

Aus der orthopädischen Klinik  
der Universität Würzburg  
im König-Ludwig-Haus  
Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**BEDEUTUNG VON DNS-POLYMORPHISMEN BEI ARTHROSE**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Lars Eden  
aus Dortmund

Würzburg, Dezember 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer.nat. Norbert Schütze

Koreferent: Professor Dr. Franz Jakob

Dekan: Professor Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Das Krankheitsbild der Arthrose .....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klinik.....	2
1.1.3	Therapiemöglichkeiten der Arthrose .....	4
1.1.4	Pathophysiologie des Arthrose-Prozesses .....	5
1.1.5	Il-1, TNF-alpha, Matrixmetalloproteinasen .....	7
1.1.6	Primäre vs sekundäre Arthrose .....	9
1.1.7	Genetik der Arthrose.....	10
1.2	Fragestellung .....	11
2	Material und Methoden .....	12
2.1	Der Womac-Score .....	12
2.2	Fragebogen „Arthrostudie“ .....	12
2.3	Material .....	13
2.4	Geräte .....	14
2.5	Methoden .....	15
2.5.1	DNS-Extraktion .....	15
2.5.2	PCR (Polymerase Kettenreaktion) .....	16
2.5.3	Restriktion .....	18
2.5.4	Gelelektrophorese.....	19
2.5.5	Kapillarelektrophorese/Fragmentanalyse .....	19
2.6	Statistik .....	20
2.6.1	Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson .....	20
2.6.2	Der Fisher-Exakt-Test .....	20
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Patientenauswahl und Aufbau der Gruppen.....	22
3.2	Darstellung der Gruppencharakteristika .....	23
3.2.1	Altersdurchschnitt.....	24
3.2.2	Der Body Mass Index (BMI) .....	25
3.2.3	Geschlecht .....	27
3.2.4	Der Womac-Score .....	28
3.3	Allelverteilungen der Polymorphismen .....	29

3.4	<i>Statistische Auswertung</i> .....	36
4	Diskussion .....	38
4.1	<i>Einleitung</i> .....	38
4.2	<i>Bewertung des Studiendesigns</i> .....	38
4.3	<i>Auswahl der Polymorphismen</i> .....	41
4.4	<i>Ergebnisse der Studie</i> .....	43
4.5	<i>Ausblick für die Zukunft</i> .....	44
5	Zusammenfassung.....	46
6	Abkürzungsverzeichnis .....	48
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	49
8	Literaturverzeichnis .....	51

# 1 Einleitung

## *1.1 Das Krankheitsbild der Arthrose*

### *1.1.1 Epidemiologie*

Nicht zu Unrecht gilt die Arthrose als Volkskrankheit: Es handelt sich um die weltweit am häufigsten auftretende Gelenkerkrankung von Erwachsenen und gleichzeitig um die häufigste Krankheit von älteren Menschen. Arthrosen machen mehr als 50% der chronischen Erkrankungen jenseits des 60. Lebensjahres aus (Petersson et al. 1996). Kellgren und Lawrence stellten 1958 eine Prävalenz radiologisch diagnostizierter Kniearthrose von 40,7% bei Frauen und 29,8% bei Männern im Alter zwischen 55 und 64 Jahren fest.

Arthrose hat weitreichende Einschränkungen des Alltagslebens zur Folge. Neben Einschränkungen im Beruf (65,7%) gaben in einer französischen Studie von Fautrel (2004) viele Kniearthrotiker Probleme beim Einkaufen (65%) und bei Freizeitaktivitäten an (22,8%) an. In einer englischen Studie gaben 90% der Arthrosepatienten an funktional in ihrem Alltagsleben eingeschränkt zu sein (Carr 1999).

Auch volkswirtschaftlich spielt die Arthrose eine bedeutende Rolle: 1997 fielen im Zusammenhang mit Arthrose 16,26 Milliarden DM durch direkte und indirekte Kosten an (Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 42, 16. Oktober 1998).

Es ist davon auszugehen, dass jeder vierte Mensch nach Erreichen des 60. Lebensjahres aufgrund von Arthrose an erheblichen Schmerzen oder Funktionsstörungen an einem der Gelenke außerhalb der Wirbelsäule leidet. Auch bereits im mittleren und jüngeren Erwachsenenalter treten Arthrosen auf, so dass rund 40% aller Reha-Maßnahmen und 27% der Frühberentungen degenerativen Erkrankungen am Bewegungsapparat zuzuschreiben sind (Puhl, 1997). Das Kniegelenk stellt dabei das am häufigsten befallene Gelenk dar (Wagenhäuser 1969).

### **1.1.2 Klinik**

In der Klinik differenziert man zwischen erregerbedingt-entzündlichen und entzündlich-rheumatischen Arthritiden auf der einen Seite sowie der primären und sekundären Arthrose auf der anderen Seite.

Die Arthrose kann in jedem Alter auftreten. Allerdings ist mit zunehmendem Alter eine gesteigerte Inzidenz der Erkrankung festzustellen, so dass das Alter einen wichtigen Risikofaktor darstellt. Klinisch äußert sich die Arthrose durch Schmerzen insbesondere bei Belastung. In Ruhe bildet sich der Schmerz in den Anfangsstadien zurück, in fortgeschrittenen Stadien kann der Schmerz auch in Ruhe und nachts auftreten. Die Patienten berichten häufig über Steifheit im befallenen Gelenk. Besonders typisch ist die Morgensteifheit, die innerhalb von 30 Minuten nach dem Aufstehen wieder nachlässt. Bei der klinischen Untersuchung zeigen sich druckschmerzhafte Zonen über dem Gelenk, in der Muskulatur, über Sehnen- und Bandansätzen (Tendomyosen, Insertionstendopathien). Durch Beugung und Streckung des Gelenks mit aufgelegter Hand lässt sich häufig ein feines Reiben bis grobes Knirschen feststellen, was als Krepitation bezeichnet wird. Nicht selten kommt es zu einem Gelenkerguss, der sich nach Ausstreichen des oberen Recessus als „tanzende“ Patella präsentieren kann. Die Beweglichkeit des entsprechenden Gelenks kann durch eine zunehmende Versteifung durch mangelnde Kongruität sowie Muskelkontrakturen eingeschränkt sein. In fortgeschrittenen Stadien sind Osteophyten als knöcherne Vergrößerungen an den Gelenkrändern zu palpieren. Als Komplikation kann eine Baker Zyste in der Kniekehle auftreten (Rössler/Rüther 2000).

Radiologisch stellt sich die Arthrose durch vier klassische Zeichen dar (siehe Abb. 2):

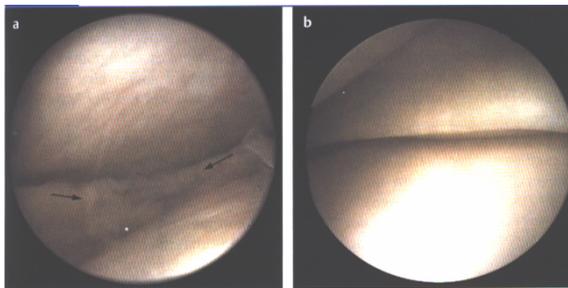
1. Verschmälerung des Gelenkspalts,
2. subchondrale Sklerose,
3. Osteophyten und
4. Geröllzysten.

Die röntgenologischen Veränderungen werden entsprechend der Kellgren- und Lawrence-Kriterien (Kellgren und Lawrence 1957) in fünf Gruppen (0 bis 4) eingeteilt. Radiologische Befunde müssen jedoch nicht mit dem klinischen Beschwerdebild korrelieren.

Die Kernspintomographie ist ein weiteres diagnostisches Medium. Insbesondere bei Knieschmerzen mit Instabilitäts- oder Blockierungssymptomen kommt dem MRT zum Ausschluss von Meniskus- oder Bandläsionen eine hohe Bedeutung zu.

Bei der Arthroskopie handelt es sich um die diagnostische Methode mit der höchsten Spezifität und Sensitivität. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die Arthroskopie den Goldstandard in der Diagnostik der Arthrose darstellt (Klashman 1996). Nachteil der Arthroskopie ist, dass es sich um ein invasives Verfahren mit entsprechendem Komplikationsrisiko handelt.

Wissenschaftler und Chirurgen teilen den Gelenkverschleiss (Chondromalazie) in vier Kategorien ein. Sie beinhalten Grad I – Erweichung und Schwellung, Grad II – Zotten und Fasern, Grad III – Rissbildung sowie Grad IV – Erosion bis auf den subchondralen Knochen, wobei jegliches Knorpelgewebe fehlt.



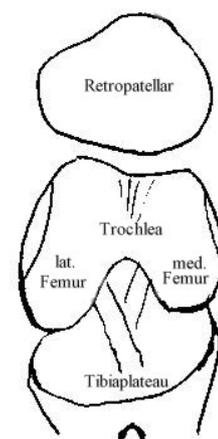
**Abb. 1: Arthroscopisches Bild einer Kniearthrose (links) (MLP-duale Reihe, Orthopädie)**



**Abb. 2: Radiologisches Bild einer medial betonten Gonarthrose (Rössler, Rüter, Orthopädie)**

Das Kniegelenk wird in drei Kompartimente mit jeweils zwei Gelenkflächen unterteilt (siehe Abb. 3):

1. Retropatellar – Trochlea
2. Medialer Femurkondylus – mediales Tibiaplateau
3. Lateraler Femurkondylus – laterales Tibiaplateau



**Abb. 3: Das Kniegelenk (Schematisch)**

### ***1.1.3 Therapiemöglichkeiten der Arthrose***

Leider gibt es bis zum heutigen Tag keine wirklich kausale, kurative Therapie, die die Arthrose stoppt und im Anschluss sogar zu einer Heilung, also der Rekonstruktion eines gleichwertigen Knorpels, führt.

Die konservative Therapie teilt sich in die pharmakologische und die nicht pharmakologische Therapie auf. Nicht pharmakologisch stehen physikalische Maßnahmen im Vordergrund, die der Prävention bzw. Lösung von Kontrakturen und der besseren Durchblutung des Knorpels dienen. Wärme wirkt besonders im chronischen Zustand schmerzlindernd, während im aktivierten Zustand eher die Kryotherapie zu bevorzugen ist.

Pharmakologisch erfolgt die Therapie analgetisch, aber auch antiphlogistisch. Sie folgt somit der Erkenntnis, dass Arthrose unter anderem auch ein entzündlicher Prozess ist. Hierzu dienen die nicht-steroidalen Antirheumatika ebenso wie die COX-2 Hemmer. Letztere sind allerdings wegen des nachgewiesenen Nebenwirkungsprofils in der näheren Vergangenheit in den Hintergrund gedrängt worden.

Einen ähnlichen Ansatz haben Glukokortikoidinjektionen in das Gelenk. Neuste Versuche machen sich die Pathophysiologie der Arthrose noch gezielter zu Nutze, indem sie Anti-Interleukin-1 alpha oder Anti-TNF alpha aus venösem Patientenblut gewinnen, im Labor amplifizieren und dann intraartikulär injizieren. Diese Therapie ist allerdings noch extrem teuer, in der Breite noch nicht applizierbar sowie randomisiert kontrollierte Studien zum Nachweis einer Wirkung nicht publiziert.

Bei all diesen Ansätzen muss allerdings erwähnt werden, dass die Entwicklung der Arthrose im besten Falle gestoppt werden kann. Bestehende Knorpelschäden lassen sich so nicht wieder beheben. In fortgeschrittenen Stadien helfen teilweise palliative Maßnahmen, wie zum Beispiel die arthroskopische Gelenkspülung, das Anlegen von Bohrkanälen (Pridie-Bohrung), Mikrofrakturierung oder die Entfernung von Gelenkkörpern. Bei der Pridie-Bohrung und der Mikrofrakturierung kommt es zu einer Knorpelneubildung, allerdings ist der neu wachsende Knorpel in seiner Qualität minderwertig. Sehr interessante, neue Ansätze folgen dem Prinzip der autologen Knorpelzelltransplantation. Einschränkend muss allerdings festgestellt werden, dass hierzu noch keine Langzeitergebnisse existieren und der Knorpeldefekt sehr umschrieben sein muss, um durchführbar zu sein. Im Bereich der Forschung befinden

sich noch Versuche mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Bereich des Tissue Engineering. Auch hier fehlt noch weiteres Verständnis bezüglich der Regeneration des Gewebes, da bislang nur Faserknorpel regeneriert werden konnte.

Als ultima ratio hilft meistens nur die Implantation einer Total-Endo-Prothese (TEP). Diese Operation macht den klinischen Alltag vieler orthopädischer und unfallchirurgischer Kliniken aus. Allein im Jahr 2002 wurden in Deutschland 60.000 Knie-Total-Endo-Prothesen implantiert mit steigender Tendenz für die Zukunft. Im Jahr 2005 werden es voraussichtlich über 100.000 sein.

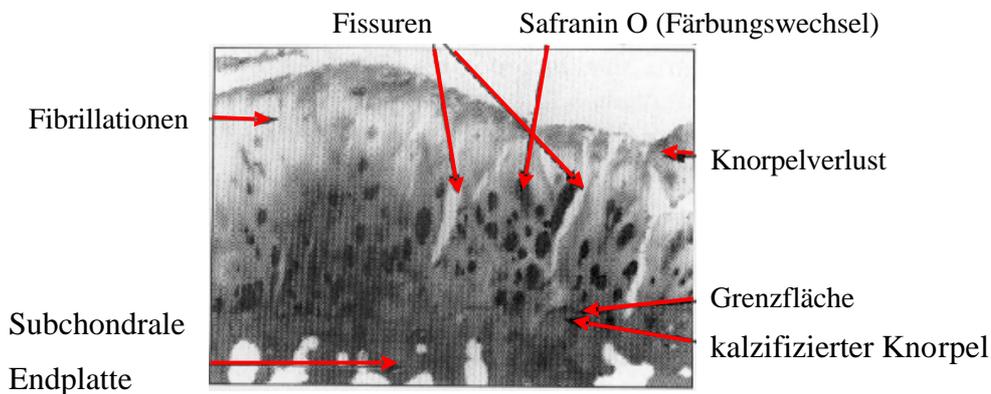
#### ***1.1.4 Pathophysiologie des Arthrose-Prozesses***

Bei Arthrose handelt es sich in erster Linie um eine irreversible Degeneration des Knorpelgewebes, die in der Maximalform bis auf den Knochen reicht (Knochenglatze). Sekundär kommt es häufig zu Knochenläsionen und entzündlich bedingten Schrumpfungen der Gelenkkapsel.

Der Gelenkknorpel besteht aus hyalinem Knorpel. Dieser ist relativ zellarm und besteht überwiegend aus Wasser. Die Extrazellulärmatrix setzt sich vor allem aus Kollagen II und Proteoglykanen zusammen (siehe Tabelle 1.1.4-1).

