

Aus der Orthopädischen Klinik
König Ludwig Haus
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

**Bedeutung von DNA- Polymorphismen für die Entstehung primärer
Gonarthrose in einem arthroskopisch definierten Patientenkollektiv**

INAUGURAL- DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät der
Julius- Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Merle
aus Heidelberg

Würzburg, März 2009

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Koreferent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Oktober 2009

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	- 3 -
1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1 DAS KRANKHEITSBILD DER ARTHROSE	- 1 -
1.1.1 <i>Begriffsdefinition</i>	- 1 -
1.1.2 <i>Epidemiologie</i>	- 1 -
1.1.3 <i>Ätiologie</i>	- 3 -
1.1.4 <i>Klinik und Diagnostik</i>	- 4 -
1.1.5 <i>Therapie</i>	- 8 -
1.1.6 <i>Pathophysiologie und Pathogenese</i>	- 11 -
1.2 DIE ROLLE DES SUBCHONDRALEN KNOCHENS IM ARTHROSEPROZESS	- 13 -
1.3 GENETIK DER ARTHROSE UND BEDEUTUNG VON SNP	- 14 -
1.4 LRP UND DER WNT- SIGNALWEG	- 14 -
1.5 STUDIENAUFBAU UND FRAGESTELLUNG	- 17 -
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 <i>Der WOMAC-Score</i>	18
2.1.2 <i>Fragebogen „Arthrostudie“</i>	18
2.1.3 <i>Blutproben</i>	20
2.1.4 <i>Labormaterial</i>	20
2.1.5 <i>Geräte</i>	21
2.2 METHODEN	21
2.2.1 <i>DNA-Extraktion</i>	21
2.2.2 <i>PCR (Polymerase- Kettenreaktion)</i>	22
2.2.3 <i>Sequenzierung zur Verifikation des PCR-Produkts</i>	23
2.2.4 <i>Restriktion</i>	24
2.2.5 <i>Gelelektrophorese</i>	25
2.2.6 <i>Statistik</i>	26
3 ERGEBNISSE	27
3.1 PATIENTENSELEKTION UND EINTEILUNG DER KOLLEKTIVE	- 28 -
3.2 GRUPPENCHARAKTERISTIKA	- 30 -
3.2.1 <i>Altersdurchschnitt der Kollektive</i>	- 30 -
3.2.2 <i>Body Mass Index (BMI)</i>	- 31 -
3.2.3 <i>Geschlechterverteilung</i>	- 32 -
3.2.4 <i>Der Womac- Score</i>	- 33 -
3.3 LABORDATEN	- 36 -
3.3.1 <i>Polymorphismen</i>	- 36 -
3.3.2 <i>Primer und PCR</i>	- 36 -
3.3.3 <i>Restriktion</i>	- 37 -
3.4 ALLELVERTEILUNG DER POLYMORPHISMEN	- 38 -
4. DISKUSSION	- 42 -
4.1 EINLEITUNG.....	- 42 -
4.2 STUDIENDESIGN UND AUSWAHL DER PATIENTENKOLLEKTIVE	- 42 -
4.2 AUSWAHL DER KANDIDATENGENE UND POLYMORPHISMEN	- 46 -
4.3 ERGEBNISSE DER STUDIE	- 50 -
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	- 52 -
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 55 -
7. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	- 56 -
8. LITERATURVERZEICHNIS	- 58 -

1. Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Arthrose

1.1.1 Begriffsdefinition

Arthrose ist nach Grifka eine in ihrer Ätiologie letztendlich ungeklärte, langsam progrediente, primär nicht entzündliche, chronische, degenerative Gelenkerkrankung, wobei ein oder mehrere Gelenke betroffen sein können.

In der gegenwärtigen wissenschaftlichen Diskussion wird die Arthrose als ein komplexer, altersassoziierter Krankheitsprozess [2] verstanden, welchem multifaktorielle Ätiologien [20] zu Grunde liegen. Dieser Prozess ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet [68] und resultiert im strukturellen und funktionellen Versagen des affizierten synovialen Gelenkes [37].

Der in der englischsprachigen Literatur verwendete Begriff „*Osteoarthritis*“ betont neben den mit der Arthrose einhergehenden Veränderungen des subchondralen Knochens auch die entzündliche Komponente des Arthroseprozesses in Form einer lokalen, reaktiven, akuten oder chronischen Synovitis, die jedoch in Abgrenzung zur rheumatoiden Arthritis limitiert ist [25]. Schon R. Virchow beschrieb 1869 aufgrund seiner pathologisch- anatomischen Untersuchungen die inflammatorische Komponente der Arthrose und prägte den Begriff der „*Arthritis deformans*“, welcher im 20. Jh. unter anderem von Aßmann in den Begriff der „*Arthrosis deformans*“ umgewandelt wurde, um den degenerativen Charakter der Arthrose in Abgrenzung zum Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis hervorzuheben.

1.1.2 Epidemiologie

Die Arthrose zählt zu den bedeutendsten chronischen Erkrankungen des mittleren und höheren Erwachsenenalters und ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung [15].

Nach Petersson [67] machen Arthrosen mehr als 50% der chronischen Erkrankungen jenseits des 60. Lebensjahres aus, wobei das Kniegelenk neben den Arthrosen der Fingermittel- und Endgelenke das am häufigsten befallene Gelenk darstellt [15]. Kellgren und Lawrence bezifferten bereits 1958 [44] die Prävalenz radiologischer Zeichen der Gonarthrose auf 29,8% bei Männern im Alter von 55-64 Jahren. Frauen

1. Einleitung

sind von jedoch von Arthrose, insbesondere von der Gonarthrose, häufiger betroffen als Männer [12].

Mit steigendem Alter nimmt die Arthroseprävalenz zu, eine Tatsache, die bereits im Mittelalter erkannt wurde und in dem Begriff des „malum senile“ (Altersübel) Ausdruck findet, der noch bis in das 20. Jahrhundert als gebräuchlicher Begriff für die Coxarthrose des höheren Lebensalters verwendet wurde. Für die großen Gelenke von Hüfte und Knie beschreibt van Saase [88] eine radiologische Prävalenz bei Frauen im Alter von 45- 49 Jahren von 2,6% für die rechte Hüfte und 12,7% für das rechte Knie. Im Alter von über 80 Jahren steigt die Prävalenz auf 26,0% (rechte Hüfte) respektive 54,6% (rechtes Knie).

Es ist jedoch ist zu berücksichtigen, dass die Prävalenz klinisch symptomatischer Arthrosen geringer ausfällt als radiologische Studien zunächst vermuten lassen. So beträgt die Prävalenz klinisch symptomatischer Arthrosen im Erwachsenenalter nach Felson [28] zwischen 1,6% und 9,4%. Die Framingham- Studie [27, 52] zeigt eine Gesamtprävalenz radiologisch objektiver Gonarthrose von 13,8 % aller teilnehmenden Probanden, die älter als 26 Jahre waren, und von 19,2% aller Probanden im Alter von über 45 Jahren. Die Raten symptomatischer Arthrose im gleichen Kollektiv lagen mit 4,9% respektive 6,7% deutlich niedriger.

Zur Arthroseinzidenz finden sich in der Literatur nur wenige und stark schwankende Angaben. Nach Oliveira [63] ist für die klinisch symptomatische und radiologisch manifeste Gonarthrose von einer Inzidenz von 240/100.000/a auszugehen. Auch die Inzidenz steigt mit dem Lebensalter und ist bei Frauen höher als bei Männern.

Nach einer Studie des Zentralinstitutes für Kassenärztliche Versorgung [18] verursachte die Krankheitsgruppe von Arthropathien und Osteopathien, deren wichtigste Erkrankung die Arthrose darstellt, in der BRD 1997 jährlich direkte und indirekte Kosten von 16,26 Milliarden DM bei 600 000 Krankenhausfällen und etwa 10 Millionen Krankheitstagen. Die jährliche ökonomische Belastung durch Erkrankungen des Bewegungsapparates beläuft sich in westlichen Ländern auf 1 bis 2,5 Prozent des Bruttosozialproduktes [69].

Weiterhin sind degenerative Erkrankungen des Bewegungsapparates die Ursache für 40% aller Rehabilitationsmaßnahmen und 27% aller Frühberentungen in den USA [24].

1. Einleitung

Die sozialmedizinische Bedeutung der Arthrose wird in einer von Fautrel [22] durchgeführten Studie evident. So geben 65% der an der Studie teilnehmenden Patienten mit Gonarthrose Probleme beim Einkaufen an, 22,8% berichten über Einschränkungen in ihren Freizeitaktivitäten. Arthroseassoziierte Gelenkveränderungen stellen die Hauptursache eingeschränkter Mobilität bei älteren Menschen dar [34] und werden auch angesichts der zukünftigen demographischen Entwicklung in der BRD als sozialmedizinisches und volkswirtschaftliches Problem immer größere Bedeutung gewinnen.

1.1.3 Ätiologie

Arthrosen werden hinsichtlich ihrer Ätiologie in 2 Gruppen klassifiziert: Man unterscheidet die primäre (idiopathische) Arthrose, deren Ursache weitgehend unbekannt ist, von den sekundären Arthroseformen, die sich als Folge eines angeborenen oder erworbenen Gelenkschadens, einer so genannten „präarthrotischen Deformität“, manifestieren. Eine Übersicht über wichtige Ursachen der sekundären Gonarthrose gibt Tabelle 1.1. Sekundär arthrotische Gelenkveränderungen finden sich insbesondere bei jungen Patienten und sind in Bezug auf das Kniegelenk in den meisten Fällen auf ein zurückliegendes Trauma zurückzuführen [15].

Ursachen der sekundären Gonarthrose	
Trauma	<ul style="list-style-type: none">• Traumatische Läsionen von Knieinnenstrukturen (z.B. Knorpel, Meniskus, Kreuzbänder)• Intraartikuläre Frakturen• Freie Gelenkkörper• Posttraumatische Instabilitäten
Dysplastische Gelenkanlage	<ul style="list-style-type: none">• Kondylenhypoplasie
Achsfehlstellungen	<ul style="list-style-type: none">• Genu varum/ valgum congenital oder erworben• Extraartikuläre Frakturen
Entzündliche Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none">• Bakterielle Arthritis• Rheumatoide Arthritis
Metabolische Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none">• Hyperurikämie• Chondrokalzinose• Hämochromatose• Ochronose
Gerinnungsstörungen	<ul style="list-style-type: none">• Hämophilie
Sonstige Ursachen	<ul style="list-style-type: none">• Osteochondrosis dissecans• Aseptische Osteonekrosen (z.B. M.Ahlbäck)• Marfan- Syndrom• Ehlers- Danlos- Syndrom• Neuropathische Gelenkzerstörung (Charcot- Gelenk)

Tabelle 1.1 Ursachen der sekundären Gonarthrose

1. Einleitung

Im Sinne der oben genannten Klassifikation sind etwa 20% der Arthrosen von Hüfte und Knie durch bekannte ätiologische Faktoren ausgelöst (sekundär), für den überwiegenden Anteil (80%) der Gon- und Coxarthrosen, ist die Ursache jedoch nicht bekannt. Daher sind sie den primären Arthrosen zuzuordnen. Beispielsweise beschreibt Buckwalter [15] bei 407 konsekutiven Patienten, welche wegen symptomatischer Gonarthrose an der Orthopädischen Klinik der Universität von Iowa behandelt wurden, einen Anteil von 85% von Patienten mit primärer Gonarthrose.

Nach der Klassifikation des *American College of Rheumatology* [3] ist von einer primären Gonarthrose auszugehen, wenn folgende Befundkonstellation vorliegt und Ursachen sekundärer Arthroseformen anamnestisch nicht zu eruieren sind.

Knee pain plus **osteophytes** on radiographs and at least one of the following:

- Patient age older than 50 years
- morning stiffness lasting 30 minutes or less
- Crepitus on motion

Abbildung 1.1 Kriterien des American College of Rheumatology für die primäre Gonarthrose (1986)

Werden diese klinischen und radiologischen Kriterien für die Diagnosestellung angewendet, beträgt die Sensivität 91% und die Spezifität 86% [3].

Entgegen früheren Annahmen, dass primäre Arthrose eine altersbedingte Abnutzung der am meisten belasteten Gelenkflächen ist, werden heute multiple Ätiologien angenommen. In der Literatur werden neben dem zunehmenden Alter und dem weiblichen Geschlecht mehrere Risikofaktoren, die das Entstehen bzw. die Progression primärer Gonarthrose begünstigen, diskutiert [14, 73, 82]:

- Genetische Prädisposition
- Übergewicht
- Erhöhte Knochendichte
- Hyperlaxizität
- Repetitive Überlastung

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Die Arthrose ist eine chronische Erkrankung, welche alle Strukturen der funktionellen Gelenkeinheit (Knorpel, subchondraler Knochen, intra- und periartikuläre

1. Einleitung

Weichteilstrukturen) affiziert und in der Regel progredient verläuft. Ihr Beginn ist meist schleichend, in ihrem fortschreitenden Verlauf können sich symptomatische Perioden mit intermittierenden Remissionen abwechseln. Obwohl die Arthrose häufig als unaufhaltbar fortschreitende Erkrankung betrachtet wird, werden in der Literatur klinische und radiologische Progressionraten von nur 30- 60 % im Zeitraum von 2-15 Jahren angegeben [15]. Auch über Fälle radiologischer Befundregredienz wird berichtet [35, 76]. Die interindividuelle Variabilität des natürlichen Verlaufes der Arthrose ist nur unzureichend verstanden.

Das klinische Leitsymptom der Arthrose ist der Schmerz des betroffenen Gelenkes, insbesondere bei den ersten Bewegungen nach längerem Liegen, Sitzen oder Stehen (Anlaufschmerz) sowie bei andauernder Belastung (Belastungsschmerz). Im Frühstadium sind die Beschwerden vorwiegend belastungsassoziiert und bilden sich in Ruhe oft zurück, in fortgeschrittenen Stadien hingegen kann der Schmerz auch während Ruhephasen auftreten (z.B. nächtlicher Schmerz). Des Weiteren berichten viele Arthrosepatienten über eine zunehmende Funktionseinschränkung des betroffenen Gelenkes. Ein weiteres Symptom ist die Steifigkeit des arthrotischen Gelenkes (z.B. Morgensteifigkeit), welche typischerweise ebenfalls nach Ruhephasen auftritt und sich beim Durchbewegen im Gegensatz zur länger anhaltenden Steifigkeit bei rheumatoider Arthritis rasch bessert.



Abbildung 1.2 Pangoarthrose, radiologischer und intraoperativer Befund, aus Jerosch et al. Knieendoprothetik, eine Standortbestimmung, Dt Ärztebl 1997; 94: A-449–455 [Heft 8]

1. Einleitung

In der klinischen Untersuchung lassen sich im Anfangsstadium nur geringgradige oder unspezifische Veränderungen feststellen, später findet sich vorwiegend ein Druckschmerz über dem Gelenk und den umgebenden Sehnen, Bändern und Muskeln. Häufig lässt sich eine schmerzhaft eingeschränkte aktive und passive Beweglichkeit des Gelenkes finden, die auf zunehmender Inkongruität des deformierten Gelenkes und auf begleitenden Muskelkontrakturen beruht. Auch rezidivierende intraartikuläre Ergussbildungen mit Schwellneigung sowie Krepitationsphänomene werden in der klinischen Untersuchung evident. Eine inspektorisch und palpatorisch auffällige Vergrößerung der Gelenkkonturen als Ausdruck von Osteophytenbildung ist ebenfalls häufig vorhanden. In Spätstadien können eine Subluxationsstellung bzw. eine Deformität des Gelenkes imponieren, welche in dessen vollständiger Versteifung (Ankylose) resultieren können.

Da sich der Arthroseprozess ausschließlich am Gelenk und in seiner Umgebung manifestiert, lassen sich keine systemischen diagnostischen Parameter zur Diagnosestellung heranziehen. Einzelne Serummarker, beispielsweise ana- oder katabole Substanzen (z.B. COMP, Osteocalcin), sind zwar von wissenschaftlichem Interesse [93], spielen aber bisher in der klinischen Routinediagnostik keine Rolle. Standardlaborwerte weisen bei der Arthrose keine Auffälligkeiten auf.

Neben einer sorgfältigen Anamnese bezüglich Schmerz, Funktionseinschränkung und Limitierungen im Alltag sowie der oben erwähnten klinischen Untersuchung ist die röntgenologische Diagnostik der Goldstandard in der Diagnosesicherung. In fortgeschrittenen Stadien lassen sich fünf charakteristische radiologische Arthrosezeichen im nativen Röntgenbild des betroffenen Gelenkes feststellen:

- Osteophytäre Anbauten
- Gelenkspaltverschmälerung
- Subchondrale Sklerose
- Geröllzysten
- Deformitäten

Nach Kellgren und Lawrence [45] werden radiologisch fünf Schweregrade der Arthrose unterscheiden (Tabelle 1.2)

1. Einleitung

Grad	Beurteilung	Befund
0	normal	keine Zeichen für OA
1	Verdacht auf OA	kleine Osteophyten, unklare Relevanz
2	Geringfügige OA	Osteophyten; Gelenkspalt normal
3	Mäßige OA	leichte Gelenkspaltverschmälerung
4	Schwere OA	ausgeprägte Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerose

Tabelle 1.2 Radiologische Schweregrade der Arthrose nach Kellgren und Lawrence (1957)

Die Ausprägung des nativradiologischen Befundes muss nicht zwangsläufig mit dem klinischen Bild und der subjektiven Beschwerdesymptomatik des Patienten korrelieren. Buckwalter [15] konnte jedoch zeigen, dass insbesondere bei der Gonarthrose mit der Progredienz radiologischer Arthrosezeichen auch die Prävalenz von Schmerzen des betroffenen Kniegelenkes zunimmt.

