beiden Zellkulturen nur in geringem Ausmaß im nativen Knorpel vorliegen (Zhang et al. 2019).

4.2. Pro-Proliferative Funktionsgruppe

Im Vergleich der nativen Knorpel Proben mit Chondrozyten aus der Monolayer-Kultur mit FCS (drei Gene - SUB1, LUM, ASPM) und ohne FCS (ein Gen - BHLHE41) wurden Fünf Gene, die der Funktionsgruppe **pro-proliferativ** zugeordnet werden können differentiell exprimiert. Sieben weitere Gene (NUSAP1, CCNB1, KIF11, CENPI, CDT1, CDK1, NCAPG) wurden sowohl in dem Monolayer mit und ohne FCS stärker als im nativen Knorpel exprimiert. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Kultivierung einen großen Stressfaktor für die Chondrozyten darstellt. Auf den Stress reagieren die Zellen mit Anstieg der Zellteilung (Halliwell 2014).

Die **Zellteilung** ist im gesunden Knorpel auf einem sehr geringen Niveau, da Knorpelzellen eine sehr geringe pro-proliferative Aktivität haben (Aigner et al. 2007, Bolduc et al. 2019). Dahingehend sollten in den Nativen Knorpelproben niedrig sein. In der Zellkultur, unabhängig vom verwendeten Medium, sollten diese Gene, als Stressantwort der Knorpelzellen, vermehrt exprimiert werden.

4.3. Funktionsgruppe der Apoptose

Zwei Gene (ANGPT1, IGFBP2), welche der Funktionsgruppe **anti-inflammatorisch** zugeordnet werden konnten, wurden in den Vergleichen der Monolayerkultur mit FCS sowohl im Vergleich zu der nativen Knorpelprobe, als auch im Vergleich zu der Monolayerkultur ohne FCS des Donors differentiell exprimiert. Drei weitere Gene (SYVN1, AURKB, RFC4) dieser Funktionsgruppe wurden in der Zellkultur ohne FCS vergleichend zur nativen Knorpelprobe verstärkt exprimiert. Dies lässt darauf schließen, dass die Knorpelproben von gesunden Donoren kamen, die keine Veränderungen im Sinne von OA oder Seneszenz aufwiesen.

Im Vergleich der Gruppen nativer Knorpel (drei Gene - TYROBP, CTSC, MARCO) vs. Chondrozyten mit FCS (drei Gene - ANKRD1, ECT2, STK17B) und ohne FCS (zwei Gene - NGF, ECT2) wurden acht Gene der **pro-apoptotischen** Funktionsgruppe überwiegend des Donors exprimiert. ECT2 wurde im Vergleich der beiden Zellkulturen in der Zellkultur mit FCS verstärkt gefunden.

Die erhöhte Expression dieser Gengruppe im nativen Knorpel war aufgrund des geriatrischen Alters der Knorpelspender zu erwarten. Ebenso war mit einem Anstieg der Genexpression in der Zellkultur ohne FCS zu rechnen, wobei ECT2 zwar ohne FCS im Vergleich zu der Expressionsrate im nativen Knorpel verstärkt gebildet wurde, aber im Vergleich zu der Rate in der Kultur mit FCS seltener. Dies deutet daraufhin, dass FCS in der Zellkultur einen geringeren Einfluss auf die apoptotischen Gene hat, als erwartet.

In der Zellkultur mit FCS wurden zudem deutlich mehr pro-proliferative Gene exprimiert als ohne FCS. Dies kann als Versuch der Zellen übermäßige Apoptose zu kompensieren hindeuten (Aigner et al. 2007). Die Apoptose entsteht aufgrund des Stresses der Zellen während der Kultivierung. Ein Anstieg in der Kultur mit FCS spricht daher für einen positiven Einfluss des FCS. Andererseits neigen Chondrozyten bei übermäßiger Proliferation zur hypertrophen Dedifferenzierung, was wiederum gegen die positive Wirkung des FCS spricht und die Ausbildung von OA und Seneszenz unterstützt (Endisha et al. 2018).

4.4. Hypertrophie

Im Vergleich der beiden Monolayerkulturen zu der nativen Knorpelprobe des Donors wurde **Aggrekan** im nativen Knorpel stärker als in beiden Zellkulturen exprimiert.

Dies spricht gegen Hypertrophie der Knorpelproben, da Aggrekan bei Hypertrophie vermindert gebildet wird (Wuest et al. 2018). Es kann zudem der Funktionsgruppe Chondroprotektiv zugeordnet werden, da es Hyaluronsäure in der ECM binden kann und eine essenzielle Komponente der Proteoglykan-Gruppe im gesunden Knorpel ist (Thielen et al. 2019). Zu bedenken ist, dass Hypertrophie und Seneszenz nicht mit einem festen Set an Genen und deren Veränderungen verknüpft. Daher kann eine Hypertrophie nicht ausgeschlossen werden, zumal die Expression von ACAN am Anfang von Hypertrophie erhöht ist (Singh et al. 2019). Erst bei Fortschreiten von OA kommt es zur Runterregulation (Wuest et al. 2018).

Beim Vergleichen der Aggrekan-Expresssionswerte in den beiden Monolayer-Kulturen wurde es vermehrt in der Kultur ohne FCS gefunden.

Dies kann auf den Anfang von Hypertrophie in der Zellkultur hinweisen. Daraus schließend kann man davon ausgehen, dass durch die Kultivierung eine Hypertrophie der Chondrozyten eingeleitet wird. Diesen Schluss aufgrund eines Gens zu ziehen, ist aber schwierig, da Hypertrophie nicht anhand eines Gens festgemacht werden kann. Typische Hypertrophiegene sind Col1, Col10, RUNX2, MMP13 und Versikan (VCAN) (Branly et al. 2018, Fisch et al. 2018, Rim et al. 2020, Wuest et al. 2018), welche bei hypertrophischen Veränderungen in ihrer Expression hochreguliert werden. Ebenfalls auf Hypertrophie hinweisend ist die Herrunterregulierung der Expression von Col2, SOX9 und ACAN (Ma et al. 2013, Rim et al. 2020, Wuest et al. 2018). Es ist aber zu beachten, dass es kein festes Set an Genen gibt, welches Hypertrophie anzeigt, sondern immer das Zusammenspiel von phänotypischen Veränderungen und Genexpressionsveränderungen hin- bzw. beweisend ist (Rim et al. 2020). Um das Ausmaß von Dedifferenzierung von Chondrozyten in der Zellkultur zu bestimmen, wird

deswegen die Relation von ACAN : VCAN und Col2 : Col1 genutzt. Ein Wert von unter

eins steht für Dedifferenzierung der Knorpelzellen (Charlier et al. 2019). Am Anfang der Hypertrophie steht allerdings immer der Anstieg von physiologischen Knorpelgenen (Col2, SOX9, ACAN) in Kombination mit dem Anstieg der RUNX2-Expression (Singh et al. 2019).

Die Hypertrophie der Knorpelzellen ist während der enchondralen Ossifikation (EO) im Bereich der Wachstumsplatte von Knochen ein physiologisch *in vivo* ablaufender Prozess, kommt aber im gesunden adulten Knorpel nicht vor (Rim et al. 2020). Die pathologische hypertrophe Dedifferenzierung bei adulten Knorpelzellen ist von der physiologischen zu unterscheiden, und wird nach Verletzungen oder bei Entzündungen aktiviert (Rim et al. 2020). Die dafür zuständigen Signalwege sind der Wnt/TGF- β -, ERK1/2-, Notch-, p38MAPK- und/oder NF-*k*B-Signalweg (Charlier et al. 2019, Yao und Wang 2020).

Gene, die von den hypertrophischen Zellen exprimiert werden, führen zu einer Mineralisierung und folglich zu einer Verkalkung des umliegenden Gewebes (Rim et al. 2020). Dadurch wird die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen abgeschnitten und diese werden apoptotisch (Rim et al. 2020). In den zurückbleibenden "Löchern" können dann neue Blutgefäße aus der Tiefe ein sprossen (Rim et al. 2020). Den gleichen Ablauf gibt es auch bei der Entstehung von OA. Die hierbei am Anfang stehende Hypertrophie wird als pathologisch angesehen und entsteht an Stellen des Gelenkknorpels, die übermäßiger Belastung ausgesetzt sind. Durch das Versteifen des Knorpels in diesem Bereich in Folge der Mineralisierung und Verkalkung, sind betroffene Stellen anfälliger für weitere Fibrillationen (Rim et al. 2020). Die dabei exprimierten Gene entsprechen denen, während der EO (Rim et al. 2020). Auch Charlier et al. (2019) beschreiben, dass bei experimentell induzierter OA die in vivo beobachtete Genexpression die gleiche ist, wie bei hypertropher Dedifferenzierung von Chondrozyten. Daher kann man sagen, dass bei der Kultivierung beobachtete Hypertrophiemarker für die Ausbildung eines osteoarthrotischen Knorpelzelltyps in der Zellkultur steht (Charlier et al. 2019, Lepage et al. 2021).

4.5. Dedifferenzierung – Funktiontionsgruppe Chondrozytenprotektiv/degenerativ

Im Vergleich der Zellkulturen mit FCS und ohne FCS mit den nativen Knorpelproben, wurden in der Zellkultur mit FCS vier Gene (EFEMP1, CHRDL1, MMP13, MMP1) der Funktionsgruppe **chondrodegenerativ** differentiell exprimiert vor. Alle vier dieser Gene wurden im Vergleich zwischen den beiden Monolayern in der Kultur mit FCS stärker exprimiert, als in der Kultivierung ohne FCS. Ein Gen (CILP) wurde in den nativen Knorpelproben mehr als in den Monolayern gefunden. Dies lässt auf einen großen Stressorenimpakt durch die Kultivierung und die dafür notwendige Verarbeitung auf die Chondrozyten schleißen. Auf diesen negativen Einfluss reagieren die Zellen mit einem anstieg an katabolen Genen, wie es auch in der Literatur beschrieben wurde (Bolduc et al. 2019).

