

Immunregulatorische Marker im Kontext von Hüft- und Knieprothesen und Infektionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Jil Marie Jubel

aus Düsseldorf

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof Dr. Frank Alexander Schildberg
2. Gutachterin: Prof. Dr. Stephanie Jung

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.02.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Dieter C. Wirtz und Prof. Dr. med. Christof Burger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Einleitung	7
1.1.1 Fragestellung	10
1.2 Material und Methoden	11
1.2.1 Patient*innenkollektiv	11
1.2.2 Klassifikation	12
1.2.3 Datenerhebung	12
1.2.4 Entnahme der Punktate	12
1.2.5 Bead-basierte Multiplex-Assays	13
1.2.6 Statistische Auswertung	13
1.3 Ergebnisse	14
1.4 Diskussion	20
1.5 Zusammenfassung	26
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	27
2. Veröffentlichung	38
Abstract	38
Introduction	39
Materials and Methods	39
Results	40
Discussion	41
References	45

3. Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Aseptische Prothesenlockerung
BMI	Body-Mass-Index
BTLA	B- und T-Lymphozyten-Attenuator
CD137	Differenzierungscluster 137
CD27	Differenzierungscluster 27
CD28	Differenzierungscluster 28
CD80	Differenzierungscluster 80
CO	Kontrollgruppe
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
GITR	Glukokortikoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HVEM	Herpesvirus-Eintrittsmediator
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IQR	Interquartilbereich
LAG-3	Lymphozyten-Aktivierungsgen 3
MSIS	Musculoskeletal Infection Society
PD-1	Programmiertes Zelltodprotein 1
PD-L1	Programmierter Zelltod 1 Ligand 1
PD-L2	Programmierter Zelltod 1 Ligand 2

PJI	Periprothetischer Gelenkinfekt
RA	Rheumatoide Arthritis
s	Löslich
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TEP	Totalendoprothese
TIM-3	T-Zell-Immunglobulin und Muzin-Domäne enthaltendes Protein-3
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
T _{reg} -Zelle	Regulatorische T-Zelle

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die Zahl der Patient*innen in Deutschland, die eine Endoprothese benötigen, ist im Laufe der letzten Jahre aufgrund des demografischen Wandels und den damit verbundenen altersbedingten Erkrankungen deutlich angestiegen (Kurtz et al. 2007, Maradit Kremers et al. 2015). Parallel dazu konnte auch ein Anstieg periprothetischer Komplikationen und Revisionen beobachtet werden (Postler et al. 2018).

Zu den häufigsten Komplikationen nach Implantation einer Endoprothese zählen die aseptische Prothesenlockerung, die Periimplantatfraktur und der periprothetische Gelenkinfekt (Izakovicova et al. 2019, Koh et al. 2017, Portillo et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass Patient*innen, die von solchen Komplikationen betroffen sind, im Alltag deutliche Einschränkungen aufgrund ihrer Gelenkschmerzen erleben, da diese zu Bewegungseinschränkungen bis hin zur Immobilität führen (Helwig et al. 2014).

Laut aktueller Literatur ist einer der häufigsten Gründe für das Versagen einer Prothese die aseptische Lockerung (Koh et al. 2017, Wooley und Schwarz 2004). Hierbei kommt es zur frühzeitigen Lockerung der Prothesenkomponenten, ohne dass ein Infekt vorliegt. Das Leitsymptom einer aseptischen Prothesenlockerung ist der belastungsabhängige Schmerz im betroffenen Gelenk.

Die pathophysiologischen Prozesse der aseptischen Lockerung konnten noch nicht vollständig geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Lockerung spielen (Yang et al. 2011). Makrophagen werden durch Abriebpartikel, die durch Abnutzung der Prothese entstehen, angelockt und aktiviert (Zhang et al. 2020). Makrophagen phagozytieren die Abriebpartikel und sezernieren Zytokine, die wiederum Osteoklasten aktivieren. Diese bauen den Knochen lokal ab, wodurch die Verankerung der Prothese im Knochen verloren geht (Yang et al. 2011). Eine aseptische Prothesenlockerung zieht in der Regel eine Revision der Gelenkendoprothese nach sich, d. h. die gelockerte Prothese muss durch eine neue, meist größere Revisionsprothese ersetzt werden (Marshall et al. 2008).

Eine weitere Komplikation nach Implantation einer Endoprothese ist der periprothetische Gelenkinfekt (Portillo et al. 2013, Winkler et al. 2014). Hierunter versteht man die Infektion eines Gelenks bei einliegender Endoprothese (Izakovicova et al. 2019). Je nachdem, wann die Infektion auftritt, unterscheidet man zwischen einem Frühinfekt, verzögertem

Infekt und Spätinfekt. In der Literatur findet man verschiedene Zeiteinteilungen (Winkler et al. 2014, Zimmerli et al. 2004). Laut Zimmerli et al. (2004) entsteht ein Frühinfekt innerhalb der ersten drei Monate nach der Prothesenimplantation. Von einem verzögerten Infekt spricht man, wenn der Infekt im Zeitraum von drei bis 24 Monaten nach Implantation auftritt. Beim Spätinfekt kommt es erst zwei Jahre nach Primärimplantation zur Gelenkinfektion. Des Weiteren wird zwischen low-grade und akuten high-grade Infekten unterschieden. Insbesondere die low-grade Infektionen unterscheiden sich in der Anfangsphase hinsichtlich der klinischen Symptomatik kaum von aseptischen Prothesenlockerungen (Winkler et al. 2014). Bei Patient*innen mit einem akuten high-grade Infekt findet man die typischen klinischen Infektionszeichen wie Rötung, Schwellung, Überwärmung oder eine schmerzhafte Funktionseinbuße des betroffenen Gelenks (Zimmerli et al. 2004).

Die häufigsten Erreger, die man bei einem akuten periprothetischen Gelenkinfekt findet, sind der Staphylokokkus aureus, Streptokokken und Enterokokken (Lamagni 2014, Peel et al. 2012). Bei low-grade Infekten findet man weniger virulente Erreger wie Koagulase-negative Staphylokokken und Cutibacterium Spezies (Izakovicova et al. 2019, Zimmerli et al. 2004). Die Patient*innen klagen über unspezifische Symptome wie z. B. Gelenkschmerzen.

Die Erreger können auf verschiedensten Wegen ins Gelenk gelangen (Winkler et al. 2014). Zwei Drittel der Infektionen entstehen durch Kontamination im Rahmen einer Gelenkoperation (Zimmerli et al. 2004). Die Erreger können zudem durch Gelenkinfiltration, Gelenkpunktion oder einen Infektionsherd in der Nähe (Weichteilinfektion, Osteomyelitis) eingeschleppt werden. Besteht eine Verbindung zwischen dem Gelenk und der Außenwelt, z. B. bei einer offenen periprothetischen Fraktur, können die Erreger auch direkt von außen ins Gelenk gelangen. Des Weiteren können die Erreger über die Blutbahn von einem weit entfernten Infektionsherd ins Gelenk gelangen. Als Folge des periprothetischen Gelenkinfekts können sich die Erreger im Blut (Sepsis) oder auf den Knochen (Osteomyelitis) ausbreiten (Corvec et al. 2012).

Die Behandlung des periprothetischen Gelenkinfekts ist aufwendig und langwierig. Ist die Infektion nicht mehr in den Griff zu bekommen, muss die betroffene Extremität als „Ultima Ratio“ amputiert werden, um das Leben der Patient*innen zu retten (Gehrke et al. 2015, Orfanos et al. 2020).

Im klinischen Alltag ist es teilweise nicht leicht zwischen einer aseptischen und septischen Gelenkentzündung zu unterscheiden (Muller et al. 2008). Dies wird auch deutlich an der Anzahl der Parameter, die zur Differenzierung der Gelenkentzündung herangezogen werden. Dazu zählen die klinische Untersuchung, Blut-/Gelenkpunktat-Analysen sowie mikrobiologische und histologische Gewebeanalysen (Gomez-Urena et al. 2017). Zurzeit werden verschiedene Scoring-Systeme zur Diagnose eines periprothetischen Gelenkinfekts (PJI) genutzt, beispielsweise die Kriterien der Musculoskeletal Infection Society (MSIS). Das Problem ist, dass ein negativer Keimnachweis in einem Gelenkpunktat eine bakterielle Infektion nicht sicher ausschließt (Berbari et al. 2007, Palan et al. 2019). Die Bakterien können sich in einem biologisch inaktiven Zustand auf der Gelenkendoprothese als sogenannter Biofilm angesiedelt haben und daher in der Gelenkflüssigkeit nicht nachweisbar sein (Costerton et al. 1999, Gbejuade et al. 2015, Izakovicova et al. 2019). Auch Entzündungsparameter im Blut sind nicht immer aussagekräftig, da sie durch viele verschiedene Ursachen erhöht sein können oder beim low-grade Infekt häufig unauffällig sind. Durch diese Problematik kommt es im klinischen Alltag häufig zu Widersprüchen zwischen der klinischen Bewertung sowie den laborchemischen und mikrobiologischen Befunden und damit zu Schwierigkeiten hinsichtlich der Differentialdiagnose einer aseptischen Lockerung und einer Protheseninfektion.

Die Pathophysiologie der aseptischen Lockerung und des periprothetischen Gelenkinfekts ist bis heute nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. Die derzeitigen Forschungsbemühungen konzentrieren sich auf das Verständnis der Beteiligung des Immunsystems (Warren et al. 2022). Verschiedene Arten von Immunzellen wurden bereits mit der aseptischen Lockerung und dem PJI in Verbindung gebracht (Del Pozo und Patel 2009, Koh et al. 2017, Landgraeber et al. 2014). Ein neues Forschungsgebiet im Bereich der Immunregulation stellen die Immuncheckpoints wie PD-1, PD-L1 und CTLA-4 dar. Es konnte gezeigt werden, dass sie eine große Rolle in der Immunregulation bei Krebserkrankungen und chronischen Infekten spielen (Attanasio und Wherry 2016, Baumeister et al. 2016). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PD-1 eine große Bedeutung in der Immunregulation von chronischen Infektionskrankheiten wie Hepatitis B und C, HIV und Tuberkulose zukommt (Jubel et al. 2020).

Zunächst ging man davon aus, dass Immuncheckpoints hauptsächlich T-Zellen beeinflussen (Francisco et al. 2009, Patsoukis et al. 2015, Wherry und Kurachi 2015). Inzwischen

ist bekannt, dass diese immunregulatorischen Marker auch andere Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und B-Zellen regulieren (Huang et al. 2009, Schildberg et al. 2016). Checkpoint-Moleküle können in kostimulierende und koinhibierende Moleküle unterteilt werden (Attanasio und Wherry 2016). Am besten ist der Einfluss der Immunmarker auf T-Zellen untersucht worden (Crawford und Wherry 2009, Lenschow et al. 1996).

Kostimulierende Moleküle wie CD27, CD28 und GITR verstärken die T-Zell-Antwort, während koinhibierende Moleküle wie PD-1 oder CTLA-4 die T-Zellen hemmen (Anderson et al. 2006, Attanasio und Wherry 2016, Parry et al. 2005, Tang et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene Tumore die Expression dieser Checkpoints zunutze machen und z. B. durch die Expression von PD-L1 oder CTLA-4 das Immunsystem des Wirts hemmen, um sich so vor diesem zu verstecken (Kim und Ha 2021, Zhang et al. 2021). Ein sehr bekanntes Beispiel dafür ist das maligne Melanom (Massi et al. 2014). Das gewonnene Wissen über Immuncheckpoints hat bereits zu neuen Therapieansätzen und Therapieerfolgen geführt (Cuevas und Daud 2018, Larkin et al. 2019).

In jüngster Vergangenheit wurden lösliche Formen der Checkpoint-Moleküle wie sPD-1, sPD-L2 und sCTLA-4 beschrieben (Gu et al. 2018). Ihre Funktion konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, aber erste Untersuchungen zeigen, dass die löslichen Formen auch an der Immunregulation beteiligt sind (Cheng et al. 2014, Zhou et al. 2019). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung, Prognose und Behandlung verschiedener Krebserkrankungen (Lungen-, Magen- oder Nierenzellkrebs) und Infektionskrankheiten (Hepatitis B) durch Veränderungen der Plasmaspiegel löslicher Immunmarker beeinflusst werden (Chakrabarti et al. 2019, Cheng et al. 2014, Wang et al. 2019, Zhou et al. 2019).

Eine im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung durchgeführte PubMed-Abfrage ergab, dass es bisher keine systematische Bewertung der Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen löslicher Checkpoint-Moleküle und Komplikationen im Zusammenhang mit Gelenkimplantaten gibt.

1.1.1 Fragestellung

Mit der hier vorgelegten Untersuchung soll die Frage beantwortet werden, ob der Nachweis verschiedener Immunmarker und die Bestimmung ihrer Konzentrationen in Gelenk-

punktaten Rückschlüsse auf das Vorliegen einer aseptischen Lockerung oder eines periprothetischen Gelenkinfekts zulassen. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf löslichen Checkpoint-Molekülen. Hierzu erfolgte eine systematische Analyse von Punktaten aus Knie- und Hüftgelenken, um die qualitative und quantitative Zusammensetzung verschiedener immunregulatorischer Marker zu bewerten. Zu diesem Zweck wurden Punktate aus nativen Gelenken (d. h. Gelenke ohne implantierte Prothese), Gelenken mit fester Prothese, Gelenken mit aseptischer Prothesenlockerung und Gelenken mit periprothetischem Gelenkinfekt ausgewertet und verglichen.

Die Arbeitshypothese der vorgelegten Untersuchung lautet, dass die qualitative und quantitative Zusammensetzung der immunregulatorischen Moleküle in Punktaten aus nativen Gelenken, Gelenken mit fester Prothese, Gelenken mit aseptischer Prothesenlockerung und Gelenken mit Protheseninfekt spezifische Unterschiede aufweisen. Darüber hinaus besteht ein weiteres Ziel darin, einen spezifischen Biomarker zu identifizieren, der es erlaubt, eine aseptische Lockerung von einem periprothetischen Gelenkinfekt zu differenzieren. Die Identifizierung eines solchen Biomarkers kann zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen in periprothetischen Komplikationen und weiterführend zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen führen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Patient*innenkollektiv

In diese Arbeit wurden 99 Patient*innen eingeschlossen, die im Zeitraum von 2016 bis 2019 in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Uniklinik Bonn behandelt wurden. Die verwendeten Gelenkpunktate wurden im Rahmen diagnostischer oder therapeutischer Verfahren gewonnen. Eingeschlossen wurden Patient*innen zwischen 18 und 100 Jahren. Ausgeschlossen wurden Patient*innen mit Sepsis und extraartikulären Infektionen. Die eingeschlossenen Patient*innen konnten vier Gruppen zugeordnet werden:

1. Die Kontrollgruppe (CO) wurde von Patient*innen mit nativen Gelenken, d. h. Gelenke ohne Prothese oder Gelenkinfekt, gebildet.
2. Die zweite Gruppe (TJA) schloss Patient*innen mit fester Totalendoprothese ein.
3. Der dritten Gruppe wurden Patient*innen mit aseptischer Prothesenlockerung (AIF) zugeordnet.
4. Die vierte Gruppe bildeten Patient*innen mit periprothetischem Gelenkinfekt (PJI).

Die Ethikkommission der Universität Bonn, Deutschland, genehmigte die Studie, die gemäß den Richtlinien und der Deklaration von Helsinki durchgeführt wurde.

1.2.2 Klassifikation

Patient*innen mit PJI wurden mithilfe der Musculoskeletal Infection Society (MSIS) Klassifikation identifiziert. Ein PJI wurde diagnostiziert, wenn eines von zwei Hauptkriterien oder drei von fünf Nebenkriterien erfüllt waren. Die Hauptkriterien waren erfüllt, wenn entweder zwei Mikroorganismen-positive Kulturen (basierend auf Punktat-/Gewebeproben) mit demselben Erreger vorlagen oder ein mit der Prothese kommunizierender Sinustrakt vorlag. Zu den Nebenkriterien zählten eine Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) > 10 mg/L, Leukozyten-Zahl > 3000 Zellen/ μ L im Gelenkpunktat, Anteil neutrophiler Granulozyten > 85 % im Gelenkpunktat, eine einzige Mikroorganismus-positive Gewebe-/Punktatprobe und eine positive Histologie. Anhand der MSIS-Kriterien, der klinischen Untersuchung und der Bildgebung wurde eine aseptische Prothesenlockerung diagnostiziert.