Aufgrund des hohen Wasser- und Proteoglykangehaltes des hyalinen Knorpels eignet sich die Magnetresonanztomographie (MRT) als weiteres bildgebendes Verfahren hervorragend zur Darstellung der Veränderungen eines arthrotischen Kniegelenkes. Auch betroffene peri- und intraartikuläre Strukturen, beispielsweise begleitende Band- oder Meniskusläsionen, intraartikuläre Ergussbildung oder Bakerzysten können zuverlässig erfasst werden. Im klinischen Alltag ist die MRT jedoch nicht die Methode der ersten Wahl, da mit Standardröntgenaufnahmen eine ausreichend sichere Diagnosestellung möglich ist. Bei differentialdiagnostischen Fragestellungen bzw. bei der Abwägung der Option gelenkerhaltender Therapiemaßnahmen kann die Kernspintomographie im Einzelfall eine sinnvolle Ergänzung zu weniger teuren Diagnostikmaßnahmen sein.

Die diagnostische Methode mit der höchsten Sensitivität und Spezifität ist die Arthroskopie [10]. Hierbei lässt sich der Schweregrad der Knorpelaffektion visuell beurteilen und im Falle der Gonarthrose auch den jeweiligen Kompartimenten des Kniegelenkes zuordnen. Abhängig davon, welche Gelenkanteile betroffen sind, spricht man von uni-, bi- oder trikompartimenteller Gonarthrose. Während der Vorteil der Arthroskopie in der direkten visuellen Beurteilbarkeit des Knorpelzustandes und den gleichzeitig vorhandenen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten (z.B. dem Entfernen freier Gelenkkörper) liegt, ist der evidente Nachteil, dass es sich um ein invasives Verfahren mit entsprechendem Komplikationsrisiko handelt.

1. Einleitung

Der Grad der Knorpelerweichung (Chondromalazie) wird arthroskopisch nach Outerbridge [65] klassifiziert (Tabelle 1.3) und hinsichtlich der anatomischen Lokalisation einem Gelenkkompartiment (Abbildung 1.3) zugeordnet.

Grad	Arthroskopischer Befund
I	Lokalisierte Knorpelerweichung, Knorpelödem
II	Oberflächliche Knorpelläsionen, Villi, Fasern, Defekt bis 1,25 cm ²
III	Knorpelrisse, Defekt über 1,25 cm ²
IV	Freiliegender subchondraler Knochen

Tabelle 1.3 Arthroskopische Klassifikation von Knorpelläsionen modifiziert nach Outerbridge (1961)

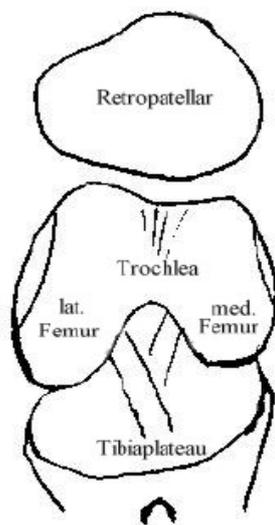


Abbildung 1.3

Kompartimente des Kniegelenkes (schematisch), Auszug aus OP-Bericht der Orthopädischen Gemeinschaftspraxis (OGP) Straubing (Dr. Eichhorn, Prof. Dr. Strobel)

- **Articulatio femoropatellaris**
(femoropatellares Kompartiment)
- **Articulatio femorotibialis medialis**
(mediales femorotibiales Kompartiment)
- **Articulatio femorotibialis lateralis**
(laterales femorotibiales Kompartiment)

1.1.5 Therapie

Eine kausale Therapie, die den Arthroseprozess aufzuhalten vermag bzw. zu einer restitutio ad integrum des geschädigten Knorpels bzw. der mitaffektierten Strukturen der funktionellen Gelenkeinheit führt, existiert nicht. Grundlegende Therapieprinzipien sind Schmerzreduktion, Funktionsverbesserung sowie Korrektur von Fehlstellung und Instabilität.

Grundsätzlich unterscheidet man die konservative von der operativen Therapie, wobei sich die konservative Therapie in die pharmakologische und die nicht pharmakologische Therapie aufteilen lässt. Zu den konservativen und nicht pharmakologischen Therapiekonzepten zählen allgemeine Maßnahmen wie Gewichtsreduktion und Patientenaufklärung. Weiterhin kommt der Physiotherapie zur Erhaltung der Beweglichkeit und Verbesserung der muskulären Führung des

1. Einleitung

Gelenkes entscheidende Bedeutung zu. Supportiv werden orthopädische Hilfsmittel (z.B. Orthesen, Gehstützen) und physikalische Therapie (Wärme- oder Kryotherapie, Elektrotherapie, Ultraschalltherapie) angewendet. Weitere Verfahren der nicht pharmakologischen Arthrotherapie sind die Akupunktur und die Magnetfeldtherapie, deren Wirksamkeit in der wissenschaftlichen Literatur kontrovers diskutiert wird [80].

Die pharmakologische Therapie der Arthrose basiert hauptsächlich auf analgetischen und antiinflammatorischen Wirkungsmechanismen. Nicht steroidale Antiphlogistika (NSAR), die unter anderem über die Hemmung der Prostaglandin E₂- Produktion des Enzyms Cyclooxygenase wirken, stellen die wichtigste Substanzklasse dar. Sie können oral oder topisch angewendet werden.

Die in neuerer Zeit eingesetzten selektiven COX-2- Hemmer, für die ein günstigeres Nebenwirkungsprofil, insbesondere hinsichtlich der gastrointestinalen Nebenwirkungen der NSAR, postuliert wurde, sind in letzter Zeit in den Hintergrund geraten, da sie mit einem noch nicht eindeutig beurteilbaren kardialen Risiko assoziiert werden und daher die Indikation vor allem bei Patienten mit kardialen Vorerkrankungen zurückhaltend gestellt werden sollte [41].

Intrartikuläre Kortikoidinjektionen sind bei akuten Schmerzexazerbationen mit entzündlicher Komponente (aktivierte Arthrose) in fortgeschrittenen Arthrostadien indiziert und wirken ebenfalls über die Hemmung der Prostaglandin- und Leukotrienfreisetzung durch Hemmung der Arachidonsäuresynthese, die ein Substrat der Cyclooxygenasen und Lipooxygenasen darstellt.

Seit Jahren wird versucht, pharmakologische Therapeutika zu entwickeln, die die Arthroseprogression aufhalten bzw. den Arthroseprozess umkehren können. Die Gruppe der so genannten „slow acting drugs in osteoarthritis“ (SADOA) oder „disease modifying OA drugs“ (DMOAD) zu denen beispielsweise Hyaluronsäure, Glucosamin, Chondroitinsulfat und auch IL-1 alpha Rezeptorantagonisten zählen, zeigen in ersten Studien zum Teil positive Effekte hinsichtlich Schmerzlinderung, Funktionsverbesserung und Verringerung des Gelenkspaltverlustes bei Arthrosepatienten, jedoch wird sich erst in größeren prospektiven Langzeitstudien, die den Kriterien der evidence- based medicine entsprechen, herausstellen, inwieweit eine tatsächliche Chondroprotektion bzw. Strukturmodifikation stattfindet und der Einsatz der genannten Präparate pharmakökonomisch sinnvoll ist [21].

1. Einleitung

Hinsichtlich der konservativen Therapie der Arthrose ist zusammenfassend festzuhalten, dass alle genannten Methoden nicht zu einer Heilung der Erkrankung mit restitutio ad integrum führen und bestenfalls in der Lage sind, die Arthroseprogression aufzuhalten.

Bei Beschwerdepersistenz oder -progredienz trotz Ausschöpfung sämtlicher konservativer Therapiemaßnahmen kann die Indikation zur operativen Intervention gestellt werden.

Bei umschriebenen symptomatischen Knorpeldefekten sind arthroskopische Operationsverfahren Therapie der Wahl. Ziel der sogenannten markraumeröffnenden Verfahren (z.B. Microfracturing, Pridie- Bohrung) ist die Induktion einer Ersatzknorpelbildung aus einem an der Defektone befindlichen Blutkoagel, wobei das chondrale Regenerat (Faseknorpel) im Vergleich zum hyalinen Knorpel minderwertige mechanische Eigenschaften besitzt. Die autologe Chondrozytentransplantation (ACT) und die autologe osteochondrale Transplantation (OCT) stellen alternative Verfahren zur Therapie umschriebener chondraler Defekte dar. Mittelfristige Ergebnisse sind vielversprechend, Langzeitergebnisse prospektiver kontrollierter Studien liegen jedoch bislang nicht vor. Gegenstand intensiver Forschung mit ersten klinischen Anwendungen ist die biologische, zellbasierte Regeneration hyalinen Knorpels aus mesenchymalen Stammzellen durch Tissue Engineering.

Kniegelenksnahe Umstellungsosteotomien kommen bei jüngeren Patienten (< 60 Jahre) in Betracht, bei denen Achsfehlstellungen in der Frontalebene (Genu varum, Genu valgum) zur Überlastung des medialen oder lateralen Kompartimentes führen. Bei fortgeschrittener Gonarthrose mit vollständigem und ausgedehntem Knorpelverlust stellt der teil- bzw. totalendoprothetische Ersatz des betroffenen Gelenkes den therapeutischen Goldstandard mit hoher Patientenzufriedenheit dar. In Deutschland werden jährlich über 150.000 künstliche Kniegelenke mit steigender Tendenz implantiert. Durch die kontinuierliche Weiterentwicklung der Prothesendesigns und -materialien und die Standardisierung der Implantationstechnik liegen mittlerweile sehr gute Langzeitergebnisse mit revisionsfreien Standzeiten von über 90% nach 15 Jahren vor [4]. Seit der erstmaligen experimentellen Implantation einer Kniegelenks- Scharnierprothese aus Elfenbein durch Themistocles Gluck im Jahr 1890 hat die Kniegelenksendoprothetik

1. Einleitung

insbesondere durch die Fortschritte der letzten 15 Jahre einen hohen Entwicklungsstand erreicht. Es steht eine Vielzahl von Prothesenmodellen zur Verfügung, die eine individuelle Patientenversorgung auch bei komplexen Ausgangssituationen ermöglichen.

1.1.6 Pathophysiologie und Pathogenese

Eine normale Gelenkfunktion ist gekennzeichnet durch schmerzfreie Beweglichkeit über den gesamten erforderlichen Bewegungsumfang, die störungsfreie Kraft- und Belastungsübertragung über alle Gelenkstrukturen und die Gewährleistung von statischer und dynamischer Stabilität. Diese normale Funktion wird durch ein balanciertes Zusammenspiel aller Komponenten der funktionellen Gelenkeinheit (Knorpel, subchondraler Knochen, Synovia, Synovialis, Gelenkkapsel, Sehnen, Ligamente, Muskulatur) gewährleistet. Entgegen dem traditionellen Verständnis der Arthrose als rein degenerative Erkrankung des hyalinen Gelenkknorpels konnte gezeigt werden, dass alle Komponenten der funktionellen Gelenkeinheit in den Arthroseprozess involviert sind [11].

Der hyaline Gelenkknorpel setzt sich aus Zellen (Chondrozyten, 1-10%) und extrazellulärer Matrix (ECM, 90%) zusammen. Die bedeutendsten Strukturmoleküle der ECM sind Kollagene (Kollagen Typ II, 95%) und Proteoglykane (v.a. Aggrekan), welche im kollagenen Fasernetz eingebunden sind und durch ihre hohe Wasserbindungsfähigkeit die mechanisch entscheidende, prallelastische Struktur des Knorpels gewährleisten.

Chondrozyten	1- 10%
Wasser	70- 80 %
Kollagen	12- 14 %
• Typ II	10- 12 %
• Typ IX	1 %
• Typ XI	1 %
Mineralsubstanzen	< 4 %
Matrixproteine	< 1 %
Proteoglykane	7- 9 %

Tabelle 1.4 Zusammensetzung des Gelenkknorpels (nach J. Metz)

1. Einleitung

Histopathologische Charakteristika der Arthrose sind der Verlust des hyalinen Gelenkknorpels mit assoziierten Veränderungen des subchondralen Knochens, welcher eine Sklerose, Knochenzysten und Osteophyten aufweist [38]. Weiterhin kann eine begleitende Synovitis vorliegen. Im Vordergrund steht häufig initial ein oberflächlicher Knorpelschaden, der mit Fibrillenbildung beginnt und im weiteren Verlauf durch Erosionen und Einrisse gekennzeichnet ist (Abbildung 1.4). Im fortgeschrittenen Stadium kann es zu einer großflächigen Knorpelzerstörung mit Freilegung des subchondralen Knochens (Knochenglatze) kommen, vor allem in Regionen mit hoher Druckbelastung (Hauptbelastungszonen).

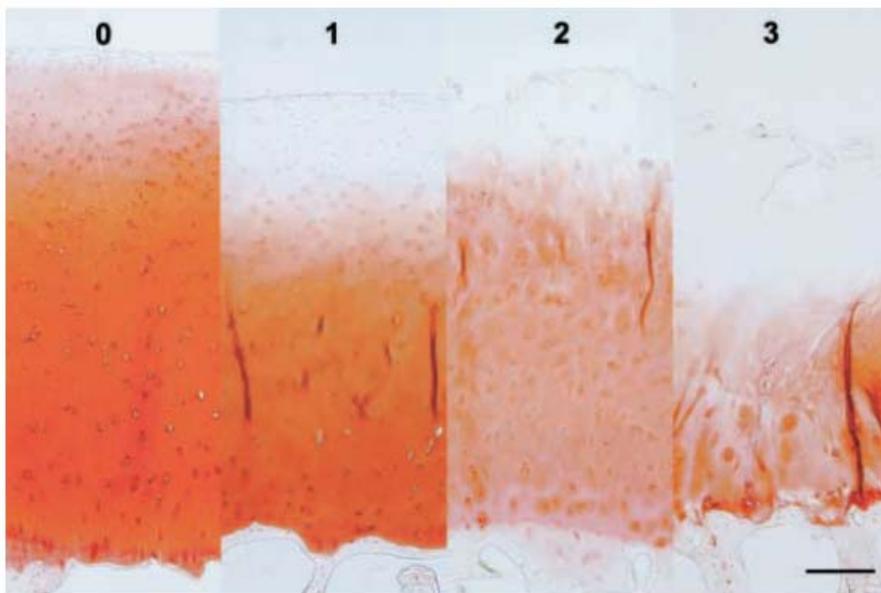


Abbildung 1.4 Histologische Arthrostadien nach Otte (1987), Safranin- O- Färbung, Balken 400 µm

Entgegen früheren Vorstellungen, dass es sich bei der Arthrose um rein mechanisch bedingte Verschleißerscheinungen, dem sog. "wear and tear concept" [64] handelt, werden Entstehung und Fortschreiten osteoarthrotischer Veränderungen heute als komplexer Krankheitsprozess verstanden, dem ein Ungleichgewicht zwischen destruktiven und protektiven bzw. reparativen Mechanismen zu Grunde liegt, wobei die Homöostase zu Gunsten der katabolen Seite außer Kontrolle gerät [13, 14]. Hierbei spielen mechanische Kräfte, lokale Entzündung und weitere biochemische Vorgänge auf zellulärer (Chondrozyten) und extrazellulärer Ebene eine entscheidende Rolle, so dass in der neueren Literatur von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen wird, der komplexe genetische Regulationsmechanismen zu Grunde liegen.

An der Knorpeldegeneration sind katabole proteolytische Enzyme (Matrixmetalloproteinasen, MMP) beteiligt, deren Regulation einerseits durch Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of MMP), andererseits durch Induktoren, wie beispielsweise proinflammatorische Cytokine (TNF alpha, Interleukin-1), erfolgt [29]. Gleichzeitig mit der Schädigung werden Reparaturmechanismen aktiviert. Die unzureichenden Regenerationsversuche der Chondrozyten lassen sich prinzipiell in 3 Reaktionsmustern zusammenfassen [68]: Sie weisen eine Proliferation auf, steigern die Synthese von ECM und ändern ihre Syntheseprodukte in primär untypische Matrixbestandteile (z.B. Kollagen X, Osteocalcin) mit Alteration des Phänotyps. Auch weitere Mechanismen wie die Apoptose werden in diesem Zusammenhang diskutiert [2].

Diese Erkenntnisse verdeutlichen die komplexen molekularen Abläufe im Arthroseprozess und sind Gegenstand der aktuellen orthopädischen Grundlagenforschung.

1.2 Die Rolle des subchondralen Knochens im Arthroseprozess

Der subchondrale Knochen bildet mit dem hyalinen Knorpel des Gelenkes eine funktionelle Einheit, die für dessen Integrität von großer Bedeutung zu sein scheint. Morphologische und biochemische Alterationen des subchondralen Knochens bei Arthrose (sog. „remodeling“), welche auf einen abnormalen Knochenmetabolismus schließen lassen, konnten in mehreren Studien belegt werden [49, 51]. Bis heute wird die Rolle des subchondralen Knochens in der Induktion und Progression des Arthroseprozesses nur unzureichend verstanden.

Morphologisch lässt sich bei osteoarthrotischen Veränderungen neben osteophytären Anbauten eine vermehrte Sklerosierung des subchondralen Knochens nachweisen, welche bereits im konventionellen Röntgenbild meist deutlich zu erkennen ist. In der Literatur finden sich Hinweise, dass sowohl bei Tieren als auch bei Menschen die subchondrale Sklerosierung und die damit einhergehenden abnormalen Veränderungen des Knochenstoffwechsels der Knorpeldegradation vorausgehen [5, 19]. Es konnte gezeigt werden, dass Arthrosepatienten unabhängig vom Körpergewicht eine höhere Knochendichte aufweisen als vergleichbare Individuen ohne Arthrose [50]. Weiterhin wird die Koexistenz von primärer Arthrose und Osteoporose extrem selten beobachtet [36, 58, 89], was ebenfalls als Hinweis

auf eine positive Korrelation von erhöhter Knochendichte und Arthrose gewertet werden kann.

Bisher ist die Rolle von regulativen Mechanismen des subchondralen Knochens im Arthroseprozeß nur unzureichend untersucht.