Das verstärkte Vorkommen von CILP in der nativen Probe lässt auf eine beeinträchtige Matrixreparaturkapazität der Knorpelzellen schließen, da dieses bei erhöhter Expression die Chondrozyten im Wachstum hemmt. Mit einem gesteigerten Vorkommen ist bei OA und Seneszenz zu rechnen.

Die vier in der Zellkultur vermehrt vorkommende Gene lassen auf Veränderungen der Chondrozyten im Sinne von OA und Seneszenz schließen, da ihre gesteigerte Expression Marker hierfür sind (Rim et al. 2020, Thielen et al. 2019). Ihre gesteigerte Expression mit FCS spricht gegen einen positiven Einfluss von FCS auf den kulturbedingten Stress bzw. Abmilderung der negativen Einflüsse für die Knorpelzellen.

Diese Schlussfolgerung ist nicht mit den Ergebnissen von Carlson et al. (2007) und Conboy et al. (2005) in Einklang, welche publizierten, dass die Imitierung eines fetalen Milieus bzw. der Zusatz von Komponenten aus dem fetalen Milieu einen zellprotektiven Effekt haben kann (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005). Die erhöhte Expression von MMP13, als Schlüsselenzym des Knorpelmatrixverlust (Bolduc et al. 2019), ist als Reaktion der Zellen auf den Stress der Kultivierung zu erwarten gewesen. Rim et al. (2020) publizierten zudem, dass die *in vitro* Expression von MMP13 in den Knorpelproben älterer Individuen, wie sie auch hier vorlagen, höher ausfällt als bei denen von jüngeren Individuen. Die erhöhte Expression im vorliegenden Versuch kann daher auch zum Teil damit erklärt werden, dass die hier verwendeten Proben von Pferden älter als 20 Jahre gewonnen wurden.

Werden die Knorpelzellen gestört, sind sie, als Hauptregulatoren der Knorpelhomöostase, nicht mehr in der Lage eine auftretende Dysbalance auszugleichen (Aigner et al. 2007). Die auftretenden katabolen Faktoren, ob durch die Chondrozyten selbst oder durch äußere Einflüsse gebildet, können nicht mehr durch das Hochregulieren der Produktion von anabolen Faktoren kompensiert werden (Aigner et al. 2007). Die Knorpelzellen unterstützen somit aktiv den ECM-Abbau und es kommt zur Ausbildung von OA und Seneszenz (Aigner et al. 2007).

Es gibt diverse Einflussfaktoren, die zur Dedifferenzierung von Chondrozyten führen. Neben degradierenden Enzymen, ROS und Entzündungsmediatoren *in vivo*, kommen *in vitro* Kultivierung, Veränderungen im Sauerstoffpartialdruck und Digestationsenzyme für die RNS-Isolierung hinzu (Carrera et al. 2010, Charlier et al. 2019, Lepage et al. 2021, Wuest et al. 2018). Ebenso wird das Phänomen durch alle auch OA-begünstigende Faktoren gefördert (Charlier et al. 2019). Zusätzlich zu den begünstigenden Dedifferenzierungsfaktoren in der Zellkultur, kann es *in vitro* auch spontan zum Auftreten von Dedifferenzierung kommen (Charlier et al. 2019).

Für die *ex vivo* Kultivierung von Knorpelzellen müssen diese aus dem Knorpel entnommen werden und werden damit aus ihrem physiologischen Milieu herausgelöst. Da der zelluläre Phänotyp schon per se durch die Störung bzw. Entfernung der ECM stark negativ beeinflusst ist, führt die Kultivierung alleine schon zur Störung der Knorpelhomöostase und damit zur Dedifferenzierung (Aigner et al. 2007).

Im Gelenkknorpel, der avaskular ist, liegt der Sauerstoffpartialdruck *in vivo* bei 3-6 % und ~ 20-40 mmHg (Carrera et al. 2010). Sowohl hypoxische als auch hyperoxische Bedingungen können die Lebensspanne von Chondrozyten deutlich verkürzen (Carrera et al. 2010). Während die Kultivierung bei atmosphärischen Werten (20-21 % O₂) (hyperoxisch) zur Hemmung der Proliferation und Induktion von Apoptose und Seneszenz führt (Carrera et al. 2010), hat auch ein Sauerstoffgehalt von weniger als 5 % (Hypoxie) einen zytotoxischen Einfluss (Carrera et al. 2010). Obwohl es in der Hypoxie zu Zellschäden in Folge von p53-Anstieg kommt, ist eine niedrige O₂-Konzentration in der Kultur von Vorteil (Carrera et al. 2010), solange der Wert über dem Schwellenwert für eine schwere Hypoxie bleibt. Steht den Zellen *in vitro* eine höhere O₂-Konzentration als

physiologisch zur Verfügung, werden vermehrt ROS von den Chondrozyten gebildet (Carrera et al. 2010). Diese führen zu DNS-Schäden und oxidativem Stress, welche wiederum das Risiko für die Entwicklung des OA-Phänotyps begünstigen (Yudoh et al. 2005). Viele Zellkultivierungen werden bei 95 % Raumluft (~ 21 % O₂) und 5 % CO₂ durchgeführt (Halliwell 2014). Hypoxische Zellen sind, da es mehr der *in vivo* Situation entspricht, resistenter gegen ROS-Schäden (Carrera et al. 2010).

Alle oben genannten Einflussfaktoren begünstigen die Veränderung der Genexpression bei der Kultivierung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die *in vitro* analysierten Gene nicht dem exakten *in vivo* Bild entsprechen (Halliwell 2014). Dieser Umstand ist auch in der Entwicklung von neuen Therapieansätzen zu bedenken. *In vitro* funktionierende Therapien müssen nicht zwangsläufig auch *in vivo* erfolgreich sein, sodass die Übertragung von den Ergebnissen aus Zellkulturen auf die Anwendung am lebenden Tier zusätzlich mit *in vivo* Studien belegt werden müssen (Rim et al. 2020).

Neben der Hypertrophie und Dedifferenzierung kommt es bei der Ausbildung von OA auch zur Seneszenz.

Seneszente Zellen weisen viele Ähnlichkeiten zu osteoarthrotischen Zellen auf, wie die Telomerverkürzung, Erhöhung der SA- β -Gal-Aktivität oder die Genexpression, welche sich im SASP widerspiegelt (Rim et al. 2020). Im gesunden Gelenkknorpel sind *in vivo* keine seneszenten Zellen vorhanden, wobei zu beachten ist, dass Knorpelzellen Quiescent sind. Das bedeutet, dass sie keine oder sehr wenig Proliferation und Aktivität aufweisen (Singh et al. 2019).

In vivo können im Knorpelbereich um OA-Läsionen herum seneszente Zellen gefunden werden (Rim et al. 2020). Da es auch bei der Seneszenz von Knorpelzellen zur Ausbildung eines hypertrophischen Phänotyps kommt, kann davon ausgegangen werden, dass OA, Seneszenz und hypertrophe Dedifferenzierung mit einander einher gehen und sich gegenseitig begünstigen (Rim et al. 2020).

Obwohl vor allem die Knorpelzellen treibend für die Entstehung von Seneszenz sind, exprimieren auch die umgebenden Fibroblasten *in vivo* fördernde Gene, wie CDKN1A, CDGN2A, IL-6, CXCL8, CCL2 und MMP3 (Rim et al. 2020). Wie auch bei der Hypertrophie, gibt es für Seneszenz und OA kein eindeutiges Set an Genen (Rim et al. 2020). Typischerweise ist aber mit einem Anstieg von RUNX2, Col10, IL-1 β und Akkumulation von diversen MMPs zu rechnen (Rim et al. 2020). Im Vergleich der Gene der Funktionsgruppe **chondroprotektiv** in den Zellkulturen mit und ohne FCS konnten sieben Gene (COL11A2, FN1, FBN1, MIA, ITIH5, SLC39A14, SOX9) in der Kultur ohne FCS gefunden werden. Im Gegensatz wurden nur fünf chondroprotektive Gene (CTHRC1, ID3, LUM, TIMP1, ECM2) in der FCS-haltigen Zellkultur gefunden. Ebenso waren sechs Gene (SOD3, CYTL1, COL9, SOX9, ACAN, CHAD) in der nativen Knorpelprobe des Donors zu finden.

Dies lässt darauf schließen, dass die erwartete positive Einfluss von FCS auf die Knorpelzellen in der Kultur geringer ausfällt als angenommen. Dieses Verhältnis ist nicht mit anderen Forschungsergebnissen konform, welche den Schluss zuließen, dass FCS einen chondroprotektiven Effekt haben könnte (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005). Möglicherweise ist der Einfluss der Zellkultivierung auch viel größer als der positive Einfluss des FCS, sodass kein Ausgleich der negativen Stressoren stattfindet.

Eine mögliche Erklärung für die niedrige Expression des Gens Fibrillin 1 (FBN1) im nativen Knorpel ist, dass FBN1 vor allem in juvenilem Knorpel vorkommt, aber in deutlich geringeren Konzentrationen im adulten Knorpelgewebe (Kemper et al. 2019). Fibrillin 1 ist im juvenilen Knorpel an Stellen mit hoher proliferativer Aktivität (Kemper et al. 2019) zu finden. Das vermehrte Vorhandensein in den *in* vitro Proben kann auf eine erhöhte Proliferationsrate aufgrund von Stress in der Zellkultur und dies wiederrum hinweisend für Hypertrophie und Seneszenz sein.

Das Vorkommen von SOD3 in der nativen Knorpelprobe deutet daraufhin, dass die Knorpelproben von gesunden Gelenkknorpelbereichen, ohne osteoarthrotische Veränderungen stammten, da eine verminderte Expression in OA Knorpel beobachtet wurde (Bolduc et al. 2019). Diese Annahme wird ebenfalls von der Expressionsrate von Col9 unterstützt. Col9 ist dafür bekannt wichtig in der Ausbildung einer Knorpelmatrix zu sein (Luo et al. 2017). Bereits im frühen Stadium von degenerativen Gelenkserkrankungen wird es abgebaut (Luo et al. 2017).