1.2.3 Datenerhebung

Es wurden Daten zu Geschlecht, Alter, Body-Mass-Index (BMI) und Komorbiditäten erhoben. Zusätzlich wurden verschiedene Laborwerte präinvasiv bestimmt. Dazu zählten die CRP-Konzentration im Serum, die Anzahl der präoperativen Leukozyten im Blut und die Zellzahl im Gelenkpunktat. Des Weiteren wurden den Krankenakten intraoperative Befunde, mikrobiologische Ergebnisse der Sonikation und histopathologische Ergebnisse entnommen. In Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) wurden alle Daten festgehalten.

1.2.4 Entnahme der Punktate

Die Entnahme der Hüft- und Kniegelenkpunktate erfolgte im Rahmen diagnostischer oder therapeutischer Eingriffe. Das dabei nicht für die klinische Diagnostik verwendete Material wurde in dieser Studie untersucht. Nach Entnahme des Punktats wurde dieses 10 Minuten lang bei 1200 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), um die zellulären Bestandteile zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in 0,5 mL-Aliquots überführt und bei - 80 °C gelagert.

1.2.5 Bead-basierte Multiplex Assays

Mithilfe des Immuno Oncology Checkpoint 14-plex ProcartaPlex™ (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), einem Bead-basierten Multiplex Assay, wurden 14 verschiedene lösliche Moleküle gemäß den Anweisungen des Herstellers in den Gelenkpunktaten gemessen. Untersucht wurden dabei folgende lösliche Immunmarker: B- und T-Lymphozyten-Attenuator (BTLA), Glukokortikoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein (GITR), Herpesvirus-Eintrittsmediator (HVEM), Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3), programmiertes Zelltodprotein 1 (PD-1), programmierter Zelltod 1 Ligand 1 (PD-L1), programmierter Zelltod 1 Ligand 2 (PD-L2), T-Zell-Immunglobulin und Muzin-Domäne enthaltendes Protein-3 (TIM-3), Differenzierungscluster 28 (CD28), Differenzierungscluster 80 (CD80), Differenzierungscluster 137 (CD137), Differenzierungscluster 27 (CD27) und zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4 (CTLA-4). Alle Punktatproben wurden unmittelbar vor der Durchführung des Assays aufgetaut. Die Wells wurden mit 10 mL Reading Buffer benetzt. Bevor 12,5 mL der antikörpermarkierten magnetischen Beads in jedes Well gegeben wurde, wurden die Beads für 30 Sekunden geschüttelt. Es folgte ein Waschgang und anschließend wurden 12,5 mL der Proben oder des mit dem Assay-Kit gelieferten Standards in die Wells hinzugegeben. Diese wurden 120 Minuten lang im Dunkeln bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden 6,25 mL der Antikörpermischung zum Nachweis der Immunmarker in jedes Well gegeben. Darauf folgte eine weitere Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln unter Schütteln. Nach einem erneuten Waschgang wurden 12,5 mL Streptavidin-Phycoerythrin in die Wells gegeben und diese für weitere 30 Minuten im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschgang und die Beads wurden in 50 mL Reading Buffer für 5 Minuten unter Schütteln resuspendiert. Schließlich wurden die Proben mit einem Flexmap 3D®-System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) gemessen. Die Rohdaten wurden zur weiteren Analyse in eine Microsoft Excel Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) übertragen.

1.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der SPSS-Version 27 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Zur Beurteilung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-

Smirnov-Test durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanzen verwendet. Anschließend wurde der Dunn-Test als Post-hoc-Test angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$). Mit GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) erfolgte die deskriptive Statistik. Die Ergebnisse der Multiplex-Assays wurden als Boxplots mit Median, Interquartilsbereich, oberen/ unteren Whisker und Ausreißern veranschaulicht.

1.3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die qualitative und quantitative Zusammensetzung 14 verschiedener löslicher immunregulatorischer Marker in Hüft- und Kniegelenkpunktaten untersucht. Dabei lag ein besonderer Fokus auf kostimulierenden und koinhibierenden Checkpoint-Molekülen. Es wurden die folgenden vier Gruppen miteinander verglichen: die Kontrollgruppe, die TJA-Gruppe, die AIF-Gruppe und die PJI-Gruppe.

Die demographischen Patient*innen-Daten sind in Tabelle 1 dargestellt. Der Kontrollgruppe konnten 13, der TJA-Gruppe 23 und der AIF-Gruppe 24 Patient*innen zugeordnet werden, während 39 Patient*innen einen periprothetischen Gelenkinfekt aufwiesen.

Im Durchschnitt waren die Patient*innen der Kontrollgruppe jünger ($\bar{x} = 48 \pm 13$ Jahre) als diejenigen mit implantierter Prothese ($\bar{x} = 65 \pm 10$ Jahre) oder periprothetischen Komplikationen (AIF $\bar{x} = 72 \pm 9$ Jahre, PJI $\bar{x} = 71 \pm 12$ Jahre). Patient*innen der Kontrollgruppe hatten im Durchschnitt einen niedrigeren BMI ($\bar{x} = 26 \pm 4$ kg/m²) als diejenigen der anderen drei Gruppen (TJA $\bar{x} = 33 \pm 6$ kg/m², AIF $\bar{x} = 32 \pm 6$ kg/m², PJI $\bar{x} = 33 \pm 11$ kg/m²). In der präoperativen Blutuntersuchung wurden bei Patient*innen mit periprothetischem Gelenkinfekt die höchsten CRP-Konzentrationen ($\bar{x} = 92 \pm 24$ mg/dL) und die höchste Leukozyten-Anzahl ($\bar{x} = 9 \pm 0,6$ G/L) gemessen. Mehr als zwei Drittel der Patient*innen mit Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) wiesen einen PJI auf und insgesamt waren 44 % der Patient*innen mit PJI an einem DM2 erkrankt. Zehn Patienten wiesen eine rheumatoide Arthritis auf (Tab.1).

Tab. 1: Demographische Daten der Patient*innen

Variable	Gesamt	CO	TJA	AIF	PJI
Anzahl	99	13	23	24	39
Alter (Jahre)	67 ± 13	48 ± 13	65 ± 10	72 ± 9	71 ± 12
Geschlecht (m:f)	39:60	7:6	10:13	7:17	15:24
Hüfte	35	2	6	11	16
Knie	64	11	17	13	23
BMI (kg/m ²)	32 ± 8	26 ± 4	33 ± 6	32 ± 6	33 ± 11
DM2	23	1	3	2	17
RA	10	1	3	2	4
CRP (mg/dL)	46 ± 106	2,4 ± 0,7	14 ± 20	8,9 ± 8,9	92 ± 24
Leukozyten (G/L)	8,6 + 3	8,5 ± 0,8	7,6 ± 1,6	8,2 ± 2,9	9 ± 0,6

Die Messdaten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung oder als absolute Häufigkeit dargestellt. Patient*innen mit Prothese waren im Durchschnitt älter als Patient*innen ohne Prothese. Patient*innen mit PJI hatten deutlich höhere CRP-Konzentrationen als andere Gruppen. CO = Kontrollgruppe; TJA = Totalendoprothese; AIF = Aseptische Prothesenlockerung; PJI = Periprothetischer Gelenkinfekt; BMI = Body-Mass-Index; CRP = C-reaktives Protein, DM2 = Diabetes mellitus Typ 2; RA = Rheumatoide Arthritis; Quelle: in Anlehnung an Jubel et al., 2021

Die Mittelwerte der Konzentrationen der immunregulatorischen Marker sind in Tabelle 2 dargestellt. In Gelenkpunktaten der Kontrollgruppe wurden die geringsten Konzentrationen gemessen. In Gelenkpunktaten der TJA-Gruppe wurden höhere Mittelwerte erreicht als in der CO-Gruppe, während Patient*innen mit aseptischer Lockerung höhere Messwerte aufwiesen als Patient*innen mit fester Prothese. Die höchsten Konzentrationen vieler Marker wurden in Gelenkpunktaten der Patient*innen mit periprothetischem Gelenkinfekt bestimmt. Ausnahmen hierbei bildeten sBTLA, sCD80 und sCD27, deren Konzentrationen in der AIF-Gruppe höher waren als in der PJI-Gruppe (Tab. 2).

Die Boxplots der 14 verschiedenen Immunmarker sind in Abbildung 1 dargestellt. Gezeigt werden der Median, Interquartilbereich und oberer und unterer Whisker mit einzelnen Werten. Patient*innen ohne Prothese wiesen die niedrigsten Messwerte auf, während die höchsten Konzentrationen in Gelenkpunktaten von Patient*innen mit aseptischer Prothesenlockerung (sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sBTLA, sCD80 und sCD137) oder mit periprothetischem Gelenkinfekt (sCTLA-4, sTIM-3, sLAG-3, sHVEM,IDO, sCD28, sCD27 und sGITR) gemessen werden konnten.

Tab. 2: Multiplex-Analysen

Marker	CO (pg/mL)	TJA (pg/mL)	AIF (pg/mL)	PJI (pg/mL)
sCTLA-4	59,33 ± 16,92	222,52 ± 73,29	236,29 ± 33,73	450,03 ± 58,53
sPD-1	32,77 ± 15,32	120,61 ± 35,10	171,75 ± 28,99	253,74 ± 59,44
sPD-L1	15,31 ± 6,60	40,83 ± 19,62	92,38 ± 21,37	289,92 ± 116,94
sPD-L2	9113,77 ± 2417,93	8808,78 ± 1953,44	15516,71 ± 1977,11	15966,54 ± 1948,67
sTIM-3	6534,31 ± 753,27	8435,04 ± 931,20	10649,71 ± 743,64	11032,33 ± 805,93
sLAG-3	168,15 ± 67,58	208,61 ± 49,94	276,38 ± 46,48	319,69 ± 38,40
sBTLA	594,92 ± 199,10	2220,57 ± 1125,36	4053,50 ± 818,41	3716,62 ± 674,90
sHVEM	13,31 ± 13,31	140,00 ± 453,79	541,00 ± 2064,83	896,97 ± 437,64
IDO	38,46 ± 16,09	171,04 ± 83,37	675,17 ± 291,29	1892,77 ± 519,09
sCD28	200,58 ± 167,92	1956,35 ± 764,85	3300,63 ± 663,01	4547,46 ± 717,21
sCD80	238,23 ± 66,18	1661,00 ± 450,41	1911,00 ± 195,57	1671,92 ± 184,79
sCD27	5610,23 ± 2444,59	10570,39 ± 2774,63	34988,13 ± 8975,34	32088,36 ± 5436,80
sGITR	59,08 ± 24,95	55,61 ± 21,63	70,79 ± 15,44	175,97 ± 46,54
sCD137	1832,83 ± 606,11	11892,73 ± 3469,32	10649,00 ± 3051,80	14389,70 ± 8378,15

Die Konzentrationen der 14 Checkpoint-Moleküle sind als Mittelwert mit Standardabweichung in pg/mL für jede der vier Gruppen angegeben. Der höchste Wert eines Markers ist in fett dargestellt, der niedrigste Wert in kursiv. CO = Kontrollgruppe; TJA = Totalendoprothese; AIF = Aseptische Prothesenlockerung; PJI = Periprothetischer Gelenkinfekt; s = Löslich; CTLA-4 = Zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4; PD-1 = Programmieretes Zelltodprotein 1; PD-L1 = Programmierter Zelltod 1 Ligand 1; PD-L2 = Programmierter Zelltod 1 Ligand 2; TIM-3 = T-Zell-Immunglobulin und Muzin-Domäne enthaltendes Protein-3; LAG-3 = Lymphozyten-Aktivierungsgen 3; BTLA = B- und T-Lymphozyten-Attenuator; HVEM = Herpesvirus-Eintrittsmediator; IDO = Indolamin-2,3-Dioxygenase; GITR = Glukokortikoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein; CD = Differenzierungscluster; Quelle: in Anlehnung an Jubel et al., 2021

Was die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests betreffen, so wies die TJA-Gruppe tendenziell höhere Konzentrationen auf als die Kontrollgruppe. Dabei konnten signifikante Werte für den kostimulierenden Marker sCD80 berechnet werden ($p = 0,015$) (Abb. 1). Darüber hinaus konnten für die meisten Immunmarker in den Gelenkpunktaten der AIF-Gruppe

signifikant höhere Konzentrationen gemessen werden als in denen der Kontrollgruppe. Hierbei erreichten sCD28, sCD80 und sBTLA eine Signifikanz von $p < 0,01$ (Abb. 1). Außerdem waren die Messwerte der PJI-Gruppe signifikant höher als die der Kontrollgruppe. Dabei erreichten sCTLA-4, IDO, sCD28 und sCD80 eine Signifikanz von $p < 0,001$ (Abb. 1).

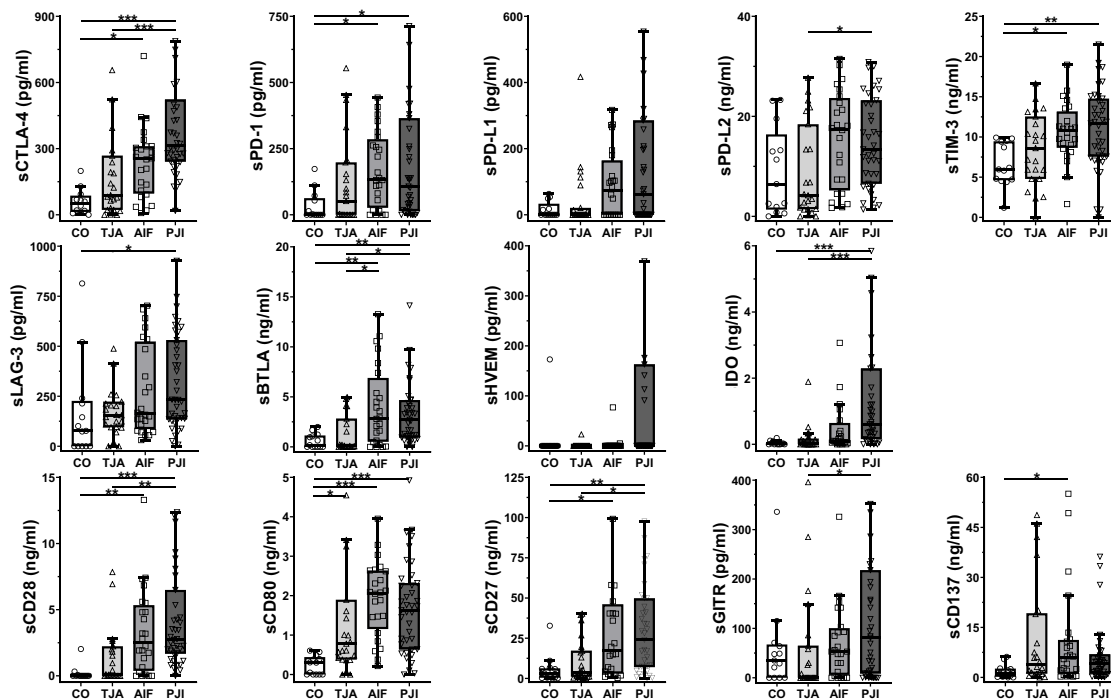


Abb. 1: Boxplots der Checkpoint-Moleküle

Gezeigt sind die Boxplots mit Median, Interquartilbereich und einzelnen Werten. Die Konzentrationen sind in pg/mL oder ng/mL angegeben. Die niedrigsten Konzentrationen wurden in der Kontrollgruppe gemessen, während die höchsten Konzentrationen in der Gruppe der AIF (sPD-L2, sBTLA-4, sCD80 und sCD27) oder PJI (sCTLA-4, sPD-1, sPD-L1, sTIM-3, sLAG-3, sHVEM, IDO, sCD28, sGITR und sCD137) gemessen wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$). CO = Kontrollgruppe; TJA = Totalendoprothese; AIF = Aseptische Prothesenlockerung; PJI = Periprothetischer Gelenkinfekt; s = Löslich; CTLA-4 = Zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4; PD-1 = Programmieretes Zelltodprotein 1; PD-L1 = Programmierter Zelltod 1 Ligand 1; PD-L2 = Programmierter Zelltod 1 Ligand 2; TIM-3 = T-Zell-Immunglobulin und Muzin-Domäne enthaltendes Protein-3; LAG-3 = Lymphozyten-Aktivierungsgen 3; BTLA = B- und T-Lymphozyten-Attenuator; HVEM = Herpesvirus-Eintrittsmediator; IDO = Indolamin-2,3-Dioxygenase; GITR = Glukokortikoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein; CD = Differenzierungscluster; Quelle: in Anlehnung an Jubel et al., 2021

Patient*innen mit aseptischer Lockerung wiesen höhere Messwerte der immunregulatorischen Marker auf als Patient*innen mit fester Prothese. Eine Ausnahme bildete dabei

sCD137 (TJA: 11892,73 pg/mL, AIF: 10649,00 pg/mL) (Tab. 2). Der Mittelwert von sPD-1 betrug beispielsweise in der AIF-Gruppe 171,75 pg/mL, während in der TJA-Gruppe eine Konzentration von 120,61 pg/mL gemessen werden konnte. In den Gelenkpunktaten der AIF-Gruppe konnten im Vergleich zu denen der TJA-Gruppe signifikant höhere Werte für sBTLA bestimmt werden ($p = 0,036$) (Abb. 1). Außerdem wiesen Patient*innen mit PJI höhere Konzentrationen der 14 immunregulatorischen Marker (sCTLA-4, sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sTIM-3, sLAG-3, sBTLA, sHVEM,IDO, sCD28, sCD80, sCD27, sGITR und sCD137) auf als Patient*innen mit fester Prothese. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte, dass sCTLA-4 und IDO eine Signifikanz von $p < 0,001$ erreichten (Abb. 1). Zudem konnten in Gelenkpunktaten von Patient*innen mit PJI höhere Konzentrationen der Immunmarker gemessen werden als in der AIF-Gruppe (Tab. 2). Dabei bildeten sBTLA, sCD80 und sCD27 eine Ausnahme, da deren höchste Konzentration jeweils in Gelenkpunktaten von Patient*innen mit aseptischer Lockerung gemessen wurde. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der AIF- und PJI-Gruppe festgestellt werden (Abb. 1).