Chondrozyten	1-10%
Wasser	70-80%
Kollagen	12-14%
- Typ II	10-12%
- Typ IX	ca. 1%
- Typ XI	ca. 1%
Mineralsubstanzen	<4%
Matrixproteine	<1%
Proteoglykane	7-9%
- Hyaluronsäure-Proteoglykan-Aggregate	6-8%
- andere Proteoglykane	ca. 1%

**Tabelle 1.1.4-1: Zusammensetzung des Gelenkknorpels (nach J. Metz)**



**Abb. 4: Histologisches Bild einer Chondromalazie**

Jahrzehntlang war vorherrschende Meinung, dass Arthrose eine reine Verschleißerkrankung sei – als logische Konsequenz des Alterns und der Reibung zwischen zwei Flächen. Dies führe zu einem initialen Aufbrechen der oberflächlichen Kontinuität der Faserarchitektur (siehe Abb. 4) und in der Folge zum Zerreißen der fibrillierten Matrix im Sinne einer Verschleißerkrankung. Dies wird im angloamerikanischen Sprachgebrauch als *wear and tear* bezeichnet (Otte 2000).

Im deutschsprachigen Raum ordnet man die Arthrose traditionell und in Abgrenzung zu den entzündlichen z.B. rheumatischen Gelenkerkrankungen den degenerativen Gelenkerkrankungen zu. Das erklärt die Endung „-ose“ im Unterschied zu „-itis“ bei Entzündungen. Einen detaillierten historischen Überblick über die Entwicklung des Begriffs der Arthrose liefert Hackenbroch in seinem Werk *Arthrosen* (Hackenbroch 2002).

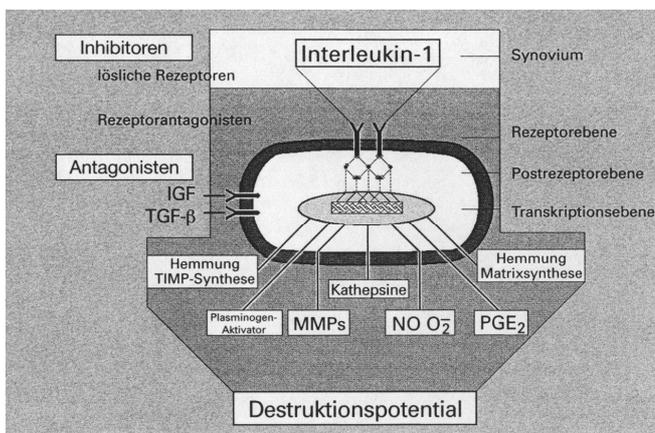
In der neueren Literatur geht man nun verstärkt davon aus, dass die Arthrose ein viel komplexeres Zusammenspiel aus genetischen Faktoren, lokaler Entzündung, mechanischen Kräften sowie zellulären und biochemischen Prozessen darstellt, als der Begriff einer reinen Verschleißerkrankung zu umfassen vermag. Andernfalls ließe es sich wohl nur schwer erklären, warum manche Patienten noch im Alter von 80 Jahren von einem unverbrauchten Knorpel profitieren und andere Patienten mit 30 Jahren – ohne erkennbare Ursache – bereits eine Arthrose entwickeln.

In zahlreichen Studien und Veröffentlichungen setzt sich mittlerweile die Ansicht durch, dass es sich um einen Arthrose-Prozess handelt. Das klinische Bild der Arthrose ist somit das Endbild eines durch jegliche Art von Stress in Gang gesetzten, via

zahlreicher Entzündungsmediatoren am Leben gehaltenen Degradationsprozess des Knorpels. Genauer betrachtet gerät das Gleichgewicht zwischen den degradierenden, knorpelzerstörenden Enzymen und den aufbauenden, knorpelproduzierenden Faktoren zu Gunsten der katabolen Seite außer Kontrolle (Buckwalter et al. 1998). In diesem Prozess scheinen proinflammatorische Zytokine wie das Interleukin-1 und der Tumornekrosefaktor alpha sowie die durch sie aktivierten degradierenden Enzyme (z.B. MMPs) eine entscheidende Rolle zu spielen (Fernandes et al. 2002).

### 1.1.5 *Il-1, TNF-alpha, Matrixmetalloproteinasen*

Interleukin-1 (Il-1) wird zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt. Es spielt bei zahlreichen Prozessen und vor allem entzündlichen Erkrankungen im Körper eine wichtige Rolle (z.B. der Silikose, Rheumatoide Arthritis). Es vermag eine Kaskade von Enzymaktivierungen starten, die Otte als „Deltaeffekt“ (siehe Abbildung 6) bezeichnet. Es existiert eine alpha und eine beta-Form, beta ist mengenmäßig stärker vertreten, beide wirken am gleichen Rezeptor.



**Abb. 5: Übersicht über die Interleukin-1-Effekte (Otte 2000)**

Interleukin-1 (Il-1) wird meist durch Monozyten oder Makrophagen, aber auch durch Chondrozyten freigesetzt, bindet an den Rezeptor der Zielzelle (hier: Chondrozyt) und beeinflusst durch Postrezeptorprozessierung im Zytoplasma die Transkription im Zellkern. Um den Rezeptor konkurriert der Il-1-Rezeptorantagonist (ra), der gebunden wird, dann aber kein Signal weitergibt (Otte 2000).

Durch Il-1 werden vor allem die Matrix-Metalloproteinasen aktiviert, die ihrerseits in der Lage sind, unter anderem Kollagen II, IX oder Proteoglykane (siehe Tabelle 1.1.4-1, Abb. 5) zu spalten.

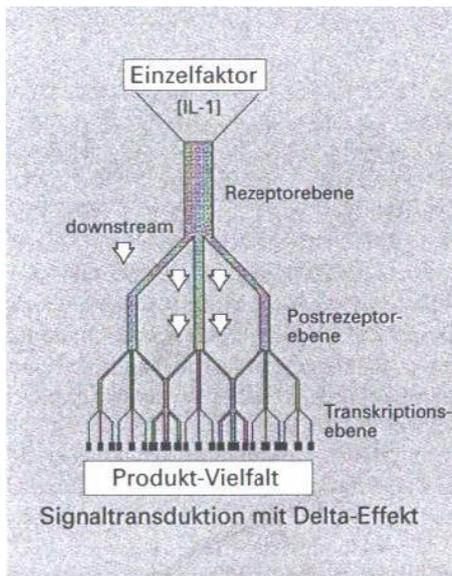


Abb. 6: „Deltaeffekt des Il-1 (Otte 2000)“

Bei Arthrosepatienten konnte im Gelenk eine signifikant erhöhte Konzentration von Il-1 zum Vergleichskollektiv festgestellt werden (Schlaak et al. 1996).

Dem Il-1 sehr ähnlich, jedoch in seiner Potenz nicht ganz so stark, ist der Tumornekrose-Faktor alpha. Wie Il-1 spielt auch TNF alpha in vielen entzündlichen Prozessen des Körpers eine Rolle. Auch TNF alpha ist in der Lage, durch einen Rezeptor die Transkription degradierender Enzyme zu steigern und somit den Arthrose-Prozess in seiner Aktivität zu verstärken. Bei der rheumatoiden Arthritis wurde nachgewiesen, dass er den Beginn einer Inflammation zu beschleunigen vermag. So führt eine Blockade von TNF alpha durch einen Antikörper auch zu einer Verzögerung des Ausbruchs, allerdings nicht zu einem Stopp eines bereits fortgeschrittenen Prozesses. Il-1 hingegen ist sogar alleinig in der Lage, die Knorpeldestruktion in Gang zu setzen, zu unterhalten und die Produktion neuen Gelenkknorpels zu verhindern (Goldring 2000; van den Berg 1999).

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind zinkenthaltende Enzyme, die nach ihrer Aktivierung durch Plasmin in der Lage sind, Matrixbestandteile zu spalten. Es wurden bislang 25 MMPs identifiziert. Im Arthrose-Prozess spielen die Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, und MMP-13), die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), die

Die Potenz von Il-1 im Arthroseprozess ist mittlerweile unumstritten. Man konnte im Tierversuch nachweisen, dass vollkommen intakter Knorpel nach traumatischer Schädigung durch intraartikuläre Gabe von Il-1 destruiert wird (Patwari 2003; Saklatwala et Dingle 1980). Il-1-Rezeptorantagonisten sind hochdosiert in der Lage, den Arthrose-Prozess weitestgehend zu stoppen (Dayer and Bresnihan 2002; Van den Berg WB et al. 1994; Fernandes et. al 1999). Bei Arthrosepatienten konnte im

Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), die Matrilysine und die Membrantype-MMPs (MT-MMPs) eine entscheidende Rolle (Murphy et al. 2002). Sie können die einzelnen Bestandteile des Knorpels, insbesondere die Matrix, sehr spezifisch spalten. So spalten die Kollagenasen unter anderem Kollagen II, und das hier untersuchte Stromelysin vermag Gelatin, Fibronectin, Laminin, Aggrecan und die Kollagene III, IV, IX und X zu spalten, ausgenommen das Kollagen II (Fuchs et al. 2004). MMP-3 ist – im Gegensatz zu gesunden Kollektiven – bei entzündlichen Prozessen im Gelenk nachgewiesen worden, was seine Wichtigkeit gerade im pathologischen Arthroseprozess unterstreicht (McCachren 1991, Lohmander et al. 1993). Die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) greifen die bereits durch die Kollagenasen gespaltenen Kollagenfragmente an. Gehemmt wird dieser Prozess durch den *Tissue Inhibitor of Metallo Proteases* (TIMP), der gerade im Knorpelgewebe der Hauptgegenspieler der MMPs ist. Entscheidend für den Knorpel ist das richtige Gleichgewicht zwischen aufbauenden und abbauenden Prozessen (Gomez et al. 1997).

#### ***1.1.6 Primäre vs sekundäre Arthrose***

Das klinische Bild der Arthrose teilt man entsprechend seiner Ätiologie in zwei Gruppen: die primär- idiopathischen und die sekundären Arthrosen.

Bei einem Teil der Arthrosen sieht man den Grund in einer pathogenen Lastübertragung basierend auf einer Gelenkinstabilität, z.B. nach Kreuzbandriss, bei Fehlstellung des Beins (Genu valgum oder varum) oder bei neuromuskulären Disbalancen. In diesen Fällen ist das Gelenk biomechanisch nicht in der Lage, unter der Toleranzgrenze der physiologisch angestrebten Druckverteilung zu bleiben. Dieser mechanische Reiz überlastet die Chondrozyten, die ihrerseits den Arthroseprozess einleiten. Eine hochgradige Chondromalazie ist häufig nicht zu vermeiden. Diese Formen der Arthrose bezeichnet man klinisch als sekundäre Arthrosen.

Als klinische „Platzhalterdiagnose“ bleibt die primäre, idiopathische Arthrose. Ihr ordnet man die Chondromalazien zu, bei denen keine erkennbaren Ursachen zum Knorpelverschleiß geführt haben. Sie kann in jedem Alter auftreten und alle Ausprägungsgrade haben. Für die Ätiologie kennt man bis heute keine plausible Erklärung. Vermutet wird ein multifaktorielles, systemisches Geschehen mit gelenkspezifischen Unterschieden.

In den letzten 10 Jahren legen zahlreiche Zwillingsstudien sowie Genanalysen die Vermutung nahe, dass die Arthrose eine komplexe Krankheit mit einer erheblichen genetischen Komponente darstellt (u.a. Kellgren et al. 1963; Spector 1996; Loughlin 2001). Sicherlich kann man annehmen, dass die Genetik auch in den anderen Formen der Arthrose eine Rolle spielt, nur stellt sie bei der primären Form am ehesten einen wichtigen Faktor dar.

### ***1.1.7 Genetik der Arthrose***

Die hier vorliegende Studie stützt sich auf die im vorigen Abschnitt geäußerte Vermutung: nämlich dass die Genetik einen Hauptfaktor bei der Entstehung der primären Arthrose bildet.

Genetik ist in diesem Zusammenhang ein weitgefasster Begriff und bedeutet zunächst, dass die Ursache auf Ebene der DNS zu suchen ist.

Der vorliegende Ansatz untersuchte Gene, die Schlüsselfunktionen im Arthroseprozess einnehmen, so genannte Kandidatengene. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei den Polymorphismen zuteil – vor allem in kodierenden Bereichen, zum Beispiel dem Promoter oder dem von Exons. Es wurden die oben erwähnten Gene Il-1 alpha und beta, TNF alpha und MMP-3 ausgewählt, weil sie diesen Ansprüchen gerecht werden.

Bei Polymorphismen handelt es sich um Regionen auf der DNS, in denen eine einzige Base den Unterschied zwischen Individuen oder sogar zwischen zwei Allelen ausmacht. So lautet bei einem Menschen die Region beispielsweise TTCGA, bei einem anderen TTAGA. Die so genannten *Single Nucleotid Polymorphisms* (SNPs) sind per definitionem so klein, dass ihnen der Evolutionsdruck nichts anhaben kann, denn die meisten dieser Änderungen bleiben ohne Auswirkung auf die Reproduktionsfähigkeit eines Individuums. Jedoch kann es durchaus sein, dass sie Einfluss auf die Entwicklung von Krankheiten haben (Cichon 2002, Desmond 2002). So können solche SNPs in wichtigen Regionen wie in der oben erwähnten Promoterregion eines Gens vorkommen. Promoter stellen spezifische Stellen der DNS dar, an denen die Sigma-Untereinheit der RNA-Polymerase bindet. Je höher die Affinität zu einer Promoterregion ist, desto leichter wird an dieser Stelle die Transkription starten können. So nimmt der Polymorphismus Einfluss auf die Konzentration oder Funktion verschiedener Zytokine oder Enzyme, die in dem Arthrose-Prozess eine Rolle spielen.

## ***1.2 Fragestellung***

Sicher haben die Erkenntnisse über den eigentlichen Arthrose-Prozess zu großen Fortschritten in der Arthroreforschung geführt, allerdings wird es für die Zukunft sehr viel interessanter sein zu erfahren, warum es zur Knorpeldegradation kommt. Ein besseres Verständnis der Ätiologie ist unerlässlich, um dem eigentlichen Ziel in Zukunft näher zu kommen: einer Vermeidung sowie Heilung der Arthrose.

Zwillingsstudien legen die Vermutung nahe, dass die Genetik eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt.

Viele bereits durchgeführte Studien lieferten allerdings widersprüchliche Ergebnisse, wiesen zu geringe Fallzahlen auf oder definierten die Kollektive nur unzureichend.

Das Ziel dieser Studie war es klar definierte Kollektive mit möglichst extremen Zuständen gegenüberzustellen.

Dies wurde durch folgende Punkte zu erreichen versucht:

- Gegenüberstellung von jungen an Arthrose leidenden Patienten (<45 Jahre) und Patienten fortgeschrittenen Alters (>55 Jahre) mit gesundem Kniegelenk sowie einer dritten Gruppe altersassoziierter Kniearthrotiker
- Rigide Ausschlusskriterien zur Erlangung einer eindeutigen Diagnose (primäre Arthrose)
- Rekrutierung von mindestens 100 Patienten pro Gruppe
- Auswahl erfolgversprechender Polymorphismen (Kandidatengene)
- Durchführung einfacher und etablierter experimenteller Verfahren (PCR, Restriktion, Gen-Sequencer)
- Klare Zuordnung der Allelverteilungen in der Auswertung
- Statistische Auswertung der Allelverteilungen

Mit der Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis der Bedeutung der hier untersuchten Polymorphismen bei der Arthroseentstehung geliefert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Der Womac-Score

*Womac* steht für Western Ontario Mac Master University-Index, ein Index, der auf mehreren Messebenen den Schmerz, die Steifheit und die so genannte funktionelle Kapazität von Patienten mit Kniegelenksarthrose erfasst (Bellamy 1988). Es wurde die für das Deutsche modifizierte Form gewählt (Stucki et al. 1996).