4.6. Funktionsgruppe der Inflammation und Entzündungsmediatoren – der Einfluss von Eicosanoiden im FCS

Von den Genen, die durch den Zusatz von FCS differentiell exprimiert waren, waren acht Gene der Funktionsklasse "**Entzündungsmediator**" (C1QB, C1QC, LAG3, SIN3A, DRA, ANKRD37, BMP6, TYROBP). Im Vergleich "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten – FCS" wurden zwei Entzündungsmediator-Gene (HMGB1, CXCL6) hochreguliert. In der Kultivierung mit FCS wurden vier Gene (Haptoglobin, PI3, ANGPT1, CXCL6) differentiell exprimiert, wobei CXCL6 mit FCS stärker gebildet wurde als ohne FCS.

Zum einen lässt die Vielzahl an Mediatoren, die im nativen Knorpel gefunden wurden, darauf schließen, dass der geriatrische Knorpel Anzeichen von Seneszenz aufweist.

Zum andern lässt sich aufgrund des erhöhten Vorkommens in der FCS-haltigen Kultur darauf schließen, dass im FCS enthaltene Inhaltsstoffe die negativen Einflüsse durch die Kultivierung nicht ausreichend neutralisieren können, sondern zum Teil auch verstärken. Die Mediatoren, wie z.B. HMGB1, führen zu Hypertrophie, Seneszenz und damit zur OA (Taniguchi et al. 2018). Die Expression von HMGB1 wird hochreguliert, wenn die Zellen in einem gestressten oder überaktivierten Zustand sind (Aulin et al. 2020).

Dies kann aufgrund der im FCS enthaltenen Eicosanoide geschehen. Bei der Kultivierung ohne FCS-Zusatz, kommt es zur Akkumulation aller negativen Einflüsse, ohne möglichen protektiven Effekt des FCS für die Knorpelzellen.

Fetales Kälberserum enthält, da von Feten gewonnen, Inhaltsstoffe und Proteine wie im fetalen Individuum. Es liegt eine Vielzahl von anabolen Faktoren vor, durch welche sich der Knorpel aufbauen und korrekt ausbilden kann. Diesen Effekt versuchten wir in der Zellkultur mit FCS nachzuweisen. Allerdings ist die exakte Zusammensetzung der FCS-Inhaltsstoffe nicht bekannt. Zudem ist die Zusammensetzung des FCS zwischen den verschiedenen Herstellern und Chargen unterschiedlich, unteranderem im Gehalt der Eicosanoide. (Niederstaetter et al. 2021). Eicosanoide sind Lipide, welche aus Arachidonsäure entstehen und sowohl pro-, als auch anti-inflammatorisch wirken können (Coras et al. 2020). Bislang ist die genaue Wirkung bei OA nicht eindeutig geklärt, sodass von einem negativen Einfluss der Eicosanoide auf das Milieu der Zellen ausgegangen werden muss, da sie auch eine starke pro-inflammatorische Wirkung haben können (Coras et al. 2020). Durch den unterschiedlich hohen Gehalt an

Eicosanoiden, kann der positive Einfluss des FCS auf die Chondrozyten unterschiedlich ausfallen.

In den Vergleichen Nativer Knorpel und Kultur ohne FCS vs. Kultur mit FCS wurden zwei **anti-inflammatorische** Gene (IGFBP2, ANGPT1) in der Kultivierung mit FCS verstärkt gebildet. Dies lässt auf einen positiven bzw. Entzündungshemmenden Einfluss des FCS für die Chondrozyten schließen. Diese Schlussfolgerung geht mit den von Conboy (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005, Conboy und Rando 2012) publizierten Ergebnissen konform, nachdem FCS ein entzündliches Milieu abmildern soll.

Die Genexpression der Zellen wird von ihrem Zustand und ihr Zustand wiederum von ihrem Milieu beeinflusst. Liegt ein entzündetes Milieu mit dem Einfluss diverser Stressoren der Chondrozyten vor, kommt es zur Ausbildung von OA und Seneszenz der Knorpelzellen. Durch den Einsatz von FCS als Kulturmediumzusatz, wurde untersucht, ob ein Milieu, ähnlich dem fetalen, erzeugt werden kann. Conboy beschrieb in Studien, dass durch die Erhöhung von anabolen Faktoren, wie im fetalen Stadium, eine Verbesserung des regenerativen Potenzials erlangt werden kann und dies die negativen Einflüsse von Stressoren abmildern könne (Conboy et al. 2005).

Entstehender oxidativer Stress während der Kultivierung, führt zur Hemmung der Bildung von BMP7 und IGF1, welche die Matrixsynthese hemmen und den Zelltod fördern (Bolduc et al. 2019). Da die Kultivierung Stress für die Chondrozyten bewirkt (Halliwell 2014), ist mit einem Anstieg der Gene zu rechnen, welche der Funktionsgruppen pro-inflammatorisch, anti-apoptotisch, chondrodegenerativ und pro-proliferativ angehören.

Neben den gefundenen anti-inflammatorischen Genen in der Zellkultur mit FCS wurden in dieser auch vier **pro-inflammatorische** Gene (LUM, FGF7, ECT2, CXCL6) gefunden. Fünf Gene (FN1, HMGB1, LBP, ECT2, CXCL6) wurden im Vergleich zu ihrem Vorkommen in der nativen Knorpelprobe in der Kultur ohne FCS verstärkt gebildet, wobei die Expressionsrate von ECT2 und CXCL6 im Vergleich Zellkultur mit FCS vs. ohne FCS in der Kultur mit FCS höher war. Dies lässt den Schluss zu, dass die Kultivierung und die Verarbeitung die Zellen einem sehr großen Stress ausgesetz hat und dass der FCS Gehalt in dem Monolayer keinen positiven Einfluss auf die Kultivierungsbedingungen der Chondrozyten hat.

Es wurden sowohl in der Kultivierung mit FCS, als auch in der Kultivierung ohne FCS pro-inflammatorische Gene gefunden. Es kann dahingehend kein Unterschied in der Anzahl der pro-inflammatorischen Gene zwischen den beiden Zellkulturen gefunden werden. Das lässt darauf schließen, dass FCS nicht das Milieu beeinflusst, in dem es die pro-inflammatorische Genexpression vermindert, sondern die Expression von anti-inflammatorischen Genen steigern könnte (Niederstaetter et al. 2021).

4.7. Seneszenz-assoziierte Gene

Der Vergleich nativen Knorpels mit Chondrozyten aus der Monolayer Kultur mit und ohne FCS zeigt, dass im nativen Knorpel Knorpel-assoziierte Gene ACAN logFC 6,28 im Vergleich zu Monolayer +FCS bzw 6,23 zu -FCS), SOX9 (log FC 3,5 zu +FCS, 2,61 zu -FCS) sowie das C-C motif chemokine (LOC100630171, logFC 10,51 zu +FCS bzw 10,32 zu -FCS) differentiell höher exprimiert sind, wohingegen in den Monolayer Kulturen drei Seneszenz-assoziierte Faktoren, C-X-C motif chemokine ligand 6 (log FC 9,44 zu +FCS, 9,96 zu -FCS), MMP1 (log FC 7,515 zu +FCS, 7,71 zu -FCS), MMP13 (log FC 8,93 zu +FCS, 9,35 zu -FCS). Im Vergleich zwischen nativem Knorpel und Monlayer-Kultur mit FCS wurde zusätzlich das C-C motif chemokine 14 (LOC100071548) höher in nativem Knorpel (LogFC 10,48) und der Hemmer der Metalloproteinasen TIMP1 (logFC 2,222) höher in Monolayer Kultur exprimiert. Im Vergleich zwischen den beiden Monolayer Kulturen waren keine SASP Faktoren differentiell reguliert, was darauf schließen läßt dass der Effekt der Monolayer Kultur auf Seneszenz höher ist als der Effekt des Zusatzes von FCS.

Von diesen Genen können vier Gene (ACAN, SOX9, TIMP1, RBP1) eine Schutzfunktion bzw. Vorkommen bei Abwesenheit von Seneszenz zugeschrieben werden. Neun der Gene (CILP, SIN3A, MMP1, MMP13, MRC1, HMGB1, PI3, FGF7, SUB1) fördern Seneszenz bzw sind bei Auftreten selbiger vorhanden. Dieses Verhältnis an Genen lässt darauf schließen, dass die Kultivierung unabhängig vom Kulturzusatz die Entstehung und Ausprägung von Seneszenz und OA begünstigt. Der Zusatz von FCS als Kulturmedium hat nicht den gewünschten schützenden Effekt, sondern kann durch den Inhalt von Eicosanoiden einen gegenteiligen Effekt bewirken.

Alles in Allem geben die Ergebnisse der Genanalyse kein eindeutiges Bild über die Wirkung des FCS in der Kultivierung wieder. Es wurden sowohl chondroprotektive und anti-inflammatorische Gene, als auch chondrodegenerative und pro-inflammatorische Gene in der Zellkultur mit und ohne FCS und in der nativen Knorpelprobe vermehrt gefunden. FCS kann somit sowohl einen verjüngenden und regenerierenden Effekt auf die Chondrozyten haben, kann aber ebenso die OA-artigen Veränderungen vorantreiben.

Das nicht eindeutige Ergebnis kann aufgrund unterschiedlicher Ursachen begründet sein. Eine Möglichkeit ist die unbekannte Zusammensetzung von FCS. FCS weist je nach Charge und Hersteller Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration dr Inhaltsstoffe auf. (Niederstaetter et al. 2021). Da es sich bei FCS um ein aus dem Kälberfetus gewonnenes Produkt handelt, kann die Konzentration der Inhaltsstoffe zwischen den Chargen und Anbietern nicht gleich sein. Es unterliegt gewissen Schwankungen, unter anderem im Gehalt der Eicosanoide, welche einen nicht unbeachtlichen negativen Einfluss auf Zellkulturen haben kann. Ebenso sind die Supplemente des STEM MACS nicht genau definiert, sodass auch hier der Einfluss auf die Zellen *in vitro* unterschiedlich ausfallen könnte.