Es wurden weitere ergänzende Analysen durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob es einen Unterschied zwischen Hüft- und Kniegelenke gab. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden mit Ausnahme von sLAG-3 in der PJI-Gruppe (Tab. 3). Es wurde weiter untersucht, inwieweit ein Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) die Konzentration der Immunmarker beeinflusst. Beim Vergleich von an DM2 erkrankten Patient*innen mit Patient*innen ohne DM2 konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der jeweiligen Untergruppe festgestellt werden (Tab. 3). Auch beim Vergleich von Patient*innen mit und ohne rheumatoide Arthritis (RA) konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der jeweiligen Untergruppe festgestellt werden (Tab. 3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die gemessenen Konzentrationen der immunregulatorischen Marker zwischen der CO-, TJA-, AIF- und PJI-Gruppe unterscheiden. Die niedrigsten Konzentrationen konnten in Gelenkpunktaten der Patient*innen ohne Prothese gemessen werden gefolgt von denen der Patient*innen mit fester Prothese. Höhere Konzentrationen wurden in Gelenkpunktaten von Patient*innen mit aseptischer Lockerung ermittelt. Die höchsten Konzentrationen wurden in Gelenkpunktaten von Patient*innen mit periprothetischem Gelenkinfekt bestimmt.

Tab. 3: Einfluss von Punktionsort, Diabetes mellitus Typ 2 und rheumatoider Arthritis

Marker	Gruppe	Hüfte vs. Knie	DM2 vs. kein DM2	RA vs. kein RA	Marker	Gruppe	Hüfte vs. Knie	DM2 vs. kein DM2	RA vs. kein RA
sCTLA-4	CO	0,727	0,667	0,885	sCD27	CO	0,811	0,308	0,789
	TJA	0,865	0,457	0,553		TJA	0,609	0,898	0,315
	AIF	0,531	0,797	0,531		AIF	0,955	0,587	0,465
	PJI	0,746	0,715	0,560		PJI	0,765	0,440	0,450
sPD-1	CO	0,161	0,308	0,561	sGITR	CO	0,937	0,462	0,588
	TJA	0,286	0,196	0,301		TJA	0,201	0,355	0,545
	AIF	0,569	0,957	0,875		AIF	0,955	0,587	0,564
	PJI	0,091	0,190	0,274		PJI	0,466	0,834	0,833
sPD-L1	CO	0,217	0,462	0,361	sCD137	CO	1,000	1,000	0,468
	TJA	0,919	0,966	0,163		TJA	0,541	0,787	0,534
	AIF	0,392	0,652	0,551		AIF	0,691	0,587	0,347
	PJI	0,558	0,092	0,599		PJI	0,860	0,715	0,962
sPD-L2	CO	0,692	0,769	0,423	sCD80	CO	0,217	1,000	0,271
	TJA	0,759	0,689	0,201		TJA	1,000	0,514	0,235
	AIF	0,649	0,797	0,917		AIF	0,459	0,406	0,835
	PJI	0,399	0,063	0,867		PJI	0,062	0,072	0,529
sTIM-3	CO	0,469	0,769	0,423	sCD28	CO	0,209	0,833	0,568
	TJA	1,000	1,000	0,584		TJA	0,865	0,457	0,475
	AIF	0,733	0,797	0,175		AIF	0,865	0,652	0,754
	PJI	0,110	0,528	0,450		PJI	1,000	0,944	0,450
sLAG-3	CO	0,217	0,769	0,410	IDO	CO	0,371	0,154	0,574
	TJA	0,812	0,230	0,438		TJA	0,609	0,698	0,259
	AIF	0,691	1,000	0,754		AIF	0,733	0,797	0,143
	PJI	0,028	0,333	0,401		PJI	0,191	0,081	0,644
sBTLA	CO	0,937	0,308	0,779	sHVEM	CO	0,469	0,923	0,773
	TJA	0,708	0,698	0,643		TJA	0,319	0,514	0,343
	AIF	0,459	0,797	1,000		AIF	0,733	0,464	0,462
	PJI	0,638	0,200	0,966		PJI	0,432	0,255	0,423

Untersucht wurde der Einfluss des Punktionsorts, des DM2 und der RA auf das Expressionsprofil der einzelnen Marker. Abgebildet sind die p-Werte. In Fett dargestellt ist der signifikante Wert. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. DM2 = Diabetes mellitus Typ 2; RA = Rheumatoide Arthritis; CO = Kontrollgruppe; TJA = Totalendoprothese; AIF = Aseptische Prothesenlockerung; PJI = Periprothetischer Gelenkinfekt; s = Löslich; CTLA-4 = Zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4; PD-1 = Programmieretes Zelltodprotein 1; PD-L1 = Programmierter Zelltod 1 Ligand 1; PD-L2 = Programmierter Zelltod 1 Ligand 2; TIM-3 = T-Zell-Immunglobulin und Muzin-Domäne enthaltendes Protein-3; LAG-3 = Lymphozyten-Aktivierungsgen 3; BTLA = B- und T-Lymphozyten-Attenuator; HVEM = Herpesvirus-Eintrittsmediator; IDO = Indolamin-2,3-Dioxygenase; GITR = Glukokortikoid-induziertes TNFR-verwandtes Protein; CD = Differenzierungscluster; Quelle: in Anlehnung an Jubel et al., 2021

1.4 Diskussion

Die Zahl der Implantationen von Gelenkendoprothesen stieg in den letzten Jahren immer weiter an (Wengler et al. 2014). Als Grund dafür werden die steigende Lebenserwartung, die Änderung des Lebensstils und damit der Wunsch nach Mobilität im hohen Alter angesehen (Maradit Kremers et al. 2015). Die Implantation einer Gelenkendoprothese kann mit verschiedenen Komplikationen einhergehen. Laut Wooley und Schwarz (2004) tritt eine aseptische Lockerung bei 20-25 % der endoprothetischen Implantate auf, während es laut Izakovicova et al. (2019) in 1-2 % der Fälle zum Gelenkinfekt kommt.

Die Rolle des Immunsystems bei obengenannten Komplikationen wurde bisher noch nicht vollständig geklärt und ist Gegenstand aktueller Forschung (Camuzard et al. 2019, Dan et al. 2021, Warren et al. 2022). Ein neuer immunologischer Forschungsbereich ist durch die Immuncheckpoints entstanden. Immuncheckpoints sind Moleküle, die das Immunsystem an entscheidenden Stellen regulieren (Baumeister et al. 2016, Parry et al. 2005). Sie wurden vor einigen Jahren v. a. im Rahmen der Tumorforschung bekannt. Checkpoint-Moleküle regulieren verschiedene Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und Monozyten (Huang et al. 2009, Schildberg et al. 2016). Parry et al. (2005) fanden heraus, dass die Immuncheckpoints der aktivierten T-Zelle ein weiteres Signal geben, durch welches sie entweder zusätzlich aktiviert oder stattdessen gehemmt wird (Guerder und Flavell 1995, Uede 1995). Laut aktueller Literatur spielen Immuncheckpoints eine wichtige Rolle in der Immunregulation von Tumoren und chronischen Infektionskrankheiten (Attanasio und Wherry 2016, Parry et al. 2005). Zu den bekanntesten Checkpoint-Molekülen zählt PD-L1. PD-L1 ist in verschiedenen Tumor- und Infektionskrankheiten hochreguliert (Jubel et al. 2020, Massi et al. 2014, Rao et al. 2017). Dadurch wird das Immunsystem gehemmt und die pathologischen Zellen können sich vor dem Immunsystem „verstecken“ (Woo et al. 2012). Dieses Wissen konnte bereits erfolgreich in der Tumorthherapie, beispielsweise des malignen Melanoms, angewandt werden (Baumeister et al. 2016, Hodi et al. 2010). Neben den zellulären Immunregulatoren sind seit kurzem auch lösliche Formen der Checkpoint-Moleküle bekannt, die von den Zellen ins Gewebe gegeben werden. So findet man sie z. B. in Gelenkflüssigkeit oder im Blut (Chakrabarti et al. 2019). Sie werden in ihrer löslichen Form exprimiert oder von membrangebundenen Proteinen der Zelloberfläche abgespalten (Gu et al. 2018, Kakoulidou et al. 2007, Ward et al. 2013). Dabei geht man davon aus, dass die Konzentration der löslichen Marker in der Synovialflüssigkeit

umso größer ist, je stärker die Oberflächenexpression der Marker ist (Gorgulho et al. 2021).

In dieser Arbeit wurden verschiedene lösliche immunregulatorische Marker in Gelenkpunktaten bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass in den Punktaten ohne Prothese im Mittel die niedrigsten Konzentrationen der löslichen Marker gemessen wurden und dass in Gelenken mit fester Prothese im Vergleich höhere Konzentrationen gemessen wurden. Wenn man davon ausgeht, dass die Konzentration der löslichen Marker mit der Expression von Checkpoint-Molekülen bzw. der Aktivität und Anzahl an Immunzellen korreliert, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass allein die Prothese im Gelenk, die fest sitzt und nicht infiziert ist, das Immunsystem moduliert. Gardner et al. (2013) beschreiben, dass eine Endoprothese nach Implantation als fremd erkannt wird und Immunzellen wie Neutrophile und Makrophagen eine aseptische Entzündung hervorrufen.

Des Weiteren sind die Daten dieser Arbeit ein Hinweis darauf, dass das Immunsystem bei aseptischer Lockerung und periprothetischem Gelenkinfekt immunregulatorisch stärker aktiv ist als bei fester Prothese. Vergleicht man die Konzentrationen der AIF-Gruppe mit der PJI-Gruppe, fällt auf, dass höhere Konzentrationen in der PJI-Gruppe gemessen wurden (*Tab. 2*). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (*Abb. 1*). Daher konnte in dieser Untersuchung kein eindeutiger Biomarker identifiziert werden, der zwischen einem PJI und einer aseptischen Lockerung differenziert. Zum einen könnte dies daran liegen, dass das untersuchte Patient*innenkollektiv zu klein war. Zum anderen könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass unter den 14 untersuchten Checkpoint-Molekülen noch nicht der richtige Marker dabei war. Eine andere mögliche Erklärung könnte lauten, dass die Immunsystemaktivierung sowohl bei der aseptischen Lockerung als auch beim periprothetischen Gelenkinfekt so hoch ist, dass kein Marker einen signifikanten Unterschied in seiner Konzentration zeigt. Die Untersuchung sollte an einem größeren Kollektiv wiederholt werden. Hierbei könnten auch weitere Checkpoint-Moleküle untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden die höchsten Konzentrationen bei Infektion der Prothese gemessen. Dieser Infekt ist meist bakteriell bedingt (Zimmerli et al. 2004). Die Bedeutung immunregulatorischer Marker bei verschiedenen Infektionskrankheiten wurde bereits in mehreren Arbeiten postuliert (Caraballo Cortes et al. 2019, Day et al. 2006, Dong et al. 2019, Jubel et al. 2020). Laut Attanasio und Wherry (2016) waren koinhibierende Marker

wie PD-1 oder CTLA-4 bei chronischen Infektionskrankheiten erhöht. Es wird diskutiert, dass durch die hemmende Wirkung der Checkpoints auf das Immunsystem die Infektion nicht effektiv bekämpft und dadurch der chronische Verlauf gefördert wird (Caraballo Cortes et al. 2019). Warren et al. (2022) konnten zeigen, dass Gewebeprobe bei periprothetischem Gelenkinfekt eine deutlich höhere Expression von PD-1 an der Zelloberfläche aufwies als Gewebeprobe bei aseptischer Lockerung. Diese Untersuchung unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, in der die höchste Konzentration von sPD-1 in der PJI-Gruppe gemessen wurde. Dies könnte außerdem ein Hinweis darauf sein, dass die Expression der zellgebundenen Form mit der löslichen Form von PD-1 positiv korreliert. Ein periprothetischer Gelenkinfekt kann bei fehlender Behandlung chronisch verlaufen. Gerade dann kann die Bedeutung der koinhibierenden Marker zunehmen. Die gezielte Blockade der koinhibierenden Marker bei chronischen Gelenkinfekten könnte zur erneuten Aktivierung des Immunsystems und somit zu einer Bekämpfung der Infektion führen. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Überlegung zu überprüfen.

Im Folgenden wird auf einige vielversprechende Marker dieser Arbeit genauer eingegangen. Ein interessanter Marker, der sich in dieser Arbeit zeigte, war sCD80. Seine membrangebundene Form CD80 wird von Makrophagen exprimiert und bindet zwei Liganden: CD28, das v. a. kostimulierend wirkt und CTLA-4, das überwiegend koinhibierend wirkt (Cox et al. 2017, Schildberg et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die lösliche Form sCD80 von Monozyten und B-Zellen exprimiert und durch alternatives Spleißen gebildet wird (Kakoulidou et al. 2007). In der Literatur findet man Arbeiten, die zu unterschiedlichen Ergebnissen der Wirkung von sCD80 kommen. Während Kakoulidou et al. (2007) eine hemmende Wirkung von sCD80 auf die Lymphozytenreaktion und T-Zellproliferation beschreiben, konnte in mehreren anderen Studien eine Steigerung der T-Zellproliferation und IFN- γ -Produktion durch sCD80 beobachtet werden (Haile et al. 2013, Haile et al. 2014, Ostrand-Rosenberg et al. 2015). Zudem zeigten Haile et al. (2013), dass durch die Gabe von CD80-Fc, einer löslichen Form von CD80, der PD-1/PD-L1-Signalweg stark inhibiert und dadurch das Immunsystem aktiviert wurde. Diese widersprüchlichen Daten könnten dadurch erklärt werden, dass CD80 zwei unterschiedliche Liganden hat. Zum einen den kostimulierenden Liganden CD28 und zum anderen den koinhibierenden Liganden CTLA-4. Je nachdem, wie hoch die Konzentration von CD28 oder CTLA-4 in den Versuchen war, könnte das Ergebnis dadurch beeinflusst worden sein.