In 24 Fragen aus drei Kategorien (Schmerz: 5, Steifheit: 2 und Funktion: 17) beurteilt der Patient anhand einer visuellen Skala von 0 (keine Beschwerden) bis 10 (maximale Beschwerden) sein subjektives Empfinden. Bei der Auswertung wurden die jeweils erreichten Punktzahlen addiert und in den einzelnen Kategorien dargestellt. So konnte in der Kategorie Schmerz ein Punktwert zwischen 0 und 50, in der Kategorie Steifheit zwischen 0 und 20 und bezüglich der Funktion zwischen 0 und 170 erreicht werden. Zur Vereinfachung wurde im vorliegenden Fall in der Darstellung der Gesamtscore, also die Summe aller Einzelwerte, verwendet. Ausgewertet wurden die Daten durch das Programm SPSS Version 12.0.

**Abb. 7: Visuelle Skala – Womac Score**

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Keine											Maximale
Beschwerden											Beschwerden

### 2.2 Fragebogen „Arthrostudie“

## Fragebogen „Arthrostudie“

Name: \_\_\_\_\_ Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

1. Führen Sie Ihre Arthrose/Ihren Gelenkverschleiß auf einen Unfall zurück? Wenn ja, wann war der Unfall und welcher Art war er?

- 
2. Haben Sie einen Sport über lange Jahre hinweg sehr intensiv betrieben? Wenn ja welchen oder welche?
- 

- 
3. Treiben Sie heute immer noch Sport? Wenn ja, welchen?
- 

4. Haben Sie Arthrose nur an einem oder auch an anderen Gelenken? Wenn ja, an welchen?
- 

5. Ist Ihnen Arthrose (auch) bei anderen Mitgliedern Ihrer Familie bekannt?
- 

6. Wie groß und wie schwer sind Sie?
- 

7. Welchen Beruf üben Sie aus und worin besteht Ihre hauptsächliche Tätigkeit dabei (eher stehend, sitzend, körperlich belastend)?
- 

8. Auf einer Skala von 1 bis 10, wie würden Sie die Belastung bzw. Einschränkung des normalen Alltagslebens durch die Arthrose bewerten? ( 1= gar keine Belastung/Einschränkung; 10= unerträgliche Belastung)
- 

### **2.3 Material**

- Ü Blutproben: Die Rekrutierung der Blutproben erfolgte durch die Blutentnahme auf den Stationen des König-Ludwig-Hauses, bei Patienten, die zur Knieoperation anstanden. Bei Patienten die bereits operiert wurden und schon entlassen worden sind, kontaktierte man sie telefonisch und bat sie für die Blutentnahme ins König-Ludwig-Haus zu kommen. Wohnte der Patient zu weit



Ü Kamera

Polaroid

## **2.5 Methoden**

### **2.5.1 DNS-Extraktion**

Zur DNS-Extraktion wurde den Patienten venöses Blut aus der Armvene in 9 ml EDTA-Monovetten abgenommen und im Kühlschrank bei 4°C oder im Eisschrank bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung der DNS aus den Granulozyten des Blutes wurde das Test-System QIAamp® Blood Kit von QIAGEN verwendet.

Dazu wurden zunächst 20 µl QIAGEN Protease in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert, gefolgt von 200 µl der Probe Vollblut und 200 µl des AL-Puffers. Das Mikrozentrifugenröhrchen wurde anschließend für 15 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 56°C inkubiert.

Anschließend folgte ein kurzes Zentrifugieren zum Entfernen der Blasen. Hinzu kamen 200 µl Ethanol (96-100%), die erneut für 15 Sekunden gevortextet und zentrifugiert wurden, um wiederum die Blasen zu entfernen.

Die Mischung musste dann auf eine QIAamp spin Säule gefüllt werden, ohne den Rand zu befeuchten. Das Röhrchen wurde geschlossen und eine Minute bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Nach dem Öffnen der QIAamp spin Säule wurden 500 µl AWI-Puffer dazupipettiert, ohne den Rand anzufeuchten. Das geschlossene Röhrchen wurde dann bei 6000 x g (8000 rpm) für eine Minute zentrifugiert, die QIAamp spin Säule in ein sauberes 2 ml Sammelröhrchen gefüllt und anschließend inklusive Filtrat verworfen.

Nach dem Öffnen der QIAamp spin Säule wurden wiederum 500 µl AWI-Puffer dazupipettiert, ohne den Rand anzufeuchten. Das Cap wurde verschlossen und bei voller Geschwindigkeit (20000 x g; 14000 rpm) für drei Minuten zentrifugiert.

Die QIAamp spin Säule wurde im Anschluss in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen gestellt und das Sammel-Röhrchen inklusive Filtrat verworfen. Nach dem Öffnen der QIAamp spin Säule wurden 200 µl destilliertes

Wasser daraufpipettiert, bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert and dann für eine Minute bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugiert.

Zur Quantifizierung der gewonnenen DNS wurde die photometrische Messung genutzt. Hierzu wurden 5µl der DNS-haltigen Lösung auf 500µl aqua ad inject. gegeben und die Konzentration der DNS bei 260 nm im UV-Spektroskop bestimmt. Eine Extinktion (OD) von 1 entsprach hierbei einer Konzentration von 50 µg/ml.

### 2.5.2 PCR (*Polymerase Kettenreaktion*)

Für die hier durchgeführte Untersuchung war eine Amplifikation einzelner Genabschnitte notwendig. Diesem Zwecke diente die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Durchführung der PCR einzelner Gensequenzen, in denen der Polymorphismus erwartet wurde, erfolgte folgendermaßen:

1	µl	dNTP-Mix (2,5 mM je Base von TaKaRa)
1	µl	Primer (Sense)
1	µl	Primer (Anti-Sense)
0,5	µl	TAQ-Polymerase (Clone – TAQ- DNS-Polymerase 5 un/µl von Amersham)
3	µl	Puffer (10 mM Tris(pH8,4), 50mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
50	ng	DNS
		Rest Aqua dest.
30	µl	•

**Tabelle 2.5.2-1: PCR-Pipettierschema**

In der PCR-Maschine wurde folgendes Programm programmiert:

Schritt	Temp. In °C	Zeit in Min.	
1	94	3	
2	94	0,5	

3	Annealing Temp. (siehe Tab.3.3-1)	1	35 Zyklen/Wiederholungen
4	72	1	
5	72	5	

**Tabelle 2.5.2-2: PCR-Programm zur Amplifikation der Gene**

Nach erfolgter Amplifikation wurden die fertigen Proben bei -20°C eingefroren.

#### Verifikation des PCR-Produkts:

Zur Verifikation des PCR-Produkts bzw. der richtigen Primer wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Dafür wurde folgende Lösung pipettiert:

1	µl	Primer
8	µl	ABI Prism „Big Dye“ Terminator Cycle Ready Reaction Kit mit Ampli TAQ FS
3	µl	Aqua destillata
8	µl	DNS (gereinigt über einer Auto-Seq G50 – Säule von Amersham)
20	µl	•

**Tabelle 2.5.2-3: Pipettierschema für den Gen-Sequenzier**

Das folgende PCR-Programm wurde durchgeführt:

Schritt	Temp. in °C	Zeit in Min.	
1	94	4	25 Zyklen/Wiederholungen
2	94	0,5	
3	50	1	
4	60	1	
5	72	5	

**Tabelle 2.5.2-4: PCR-Bedingungen für den Gensequenzierung**

Nach erfolgter Amplifikation wurden 60 µl Aqua destillata zum PCR-Produkt (gereinigt über einer Auto-Seq G50-Säule von Amersham) gegeben, ebenso wie 8,1 µl 3 M NaAcetat mit einem pH-Wert von 4,3 und 220 µl 100%iges Ethanol. Nach kurzem Vortexen wurden die zusammenpipettierten Produkte zunächst 5 Minuten auf Eis gelegt, ehe sie 10 Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert wurden.

Danach wurde das Pellet abgegossen und 400 µl 100%iges Ethanol in das Röhrchen pipettiert. Es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 U/min. Dann wurde das Pellet erneut abgegossen und das Röhrchen luftgetrocknet. Zur Beschleunigung dieses Prozesses wurde der Speed Vac zur Hilfe genommen.

Zum Schluss wurden 25 µl Template Suppression Reagent von ABI Prism hinzugegeben, ehe es in den Sequenzer gestellt und das Gensequenzierungsprogramm gestartet wurde.

### 2.5.3 Restriktion

Die PCR-Produkte von Il-1 alpha, Il-1 beta und TNF alpha wurden einer spezifischen Restriktion unterzogen. Das Restriktions-Enzym schneidet die DNS an einer ganz speziellen Stelle - der Stelle des Polymorphismus. Jedoch schneidet das Enzym nur eines der beiden möglichen Allele. Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes ergeben sich drei mögliche Variationen:

1. homozygot ungeschnitten (eine Bande bei der Gelelektrophorese)
2. homozygot geschnitten (eine Bande bei der Gelelektrophorese; kleineres Produkt)
3. heterozygot geschnitten / ungeschnitten (zwei Banden bei der Gelelektrophorese)

Die Durchführung der Restriktion sah folgendermaßen aus:

0,5	µl	Restriktionsenzym
1,5	µl	Puffer
3	µl	Aqua dest.
5	µl	•

**Tabelle 2.5.3-1: Pipettierschema für die Restriktion von Il-1 alpha, Il-1 beta, TNF alpha**

Das geschlossene Röhrchen wurde bei entsprechender individueller Inkubationstemperatur für eine Stunde in einen Metallblockthermostat gestellt.

#### **2.5.4 Gelelektrophorese**

Zur Darstellung der Restriktionsprodukte wurde bei Il-1 alpha, Il-1 beta und TNF alpha die Gelelektrophorese angewendet. Dazu wurde eine 1,5% Agaroselösung in TBE in einem Volumen von 15-70 ml – je nach Größe des gewünschten Gels – verarbeitet, die zur Darstellung von kleinen bis mittelkleinen DNS-Fragmenten am besten geeignet ist. Die Agarosegellösung wurde in der Mikrowelle bis zum Übergang in den flüssigen Zustand gekocht, dann kühlte die Lösung unter stetigem Rühren bei Raumtemperatur bis auf ca. 60 °C ab. Im Anschluss wurde 1 ml Ethidiumbromid pro 10 ml Gellösung dazugegeben. Die Lösung wurde gerührt, bis sich das Ethidiumbromid gut verteilt hatte, und dann in die Gelkammer gegossen. Der Kamm wurde auf einer Seite des Gels im Abstand von ca. 5-10 mm vom Rand hineingesteckt. Nach Festigung des Gels wurde der Kamm entfernt. Die Löcher, die im Gel zurückblieben, wurden als Slots für die Lösung benutzt. Das Gel wurde im Anschluss in 0,5× TBE-Laufpuffer gelegt, wobei das Gel vollständig bedeckt wurde. Die Slots mussten an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kommen. Dann erfolgte das Einspritzen der durchnummerierten Proben in die jeweiligen Slots und das Anlegen einer Spannung. Die DNS wanderte wegen der Phosphatreste im "Rückgrat" der DNS zur positiv gelegenen Anode. Kleine DNS-Fragmente wanderten schnell, große langsam durch das Gel. Die DNS ist während dieses Prozesses normalerweise nicht sichtbar. Daher wurde der Fortschritt an der Farbfront abgelesen, die sich schneller als selbst kleinste DNS-Fragmente durch das Gel bewegte. Hat die Farbfront das Ende des Gels erreicht, ist die Elektrophorese komplett. Das Gel konnte dann unter einer UV-Lampe betrachtet und ausgedruckt werden. Ethidiumbromid, das sich in die DNS eingelagert hatte, fluoreszierte im ultravioletten Licht, so dass man die Proben ablesen und den drei oben genannten Zuständen zuordnen konnte.

#### **2.5.5 Kapillarelektrophorese/Fragmentanalyse**

Bei MMP-3 (Stromelysin) wurde die Fragmentanalyse ausgewählt, um die exakte Größe der PCR-Produkte zu ermitteln, da es sich um Repeat-Polymorphismen (5A oder 6A) handelt. Die PCR wurde genauso angesetzt wie unter 2.5.2-1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass der Sense - Primer fluoreszenzmarkiert war. Die Bedingungen entsprachen ebenfalls den oben genannten mit der entsprechenden Annealing-

Temperatur. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde durch eine Gelelektrophorese verifiziert.

1	µl	PCR-Eluat (gereinigt über einer Auto-Seq G50-Säule von Amersham)
12	µl	TSR (ABI-Prism)
0,33	µl	Standard (Tamra Gene Scan Abiprism Size Standard 401 733)

**Tabelle 2.5.5-1: Pipettierschema für die Fragmentanalyse**

Die in einem 2ml-Röhrchen zusammenpipettierte Probe wurde bei 94°C drei Minuten im Heizblock denaturiert und danach auf Eis gestellt. Das anschließende Einbringen der Proben in den Sequencer erfolgte in speziell dafür vorgesehenen Sequencer-Röhrchen.

## **2.6 Statistik**

Die Allelverteilungen (A, B, C) wurden gruppenweise (Gr.1, 2, 3) aufgeteilt und ausgerechnet, um so die Gruppen statistisch miteinander vergleichen zu können. Dazu dienten die folgenden Verfahren.

### **2.6.1 Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson**

Zur Auswertung der Daten wurde der Chi-Quadrat-Test nach Pearson verwendet.

Mit dem Chi-Quadrat-Test oder •2-Test untersucht man Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit.

Berechnet wurden die Ergebnisse mit dem Programm SPSS Version 12.0.

### **2.6.2 Der Fisher-Exakt-Test**

Der Fishertest ist eine Sonderform des Chi-Quadrat-Tests. Mit dem Fisher-Test lässt sich eine Vierfelderverteilung prüfen, auch wenn die Stichprobe und damit die erwarteten und beobachteten Häufigkeiten klein sind. Mit Hilfe der hypergeometrischen Verteilung, die für diskrete Variablen definiert ist, lässt sich die exakte Wahrscheinlichkeit bestimmen, mit der bei gegebenen univariaten Randverteilungen eine bestimmte Häufigkeitsverteilung in den vier Feldern der Tabelle auftritt ([www.luebbert.net/uni/statist/statb/statb3.htm](http://www.luebbert.net/uni/statist/statb/statb3.htm)). Berechnet wurden die Ergebnisse ebenfalls mit dem Programm SPSS Version 12.0.

---

Für die Berechnung des Fisher-Exakt-Tests mussten also sämtliche Daten in Kreuztabellen (2x2-Matrizen) aufgeteilt werden.

## 3 Ergebnisse

### *3.1 Patientenauswahl und Aufbau der Gruppen*

Die vorliegende Studie setzte sich aus drei Gruppen mit jeweils ca. 100 Patienten zusammen.