Des Weiteren können, obwohl Knorpelproben ausschließlich von makroskopisch unauffälligen Gelenken und anamnestisch OA-gesunden Pferden entnommen wurden, erste OA-Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene nicht ausgeschlossen werden. Zudem ist aufgrund der kleinen Probengruppe die Varianz der biologischen Proben zueinander sehr hoch. Dies könnte mit größer gewählten Probengruppen abgemildert und die Ergebnisse verdeutlich werden. Zusätzlich hat die *in vitro* Kultivierung per se einen sehr großen Einfluss auf die Knorpelzellen, sodass ein Möglicher Effekt des FCS nicht eindeutig festgestellt werden kann. Die *ex vivo* Transplantation der Knorpelzellen und das Herauslösen aus dem bestehenden Knorpel-Matrix-Gefüge sorgt für neue Druckverhältnisse, Sauerstoffumgebung und Nährstoffversorgung. Bereits diese Veränderungen setzten die perfekt an ihre Umgebung angepassten Zellen unter enormen Stress, der sich in Entzündungsmediatoren und veränderter Genexpression widerspiegeln kann.

Die Resultate der Studie legen dar, dass FCS keinen positiven Einfluss auf die Alterung von Chondrozyten *in vitro* hat. Die Anzahl und Verteilung seneszenz-assooziierten Gene lässt den Schluss zu, dass die Knorpelzellen keinen Schutz, weder teilweise noch vollständig, vor dem Stressorenimpakt durch die Kultivierung und Verarbeitung erhalten. Die Chondrozyten exprimieren Gene, ähnlich der bei Seneszenz und OA vorkommenden, was die Schlussfolgerung ergibt, dass die Chondrozyten durch FCS keine Verjüngung *in vitro* erfahren.

5. Zusammenfassung

Osteoarthrose (OA) ist eine beim alternden Pferd weit verbreitete Erkrankung. 50 % aller Pferde über 15 Jahre (van Weeren und Grauw 2010) sind weltweit davon betroffen, Freizeitpferd oder Sportpferd. OA ist unabhängig ob eine klassische Verschleißerkrankung, unterschiedliche intrinsische die durch und extrinsische Einflussfaktoren, wie z.B. Trauma, Überlastung und Entzündungen entstehen und gefördert werden kann. Dabei gehen die Chondrozyten in Seneszenz über und es kommt zum Abbau von Knorpelmatrix, was Knorpeldefekte zurücklässt. Bei Seneszenz verlieren die Chondrozyten ihre Teilungsfähigkeit aufgrund von verkürzten Telomeren und verändern ihre mitotische Aktivität hin zur Ausbildung des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotypes. In Folge dieser Veränderungen kommt es zum Verlust des gesunden Knorpelgewebes, Ausbreitung der OA auf den gesamten Gelenkknorpelbereich und es treten Bewegungsschmerzen, Einschränkungen im Bewegungsradius, Weichteilschmerzen und röntgenologische Veränderungen auf.

Aufgrund der sehr schlechten intrinsischen Regenerationskapazität des Knorpels ist eine *Restitutio ad integrum* nicht möglich. Statt physiologischen Kollagen Typ 2 wird minderwertiges Kollagen Typ 1 gebildet. Es entsteht biomechanisch weniger belastbarer Faserknorpel, der anfälliger für erneute Verletzungen ist.

Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten sind dahingehend sehr beschränkt und bestehen vor allem aus anti-inflammatorischen und chondroprotektiven Regimen, wie Hyaluron oder Polysulfatierte Glycosaminoglykane. So kann die Entzündungsphase verkürzt werden und im besten Fall das Voranschreiten verlangsamt werden. Trotzdem kann eine Bildung von Kollagen Typ 1 nicht verhindert werden.

Nach Studien von Conboy et al. (Carlson und Conboy 2007, Conboy et al. 2005, Conboy und Rando 2012) in denen beschrieben wurde, dass durch ein fetales Milieu Entzündungsgeschehen reduziert werden können und alte Gewebe eine bessere Heilung zeigten, ist die Fragestellung dieser Diplomarbeit gesetzt worden, ob fetales Kälberserum (FCS) eine Verjüngung von Chondrozyten bewirken kann. Durch Imitierung eines fetalen Milieus *in vitro* sollen die Zellen zur Hochregulation von reparaturspezifischen

Molekülsignalen angeregt werden und die Regenerationskapazität erhöht werden. Möglicherweise können so auch seneszente Zellen zurück in die Zellzyklus gelangen und osteoarthrotische Veränderungen minimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob adulte, potenziell osteoarthrotisch-veränderte Chondrozyten durch die Kultivierung mit FCS im Vergleich zur Kultivierung ohne FCS und im Vergleich zu nativem Knorpelgewebe eine Verjüngung erfahren, im Sinne der Genexpression und ob FCS in der Kultur die negativen Einflüsse entstehend durch Kultivierung, Veränderungen im Sauerstoffpartialdruck und Digestationsenzyme, ausgleichen kann.

Hierfür wurden Knorpelproben von sechs Pferden mit einem Alter von über 15 Jahre von den Femurkondylen gewonnen. Die Einteilung der Proben erfolgte in drei Gruppen: nativer Knorpel, isolierte Chondrozyten in Zellkultur mit FCS und isolierte Chondrozyten in Zellkultur ohne FCS. Nach Kultivierung bzw. direkt nach der Probenentnahme (nativer Knorpel) wurde die RNS isoliert und von dem externen Labor tamiRNA mittels Next Generation Sequencing analysiert. Der Fokus lag dabei auf OA-spezifischen, Seneszenz-assoziierten und Hypertrophie Genen, um den Einfluss von FCS im Kulturmedium zu untersuchen.

Im Ergebnis lässt die Genanalyse keine eindeutige Aussage zur Beantwortung der Fragestellung zu. Ursächlich für dieses uneindeutige Ergebnis kann die zu geringe Probenanzahl sein, sodass die Varianz der einzelnen Gen-Expressions-Werte die Ergebnisse zu stark beeinflusst. Ebenso können die Inhaltsstoffe der Chargen von FCS und dem genutzten STEM MACS die Ergebnisse beeinflussen. Die Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration, speziell der Eicosanoide im FCS kann das Milieu der Chondrozyten pro-inflammatorisch beeinflussen.

Um eine bessere Aussage treffen zu können, sollte der Versuch mit mehr Proben wiederholt werden.
Auch könnte das Alter der Pferde höher angesetzt werden, um wirklich osteoarthrotisch veränderte Knorpelproben zu gewinnen bzw. mit Proben von bekanntlich osteoarthrotisch veränderten Gelenken gearbeitet werden. So könnte man sicher sein, dass Osteoarthritis und Seneszenz bei allen Proben vorliegt.

6. Summary

Osteoarthritis (OA) is a common condition in the aging horse. It affects 50% of all horses over 15 years of age worldwide (van Weeren and Grauw 2010), whether leisure or sport horses. OA is a classic wear and tear disease that can develop and be promoted by various intrinsic and extrinsic contributing factors, such as trauma, overload, and inflammation. In this process, chondrocytes enter senescence and cartilage matrix degradation occurs, leaving cartilage defects. In senescence, chondrocytes lose their ability to divide due to shortened telomeres and change their mitotic activity toward the formation of the senescence-associated secretory phenotype. As a result of these changes, there is loss of healthy cartilage tissue, spread of OA to the entire articular cartilage area, and there is pain on movement, limitation of range of motion, soft tissue pain, and radiographic changes.

Due to the very poor intrinsic regenerative capacity of cartilage, restitutio ad integrum is not possible. Instead of physiological type 2 collagen, inferior type 1 collagen is formed. The result is biomechanically less resilient fibrocartilage that is more susceptible to reinjury.

Current therapeutic options are very limited in this regard and consist mainly of antiinflammatory and chondroprotective regimens, such as hyaluronan or polysulfated glycosaminoglycans. Thus, the inflammatory phase can be shortened and, in the best case, the progression slowed down. Nevertheless, type 1 collagen formation cannot be prevented.

Following studies by Conboy et al. (Carlson and Conboy 2007, Conboy et al. 2005, Conboy and Rando 2012) in which it was described that a fetal milieu can reduce inflammatory events and old tissues showed better healing, the question of this thesis has been set whether fetal calf serum (FCS) can induce a rejuvenation of chondrocytes. By mimicking a fetal environment in vitro, the cells should be stimulated to upregulate repair-specific molecular signals and increase regenerative capacity. It may also allow senescent cells to return to the cell cycle and minimize osteoarthritic changes.

The aim of this work was to answer the question whether adult, potentially osteoarthritically altered chondrocytes undergo a rejuvenation by cultivation with FCS compared to cultivation without FCS and compared to native cartilage tissue, in terms of gene expression and whether FCS in culture can compensate for the negative influences arising from cultivation, changes in oxygen partial pressure and digestion enzymes.

For this purpose, cartilage samples were obtained from the femoral condyles of six horses older than 15 years. The samples were divided into three groups: native cartilage, isolated chondrocytes in cell culture with FCS, and isolated chondrocytes in cell culture without FCS. After cultivation or directly after sample collection (native cartilage), RNA was isolated and analyzed by the external laboratory tamiRNA using next generation sequencing. The focus was on OA-specific, senescence-associated and hypertrophy genes to investigate the influence of FCS in the culture medium.

As a result, the gene analysis does not allow a clear conclusion to answer the question. The reason for this ambiguous result may be the too small number of samples, so that the variance of the individual gene expression values influences the results too much. Likewise, the ingredients of the batches of FCS and the STEM MACS used may influence the results. The differences in composition and concentration, especially of eicosanoids in FCS may influence the chondrocyte pro inflammatory milieu.