1.3 Genetik der Arthrose und Bedeutung von SNP

Mehrere Zwillingsstudien und Genanalysen legen die Vermutung nahe, dass die genetische Komponente eine wichtige Rolle im Arthroseprozess spielt [75, 78, 94] und der Einfluss genetischer Faktoren auf die Arthroseentstehung für bestimmte Gelenke bis zu 70% beträgt [32]. Auch das Auftreten von Arthrose bei jungen Patienten (early-onset) konnte mit bestimmten Genvariationen in Verbindung gebracht werden [87]. In Abgrenzung zu den sekundären Formen der Arthrose stellt die genetische Prädisposition insbesondere bei Patienten mit primärer Arthrose einen wichtigen Risikofaktor dar.

Mehrere Suzeptibilitätsloci und multiple Kandidatengene, welche mit dem Auftreten und der Progression von Arthrose in Verbindung gebracht werden, sind in der Literatur beschrieben [1, 32, 59]. Ebenso konnte für viele untersuchte Genvariationen keine Assoziation mit dem Krankheitsbild der Arthrose gefunden werden. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der Arthrose um hinsichtlich der genetischen Komponente um ein polygenes Geschehen handelt.

Genetik ist in diesem Zusammenhang ein übergeordneter Begriff und bedeutet zunächst, dass Variationen des Erbgutes auf Ebene der DNA einen möglichen Risikofaktor für die Arthroseentstehung bzw.- progression darstellen oder auch als protektiver Faktor fungieren können. Die grundlegende Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass bestimmte Sequenzvariationen in Genen mit einer Schlüsselfunktion im Arthroseprozess, sog. Kandidatengenen, mit dem auftreten primärer Arthrose korrelieren.

Die häufigsten Sequenzvariationen im Genom sind die sogenannten single nucleotide polymorphisms (SNP, von Polymorphismus gr./lat: Vielgestaltigkeit), bei denen es zum Austausch einer Base im DNA-Molekül kommt und dieser den Unterschied zwischen zwei Allelen eines Gens ausmacht. Es wird von einem SNP auf 200 - 2000 Basenpaare im menschlichen Genom ausgegangen. Definitionsgemäß liegt erst ab einer Häufigkeit der Sequenzvariation von über 1% in einer definierten Population ein SNP vor. Da die meisten Änderungen, die durch

1. Einleitung

Polymorphismen hervorgerufen werden, ohne Auswirkung auf die Reproduktionsfähigkeit des Individuums bleiben, unterliegen sie nicht dem Evolutionsdruck und sind somit hoch konserviert. Da viele Aminosäuren von mehreren Basentriplets kodiert werden und SNPs auch in nicht kodierenden bzw. funktionell nicht relevanten Genabschnitten vorliegen (z.B. in Introns), hat der überwiegende Anteil der SNPs keine funktionelle Bedeutung auf der Proteinebene. Liegt der SNP jedoch im kodierenden Bereich einer Gen-Sequenz, also im Exon, kann das einen Aminosäureaustausch im resultierenden Protein mit entsprechender Aktivitätsmodifikation zur Folge haben. Somit können SNPs mit funktioneller Relevanz sowohl eine krankheitsfördernde oder aber auch eine protektive Funktion im pathophysiologischen Prozeß von Erkrankungen aufweisen.

Zunehmend stehen SNPs diverser Kandidatengene, denen eine Schlüsselrolle in der Arthroseentstehung zugeschrieben wird, im Interesse der genetischen Arthroseforschung.

1.4 LRP und der Wnt- Signalweg

Wnt- Proteine zählen zu einer hochkonservierten Familie von Molekülen, welche für Zell- Zell- Interaktionen verantwortlich sind. Der Signalweg ist nach seinem Liganden „Wnt“ benannt, einem Signalprotein, das als lokaler Mediator eine wichtige Funktion in der Embryogenese einnimmt. „Wnt“ setzt sich zusammen aus Wg für Wingless und Int-1. Die Bezeichnung Wingless-type stammt aus Beobachtungen mit der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, in der Mutationen im Wingless-Gen zu einer flügellosen Variante der Fliegen führen. Die Aktivierung des früher als Int bezeichneten Wnt-1-Gens fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs. Alterationen des Wnt- Signalweges können zu spezifischen Entwicklungsdefekten führen und werden als mögliche Ursache für verschiedene Erkrankungen (Colorektales Carcinom, Mamma Carcinom) diskutiert.

Die Gene bzw. Proteine der Wnt- Familie spielen eine wichtige Rolle in der komplexen Regulation der Morphogenese, der Zelldifferenzierung, -proliferation und der Homöostase von Knochen und Knorpel.

LRP 5 (low- density lipoprotein receptor- related protein 5) fungiert neben dem Rezeptor Frizzled als Co- Rezeptor des Wnt/ β -catenin Signalweges, dessen

1. Einleitung

Aktivierung (up- regulation) die Knochenformation begünstigt und dessen Unterdrückung (down- regulation) in einer Osteopenie resultiert [6, 7].

Für LRP 5 wurde eine Assoziation mit der menschlichen Knochendichte (BMD) nachgewiesen [40, 70]. Varianten des LRP 5 Gens werden mit alterierter Knochendichte (BMD) bzw. erhöhtem Frakturrisiko assoziiert [30, 31, 47, 48, 84].

Auch in der Chondrogenese wird dem Wnt- Signalweg eine regulative Funktion attribuiert [74].

Für LRP 1 (low- density lipoprotein receptor- related protein) konnte eine repressive Wirkung auf den Wnt- Signalweg demonstriert werden [97].

Aufgrund dieser Beobachtungen steht der Wnt- Signalweg sowie die LRP- Familie zunehmend im Interesse der molekularen Osteoporose- und Arthroseforschung. Daher sind auch Variationen der am Wnt- Signalweg beteiligten Gene hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Arthroseentstehung von großem wissenschaftlichem Interesse.

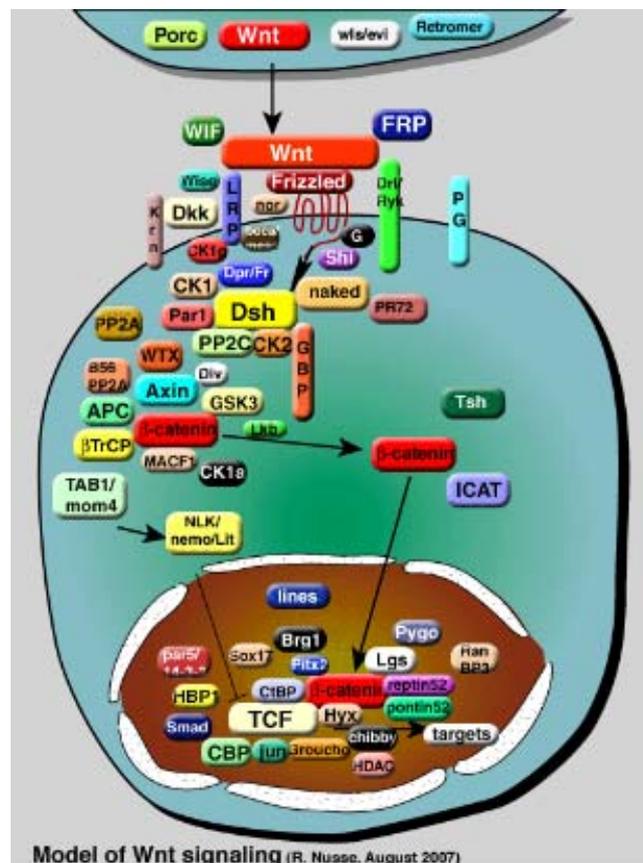


Abbildung 1.5 Der Wnt- Signalweg nach R. Nusse (2007)

1.5 Studienaufbau und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie ist es, eine Aussage über die Allelverteilung von zwei ausgewählten SNPs der Kandidatengene LRP 1 und LRP 5 in klar definierten Kollektiven von Patienten zu treffen. Hierbei sollen Patientenkollektive mit möglichst extremen Befundsituationen hinsichtlich der Knorpelsituation bzw. der Ausprägung von Gonarthrose miteinander verglichen werden. Weiterhin soll eine möglichst verlässliche Diagnosestellung erfolgen.

Folgende Kriterien wurden aufgestellt:

- Gegenüberstellung von jungen an fortgeschrittener Gonarthrose leidenden Patienten (<45 Jahre) und älteren Patienten (>55 Jahre) mit intaktem Knorpel im Kniegelenk sowie einer dritten Gruppe mit Patienten über 55 Jahren mit fortgeschrittener Gonarthrose
- Rigide Ausschlusskriterien zur Erlangung einer eindeutigen Diagnose (primäre Gonathrose)
- Diagnosesicherung durch ein Verfahren mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität (Arthroskopie)
- Rekrutierung von mindestens 100 Patienten pro Gruppe
- Auswahl erfolgversprechender Polymorphismen in Kandidatengenen
- Durchführung einfacher und etablierter experimenteller Verfahren (PCR, Restriktion, Gen-Sequencing)
- Klare Zuordnung der Allelverteilungen in der Auswertung
- Klare statistische Auswertung der Allelverteilungen

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

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Der WOMAC-Score

Der in englischer Sprache entwickelte Western Ontario and McMaster Universities` Osteoarthritis- Index (WOMAC) ist ein etablierter Patientenfragebogen [8] zur Erfassung der Symptome und der funktionellen körperlichen Einschränkung im Alltag bei Patienten mit Gon- und Coxarthrose. Er wurde 1996 für den deutschen Sprachraum durch Stucki et al. adaptiert [81] und umfasst drei Kategorien (Schmerz, Steifigkeit, Funktion) mit insgesamt 24 Fragen (Schmerz: 5, Steifheit: 2, Funktion: 17), die vom Patienten jeweils auf einer subjektiven, visuellen Graduierungsskala (Abbildung 2.1) beantwortet werden.

Bei der Auswertung werden die jeweils erreichten Punktzahlen addiert und in den einzelnen Kategorien dargestellt. So kann 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 in der vorliegenden Arbeit in der Darstellung der Gesamtscore, also die Summe aller Einzelwerte, verwendet. Ausgewertet wurden die Daten mit SPSS Version 12.0.

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

Abbildung 2.1 Visuelle Analogskala des Western Ontario and McMaster Universities` Osteoarthritis-Index (WOMAC)

2.1.2 Fragebogen „Arthrostudie“

Weitere Informationen über die teilnehmenden Probanden wurden mit Hilfe eines Fragebogens akquiriert (Abbildung 2.2).

Fragebogen „Arthrosestudie“

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)

Gehören Sie der Gruppe ohne Arthrose an, bitte nur Fragen 2,3,4,5,6 und 7 beantworten!!

Abbildung 2.2 Fragebogen Arthrosestudie

2.1.3 Blutproben

Als Quelle zur Isolierung genomischer DNA dienten Vollblutproben (EDTA-Röhrchen). Die Rekrutierung der Blutproben erfolgte durch die Blutentnahme im Rahmen der präoperativen Vorbereitung bei Patienten, die zur operativen Versorgung des betroffenen Kniegelenkes mit einer Knie totalendoprothese anstanden. Patienten, die bereits operiert wurden, wurden telefonisch kontaktiert und zur Blutentnahme in die Orthopädische Universitätsklinik Würzburg, König-Ludwig-Haus, einbestellt. Wohnte der Patient zu weit entfernt, erfolgte die Blutentnahme durch den Hausarzt. Dieser wurde zuvor telefonisch über die Studie informiert und um Kooperation gebeten. Entsprechende Blutentnahmeröhrchen sowie ein frankierter Rückumschlag wurden zugesendet. Die zur Studie gehörigen Fragebögen erhielt der Patient per Post direkt nach Hause, ebenfalls mit bereits frankiertem Rückumschlag.

2.1.4 Labormaterial

● **Vollblutproben**

EDTA- Monovetten

● **Puffer**

AL-Puffer (QIAamp® Blood Kit), AWI-Puffer (QIAamp® Blood Kit), PCR-Puffer (10 mM Tris (pH 8,4), 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) NE-Puffer (Restriktion), TE-Puffer (1ml Tris Cl, 0,2ml EDTA, Aqua dest.) TBE-Puffer (10,8g/l Tris, 5,8g/l Borsäure, 10mM EDTA), DNA-Probenpuffer (TBE, 60% Glycerol, 0,4% Xylen Cyanol)

● **Chemikalien**

Ethanol, Ethidiumbromid

● **Enzyme:**

Apa I (50,000 U/ml; New England Biolabs),

Eci I (2,000 U/ml; New England Biolabs)

● **Sonstiges**

EDTA-Monovetten (Sarstedt), QIAamp® Blood Kit (QIAGEN), Primer (MWG Biotech-AG), dNTP-Mixture (TaKaRa Bio Inc.), TAQ-Polymerase (Clone – TAQ-DNS-Polymerase 5 un/µl von Amersham), Big Dye Terminator Cycle Ready Reaction Kit mit Ampli TAQ FS von ABI Prism, DNS-Leiter plus von peq Gold, Template Suppression Reagent von Abi Prism, TSR (Abiprism)

2.1.5 Geräte

- Labor- Zentrifuge „Biofuge pico“ (Heraeus)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- Metallblock-Thermostate (Grant Boekel)
- Multi-Cycler PTC 200 (PCR-Cycler Biozym Diagnostik GmbH)
- Bio-Profil
- Abi-Prism 310 Genetic Analyser
- Gelelektrophorese (Consort 300V; 500mA E 835; Mode B2 Owl Separation Systems Class II Rated 0-150 V; 0-100 mA; Mitsubishi Printer P91)
- Densitometer (LFT-Labortechnik)
- Densitometer-Software (Bio-ID)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde den Patienten venöses Blut aus der Armvene in 9 ml EDTA-Monovetten abgenommen und bei 4°C bzw. im Eisschrank bei -20°C gelagert. Zur Extraktion der DNA aus den Granulozyten des venösen Blutes wurde das Test-System QIAamp® Blood Kit der Firma QIAGEN verwendet. Dazu wurden zunächst gemäß Protokoll 20 µl QIAGEN Protease in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen- Rörchen pipettiert, gefolgt von 200 µl der Vollblutprobe und 200 µl des AL-Puffers. Das Mikrozentrifugenrörchen wurde anschließend für 15 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend folgte ein kurzes Zentrifugieren zum Entfernen von Blasen.

Nach Addition von 200 µl Ethanol (96-100%), erneutem Vortexen und Zentrifugieren für 15 Sekunden wurde die Probe auf eine QIAamp spin Säule gefüllt, ohne den Rand zu befeuchten. Das Rörchen 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 hinzupipettiert, ohne den Rand anzufeuchten. Das geschlossene Rörchen wurde dann erneut bei 6000 x g (8000 rpm) für eine Minute zentrifugiert, die QIAamp spin Säule in ein sauberes 2 ml Sammelrörchen gefüllt und anschließend inklusive Filtrat verworfen. Nach dem Öffnen der QIAamp spin Säule wurden wiederum 500 µl AWI-Puffer hinzupipettiert, ohne den Rand anzufeuchten. Das Cap wurde verschlossen und bei voller

1. Einleitung

Geschwindigkeit (20000 x g; 14000 rpm) für drei Minuten zentrifugiert. Die QIAcamp spin Säule wurde im Anschluss in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen gestellt und das Sammel-Röhrchen inklusive Filtrat verworfen. Nach dem Öffnen der QIAcamp spin Säule wurden 200 µl destilliertes Wasser hinzupipettiert, bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert and dann für eine Minute bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugiert.

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

2.2.2 PCR (Polymerase- Kettenreaktion)

Zur in vitro Amplifikation der zu untersuchenden Genabschnitte wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Die Durchführung der PCR einzelner Gensequenzen, in denen der Polymorphismus erwartet wurde, erfolgte nach dem Pipettierschema, welches in Tabelle 2.1 dargestellt ist.

LRP 1/5 Pipettierschema		
Reagenzien	Menge	Einheit
Primer sense	1	µl
Primer antisense	1	µl
dNTP Mix 2,5mM	1	µl
Puffer (Tris 10mM, pH 8,4, 50mM KCl, 1,5mM MgCl ₂)	3	µl
DNA	50	ng
Taq Polymerase (Clone TAQ 5 un/µl, Amersham)	0,5	µl
Aqua dest.	ad 30	µl

Tabelle 2.1 LRP 1/5 Pipettierschema

Folgende Programmierungen wurden für die PCR im Cycler gewählt:

LRP 1 PCR Programm		
Step	Temperatur/°C	Dauer/min
1. Initialisierung	94	3:00
2. Denaturierung	94	0:30
3. Annealing	57,5	1:00
4. Elongation	72	1:00
5. goto 2.	40 Zyklen	
6. Elongation	72	5:00
7. Aufbewahrung	4	for ever

Tabelle 2.2 PCR-Programm LRP 1

1. Einleitung

LRP 5 PCR Programm		
Step	Temperatur/°C	Dauer/min
1. Initialisierung	94	3:00
2. Denaturierung	94	0:30
3. Annealing	55	1:00
4. Elongation	72	1:00
5. goto 2.	36 Zyklen	
6. Elongation	72	5:00
7. Aufbewahrung	4	for ever

Tabelle 2.3 PCR-Programm LRP 5

Nach erfolgter Amplifikation wurden die Proben mit dem PCR- Produkt bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3 Sequenzierung zur Verifikation des PCR-Produkts

Zur Verifikation des PCR-Produkts bzw. zur der richtigen Primerwahl wurde eine Sequenzanalyse des PCR- Produktes durchgeführt. Dafür wurde folgender Pipettieransatz verwendet:

LRP 1/5 Pipettierschema		
Reagenzien	Menge	Einheit
Primer	1	µl
ABI Prism „Big Dye“ Terminator Cycle Ready Reaction Kit mit Ampli TAQ FS	8	µl
DNA (gereinigt über einer Auto-Seq G50 – Säule, Amersham)	8	µl
Aqua dest.	ad 20	µl

Tabelle 2.4 Pipettierschema für die Sequenzierung

Das folgende PCR-Programm wurde durchgeführt:

Sequenzierung PCR Programm		
Step	Temperatur/°C	Dauer/min
1. Initialisierung	94	4:00
2. Denaturierung	94	0:30
3. Annealing	50	1:00
4. Elongation	60	1:00
5. goto 2.	25 Zyklen	
6. Elongation	72	5:00
7. Aufbewahrung	4	for ever

Tabelle 2.5 PCR-Bedingungen für den Gensequenzierung

1. Einleitung

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, anschließend wurde die Probe 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Pellet abgegossen und 400 µl 100%iges Ethanol in das Röhrchen pipettiert. Es erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm. Dann wurde das Pellet erneut abgegossen und das Röhrchen luftgetrocknet. Zur Beschleunigung dieses Prozesses wurde der Speed Vac zur Hilfe genommen. 25 µl Template Suppression Reagent von ABI Prism wurden hinzugegeben, bevor die Proben im Sequenzer mit dem o.g. Gensequenzierungsprogramm analysiert wurden.