Die erste Gruppe bildete ein Patientenkollektiv aus dritt- oder viertgradigen Kniearthrotikern in mindestens zwei Kompartimenten des Kniegelenks. Die Diagnose wurde arthroskopisch durch erfahrene Oberärzte der orthopädischen Universitätsklinik Würzburg oder der orthopädischen Gemeinschaftspraxis Dr. Eichhorn und Prof. Strobel in Straubing gestellt. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Arthroskopie jünger als 46 Jahre alt und ursächlich gab es keinen ersichtlichen Grund für ihre Erkrankung, so dass von einer primären Arthrose ausgegangen werden konnte. Ausschlusskriterien waren:

1. freie Gelenkkörper,
2. Gerinnungsstörungen (z.B. von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, Hämophilie),
3. Entzündungen im Gelenk (spezifisch oder unspezifisch),
4. rezidivierende Patellaluxation,
5. Varus-/Valgusfehlstellung,
6. Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (z.B. rheumatoide Arthritis, reaktive Arthritis, rezidivierende Gelenkergüsse, etc.),
7. Stoffwechselstörungen (z.B. Gicht, Chondrokalzinose, etc.) sowie
8. vorausgegangene Traumen (z.B. Bandverletzungen mit Instabilität, intraartikuläre Frakturen, etc.).

Keine Ausschlusskriterien waren:

1. Leistungssport und
2. Adipositas.

Die zweite Gruppe bestand aus Patienten mit typischer Altersarthrose, ebenfalls dritt- oder viertgradig, in mindestens zwei Kompartimenten. Die Diagnose wurde arthroskopisch oder operativ bei erfolgter Knie-TEP gesichert. Auch wurde auf eine

Auswahl von Patienten mit primärer Arthrose Wert gelegt (mit Hilfe der oben genannten Ausschlusskriterien).

Die dritte Gruppe wurde aus Patienten rekrutiert, die zum Zeitpunkt der Operation älter als 55 Jahre waren und arthroskopisch einen intakten Knorpel mit maximal einer Chondromalazie ersten Grades besitzen. Diese Gruppe fungierte als Kontroll-/Vergleichskollektiv und bildete einen größtmöglichen Kontrast zur ersten Gruppe. Gerade im Vergleich dieser beiden Extremgruppen wurden genetische Unterschiede bei arthroserelevanten Genen erwartet (Il-1 alpha, Il-1 beta, TNF alpha, MMP-3).

Beispiel zweier OP-Berichte (Dr. Eichhorn, Prof. Strobel; Straubing):



Abb. 8:  
45-jähriger Patient (Gruppe 1)

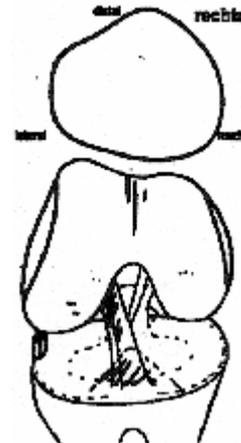


Abb. 9:  
70-jähriger Patient (Gruppe 3)

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, nur Patienten mit einer primären Arthrose zu rekrutieren, und um mehr anamnestische Daten bezüglich der Familie, anderer Gelenke und der Lebensweise zu erfahren, füllten die Patienten der Gruppen 1 und 3 einen Fragebogen aus (siehe Seite 12f).

### ***3.2 Darstellung der Gruppencharakteristika***

Zur Darstellung und Charakterisierung der drei Gruppen wurden Informationen bezüglich des Geburtstages, des Alters bei der Operation, des Geschlechts, der Größe, des Gewichts (BMI) und des Womac-Scores gesammelt und in einer Tabelle

zusammengefasst. Die Patientenzahl, die erreicht wurde, betrug 100 Patienten für die erste Gruppe, 86 für die zweite Gruppe und 103 für die dritte Gruppe.

**Abbildung 10: Tabellarische Darstellung der Patientendaten**

DNS#	Name	Geb.- Dat.	Alter bei OP	Größe	Gewicht	BMI	Geschlecht	WOMAC- G*	Gruppe
------	------	---------------	-----------------	-------	---------	-----	------------	--------------	--------

\* Womac-Gesamt, zusammengesetzt aus Womac S, P, V

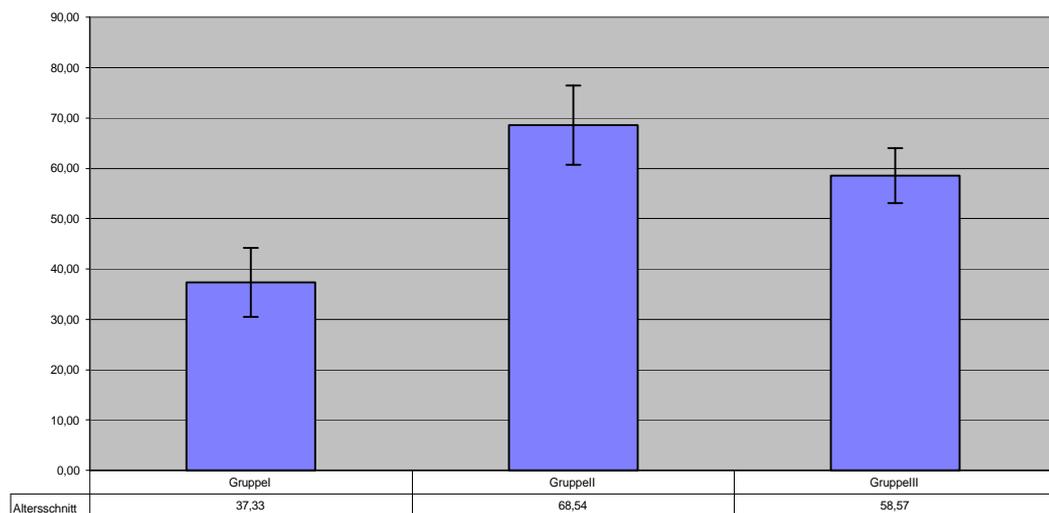
### 3.2.1 Altersdurchschnitt der 3 Kollektive

Entsprechend der Gruppeneinteilung ergab sich in der ersten Gruppe ein Altersdurchschnitt von 37,33 Jahren zum Zeitpunkt der OP. Der Durchschnitt blieb also deutlich unter der Referenzmarke von 45 Jahren.

Die zweite Gruppe stellte mit einem Alterdurchschnitt von 68,54 Jahren das älteste Kollektiv dar. Sie enthält die Altersarthrotiker.

Die dritte Gruppe der Gesunden überschritt mit einem Altersdurchschnitt von 58,57 Jahren im Durchschnitt die geforderten 55 Jahre deutlich und bildete somit einen guten Kontrast zu den kranken, jungen Arthrotikern der Gruppe 1.

**Abb. 11: Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Operation, getrennt nach Gruppen (in Jahren)**

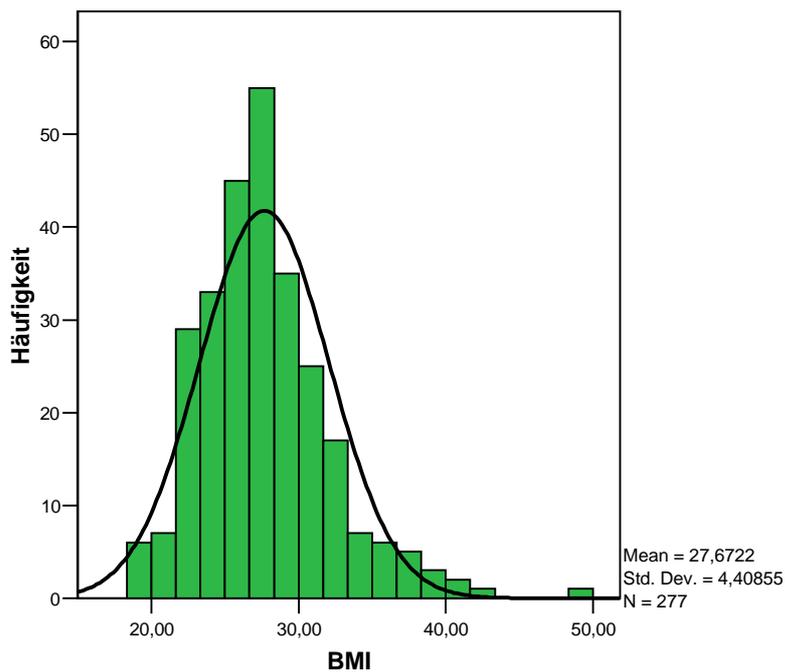


Entsprechend den Einschlusskriterien der Gruppen ergibt sich für Gruppe 1 ein Durchschnittsalter von 37,33 Jahren, bei den Altersarthrotikern (Gruppe 2) ein Durchschnitt von 68,54 Jahren und Gruppe 3 ein Durchschnitt von 58,57 Jahren

### 3.2.2 Der Body Mass Index (BMI)

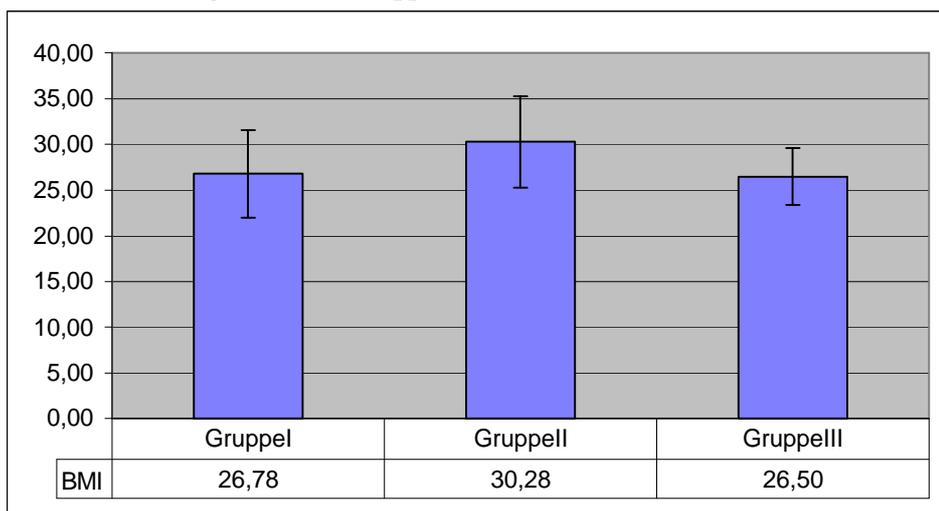
Der *Body Mass Index* ist ein Maß, das Größe und Gewicht in einem Wert zu vereinen sucht. Er errechnet sich aus dem Körpergewicht (in kg) dividiert durch das Quadrat der Körpergröße (in m).

Abb. 12: BMI des Gesamtkollektivs



Im Durchschnitt aller Gruppen ergab sich ein BMI von 27,7

Abb. 13: BMI, aufgeteilt nach Gruppen



Gruppe 1 und 3 weisen ein fast gleiches BMI von 26,78 und 26,50 auf, dagegen fällt das BMI der Gruppe 2 der Altersarthrotiker mit 30,28 deutlich größer aus.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des BMI von  $p=0,033$ . Er errechnet sich aus einer 3x3-Matrix, bestehend aus den drei Gruppen und einer Unterteilung der BMI-Werte in drei weitere Gruppen:

1. BMI < 20,
2. BMI > 20 und < 25 sowie
3. BMI > 25.

		BMI in Gruppen			Gesamt
		BMI unter 20	BMI zw. 20 u. 25	BMI über 25	
Gruppen	Gruppe 1	3	31	66	100
	Gruppe 2	0	11	67	78
	Gruppe 3	3	27	67	97
Gesamt		6	69	200	275

**Tabelle 3.2.2-1: BMI-Werte, aufgeteilt in drei Gruppen**

Exakter Test nach Fisher:

Um beim exakten Test nach Fisher im Sinne einer 2x2-Matrix vergleichen zu können, wurden die BMI-Werte in zwei Gruppen aufgeteilt: eine Gruppe mit Werten < 30 und eine andere Gruppe mit Werten > 30.

		BMI in Gruppen - Cut off 30		Gesamt
		bis BMI 30 (alles bis "leicht" übergewichtig)	über BMI 30 (Adipositas)	
Gruppen	Gruppe 1	82	18	100
	Gruppe 2	42	36	78
	Gruppe 3	86	13	99
Gesamt		210	67	277

**Tabelle 3.2.2-2: BMI-Werte, aufgeteilt in zwei Gruppen**

Anhand dieser Aufteilung ließen sich nun die eigentlichen Gruppen mit dem exakten Test nach Fisher bezüglich des BMI miteinander vergleichen.

	Gr. 1 vs. Gr. 2	Gr. 1 vs. Gr. 3	Gr. 2 vs. Gr. 3
Exakter Test nach Fisher*(p)	< 0,001	0,435	< 0,001

**Tabelle 3.2.2-3: Exakter Test nach Fisher (BMI)**

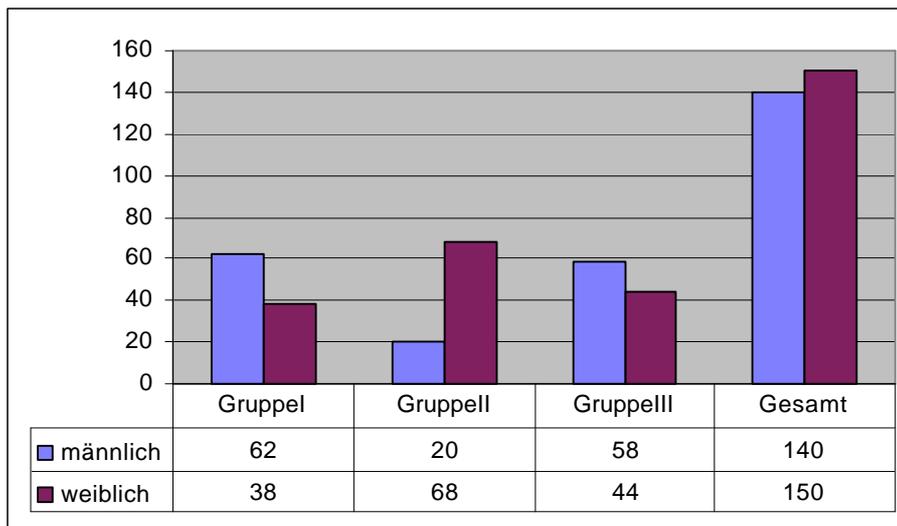
Werte  $p < 0,001$  sind hochsignifikant, Werte  $p < 0,05$  sind signifikant

Es ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied der Gruppen 1 und 2 sowie der Gruppen 2 und 3 bezüglich des Gewichts. Die Gruppen 1 und 3 unterschieden sich nicht signifikant.