Also, the age of the horses could be set higher to obtain truly osteoarthritically altered cartilage samples or work with samples from known osteoarthritically altered joints. This way, one could be sure that osteoarthritis and senescence are present in all samples.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A, Haag J. 2007. Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence. Nature clinical practice. Rheumatology, 3 (7): 391–399. DOI 10.1038/ncprheum0534.

Ashraf S, Cha B-H, Kim J-S, Ahn J, Han I, Park H, Lee S-H. 2016. Regulation of senescence associated signaling mechanisms in chondrocytes for cartilage tissue regeneration. Osteoarthritis and Cartilage, 24 (2): 196–205. DOI 10.1016/j.joca.2015.07.008.

Asjid R, Faisal T, Qamar K, Khan SA, Khalil A, Zia MS. 2019. Platelet-rich Plasmainduced Inhibition of Chondrocyte Apoptosis Directly Affects Cartilage Thickness in Osteoarthritis. Cureus, 11 (11): e6050. DOI 10.7759/cureus.6050.

Aulin C, Lassacher T, Palmblad K, Erlandsson Harris H. 2020. Early stage blockade of the alarmin HMGB1 reduces cartilage destruction in experimental OA. Osteoarthritis and Cartilage, 28 (5): 698–707. DOI 10.1016/j.joca.2020.01.003.

Barter MJ, Bui C, Young DA. 2012. Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis. DNA methylation, histone modifications and microRNAs. Osteoarthritis and Cartilage, 20 (5): 339–349. DOI 10.1016/j.joca.2011.12.012.

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

DOI 10.1016/j.joca.2012.11.012.

Bogers SH. 2018. Cell-Based Therapies for Joint Disease in Veterinary Medicine. What We Have Learned and What We Need to Know. Frontiers in veterinary science, 5: 70. DOI 10.3389/fvets.2018.00070.

Bolduc JA, Collins JA, Loeser RF. 2019. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis. Free radical biology & medicine, 132: 73–82. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.038.

Brandt KD, Dieppe P, Radin EL. 2008. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. Rheumatic Disease Clinics of North America, 34 (3): 531–559. DOI 10.1016/j.rdc.2008.05.011.

Branly T, Contentin R, Desancé M, Jacquel T, Bertoni L, Jacquet S, Mallein-Gerin F, Denoix J-M, Audigié F, Demoor M, Galéra P. 2018. Improvement of the Chondrocyte-Specific Phenotype upon Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation: Influence of Culture Time, Transforming Growth Factors and Type I Collagen siRNAs on the Differentiation Index. International journal of molecular sciences, 19 (2). DOI 10.3390/ijms19020435.

Bu H, Wedel S, Cavinato M, Jansen-Dürr P. 2017. MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence. Oxidative medicine and cellular longevity, 2017: 2398696. DOI 10.1155/2017/2398696.

Buckwalter JA. 1998. Articular cartilage. Injuries and potential for healing. The Journal of orthopaedic and sports physical therapy, 28 (4): 192–202. DOI 10.2519/jospt.1998.28.4.192.

Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. 2019. Cellular Senescence. Aging, Cancer, and Injury. Physiological reviews, 99 (2): 1047–1078. DOI 10.1152/physrev.00020.2018.

Campisi J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. Annual review of physiology, 75: 685–705. DOI 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.

Carlson ME, Conboy IM. 2007. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. Aging cell, 6 (3): 371–382. DOI 10.1111/j.1474-9726.2007.00286.x.

Carrera S, Verdier PJ de, Khan Z, Zhao B, Mahale A, Bowman KJ, Zainol M, Jones GDD, Lee SW, Aaronson SA, Macip S. 2010. Protection of cells in physiological oxygen tensions against DNA damage-induced apoptosis. The Journal of biological chemistry, 285 (18): 13658–13665. DOI 10.1074/jbc.M109.062562.

Chandeck C, Mooi WJ. 2010. Oncogene-induced cellular senescence. Advances in anatomic pathology, 17 (1): 42–48. DOI 10.1097/PAP.0b013e3181c66f4e.

Chang H-Y, Lawless C, Addinall SG, Oexle S, Taschuk M, Wipat A, Wilkinson DJ, Lydall D. 2011. Genome-wide analysis to identify pathways affecting telomere-initiated senescence in budding yeast. G3 (Bethesda, Md.), 1 (3): 197-208. DOI 10.1534/g3.111.000216.

Chapman H-S, Richardson DW, Ortved KF. 2019. Arthrodesis of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints to treat osteoarthritis in 17 horses. Veterinary surgery : VS, 48 (5): 850–857. DOI 10.1111/vsu.13236.

Charlier E, Deroyer C, Ciregia F, Malaise O, Neuville S, Plener Z, Malaise M, Seny D de. 2019. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA). Biochemical pharmacology, 165: 49–65. DOI 10.1016/j.bcp.2019.02.036.

Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease. From mechanisms to therapy. Nature medicine, 21 (12): 1424–1435. DOI 10.1038/nm.4000.

Choi M-C, Jo J, Park J, Kang HK, Park Y. 2019. NF-κB Signaling Pathways in Osteoarthritic Cartilage Destruction. Cells, 8 (7). DOI 10.3390/cells8070734.

Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. Nature, 433 (7027): 760–764. DOI 10.1038/nature03260.

Conboy IM, Rando TA. 2012. Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 11 (12): 2260–2267. DOI 10.4161/cc.20437.

Contino EK. 2018. Management and Rehabilitation of Joint Disease in Sport Horses. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, 34 (2): 345–358. DOI 10.1016/j.cveq.2018.04.007.

Coras R, Kavanaugh A, Boyd T, Huynh Q, Pedersen B, Armando AM, Dahlberg-Wright S, Marsal S, Jain M, Paravar T, Quehenberger O, Guma M. 2019. Pro- and antiinflammatory eicosanoids in psoriatic arthritis. Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society, 15 (4): 65. DOI 10.1007/s11306-019-1527-0.

Coryell, P.R., Diekman, B.O. & Loeser, R.F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **17**, 47–57 (2021).

Decker RS, Koyama E, Pacifici M. 2015. Articular Cartilage. Structural and Developmental Intricacies and Questions. Current osteoporosis reports, 13 (6): 407–414. DOI 10.1007/s11914-015-0290-z.

Ebell MH. 2018. Osteoarthritis. Rapid Evidence Review. American family physician, 97 (8): 523–526.

Emanuela F, Grazia M, Marco DR, Maria Paola L, Giorgio F, Marco B. 2012. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. Journal of nutrition and metabolism, 2012: 476380. DOI 10.1155/2012/476380. Endisha H, Rockel J, Jurisica I, Kapoor M. 2018. The complex landscape of microRNAs in articular cartilage: biology, pathology, and therapeutic targets. JCI insight, 3 (17). DOI 10.1172/jci.insight.121630.

Fisch KM, Gamini R, Alvarez-Garcia O, Akagi R, Saito M, Muramatsu Y, Sasho T, Koziol JA, Su AI, Lotz MK. 2018. Identification of transcription factors responsible for dysregulated networks in human osteoarthritis cartilage by global gene expression analysis. Osteoarthritis and Cartilage, 26 (11): 1531–1538. DOI 10.1016/j.joca.2018.07.012.

Freitag J, Bates D, Boyd R, Shah K, Barnard A, Huguenin L, Tenen A. 2016. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis. Reparative pathways, safety and efficacy - a review. BMC musculoskeletal disorders, 17: 230. DOI 10.1186/s12891-016-1085-9.

Fuggle NR, Cooper C, Oreffo ROC, Price AJ, Kaux JF, Maheu E, Cutolo M, Honvo G, Conaghan PG, Berenbaum F, Branco J, Brandi ML, Cortet B, Veronese N, Kurth AA, Matijevic R, Roth R, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Vlaskovska M, Thomas T, Lems WF, Al-Daghri N, Bruyère O, Rizzoli R, Kanis JA, Reginster JY. 2020. Alternative and complementary therapies in osteoarthritis and cartilage repair. Aging clinical and experimental research, 32 (4): 547–560. DOI 10.1007/s40520-020-01515-1.

Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzì RM, Marcu KB. 2011. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. Signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. European cells & materials, 21: 202–220. DOI 10.22203/ecm.v021a16.

Goldring MB, Otero M. 2011. Inflammation in osteoarthritis. Current opinion in rheumatology, 23 (5): 471–478. DOI 10.1097/BOR.0b013e328349c2b1.

Goodrich LR, Nixon AJ. 2006. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. Veterinary journal (London, England : 1997), 171 (1): 51–69. DOI 10.1016/j.tvjl.2004.07.008.

Gregory PJ, Sperry M, Wilson AF. 2008. Dietary supplements for osteoarthritis. American family physician, 77 (2): 177–184.

Griffin TM, Fermor B, Huebner JL, Kraus VB, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Cao L, Setton LA, Guilak F. 2010. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral,

biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. Arthritis research & therapy, 12 (4): R130. DOI 10.1186/ar3068.

Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB. 2004. The Role of Biomechanics and Inflammation in Cartilage Injury and Repair. Clinical Orthopaedics and Related Research, 423: 17–26.

DOI 10.1097/01.blo.0000131233.83640.91.

Guilak F. 2011. Biomechanical factors in osteoarthritis. Best practice & research. Clinical rheumatology, 25 (6): 815–823. DOI 10.1016/j.berh.2011.11.013.

Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. 2019. Hyaluronic Acid. Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. Frontiers in veterinary science, 6: 192. DOI 10.3389/fvets.2019.00192.

Halliwell B. 2014. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. Biomedical journal, 37 (3): 99–105. DOI 10.4103/2319-4170.128725.

Hendijani F. 2017. Explant culture: An advantageous method for isolation of mesenchymal stem cells from human tissues. Cell proliferation, 50 (2). DOI 10.1111/cpr.12334.

Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, Kehm R, König J, Grune T, Castro JP. 2017. Happily (n)ever after. Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. Redox Biology, 11: 482–501. DOI 10.1016/j.redox.2016.12.001.