Wie bereits oben erwähnt, wird die nicht-lösliche Form CD80 von Makrophagen exprimiert. Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der aseptischen Lockerung. Sie phagozytieren die Abriebpartikel der Prothese und setzen als Reaktion darauf Zytokine frei. Zytokine fördern die Osteoklastendifferenzierung. Die aktivierten Osteoklasten bauen den Knochen lokal ab. Als Folge kommt es zur Lockerung des Implantats (Cherian et al. 2015). In dieser Arbeit konnte in Gelenkpunktaten von Gelenken mit aseptischer Lockerung der höchste Mittelwert für sCD80 im Vergleich zu allen anderen Gruppen gemessen werden. Eine statistische Signifikanz von $p < 0,001$ wurde beim Vergleich von Patient*innen mit aseptischer Lockerung (AIF) mit der CO-Gruppe erreicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Vorstellung, dass Makrophagen bei der aseptischen Lockerung aktiv sind und somit der Marker CD80/ sCD80 vermehrt vorkommt. Im nächsten Schritt könnte man nun untersuchen, ob die lokale Antikörper-Blockade von CD80 ein möglicher Therapieansatz der aseptischen Lockerung sein könnte. Der Gedanke dahinter ist, dass durch die Blockade von CD80 Makrophagen gehemmt werden und somit der lokale Knochenabbau reduziert wird. Um diese Vermutungen zu überprüfen, sind weitere Nachforschungen und Experimente nötig.

Zu den interessanten Immunmarkern dieser Arbeit zählte außerdem sCTLA-4. Die höchste Konzentration wurde in Gelenkpunktaten infizierter Gelenke (PJI) gemessen. Dabei wurde beim Vergleich der PJI- Gruppe mit der Kontrollgruppe eine Signifikanz von $p < 0,001$ erreicht. In der Literatur findet man Arbeiten dazu, dass sCTLA-4 von T_{reg} -Zellen, Monozyten und unreifen dendritischen Zellen freigesetzt wird (Ward et al. 2013). Ein Anstieg der Konzentration von sCTLA-4 konnte bei Immunaktivierung und verschiedenen Autoimmun- und Entzündungskrankheiten festgestellt werden, z. B. beim Lupus, bei einer Autoimmunthyreoiditis, Myasthenia gravis und Zöliakie (Liu et al. 2003, Oaks und Hallett 2000, Simone et al. 2009, Wang et al. 2002). Zudem scheint eine erhöhte sCTLA-4 Konzentration in verschiedenen Tumorerkrankungen prognostisch ungünstig zu sein (Erfani et al. 2010, Mansour et al. 2014). Einige Studien konnten zeigen, dass die Funktion des löslichen CTLA-4 mit der Funktion des zellulären CTLA-4 identisch ist, d. h. CTLA-4 und sCTLA-4 hemmen T-Zellen. Gu et al. (2018) und Ward et al. (2013) konnten unabhängig voneinander zeigen, dass es durch die Blockade von sCTLA-4 zur Aktivierung des Immunsystems kommt. Andere Studien konnten wiederum zeigen, dass sCTLA-4 die hemmende Wirkung von CTLA-4 auf T-Zellen aufhebt (Liu et al. 2017, Saverino et al. 2007).

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass die Wirkung von sCTLA-4 vom Aktivierungsstatus der beteiligten Zellen abhängt. Bei einem periprothetischen Infekt könnte die hemmende Wirkung von sCTLA-4 auf die T-Zellen die Progression der Infektion fördern. Eine Blockade von sCTLA-4 könnte diesem Effekt entgegenwirken und möglicherweise zur Aktivierung und Proliferation von Immunzellen führen, wodurch der Infekt adäquat bekämpft werden könnte. Dadurch könnte wohlmöglich ein neuer Therapieansatz für periprothetische Gelenkinfekte entstehen.

Auf der Grundlage der Daten dieser Arbeit könnte es sich auch bei sCD28 um einen weiteren interessanten Kandidaten handeln, der als therapeutischer Ansatzpunkt des PJIs genutzt werden könnte. Aktuell findet man in der Literatur allerdings nur wenige Informationen zu sCD28. Es ist bekannt, dass sCD28 von T-Zellen exprimiert wird. Die Konzentration ist bei Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus, Sjögren-Syndrom und allergischem Asthma erhöht (Hebbar et al. 2004, Ip et al. 2005, Wong et al. 2005). Es gibt jedoch noch keine Studie zum genauen Wirkmechanismus. Die membrangebundene Form von CD28 wirkt stimulierend auf T-Zellen und fördert ihre Aktivität und Proliferation. In dieser Arbeit war sCD28 beim Vorliegen eines PJIs erhöht. Die erhöhte Konzentration könnte Ausdruck der Immunsystemaktivierung bei PJI sein. CD28 konkurriert mit CTLA-4 um die Bindung an CD80. Durch die Erhöhung von CD28 könnte CTLA-4 aus dem Bindungsspalt verdrängt werden und durch die nachfolgende Immunaktivierung der Gelenkinfekt besser bekämpft werden. Um diesen Gedanken weiter zu verfolgen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Ein weiteres interessantes Molekül dieser Arbeit ist sBTLA. Die höchste Konzentration von sBTLA wurde bei der aseptischen Lockerung gemessen. Gorgulho et al. (2021) konnten zeigen, dass die Konzentration von sBTLA mit der BTLA-Expression auf der Zelloberfläche positiv korreliert. Zudem konnte gezeigt werden, dass sBTLA bei Sepsis erhöht ist (Lange et al. 2017, Monaghan et al. 2018). Außerdem wurde laut Dong et al. (2020) und Bian et al. (2019) sBTLA mit einer schlechten Prognose bei HCC und Pankreasadenokarzinom sowie bei Patient*innen mit klarzelligem Nierenzellkarzinom in Verbindung gebracht (Wang et al. 2019). Die membrangebundene Form von BTLA wird von T- und B-Zellen exprimiert und wirkt inhibierend auf T-Zellen, nachdem der Ligand HVEM gebunden hat. Es wird angenommen, dass BTLA eine große Bedeutung beim Schutz vor Auto-

immunerkrankungen trägt. Wie genau die lösliche Form sBTLA das Immunsystem reguliert, ist noch nicht bekannt. Wenn man davon ausgeht, dass sBTLA wie BTLA inhibierend auf T-Zellen wirkt, könnte diesem Molekül eine große Bedeutung bei der aseptischen Lockerung zukommen, indem es hemmend auf die beteiligten Immunzellen wirkt. Daher könnte ein gezielter Einsatz dieses Moleküls in der Therapie der aseptischen Lockerung nützlich sein.

Ein wichtiger nächster Schritt für bessere diagnostische und therapeutische Ansätze, die die Biologie der löslichen Checkpointinhibitoren nutzen, ist nicht nur ein besseres Verständnis ihrer Expression und ihres Wirkmechanismus, sondern auch die Frage, wie reproduzierbar sie in verschiedenen Kohorten mit Unterschieden in Bezug auf Alter, Medikation, Operationsort und Begleiterkrankungen sind. Daher wurden in dieser Arbeit die Einflussfaktoren Ort der Gelenkpunktion, Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) und rheumatoide Arthritis (RA) auf die Konzentration der Marker innerhalb einer Gruppe untersucht. Um einen möglichen Einfluss des untersuchten Gelenkortes zu überprüfen, wurden die Konzentrationen der Checkpoint-Moleküle der Hüftgelenkpunkture mit denen der Kniegelenkpunkture verglichen. Es konnten mit Ausnahme von sLAG-3 in der PJI-Gruppe keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Wenn sich diese Beobachtung in einer größeren Kohorte bestätigt, würde dies eine interessante Diskussion über Unterschiede in der lokalen immunologischen Mikroumgebung eröffnen und für mögliche Therapieansätze genutzt werden können.

Außerdem wurde untersucht, inwieweit die rheumatoide Arthritis (RA) einen Einfluss auf die Konzentrationen innerhalb einer Untersuchungsgruppe hat. Insgesamt wiesen 10 von 99 Patient*innen eine RA auf. In der Literatur findet man Veröffentlichungen, in denen der Spiegel löslicher Immuncheckpoints wie sCD28, sCTLA-4, sCD80 und sPD-1 bei RA-Patient*innen im Vergleich zu Patient*innen ohne RA höher waren (Cao et al. 2012, Wan et al. 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied eines Markers innerhalb einer Gruppe zwischen Patient*innen mit und ohne RA festgestellt werden. Aufgrund der geringen Patient*innenanzahl mit RA ist diese Aussagekraft jedoch sehr begrenzt. Es wird eine wesentlich größere Kohorte benötigt, um eine ausreichend statistische Aussagekraft über die Auswirkungen der RA zu erreichen. Allerdings könnte eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sein, dass die implantierte Prothese, die aseptische Lockerung oder der periprothetische Gelenkinfekt das Immunsystem und damit das

Expressionsprofil von Checkpoint-Molekülen so beeinflussen, dass der Einfluss der RA auf das Immunsystem verschleiert werden könnte.

Es wurde außerdem untersucht, ob ein Diabetes mellitus Typ 2 Einfluss auf die Konzentration der untersuchten Marker hat. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auffällig ist, dass die meisten Patient*innen mit DM2 der PJI-Gruppe zugeordnet waren. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Patient*innen mit DM2 vermehrt zu Infektionen neigen, so beispielsweise auch zu einem PJI (Blanco et al. 2020, Kunutsor et al. 2016). Darüber hinaus wird ein DM2 im Rahmen des metabolischen Syndroms mit Adipositas in Verbindung gebracht. Patient*innen mit höherem BMI haben ein höheres Risiko an Infektionen zu erkranken als Patient*innen mit BMI im Normalbereich (Blanco et al. 2020, Kunutsor et al. 2016, Namba et al. 2005). Außerdem wird durch ein hohes Körpergewicht der Gelenkverschleiß gefördert und somit die Indikation zur Gelenkprothese früher gestellt (Ackerman und Osborne 2012, Holliday et al. 2011, Wang et al. 2009). Diese Untergruppenanalysen deuten darauf hin, dass Checkpoint-Moleküle nicht oder nur geringfügig durch das Gelenk, eine rheumatoide Erkrankung oder einen Diabetes mellitus Typ 2 beeinflusst werden. Solche Analysen müssen jedoch in größeren (multizentrischen) Studien wiederholt werden, um die Vergleichbarkeit der Patient*innengruppen eindeutig zu überprüfen.

1.5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Punktate von Knie- und Hüftgelenken systematisch zu analysieren und die qualitative und quantitative Zusammensetzung löslicher Checkpoint-Moleküle zu bewerten. Checkpoint-Moleküle sind wichtige Regulatoren des Immunsystems, u. a. bei Tumorerkrankungen und chronischen Infektionen. Die Fragestellung dieser Arbeit lautete, ob die Konzentrationen löslicher Immuncheckpoints bei den häufigsten periprothetischen Komplikationen, der aseptischen Lockerung und dem periprothetischen Gelenkinfekt, im Vergleich zur festen Prothese oder dem nativen Gelenk variieren und ob ein Biomarker zur Differentialdiagnostik der aseptische Lockerung und des periprothetischen Gelenkinfekts identifiziert werden kann.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden 14 verschiedene lösliche Marker mit Hilfe von Multiplex-Assays bestimmt und vier verschiedene Gruppen miteinander verglichen:

Patient*innen ohne Prothese, mit fester Prothese, mit aseptischer Lockerung und mit periprothetischem Gelenkinfekt.

Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Konzentrationen der Checkpoint-Moleküle zwischen den vier Gruppen unterscheiden. Die niedrigsten Konzentrationen konnten in Punktaten aus Gelenken ohne Prothese gemessen werden, gefolgt von denen mit fester Prothese. Höhere Konzentrationen wurden in Gelenkpunktaten der aseptischen Lockerung und die höchsten Konzentrationen in Gelenkpunktaten bei periprothetischem Gelenkinfekt bestimmt. Es konnte kein eindeutiger Biomarker identifiziert werden, der zur Differentialdiagnostik der aseptischen Lockerung und des periprothetischen Gelenkinfekts genutzt werden kann. Es konnten jedoch einige interessante Marker wie sCTLA-4, sCD80, sCD28 und sBTLA bestimmt werden, die eine Diskussion über neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten für die aseptische Lockerung und den periprothetischen Gelenkinfekt eröffnen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Ackerman IN, Osborne RH. Obesity and increased burden of hip and knee joint disease in Australia: results from a national survey. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 13: 254

Anderson KM, Czinn SJ, Redline RW, Blanchard TG. Induction of CTLA-4-Mediated Anergy Contributes to Persistent Colonization in the Murine Model of Gastric *Helicobacter pylori* Infection. *The Journal of Immunology* 2006; 176: 5306-5313

Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* 2016; 44: 1052-1068

Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* 2016; 34: 539-573

Berbari EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, Gullerud R, Osmon DR. Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1113-1119

Bian B, Fanale D, Dusetti N, Roque J, Pastor S, Chretien AS, Incorvaia L, Russo A, Olive D, Iovanna J. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1

and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 2019; 8: e1561120

Blanco JF, Diaz A, Melchor FR, da Casa C, Pescador D. Risk factors for periprosthetic joint infection after total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg* 2020; 140: 239-245

Camuzard O, Breuil V, Carle GF, Pierrefite-Carle V. Autophagy Involvement in Aseptic Loosening of Arthroplasty Components. *J Bone Joint Surg Am* 2019; 101: 466-472

Cao J, Zou L, Luo P, Chen P, Zhang L. Increased production of circulating soluble co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol* 2012; 14: 585-592

Caraballo Cortes K, Osuch S, Perlejewski K, Pawelczyk A, Kazmierczak J, Janiak M, Jablonska J, Nazzal K, Stelmaszczyk-Emmel A, Berak H, Bukowska-Osko I, Paciorek M, Laskus T, Radkowski M. Expression of programmed cell death protein 1 and T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 on peripheral blood CD4+CD8+ double positive T cells in patients with chronic hepatitis C virus infection and in subjects who spontaneously cleared the virus. *J Viral Hepat* 2019; 26: 942-950

Chakrabarti R, Kapse B, Mukherjee G. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Rep (Hoboken)* 2019; 2: e1160

Cheng HY, Kang PJ, Chuang YH, Wang YH, Jan MC, Wu CF, Lin CL, Liu CJ, Liaw YF, Lin SM, Chen PJ, Lee SD, Yu MW. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2014; 9: e95870

Cherian JJ, Jauregui JJ, Banerjee S, Pierce T, Mont MA. What Host Factors Affect Aseptic Loosening After THA and TKA? *Clin Orthop Relat Res* 2015; 473: 2700-2709

Corvec S, Portillo ME, Pasticci BM, Borens O, Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs* 2012; 35: 923-934

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322

Cox MA, Nechanitzky R, Mak TW. Check point inhibitors as therapies for infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2017; 48: 61-67

Crawford A, Wherry EJ. The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 179-186

Cuevas LM, Daud AI. Immunotherapy for melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2018; 37: 127-131

Dan CP, Dan SI, Silasi AAD, Tomoaia G. Immunologic reactions to bone and articular implants. *Int Orthop* 2021; 45: 1941-1946

Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 350-354

Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med* 2009; 361: 787-794

Dong MP, Enomoto M, Thuy LTT, Hai H, Hieu VN, Hoang DV, Iida-Ueno A, Odagiri N, Amano-Teranishi Y, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Tamori A, Kawada N. Clinical significance of circulating soluble immune checkpoint proteins in sorafenib-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2020; 10: 3392

Dong Y, Li X, Zhang L, Zhu Q, Chen C, Bao J, Chen Y. CD4(+) T cell exhaustion revealed by high PD-1 and LAG-3 expression and the loss of helper T cell function in chronic hepatitis B. *BMC Immunol* 2019; 20: 27

Erfani N, Razmkhah M, Ghaderi A. Circulating soluble CTLA4 (sCTLA4) is elevated in patients with breast cancer. *Cancer Invest* 2010; 28: 828-832

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2009; 206: 3015-3029

Gardner AB, Lee SK, Woods EC, Acharya AP. Biomaterials-based modulation of the immune system. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 732182

Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. *Acta Orthop* 2015; 86: 147-158