### 3.2.3 Geschlechterverteilung der 3 Kollektive

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte eine hochsignifikante ( $p < 0,05$ ) Unterscheidung bezüglich der Geschlechterverteilung:

**Abb. 14: Geschlechterverteilung aufgeschlüsselt nach Gruppen**



**Die Geschlechterverteilung zeigt ein ähnliches Verhältnis männlich zu weiblich bei den Gruppen 1 und 3 zugunsten der Männer, jedoch ein deutliches Übergewicht an Frauen in der Gruppe 2 (Altersarthrotiker)**

Der exakte Test nach Fisher zeigte einen hoch signifikanten Unterschied der Gruppen 1 und 2 sowie der Gruppen 2 und 3 bezüglich des Geschlechts. Die Gruppen 1 und 3 unterschieden sich nicht signifikant:

	Gr. 1 vs. Gr. 2	Gr. 1 vs. Gr. 3	Gr. 2 vs. Gr. 3
Exakter Test nach Fisher	p < 0,001	0,567	p < 0,001

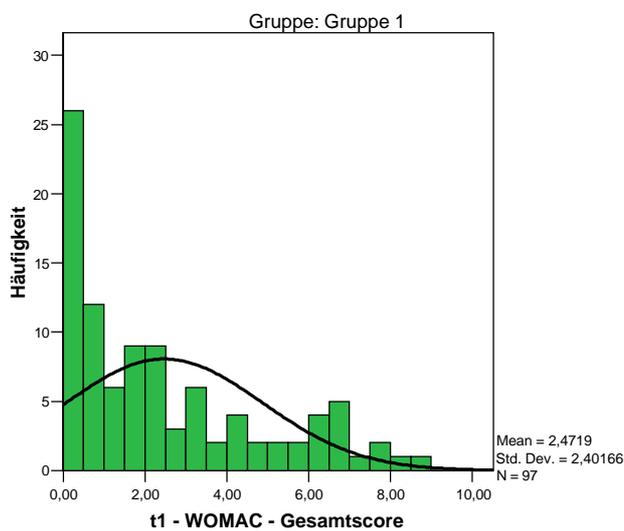
**Tabelle 3.2.3-1: Exakter Test nach Fisher (Geschlechterverteilung)**

Werte p < 0,001 sind hochsignifikant, Werte p < 0,05 sind signifikant

### 3.2.4 Der Womac-Score

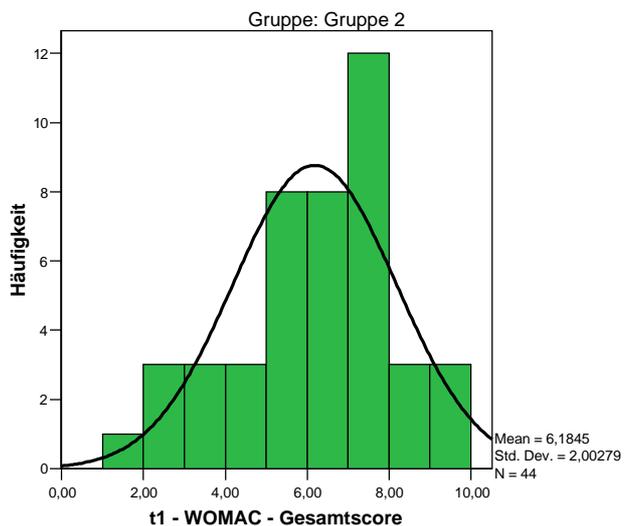
Der Gesamtscore setzt sich aus den Einzelscores von Womac P, S und V zusammen.

**Abb. 15: Womac-Gesamtscore Gruppe 1**



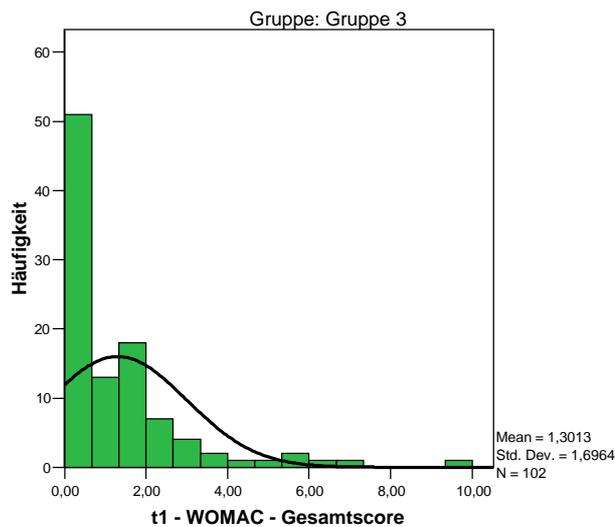
**25% der Gruppe 1 gaben keinerlei Beschwerden an, der Durchschnittswert lag bei 2,47 von 10 Maximalpunkten**

**Abb. 16: Womac-Gesamtscore Gruppe 2**



**Gruppe 2 zeigte einen Durchschnitts-Womacwert von 6,18. 64% der Befragten wiesen einen Wert zwischen 5 und 8 auf. Keiner einen Wert von 0.**

Abb. 17: Womac-Gesamtscore Gruppe 3



**Die Gruppe 3 der Gesunden zeigt einen Durchschnitts-Womacwert von 1,3. 50% der Befragten hatten keinerlei Beschwerden (0).**

Der exakte Test nach Fisher zeigte einen hochsignifikanten Unterschied aller Gruppen zueinander bezüglich des Womac-Gesamtscores. Dies bekräftigte den Wert des Womac-Scores als Arthroseindex, also der positiven Korrelation zwischen den anamnestisch erhobenen Daten via Fragebogen und der arthroskopisch gesicherten Diagnose. Allerdings erstaunte der große Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2, die ja beide hochgradige Arthrotiker beinhalten.

	Gr. 1 vs. Gr. 2	Gr. 1 vs. Gr. 3	Gr. 2 vs. Gr. 3
Exakter Test nach Fisher	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tabelle 3.2.4-1: Exakter Test nach Fisher (Womac-Score)

Werte  $p < 0,001$  sind hochsignifikant, Werte  $p < 0,05$  sind signifikant

### 3.3 Labordaten der Polymorphismen

Als Primer wurden entsprechend des Gens, das es zu amplifizieren galt, folgende Anfangs- (Sense) und Endsequenzen (Antisense) mit der entsprechenden Annealing Temperatur gewählt:

	Variante Ort	Primer-Sense	Primer-Antisense	Größe in bp	Annealing Temp. (x)
<b>MMP3</b>	5A/6A	ACT AGT ATT CTA TGG TTC TCC	GCC ACC ACT CTG TTC TCC	132	60°C
<b>IL-1 alpha</b>	G-889T Promoter	GGG GGC TTC ACT ATG TTG CCC ACA CTG GAC TAA	GAA GGC ATG GAT TTT TAC ATA TGA CCT TCC ATG	300	58°C
<b>IL-1 beta</b>	C+3954T Exon 5	CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA	GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG	194	58°C
<b>TNF alpha</b>	G-308A Promoter	CAA AAG AAA TGG AGG CAA TAG GTT TTG AGG	AGG GCG GGG AAA GAA AGA ATC ATT CAA CCA GCG G	ca. 300	60°C

**Tabelle 3.3-1: Gensequenzen und ihre PCR-Bedingungen**

Zur Darstellung der Polymorphismen der Gene Il-1 alpha, Il-1 beta und TNF alpha wurden folgende Restriktionsenzyme mit entsprechenden Puffern und Inkubationstemperaturen gewählt:

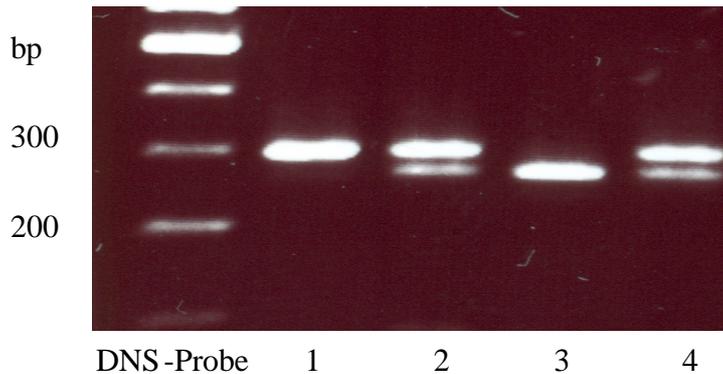
Polymorphismus	Il-1 alpha	Il-1 beta	TNF alpha
<b>Restriktionsenzym</b>	NcoI; 193 S 10,000 U/ml Lot:25	Taq I; R0149 S; 20,000U/ml Lot:45A	NcoI; 193 S 10,000 U/ml Lot:25
<b>Puffer</b>	10 X NEBuffer 4	10 NEBuffer Taq I; 100X BSA	10 X NEBuffer 4
<b>Inkubationsbedingungen</b>	37°C	65°C	37°C

**Tabelle 3.3-2: Restriktionsbedingungen Il-1 alpha, Il-1 beta, TNF alpha**

Die Ergebnisse aus der PCR, Restriktion und Gelelektrophorese wurden in drei Zustände eingeteilt (siehe Abb.17):

1. homozygot ungeschnitten: Zustand A,
2. heterozygot geschnitten/ungeschnitten: Zustand B und
3. homozygot geschnitten: Zustand C.

**Abb. 18: Beispiel einer Gelelektrophorese nach PCR und Restriktion**



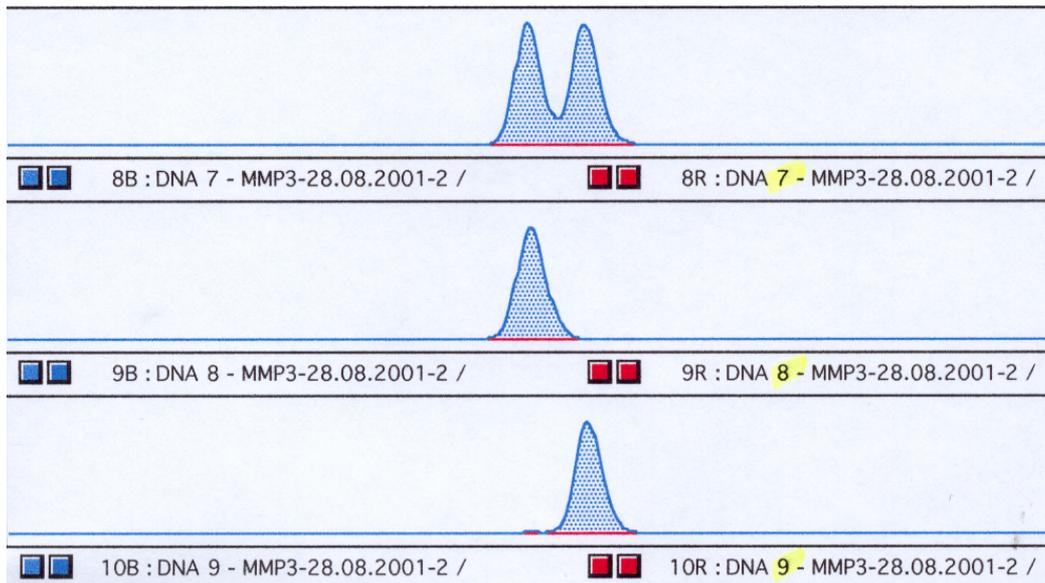
- Legende:
- DNS-Probe 1: homozygot ungeschnitten (Zustand A)
  - DNS-Probe 2: heterozygot geschnitten/ungeschnitten (Zustand B)
  - DNS-Probe 3: homozygot geschnitten (Zustand C)
  - DNS-Probe 4: heterozygot geschnitten/ungeschnitten (Zustand B)

Diese Einteilung betrifft Il-1 alpha, Il-1 beta und TNF alpha.

MMP-3 (Stromelysin) konnte mit dieser Methode nicht ausgewertet werden und musste sich deshalb einer Fragmentanalyse unterziehen.

Bei MMP-3 (Stromelysin) wurden die Ergebnisse der Fragmentanalyse (siehe Abb.18) ebenfalls in drei Zustände eingeteilt:

1. homozygot 5A: Zustand A,
2. heterozygot 5A/6A: Zustand B und
3. homozygot 6A: Zustand C.

**Abb. 19: Beispiel einer Fragmentanalyse (MMP-3)**

Legende:      DNS-Probe 7: heterozygot 5A/6A (Zustand B)  
                  DNS-Probe 8: homozygot 5A (Zustand A)  
                  DNS-Probe 9: homozygot 6A (Zustand C)

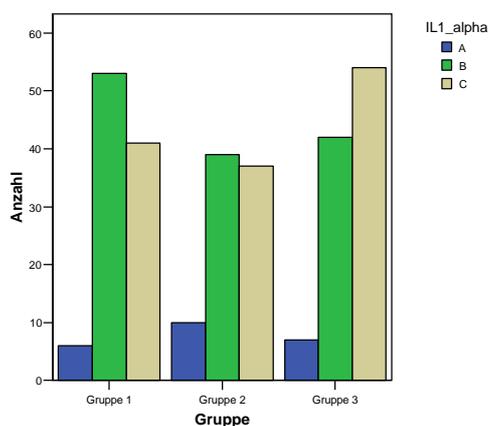
### 3.4 Darstellung der Allelverteilungen aufgeteilt nach Gruppen und Genen

Aufgeteilt nach Genen, Gruppen und Allelverteilungen ergeben sich folgende Ergebnisse dargestellt in Kreuztabellen und Diagrammen.

		IL-1 alpha			Gesamt	
		A	B	C		
Gruppe	Gruppe 1	Anzahl	6	53	41	100
		% von Gruppe	6,0%	53,0%	41,0%	100,0%
	Gruppe 2	Anzahl	10	39	37	86
		% von Gruppe	11,6%	45,3%	43,0%	100,0%
	Gruppe 3	Anzahl	7	42	54	103
		% von Gruppe	6,8%	40,8%	52,4%	100,0%
Gesamt		Anzahl	23	134	132	289
		% von Gruppe	8,0%	46,4%	45,7%	100,0%

Tabelle 3.4-1: IL-1 alpha Kreuztabelle

Abb. 20: Allelverteilung Interleukin-1 alpha aufgeteilt nach Gruppen

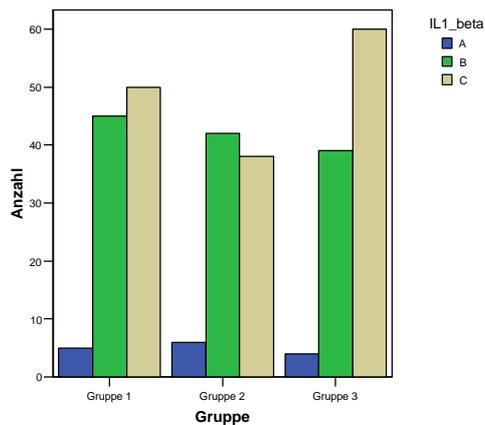


In Gruppe 1 zeigt sich B als der dominante Zustand (53%), wohingegen in Gruppe 3 C der domierende Zustand ist (52,4%).

		IL-1 beta			Gesamt	
			A	B	C	
Gruppe	Gruppe 1	Anzahl	5	45	50	100
		% von Gruppe	5,0%	45,0%	50,0%	100,0%
	Gruppe 2	Anzahl	6	42	38	86
		% von Gruppe	7,0%	48,8%	44,2%	100,0%
	Gruppe 3	Anzahl	4	39	60	103
		% von Gruppe	3,9%	37,9%	58,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	15	126	148	289

Tabelle 3.4-2: IL-1beta Kreuztabelle

Abb. 21: Allelverteilung Interleukin-1 beta aufgeteilt nach Gruppen

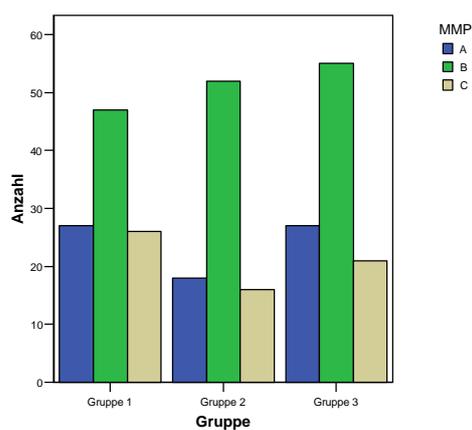


Bei IL-1 beta dominiert der Zustand C in Gruppe 3 deutlicher gegenüber dem Zustand B (58,3% vs 37,9%) als in Gruppe 1 (50% vs 45%).