Issa RI, Griffin TM. 2012. Pathobiology of obesity and osteoarthritis. Integrating biomechanics and inflammation. Pathobiology of aging & age related diseases, 2 (2012). DOI 10.3402/pba.v2i0.17470.

Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature, 461 (7267): 1071–1078. DOI 10.1038/nature08467.

Jeon OH, David N, Campisi J, Elisseeff JH. 2018. Senescent cells and osteoarthritis. A painful connection. The Journal of clinical investigation, 128 (4): 1229–1237. DOI 10.1172/JCI95147.

Jeon OH, Kim C, Laberge R-M, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, Chung JW, Kim DH, Poon Y, David N, Baker DJ, van Deursen JM, Campisi J, Elisseeff JH. 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. Nature medicine, 23 (6): 775–781. DOI 10.1038/nm.4324. Jones IA, Togashi R, Wilson ML, Heckmann N, Vangsness CT. 2019. Intra-articular treatment options for knee osteoarthritis. Nature reviews. Rheumatology, 15 (2): 77–90. DOI 10.1038/s41584-018-0123-4.

Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. 2015. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. Genome biology, 16: 113. DOI 10.1186/s13059-015-0676-3.

Kemper AM, Drnevich J, McCue ME, McCoy AM. 2019. Differential Gene Expression in Articular Cartilage and Subchondral Bone of Neonatal and Adult Horses. Genes, 10 (10). DOI 10.3390/genes10100745.

Kukolj T, Trivanović D, Mojsilović S, Okić Djordjević I, Obradović H, Krstić J, Jauković A, Bugarski D. 2019. IL-33 guides osteogenesis and increases proliferation and pluripotency marker expression in dental stem cells. Cell proliferation, 52 (1): e12533. DOI 10.1111/cpr.12533.

Kwon H, Paschos NK, Hu JC, Athanasiou K. 2016. Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 73 (6): 1173–1194. DOI 10.1007/s00018-015-2115-8.

Lepage SIM, Sharma R, Dukoff D, Stalker L, LaMarre J, Koch TG. 2021. Gene Expression Profile Is Different between Intact and Enzymatically Digested Equine Articular Cartilage. Cartilage, 12 (2): 222–225. DOI 10.1177/1947603519833148.

Lepetsos P, Papavassiliou AG. 2016. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. Biochimica et biophysica acta, 1862 (4): 576–591. DOI 10.1016/j.bbadis.2016.01.003.

Liu X-L, Ding J, Meng L-H. 2018. Oncogene-induced senescence. A double edged sword in cancer. Acta pharmacologica Sinica, 39 (10): 1553–1558. DOI 10.1038/aps.2017.198;

Lowe D, Horvath S, Raj K. 2016. Epigenetic clock analyses of cellular senescence and ageing. Oncotarget, 7 (8): 8524–8531. DOI 10.18632/oncotarget.7383.

Luo Y, Sinkeviciute D, He Y, Karsdal M, Henrotin Y, Mobasheri A, Önnerfjord P, Bay-Jensen A. 2017. The minor collagens in articular cartilage. Protein & cell, 8 (8): 560–572. DOI 10.1007/s13238-017-0377-7.

Ma B, Leijten JCH, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, Karperien M. 2013. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. Osteoarthritis and Cartilage, 21 (4): 599–603. DOI 10.1016/j.joca.2013.01.014.

Magalhães JP de, Passos JF. 2018. Stress, cell senescence and organismal ageing. Mechanisms of ageing and development, 170: 2–9. DOI 10.1016/j.mad.2017.07.001. Mariñas-Pardo L, García-Castro J, Rodríguez-Hurtado I, Rodríguez-García MI, Núñez-Naveira L, Hermida-Prieto M. 2018. Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (Horse Allo 20) for the Treatment of Osteoarthritis-Associated Lameness in Horses. Characterization, Safety, and Efficacy of Intra-Articular Treatment. Stem cells and development, 27 (17): 1147–1160. DOI 10.1089/scd.2018.0074.

Martin JA, Buckwalter JA. 2001. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, 56 (4): B172-9. DOI 10.1093/gerona/56.4.b172.

McCarthy DJ, Smyth GK. 2009. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. Bioinformatics (Oxford, England), 25 (6): 765-771. DOI 10.1093/bioinformatics/btp053.

McCulloch K, Litherland GJ, Rai TS. 2017. Cellular senescence in osteoarthritis pathology. Aging cell, 16 (2): 210–218. DOI 10.1111/acel.12562.

McIlwraith CW, Fortier LA, Frisbie DD, Nixon AJ. 2011. Equine Models of Articular Cartilage Repair. Cartilage, 2 (4): 317–326. DOI 10.1177/1947603511406531.

McIlwraith CW, Lattermann C. 2019. Intra-articular Corticosteroids for Knee Pain-What Have We Learned from the Equine Athlete and Current Best Practice. The journal of knee surgery, 32 (1): 9–25. DOI 10.1055/s-0038-1676449.

McIlwraith CW, Vachon A. 1988. Review of pathogenesis and treatment of degenerative joint disease. Equine veterinary journal. Supplement, (6): 3–11. DOI 10.1111/j.2042-3306.1988.tb04641.x.

Mendes AF, Caramona MM, Carvalho AP, Lopes MC. 2003. Hydrogen peroxide mediates interleukin-1beta-induced AP-1 activation in articular chondrocytes. Implications for the regulation of iNOS expression. Cell biology and toxicology, 19 (4): 203–214. DOI 10.1023/b:cbto.0000003730.21261.fa.

Miller AM. 2011. Role of IL-33 in inflammation and disease. Journal of inflammation (London, England), 8 (1): 22. DOI 10.1186/1476-9255-8-22.

Mobasheri A, Matta C, Zákány R, Musumeci G. 2015. Chondrosenescence. Definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. Maturitas, 80 (3): 237–244. DOI 10.1016/j.maturitas.2014.12.003.

Niederstaetter L, Neuditschko B, Brunmair J, Janker L, Bileck A, Del Favero G, Gerner C. 2021. Eicosanoid Content in Fetal Calf Serum Accounts for Reproducibility Challenges in Cell Culture. Biomolecules, 11 (1). DOI 10.3390/biom11010113.

Orlowsky EW, Kraus VB. 2015. The role of innate immunity in osteoarthritis. When our first line of defense goes on the offensive. The Journal of rheumatology, 42 (3): 363–371. DOI 10.3899/jrheum.140382.

Ortved KF, Nixon AJ. 2016. Cell-based cartilage repair strategies in the horse. Veterinary journal (London, England : 1997), 208: 1–12. DOI 10.1016/j.tvjl.2015.10.027.

Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. 2016. Inflammatory mediators in osteoarthritis. A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. Bone, 85: 81–90. DOI 10.1016/j.bone.2016.01.019.

Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. 2017. Aging and osteoarthritis. Central role of the extracellular matrix. Ageing research reviews, 40: 20–30. DOI 10.1016/j.arr.2017.07.004.

Resau JH, Sakamoto K, Cottrell JR, Hudson EA, Meltzer SJ. 1991. Explant organ culture: a review. Cytotechnology, 7 (3): 137–149. DOI 10.1007/BF00365924.

Rim YA, Nam Y, Ju JH. 2020. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. International journal of molecular sciences, 21 (7). DOI 10.3390/ijms21072358.

Saw K-Y, Hussin P, Loke S-C, Azam M, Chen H-C, Tay Y-G, Low S, Wallin K-L, Ragavanaidu K. 2009. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid. An experimental study in a goat model. Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association, 25 (12): 1391–1400. DOI 10.1016/j.arthro.2009.07.011.

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell, 88 (5): 593–602. DOI 10.1016/s0092-8674(00)81902-9.

Singh P, Marcu KB, Goldring MB, Otero M. 2019. Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. Annals of the New York Academy of Sciences, 1442 (1): 17–34. DOI 10.1111/nyas.13930.

Svala E, Jin C, Rüetschi U, Ekman S, Lindahl A, Karlsson NG, Skiöldebrand E. 2017. Characterisation of lubricin in synovial fluid from horses with osteoarthritis. Equine veterinary journal, 49 (1): 116–123. DOI 10.1111/evj.12521.

Taniguchi N, Kawakami Y, Maruyama I, Lotz M. 2018. HMGB proteins and arthritis. Human cell, 31 (1): 1–9. DOI 10.1007/s13577-017-0182-x.

Tao W, Levine AJ. 1999. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96 (12): 6937–6941. DOI 10.1073/pnas.96.12.6937.

Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. 2013. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype. Therapeutic opportunities. The Journal of clinical investigation, 123 (3): 966–972. DOI 10.1172/JCI64098.

Thielen NGM, van der Kraan PM, van Caam APM. 2019. TGFβ/BMP Signaling Pathway in Cartilage Homeostasis. Cells, 8 (9). DOI 10.3390/cells8090969.

Tian Y, Xu Y, Xue T, Chen L, Shi B, Shu B, Xie C, Max Morandi M, Jaeblon T, Marymont JV, Dong Y. 2017. Notch activation enhances mesenchymal stem cell sheet osteogenic potential by inhibition of cellular senescence. Cell death & disease, 8 (2): e2595. DOI 10.1038/cddis.2017.2.

Tnibar A, Schougaard H, Camitz L, Rasmussen J, Koene M, Jahn W, Markussen B. 2015. An international multi-centre prospective study on the efficacy of an intraarticular polyacrylamide hydrogel in horses with osteoarthritis. A 24 months follow-up. Acta veterinaria Scandinavica, 57: 20. DOI 10.1186/s13028-015-0110-6.

Toh WS, Brittberg M, Farr J, Foldager CB, Gomoll AH, Hui JHP, Richardson JB, Roberts S, Spector M. 2016. Cellular senescence in aging and osteoarthritis. Acta orthopaedica, 87 (sup363): 6–14. DOI 10.1080/17453674.2016.1235087.