Gehrke T, Alijanipour P, Parvizi J. The management of an infected total knee arthroplasty. *Bone Joint J* 2015; 97-B: 20-29

Gomez-Urena EO, Tande AJ, Osmon DR, Berbari EF. Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: Cultures, Biomarker and Criteria. *Infect Dis Clin North Am* 2017; 31: 219-235

Gorgulho J, Roderburg C, Heymann F, Schulze-Hagen M, Beier F, Vucur M, Kather JN, Laleh NG, Tacke F, Brummendorf TH, Luedde T, Loosen SH. Serum levels of soluble B and T lymphocyte attenuator predict overall survival in patients undergoing immune checkpoint inhibitor therapy for solid malignancies. *Int J Cancer* 2021; 149: 1189-1198

Gu D, Ao X, Yang Y, Chen Z, Xu X. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J Immunother Cancer* 2018; 6: 132

Guerder S, Flavell RA. T-cell activation. Two for T. *Curr Biol* 1995; 5: 866-868

Haile ST, Dalal SP, Clements V, Tamada K, Ostrand-Rosenberg S. Soluble CD80 restores T cell activation and overcomes tumor cell programmed death ligand 1-mediated immune suppression. *J Immunol* 2013; 191: 2829-2836

Haile ST, Horn LA, Ostrand-Rosenberg S. A soluble form of CD80 enhances antitumor immunity by neutralizing programmed death ligand-1 and simultaneously providing costimulation. *Cancer Immunol Res* 2014; 2: 610-615

Hebbar M, Jeannin P, Magistrelli G, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B, Bonnefoy JY, Delneste Y. Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus

erythematosus, primary Sjogren's syndrome and systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 388-392

Helwig P, Morlock J, Oberst M, Hauschild O, Hubner J, Borde J, Sudkamp NP, Konstantinidis L. Periprosthetic joint infection--effect on quality of life. *Int Orthop* 2014; 38: 1077-1081

Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711-723

Holliday KL, McWilliams DF, Maciewicz RA, Muir KR, Zhang W, Doherty M. Lifetime body mass index, other anthropometric measures of obesity and risk of knee or hip osteoarthritis in the GOAL case-control study. *Osteoarthritis Cartilage* 2011; 19: 37-43

Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, Swan R, Kherouf H, Monneret G, Chung C-S, Ayala A. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *PNAS* 2009; 106: 6303-6308

Ip WK, Wong CK, Leung TF, Lam CW. Elevation of plasma soluble T cell costimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in children with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 137: 45-52

Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic joint infection: current concepts and outlook. *EFORT Open Rev* 2019; 4: 482-494

Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol* 2020; 11: 487

Kakoulidou M, Giscombe R, Zhao X, Lefvert AK, Wang X. Human Soluble CD80 is generated by alternative splicing, and recombinant soluble CD80 binds to CD28 and CD152 influencing T-cell activation. *Scand J Immunol* 2007; 66: 529-537

Kim MJ, Ha SJ. Differential Role of PD-1 Expressed by Various Immune and Tumor Cells in the Tumor Immune Microenvironment: Expression, Function, Therapeutic Efficacy, and Resistance to Cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 767466

Koh CK, Zeng I, Ravi S, Zhu M, Vince KG, Young SW. Periprosthetic Joint Infection Is the Main Cause of Failure for Modern Knee Arthroplasty: An Analysis of 11,134 Knees. *Clin Orthop Relat Res* 2017; 475: 2194-2201

Kunutsor SK, Whitehouse MR, Blom AW, Beswick AD, Team I. Patient-Related Risk Factors for Periprosthetic Joint Infection after Total Joint Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0150866

Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 2007; 89: 780-785

Lamagni T. Epidemiology and burden of prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69 Suppl 1: i5-10

Landgraeber S, Jager M, Jacobs JJ, Hallab NJ. The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 185150

Lange A, Sundén-Cullberg J, Magnusson A, Hultgren O. Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Correlates to Disease Severity in Sepsis and High Levels Are Associated with an Increased Risk of Mortality. *PLoS One* 2017; 12: e0169176

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hogg D, Hill A, Marquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schoffski P, Carlino MS, Lebbe C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bastholt L, Rizzo JI, Balogh A, Moshyk A, Hodi FS,

Wolchok JD. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2019; 381: 1535-1546

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 233-258

Liu MF, Wang CR, Chen PC, Fung LL. Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2003; 57: 568-572

Liu Q, Hu P, Deng G, Zhang J, Liang N, Xie J, Qiao L, Luo H, Zhang J. Soluble cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: a favorable predictor in malignant tumors after therapy. *Oncotargets Ther* 2017; 10: 2147-2154

Mansour A, Elkhodary T, Darwish A, Mabed M. Increased expression of costimulatory molecules CD86 and sCTLA-4 in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014; 55: 2120-2124

Maradit Kremers H, Larson DR, Crowson CS, Kremers WK, Washington RE, Steiner CA, Jiranek WA, Berry DJ. Prevalence of Total Hip and Knee Replacement in the United States. *J Bone Joint Surg Am* 2015; 97: 1386-1397

Marshall A, Ries MD, Paprosky W, Implant Wear Symposium Clinical Work G. How prevalent are implant wear and osteolysis, and how has the scope of osteolysis changed since 2000? *J Am Acad Orthop Surg* 2008; 16 Suppl 1: S1-6

Massi D, Brusa D, Merelli B, Ciano M, Audrito V, Serra S, Buonincontri R, Baroni G, Nassini R, Minocci D, Cattaneo L, Tamborini E, Carobbio A, Rulli E, Deaglio S, Mandala M. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann Oncol* 2014; 25: 2433-2442

Monaghan SF, Banerjee D, Chung CS, Lomas-Neira J, Cygan KJ, Rhine CL, Fairbrother WG, Heffernan DS, Levy MM, Cioffi WG, Ayala A. Changes in the process of alternative RNA splicing results in soluble B and T lymphocyte attenuator with biological and clinical implications in critical illness. *Mol Med* 2018; 24: 32

Muller M, Morawietz L, Hasart O, Strube P, Perka C, Tohtz S. Diagnosis of periprosthetic infection following total hip arthroplasty--evaluation of the diagnostic values of pre- and intraoperative parameters and the associated strategy to preoperatively select patients with a high probability of joint infection. *J Orthop Surg Res* 2008; 3: 31

Namba RS, Paxton L, Fithian DC, Stone ML. Obesity and perioperative morbidity in total hip and total knee arthroplasty patients. *J Arthroplasty* 2005; 20: 46-50

Oaks MK, Hallett KM. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J Immunol* 2000; 164: 5015-5018

Orfanos AV, Michael RJ, Keeney BJ, Moschetti WE. Patient-reported outcomes after above-knee amputation for prosthetic joint infection. *Knee* 2020; 27: 1101-1105

Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Alvarez JA. Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64: 1287-1293

Palan J, Nolan C, Sarantos K, Westerman R, King R, Foguet P. Culture-negative periprosthetic joint infections. *EFORT Open Rev* 2019; 4: 585-594

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 9543-9553

Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, Karoly ED, Freeman GJ, Petkova V, Seth P, Li L, Boussiotis VA. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* 2015; 6: 6692

Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PF. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2386-2391

Portillo ME, Salvado M, Alier A, Sorli L, Martinez S, Horcajada JP, Puig L. Prosthesis failure within 2 years of implantation is highly predictive of infection. *Clin Orthop Relat Res* 2013; 471: 3672-3678

Postler A, Lutzner C, Beyer F, Tille E, Lutzner J. Analysis of Total Knee Arthroplasty revision causes. *BMC Musculoskelet Disord* 2018; 19: 55

Rao M, Valentini D, Dodoo E, Zumla A, Maeurer M. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int J Infect Dis* 2017; 56: 221-228

Saverino D, Brizzolara R, Simone R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Pesce G, Bagnasco M. Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the immune response dysregulation. *Clin Immunol* 2007; 123: 190-198

Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* 2016; 44: 955-972

Simone R, Brizzolara R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Natale C, Greco L, Schiavo M, Bagnasco M, Pesce G, Saverino D. A functional soluble form of CTLA-4 is present in the serum of celiac patients and correlates with mucosal injury. *Int Immunol* 2009; 21: 1037-1045

Tang ZS, Hao YH, Zhang EJ, Xu CL, Zhou Y, Zheng X, Yang DL. CD28 family of receptors on T cells in chronic HBV infection: Expression characteristics, clinical significance and correlations with PD-1 blockade. *Mol Med Rep* 2016; 14: 1107-1116

Uede T. [The molecular mechanism of costimulatory signal for T cell activation]. *Nihon Rinsho* 1995; 53: 2597-2603

Wan B, Nie H, Liu A, Feng G, He D, Xu R, Zhang Q, Dong C, Zhang JZ. Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006; 177: 8844-8850

Wang Q, Zhang J, Tu H, Liang D, Chang DW, Ye Y, Wu X. Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *J Immunother Cancer* 2019; 7: 334

Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, Qiu Q, Huang D, Pirskanen R, Lefvert AK. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J Neuroimmunol* 2002; 130: 224-232

Wang Y, Simpson JA, Wluka AE, Teichtahl AJ, English DR, Giles GG, Graves S, Cicuttini FM. Relationship between body adiposity measures and risk of primary knee and hip replacement for osteoarthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R31

Ward FJ, Dahal LN, Wijesekera SK, Abdul-Jawad SK, Kaewarpai T, Xu H, Vickers MA, Barker RN. The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses. *Eur J Immunol* 2013; 43: 1274-1285

Warren SI, Charville GW, Manasherob R, Amanatullah DF. Immune checkpoint upregulation in periprosthetic joint infection. *J Orthop Res* 2022; 40: 2663-2669

Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. Hip and knee replacement in Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111: 407-416

Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 486-499

Winkler T, Trampuz A, Hardt S, Janz V, Kleber C, Perka C. [Periprosthetic infection after hip arthroplasty]. *Orthopade* 2014; 43: 70-78

Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Aberrant production of soluble costimulatory molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 989-994

Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tansombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz

PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG, Vignali DA. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 2012; 72: 917-927

Wooley PH, Schwarz EM. Aseptic loosening. *Gene Ther* 2004; 11: 402-407

Yang F, Wu W, Cao L, Huang Y, Zhu Z, Tang T, Dai K. Pathways of macrophage apoptosis within the interface membrane in aseptic loosening of prostheses. *Biomaterials* 2011; 32: 9159-9167

Zhang H, Dai Z, Wu W, Wang Z, Zhang N, Zhang L, Zeng WJ, Liu Z, Cheng Q. Regulatory mechanisms of immune checkpoints PD-L1 and CTLA-4 in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2021; 40: 184

Zhang L, Haddouti EM, Welle K, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA, Kabir K. The Effects of Biomaterial Implant Wear Debris on Osteoblasts. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 352

Zhou L, Li X, Huang X, Chen L, Gu L, Huang Y. Soluble programmed death-1 is a useful indicator for inflammatory and fibrosis severity in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2019; 26: 795-802

Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; 351: 1645-1654

2. Veröffentlichung



sCD28, sCD80, sCTLA-4, and sBTLA Are Promising Markers in Diagnostic and Therapeutic Approaches for Aseptic Loosening and Periprosthetic Joint Infection

Jil M. Jubel¹, Thomas M. Randau¹, Janine Becker-Gotot², Sebastian Scheidt¹, Matthias D. Wimmer¹, Hendrik Kohlhof¹, Christof Burger¹, Dieter C. Wirtz¹ and Frank A. Schildberg^{1*}

¹ Clinic for Orthopedics and Trauma Surgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, ² Institute of Experimental Immunology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Katharina Schmidt-Bleek,
Charité – Universitätsmedizin Berlin,
Germany

Reviewed by:

Gergely Toldi,
Semmelweis University, Hungary
Youg R Thaker,
Sorrento Therapeutics, United States

*Correspondence:

Frank A. Schildberg
frank.schildberg@ukbonn.de

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 28 March 2021

Accepted: 26 July 2021

Published: 06 August 2021

Citation:

Jubel JM, Randau TM, Becker-Gotot J, Scheidt S, Wimmer MD, Kohlhof H, Burger C, Wirtz DC and Schildberg FA (2021) sCD28, sCD80, sCTLA-4, and sBTLA Are Promising Markers in Diagnostic and Therapeutic Approaches for Aseptic Loosening and Periprosthetic Joint Infection. *Front. Immunol.* 12:687065. doi: 10.3389/fimmu.2021.687065

Aseptic prosthetic loosening and periprosthetic joint infections (PJI) are among the most frequent complications after total knee/hip joint arthroplasty (TJA). Current research efforts focus on understanding the involvement of the immune system in these frequent complications. Different immune cell types have already been implicated in aseptic prosthetic loosening and PJI. The aim of this study was to systematically analyze aspirates from knee and hip joints, evaluating the qualitative and quantitative composition of soluble immunoregulatory markers, with a focus on co-inhibitory and co-stimulatory markers. It has been shown that these molecules play important roles in immune regulation in cancer and chronic infectious diseases, but they have not been investigated in the context of joint replacement. For this purpose, aspirates from control joints (i.e., native joints without implanted prostheses), joints with TJA (no signs of infection or aseptic loosening), joints with aseptic implant failure (AIF; i.e., aseptic loosening), and joints with PJI were collected. Fourteen soluble immunoregulatory markers were assessed using bead-based multiplex assays. In this study, it could be shown that the concentrations of the analyzed immunoregulatory molecules vary between control, TJA, AIF, and PJI joints. Comparing TJA patients to CO patients, sCD80 was significantly elevated. The marker sBTLA was significantly elevated in AIF joints compared to TJA joints. In addition, a significant difference for eight markers could be shown when comparing the AIF and CO groups (sCD27, sCTLA-4, sCD137, sCD80, sCD28, sTIM-3, sPD-1, sBTLA). A significant difference was also reached for nine soluble markers when the PJI and CO groups were compared (sLAG-3, sCTLA-4, sCD27, sCD80, sCD28, sTIM-3, sPD-1, IDO, sBTLA). In summary, the analyzed immunoregulatory markers could be useful for diagnostic purposes as well as to develop new therapeutic approaches for AIF and PJI.

Keywords: aseptic loosening, periprosthetic joint infection, immunoregulatory markers, sCD28, sCD80, sCTLA-4, sBTLA, osteoimmunology

INTRODUCTION

In recent years, the continuously aging population and associated age-related morbidity have led to a marked increase in the number of implanted joint endoprotheses (1–3). As a result, an increase in consequent complications has been observed (2). These primarily include aseptic prosthetic loosening (referred to in this study as aseptic implant failure (AIF)) and peri-implant fractures, and also prosthetic joint infections (PJI), which can lead to septic prosthetic loosening (4–6). These typical complications can lead to significant limitations in daily activities due to pain, immobility, and chronic infections (7).

Current research efforts focus on understanding the immune system involvement, both qualitatively and quantitatively, in these frequent complications. Specific cell types of the immune system have been implicated in AIF (aseptic loosening) and PJI. As important mediators of osteolysis, macrophages play a significant role in the former complication (5, 8).

A new field of intensive research is the regulation of the immune system by immunoregulatory molecules, with a particular focus on so-called checkpoint molecules. These checkpoint molecules play an important role in immune regulation in cancer and chronic infectious diseases (9–12). At first, it was assumed that the main cells that are influenced by these molecules are T cells (10, 13–15). It is now known that these immunoregulatory markers also regulate other immune cells, such as macrophages, monocytes, and B cells (16, 17). Checkpoint molecules can be classified into co-stimulatory and co-inhibitory molecules. Co-stimulatory molecules, such as cluster of differentiation 27 (CD27), CD28, and glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), enhance the T cell response, while co-inhibitory molecules, such as programmed cell death protein 1 (PD-1) or cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), reduce it (10, 18–20). Recently, soluble forms of checkpoint molecules, such as sPD-1 (soluble PD-1), sPD-L2 (soluble PD-L2), and sCTLA-4 (soluble CTLA-4) were found (21). Their role is not yet understood but first studies have shown that these soluble forms of checkpoint molecules can be involved in positive or negative immune regulation. Furthermore, the development, prognosis, and treatment of cancer (lung, gastric or renal cell cancer) and infectious diseases (hepatitis B) may be affected by changes in the plasma levels of soluble immune markers (22–25).