2.2.4 Restriktion

Die PCR- Produkte von LRP 1 und LRP 5 wurden einer spezifischen Restriktion unterzogen. Die jeweils verwendeten Restriktionsenzyme (Apa I, Eci I) schneiden das PCR- Produkt an der Stelle der Lokalisation des Polymorphismus, jedoch nur bei Vorliegen eines der beiden Allele. Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes ergeben sich drei mögliche Schnittvariationen:

1. homozygot ungeschnitten (Zustand A)

Darstellung einer Bande bei der Gelelektrophorese, die dem PCR- Produkt entspricht.

2. heterozygot geschnitten / ungeschnitten (Zustand B)

Darstellung einer Bande bei der Gelelektrophorese, die dem PCR- Produkt entspricht, sowie von einer oder zwei Banden bei der Gelelektrophorese, die kleiner als das PCR- Produkt sind und den Schnittprodukten entsprechen.

3. homozygot geschnitten (Zustand C)

Darstellung von einer oder zwei Banden bei der Gelelektrophorese, die kleiner als das PCR- Produkt sind und den Schnittprodukten entsprechen.

Folgende Pipettieransätze wurden zur Durchführung der Restriktion angewendet:

Restriktion Pipettierschema		
Reagenzien	Menge	Einheit
Restriktionsenzym	0,5	µl
Puffer (enzymspezifisch)	1	µl
BSA	0,15	µl
DNA	50	ng
Aqua dest.	ad 15	µl

Tabelle 2.6 Pipettierschema für die Restriktion von LRP 1, LRP 5

Das geschlossene Röhrchen wurde der individuellen Inkubationstemperatur des Restriktionsenzym entsprechend für zwei Stunden in einen Metallblockthermostat gestellt.

Restriktionsbedingungen		
	LRP 1	LRP 5
Inkubationstemperatur/ °C	25	37
Dauer/ h	2:00	2:00
Restriktionsenzym	Apa I	Eci I
Puffer	NEB 4 (10x) BSA (100x)	NEB 2 (10x) BSA (100x)

Tabelle 2.7 Restriktionsbedingungen für LRP 1, LRP 5

2.2.5 Gelelektrophorese

Zur Darstellung der PCR-Produkte sowie der Restriktionsprodukte diente die Gelelektrophorese. Dazu wurde eine 1,5%ige Agaroselösung in TBE in einem Volumen von 15-70 ml – je nach Größe des gewünschten Gels – hergestellt und in der Mikrowelle bis zum Übergang in den flüssigen Zustand gekocht. Danach kühlte die Lösung unter stetigem Rühren bei Raumtemperatur bis auf ca. 60 °C ab. Im Anschluss wurde 1 ml Ethidiumbromidlösung pro 10 ml Gellösung hinzupipettiert. Die Lösung wurde gerührt, bis sich das Ethidiumbromid gut verteilt hatte und dann in die Gelkammer gegossen. Zur Herstellung der Slots als Startpunkt für die Restriktionsprodukte wurde ein entsprechender Kamm auf einer Seite des Gels verwendet. Nach Festigung des Gels wurde der Kamm entfernt. Das Gel wurde im Anschluss in 0,5× TBE- Laufpuffer in die Elektrophoresekammer gelegt, wobei es vollständig von der Pufferlösung bedeckt wurde. Die Slots mussten an der negativen Elektrode der Kammer zu liegen kommen. Dann erfolgte das Hineinpipettieren der durchnummerierten Proben in die jeweiligen Slots und das Anlegen einer Spannung

in der Größenordnung von 120- 150 mV. Die DNA wandert aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste im "Rückgrat" der DNA von der Kathode zur Anode, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als große. Die DNA ist während dieses Prozesses normalerweise nicht sichtbar; daher wurde der Fortschritt des Elektrophoreseprozesses an der Farbfront abgelesen, die sich schneller als selbst kleinste DNS-Fragmente durch das Gel bewegte. Hatte die Farbfront das Ende des Gels erreicht, war die Elektrophorese abgeschlossen und die angelegte Spannung konnte beendet werden.

Das Gel konnte abschließend unter einer UV-Lampe betrachtet werden und die Bilder wurden computergestützt archiviert. Das Ethidiumbromid, welches sich in die DNA einlagert, fluoresziert im ultravioletten Licht, so dass die Proben abgelesen wurden und jeweils den oben genannten drei Restriktionszuständen eindeutig zugeordnet werden konnten.

2.2.6 Statistik

Die Allelverteilungen (Zustände A, B, C) wurden den Patientengruppen (Gr.1, 2, 3) zugeordnet, um die Kollektive statistisch miteinander vergleichen zu können. Zur statistischen Auswertung der erfassten epidemiologischen und laborchemischen Parameter und zur Signifikanztestung wurden folgende Verfahren verwendet:

● **Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson**

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

Mit dem Chi-Quadrat-Test oder χ^2 -Test werden Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit untersucht. Berechnet wurden die Ergebnisse mit dem Programm SPSS Version 12.0.

● **Der Fisher- Exakt- Test**

Der exakte Test nach Fisher 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). Für die Berechnung

1. Einleitung

des Fisher-Exakt-Tests wurden sämtliche Daten in Kreuztabellen (2x2-Matrizen) aufgeteilt. Berechnet wurden die Ergebnisse ebenfalls mit dem Programm SPSS Version 12.0.

Angegeben wird die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit „p“. Signifikant sind Aussagen, welche mit einem p- Wert $<0,05$ belegt sind. Ein hohes Signifikanzniveau haben Aussagen, bei denen der p- Wert $<0,01$ ist.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenselektion und Einteilung der Kollektive

Für die vorliegende Studie wurden Patienten für drei Gruppen aus der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg und der Orthopädischen Gemeinschaftspraxis Straubing (OGP, Dr. Eichhorn, Prof. Dr. Strobel) rekrutiert:

● **Gruppe 1**

Die erste Gruppe (n= 100) bildete ein Kollektiv aus jungen Arthrose- Patienten mit dritt- oder viertgradigem Knorpelschäden gemäß der Outerbridge- Klassifikation in mindestens zwei Kompartimenten des Kniegelenkes. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Arthroskopie jünger als 46 Jahre. Die Rekrutierung von Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg, König- Ludwig- Haus, erfolgte unter Zuhilfenahme der SFA- Datenbank (Stiftung zur Förderung der Arthroskopie, www.sfa-stiftung.org). Die Diagnose sowie die Ausprägung und Lokalisation des jeweiligen Knorpelschadens wurde arthroskopisch durch erfahrene Oberärzte der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg oder durch erfahrene Arthroskopeure der Orthopädischen Gemeinschaftspraxis (OGP, Dr. Eichhorn und Prof. Dr. Strobel) in Straubing gestellt.

Um eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit einer primären Arthrose zu gewährleisten, wurden folgende Ausschlusskriterien, die als Ursachen sekundär arthrotischer Veränderungen gelten können, festgelegt:

- freie Gelenkkörper
- Gerinnungsstörungen (z.B. von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, Hämophilie)
- Entzündungen im Gelenk (spezifisch oder unspezifisch)
- ligamentäre Instabilität
- rezidivierende Patellaluxation
- Achsfehlstellungen (z.B. Varus-/Valgusfehlstellung)
- Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (z.B. rheumatoide Arthritis, reaktive Arthritis, rezidivierende Gelenkergüsse, etc.),
- Metabolische Störungen (z.B. Gicht, Chondrokalzinose, etc.)
- anamnestisch eruierbare Traumen (z.B. Bandverletzungen mit Instabilität, intra-/ extraartikuläre Frakturen, etc.).

● **Gruppe 2**

Die zweite Gruppe (n=86) bestand aus Patienten mit Gonarthrose, die einen dritt- oder viertgradigen Knorpelschaden in mindestens zwei Kompartimenten des Kniegelenkes aufwiesen, jedoch zum Zeitpunkt der OP älter als 55 Jahre waren. Die Diagnosestellung erfolgte ebenfalls im Rahmen einer operativen Intervention, entweder arthroskopisch oder bei Implantation einer Kniegelenktotalendoprothese. Mit Hilfe der oben genannten Ausschlusskriterien wurde versucht, auch hier sekundäre Arthroseformen weitestgehend auszuschließen.

● **Gruppe 3**

Die dritte Gruppe (n= 103) setzte sich aus Patienten zusammen, die zum Zeitpunkt der Operation älter als 55 Jahre waren und arthroskopisch einen intakten Gelenkknorpel oder maximal eine Chondromalazie ersten Grades aufwiesen. Diese Gruppe fungierte als Vergleichskollektiv mit gesunden Probanden und bildete einen größtmöglichen Kontrast zur ersten Gruppe mit jungen Patienten, die eine fortgeschrittene Arthrose in jungem Alter (early-onset) aufwiesen. Gerade im Vergleich dieser beiden Extremgruppen wurden genetische Unterschiede bei arthroserelevanten Genen erwartet.

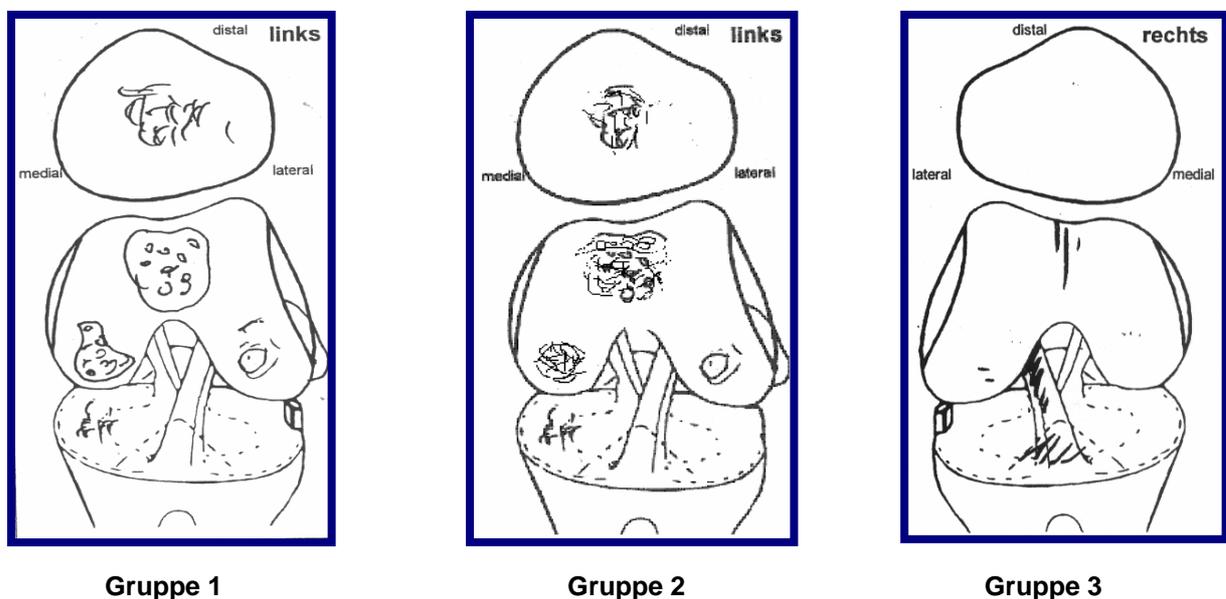


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Knorpelsituation der 3 Patientengruppen, aus OP-Berichten der OGP Straubing (Dr. Eichhorn, Prof. Dr. Strobel)

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, Patienten mit einer primären Arthrose zu rekrutieren, wurden durch den o.g. Fragebogen in den Gruppen 1 und 3 weitere

3. Ergebnisse

anamnestische Daten bezüglich Gelenkerkrankungen des Patienten und dessen Familie sowie der Lebensweise gewonnen. Ebenfalls wurden anamnestisch Vorerkrankungen und mögliche Traumen eruiert.

3.2 Gruppencharakteristika

Zur Darstellung und Charakterisierung der drei Gruppen wurden Informationen bezüglich Geburtstag, Alter zum Zeitpunkt der Operation, Geschlecht, Größe, Gewicht (BMI) und WOMAC- Scores gesammelt und tabellarisch (Microsoft Excel) zusammengefasst.

3.2.1 Altersdurchschnitt der Kollektive

Entsprechend der Gruppeneinteilung ergab sich in der ersten Gruppe (Gruppe 1) ein Altersdurchschnitt von 37,33 Jahren zum Zeitpunkt der OP. Der Durchschnitt blieb also deutlich unter der Obergrenze von 45 Jahren. Die zweite Gruppe (Gruppe 2) stellte mit einem Alterdurchschnitt von 68,54 Jahren das älteste Kollektiv dar.

Die dritte Gruppe (Gruppe 3) der Patienten ohne relevante Arthrose überschritt mit einem Altersdurchschnitt von 58,57 Jahren im Durchschnitt die geforderten 55 Jahre deutlich und bildete somit den erwarteten Kontrast zu den jungen Arthrose- Patienten der Gruppe 1.

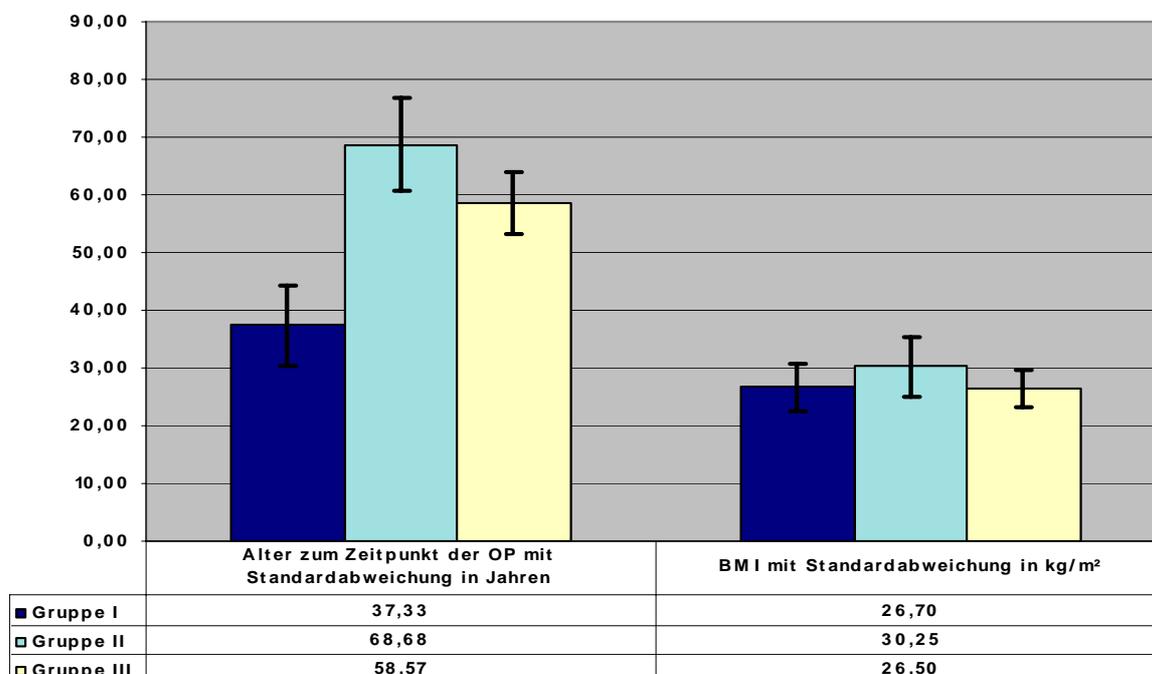


Abbildung 3.2 Altersdurchschnitt und Body- Mass- Index zum Zeitpunkt der Operation, getrennt nach Gruppen (in Jahren)

3.2.2 *Body Mass Index (BMI)*

Der Body Mass Index ist eine Maßzahl zur Bewertung des menschlichen Körpergewichtes unter Berücksichtigung der Körpergröße. Er errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Größe in m})^2}$$

Der durchschnittliche BMI aller in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Patienten lag bei einem Wert von 27,7 kg/m². Gruppe 1 und Gruppe 3 wiesen mit einem BMI von 26,7 kg/m² respektive 26,5 kg/m² nahezu identische Werte auf, wohingegen die Gruppe der alten Arthrosepatienten (Gruppe 2) mit 30,25 kg/m² einen deutlich höheren Wert zeigte.

Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson 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
3. BMI > 25

Er zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den BMI Gruppen zu Gunsten der Gruppe mit einem BMI von über 25 (p= 0,033).

Body- Mass- Index in 3 Gruppen				
	BMI unter 20	BMI 20- 25	BMI über 25	Gesamt (n)
Gruppe 1 (n)	3	31	66	100
Gruppe 2 (n)	0	11	67	78
Gruppe 3 (n)	3	27	67	97
Gesamt (n)	6	69	200	275

Tabelle 3.1 BMI-Werte, aufgeteilt in drei Gruppen

3. Ergebnisse

Exakter Test nach Fisher

Um die einzelnen Gruppen hinsichtlich des Körpergewichtes miteinander zu vergleichen, wurden im exakten Test nach Fisher die BMI- Werte in 2 Gruppen aufgeteilt. Als cut- off wurde ein BMI- Wert von 30 kg/m² gewählt, welcher die Grenze zwischen leichtem Übergewicht und Adipositas bildet.