		MMP-3			Gesamt	
		A	B	C		
Gruppe	Gruppe 1	Anzahl	27	47	26	100
		% von Gruppe	27,0%	47,0%	26,0%	100,0%
	Gruppe 2	Anzahl	18	52	16	86
		% von Gruppe	20,9%	60,5%	18,6%	100,0%
	Gruppe 3	Anzahl	27	55	21	103
		% von Gruppe	26,2%	53,4%	20,4%	100,0%
Gesamt		Anzahl	72	154	63	289

Tabelle 3.4-3: MMP-3 Kreuztabelle

Abb. 22: Allelverteilung MMP-3 (Stromelysin) aufgeteilt nach Gruppen

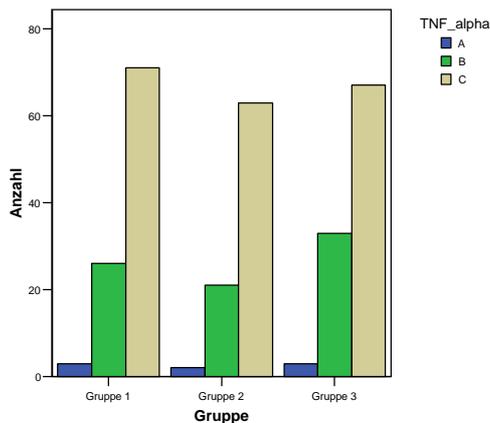


Bei den Allelverteilungen zeigten sich im Vergleich der Gruppen keine wesentlichen Unterschiede.

		TNF_alpha			Gesamt	
			A	B	C	
Gruppe	Gruppe 1	Anzahl	3	26	71	100
		% von Gruppe	3,0%	26,0%	71,0%	100,0%
	Gruppe 2	Anzahl	2	21	63	86
		% von Gruppe	2,3%	24,4%	73,3%	100,0%
	Gruppe 3	Anzahl	3	33	67	103
		% von Gruppe	2,9%	32,0%	65,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	8	80	201	289

Tabelle 3.4-4: TNF alpha Kreuztabelle

Abb. 23: Allelverteilung TNF alpha aufgeteilt nach Gruppen



Bei den Allelverteilungen zeigten sich im Vergleich der Gruppen keine wesentlichen Unterschiede.

### 3.5 Statistische Auswertung

Es sollte ermittelt werden, ob in der Allelverteilung zwischen den Gruppen Unterschiede vorliegen, ob also z.B. der Zustand A bei Arthrotikern häufiger vorkommt als bei Patienten ohne Arthrose oder C bei Nicht-Arthrotikern dominant ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass der Polymorphismus dieses Gens eine entscheidende Rolle im

Krankheitsprozess der Arthrose spielt, es als so genanntes Risikoallel fungiert oder – im Gegenteil – als protektives Allel.

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte jedoch im Vergleich der Allelverteilungen (A, B, C) bei keinem der Polymorphismen eine statistische Signifikanz.

	AB	AC	BC	ABC
Il-1 alpha	0,324	0,325	0,215	0,247
Il-1 beta	0,871	0,427	0,205	0,394
TNF alpha	0,959	0,928	0,441	0,786
MMP-3	0,37	0,866	0,271	0,452

**Tabelle 3.5-1: Chi-Quadrat-Test nach Pearson**

Auch im exakten Test nach Fisher ließ sich weder ein hochsignifikanter noch ein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung zwischen den Gruppen feststellen. Allerdings ließen die fett gedruckten Felder einen Trend vermuten ( $p=0,11$  bzw.  $p=0,103$ ). Dabei handelt es sich auch um die beiden Gruppenvergleiche und Allele, bei denen der größtmögliche Unterschied erwartet worden war (BC Gr. 1 vs. Gr. 3 bei Interleukin-1 alpha sowie BC Gr. 1 und Gr. 2 vs. Gr. 3 bei Interleukin-1 beta).

	BC Gr. 1 vs. Gr. 3	BC Gr. 1 vs. Gr. 2	BC Gr. 2 vs. Gr. 3	AB Gr. 1 vs. Gr. 2	AB Gr. 1 vs. Gr. 3	AB Gr. 2 vs. Gr. 3	AC Gr. 1 vs. Gr. 2	AC Gr. 1 vs. Gr. 3	AC Gr. 2 vs. Gr. 3
Il-1 alpha	<b>0,11</b>	0,54	0,19	0,18	0,56	0,6	0,41	1	0,19
Il-1 beta	0,31	0,55	<b>0,103*</b>	0,76	1	0,74	0,53	0,73	0,31
TNF alpha	0,36	0,865	0,217*	1	1	1	1	1	1
MMP-3	0,38	0,142	0,703	0,208	0,736	0,375	1	0,69	0,824

**Tabelle 3.5-2: Exakter Test nach Fisher**

Werte  $p<0,001$  sind hochsignifikant, Werte  $p<0,05$  sind signifikant

- Gr. 1 und Gr. 2 vs. Gr. 3 (Kranke vs. Kontrollgruppe)

## 4 Diskussion

### 4.1 Einleitung

In den letzten Jahren verdichtet sich durch zahlreiche Zwillingsstudien und Geschwisteruntersuchungen die Ansicht, dass die Genetik bei Arthrose eine große und wichtige Rolle spielt (u.a. Kellgren et al. 1963; Spector 1996). Man vermutet ein nicht-mendelsches Vererbungsmuster und rechnet die Arthrose zu den komplexen, multifaktoriell bedingten Volkskrankheiten.

Wie diese Einordnung verdeutlicht, spielt die Genetik nicht die einzige Rolle in diesem komplexen Zusammenspiel, Arthrose ist vielmehr das Ergebnis zahlreicher Faktoren. Es ist somit fast unmöglich, bei einem multifaktoriellen Geschehen wie der Arthrose eine Untersuchung durchzuführen, die einen einzelnen Faktor isoliert betrachtet.

Leider ist es ebenfalls eher unwahrscheinlich, dass es sich bei der Arthrose um eine monogenetische Erkrankung handelt. Es spielen also auch hier viele Faktoren bzw. Gene eine Rolle, die es schwer machen, einen einzelnen herauszukristallisieren.

Ob es der hier vorliegenden Studie gelungen ist diesem Problem zu begegnen soll im Folgenden diskutiert werden.

### 4.2 Bewertung des Studiendesigns

Der hier gewählte Ansatz konzentrierte sich bei der Auswahl der Patientenkollektive vor allem auf die Gegenüberstellung zweier Extreme (jung vs alt, krank vs gesund), die richtige Diagnosefindung durch rigide Auswahlkriterien sowie die Anzahl von mindestens 100 Patienten pro Gruppe.

Die angestrebte Fallzahl war relativ gering: Dieses Defizit wurde durch die Gegenüberstellung der oben erwähnten Extreme auszugleichen versucht. In vielen in der Literatur beschriebenen Studien fungiert ein sehr beliebiges Patientenkollektiv als Kontrollgruppe, bei dem lediglich radiologisch eine Arthrose ausgeschlossen wurde. Andere Studien vergleichen rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis. Peach sieht das Manko vieler bislang veröffentlichter Studien in der geringen Fallzahl, der Art und Weise der Diagnosefindung sowie den nur isoliert betrachteten Genen (Peach et al. 2005).

In der vorliegenden Studie wurde ein möglichst altes Patientenkollektiv (> 55 Jahre) ausgewählt, das arthroskopisch gesichert keine oder maximal eine Chondromalazie ersten Grades besitzt, das einem jungen, kranken Kollektiv gegenübergestellt werden sollte. Dies ist mit einem Altersdurchschnitt von 37,33 Jahren in der ersten Gruppe (krank) und einem Schnitt von 58,57 in der dritten Gruppe (gesund) gelungen. In dem Vergleich dieser Extreme erhoffte man sich, etwaige Unterschiede in der Allelverteilung am Besten herauskristallisieren zu können.

Wie bereits oben erwähnt, korrelieren weder die Klinik noch das Röntgenbild in einem hohen Maß mit dem Grad der Knorpeldegradation. Infolgedessen wurde in diesem Ansatz sehr viel Wert darauf gelegt, dass alle Diagnosen visuell getroffen wurden – entweder durch eine Arthroskopie oder durch eine offene Operation im Rahmen einer Knieprothesenimplantation. Die Einteilung des Schweregrades (Grad I bis IV) erfolgte durch sehr erfahrene Operateure: Oberärzte der orthopädischen Universitätsklinik Würzburg sowie Herrn Professor Strobel und Herrn Dr. Eichhorn in der orthopädischen Gemeinschaftspraxis in Straubing. Fehleinschätzungen die Einordnung der Patienten betreffend, bezüglich des Grades des Knorpelverschleisses sind also eher unwahrscheinlich.

Um die Fälle primärer Arthrosen herauszufiltern, wurden zwei Fragebögen ausgegeben. Zur Quantifizierung der arthrotischen Beschwerden wurde der Womac-Arthroseindex angewendet. Der zweite Fragebogen (Fragebogen „Arthrostudie“) diente dem Ausschluss sekundärer Arthrosen. Sicherlich muss einschränkend festgestellt werden, dass es nicht in 100% der Fälle gelungen sein kann, die korrekte Diagnose zu finden. Aus zeitlichen, räumlichen und finanziellen Gründen war es nicht möglich, von jedem Patienten eine lückenlose Anamnese, eine Untersuchung möglicher systemischer Erkrankungen sowie eine genaue Dokumentation der Beinachsen (Einbeinstandaufnahme) zu erreichen. Dennoch kann anhand des OP-Berichts, des zweiten Fragebogens und der mündlichen Befragung der Patienten in der deutlichen Mehrheit der Fälle von einer korrekten Diagnose ausgegangen werden. Zumindest ist die Diagnose deutlich valider als in radiologischen Studien.

Die angestrebte Zahl von 100 Patienten pro Gruppe konnte nur in den Gruppen 1 und 3 erreicht werden. Aber allein dies zu erreichen bedurfte größter Anstrengungen, da nur ein sehr geringer Prozentsatz der in beiden Häusern durchgeführten Arthroskopien die

Kriterien einer primären Arthrose erfüllten. Gleichsam war die Anzahl der über 55jährigen, die sich mit Knieproblemen haben arthroskopieren lassen und keine Arthrose aufwiesen (Gruppe 3), sehr gering.

Es wurden vor allem in der orthopädischen Gemeinschaftspraxis in Straubing sämtliche voroperierten sowie alle posttraumatischen Patienten - egal wie kurz oder lang das Trauma zurücklag - ausgeschlossen. Angesichts der Tatsache, dass dort die überwiegende Zahl der Operierten Sportverletzte sind, ergab sich, dass von ca. 2000 Arthroskopien nur etwa 50 den Kriterien entsprachen. Im König-Ludwig-Haus wurde Gebrauch von der SFA-Datenbank ([www.sfa-stiftung.org](http://www.sfa-stiftung.org)) gemacht.

Adipositas und Leistungssport zählten nicht zu den Ausschlusskriterien.

Der Einfluss des BMI auf die Arthrose kann kontrovers gesehen werden. Es ist mittlerweile bewiesen, dass Patienten bei bestehender Arthrose einen höheren BMI aufweisen als gesunde Vergleichskollektive. Weiter wurde gezeigt, dass ein höherer BMI das Arthroserisiko steigert (Mainnen et al. 1996; Oliveria et al. 1999; Felson et al. 1988). Unklar ist, ob das Gewicht auch Einfluss auf die Progression einer bereits bestehenden Arthrose hat (Spector et al. 1994). Ein gemeinsamer genetischer Zusammenhang zwischen Adipositas and Kniearthrose scheint nicht zu existieren (Manek et al. 2003). Man kann sich jedoch auch in der vorliegenden Studie des Eindrucks nicht erwehren, dass der BMI einen Einfluss auf die Arthrose hat. Der Unterschied zwischen den alten Gesunden und alten Kranken fällt hochsignifikant aus (30,28 vs 26,50). Allerdings kann es sich sicherlich nicht um den Hauptfaktor handeln, da Arthrose auch an nicht Gewicht tragenden Gelenken auftritt (z.B. Heberden-Arthrose), so dass Adipositas hier nicht als Ausschlusskriterium gewertet wurde. Für weitere Studien ist es allerdings denkbar die Adipositas Grad II und III (BMI>35) beispielsweise auszuschließen.

Die Gruppen 1 und 3 wiesen einen annähernd gleichen BMI-Mittelwert auf, so dass der Vergleich dieser beiden Gruppen unproblematisch sein dürfte.

Der Womac-Index erwies sich als probates Mittel, die Beschwerden der Patienten zu quantifizieren. Hier zeigte sich eindeutig eine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad der Arthrose bzw. zwischen dem Vorliegen der Arthrose und den Beschwerden des Patienten anhand des Womac-Scores. Zwar war der Womac-Wert bei der dritten Gruppe (gesund) nicht gleich 0, aber er war mit 1,3013 im Mittelwert

signifikant kleiner als die erste Gruppe (2,4719) und unterschied sich ganz deutlich von der zweiten Gruppe (6,1845). Die sehr große Differenz zwischen den beiden Arthrosekollektiven hat wahrscheinlich mehrere Gründe. Eine Rolle spielt sicherlich, dass der Großteil der Patienten der zweiten Gruppe zur Implantation einer Knie-TEP anstand. Das heißt sie hatten eine Pangoarthrose vierten Grades, wogegen die jungen Patienten arthroskopisch operiert worden waren und der Großteil eine Arthrose 3.-4. Grades in meistens nur 2 Kompartimenten hatte. Außerdem kann man davon ausgehen, dass Schmerzen und Funktionseinschränkungen in jungen Jahren noch besser kompensiert werden können. 25% der ersten Gruppe gaben sogar keinerlei Beschwerden an, was erneut zeigt, dass Klinik und Knorpelzustand nicht immer korrelieren müssen. Das unterstreicht aber auch die Wichtigkeit des hier angewandten Prozedere der visuellen Diagnosefindung.

Neuste Studien haben ergeben, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede vor allem bei der Kniearthrose gebe. So sollen Frauen generell, aber vor allem nach dem 55. Lebensjahr vermehrt und ausgeprägter Gelenkverschleiß im Knie haben (Srikanth et al. 2005). Letztere beiden Erkenntnisse scheinen sich auch in der hier durchgeführten Studie wiederzuspiegeln (Gr.2: 77,3% weiblich; Gr.1 und 3:40,6%). Allerdings kann das nicht mehr als ein Hinweis sein, da Gruppe 2 überwiegend aus dem König-Ludwig-Haus in Würzburg und die anderen beiden Gruppen überwiegend aus der orthopädischen Gemeinschaftspraxis in Straubing rekrutiert worden sind. Gerade die Patienten aus Straubing waren ein sehr selektiertes Praxiskollektiv von überwiegend Freizeitsportlern, die aus dem gesamten Bundesgebiet die Praxis in Straubing aufgesucht haben. Außerdem ist das Patientenkollektiv nicht groß genug um weitere Rückschlüsse zu ziehen.