A recent PubMed query showed that there has not yet been a systematic evaluation of the associations between the concentrations of soluble immunoregulatory molecules and joint implant-associated complications.

Differentiation between aseptic and septic joint inflammation is difficult. Neither clinical nor biochemical markers can distinguish abacterial from bacterial joint inflammation, despite assessment of markers obtained from clinical examinations, blood and joint aspirate analyses, and microbiological and histological tissue analyses (26). For example, a negative bacterial result in a joint aspirate does not reliably exclude a bacterial infection (27, 28). Currently, different scoring systems are used to diagnose a PJI. MSIS criteria, for example, consist of several major and minor parameters. Based on this scoring system, a PJI is diagnosed when one out of two major criteria (two microorganism-positive cultures indicating the

same pathogen; sinus tract communicating with the prosthesis) or three out of five minor criteria are fulfilled (CRP >10 mg/L; joint aspirate: leukocytes >3000 cells/ μ L, neutrophils >85%; single microorganism-positive tissue/aspirate sample; positive histology).

It is crucial to diagnose PJI early, differentiating septic from aseptic implant loosening so that specific therapy can be initiated at an early stage (29). If inflammation is treated inadequately, irreversible joint damage can occur, such as cartilage destruction with subsequent arthrosis and ankylosis (30). These changes can lead to functional loss of the affected joint and thus to permanent disabilities that affect everyday life. If the PJI progresses, the “ultima ratio” is amputation of the affected limb to save the patient’s life (31, 32).

The aim of this study was to systematically analyze aspirates from knee and hip joints, evaluating the qualitative and quantitative composition of soluble immunoregulatory markers for evaluating their potential as disease markers. For this purpose, aspirates from control (CO) joints (i.e., native joints without implanted prostheses), joints with total joint arthroplasty (TJA, i.e., fixed prostheses), joints with aseptic implant failure (AIF; i.e., aseptic loosening), and joints with periprosthetic joint infection (PJI) were evaluated and compared. The working hypothesis was that the qualitative and quantitative composition of soluble immunoregulatory molecules exhibits specific variations in aspirates from control, TJA, AIF, and PJI joints. Furthermore, one or more biomarkers may be specific for AIF or PJI. The identification of such biomarkers could lead to a better understanding of the pathomechanisms and new diagnostic and therapeutic approaches.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

Consecutive patients ($n = 99$) treated between 2016 and 2019 at the Clinic for Orthopedics and Trauma Surgery of the University Hospital Bonn, Germany, were recruited. The patients were aged 18–100 years and had undergone synovial fluid aspiration for diagnostic or therapeutic purposes. Patients with sepsis or extra-articular infection were excluded. The included patients were divided into four groups: control (CO) patients with native joints (no prosthesis and no signs of infection); patients with fixed TJA (no signs of infection or aseptic loosening); patients with AIF (i.e., aseptic loosening); and patients with PJI. The ethics committee of the University of Bonn, Germany, approved the study, which was conducted according to the approved guidelines and the Helsinki Declaration.

Classification

The classification developed by the Musculoskeletal Infection Society (MSIS) was used to identify patients with PJI. PJI was diagnosed when one major criterion (out of two major criteria) or three minor criteria (out of five minor criteria) were fulfilled. The major criteria are two microorganism-positive cultures (based on aspirate/tissue samples), indicating the same pathogen and sinus tract communicating with the prosthesis. The minor criteria are CRP >10 mg/L, leukocytes >3000 cells/ μ L of joint aspirate,

neutrophils >85% in joint aspirate, single microorganism-positive tissue/aspirate sample, and positive histology. The diagnosis of AIF (aseptic loosening) was determined based on the MSIS criteria, clinical examination, and radiological signs.

Data Collection

Data were collected on patient gender, age, BMI, and comorbidities (Table 1). In addition, laboratory results such as serum C-reactive protein (CRP), preoperative blood leukocyte counts, joint aspirate cell counts, intraoperative findings, sonication microbiology, and histopathology results were obtained from the medical records. All data were recorded in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Aspirate Sample Collection

Preoperative or intraoperative hip or knee joint aspirates had previously been obtained during diagnostic or therapeutic procedures, and the material not used for clinical diagnostics was utilized in this study. Each synovial fluid sample was centrifuged at 1200 rpm for 10 min (Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) to remove the cellular components. The resulting supernatant was transferred in 0.5-mL aliquots and stored at -80°C.

Bead-Based Multiplex Assays

Various soluble cytokines were measured using Immuno-Oncology Checkpoint 14-plex ProcartaPlex™ bead-based assays (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The detected soluble targets were: B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA), glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR), herpesvirus entry mediator (HVEM), indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3), programmed cell death protein 1 (PD-1), programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1), programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2), T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3), cluster of differentiation 28 (CD28), CD80, CD137, CD27, and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4). All samples were immediately thawed before conducting the assay. The wells were prewetted with 10 µL reading buffer and the antibody-labeled magnetic beads were vortexed for 30 s. Next, 12.5 µL of the beads was added to each well. After washing the wells, 12.5 µL of samples (or standards provided with the assay kit) was added to the beads in the wells and incubated in the dark for 120 min at room temperature, with

shaking. The beads were then washed twice. Next, 6.25 µL detection antibody mixture was added to each well and incubated in the dark for another 30 min, with shaking. After washing the beads, 12.5 µL streptavidin-phycoerythrin (PE) was added to the wells and the beads were again incubated in the dark for 30 min, with shaking. Following another washing step, the beads were resuspended in 50 µL reading buffer for 5 min, with shaking. Finally, data were acquired using a Flexmap 3D® system (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The raw data were transferred to a Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) table for further analysis.

Statistical Analysis

SPSS version 27 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for statistical analysis. The Kolmogorov–Smirnova test was performed to assess normality. The Kruskal–Wallis test was used to evaluate the statistical significance of the differences among the four groups. The Dunn's Test was performed as post-hoc-test. The level of significance was set at $p < 0.05$ (* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001). Descriptive statistics were calculated using GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All results are presented using boxplots showing the median and interquartile range (IQR).

RESULTS

The qualitative and quantitative composition of soluble immunoregulatory markers, focusing on co-inhibitory and co-stimulatory markers, was evaluated. Aspirates from control joints, joints with fixed TJA (no signs of infection or aseptic loosening), joints with AIF (aseptic loosening), and joints with PJI were compared.

Patient information is presented in Table 1. The overall male-to-female ratio was 2:3. The control patients were younger (mean age 48 years) than the patients with TJA (mean age 65 years) and the patients with periprosthetic complications (AIF: mean age 72 years, PJI: mean age 71 years). Furthermore, the control patients had a lower BMI (26 kg/m²) than the patients in the other three cohorts (TJA: 33 kg/m², AIF: 32 kg/m², PJI: 33 kg/m²). Preoperative routine blood analysis showed an increased level of CRP for PJI patients (92 mg/dl), and 44% of the PJI patients had diabetes mellitus.

TABLE 1 | Patient characteristics (n = 99).

Variable	Overall (n = 99)	CO (n = 13)	TJA (n = 23)	AIF (n = 24)	PJI (n = 39)
Age (year)	67 ± 13	48 ± 13	65 ± 10	72 ± 9	71 ± 12
Gender (m:f)	39:60	7:6	10:13	7:17	15:24
Hip	35	2	6	11	16
Knee	64	11	17	13	23
BMI (kg/m ²)	32 ± 8	26 ± 4	33 ± 6	32 ± 6	33 ± 11
Diabetes mellitus	23	1	3	2	17
Rheumatoid arthritis	10	1	3	2	4
CRP (mg/dl)	46 ± 106	2.4 ± 0.7	14 ± 20	8.9 ± 8.9	92 ± 24
Leukocytes (10 ⁹ /l)	8.6 ± 3	8.5 ± 0.8	7.6 ± 1.6	8.2 ± 2.9	9 ± 0.6

Data are presented as mean ± standard deviation or as frequency. Patients with a prosthesis were in general older than control patients without one. PJI patients had the highest concentration of CRP and leukocytes. CO, control group; TJA, total joint arthroplasty; AIF, aseptic implant failure; PJI, periprosthetic joint infection; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein.

Table 2 shows the mean concentrations of the 14 soluble immunoregulatory markers from hip and knee aspirates (based on bead-based multiplex assays) in each of the four groups. Overall, the control patients tended to have the lowest mean concentrations of immunoregulatory markers. TJA patients tended to have higher mean concentrations than control patients, while AIF patients tended to have higher concentrations than TJA patients. For many markers, the highest mean concentration was found in PJI patients, though sBTLA, sCD80, and sCD27 were higher in AIF patients than PJI patients (**Table 2**).

Figure 1 shows boxplots of the data regarding all 14 immunoregulatory markers, expressed as the median and interquartile range (IQR). In general, the lowest median concentrations of the markers were found in the control patients, whereas the highest were found in either AIF patients (sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sBTLA, sCD80, and sCD137) or PJI patients (sCTLA-4, sTIM-3, sLAG-3, sHVEM, IDO, sCD28, sCD27, and sGITR).

Regarding the results of the Kruskal-Wallis test, TJA patients tended to have higher concentrations than control patients, with significant levels being reached for the co-stimulatory marker sCD80 ($p = 0.015$) (**Figure 1**). In addition, the majority of the concentrations were also significantly higher in AIF patients than in control patients, with sCD28, sCD80, and sBTLA reaching a significance of $p < 0.01$ (**Figure 1**). Moreover, differences in concentrations between the PJI and control groups were significant, with sCTLA-4, IDO, sCD28, and sCD80 reaching a significance of $p < 0.001$ (**Figure 1**).

As shown in **Table 2**, the mean concentrations of all immunoregulatory markers were higher in AIF patients than in TJA patients, except for sCD137 (TJA: 11892.73 pg/ml, AIF: 10649.00 pg/ml). For example, the mean concentration of the co-inhibitory markers PD-1 was 171.75 pg/ml in AIF patients and only 120.61 pg/ml in TJA patients. Regarding the results of the Kruskal-Wallis test concerning the median concentrations, significantly higher levels were found in AIF patients compared to TJA patients for sBTLA ($p = 0.036$) (**Figure 1**).

Additionally, the mean concentrations of all 14 immunoregulatory markers (sCTLA-4, sPD-1, sPD-L1, sPD-L2, sTIM-3, sLAG-3, sBTLA, sHVEM, IDO, sCD28, sCD80, sCD27, sGITR, and sCD137) were higher in PJI patients compared to TJA patients. Kruskal-Wallis tests analyzing the median concentrations showed that sCTLA-4 and IDO reached a significance of $p < 0.001$ (**Figure 1**).

The mean concentrations in PJI patients were generally higher than in AIF patients (**Table 2**). However, AIF patients had higher levels of sBTLA, sCD80, and sCD27 compared to PJI patients. Investigating the median concentrations, no significant differences could be detected (**Figure 1**).

Additionally, we performed supplemental analyses to compare the marker concentrations of hip aspirates in comparison to knee aspirates. No significant trends could be seen, except for sLAG-3 in the PJI group (**Supplementary Table 1**). We also investigated whether diabetes mellitus (DM) had an influence on the investigated markers. In this study, only patients with a DM type II were found. When comparing DM patients with non-DM patients, we could not detect any significant difference (**Supplementary Table 2**). Interesting was the fact that the majority of patients with DM were in the PJI group. Similarly, also no significant difference could be found when comparing patients with and without rheumatoid arthritis (RA) (**Supplementary Table 3**).

In summary, the concentrations of the measured immunoregulatory markers differed between control (native), TJA, AIF, and PJI joints. The lowest levels were generally found in control joints, followed by TJA joints. Higher concentrations were generally found in AIF joints and the highest concentrations were generally found in PJI joints.

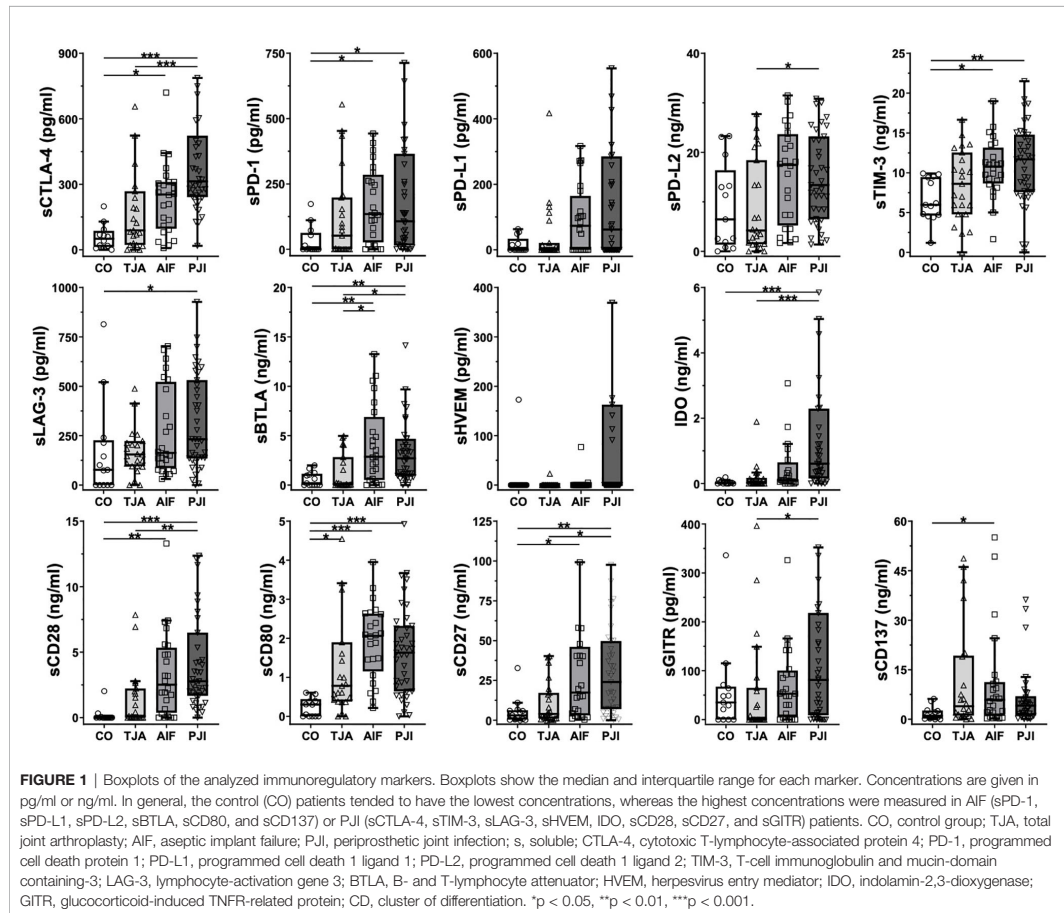
DISCUSSION

According to Wengler et al., the number of primary hip arthroplasties in Germany increased by 10.9% to 155,300 per year between 2005 and 2011 (33). During the same period, primary knee arthroplasty procedures increased by 21.6% to 152,500 per year (33).

TABLE 2 | Mean concentrations according to bead-based multiplex assays.