Body- Mass- Index in 2 Gruppen- Cut- off BMI 30			
	BMI unter 30	BMI über 30	Gesamt (n)
Gruppe 1 (n)	82	18	100
Gruppe 2 (n)	42	36	78
Gruppe 3 (n)	86	13	99
Gesamt (n)	210	67	277

Tabelle 3.2 BMI-Werte, aufgeteilt in zwei Gruppen, Cut- off BMI 30

Es zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Gruppe 1 und 2, so wie zwischen Gruppe 2 und 3. Gruppen 1 und 3 unterschieden sich bezüglich des BMI nicht signifikant.

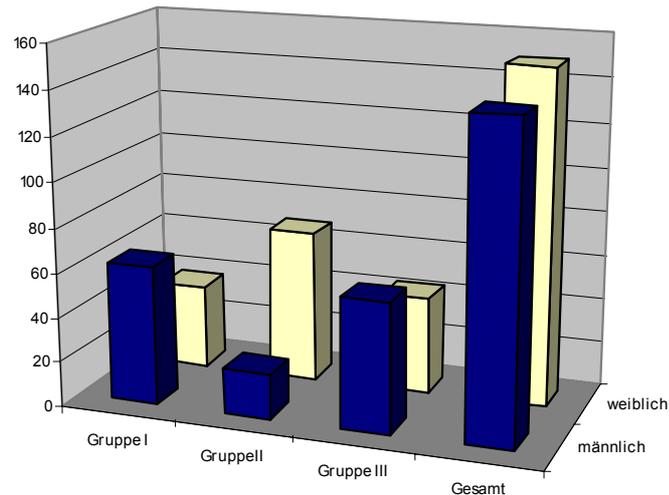
Body- Mass- Index- Exakter Test nach Fisher		
Gruppe I vs. Gruppe II	Gruppe I vs. Gruppe III	Gruppe II vs. Gruppe III
$p < 0.001$	$P = 0,436$	$p < 0.001$

Tabelle 3.3 BMI, Vergleich der 3 Gruppen, Exakter Test nach Fisher

3.2.3 Geschlechterverteilung

In der Auswertung der Geschlechterverteilung zeigte sich in Gruppe 1 und Gruppe 3 ein ähnliches Verhältnis von Männern zu Frauen zu Gunsten des männlichen Geschlechtes. In der Gruppe der Patienten mit altersassoziierter Arthrose (Gruppe 3) überwiegt der Anteil der weiblichen Patienten deutlich.

3. Ergebnisse



	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gesamt
■ männlich	62	20	58	140
■ weiblich	38	68	44	150

Abbildung 3.3 Geschlechterverteilung innerhalb der drei Patientengruppen

Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Im Chi-Quadrat-Test nach Pearson zeigte sich ein hochsignifikanter ($p < 0,001$) Unterschied im Hinblick auf die Geschlechterverteilung.

Exakter Test nach Fisher

Auch der Exakte Test nach Fisher zeigte einen hochsignifikanten Unterschied sowohl zwischen Gruppe 1 und 2 als auch zwischen Gruppe 2 und 3. Gruppen 1 und 3 unterschieden sich nicht signifikant.

Geschlechterverteilung- Exakter Test nach Fisher		
Gruppe I vs. Gruppe II	Gruppe I vs. Gruppe III	Gruppe II vs. Gruppe III
$p < 0,001$	$p = 0,453$	$p < 0,001$

Tabelle 3.4 Geschlechterverteilung, Exakter Test nach Fisher

3.2.4 Der Womac- Score

Der Gesamtscore des Western Ontario Mac Master Universities'- Index wurde durch Addition der Punktwerte der Kategorien Schmerz, Steifheit und Funktion gebildet.

In Gruppe 1 findet sich ein Durchschnittswert von 2,47 von insgesamt 10 Maximalpunkten. 25% der Patienten gaben keinerlei Beschwerden an (0).

3. Ergebnisse

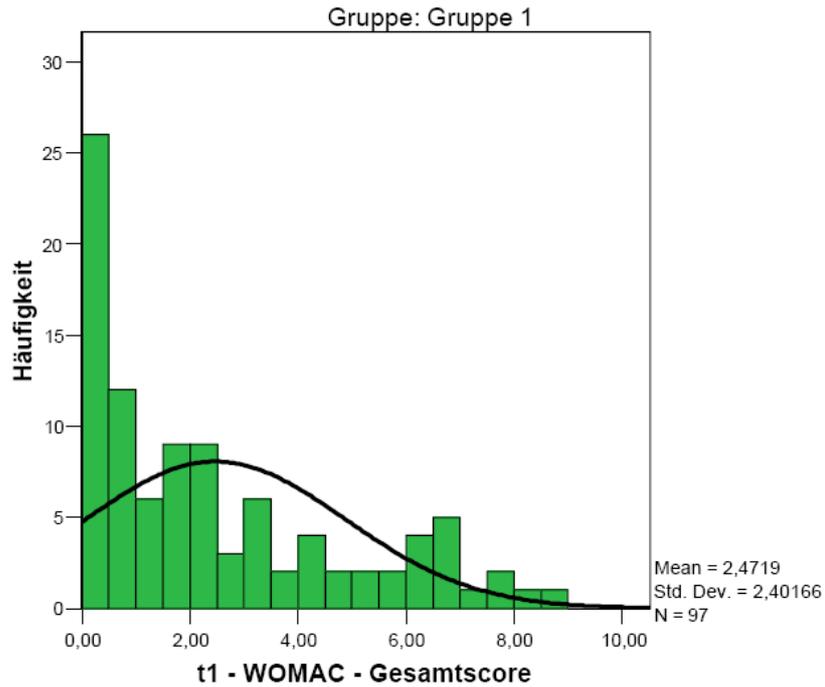


Abbildung 3.4 WOMAC- Score Gruppe 1

Gruppe 2 weist einen Durchschnittswert von 6,18 auf, wobei 64% der Befragten einen Score zwischen 5 und 8 angaben, keiner der Patienten war vollständig beschwerdefrei (0).

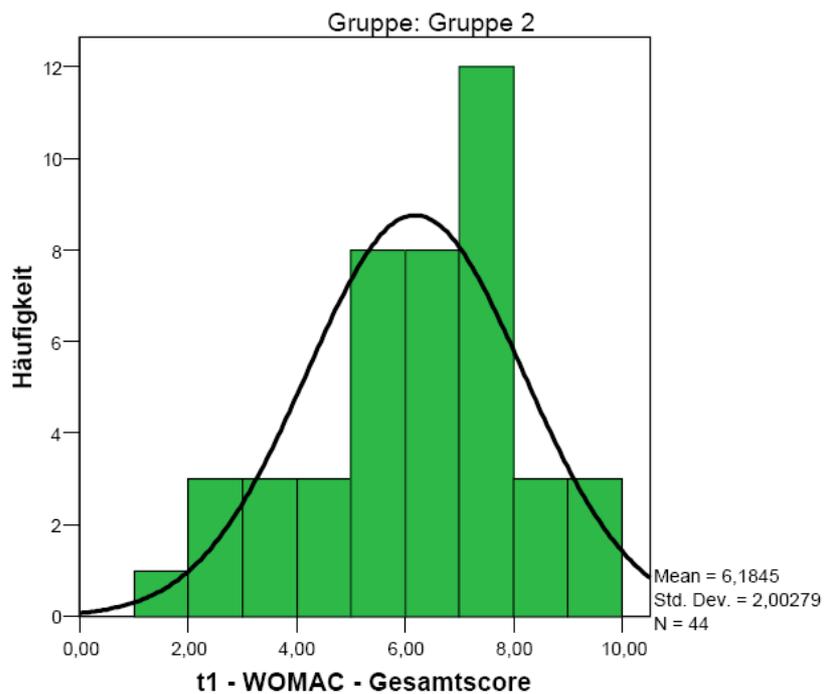


Abbildung 3.5 WOMAC- Score Gruppe 2

3. Ergebnisse

In Gruppe 3, welche das Vergleichskollektiv der nicht an Arthrose erkrankten Patienten über 55 Jahre bildete, liegt der Durchschnittliche Womac- Score bei 1,3. 50% der Befragten hatten keine Beschwerden (0).

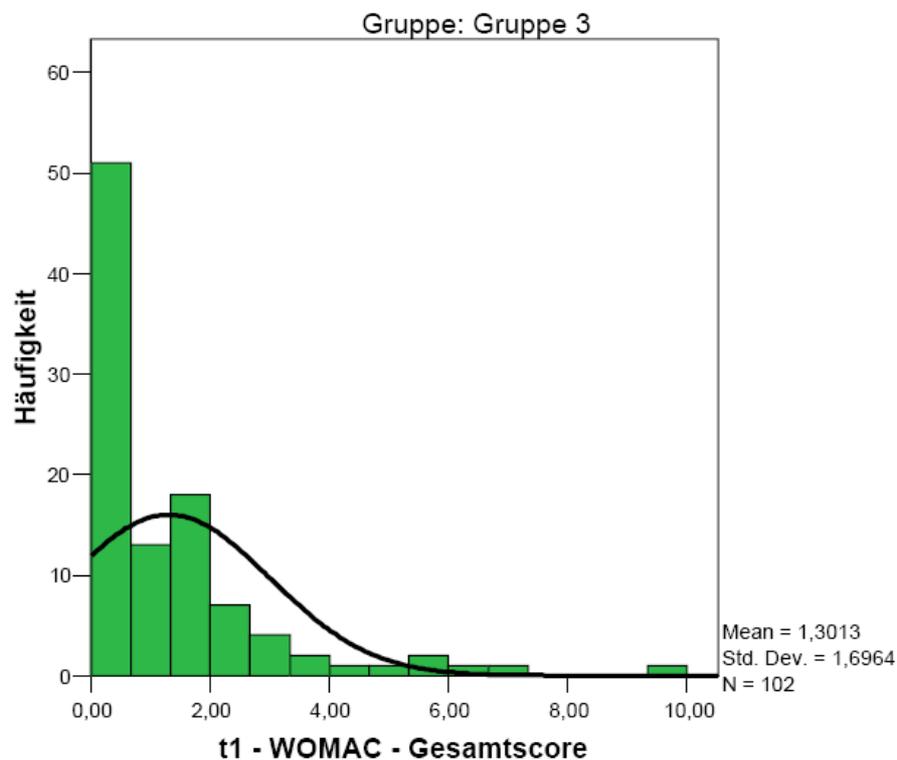


Abbildung 3.6 WOMAC- Score Gruppe 3

Exakter Test nach Fisher

Der exakte Test nach Fisher zeigte einen hochsignifikanten Unterschied im Vergleich der drei Gruppen untereinander. Hierbei ergibt sich eine positive Korrelation zwischen dem anamnestisch erhobenen WOMAC- Score und dem arthroskopisch gesicherten Ausmaß der Arthrose.

WOMAC-Score- Exakter Test nach Fisher		
Gruppe I vs. Gruppe II	Gruppe I vs. Gruppe III	Gruppe II vs. Gruppe III
p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

Tabelle 3.5 WOMAC- Score, Exakter Test nach Fisher

3. Ergebnisse

3.3 Labordaten

3.3.1 Polymorphismen

Folgende SNPs von LRP 1 und LRP 5 wurden ausgewählt und hinsichtlich der Allelverteilung in den Gruppen 1,2 und 3 untersucht:

● **LRP 1**, A217V, Exon 6, SNP rs1800127_

5'- ...CATCTTGGCCACGTACCTGAGTGGGG[C/T]CCAGGTGTCTACCATCACACCTACG... -3'

Abbildung 3.7 Auszug aus der genomischen DNA von LRP 1, der gewählte Polymorphismus ist farblich markiert

● **LRP 5**, A1330V, Exon 18, SNP rs3736228_

5'- ...AGACTGTCAGGACCGCTCAGACGAGG[C/T]GGACTGTGACGGTGAGGCCCTCCCC... -3'

Abbildung 3.8 Auszug aus der genomischen DNA von LRP 5, der gewählte Polymorphismus ist farblich markiert

3.3.2 Primer und PCR

Um den gewünschten Abschnitt der genomischen DNA mit dem zu untersuchenden SNP zu amplifizieren und ein PCR Produkt zu erhalten, welches im Weiteren durch Restriktion die Allelverteilung des Polymorphismus aufzeigen konnte, wurden folgende Primer gewählt:

Primer			
SNP	Primer forward	Primer reverse	Produkt/ bp
LRP 1 A217V Exon 6	GATACCTCCTGCAGCCGGAT (Tm 64,5°C)	GCAGACTGAGGGAGATGTTG (Tm 62,45°C)	431
LRP 5 A1330V Exon 18	GGGTCAGTGTGTGGACCTG (Tm 59,98°C)	GATGGGTGGAAGTGCAGAGT (Tm 60,12°C)	254

Tabelle 3.6 Primersequenzen, Annealingtemperaturen und Größe der PCR- Produkte in Basenpaaren

3. Ergebnisse

Anschließend wurde die Größe des PCR- Produktes in einer Gelelektrophorese verifiziert. Für den amplifizierten Abschnitt von LRP 1 und LRP 5 wurde zusätzlich eine Sequenzanalyse durchgeführt, welche verifiziert, dass der entsprechende Abschnitt des LRP 1/ LRP 5 Gens mit dem zu untersuchenden Polymorphismus amplifiziert wurde. Die Gelelektrophorese des PCR- Produktes von LRP 1 ist in Abbildung 3.9. exemplarisch dargestellt. Analog wurde der LRP 5 Genabschnitt mit einem PCR- Produkt von 254 bp amplifiziert.



Abbildung 3.9 Beispiel der Gelelektrophorese des LRP 1- Produktes, Größe 431 Basenpaare

3.3.3 Restriktion

Die Restriktion wurde unter den bereits genannten Bedingungen für die Restriktionsenzyme Apa I und Eci I durchgeführt.

Die Erkennungssequenz (recognition site) für das Restriktionenzym Apa I lautet:



Folglich wird bei Vorliegen der Sequenz 5'-...**GGGCC**...-3' das PCR- Produkt von LRP 1 geschnitten, bei der Sequenz 5'-...**GGGTCC**...-3' erfolgt keine Restriktion.

Eci I hat die folgende Erkennungssequenz (recognition site), bei der eine Restriktion des PCR- Produktes erfolgt:

3. Ergebnisse



Bei Vorliegen der Sequenz **5'-...GGCGGA...-3'** das PCR- Produkt von LRP 5 geschnitten, bei der Sequenz **5'-...GGTGGGA...-3'** erfolgt keine Restriktion.

Die Gelelektrophorese nach Restriktion des PCR- Produktes von LRP 1 ist in Abbildung 3.9 exemplarisch dargestellt. Analog wurde das LRP 5 Genprodukt einer Restriktion unterzogen.



Abbildung 3.10 Beispiel der Gelelektrophorese des LRP 1- Produktes nach Restriktion mit Apa I

DNA Probe 5: Zustand A (homozygot ungeschnitten)

DNA Probe 2: Zustand B (heterozygot geschnitten/ ungeschnitten)

DNA Proben 1,3,4,6,7,8: Zustand C (homozygot geschnitten)

3.4 Allelverteilung der Polymorphismen

Die Ergebnisse aus PCR, Restriktion und Gelelektrophorese wurden entsprechend der Allelverteilung in 3 Zustände eingeteilt:

Allelzustände		
1.	homozygot ungeschnitten	Zustand A
2.	heterozygot geschnitten/ ungeschnitten	Zustand B
3.	homozygot geschnitten	Zustand C

Tabelle 3.7 Allelzustände

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Allelverteilungen sind in den folgenden Tabellen und Abbildungen dargestellt.