Vaishya R, Vijay V, Lama P, Agarwal A. 2019. Does vitamin D deficiency influence the incidence and progression of knee osteoarthritis? - A literature review. Journal of clinical orthopaedics and trauma, 10 (1): 9–15. DOI 10.1016/j.jcot.2018.05.012.

van Weeren PR, Back W. 2016. Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, 32 (2): 229–247. DOI 10.1016/j.cveq.2016.04.003.

van Weeren PR, Grauw JC de. 2010. Pain in osteoarthritis. The Veterinary clinics of North America. Equine practice, 26 (3): 619–642. DOI 10.1016/j.cveq.2010.07.007.

Vinatier C, Domínguez E, Guicheux J, Caramés B. 2018. Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. Frontiers in physiology, 9: 706. DOI 10.3389/fphys.2018.00706.

Wang W, Sun L, Zhang P, Song J, Liu W. 2014. An anti-inflammatory cell-free collagen/resveratrol scaffold for repairing osteochondral defects in rabbits. Acta biomaterialia, 10 (12): 4983–4995. DOI 10.1016/j.actbio.2014.08.022.

Wang X, Hunter D, Xu J, Ding C. 2015. Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage, 23 (1): 22–30. DOI 10.1016/j.joca.2014.10.002.

Wuest SL, Caliò M, Wernas T, Tanner S, Giger-Lange C, Wyss F, Ille F, Gantenbein B,
Egli M. 2018. Influence of Mechanical Unloading on Articular Chondrocyte
Dedifferentiation. International journal of molecular sciences, 19 (5).
DOI 10.3390/ijms19051289.

Yao Y, Wang C. 2020. Dedifferentiation: inspiration for devising engineering strategies for regenerative medicine. NPJ Regenerative medicine, 5: 14. DOI 10.1038/s41536-020-00099-8.

Yudoh K, van Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. 2005. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. Arthritis research & therapy, 7 (2): R380-91. DOI 10.1186/ar1499.

Zayed M, Adair S, Ursini T, Schumacher J, Misk N, Dhar M. 2018. Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. Research in veterinary science, 118: 317–323.

DOI 10.1016/j.rvsc.2018.03.011.

Zhang M, Theleman JL, Lygrisse KA, Wang J. 2019. Epigenetic Mechanisms Underlying the Aging of Articular Cartilage and Osteoarthritis. Gerontology, 65 (4): 387–396. DOI 10.1159/000496688.

Zhao Z, Li Y, Wang M, Zhao S, Zhao Z, Fang J. 2020. Mechanotransduction pathways in the regulation of cartilage chondrocyte homoeostasis. Journal of cellular and molecular medicine, 24 (10): 5408–5419. DOI 10.1111/jcmm.15204.

Buchquelle:

Adams and Stashk's Lameness in horses, 6. Auflage; edited 2011 by Baxter G.; Blackwell Publishing, Ltd.; S.873-875

Internet:

Boster Biological; pathway Infocard – Oncogene-induced Senescence https://www.bosterbio.com/pathways/oncogene-induced-senescence (Zugriff: 13.01.2021)

Danmarks Tekniske Universitet; Department of Systems Biology; Jarmer H., Workman C.; 2010; Dimension reduction : PCA and Clustering; https://cbs.dtu.dk/chipcourse/Lectures/ClusteringPCA_2010.pdf (Zugriff: 26.04.2021) Explained Visually EV9-2015/02/12 Principal Component Analysis https://setosa.io/ev/principal-component-analysis/ (Zugriff: 25.04.2021) Fa. BINDER GmbH https://pages.binder-world.com/zellkultur (Zugriff: 03.02.2021)

Gansser O. 2017; Dimensionsreduktion mit PCA und EFA; Data analysis and academic research https://gansser.de/Dimensionsreduktion-PCA-EFA.pdf (Zugriff: 25.04.2021)

7.2. Abbildungs-/Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Principal component analysis (PCA) mit Clusterbildung in den Probengruppen Es sind die sechs Proben der jeweiligen Probengruppe graphisch in ihren zwei Hauptkomponenten (HK) dargestellt. In Grün die Proben der 2D Kultur (isolierte Chondrozyten), als Kreis in der Kultur ohne FCS, als Quadrat in der Kultur mit FCS. In Orange sind die Proben der 3D (Explants) dargestellt, als Kreis in der Kultur ohne FCS, als Quadrat in der Kultur mit FCS. Als blaue Dreiecke sind die nativen Knorpelproben eingetragen. In den jeweiligen Probengruppen sind Clusterbildungen sowohl in der 2D Kultur als auch in der 3D Kultur erkennbar. Die Varianz der HK-Werte sind hier bei der Kultivierung mit und ohne FCS sehr ähnlich. Die HK der nativen Proben weisen eine höhere Streuung zueinander auf. Die 2D-Kultur führt durch die Lösung der Zellen aus ihrem Verband und die dafür nötigen Bearbeitungsschritte zu einer Veränderung der Zelleigenschaften im Vergleich zum nativen Gewebe. Dieser Bearbeitungsschritt hat einen größeren Einfluss auf die Zellen, als die Kultivierung per se.

Abb. 2 Zusammenfassung der differentiellen Expression

Es ist eine Zusammenfassung der differentiellen Expression der hoch- und runterregulierten Gene der Vergleichsgruppen dargestellt. In Grün die Anzahl der hochregulierten Gene, in Rot die Herunterregulierten Gen. Auf der X-Achse sind die Vergleichsgruppen aus Kombination der Fünf Probengruppen (Chondrozyten ohne FCS, Chondrozyten mit FCS, Explants mit FCS, Explants ohne FCS, nativer Knorpel) als Balken dargestellt. Die Anzahl der DE-Gene können auf der Y-Achse abgelesen werden.

Abb. 3 Venn Diagramm A) aller differentiell exprimierten Gene, B) der gemeinsamen differentiell hoch- bzw C) herunter-regulierten Gene.

Abb. 4LogFCderrelevantenGeneinderKonditionNativerKnorpel vs. Chondrozyten + FCS

Zur Veranschaulichung der LogFC-Werte der relevanten Gene der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS sind diese Werte der 20 top-up (rot), der 20 top-down (grün) und der sieben seneszenz-relevanten Gene (blau) auf der Y-Achse eingetragen.

Abb. 5LogFCderrelevantenGeneinderKonditionNativerKnorpel vs. Chondrozyten – FCS

Zur Veranschaulichung der LogFC-Werte der relevanten Gene der Kondition Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS sind diese Werte der 20 top-up (rot), der 20 top-down (grün) und der sechs seneszenz-relevanten Gene (blau) auf der Y-Achse eingetragen.

Abb. 6LogFCderrelevantenGeneinderKonditionChondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS

Zur Veranschaulichung der LogFC-Werte der relevanten Gene der Kondition Chondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS sind diese Werte der 20 top-up (rot), der 20 top-down (grün) und der zwei seneszenz-relevanten Gene (blau) auf der Y-Achse eingetragen.

Tab. 1 Gruppenaufbau

Tab. 2 Verwendete Reagenzien und Medien

Tab. 3 Verwendete Materialien

Tab. 4 Verwendete Gerätschaften

Tab. 5 Zusammensetzung und Verwendung Kulturmedien

Tab. 6 Probengruppe 2 Aufbau

Tab. 7 Seneszenzmarker

Tab. 8 Anzahl der regulierten Gene je Vergleichsgruppe

Tab. 9 Liste der 20 Top-up, der 20 Top-down regulierten und der differenziell exprimiertenSeneszenz-assoziierten Gene des Vergleichs "Nativer Knorpel vs. Chondrozyten + FCS"inkl. Genname, logFC-Wert und, falls zutreffend, Funktionsgruppe (pro-inflammatorisch,
anti-inflammatorisch,
pro- apoptotisch,
anti-apoptotisch, chondroprotektiv,
chondrodegenerativ, pro-proliferativ, Entzündungsmediator) und Seneszenz-Assoziation

Tab. 10 9 Liste der 20 Top-up, der 20 Top-down regulierten und der differenziell Seneszenz-assoziierten Gene exprimierten des Vergleichs "Knorpel vs. Chondrozyten – FCS" inkl. Genname, logFC-Wert und, falls zutreffend, Funktionsgruppe (pro-inflammatorisch, anti-inflammatorisch, apoptotisch, proanti-apoptotisch, chondroprotektiv, chondrodegenerativ, pro-proliferativ, Entzündungsmediator) und Seneszenz-Assoziation

Tab. 11 Liste der 20 Top-up, der 20 Top-down regulierten und der differenziell exprimiertenSeneszenz-assoziiertenGenedesVergleichs"Chondrozyten + FCS vs. Chondrozyten – FCS" inkl. Genname, logFC-Wert und, fallszutreffend, Funktionsgruppe (pro-inflammatorisch, anti-inflammatorisch, pro- apoptotisch,

anti-apoptotisch, chondroprotektiv,chondrodegenerativ,pro-proliferativ,Entzündungsmediator) und Seneszenz- Assoziation

7.3. Abkürzungsverzeichnis

- AB Antibiotikum
- ACAN Aggrekan
- ACI autologe Chondrozyten-Implantation
- ACN Aggrekan
- ACP5 acid phosphatase 5, tartrate resistant
- ACS autologes konditioniertes Serum
- ACT autologe Chondrozyten Transplantation
- ADAM A Disintegrin And Metalloproteinase; deutsch: ein Disintegrin und Metalloproteinase
- ADAMTS A Disintegrin and Metalloproteinase with thrombospondin motifs; deutsch: Disintegrin und Metalloproteinase mit Thrombospondin
- ADM Adrenomedullin
- AGE Advanced Glycation Endproduct
- AKT(-Protein) Gen der Proteinkinase B
- AMT Amelotin
- ANGPT Angiopoietin 1
- ANKRD1 ankyrin repeat domain 1
- ANKRD37 ankyrin repeat domain 37
- AP activator protein; deutsch: Aktivator Protein