Andere Faktoren wie Beruf, Lebensgewohnheiten (Sport, Rauchen etc.), Knochendichte, Tabletteneinnahme (Östrogene etc.) werden immer wieder im Zusammenhang mit einer Prädisposition zur Arthrose genannt, allerdings liefert die Literatur diesbezüglich bisher keine eindeutigen Daten (Peterson et Jacobsson 2002).

### ***4.3 Auswahl der Polymorphismen***

Zu Beginn der genetischen Arthroreforschung galt das Hauptinteresse zunächst den Strukturgenen der Extrazellulärmatrix entsprechend den bereits bekannten

Generkrankungen wie zum Beispiel der Osteochondrodysplasie. Man untersuchte COL2A1 (Chromosome 12q13.11), das für die alpha1-Kette des Kollagen II kodiert. Andere Kollagengene wie das Kollagen XI kodierende COL11A1(1p21.1)-Gen, COL11A2 (6p21.32) sowie auch nicht-kollagenöse Komponenten wie das COMP (19p13.11) wurden untersucht. Es fanden sich jedoch keine überzeugenden Beweise für eine genetische Korrelation (Loughlin 2001).

Etwa zeitgleich zur Analyse der EZM-Strukturgene konzentrierten sich einige Wissenschaftler auf die Gene, die die Knochendichte beeinflussen, da bei Arthrose bereits im Frühstadium eine subchondrale Sklerosierung des Knochens beobachtet wird. Untersucht wurden vor allem der Vitamin-D-Rezeptor VDR (12q13.11) sowie der Östrogenrezeptor alpha ESR1 (6q25.1). Hierzu finden sich in der Literatur widersprüchliche Daten, die teilweise eine Assoziation mit Arthrose zeigten (Uitterlinden et. al. 1997; Ushiyama et al. 1998), jedoch in späteren Studien nicht bestätigt werden konnten (Loughlin et al, 2000). Zuletzt erschienen jedoch einige Studien, die zumindest für ESR1 eine Assoziation zeigten (Bergink et. al, 2003; Jin et. al. 2004).

Der dritte und zur Zeit am meisten untersuchte Bereich umfasst die Kandidatengene, die für die inflammatorischen Zytokine kodieren. Die entzündlichen Komponenten stellen einen wichtigen pathogenetischen Faktor im Arthroseprozess dar (Goldring et Goldring 2004; Fernandes et al. 2002). Die Gene, bei denen bislang arthroserelevante Assoziationen gefunden werden konnten, sind der Il-1-Gencluster auf Chromosom 2q11.2-q13, das Matrilin-3-Gen (2p24.1), die Interleukin-4-Rezeptor-Alpha-Kette (16p12.1), das secreted frizzled-related protein 3 Gen (2q32.1), das Metalloproteinasegen Adam12 (10q26.2) und zuletzt das Asporin-Gen (9q22.31) (Loughlin 2005).

Dabei wurde dem Interleukin-1-Gencluster auf Chromosom 2q13 die bislang größte Aufmerksamkeit zuteil. Bei den hier nachgewiesenen Assoziationen (Stern et. al. 2003; Smith et.al. 2004; Meulenbelt et. al. 2004) wies letztgenannter bei einem 886 Personen umfassenden Patientenkollektiv eine schützende Assoziation bei Trägern des auch hier untersuchten Il-1 beta-Polymorphismus (+3953 im Bereich eines Exons) bei Hüftarthrose nach.

Über den Polymorphismus des TNF alpha kodierenden Gens (G-308A) im Bereich des Promoters ist bekannt, dass er Einfluss auf die Transkriptionsrate dieses Gens hat. So führt ein Vorliegen dieses Polymorphismus zu einer verdoppelten Transkriptionsrate durch eine erhöhte Affinität des Faktors an den Promoter (Kroeger et al. 1997). Ebenso weiß man, dass eine Überexpression von TNF alpha im Gelenk zu einer chronischen Arthritis führt, sowie, dass bei Arthrose erhöhte TNF alpha-Konzentrationen nachgewiesen wurden (van den Berg et al. 1999).

Auch MMP-3 spielt – wie bereits in der Einleitung erwähnt – eine wichtige Rolle im Arthrose-Prozess. Es vermag nach seiner Aktivierung wichtige Strukturen der extrazellulären Matrix zu spalten und wird durch sogenannte TIMPs in seiner Aktivität inhibiert (siehe oben). MMPs spielen auch in anderen physiologischen wie pathophysiologischen Vorgängen des Körpers entscheidende Rollen. So konnten beim abdominalen Aortenaneurysma erhöhte Spiegel sowie ein Zusammenhang mit dem auch hier untersuchten 5A/6A Polymorphismus im Bereich des Promoters festgestellt werden. Das 5A-Allel erwies sich als Risikofaktor für die Entwicklung eines abdominalen Aortenaneurysmas (Yoon et al. 1999).

Eine Kombination der Polymorphismen entsprechend dem Beispiel von Smith, A.J. et al. 2004 bei einem II1R1-II1A-II1B-II1RN-Gen-Cluster wurde aufgrund der geringen Fallzahlen als zu wenig aussagekräftig eingestuft.

Die Literatur legte die Auswahl dieser oben aufgeführten Polymorphismen im Zusammenhang mit der Arthrose nahe und hat sicherlich seine Berechtigung gehabt.

#### ***4.4 Ergebnisse der Studie***

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, arthroserelevante Polymorphismen zu identifizieren.

Bei den hier untersuchten Polymorphismen von Il-1 alpha, Il-1 beta, TNF-alpha und MMP-3 ist dies nicht gelungen. In keinem der Fälle konnte eine statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) erkannt werden. Lediglich bei Il-1 alpha ( $p = 0,11$ ) und beta ( $p = 0,103$ ) deutet sich ein Trend an, der bei gleichbleibendem Verhältnis durch eine Erhöhung des Patientenkollektivs auf etwa das Doppelte zur statistischen Signifikanz führen könnte.

Die oben aufgeführte Erkenntnis über Il-1 beta im Zusammenhang mit Hüftarthrose konnte im vorliegenden Ansatz für die Kniearthrose also weder bestätigt noch

ausgeschlossen werden. Vielleicht bringt hier eine Erhöhung des Patientenkollektivs Klarheit.

Mit einer gewissen Sicherheit lässt sich ein Zusammenhang der Polymorphismen-Allele TNF alpha und MMP-3 mit Arthrose ausschließen. Eine Assoziation für die Arthrose konnte in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden und ist auch nicht zu erwarten, dass sich dies selbst bei einem größeren Patientenkollektiv ändern wird (siehe statistische Auswertung MMP-3).

Ein Aspekt der auffiel war, dass die primäre Arthrose sicherlich nicht nur eine Erkrankung des Alters ist (late-onset-disease), wie mehrfach in der Literatur beschrieben, sondern bereits in frühen Jahren (< 45 Jahre) auftreten kann. Sie zeigt mit zunehmendem Alter eine Progredienz und führt im fortgeschrittenen Alter meist nicht an einem künstlichen Kniegelenkersatz vorbei, aber sie ist definitiv bereits in jungen Jahren vorhanden. Vielleicht ist diese Erkenntnis eine Errungenschaft der modernen Arthroskopie, die eine frühere Detektion des Knorpelschadens möglich macht.

#### **4.5 Ausblick für die Zukunft**

Es bleibt spannend abzuwarten, ob eine Assoziation bei der Kniearthrose durch ein höheres Patientenkollektiv nachgewiesen werden kann (Il-1 alpha und Il-1beta).

Wichtig für die Zukunft ist es, mehr Kenntnisse über das Zusammenspiel zwischen Zytokinen, aktivierten MMPs und TIMPs, die Mechanismen der Aktivierung der proMMPs sowie auch über den Unterschied zwischen den Prozessen im Knorpelgewebe selber und der umgebenden Synovia zu gewinnen (Tschetverikov et al. 2005).

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse haben schon zu vielversprechenden Ansätzen in der Therapie geführt (Il-1ra, TNF-alpha Antikörper).

Auch bei den MMPs sind schon gute Ansätze gemacht worden. So erweist sich die Therapie mit oralen Matrix Metalloproteinase- Inhibitoren in ersten Versuchsreihen beim Schwein sowie beim Menschen als vielversprechend (Sabitini et al. 2005, Leff et al. 2003).

Sicher bedarf es aber noch eines weiteren, grundlegenden Verständnisses der Gelenkphysiologien und -pathologien – vor allem auch im Vergleich der verschiedenen Gelenke. Einen guten Anfang hat Kuettner in seinem zuletzt veröffentlichten Projekt gemacht (Cole und Kuettner 2005), in dem er das obere Sprunggelenk mit dem Knie verglichen hat und herausarbeitet, warum trotz gleicher Lastübertragung das Kniegelenk signifikant häufiger an Arthrose erkrankt als das obere Sprunggelenk.

Das mittelfristige Ziel wird es sein so viele Kandidatengene wie möglich zu finden, die im Zusammenhang mit der Arthrose eine Rolle spielen. Erleichtert könnte die Suche nach arthroserelevanten SNPs durch das „HapMap“ Projekt werden. Ziel dieses Projekts ist die quantitative Erfassung von Variationen innerhalb des humanen Genoms. Über 1 Millionen SNPs wurden bei 269 Personen aus 4 Kollektiven untersucht und in der Phase 1 des Projekts im Oktober 2005 publiziert (Altshuler et al. 2005). So könnte die Auswahl von geeigneten SNPs, das Design systematischer Assoziationsstudien und die Beurteilung der Aussagekraft ihrer Ergebnisse in Zukunft deutlich erleichtert werden.

Für die Patienten könnten diese Erkenntnisse in Zukunft bedeuten, dass man in der Lage ist ein individuelles Genprofil zu erstellen, das die Suszeptibilität für diese Erkrankung einstuft. Bei Patienten mit einer hohen Gefahr könnte man prophylaktische Maßnahmen (z.B. Physiotherapie) sowie den Verzicht auf gelenkstrapazierende Sportarten (z.B. Skifahren) empfehlen.

Langfristig wird es vielleicht möglich sein entsprechende Gene gezielt auszuschalten, um so einer Arthroseentstehung vorzubeugen.

## 5 Zusammenfassung

Arthrose ist eine Erkrankung des Gelenks, die einen erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität der Betroffenen sowie auch auf die Volkswirtschaft eines Landes hat. Das Kniegelenk ist das dabei am häufigsten befallene Gelenk.

Leider gibt es bis zum heutigen Tag keine kausale, kurative Therapie dieser Erkrankung. In Frühstadien kann der Verlauf im Idealfall gestoppt werden, in Spätstadien ist häufig der künstliche Gelenkersatz die einzige Therapieoption, die Aussicht auf Schmerzfreiheit und einen gewissen Funktionserhalt gewährleisten kann.

Lange Zeit war man der Meinung, dass die Arthrose eine logische Konsequenz des Alterns sei. Zuletzt geht man jedoch mehr und mehr davon aus, dass die Arthrose ein komplexes Zusammenspiel aus Entzündung, mechanischen Kräften, zellulären und biochemischen Prozessen sowie nicht zuletzt der Genetik ist. Die Genetik wurde in dieser Studie zum Fokus des Interesses gemacht, als ein entscheidender Faktor der primären Arthrose.

Untersucht wurden Polymorphismen in entscheidenden Regionen (Promoter, Exons) von Genen, die im Arthrose-Prozess eine große Bedeutung haben: Il-1 alpha, Il-1 beta, TNF alpha und MMP-3 (Stromelysin).

Viele bereits durchgeführte Studien lieferten widersprüchliche Ergebnisse, wiesen zu geringe Fallzahlen auf oder definierten die Kollektive nur unzureichend. Ziel dieser Studie war es klar definierte Kollektive mit möglichst extremen Zuständen gegenüberzustellen. Junge bereits in frühen Jahren an Arthrose Erkrankte (<45 Jahre) sollten gesunden Patienten über 55 Jahre gegenübergestellt werden. Als dritte Gruppe dienten Altersarthrotiker. Die Diagnosen wurden arthroskopisch gestellt, der Zielwert pro Gruppe sollte 100 Patienten betragen.

Für die Auswertung wurden etablierte Verfahren wie die PCR, Restriktion und der Gensequencer genutzt.

Die Allelverteilungen der Polymorphismen TNF alpha und MMP-3 konnten in der Auswertung zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Das legt nahe, dass diese beiden Polymorphismen wohl keinen Einfluss auf die Entstehung von Arthrose haben. Bei Il-1 alpha und Il-1 beta wurden keine eindeutigen Ergebnisse

erzielt. Es deutet sich ein Trend an, dass diese beiden Polymorphismen einen Einfluss haben, der allerdings erst durch eine höhere Fallzahl bestätigt bzw. widerlegt werden könnte.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es ebenso sein, die bestehende bzw. die in der Fallzahl erhöhte DNS-Bank auf weitere Polymorphismen von Genen, die im Arthroseprozess eine Rolle spielen (z.B. Il-1 ra, weitere MMPs, TIMP etc.), zu untersuchen. Interessant könnte auch die Kombination einzelner Varianten innerhalb eines Genclusters sein, entsprechend dem Beispiel von Smith, A.J. et al. 2004 bei einem Il-1 R1-II-1 alpha –Il-1 beta-II-1 RN Gencluster.