Für LRP 1 ergab sich folgende Allelverteilung:

LRP 1		Zustände			Gesamt	
		A	B	C		
Gruppe	1	Anzahl	2	6	92	100
		% von Gruppe	2,0%	6,0%	92,0%	100,0%
	2	Anzahl	0	4	82	86
		% von Gruppe	0%	4,7%	95,3%	100,0%
	3	Anzahl	1	3	99	103
		% von Gruppe	1,0%	2,9%	96,1%	100,0%
Gesamt		Anzahl	3	13	273	289
		% von Gruppe	1,0%	4,5%	94,5%	100,0%

Tabelle 3.8 Allelverteilung des LRP 1- Polymorphismus

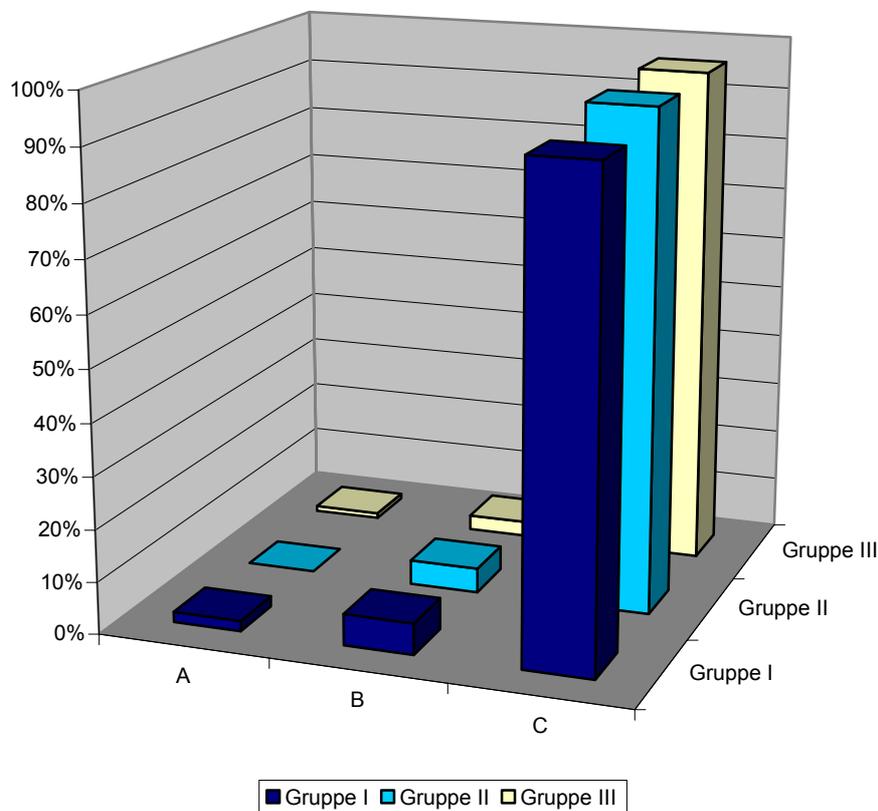


Abbildung 3.11 Allelverteilung des LRP 1- Polymorphismus

3. Ergebnisse

Für LRP 5 waren die Allele wie folgt verteilt:

LRP 5			Zustände			Gesamt
			A	B	C	
Gruppe	1	Anzahl	2	26	72	100
		% von Gruppe	2,0%	26,0%	72,0%	100,0%
	2	Anzahl	1	11	74	86
		% von Gruppe	1,2%	12,8%	86,0%	100,0%
	3	Anzahl	0	28	75	103
		% von Gruppe	0%	27,2%	72,8%	100,0%
Gesamt		Anzahl	3	65	221	289
		% von Gruppe	1,0%	22,5%	76,5%	100,0%

Tabelle 3.9 Allelverteilung des LRP 5- Polymorphismus

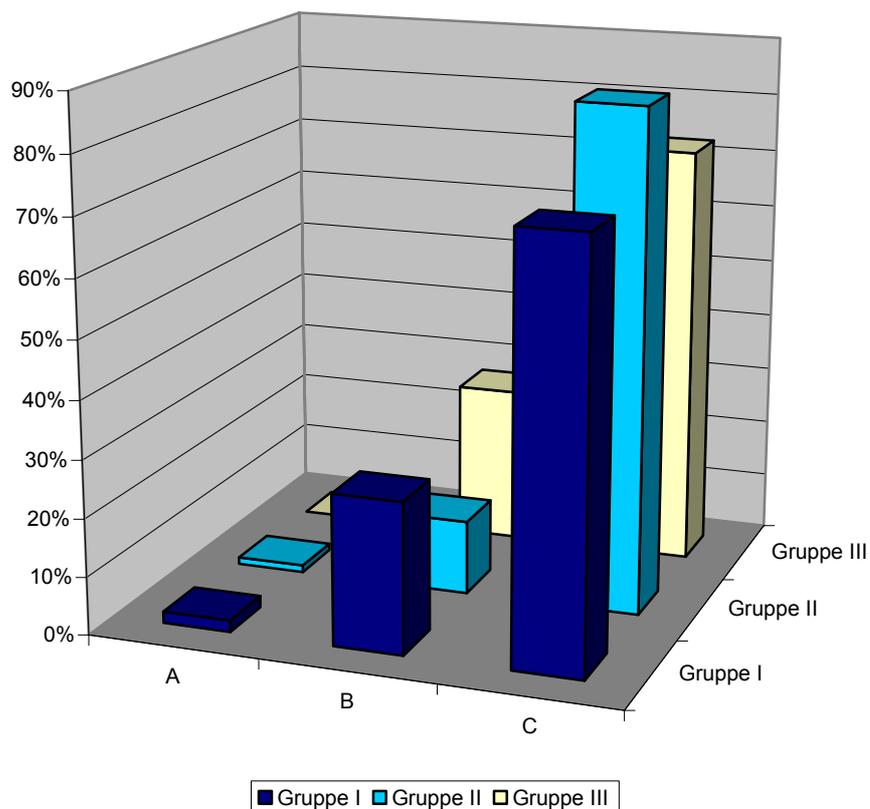


Abbildung 3.12 Allelverteilung des LRP 5- Polymorphismus

3. Ergebnisse

Chi-Quadrat-Test nach Pearson

In der statistischen Auswertung der Allelverteilungen des untersuchten SNP von LRP 1 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Für den LRP 5 SNP ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen 2 (Patienten über 55 Jahre mit Arthrose) und 3 (Patienten über 55 Jahre ohne Arthrose). Hinsichtlich der gegenübergestellten Extremskollektive 1 und 3, bei denen der größte Unterschied erwartet wurde, kann sich lediglich ein Trend für die Verteilung des LRP 5 Polymorphismus vermuten lassen ($p = 0,067$).

Chi- Quadrat- Test nach Pearson Allelverteilung LRP 1/ LRP 5				
Gruppen	1,2,3	1 vs. 2	1 vs. 3	2 vs. 3
LRP 1 (A,B,C)	$p=0,563$	$p=0,381$	$p=0,462$	$p=0,543$
LRP 5 (A,B,C)	$p=0,072$	$p=0,067$	$p=0,351$	$p=0,031$

Tabelle 3.10 Chi-Quadrat- Test, Vergleich der Allelverteilung der untersuchten Polymorphismen zwischen den Gruppen 1- 3

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Die Arthrose ist ein komplexer und multifaktoriell bedingter Krankheitsprozess. In der orthopädischen Grundlagenforschung konnte durch mehrere Zwillingsstudien gezeigt werden [46, 75], dass bei dem Krankheitsbild der Arthrose die genetische Komponente, insbesondere bei der primären Arthrose, eine entscheidende Bedeutung beigemessen werden muss. Es wird ein nicht-mendelsches Vererbungsmuster angenommen. Valdes et al. [86, 87] konnten eine genetische Suszeptibilität für Gonarthrose beim Vorliegen bestimmter Allele in SNPs mehrerer Kandidatengene nachweisen. Da eine monogenetische Ätiologie höchst unwahrscheinlich erscheint, ist weiterhin anzunehmen, dass eine Vielzahl von Genen bzw. die Kombination multipler genetischer Variationen für die Arthroseentstehung und -progression relevant sind. Es wird daher ein polygenes Vererbungsmuster angenommen.

Im Folgenden soll erörtert werden, inwieweit es der vorliegenden Studie gelungen ist, diesem Problem zu begegnen und einen Beitrag zur Bedeutung von SNPs im Arthroseprozess zu leisten.

4.2 Studiendesign und Auswahl der Patientenkollektive

Ziel des vorliegenden Studiendesigns war die Gegenüberstellung zweier Extremkollektive (junge Patienten mit fortgeschrittener Gonarthrose vs. alte Patienten ohne Gonarthrose), um mögliche Unterschiede in der Allelverteilung der untersuchten SNPs auch bei einer geringen Fallzahl herausstellen zu können. Weiterhin sollte durch eine exakte Anamnese und eine hoch sensitive und spezifische Diagnostik (Arthroskopie) die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer primären Arthrose maximiert werden. Um sekundäre Arthroseformen weitgehend auszuschließen, wurden rigide Ausschlußkriterien angewendet.

In der Literatur sind häufig nur unzureichend charakterisierte Patientenkollektive beschrieben, bei denen eine Gonarthrose rein radiologisch diagnostiziert bzw.

ausgeschlossen wird. Weiterhin werden häufig Daten von Patienten mit Arthrose und rheumatoider Arthritis untersucht, was den ätiologischen Unterschieden beider Krankheitsbilder nicht gerecht wird.

In der vorliegenden Studie wurde ein möglichst junges Patientenkollektiv (Gruppe 1, Altersdurchschnitt 37,3 Jahre) mit fortgeschrittener Arthrose (Chondromalazie III° oder IV° in mindestens 2 Kompartimenten des Kniegelenkes) einem älteren Patientenkollektiv (Gruppe 3, Altersdurchschnitt 58,57 Jahre) ohne wesentliche arthrotische Veränderungen (maximal Chondromalazie I°) gegenübergestellt. Als weitere Kontrollgruppe diente eine Gruppe älterer Patienten (Gruppe 2, Altersdurchschnitt 68,54 Jahre), bei denen aufgrund fortgeschrittener Gonarthrose ein totalendoprothetischer Kniegelenksersatz durchgeführt wurde.

Da der röntgenologische Befund bei Gonarthrose nicht zwingend mit dem Ausmaß der Knorpeldegradation und der klinischen Beschwerdesymptomatik korreliert, erfolgte die Diagnosestellung bzw. der Arthroseausschluß visuell, entweder im Rahmen einer arthroskopischen Intervention oder im Falle der Patienten der Gruppe 2 durch die offene Kniegelenksarthrotomie bei Implantation einer Kniegelenktotalendoprothese. Die Lokalisationsbestimmung sowie die Einteilung des Schweregrades der Gonarthrose gemäß der modifizierten Outerbridge- Klassifikation erfolgte durch erfahrene Operateure (Dr. Eichhorn/ Prof. Dr. Strobel, Orthopädische Gemeinschaftspraxis Straubing; Oberärzte der Orthopädischen Universitätsklinik Würzburg, König- Ludwig- Haus), so dass Fehleinschätzungen hinsichtlich des intraoperativen Befundes als eher unwahrscheinlich anzusehen sind. Die Tatsache, dass die Patienten der Gruppe 1 bei Beschwerden im Kniegelenk einer operativen Intervention zugeführt wurden, bei der ein isolierter Knorpelschaden höheren Ausmaßes (Grad III°/ IV° nach Outerbridge in mindestens 2 Gelenkkompartimenten ohne weitere strukturelle Kniebinnenpathologien) arthroskopisch gesichert wurde, spricht ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer symptomatischen Gonarthrose.

Um eine exakte Anamnese zur Erfassung möglicher Ursachen sekundärer Arthroseformen (z.B. Trauma) zu erhalten, wurde ein standardisierter Fragebogen („Fragebogen Arthrostudie“) verwendet. Die Objektivierung und Quantifizierung der klinischen Beschwerdesymptomatik erfolgte anhand des etablierten WOMAC-Scores, wobei ein hochsignifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen belegt und

somit auch das klinische Beschwerdebild adäquat zur näheren Charakterisierung der Kollektive beitragen konnte. Es zeigte sich eine hochsignifikante ($p < 0,001$) Korrelation zwischen dem Ausmaß der arthrotischen Veränderungen und dem WOMAC- Score, also der Ausprägung des klinischen Beschwerdebildes. Es ist jedoch anzumerken, dass 50% der Patienten der Gruppe 3 (Patienten ohne Arthrose, Alter > 55 Jahre) nicht vollständig beschwerdefrei waren, was vermutlich auf andere Pathologien des Kniegelenkes, beispielsweise isolierte Meniskusläsionen, symptomatische Plicae, etc. zurückgeführt werden kann. Die auffallende hochsignifikante Differenz ($p < 0,001$) des WOMAC- Scores zwischen den beiden Arthrosekollektiven (Gruppe 1: 2,47, Gruppe 2: 6,18) scheint mehrere Gründe zu haben. Patienten der Gruppe 2 standen zur Implantation einer Totalendoprothese bei viertgradigem Knorpelschaden und therapieresistenten Beschwerden trotz umfassender konservativer Therapiemaßnahmen an. Strukturelle (z.B. Kontrakturen) und funktionelle Alterationen (z.B. muskuläre Insuffizienz) treten in fortgeschrittenen Arthrostadien häufig auf und können die Beschwerdesymptomatik verstärken. Im Gegensatz dazu wurde von 25 % der Patienten der Gruppe 1 keinerlei Beschwerdesymptomatik angegeben, was aufzeigt, dass die klinische Beschwerdesymptomatik nicht zwingend mit dem Zustand des Gelenkknorpels korreliert und jüngere Patienten möglicherweise über bessere Kompensationsmechanismen verfügen.

Neben der unzureichenden Diagnostik zur Sicherung einer manifesten Arthrose sieht Peach [66] ein weiteres Defizit vieler bisher veröffentlichter Studien in der geringen Fallzahl der untersuchten Patientenkollektive.

Die angestrebte Fallzahl von mindestens 100 Patienten pro Gruppe wurde in Gruppe 1 und 3 erreicht. In Gruppe 2 konnte die angestrebte Fallzahl nahezu erreicht werden ($n=86$). Dies bedurfte erheblicher Anstrengungen, da nur ein geringer Prozentsatz der an beiden Häusern operierten Patienten die rigiden Einschlusskriterien erfüllte. Insbesondere bei den über 55- jährigen Patienten ohne relevante Gonarthrose (Gruppe 3), bei denen der Arthroseausschluß ebenfalls arthroskopisch erfolgte, gestaltete sich die Rekrutierung einer ausreichenden Anzahl als schwierig.

Eine mögliche Ursache mag in der Tatsache liegen, dass in der Orthopädischen Gemeinschaftspraxis Straubing vorwiegend Patienten mit Sportverletzungen behandelt werden. Trotz einer Spezialisierung auf arthroskopische Interventionen mit

4. Diskussion

einer hohen Anzahl durchgeführter Arthroscopien (2006: 2.067 Kniegelenksarthroscopien) kamen weniger als 5% der arthroscopierten Patienten für die Studie in Frage.

Einschränkend ist festzustellen, dass es sicherlich nicht vollständig gelungen ist, alle Formen der sekundären Arthrose auszuschließen. Aus logistischen, finanziellen und zeitlichen Gründen war es nicht möglich von jedem Patienten eine lückenlose Anamnese, eine Abklärung möglicher systemischer Erkrankungen und eine bildliche Dokumentation der Beinachse zum Zeitpunkt der Operation zu erlangen. Trotzdem ist davon auszugehen, dass durch die Anamnese mit standardisiertem Fragebogen und ggf. telefonischem Interview sowie durch intensive Würdigung der Patientenakten und OP- Berichte in den meisten Fällen die korrekte Diagnose „primäre Gonarthrose“ gestellt wurde.

Ein weiterer Aspekt der Studie, welcher kontrovers diskutiert werden kann, ist der Einfluss des Body Mass Index (BMI) auf die Arthroseentstehung bzw. die Arthroseprogression. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Übergewicht das Arthroserisiko für das Kniegelenk steigert [26, 61, 62]. Ob der BMI auch Einfluss auf die Arthroseprogression hat, ist weiterhin umstritten [77], jedoch scheint die Kombination von Fehlstellung und Übergewicht [23, 56] die Progression der Knorpeldegeneration zu begünstigen. Da arthrotische Alterationen des Gelenknorpels auch nicht- lasttragende Gelenke betreffen (z.B. die Fingerendgelenke bei Heberden-Arthrose), kann Übergewicht sicherlich nicht als monokausale Ursache von Arthrose betrachtet werden. Nach Manek et al. [56] scheint ein genetischer Zusammenhang zwischen Gonarthrose und Adipositas nicht zu existieren. In der vorliegenden Studie zählte Übergewicht nicht zu den Ausschlusskriterien, jedoch zeigt sich zwischen den Gruppen ein hochsignifikanter Unterschied hinsichtlich des BMI, wobei die Gruppe der alten Arthrosepatienten (Gruppe 2, BMI 30,28) einen hochsignifikant ($p < 0.001$) höheren BMI aufweist als die Gruppen 1 (26,78) und 3 (26,50). Im Vergleich der extremen Gruppen I und III zeigte sich kein signifikanter Unterschied (26,78 vs. 26,50), so dass deren Gegenüberstellung hinsichtlich des BMI- Einflusses als unproblematisch zu betrachten ist.

Weibliches Geschlecht stellt insbesondere in Verbindung mit zunehmendem Alter (ab dem 55. Lebensjahr) bei der Gonarthrose einen wesentlichen Risikofaktor dar [79]. In der vorliegenden Studie scheint sich diese Beobachtung zu bestätigen, da in Gruppe 2 77,2% der Patienten weiblichen Geschlechtes waren, hingegen in Gruppe 1 nur 40,6% der Patienten. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass bei der geringen Fallzahl der Patientenkollektive der vorliegenden Studie keine repräsentative Aussage über diesen Zusammenhang getroffen werden kann.

Die Frage, inwieweit weitere mögliche Risikofaktoren wie repetitive Überlastung oder Hyperlaxizität eine Bedeutung für die Arthroseinduktion bzw. -progression haben, kann durch die hier erhobenen Daten ebenfalls nicht beantwortet werden.

Zusammenfassend kann das Ziel, die Aussagekraft der Studie trotz geringer Fallzahl durch Gegenüberstellung extremer Patientenkollektive zu erhöhen, als erreicht betrachtet werden. Ebenso ist es gelungen, durch ein Diagnoseverfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität (Arthroskopie) [10] in Kombination mit rigiden Ausschlusskriterien eine hohe Sicherheit in der Diagnosestellung zu erzielen.

4.2 Auswahl der Kandidatengene und Polymorphismen

Zu Beginn der genetischen Erforschung der primären Arthrose standen die Strukturgene der extrazellulären Matrix (ECM) im Fokus des wissenschaftlichen Interesses, da man in einer durch genetische Variationen bedingten strukturellen Minderwertigkeit des hyalinen Gelenkknorpels mit unzureichenden mechanischen Eigenschaften eine wesentliche Ursache der primären Arthrose vermutete. Diese Ansicht entwickelte sich aus der Erforschung der genetischen Ursachen der Chondrodysplasien, die aufgrund von missense- Mutationen in Genen der ECM entstehen und häufig mit schweren und früh eintretenden (early- onset) Arthrosen einhergehen. Die Hypothese war folglich, dass der Austausch einer Aminosäure in ECM- Genen zu weniger schweren funktionellen Defiziten der ECM- Proteine führt und somit einen Risikofaktor für das Auftreten der Arthrose im höheren Lebensalter (late- onset) darstellt. Das COL2A1 Gen (Chromosom 12q13.11), welches für die alpha1- Kette des Kollagen Typ II codiert, wurde ebenso wie das COL11A1 Gen (Chromosom 1p12.1), welches für Kollagen XI codiert, untersucht. Auch Gene für nicht- kollagene Bestandteile der hyalinen Gelenkknorpels (z.B. COMP) waren

Gegenstand der Forschung. Zusammenfassend kann jedoch konstatiert werden, dass die meisten Untersuchungen keine Korrelation von Aminosäuresubstitutionen bzw. Polymorphismen in Genen der ECM mit der primären Arthrose nachweisen konnten [54].

Ausgehend von der komplexen Regulation der Knorpelhomöostase durch protektive und destruktive Mechanismen mit einer Vielzahl regulatorischer Faktoren wurde konsekutiv nach neuen Kandidatengen gesucht.

Ein Bereich, welcher Gegenstand intensiver Untersuchungen ist und den Focus auf den Aspekt der entzündlichen Komponente im Arthroseprozesses legt, liegt in Kandidatengen, welche für inflammatorische Zytokine codieren. Auch für Sequenzvariationen in Genen, die für knorpeldegradierende Enzyme (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) codieren, wurden positive Korrelationen gefunden.