- APS autologes Proteinserum
- ASPM assembly factor for spindle microtubules
- ATM Ataxia telangiectasia mutated protein
- ATR Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
- AURKB Aurorakinase B
- BHLHE41 basic helix-loop-helix family member e41
- BMP bone morphogenetic protein; deutsch: Knochenmorphogenetisches Protein
- BRAF Gen, welches für B-RAF (Protoonkogen) codiert
- C1H15orf48 chromosome 1 C15orf48 homolog
- C1QB complement C1q b chain
- C1QC complement C1q C chain
- CA4 carbonic anhydrase 4
- CAV Caveolin
- CCNB1 cyclin B1
- CD163 CD163 Molekül
- CDGN –
- CDK Cyklin dependant kinase; deutsch: Cyklin abhängige Kinase
- CDK1 cyclin dependent kinase 1
- CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, Synonym: INK4A oder ARF
- CDT1 chromatin licensing and DANN replication factor 1
- CENPI centromere protein 1

- CHAD Chondroadherin
- CHEK Checkpointkinase-Gen
- CHK Checkpointkinase-Protein
- CHRDL1 chordin like 1
- CILP cartilage intermediate layer protein
- CLEC12 C-type lectin domain family 12 member A
- Col Kollagen
- COX Cyclooxygenase

CpG-Insel – Abschnitt auf der DNS mit sich häufig wiederholenden Cytosin-Guanin Nukleotidabfolge

- CRP C-reaktives Protein
- CSTA Cystatin A
- CTHRC1 collagen triple helix repeat containing 1
- CTSC Cathepsin
- CXCL C-X-C motif chemokine ligand
- CYTL1 cytokine like 1

DAMP – damage-related molecular patterns; deutsch: Schaden assoziierte molekulare Muster

DDR - DNA-damage-response; deutsch: DNS-Schadenanwort

- DE differential expression; deutsch: differentielle Expression
- DENND2D DENN domain containing 2D

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

- DRA MHC class II DR alpha chain
- ECM extracellular matrix;deutsch: extrazelluläre Matrix
- ECT2 epithelial cell transforming 2

EFEMP1 - EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1

- EGF epidermal growth factor, deutsch: Epidermaler Wachstumsfaktor
- ELF-3 E74 like factor 3
- EMS equines metabolisches Syndrom
- EO enchondrale Ossifikation
- ERGIC2 ERGIC and golgi 2

ERK – extracellular signal-related kinase; deutsch: extrazelluläre Signale regulierte Kinase

- EtOH Wasch-Ethanol
- FC Fold Change
- FCS fetal calf serum; deutsch: fetales Kälberserum
- FGF fibroblast-like growth factor
- FN1 Fibronektin 1
- FRMD7 FERM domain containing 7
- GADD 45β growth arrest and DNA damage-inducible 45β
- GAG Glykosaminoglykan
- GATA4 GATA binding protein 4
- GCH1 GTP cyclohydrolase 1

- GIMAP6 GTPase, IMAP family member 6
- GLIPR1 GLI pathogenesis related 1
- GM-CSF granulocyte/macrophage stimulating factors; deutsch: Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
- GRO growth regulated oncogenes; deutsch: Wachstum regulierter Onkogen
- HA hyaluronacid; deutsch: Hyaluronsäure
- HGF hepatocyte growth factor; deutsch:Hepatozyten Wachstumsfaktor
- HK Hauptkomponente
- HMGB high mobility group box
- i. a. intraarticular
- ID3 inhibitor of DNA binding 3, HLH protein
- IFITM5 interferon induced transmembrane protein 5
- IFN-y Interferon-y
- IGF insulin-like growth factor, deutsch: Insulinähnlicher Wachstumfaktor
- IGFBP2 insulin like growth factor binding protein
- IL Interleukin
- IL-1R1 Rezeptor ST2
- IL-1RAcP IL-1 Rezeptor-Accessoire-Protein
- ILT11A immunoglobulin-like transcript 11 A
- iNOS inducible nitric oxide synthase; deutsch: induzierbarer Stickstoffmonoxid Synthase
- IRAP Interleukin 1 Rezeptor Antagonist Protein

- ITIH5 inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 5
- JNK c-Jun N-terminal Kinase
- kbp kilobase pairs; deutsch: Kilobasen Paare
- KIF11 kinesin family member 11
- KM Kulturmedium
- LAG3 Lymphocyte activating 3
- LBP lipopolysaccharide binding protein
- LOC100050637 interferon-induced transmembrane protein 3
- LOC100061154 membrane- spanning 4-domains subfamily A member 6A
- LOC100067869 Haptoglobin
- LOC100068926 hemoglobin subunit epsilon
- LOC100071548 C-C motif chemokine 14
- LOC100630171 C-C motif chemokine
- LOG/log Logarithmus
- LUM Lumikan
- MAML Mastermind like protein
- MARCO macrophage receptor with collagenous structure
- MC-Medium MEF-conditioned medium
- MCP monocyte chemoattractant protein; deutsch: Monozyten-Chemoattraktant-Protein
- M-CSF Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
- Mdm2 murine double minute (mdm) oncogene, Regulator von p53 (Tumorsuppressor)

- MHC major histocompatibility complex
- MIA MIA SH3 domain containing

MIP – macrophage inflammatory protein; deutsch: Makrophagen-Entzündungsprotein

MIR8995 - eca-mir-8995

miRNA – micro RNA

MKP – Metakarpophalangealgelenk

MM – Mastermix

MMP – Matrix-Metalloproteinase

MNC – monocyte chemoattractant proteins; deutsch: Monozyten-Chemoattraktant-Proteinen

MPDZ – multiple PDZ domain crumbs cell polarity complex component

mPGES-1 - mikrosomale PGE-Synthese-1

MRC – mannose receptor C type 1

MSC – mesenchymale Stammzelle

MSR1 - macrophage scavenger receptor 1

mTOR - mechanistic Target of Rapamycin; deutsch: Ziel des Rapamycins

MTP – Metatarsophalangealgelenk

NCAPG – non-SMC condensin I complex subunit G

NDRG2 – NDRG family member 2

NEXT – Notch extracellular truncation

NF-KB – nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NGF - nerve growth factor

NICD – Notch intrazellular Domain

NK – natürliche Killerzelle

NO – Stickoxid

NSAID – non-steroidal anti-inflammatory drug; deutsch: nicht-steroidales Antiphlogistikum

NUSAP1 - nucleolar and spindle associated protein 1

O₂ – Sauerstoff

OA – Osteoarthritis

OCIAD2 – OCIA domain containing 2

OGN - Osteoglycin

OIS – onkogen induzierte zelluläre Seneszenz

p16INK4A – Tumorsuppressor

p19ARF – alternative reading frame (ARF) protein p19 bei der Maus, beim Menschen p14ARF

p21 - CDK1-Inhibitor

p38MAPK – p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen

p53 – Tumorsuppressor-Protein

PAHG – Polyacrylamid Hydrogel

PAMP – pathogen associated molecular pattern; deutsch: Pathogen assoziierte molekulare Muster

PBS – Phosphat buffered saline

- PCA principal component analysis;deutsch: Hauptkomponentenanalyse
- PDGF platelet-derived growth factor
- PEBP4 phosphatidylethanolamine binding protein 4
- PGE-2 Prostaglandin E2
- PI3 Peptidas inhibitor 3
- PI3K Phosphoinositid-3-Kinase
- PIP3 Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
- PRP platelet rich plasma; deutsch: Plättchen reiches Plasma
- PRR pattern recognition receptor; deutsch: Mustererkennungsrezeptoren
- PSAT1 phosphoserine aminotransferase 1
- PSGAG Polysulfatierte Glycosaminoglykane
- PTEN Phosphatase and tensin homolog
- QPCT glutaminyl-peptide cyclotransferase
- RAGE Rezeptor für AGE
- RB Retinoblastom-Protein, ein Tumorsuppressorprotein
- RBP1 retinol binding protein 1
- RBPjk Recombination-signal-binding-protein-for-immunoglobulin-kappa-J-region
- RFC4 replication factor C subunit 4
- ROS reactive oxygen species, deutsch: reaktive Sauerstoffspezies
- RPN1 Ribophorin 1
- RRM2 ribonucleotide reductase regulatory subunit M2

RS - replikative Seneszenz; ODER: telomerinduzierte Seneszenz

RUNX2 – Runt-related transcription factor 2

SAHF – senescence-associated heterochromatic foci; deutsch: Seneszenz-assoziierte heterochromatische Herde

SASP – Senescence-Associated Secretory Phenotype; deutsch: Seneszenz-asoziierter sekretorischer Phänotyp

SA- β -Gal – senescence-associated- β -galactosidase; deutsch: Seneszenz-asoziierte β -Galactosidase

SCD – stearoyl-CoA desaturase

SIDT2 – SID1 transmembrane family member 2

SIN3A – SIN3 transcription regulator family member A

SIPS – stress induced premature senescenz; deutsch: Stressinduzierte vorzeitige Seneszenz

SLC1A – solute carrier family 1 member 2

SLC39A14 - solute carrier damily 39 member 14

SLC6A9 - solute carrier family member 9

SOD3 – Superoxide Dismutase 3

SOX-9 – sex related Y chromosom (SRY) related HMG box

sPA2 – lösliche Phospholipase 2

SREBF2 – sterol regulatory element binding transcription factor 2

STK17B - serine/threonine kinase 17b

STRA6 – signaling receptor and transporter of retinol STRA6

SUB1 – SUB1 regulator of transcription; Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15

- SYVN1 Synoviolin 1
- T75 Zellkulturflasche
- TA Triamcinolon
- TGF- β Transforming growth factor- β
- TIMP Gewebehemmer der Metalloprotease
- TLR Toll-like-Rezeptor
- TNC Tenascin C
- TNF- α Tumornekrosefaktor α
- TPM1 Tropomyosin 1
- TP53 Tumorsuppresor-Gen p53
- TRAOP trophinin associated protein
- TSPAN8 tetraspanin 8
- TYROBP Transmembran immune signaling adaptor
- VCAN Versikan

VEGF – vascular endothelial growth factor; deutsch: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

VNN1 – Vanin 1

wP – wässrige Phase