Marker	CO (pg/ml)	TJA (pg/ml)	AIF (pg/ml)	PJI (pg/ml)
sCTLA-4	59.33 ± 16.92	222.52 ± 73.29	236.29 ± 33.73	450.03 ± 58.53
sPD-1	32.77 ± 15.32	120.61 ± 35.10	171.75 ± 28.99	253.74 ± 59.44
sPD-L1	15.31 ± 6.60	40.83 ± 19.62	92.38 ± 21.37	289.92 ± 116.94
sPD-L2	9113.77 ± 2417.93	8808.78 ± 1953.44	15516.71 ± 1977.11	15966.54 ± 1948.67
sTIM-3	6534.31 ± 753.27	8435.04 ± 931.20	10649.71 ± 743.64	11032.33 ± 805.93
sLAG-3	168.15 ± 67.58	208.61 ± 49.94	276.38 ± 46.48	319.69 ± 38.40
sBTLA	594.92 ± 199.10	2220.57 ± 1125.36	4053.50 ± 818.41	3716.62 ± 674.90
sHVEM	13.31 ± 13.31	140.00 ± 453.79	541.00 ± 2064.83	896.97 ± 437.64
IDO	38.46 ± 16.09	171.04 ± 83.37	675.17 ± 291.29	1892.77 ± 519.09
sCD28	200.58 ± 167.92	1956.35 ± 764.85	3300.63 ± 663.01	4547.46 ± 717.21
sCD80	238.23 ± 66.18	1661.00 ± 450.41	1911.00 ± 195.57	1671.92 ± 184.79
sCD27	5670.23 ± 2444.59	10570.39 ± 2774.63	34988.13 ± 8975.34	32088.36 ± 5436.80
sGITR	59.08 ± 24.95	55.61 ± 21.63	70.79 ± 15.44	175.97 ± 46.54
sCD137	1832.83 ± 606.11	11892.73 ± 3469.32	10649.00 ± 3051.80	14389.70 ± 8378.15

Concentrations (pg/ml) of 14 immunoregulatory markers in hip and knee joint aspirates in each of the four groups are expressed as mean ± standard deviation. The highest values in each row are indicated in bold and the lowest values in italic. CO, control group; TJA, total joint arthroplasty; AIF, aseptic implant failure; PJI, periprosthetic joint infection; s, soluble; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; PD-1, programmed cell death protein 1; PD-L1, programmed cell death 1 ligand 1; PD-L2, programmed cell death 1 ligand 2; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; LAG-3, lymphocyte-activation gene 3; BTLA, B- and T-lymphocyte attenuator; HVEM, herpesvirus entry mediator; IDO, indoleamine-2,3-dioxygenase; GITR, glucocorticoid-induced TNFR-related protein; CD, cluster of differentiation.



One complication of endoprosthesis is aseptic joint inflammation, which can lead to AIF (aseptic implant failure). Another complication is septic joint inflammation caused by a bacterial infection (PJI), which can lead to septic prosthetic loosening. Wooley et al. reported that aseptic prosthetic loosening occurs in 20–25% of endoprosthetic implants (34), and approximately 1–2% of primary implants become infected, according to Trampuz et al. (2). These complications play significant roles in routine clinical practice, as patients experience severe reductions in quality of life, and the costs of treatment burden the healthcare system (2, 35, 36).

The variations in human immune responses related to joint endoprostheses, AIF, and PJI are not yet fully understood. This study presents an analysis of various soluble immunoregulatory markers (focusing on checkpoint molecules) in joint aspirates obtained during diagnostic or therapeutic procedures.

Checkpoint molecules play an essential role in modulating immune cells (11, 18). They are best known for regulating T cells,

though it is now recognized that other immune cells, such as macrophages and monocytes, are also controlled by these molecules (16, 17). T cells are part of the adaptive immune system, i.e., the acquired immune response that acts against specific pathogens. Antigen-presenting cells present previously phagocytosed antigens *via* the major histocompatibility complex (MHC) (37, 38). The MHC binds to the T cell receptor on T cells, which activates them (38–40). Parry et al. found that MHC-dependent antigen presentation alone is not sufficient for T cell activation. A second immunoregulatory signal, a so-called checkpoint molecule, is necessary (41, 42). These molecules either have activating (i.e., co-stimulatory) or inhibiting (i.e., co-inhibitory) effects. Co-stimulatory markers promote T cell activation, proliferation, and differentiation; co-inhibitory markers inhibit T cell functioning and activation (43–45).

In tumors and various chronic infectious diseases, checkpoint molecules play important roles in regulating the immune response (10, 18). For example, in these diseases, PD-1 is

upregulated. This results in the inhibition of immune cell activity so that pathological cells can hide from the immune system (46). This finding has already been applied in tumor therapy. For example, anti-PD-1 antibodies are used to treat melanomas and non-small cell lung cancer (11, 47).

Recently, soluble forms of checkpoint molecules were also found. In contrast to checkpoint molecules on the cell surface, they are less well studied and their role in immune regulation is not well understood. They can be generated *via* expression of the soluble form or by the cleavage of membrane-bound proteins by immune cells or tumor cells (21, 48, 49). There are no robust data for the correlation between the concentration of the soluble markers in synovial fluid or serum with their expression on the surface of immune cells. However, it is assumed that the stronger the surface expression of the markers, the greater the number of soluble markers found in synovial fluid.

In this study, we found that the mean concentrations of soluble immunoregulatory markers were generally lowest in control joints, TJA joints generally had lower concentrations than AIF joints, and PJI joints tended to have the highest concentrations, while sCD27, sBTLA, and sCD80 were the exceptions.

Our study revealed a significant difference for sCD80 comparing the CO and TJA groups, with higher mean concentrations in the TJA group. sCD80 is expressed by monocytes and B cells and is generated by alternative splicing (49). Whereas Kakoulidou et al. found an inhibitory effect on lymphocyte reactions and T cell proliferation, various other studies could describe an enhancement of T cell proliferation and IFN- γ production (21, 49–52). Furthermore, Haile et al. showed that a soluble form of CD80, CD80-Fc, was more effective in preventing the coinhibitory effect of the PD-1/PD-L1 pathway and in restoring T cell activation in comparison to blocking either PD-1 or PD-L1 with antibodies (52). Overlaying this finding with our data, the increased concentration of sCD80 in the TJA group compared to the CO group supports the idea that the prosthesis might activate the local immune system in the joint.

CD80 is expressed by macrophages, which are known to play an important role in aseptic loosening. Particles abraded from the prosthesis activate macrophages and promote osteoclast differentiation (53). This leads to local bone loss, which, in turn, can lead to aseptic loosening of the implant. In our data set, AIF patients showed a higher mean concentration of sCD80 than any other group and reached a statistical significance of < 0.001 when comparing AIF patients with the CO group. These findings suggest a role of macrophages and sCD80 in aseptic loosening. Furthermore, these data also suggest that blocking sCD80 to reduce an activation of the immune system activation could be a possible therapeutic option.

Another interesting soluble checkpoint molecule in our study is sCTLA-4. This marker presented the highest mean concentration in the PJI group and reached a significance < 0.001 when comparing the PJI and CO groups. sCTLA-4 is released by Treg cells, monocytes and immature DCs (48). Higher levels were found during immune activation and in different autoimmune and inflammatory diseases such as

lupus, autoimmune thyroiditis, myasthenia gravis, and celiac disease (54–57). Furthermore, in different tumors a high level of sCTLA-4 was associated with a poor prognosis (58, 59). It could be shown that sCTLA-4, similarly to CTLA-4, inhibits T cells. Blocking sCTLA-4 led to elevated levels of cytokines, especially IFN- γ (21, 60). In contrast, other studies found that sCTLA-4 inhibits the inhibitory effect of CTLA-4 on T cells (61, 62). One possible explanation for these contradictory findings might be that the effects of sCTLA-4 depend on the activation status of the involved cells. Whereas sCTLA-4 might inhibit the CD80-CD28 interaction on resting cells, it may inhibit the CD80-CTLA-4 interaction on activated T cells, thereby preventing the inhibition of T cells. In PJI, inhibitory effects on T cells might promote the persistence of the infection. Thus, blocking sCTLA-4 may possibly lead to T cell activation and proliferation and represent a possible therapy.

Based on our data, sCD28 could also be another therapeutic avenue. However, not much is known about this molecule in the current literature. sCD28 is expressed by T cells and increased in autoimmune diseases such as lupus, Sjögren's syndrome, allergic asthma and SLE (63–65). There are, however, as yet no data regarding its mechanism of action.

Our analysis of sBTLA found a significant difference between the AIF with TJA group ($p = 0.036$). Gorgulho et al. could show a positive correlation of sBTLA and BTLA expression on the cell surface (66). Soluble BTLA is increased in sepsis (67, 68). Dong et al. and Bian et al. showed that sBTLA correlated with a poor prognosis in HCC and pancreatic adenocarcinoma (69, 70). Furthermore, it correlated with the risk of death in clear cell renal cell carcinoma patients (22). There are different hypotheses how sBTLA could regulate the immune system. One possibility is that sBTLA could competitively bind HVEM on antigen presenting cells. On the other hand, it's plausible that sBTLA mimics the inhibitory effect of sCTLA-4 (66). Thinking along this line, the elevated sBTLA in our study could regulate the immune system activation in aseptic loosening. Therefore, targeting this molecule might be useful in the therapy of AIF.

Differentiation between aseptic and septic loosening (which are related to AIF and PJI, respectively) is a big problem in everyday clinical practice; currently, neither clinical nor laboratory parameters can be used to clearly differentiate them (26). Various diagnostic tools, such as the MSIS criteria, are currently being used to diagnose PJI (2, 71). However, there is still no proper gold standard for diagnosis. The distinction between aseptic and septic joint inflammation is vital for subsequent treatment. In cases of AIF, the aseptically loosened prostheses can generally be immediately exchanged. PJI must typically be addressed several times (31). For the patient, PJI also means taking antibiotics and experiencing chronic health complaints (31). Comparing the mean concentration of the PJI and AIF group in this study, the PJI group showed higher levels. However, using the Kruskal-Wallis test, no significant difference between the two groups could be shown. Therefore, it could not be found a useful biomarker to differ a PJI from an AIF.

As mentioned earlier, PJI is usually a chronic infection. The role of immunoregulatory markers has already been investigated

multiple times in other chronic diseases (9, 10, 72). In chronic infectious diseases such as HIV or HCV infections, co-inhibitory molecules, e.g., PD-1, show increased concentration (73, 74). Based on previous findings and the current findings, the assumption arises that these co-inhibitory markers play an important role in the immune response during PJI. By inhibiting the immune system, they pave the way for chronic disease. The infection persists within the joint and is not effectively resolved. Targeted blocking of these co-inhibitory markers using antibodies might neutralize the inhibition of the immune system. The infection may then be better addressed by the subsequent increased immune response and thus, satisfactorily treated.

However, one important next step for better diagnostic and therapeutic approaches utilizing the biology of soluble checkpoint inhibitors is not only a better understanding of their expression and mechanism of action but also how reproducible they are across different patient cohorts with differences in age, medication, site of surgery or comorbidities.

To address a potential influence of the site of surgery, we compared the level of checkpoint molecules of hip aspirates in comparison to knee aspirates. No significant trends could be found, except for sLAG-3 in the PJI group. If such an effect can be confirmed in a larger cohort, this would open up a very interesting discussion about differences of the local immunological microenvironment and how this could be used for targeted therapy.

As mentioned before, other comorbidities also need to be investigated in more detail. In this study, 10 patients out of 99 patients presented a RA. Previous publications could show that the levels of soluble immune checkpoints, such as sCD28, sCTLA-4, sCD80, and sPD-1 were higher in RA patients compared to patients without RA (75, 76). In our study, there was no significant difference between patients with and without RA. It is possible that the effect of an implanted protheses, aseptic loosening or PJI on the immune system might influence the expression profile of checkpoint molecules and disguise the influence of the RA. However, the value of this subgroup analysis is very limited due to the few numbers of RA patients. A significantly larger cohort is needed to allow for sufficient statistical power to perform meaningful statistics on the effect of RA. We also investigated whether DM type 2 had an influence on the investigated markers but could not find significant differences. It is noteworthy that most patients with DM type 2 were in the PJI group. This could be explained by the fact that patients with DM type 2 are prone to infections, especially periprosthetic joint infections (77, 78). In addition, DM type 2 is associated with obesity in the context of the metabolic syndrome and patients with a higher BMI have a higher risk for infections (77–79). These subgroup analyses imply that checkpoint molecules are not or only slightly influenced by the site of surgery, RA or DM type 2; however, such analyses have to be repeated in larger (multi-center) studies to clearly verify the comparability of patient groups.

Future studies should continue to investigate the roles of soluble immunoregulatory markers in aseptic and septic joint

inflammation. There is hope that this could result in new diagnostic and therapeutic approaches for aseptic and septic joint inflammation. Targeted inhibition of particular markers with antibodies may also influence the chronic course of PJI and result in successful eradication of the infection.

In summary, this study demonstrates that the concentrations of the analyzed immunoregulatory molecules varied between control, TJA, AIF, and PJI joints. Ultimately, this study suggests that immunoregulatory markers, such as sBTLA (AIF vs. TJA) or sCD28 and sCTLA-4 (PJI vs. TJA), could be useful for diagnostic purposes as well as to develop new therapeutic approaches for AIF and PJI.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the ethics committee of the University of Bonn, Germany. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by a grant from the National Multiple Sclerosis Society (RG 1809-32591 to FS).