Beispielhaft seien hier einige Gene erwähnt, bei denen für bestimmte genetische Variationen in Form von SNPs eine Assoziation zur Arthrose gefunden werden konnte [54]:

- Interleukin-1- Gencluster (Chromosom 2q11.2- 2q.13)
- Matrilin- 3- Gen (Chromosom 2p24.1)
- Interleukin- 4- Rezeptor- Alphakette (Chromosom 16p12.1)
- Secreted frizzled- related protein 3 Gen (Chromosom 32q.1)
- Adam 12- Gen (10q26.2)
- Asporin (9q22.31)

Weitere Suzeptibilitätsloci und multiple Kandidatengene, welche mit dem Auftreten und der Progression von Arthrose in Verbindung gebracht werden, sind in der Literatur beschrieben [1, 32, 59].

Es handelt sich jedoch bei den meisten Studien um Einzelbeschreibungen, deren Ergebnisse in weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden konnten bzw. bei denen noch eine Bestätigung durch weitere Studien aussteht. Bei komplexen genetischen Erkrankungen, zu denen die primäre Arthrose zählt, ist dies von großer Bedeutung, um eine verlässliche Aussage zur Relevanz der untersuchten SNPs treffen zu können.

Die Bedeutung des subchondralen Knochens in der Arthroseentstehung steht seit längerem im Focus des wissenschaftlichen Interesses. Lajeunesse [50] geht von einem cross-talk zwischen subchondralem Knochen und hyalinem Gelenkknorpel auf Cytokinebene aus und sieht in diesem eine mögliche Ursache der Initiation bzw. Progression von Arthrose. Westacott [91] belegte die Interaktion von Knochen und Knorpel eindrucksvoll indem er zeigte, dass Osteoblasten von Patienten mit Arthrose den Metabolismus von Chondrozyten im Hinblick auf die Freisetzung von Glycosaminoglykanen beeinflussen können.

Etwa zeitgleich zur Analyse der ECM- 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, welche noch vor der Knorpeldegradation zu beobachten ist [5, 19]. Untersucht wurden vor allem der Vitamin- D- Rezeptor VDR (Chromosom 12q13.11) sowie der Östrogenrezeptor alpha ESR1 (Chromosom 6q25.1). Hierzu finden sich in der Literatur widersprüchliche Daten, die teilweise eine Assoziation mit Arthrose zeigten [83], jedoch in späteren Studien nicht bestätigt werden konnten [9, 55]. Zuletzt erschienen jedoch einige Studien, die zumindest für ESR1 eine Assoziation mit Arthrose nahelegen [9, 39].

Die zentrale Bedeutung des Wnt- Signalkaskade für die Knorpel und Knochenentwicklung stellt in den letzten Jahren zunehmend deren multiple Proteine und die zugehörigen Gene in den Mittelpunkt der genetischen Arthrosenforschung. In der Chondrogenese wird dem Wnt- Signalweg eine regulative Funktion attribuiert [74]. Der Wnt- β - Catenin Signalweg wird neben der Regulation der Knochendichte weiterhin mit der Chondrozytenreifung in Verbindung gebracht. Erstmals konnte durch Zhu et al. (2009) [43, 96] ein direkter Nachweis der Bedeutung von β - Catenin für die Arthroseentstehung in einem Mausmodell erbracht werden. Ein gain –of- function des β - Catenin Signalweges konnte einen Phänotyp mit osteoarthrotischen Alterationen hervorrufen, wobei unterschiedliche Mechanismen diskutiert werden (beschleunigte Chondrozytenreifung, gesteigerte MMP- Expression). Von der gleichen Autorengruppe wird interessanterweise jedoch auch ein loss- of- function des β - Catenin Signalweges in einem transgenen Mausmodell mit einem arthrotischen Phänotyp von artikulären Chondrozyten beschrieben, wobei dies mit einer gesteigerten Apoptoserate assoziiert wird [95].

4. Diskussion

Aktives, nicht phosphoryliertes β -Catenin, welches durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges entsteht, konnte von Yuasa et al. in arthrotisch alterierten Knorpelzellen in einem Guinea-Pig-Arthrosemodell in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden, wohingegen es in gesunden Chondrozyten jüngerer Tiere kaum nachweisbar war [92]. Aktuelle Studien konnten unabhängig voneinander zeigen, dass Polymorphismen im sFRP3 (Secreted frizzled-related protein 3) Gen zumindest teilweise die Eigenschaft besitzen, den β -Catenin Signalweg zu limitieren.

Auch für die Gene, in denen die in der vorliegenden Studie untersuchten Polymorphismen lokalisiert sind, gibt es Hinweise auf eine mögliche Schlüsselfunktion im Arthroseprozess sowie in der Regulation der Knochendichte:

Für LRP 1 konnte eine repressive Wirkung auf den Wnt-Signalweg demonstriert werden [97]. Weiterhin ist für LRP 1 bekannt, dass eine Aktivitätsreduktion der Rezeptorfunktion mit erhöhten MMP-13 (Collagenase-3) Werten in vitro (in Chondrozytenkulturen arthrotischen Gelenkknorpels) assoziiert ist und es somit zu einer vermehrten Degradation von Collagen II und Aggrecan kommen kann [90].

In den letzten Jahren haben mehrere Studien gezeigt, dass auf dem langen Arm des Chromosoms 11 ein möglicher Suszeptibilitätslocus (11q12-13) für die primäre Arthrose liegt [16, 17]. Das Gen, welches LRP 5 codiert, ist in dieser Region lokalisiert. Für LRP 5 wurde in multiplen Studien eine Assoziation mit der menschlichen Knochendichte (BMD) nachgewiesen: Loss-of-function Mutationen resultieren in einem osteoporosis-pseudoglioma-syndrom (oppg) mit extrem niedriger Knochendichte, wohingegen gain-of-function Mutationen zu einer hohen Knochendichte führen können (HBM) [40, 70]. Varianten des LRP 5 Genes werden mit alterierter Knochendichte (BMD) bzw. erhöhtem Frakturrisiko in Verbindung gebracht [30, 31, 47, 48, 71, 84]. Der in dieser Arbeit untersuchte A1330V SNP von LRP 1 wurde mit einer niedrigen peak bone mass bei jungen Männern assoziiert [71]. Für den Q89R SNP von LRP 5 demonstrierten Urano et al. einen Zusammenhang mit dem Auftreten degenerativer Wirbelsäulenveränderungen bei postmenopausalen japanischen Frauen [85].

In einer Übersichtsarbeit von Mizuguchi [60] wird evident, dass der LRP5/ Wnt-Signalweg auch in der postnatalen Knochenentwicklung eine zentrale Bedeutung einnimmt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass LRP 5 eine wichtige Rolle in der Osteoblastenproliferation und möglicherweise auch in der –apoptose spielt [33, 42].

Beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polymorphismen lagen in einem Exon und waren in einem codierenden Genabschnitt lokalisiert. Weiterhin führen beide SNP zu einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene, was eine funktionelle Relevanz dieser SNPs wahrscheinlich erscheinen lässt.

Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, dass der in der vorliegenden Arbeit sowohl die Auswahl der Kandidatengene LRP1 und LRP 5, als auch der jeweiligen Polymorphismen berechtigt waren.

4.3 Ergebnisse der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine Korrelation der ausgewählten Polymorphismen mit dem Auftreten primärer Gonarthrose nachzuweisen.

Eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich der beiden Extremkollektive, bei denen die deutlichsten Unterschiede in der Allelverteilung erwartet wurde, konnte trotz des optimierten Studiendesigns für beide untersuchten SNP nicht gezeigt werden.

Für den untersuchten LRP 1 Polymorphismus kann eine Assoziation mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Als problematisch ist die geringe Frequenz des Allels T bzw. der Zustände A (1% im Gesamtkollektiv) und B (4,5% im Gesamtkollektiv) zu werten, was den Nachweis einer statistischen Signifikanz bei der vorliegenden Patientenzahl deutlich erschwert.

Für den LRP 5 Polymorphismus ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen 2 und 3, also den Patienten im Alter über 55 Jahre mit Arthrose und dem Kollektiv mit Patienten im Alter über 55 Jahre ohne Arthrose. Dies kann als Hinweis auf eine mögliche arthrosefördernde oder auch protektive Funktion dieses Polymorphismus gewertet werden. Bei dem gewählten SNP von LRP 5 ist im Vergleich der beiden Extremkollektive (Gruppe 1 vs. Gruppe 3) lediglich ein Trend

angedeutet ($p= 0,067$), welcher bei gleichbleibender Verteilung auf die Kollektive durch eine Erhöhung der Fallzahlen auf das Doppelte ($n= 200$ Patienten pro Gruppe) zu einer statistischen Signifikanz führen könnte.

Abschließend ist festzustellen, dass durch diese Arbeit für die gewählten SNPs von LRP 1 und LRP 5 eine Assoziation mit dem Auftreten von Gonarthrose weder eindeutig bestätigt noch widerlegt werden konnte.

Auch wenn die hier untersuchten SNPs von LRP 1 und LRP 5 nicht als isolierte ätiologische Faktoren in der Entstehung der primären Arthrose interpretiert werden können, könnten sie jedoch durch die Verknüpfung mit anderen bekannten und bisher noch unbekanntem genetischen Faktoren zu einem umfassenden Verständnis der komplexen Regulation des Arthroseprozesses führen. Aufgrund der hohen Anzahl von möglichen arthrosefördernden Variationen des Erbgutes in Form von SNPs erscheint es wahrscheinlicher, dass erst die Kombination multipler SNPs eine nachweisbare genetische Prädisposition darstellt. Weitere Studien mit größerer Fallzahl unter Beibehaltung der rigiden Ausschlusskriterien und der hohen Sicherheit in der Diagnosestellung sind daher erforderlich, um die Relevanz der untersuchten Polymorphismen, insbesondere des hier dargestellten LRP 5 SNP, für die Arthroseentstehung zu klären.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Arthrose ist ein komplexer, noch nicht ausreichend verstandener Krankheitsprozess und gilt aufgrund ihrer epidemiologischen und sozioökonomischen Bedeutung zu recht als Volkskrankheit. Das Kniegelenk ist das am häufigsten befallene Gelenk, wobei neben dem hyalinen Gelenkknorpel alle Gelenkstrukturen von der Erkrankung betroffen sind.

Im Gegensatz zum früheren Verständnis der Arthrose als rein mechanisch bedingte Erscheinung des Alterns geht man zunehmend 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 Arbeit in den Mittelpunkt des Interesses gestellt und als ein entscheidender ätiologischer Faktor der primären Arthroseformen gewertet.

Bis zum heutigen Tag existiert keine kausale, kurative Therapie der Arthrose. In Frühstadien kann der Verlauf im Idealfall gestoppt bzw. verlangsamt werden, in Spätstadien ist häufig der künstliche Gelenkersatz die einzige Therapieoption, die als ultima ratio Aussicht auf Schmerzfreiheit mit angemessenem Funktionserhalt gewährleisten kann.

Untersucht wurden zwei Polymorphismen von Rezeptoren des Wnt- Signalweges, welcher eine wichtige Schlüsselrolle in der komplexen Regulation von Knochen- und Knorpelhomöostase einnimmt und zunehmend Gegenstand der molekularen Arthroseforschung ist. Viele bereits durchgeführte Studien zur Bedeutung von SNPs in der Arthroseentstehung 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 Patienten (<45 Jahre) sollten gesunden Patienten über 55 Jahre gegenübergestellt werden. Als dritte Gruppe dienten Patienten, welche zur endoprothetischen Versorgung bei fortgeschrittener Gonarthrose anstanden. Die Diagnosen wurden arthroskopisch bzw. im Rahmen der Arthrotomie bei Prothesenimplantation gestellt, der Zielwert pro Gruppe hinsichtlich der Fallzahl betrug 100 Patienten.

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

Die Allelverteilungen der Polymorphismen von LRP 1 und LRP 5 konnten in der Auswertung zwischen den beiden gegenübergestellten Gruppen 1 und 3 keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Für den LRP 5 Polymorphismus ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Gruppen 2 und 3, also den Patienten im Alter über 55 Jahre mit Arthrose und dem Kollektiv mit Patienten im Alter über 55 Jahre ohne Arthrose. Dies kann als Hinweis auf eine mögliche arthrosefördernde oder auch protektive Funktion dieses Polymorphismus gewertet werden. Bei dem ausgewählten LRP 5 SNP deutet sich im Vergleich der Extremkollektive (Gruppe 1 vs. Gruppe 3) lediglich ein Trend an ($p = 0,067$), so dass eine Assoziation dieses SNP mit Gonarthrose erst durch eine höhere Fallzahl eindeutig bestätigt bzw. widerlegt werden kann.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es daher sein, die bestehende bzw. in der Fallzahl erhöhte DNA-Bank auf die bereits erwähnten und auf weitere Polymorphismen von Genen, die im Arthroseprozess eine Rolle spielen, zu untersuchen. Insbesondere die Kombination vieler Polymorphismus- Allele bzw die Zusammenfassung von potentiellen Kandidatengenen in Genclustern kann weiter helfen, um ein mögliches genetisches Risikoprofil für die primäre Gonarthrose zu erstellen. Entsprechend könnten hieraus Konsequenzen für mögliche präventive Maßnahmen gezogen werden.

Erleichtert werden könnte die Suche nach arthroserelevanten SNPs durch das internationale „HapMap“ Projekt [57]. Ziel dieses Projekts ist die quantitative Erfassung von Variationen innerhalb des humanen Genoms und der Aufbau einer genomweiten Datenbank. Über 100 Suszeptibilitätsloci für 40 Erkrankungen konnten bisher identifiziert werden. So könnte die Auswahl von geeigneten SNPs, das Design systematischer Assoziationsstudien und die Beurteilung der Aussagekraft ihrer Ergebnisse in Zukunft deutlich erleichtert werden.

Bereits gewonnene Erkenntnisse über Kandidatengene und mögliche therapeutische Targets haben schon zu vielversprechenden Ansätzen in der Therapie der Arthrose geführt (z.B. Il-1ra, TNF-alpha Antikörper). Auch bei den MMPs sind erste

therapeutische Ansätze in Erprobung. So erweist sich die Therapie mit oralen Matrix Metalloproteinase- Inhibitoren in ersten Versuchsreihen beim Schwein sowie beim Menschen als vielversprechend [53, 72].

Es bedarf jedoch noch weiterer intensiver Forschung auf molekularer Ebene, um das komplexe Zusammenspiel und die Bedeutung der einzelnen Faktoren im Arthroseprozess grundlegend zu verstehen und um mögliche Angriffspunkte für weitere modulierende oder gar kurative Therapieansätze zu identifizieren.

6. Abkürzungsverzeichnis

Apa I	Restriktionsenzym Apa I
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare (Base pairs)
CM	Chondromalazie
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX	Cyclooxygenase
DM	Deutsche Mark
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	β -2'-Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylen-Diamintetraacetat
Eci I	Restriktionsenzym Eci I
ECM	Extrazellulärmatrix (extracellular matrix)
ESR	Estrogen (Östrogen) Receptor
Il-1	Interleukin 1
Il-1 R1	Interleukin-1-Rezeptor 1
Il-1 ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
kg	Kilogramm
m	Meter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NaAcetat	Natriumacetat
nm	Nanometer
OD	Extinktion
OP	Operation
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolutions 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 Universities'-Index

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1.1	Ursachen der sekundären Gonarthrose
Tabelle 1.2	Radiologische Schweregrade der Arthrose nach Kellgren und Lawrence (1957)
Tabelle 1.3	Arthroskopische Klassifikation von Knorpelläsionen modifiziert nach Outerbridge (1961)
Tabelle 1.4	Zusammensetzung des Gelenkknorpels (nach J. Metz)
Tabelle 2.1	LRP 1/5 Pipettierschema
Tabelle 2.2	PCR-Programm LRP 1
Tabelle 2.3	PCR-Programm LRP 5
Tabelle 2.4	Pipettierschema für die Sequenzierung
Tabelle 2.5	PCR-Bedingungen für den Gensequenzierung
Tabelle 2.6	Pipettierschema für die Restriktion von LRP 1, LRP 5
Tabelle 2.7	Restriktionsbedingungen für LRP 1, LRP 5
Tabelle 3.1	BMI-Werte, aufgeteilt in drei Gruppen
Tabelle 3.2	BMI-Werte, aufgeteilt in zwei Gruppen, Cut- off BMI 30
Tabelle 3.3	BMI, Vergleich der 3 Gruppen, Exakter Test nach Fisher
Tabelle 3.4	Geschlechterverteilung, Exakter Test nach Fisher
Tabelle 3.5	Primersequenzen, Annealingtemperaturen und Größe der PCR- Produkte in Basenpaaren
Tabelle 3.6	Allelzustände
Tabelle 3.8	Allelverteilungen von LRP 1
Tabelle 3.9	Allelverteilung des LRP 5- Polymorphismus
Tabelle 3.10	Chi-Quadrat- Test, Vegleich der Allelverteilung der untersuchten Polymorphismen auf die Gruppen I- III

Abbildungen

Abbildung 1.1	Kriterien des American College of Rheumatology für die primäre Gonarthrose (1986)
Abbildung 1.2	Pangonarthrose, radiologischer und intraoperativer Befund, aus Jerosch et al. Knieendoprothetik, eine Standortbestimmung, Dt Ärztebl 1997; 94: A-449–455 [Heft 8]
Abbildung 1.3	Kompartimente des Kniegelenkes, aus OP- Bericht der OGP Straubing (Dr. Eichhorn, Prof. Strobel)
Abbildung 1.4	Histologische Arthrostadien nach Otte (1987), Safranin- O- Färbung, Balken 400 µm
Abbildung 1.5	Der Wnt- Signalweg nach R. Nusse (2007)