Sicherlich bedarf es noch viel intensiver Forschung, um das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Faktoren im Arthroseprozess zu verstehen, um so die einzelnen Mosaiksteinchen innerhalb des Gesamtkomplexes darzustellen. Jedoch lässt sich nur auf diese Weise das Ziel erreichen, eines Tages diese multifaktorielle Erkrankung zu verstehen und zu heilen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body Mass Index
bp	Base pairs
CM	Chondromalazie
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX	Cyclooxygenase
DM	Deutsche Mark
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	β-2'-Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamintetraacetat
ESR	Estrogen (Östrogen) Receptor
EZM	Extrazellulärmatrix
Il-1	Interleukin 1
Il-1 R1	Interleukin-1-Rezeptor 1
Il-1 ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
Il-1 RN	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
kg	Kilogramm
m	Meter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MT-MMP	Membrantype MMP
NaAcetat	Natriumacetat
NCO	Einbandenrestriktionsenzym
nm	Nanometer
OD	Extinktion
OP	Operation
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Rates per minute
SFA	Stiftung zur Förderung der Arthroskopie
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SPSS	Superior Performing Statistical Software
Taq-Polymerase	Hitzestabile Polymerase
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE-Puffer	Tris/EDTA Puffer
TEP	Total-Endo-Prothese
TIMP	Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases
TNF alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
UV	Ultraviolette Strahlung
Womac-Index	Western Ontario Mac Master University-Index

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Arthroskopisches Bild einer Kniearthrose (MLP-duale Reihe, Orthopädie).....	3
Abb. 2:	Radiologisches Bild einer medial betonten Gonarthrose (Rössler, Rüter, Orthopädie).....	3
Abb. 3:	Das Kniegelenk (Schematisch).....	3
Abb. 4:	Histologisches Bild einer Chondromalazie.....	6
Abb. 5:	Übersicht über die Interleukin-1-Effekte (Otte 2000).....	7
Abb. 6:	„Deltaeffekt“ des Il-1 (Otte 2000).....	8
Abb. 7:	Visuelle Skala – Womac Score.....	12
Abb. 8:	45-jähriger Patient (Gruppe 1).....	23
Abb. 9:	70-jähriger Patient (Gruppe 3).....	23
Abb. 10:	Tabellarische Darstellung der Patientendaten.....	24
Abb. 11:	Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Operation, getrennt nach Gruppen (in Jahren).....	24
Abb. 12:	BMI des Gesamtkollektivs.....	25
Abb. 13:	BMI, aufgeteilt nach Gruppen.....	25
Abb. 14:	Geschlechterverteilung nach Gruppen.....	27
Abb. 15:	Womac-Gesamtscore Gruppe 1.....	28
Abb. 16:	Womac-Gesamtscore Gruppe 2.....	28
Abb. 17:	Womac-Gesamtscore Gruppe 3.....	29
Abb. 18:	Beispiel einer Gelelektrophorese.....	31
Abb. 19:	Beispiel einer Fragmentanalyse (MMP-3).....	32
Abb. 20:	Allelverteilung Interleukin-1 alpha aufgeteilt nach Gruppen.....	33
Abb. 21:	Allelverteilung Interleukin-1 beta aufgeteilt nach Gruppen.....	34
Abb. 22:	Allelverteilung MMP-3 aufgeteilt nach Gruppen.....	35
Abb. 23:	Allelverteilung TNF alpha aufgeteilt nach Gruppen.....	36

---

Tabelle 1.1.4-1:	Zusammensetzung des Gelenkknorpels (nach J. Metz).....	5
Tabelle 2.5.2-1:	PCR-Pipettierschema.....	16
Tabelle 2.5.2-2:	PCR-Programm.zur Amplifikation der Gene.....	17
Tabelle 2.5.2-3:	Pipettierschema für den Gen-Sequenzier.....	17
Tabelle 2.5.2-4:	PCR-Bedingungen für die Gensequenzierung.....	17
Tabelle 2.5.3-1:	Pipettierschema für die Restriktion von Il-1 alpha, Il-1 beta und TNF alpha.....	18
Tabelle 2.5.5-1:	Pipettierschema für die Fragmentanalyse.....	20
Tabelle 3.2.2-1:	BMI-Werte, aufgeteilt in drei Gruppen.....	26
Tabelle 3.2.2-2:	BMI-Werte, aufgeteilt in zwei Gruppen.....	26
Tabelle 3.2.2-3:	Exakter Test nach Fisher (BMI).....	27
Tabelle 3.2.3-1:	Exakter Test nach Fisher (Geschlechterverteilung) .....	28
Tabelle 3.2.4-1:	Exakter Test nach Fisher (Womac-Score).....	29
Tabelle 3.3-1:	Gensequenzen und ihre PCR-Bedingungen.....	30
Tabelle 3.3-2:	Restriktionsbedingungen Il-1 alpha, Il-1 beta und TNF alpha.....	30
Tabelle 3.4-1:	Il-1 alpha Kreuztabelle.....	33
Tabelle 3.4-2:	Il-1 beta Kreuztabelle.....	34
Tabelle 3.4-3:	MMP3 Kreuztabelle.....	35
Tabelle 3.4-4:	TNF alpha Kreuztabelle.....	36
Tabelle 3.5-1:	Chi-Quadrat-Test nach Pearson.....	37
Tabelle 3.5-2:	Exakter Test nach Fisher.....	37

## 8 Literaturverzeichnis

- 1) **Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ, Donnelly P** (2005) International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437, S.1299-1320
- 2) **Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW** (1988): Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol.* (12), S. 1833-1840
- 3) **Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, van Leeuwen JP, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Pols HA.** (2003): Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women, *Arthritis & Rheumatism* 48, S. 1913-1922
- 4) **Buckwalter JA, Mankin HJ** (1998): Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr. Course Lect* 47, S. 487-504
- 5) **Carr AJ** (1999) Beyond disability: measuring the social and personal consequences of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 7, S. 230-238
- 6) **Cichon S, Freudenberg J, Propping P, Nöthen MM** (2002): Variabilität im menschlichen Genom – Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Deutsches Ärzteblatt* Jg. 99, 46, S. 3091-3101
- 7) **Dayar JM, Bresnihan B** (2002): Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 46, S. 574-578
- 8) **Desmond ST Nicholl** (2002): Gentechnische Methoden, 2.Aufl. *Spektrum, Heidelberg*

- 
- 9) **Erggelet C** (2004): Die Behandlung von Gelenkknorpeldefekten. *Steinkopff, Darmstadt* Kapitel 1 J.Metz
- 10) **Fautrel B, Hilliquin P, Rozenberg S, Allaert FA, Coste P, Leclerc A, Rossignol M** (2004) Impact of osteoarthritis: results of nationwide survey of 10000 patients consulting for OA. *Joint Bone Spine* 72, S.235-240
- 11) **Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Walker AM, Meenan RF** (1988): Obesity and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med*, 109, S. 18-24
- 12) **Felson DT, Goggins J, Niu J, Zhang Y, Hunter DJ** (2004): The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent of alignment. *Arthritis & Rheumatism* 50, 12, S. 3904-3909
- 13) **Fernandes J, Tardif G, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Dupuis M, Moldovan F, Sheppard M, Krishnan BR, Pelletier JP** (1999): In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression. *Am J Pathol* 154, S. 1159-1169
- 14) **Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP** (2002): The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 39 (1-2), S. 237-246
- 15) **Fuchs S, Skwara MD, Bloch M, Dankbar B** (2004): Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis and Cartilage* 12, 5, S. 409-418
- 16) **Goldring MB** (2000): Osteoarthritis and Cartilage: The role of Cytokines. *Current Rheumatology Reports*, 2, S. 459-465
- 17) **Goldring SR, Goldring MB** (2004): The role of cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis. *Cl.Orth. and rel.Research* No. 427S, S. 27-36

- 18) **Gomez DE, Alonso H, Yoshiji H, Thorgeirsson UP** (1997): Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74, S. 111-122
- 19) **Hackenbroch MH** (2002): „Arthrosen“ Basiswissen zu Klinik, Diagnostik und Therapie. *Thieme Verlag, Stuttgart*, S. 6-9
- 20) **Hirsch-Kauffmann, Schweiger** (1996): Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*
- 21) **Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park SD, Yoo MC, Lee HJ, Hong MS, Park HJ, Yoon SH, Kim BS, Yim SV, Park HK, Chung JH** (2004): Estrogen-receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population, *Arthritis Res. Ther.* 6, S. R415-R421
- 22) **Kellgren JH, Lawrence JS** (1957): Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 16, S. 494-502
- 23) **Kellgren JH, Lawrence JS** (1958): Osteoarthrosis and discgeneration in an urban population. *Annals of the Rheumatic disease* 17, S. 388-397
- 24) **Klashman D, Seeger L, Singh R** (1996): Validation of nonradiographic ACR osteoarthritis criteria using ACR arthroscopy damage index as comparison standard (abstract). *Arthritis & Rheumatism* 39, S. 172
- 25) **Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ** (1997): The 308 Tumor necrosis factor-alpha Promoter Polymorphism effects transcription. *Mol Immunology* 34, 5, S. 391-399
- 26) **Kuettner KE, Cole AA** (2005): Cartilage degeneration in different human joints, *Osteoarthritis and Cartilage* 13, S. 93-103

- 27) **Leff RL, Elias I, Ionescu M, Reiner A, Poole AR** (2003): Molecular changes in human osteoarthritic Cartilage after 3 weeks of oral Administration of BAY 12-9566, a Matrix Metalloproteinases Inhibitor. *The Journ, of Rheumatology* 30: 3, S. 544-549
- 28) **Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW** (1993): Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 36, S. 181-189
- 29) **Loughlin J** (2000): Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1 and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis, *J. Rheumatolog.* 27, S. 779-784
- 30) **Loughlin J** (2001): Genetic epidemiology of primary osteoarthritis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 13, S. 111-116
- 31) **Loughlin J** (2005): The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Exp.Reviews in mol. Med.* Vol.7, S. 1-12
- 32) **Mainnen P, Riihimaki H, Heliovaara M, Makela P** (1996): Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obes Relat Metab Discord*; 20, S. 595-597
- 33) **Manek NJ, Hart D, Spector TD, MacGregor AJ** (2003): The Association of BMI and Osteoarthritis of the Knee Joint. *Arthritis & Rheumatism* 48; 4, S. 1024-1029
- 34) **McCachren SS** (1991): Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis & Rheumatism* 34, S. 1085-1092
- 35) **Meulenbelt I, Seymour AB, Nieuwland M, Huizinga TW, van Duijn CM, Slagboom PE.Meulenbelt** (2004): Association of the interleukin-1 gene cluster with the radiographic signs of osteoarthritis of the hip, *Arthritis & Rheumatism* 50, S. 1179-1186

- 36) Murphy G, Knäuper V, Aitkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I** (2002): Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* 4, S. 39-49
- 37) Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM** (1999): Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hip, hand and knee. *Epidemiology* 10, S. 161-166
- 38) Otte P** (2000): Der Arthrose-Prozess Gelenkerhaltung-Gefährdung-Destruktion Teil 1 *Novartis*, S.115-191
- 39) Patwari, Cook, DiMicco, Blake, James, Kumar, Cole, Lark, Grodzinsky** (2003): Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vivo: Interaction with exogenous cytokines *Arthritis & Rheumatism* Vol. 48, Issue 5, S. 1292-1301
- 40) Peach CA, Andrew J.Carr, John Loughlin** (2005): Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends in Mol. Medicine* Vol. 11, Issue 4, S. 186-191
- 41) Petersson IF, Jacobsson LTH** (2002): Osteoarthritis of the peripheral joints. *Best Practice & Cl. Rheumatology* 16, 5, S. 741-760
- 42) Rössler H, Rüter W** (2000): Orthopädie. *Urban und Fischer*, München 18. korr. Auflage, S.300
- 43) Sabatini M, Lesur C, Thomas M, Chomel A, Anract P, de Nanteuil G, Pastoureau P** (2005): Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52 (1), S. 171-180
- 44) Saklatvala J** (1986): Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 322, S. 547-549

- 45) **Saklatvala J, Dingle JT** (1980): Identification of catabolin, a protein from synovium which induces degradation of cartilage in organ culture. *Biochem Biophys Res Commun* 96, S. 1225-1231
- 46) **Schlaak JF, Pfers I, Meyer zum Büschenfelde KH, Marker-Hermann E** (1996): Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin. Exp. Rheumatol.* 14, S. 155-162
- 47) **Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR, Sims JE, Doherty M, Spector TD, Bidwell JL** (2004): Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 5, S. 451-460
- 48) **Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D** (1996): Genetic influences on osteoarthritis women: a twin study. *BMJ* 312, S. 940-943
- 49) **Spector TD, Hart DJ, Doyle DV** (1994): Incidence and progression of osteoarthritis in women with unilateral knee disease in the general population: the effect of obesity. *Ann Rheum Dis* 53, S. 565-568
- 50) **Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G** (2005) A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 13(9), S. 769-81
- 51) **Stern AG, de Carvalho MRC, Buck GA, Adler RA, Rao TPS, Disler D, Moxley G** (2003): Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta; *Osteoarthritis and Cartilage* 11, S. 394-402
- 52) **Stucki G, Meier D, Stucki S, Michel BA, Tyndall AG, Dick W, Theiler R** (1996): Evaluation of a German version of WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) *Arthrosis Index Z Rheumatol.* 55 (1), S. 40-49

- 53) Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TWJ, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, DeGroot J** (2005): MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis and osteoarthritis. *Annals of Rheumatic diseases* 64, S. 694-698
- 54) Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD** (2004): Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 50, S. 2497-2507
- 55) Van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van De Loo FA** (1999): Role of tumor necrosis factor? In experimental arthritis: separate activity of interleukin 1? In chronicity and cartilage destruction. *Ann. Rheum. Dis*, 58, S. 140-148
- 56) Van den Berg WB, Joosten LAB, Helsen MMA, van de Loo AAJ.** (1994): Amelioration of established murine collagen induced arthritis with ant-IL-1 treatment. *Clin Exp Immunol.* 95, S. 237-243
- 57) [www.ensembl.com](http://www.ensembl.com)**
- 58) [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)**
- 59) [www.sfa-stiftung.org](http://www.sfa-stiftung.org)**
- 60) [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)**
- 61) Yoon S, Tromp G, Vongpunsawad S, Ronkainen A, Juvonen T, Kuivaniemi H** (1999): Genetic analysis of MMP3, MMP9, and PAI-1 in Finnish Patients with Abdominal Aortic or intracranial Aneurysms. *Biochem and Biophys. Research Comm.* 265, S. 563-569

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Name: Eden  
Vorname: Lars  
Geburtstag/-ort: 04.05.1976, Oberhausen  
Anschrift: St.-Rochus-Str.25i  
97078 Würzburg  
eden.lars@web.de  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1982 - 1986 Eintracht - Grundschule Dortmund - Holzen  
1986 - 1992 Goethe - Gymnasium in Dortmund - Hörde  
1992 - 1993 Metairie Park Country Day High School in New Orleans, La (USA)  
1993 - 1996 Ruhrtal - Gymnasium in Schwerte  
06/1996 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Durchschnittsnote: 1,8)

## Bundeswehr:

09/1996 - 06/1997 Grundwehrdienst bei der Luftwaffe in Goslar und Köln/Wahn

## Berufsausbildung:

11/1997 Beginn des Studiums der Zahnmedizin in Würzburg  
10/1998 Abschluss des Vorphysikums  
10/1999 Wechsel vom Studium der Zahnmedizin zum Studium der Humanmedizin  
04/2005 Abschluss des Medizinstudiums mit dem 3.Staatsexamen

## Beruflich Tätigkeit:

Seit 08/2005 Assistenzarzt in der Chirurgie an der Universitätsklinik Würzburg

## Berufliche Nebentätigkeiten:

01/2001 - 07/2003 Nachwachtentätigkeit im Schlaflabor der HNO an der Universitätsklinik Würzburg  
04/2001 Beginn des experimentellen Teils der Dissertation am König-Ludwig-Haus (Orthopädie) der Universitätsklinik Würzburg (Thema: Genetik der Arthrose)  
08/2002 - 09/2002 Sechswöchige Famulatur am KCMC in Moshi, Tansania  
08/2003 - 09/2003 Zweimonatige Famulatur an der UVA in Charlottesville, Va (USA)  
10/2003 - 02/2004 Anatomieassistent während des WS 2003/2004 an der Universität Würzburg  
04/2004 - 08/2004 1.Tertial des Praktischen Jahres: Fachbereich Orthopädie im König-Ludwig-Haus, Würzburg  
08/2004 - 11/2004 2.Tertial des Praktischen Jahres: Fachbereich Innere Medizin, Medizinische Klinik, Würzburg  
12/2004 - 01/2005 3.Tertial des Praktischen Jahres: Fachbereich Chirurgie, Universitätsspital Basel, Schweiz  
02/2005 3.Tertial des Praktischen Jahres: Fachbereich Chirurgie, Zentrum operative Medizin, Würzburg

## Sonstige Kenntnisse:

Sprachen: Sehr gute Sprachkenntnisse in Englisch, gute Kenntnisse in Französisch und Latein  
EDV: Sehr gute Word-, Power Point- und Excelkenntnisse  
Weiterbildungen: 240 Stunden Sportmedizin, Rhythmologie-Seminar; Sonographie-Kurs; Rhetorik-, Zeitmanagement- und Kniggeseminare  
Hobbys: Sport, Lesen, Reisen

Lars Eden