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate the technical assistance provided by Ms. Căcilia Hilgers and Mr. Werner Masson. This work is part of the doctoral thesis of JJ.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.687065/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States From 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* (2007) 89(4):780–5. doi: 10.2106/00004623-200704000-00012
- Izakovicova P, Borens O, Trampuz A. Periprosthetic Joint Infection: Current Concepts and Outlook. *EFORT Open Rev* (2019) 4(7):482–94. doi: 10.1302/2058-5241.4.180092
- Maradit Kremers H, Larson DR, Crowson CS, Kremers WK, Washington RE, Steiner CA, et al. Prevalence of Total Hip and Knee Replacement in the United States. *J Bone Joint Surg Am* (2015) 97(17):1386–97. doi: 10.2106/JBJS.N.01141
- Del Pozo JL, Patel R. Clinical Practice. Infection Associated With Prosthetic Joints. *N Engl J Med* (2009) 361(8):787–94. doi: 10.1056/NEJMc0905029
- Landgraaber S, Jager M, Jacobs JJ, Hallab NJ. The Pathology of Orthopedic Implant Failure Is Mediated by Innate Immune System Cytokines. *Mediators Inflammation* (2014) 2014:185150. doi: 10.1155/2014/185150
- Koh CK, Zeng I, Ravi S, Zhu M, Vince KG, Young SW. Periprosthetic Joint Infection Is the Main Cause of Failure for Modern Knee Arthroplasty: An Analysis of 11,134 Knees. *Clin Orthop Relat Res* (2017) 475(9):2194–201. doi: 10.1007/s11999-017-5396-4
- Helwig P, Morlock J, Oberst M, Hauschild O, Hubner J, Borde J, et al. Periprosthetic Joint Infection—Effect on Quality of Life. *Int Orthop* (2014) 38(5):1077–81. doi: 10.1007/s00264-013-2265-y
- Yang F, Wu W, Cao L, Huang Y, Zhu Z, Tang T, et al. Pathways of Macrophage Apoptosis Within the Interface Membrane in Aseptic Loosening of Prostheses. *Biomaterials* (2011) 32(35):9159–67. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.039
- Jubel JM, Barbati ZR, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Front Immunol* (2020) 11:487. doi: 10.3389/fimmu.2020.00487
- Attanasio J, Wherry EJ. Costimulatory and Coinhibitory Receptor Pathways in Infectious Disease. *Immunity* (2016) 44(5):1052–68. doi: 10.1016/j.immuni.2016.04.022
- Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* (2016) 34:539–73. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112049
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* (1996) 271(5256):1734–6. doi: 10.1126/science.271.5256.1734
- Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and Cellular Insights Into T Cell Exhaustion. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(8):486–99. doi: 10.1038/nri3862
- Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 Alters T-Cell Metabolic Reprogramming by Inhibiting Glycolysis and Promoting Lipolysis and Fatty Acid Oxidation. *Nat Commun* (2015) 6:6692. doi: 10.1038/ncomms7692
- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 Regulates the Development, Maintenance, and Function of Induced Regulatory T Cells. *J Exp Med* (2009) 206(13):3015–29. doi: 10.1084/jem.20090847
- Huang X, Venet F, Wang YL, Lepape A, Yuan Z, Chen Y, et al. PD-1 Expression by Macrophages Plays a Pathologic Role in Altering Microbial Clearance and the Innate Inflammatory Response to Sepsis. *PNAS* (2009) 106(15):6303–8. doi: 10.1073/pnas.0809422106
- Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* (2016) 44(5):955–72. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.002
- Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol* (2005) 25(21):9543–53. doi: 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005
- Anderson KM, Czinn SJ, Redline RW, Blanchard TG. Induction of CTLA-4-Mediated Energy Contributes to Persistent Colonization in the Murine Model of Gastric Helicobacter Pylori Infection. *J Immunol* (2006) 176(9):5306–13. doi: 10.4049/jimmunol.176.9.5306
- Tang ZS, Hao YH, Zhang EJ, Xu CL, Zhou Y, Zheng X, et al. CD28 Family of Receptors on T Cells in Chronic HBV Infection: Expression Characteristics, Clinical Significance and Correlations With PD-1 Blockade. *Mol Med Rep* (2016) 14(2):1107–16. doi: 10.3892/mmr.2016.5396
- Gu D, Ao X, Yang Y, Chen Z, Xu X. Soluble Immune Checkpoints in Cancer: Production, Function and Biological Significance. *J Immunother Cancer* (2018) 6(1):132. doi: 10.1186/s40425-018-0449-0
- Wang Q, Zhang J, Tu H, Liang D, Chang DW, Ye Y, et al. Soluble Immune Checkpoint-Related Proteins as Predictors of Tumor Recurrence, Survival, and T Cell Phenotypes in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients. *J Immunother Cancer* (2019) 7(1):334. doi: 10.1186/s40425-019-0810-y
- Chakrabarti R, Kapse B, Mukherjee G. Soluble Immune Checkpoint Molecules: Serum Markers for Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancer Rep (Hoboken)* (2019) 2(4):e1160. doi: 10.1002/cnr2.1160
- Zhou L, Li X, Huang X, Chen L, Gu L, Huang Y. Soluble Programmed Death-1 Is a Useful Indicator for Inflammatory and Fibrosis Severity in Chronic Hepatitis B. *J Viral Hepat* (2019) 26(7):795–802. doi: 10.1111/jvh.13055
- Cheng HY, Kang PJ, Chuang YH, Wang YH, Jan MC, Wu CF, et al. Circulating Programmed Death-1 as a Marker for Sustained High Hepatitis B Viral Load and Risk of Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* (2014) 9(11):e95870. doi: 10.1371/journal.pone.0095870
- Gomez-Urena EO, Tande AJ, Osmon DR, Berbari EF. Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: Cultures, Biomarker and Criteria. *Infect Dis Clin North Am* (2017) 31(2):219–35. doi: 10.1016/j.idc.2017.01.008
- Berberi EF, Marculescu C, Sia I, Lahr BD, Hanssen AD, Steckelberg JM, et al. Culture-Negative Prosthetic Joint Infection. *Clin Infect Dis* (2007) 45(9):1113–9. doi: 10.1086/522184
- Palan J, Nolan C, Sarantos K, Westerman R, King R, Foguet P. Culture-Negative Periprosthetic Joint Infections. *EFORT Open Rev* (2019) 4(10):585–94. doi: 10.1302/2058-5241.4.180067
- Li C, Renz N, Trampuz A, Ojeda-Thies C. Twenty Common Errors in the Diagnosis and Treatment of Periprosthetic Joint Infection. *Int Orthop* (2020) 44(1):3–14. doi: 10.1007/s00264-019-04426-7
- van der Kraan PM. The Interaction Between Joint Inflammation and Cartilage Repair. *Tissue Eng Regen Med* (2019) 16(4):327–34. doi: 10.1007/s13770-019-00204-z
- Gehrke T, Alijanipour P, Parvizi J. The Management of an Infected Total Knee Arthroplasty. *Bone Joint J* (2015) 97-B(10 Suppl A):20–9. doi: 10.1302/0301-620X.97B10.36475
- Orfanos AV, Michael RJ, Keeney BJ, Moschetti WE. Patient-Reported Outcomes After Above-Knee Amputation for Prosthetic Joint Infection. *Knee* (2020) 27(3):1101–5. doi: 10.1016/j.knee.2019.10.007
- Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. Hip and Knee Replacement in Germany and the USA: Analysis of Individual Inpatient Data From German and US Hospitals for the Years 2005 to 2011. *Dtsch Arztebl Int* (2014) 111(23–24):407–16. doi: 10.3238/arztebl.2014.0407
- Wooley PH, Schwarz EM. Aseptic Loosening. *Gene Ther* (2004) 11(4):402–7. doi: 10.1038/sj.gt.3302202
- Kurtz SM, Lau E, Watson H, Schmier JK, Parvizi J. Economic Burden of Periprosthetic Joint Infection in the United States. *J Arthroplasty* (2012) 27(8 Suppl):61–5 e1. doi: 10.1016/j.arth.2012.02.022
- Akindolire J, Morcos MW, Marsh JD, Howard JL, Lanting BA, Vasarhelyi EM. The Economic Impact of Periprosthetic Infection in Total Hip Arthroplasty. *Can J Surg* (2020) 63(1):E52–E6. doi: 10.1503/cjs.004219
- Dustin ML. The Cellular Context of T Cell Signaling. *Immunity* (2009) 30(4):482–92. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.010
- Irvine DJ, Purbhoo MA, Krogsgaard M, Davis MM. Direct Observation of Ligand Recognition by T Cells. *Nature* (2002) 419(6909):845–9. doi: 10.1038/nature01076
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive Immunity. *J Allergy Clin Immunol* (2010) 125(2 Suppl 2):S33–40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017
- Natarajan K, Li H, Mariuzza RA, Margulies DH. MHC Class I Molecules, Structure and Function. *Rev Immunogenet* (1999) 1(1):32–46.
- Uede T. The Molecular Mechanism of Costimulatory Signal for T Cell Activation. *Nihon Rinsho* (1995) 53(10):2597–603.
- Guerder S, Flavell RA. T-Cell Activation. Two for T. *Curr Biol* (1995) 5(8):866–8. doi: 10.1016/S0960-9822(95)00175-8
- Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, et al. TIGIT and PD-1 Impair Tumor Antigen-Specific CD8(+) T Cells in Melanoma Patients. *J Clin Invest* (2015) 125(5):2046–58. doi: 10.1172/JCI80445

44. Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 Delivers a Costimulatory Signal Involved in Antigen-Specific IL-2 Production by Human T Cells. *J Immunol* (1991) 147(8):2461–6.
45. Yang SY, Denning SM, Mizuno S, Dupont B, Haynes BF. A Novel Activation Pathway for Mature Thymocytes. Costimulation of CD2 (T.p50) and CD28 (T.p44) Induces Autocrine Interleukin 2/Interleukin 2 Receptor-Mediated Cell Proliferation. *J Exp Med* (1988) 168(4):1457–68. doi: 10.1084/jem.168.4.1457
46. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. *Cancer Res* (2012) 72(4):917–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620
47. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival With Ipilimumab in Patients With Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* (2010) 363(8):711–23. doi: 10.1056/NEJMoa1003466
48. Ward FJ, Dahal LN, Wijesekera SK, Abdul-Jawad SK, Kaewarpai T, Xu H, et al. The Soluble Isoform of CTLA-4 as a Regulator of T-Cell Responses. *Eur J Immunol* (2013) 43(5):1274–85. doi: 10.1002/eji.201242529
49. Kakoulidou M, Giscoombe R, Zhao X, Lefvert AK, Wang X. Human Soluble CD80 Is Generated by Alternative Splicing, and Recombinant Soluble CD80 Binds to CD28 and CD152 Influencing T-Cell Activation. *Scand J Immunol* (2007) 66(5):529–37. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02009.x
50. Haile ST, Horn LA, Ostrand-Rosenberg S. A Soluble Form of CD80 Enhances Antitumor Immunity by Neutralizing Programmed Death Ligand-1 and Simultaneously Providing Costimulation. *Cancer Immunol Res* (2014) 2(7):610–5. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0204
51. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Alvarez JA. Novel Strategies for Inhibiting PD-1 Pathway-Mediated Immune Suppression While Simultaneously Delivering Activating Signals to Tumor-Reactive T Cells. *Cancer Immunol Immunother* (2015) 64(10):1287–93. doi: 10.1007/s00262-015-1677-5
52. Haile ST, Dalal SP, Clements V, Tamada K, Ostrand-Rosenberg S. Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1-Mediated Immune Suppression. *J Immunol* (2013) 191(5):2829–36. doi: 10.4049/jimmunol.1202777
53. Cherian JJ, Jauregui JJ, Banerjee S, Pierce T, Mont MA. What Host Factors Affect Aseptic Loosening After THA and TKA? *Clin Orthop Relat Res* (2015) 473(8):2700–9. doi: 10.1007/s11999-015-4220-2
54. Oaks MK, Hallett KM. Cutting Edge: A Soluble Form of CTLA-4 in Patients With Autoimmune Thyroid Disease. *J Immunol* (2000) 164(10):5015–8. doi: 10.4049/jimmunol.164.10.5015
55. Wang XB, Kakoulidou M, Giscoombe R, Qiu Q, Huang D, Pirskanen R, et al. Abnormal Expression of CTLA-4 by T Cells From Patients With Myasthenia Gravis: Effect of an AT-Rich Gene Sequence. *J Neuroimmunol* (2002) 130(1–2):224–32. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00228-X
56. Liu MF, Wang CR, Chen PC, Fung LL. Increased Expression of Soluble Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4 Molecule in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Immunol* (2003) 57(6):568–72. doi: 10.1046/j.1365-3083.2003.01232.x
57. Simone R, Brizzolara R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Natale C, Greco L, et al. A Functional Soluble Form of CTLA-4 Is Present in the Serum of Celiac Patients and Correlates With Mucosal Injury. *Int Immunol* (2009) 21(9):1037–45. doi: 10.1093/intimm/dxp069
58. Erfani N, Razmkhah M, Ghaderi A. Circulating Soluble CTLA4 (sCTLA4) Is Elevated in Patients With Breast Cancer. *Cancer Invest* (2010) 28(8):828–32. doi: 10.3109/0737901003630934
59. Mansour A, Elkhodary T, Darwish A, Mabed M. Increased Expression of Costimulatory Molecules CD86 and sCTLA-4 in Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Lymphoma* (2014) 55(9):2120–4. doi: 10.3109/10428194.2013.869328
60. Ward FJ, Dahal LN, Khanolkar RC, Shankar SP, Barker RN. Targeting the Alternatively Spliced Soluble Isoform of CTLA-4: Prospects for Immunotherapy? *Immunotherapy* (2014) 6(10):1073–84. doi: 10.2217/imt.14.73
61. Liu Q, Hu P, Deng G, Zhang J, Liang N, Xie J, et al. Soluble Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4: A Favorable Predictor in Malignant Tumors After Therapy. *Onco Targets Ther* (2017) 10:2147–54. doi: 10.2147/OTT.S128451
62. Saverino D, Brizzolara R, Simone R, Chiappori A, Milintenda-Floriani F, Pesce G, et al. Soluble CTLA-4 in Autoimmune Thyroid Diseases: Relationship With Clinical Status and Possible Role in the Immune Response Dysregulation. *Clin Immunol* (2007) 123(2):190–8. doi: 10.1016/j.clim.2007.01.003
63. Ip WK, Wong CK, Leung TF, Lam CW. Elevation of Plasma Soluble T Cell Costimulatory Molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in Children With Allergic Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* (2005) 137(1):45–52. doi: 10.1159/000084612
64. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Aberrant Production of Soluble Costimulatory Molecules CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatol (Oxford)* (2005) 44(8):989–94. doi: 10.1093/rheumatology/keh663
65. Hebbbar M, Jeannin P, Magistrelli G, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B, et al. Detection of Circulating Soluble CD28 in Patients With Systemic Lupus Erythematosus, Primary Sjogren's Syndrome and Systemic Sclerosis. *Clin Exp Immunol* (2004) 136(2):388–92. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02427.x
66. Gorgulho J, Roderburg C, Heymann F, Schulze-Hagen M, Beier F, Vucur M, et al. Serum Levels of Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Predict Overall Survival in Patients Undergoing Immune Checkpoint Inhibitor Therapy for Solid Malignancies. *Int J Cancer* (2021) 149(5):1189–98. doi: 10.1002/ijc.33610
67. Monaghan SF, Banerjee D, Chung CS, Lomas-Neira J, Cygan KJ, Rhine CL, et al. Changes in the Process of Alternative RNA Splicing Results in Soluble B and T Lymphocyte Attenuator With Biological and Clinical Implications in Critical Illness. *Mol Med* (2018) 24(1):32. doi: 10.1186/s10020-018-0036-3
68. Lange A, Sunden-Cullberg J, Magnuson A, Hultgren O. Soluble B and T Lymphocyte Attenuator Correlates to Disease Severity in Sepsis and High Levels Are Associated With an Increased Risk of Mortality. *PLoS One* (2017) 12(1):e0169176. doi: 10.1371/journal.pone.0169176
69. Dong MP, Enomoto M, Thuy LTT, Hai H, Hieu VN, Hoang DV, et al. Clinical Significance of Circulating Soluble Immune Checkpoint Proteins in Sorafenib-Treated Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep* (2020) 10(1):3392. doi: 10.1038/s41598-020-60440-5
70. Bian B, Fanale D, Dusetti N, Roque J, Pastor S, Chretien AS, et al. Prognostic Significance of Circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Oncotarget* (2019) 8(4):e1561120. doi: 10.1080/2162402X.2018.1561120
71. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, et al. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty* (2018) 33(5):1309–14 e2. doi: 10.1016/j.arth.2018.02.078
72. Dong Y, Li X, Zhang L, Zhu Q, Chen C, Bao J, et al. CD4(+) T Cell Exhaustion Revealed by High PD-1 and LAG-3 Expression and the Loss of Helper T Cell Function in Chronic Hepatitis B. *BMC Immunol* (2019) 20(1):27. doi: 10.1186/s12865-019-0309-9
73. Caraballo Cortes K, Osuch S, Perlejewski K, Pawelczyk A, Kazmierczak J, Janiak M, et al. Expression of Programmed Cell Death Protein 1 and T-Cell Immunoglobulin- and Mucin-Domain-Containing Molecule-3 on Peripheral Blood CD4+CD8+ Double Positive T Cells in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection and in Subjects Who Spontaneously Cleared the Virus. *J Viral Hepat* (2019) 26(8):942–50. doi: 10.1111/jvh.13108
74. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells Is Associated With T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature* (2006) 443(7109):350–4. doi: 10.1038/nature05115
75. Cao J, Zou L, Luo P, Chen P, Zhang L. Increased Production of Circulating Soluble Co-Stimulatory Molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Int Immunopharmacol* (2012) 14(4):585–92. doi: 10.1016/j.intimp.2012.08.004
76. Wan B, Nie H, Liu A, Feng G, He D, Xu R, et al. Aberrant Regulation of Synovial T Cell Activation by Soluble Costimulatory Molecules in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* (2006) 177(12):8844–50. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8844
77. Blanco JF, Diaz A, Melchor FR, da Casa C, Pescador D. Risk Factors for Periprosthetic Joint Infection After Total Knee Arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg* (2020) 140(2):239–45. doi: 10.1007/s00402-019-03304-6
78. Kunutsor SK, Whitehouse MR, Blom AW, Beswick AD, Team I. Patient-Related Risk Factors for Periprosthetic Joint Infection After Total Joint Arthroplasty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* (2016) 11(3):e0150866. doi: 10.1371/journal.pone.0150866

79. Namba RS, Paxton L, Fithian DC, Stone ML. Obesity and Perioperative Morbidity in Total Hip and Total Knee Arthroplasty Patients. *J Arthroplasty* (2005) 20(7 Suppl 3):46–50. doi: 10.1016/j.arth.2005.04.023

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Jubel, Randau, Becker-Gotot, Scheidt, Wimmer, Kohlhof, Burger, Wirtz and Schildberg. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Schildberg für seine Unterstützung, Geduld und zahlreichen Ideen bedanken. Durch ihn wurde ich zur interessanten Themenwelt der Immuncheckpoints geführt und habe zahlreiche Einblicke in die Immunwelt erlangt.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Wirtz und Herrn Prof. Burger, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Weiter möchte ich mich bei dem gesamten wissenschaftlichen Team des Labors, insbesondere bei Cäcilia Hilgers und Werner Masson bedanken, die mir stets bei Seiten standen. Durch ihre Hilfe und zahlreichen Ideen ist diese Arbeit überhaupt erst entstanden.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiter*innen der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, besonders Thomas Randau und Hendrik Kohlhof, die einen Großteil der Punkttate gesammelt und mir die klinische Bedeutung der periprothetischen Gelenkkomplikationen nähergebracht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die unendliche Unterstützung, Beratung und ihr Verständnis bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Martin, der mich in allen Phasen unterstützt hat.