7. Abbildungs und- Tabellenverzeichnis

Abbildung 2.1	Visuelle Skala – Western Ontario and McMaster Universities`Osteoarthritis-Index (WOMAC)
Abbildung 2.2	Fragebogen Arthrosestudie
Abbildung 3.1	Schematische Darstellung der Knorpelsituation der 3 Patientengruppen, aus OP-Berichten der OGP Straubing (Dr. Eichhorn, Prof. Strobel)
Abbildung 3.2	Altersdurchschnitt und Body- Mass- Index zum Zeitpunkt der Operation, getrennt nach Gruppen (in Jahren)
Abbildung 3.3	Geschlechterverteilung innerhalb der drei Patientengruppen
Abbildung 3.4	WOMAC- Score Gruppe 1
Abbildung 3.5	WOMAC- Score Gruppe 2
Abbildung 3.6	WOMAC- Score Gruppe 3
Abbildung 3.7	Auszug aus der genomischen DNA von LRP 1, der gewählte Polymorphismus ist farblich markiert
Abbildung 3.8	Auszug aus der genomischen DNA von LRP 5, der gewählte Polymorphismus ist farblich markiert
Abbildung 3.9	Beispiel der Gelelektrophorese des LRP 1- Produktes, Größe 431 Basenpaare
Abbildung 3.10	Beispiel der Gelelektrophorese des LRP 1- Produktes nach Restriktion mit Apal
Abbildung 3.11	Allelverteilung des LRP 1- Polymorphismus
Abbildung 3.12	Allelverteilung des LRP 5- Polymorphismus

8. Literaturverzeichnis

1. Aigner T., Dudhia J. (2003) Genomics of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15:634-640
2. Aigner T., Mckenna L. (2002) Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 59:5-18
3. Altman R., Asch E., Bloch D., Bole G., Borenstein D., Brandt K., Christy W., Cooke T. D., Greenwald R., Hochberg M., Et Al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29:1039-1049
4. Attar F. G., Khaw F. M., Kirk L. M., Gregg P. J. (2008) Survivorship analysis at 15 years of cemented press-fit condylar total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 23:344-349
5. Bailey A. J., Buckland-Wright C., Metz D. (2001) The role of bone in osteoarthritis. *Age Ageing* 30:374-378
6. Baron R., Rawadi G. (2007) Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 148:2635-2643
7. Baron R., Rawadi G. (2007) Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep* 5:73-80
8. Bellamy N., Buchanan W. W., Goldsmith C. H., Campbell J., Stitt L. W. (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* 15:1833-1840
9. Bergink A. P., Van Meurs J. B., Loughlin J., Arp P. P., Fang Y., Hofman A., Van Leeuwen J. P., Van Duijn C. M., Uitterlinden A. G., Pols H. A. (2003) Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 48:1913-1922
10. Blackburn W. D., Jr., Bernreuter W. K., Rominger M., Loose L. L. (1994) Arthroscopic evaluation of knee articular cartilage: a comparison with plain radiographs and magnetic resonance imaging. *J Rheumatol* 21:675-679
11. Brandt K. D., Radin E. L., Dieppe P. A., Van De Putte L. (2006) Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Ann Rheum Dis* 65:1261-1264
12. Buckwalter J. A., Lappin D. R. (2000) The disproportionate impact of chronic arthralgia and arthritis among women. *Clin Orthop Relat Res*:159-168
13. Buckwalter J. A., Mankin H. J. (1998) Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47:487-504
14. Buckwalter J. A., Martin J. A. (2006) Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 58:150-167
15. Buckwalter J. A., Saltzman C., Brown T. (2004) The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res*:S6-15
16. Chapman K., Mustafa Z., Dowling B., Southam L., Carr A., Loughlin J. (2002) Finer linkage mapping of primary hip osteoarthritis susceptibility on chromosome 11q in a cohort of affected female sibling pairs. *Arthritis Rheum* 46:1780-1783

17. Chapman K., Mustafa Z., Irven C., Carr A. J., Clipsham K., Smith A., Chitnavis J., Sinsheimer J. S., Bloomfield V. A., Mccartney M., Cox O., Cardon L. R., Sykes B., Loughlin J. (1999) Osteoarthritis-susceptibility locus on chromosome 11q, detected by linkage. *Am J Hum Genet* 65:167-174
18. Deutsches Ärzteblatt 95 H., 16. Oktober 1998)
19. Dieppe P., Cushnaghan J., Young P., Kirwan J. (1993) Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann Rheum Dis* 52:557-563
20. Dieppe P. A., Lohmander L. S. (2005) Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365:965-973
21. Dinser R., Lange, U., Müller- Ladner, U. (2007) Chondroprotektiva. *Arzneimitteltherapie* 25:258- 262
22. Fautrel B., Hilliquin P., Rozenberg S., Allaert F. A., Coste P., Leclerc A., Rossignol M. (2005) Impact of osteoarthritis: results of a nationwide survey of 10,000 patients consulting for OA. *Joint Bone Spine* 72:235-240
23. Felson D. T. (2004) Obesity and vocational and avocational overload of the joint as risk factors for osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 70:2-5
24. Felson D. T. (1998) Preventing knee and hip osteoarthritis. *Bull Rheum Dis* 47:1-4
25. Felson D. T. (2004) An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* 42:1-9, v
26. Felson D. T., Anderson J. J., Naimark A., Walker A. M., Meenan R. F. (1988) Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 109:18-24
27. Felson D. T., Naimark A., Anderson J., Kazis L., Castelli W., Meenan R. F. (1987) The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 30:914-918
28. Felson D. T., Zhang Y. (1998) An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 41:1343-1355
29. Fernandes J. C., Martel-Pelletier J., Pelletier J. P. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39:237-246
30. Ferrari S. L., Deutsch S., Antonarakis S. E. (2005) Pathogenic mutations and polymorphisms in the lipoprotein receptor-related protein 5 reveal a new biological pathway for the control of bone mass. *Curr Opin Lipidol* 16:207-214
31. Ferrari S. L., Deutsch S., Baudoin C., Cohen-Solal M., Ostertag A., Antonarakis S. E., Rizzoli R., De Vernejoul M. C. (2005) LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone* 37:770-775
32. Goldring M. B., Goldring S. R. (2007) Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213:626-634
33. Gong Y., Slee R. B., Fukai N., Rawadi G., Roman-Roman S., Reginato A. M., Wang H., Cundy T., Glorieux F. H., Lev D., Zacharin M., Oexle K., Marcelino J., Suwairi W., Heeger S., Sabatakos G., Apte S., Adkins W. N., Allgrove J., Arslan-Kirchner M., Batch J. A., Beighton P., Black G. C., Boles R. G., Boon L. M., Borrone C., Brunner H. G., Carle G. F., Dallapiccola B., De Paepe A., Floege B., Halfhide M. L., Hall B., Hennekam R. C., Hirose T., Jans A., Juppner H., Kim C. A., Keppler-Noreuil K., Kohlschuetter A., Lacombe D., Lambert M., Lemyre E., Letteboer T., Peltonen L., Ramesar R. S., Romanengo M., Somer H., Steichen-Gersdorf E., Steinmann B., Sullivan B., Superti-Furga A., Swoboda W., Van Den Boogaard M. J., Van Hul W., Vikkula M., Votruba M., Zabel B., Garcia T., Baron R., Olsen B. R., Warman M. L. (2001)

- LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513-523
34. Guccione A. A. (1994) Arthritis and the process of disablement. *Phys Ther* 74:408-414
 35. Guyton G. P., Brand R. A. (2002) Apparent spontaneous joint restoration in hip osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*:302-307
 36. Hart D. J., Mootosamy I., Doyle D. V., Spector T. D. (1994) The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 53:158-162
 37. Hunter D. J., Felson D. T. (2006) Osteoarthritis. *BMJ* 332:639-642
 38. Iannone F., Lapadula G. (2003) The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin Exp Res* 15:364-372
 39. Jin S. Y., Hong S. J., Yang H. I., Park S. D., Yoo M. C., Lee H. J., Hong M. S., Park H. J., Yoon S. H., Kim B. S., Yim S. V., Park H. K., Chung J. H. (2004) Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthritis Res Ther* 6:R415-421
 40. Johnson M. L., Rajamannan N. (2006) Diseases of Wnt signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 7:41-49
 41. Jones R., Rubin G., Berenbaum F., Scheiman J. (2008) Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 121:464-474
 42. Kato M., Patel M. S., Levasseur R., Lobov I., Chang B. H., Glass D. A., 2nd, Hartmann C., Li L., Hwang T. H., Brayton C. F., Lang R. A., Karsenty G., Chan L. (2002) Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157:303-314
 43. Kawaguchi H. (2009) Regulation of osteoarthritis development by Wnt-beta-catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res* 24:8-11
 44. Kellgren J. H., Lawrence J. S. (1958) Osteo-arthritis and disk degeneration in an urban population. *Ann Rheum Dis* 17:388-397
 45. Kellgren J. H., Lawrence J. S. (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 16:494-502
 46. Kellgren J. H., Lawrence J. S., Bier F. (1963) Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthritis. *Ann Rheum Dis* 22:237-255
 47. Kiel D. P., Ferrari S. L., Cupples L. A., Karasik D., Manen D., Imamovic A., Herbert A. G., Dupuis J. (2007) Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone* 40:587-596
 48. Koller D. L., Ichikawa S., Johnson M. L., Lai D., Xuei X., Edenberg H. J., Conneally P. M., Hui S. L., Johnston C. C., Peacock M., Foroud T., Econs M. J. (2005) Contribution of the LRP5 gene to normal variation in peak BMD in women. *J Bone Miner Res* 20:75-80
 49. Lajeunesse D. (2004) The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S34-38
 50. Lajeunesse D., Reboul P. (2003) Subchondral bone in osteoarthritis: a biologic link with articular cartilage leading to abnormal remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 15:628-633

51. Lavigne P., Shi Q., Lajeunesse D., Dehnade F., Fernandes J. C. (2004) Metabolic activity of osteoblasts retrieved from osteoarthritic patients after stimulation with mediators involved in periprosthetic loosening. *Bone* 34:478-486
52. Lawrence R. C., Felson D. T., Helmick C. G., Arnold L. M., Choi H., Deyo R. A., Gabriel S., Hirsch R., Hochberg M. C., Hunder G. G., Jordan J. M., Katz J. N., Kremers H. M., Wolfe F. (2008) Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58:26-35
53. Leff T. (2003) AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans* 31:224-227
54. Loughlin J. (2005) Polymorphism in signal transduction is a major route through which osteoarthritis susceptibility is acting. *Curr Opin Rheumatol* 17:629-633
55. Loughlin J., Sinsheimer J. S., Mustafa Z., Carr A. J., Clipsham K., Bloomfield V. A., Chitnavis J., Bailey A., Sykes B., Chapman K. (2000) Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol* 27:779-784
56. Manek N. J., Hart D., Spector T. D., Macgregor A. J. (2003) The association of body mass index and osteoarthritis of the knee joint: an examination of genetic and environmental influences. *Arthritis Rheum* 48:1024-1029
57. Manolio T. A., Brooks L. D., Collins F. S. (2008) A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 118:1590-1605
58. Marcelli C., Favier F., Kotzki P. O., Ferrazzi V., Picot M. C., Simon L. (1995) The relationship between osteoarthritis of the hands, bone mineral density, and osteoporotic fractures in elderly women. *Osteoporos Int* 5:382-388
59. Marshall K. W., Zhang H., Nossova N. (2006) Chondrocyte genomics: implications for disease modification in osteoarthritis. *Drug Discov Today* 11:825-832
60. Mizuguchi T., Furuta I., Watanabe Y., Tsukamoto K., Tomita H., Tsujihata M., Ohta T., Kishino T., Matsumoto N., Minakami H., Niikawa N., Yoshiura K. (2004) LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density. *J Hum Genet* 49:80-86
61. Murphy L., Schwartz T. A., Helmick C. G., Renner J. B., Tudor G., Koch G., Dragomir A., Kalsbeek W. D., Luta G., Jordan J. M. (2008) Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 59:1207-1213
62. Oliveria S. A., Felson D. T., Cirillo P. A., Reed J. I., Walker A. M. (1999) Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology* 10:161-166
63. Oliveria S. A., Felson D. T., Reed J. I., Cirillo P. A., Walker A. M. (1995) Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization. *Arthritis Rheum* 38:1134-1141
64. Otte P. (2000) Der Arthrose- Prozess, Gelenkerhaltung- Gefährdung- Destruktion, Teil I. *Novartis*:115- 191
65. Outerbridge R. E. (1961) The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br* 43-B:752-757
66. Peach C. A., Carr A. J., Loughlin J. (2005) Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med* 11:186-191
67. Petersson I. F. (1996) Occurrence of osteoarthritis of the peripheral joints in European populations. *Ann Rheum Dis* 55:659-661

68. Pullig O., Pfander D., Swoboda B. (2001) [Molecular principles of induction and progression of arthrosis]. *Orthopade* 30:825-833
69. Reginster J. Y. (2002) The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 41 Supp 1:3-6
70. Robinson J. A., Chatterjee-Kishore M., Yaworsky P. J., Cullen D. M., Zhao W., Li C., Kharode Y., Sauter L., Babij P., Brown E. L., Hill A. A., Akhter M. P., Johnson M. L., Recker R. R., Komm B. S., Bex F. J. (2006) Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 281:31720-31728
71. Saarinen A., Valimaki V. V., Valimaki M. J., Loyttyneimi E., Auro K., Uusen P., Kuris M., Lehesjoki A. E., Makitie O. (2007) The A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) associates with low peak bone mass in young healthy men. *Bone* 40:1006-1012
72. Sabatini M., Lesur C., Thomas M., Chomel A., Anract P., De Nanteuil G., Pastoureaux P. (2005) Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on cartilage loss in vitro and in a guinea pig model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52:171-180
73. Sarzi-Puttini P., Cimmino M. A., Scarpa R., Caporali R., Parazzini F., Zaninelli A., Atzeni F., Canesi B. (2005) Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum* 35:1-10
74. Spater D., Hill T. P., Gruber M., Hartmann C. (2006) Role of canonical Wnt-signalling in joint formation. *Eur Cell Mater* 12:71-80
75. Spector T. D., Cicuttini F., Baker J., Loughlin J., Hart D. (1996) Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 312:940-943
76. Spector T. D., Dacre J. E., Harris P. A., Huskisson E. C. (1992) Radiological progression of osteoarthritis: an 11 year follow up study of the knee. *Ann Rheum Dis* 51:1107-1110
77. Spector T. D., Hart D. J., Doyle D. V. (1994) Incidence and progression of osteoarthritis in women with unilateral knee disease in the general population: the effect of obesity. *Ann Rheum Dis* 53:565-568
78. Spector T. D., Macgregor A. J. (2004) Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S39-44
79. Srikanth V. K., Fryer J. L., Zhai G., Winzenberg T. M., Hosmer D., Jones G. (2005) A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13:769-781
80. Stove J. (2005) [Conservative therapy of arthritis]. *Orthopade* 34:613-621; quiz 622
81. Stucki G., Meier D., Stucki S., Michel B. A., Tyndall A. G., Dick W., Theiler R. (1996) [Evaluation of a German version of WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) Arthrosis Index]. *Z Rheumatol* 55:40-49
82. Swoboda B. (2001) [Epidemiological arthrosis research]. *Orthopade* 30:834-840
83. Uitterlinden A. G., Burger H., Huang Q., Odding E., Duijn C. M., Hofman A., Birkenhager J. C., Van Leeuwen J. P., Pols H. A. (1997) Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knee. *J Clin Invest* 100:259-263
84. Urano T., Shiraki M., Ezura Y., Fujita M., Sekine E., Hoshino S., Hosoi T., Orimo H., Emi M., Ouchi Y., Inoue S. (2004) Association of a single-nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 22:341-345

85. Urano T., Shiraki M., Narusawa K., Usui T., Sasaki N., Hosoi T., Ouchi Y., Nakamura T., Inoue S. (2007) Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine* 32:25-29
86. Valdes A. M., Spector T. D. (2008) The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 34:581-603
87. Valdes A. M., Van Oene M., Hart D. J., Surdulescu G. L., Loughlin J., Doherty M., Spector T. D. (2006) Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. *Arthritis Rheum* 54:533-539
88. Van Saase J. L., Van Romunde L. K., Cats A., Vandenbroucke J. P., Valkenburg H. A. (1989) Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis* 48:271-280
89. Verstraeten A., Van Ermen H., Haghebaert G., Nijs J., Geusens P., Dequeker J. (1991) Osteoarthrosis retards the development of osteoporosis. Observation of the coexistence of osteoarthrosis and osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*:169-177
90. Walling H. W., Raggatt L. J., Irvine D. W., Barmina O. Y., Toledano J. E., Goldring M. B., Hruska K. A., Adkisson H. D., Burdge R. E., Gatt C. J., Jr., Harwood D. A., Partridge N. C. (2003) Impairment of the collagenase-3 endocytotic receptor system in cells from patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11:854-863
91. Westacott C. I., Webb G. R., Warnock M. G., Sims J. V., Elson C. J. (1997) Alteration of cartilage metabolism by cells from osteoarthritic bone. *Arthritis Rheum* 40:1282-1291
92. Yuasa T., Otani T., Koike T., Iwamoto M., Enomoto-Iwamoto M. (2008) Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest* 88:264-274
93. Zacher J., Gursche A. (2001) [Diagnosis of arthrosis]. *Orthopade* 30:841-847
94. Zhai G., Hart D. J., Kato B. S., Macgregor A., Spector T. D. (2007) Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis Cartilage* 15:222-225
95. Zhu M., Chen M., Zuscik M., Wu Q., Wang Y. J., Rosier R. N., O'keefe R. J., Chen D. (2008) Inhibition of beta-catenin signaling in articular chondrocytes results in articular cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 58:2053-2064
96. Zhu M., Tang D., Wu Q., Hao S., Chen M., Xie C., Rosier R. N., O'keefe R. J., Zuscik M., Chen D. (2009) Activation of beta-catenin signaling in articular chondrocytes leads to osteoarthritis-like phenotype in adult beta-catenin conditional activation mice. *J Bone Miner Res* 24:12-21
97. Zilberberg A., Yaniv A., Gazit A. (2004) The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem* 279:17535-17542