

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der immunhistochemische Nachweis von SMURF1 und
SMURF2 im humanen osteoarthritischen Knorpel und Meniskus

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Katharina Ruth Kröber

aus

Leipzig

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. A. Schilling

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 05.11.18

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Osteoarthrose	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren und Pathogenese	2
1.1.3 Klinik, Diagnose und Therapiemöglichkeiten	3
1.2 Gelenkknorpel	5
1.2.1 Anatomie des Gelenkknorpels	5
1.2.2 Mikroskopische Knorpelveränderungen bei Osteoarthrose	7
1.2.3 Systeme zur histologischen Klassifizierung des Gelenkknorpels	8
1.3 Meniskus	9
1.3.1 Anatomie des Meniskus	9
1.3.2 Degeneration des Meniskus bei Osteoarthrose	12
1.3.3 Systeme zur histologischen Klassifizierung des Meniskus	13
1.4 TGF- β -Signalweg	14
1.4.1 Grundlagen	14
1.4.2 Regulation des TGF- β -Signalweges durch SMURF1 und SMURF2	16
1.4.3 TGF- β -Signalweg im osteoarthritisch veränderten Knorpel- und Meniskusgewebe	18
1.5 Aufgabenstellung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Allgemeine vorbereitende Maßnahmen	21
2.1.1 Herkunft der Gewebeproben	21
2.1.2 Anfertigung der histologischen Schnitte	21

2.1.3 Entparaffinierung und Rehydrierung	21
2.2 Histologische Färbungen für die Lichtmikroskopie	22
2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Meniskusgewebe	22
2.2.2 Safranin O-/Fast Green-Färbung von Knorpelgewebe	23
2.3 Immunhistochemie	25
2.3.1 Allgemeines zur Methode	25
2.3.2 Vorbehandlung des Knorpel- und Meniskusgewebes	25
2.3.3 Antigendemaskierung	26
2.3.4 Blockierung unspezifischer Bindungen	26
2.3.5 Verwendete Primärantikörper	26
2.3.6 Visualisierung der Antigene	27
2.3.7 Protokoll der immunhistochemischen Färbung	28
2.3.8 Gegenfärben, Dehydrieren und Eindeckeln	30
2.3.9 Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse	32
2.4 Einteilung des Knorpel- und Meniskusgewebes	32
2.4.1 Histologische Graduierung des Knorpelgewebes	32
2.4.2 Histologische Graduierung des Meniskusgewebes	34
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Ergebnisse im Knorpelgewebe	36
3.1.1 Einteilung des Knorpels nach histologischen Merkmalen	36
3.1.2 Nachweis und Lokalisation von SMURF1	37
3.1.3 Nachweis und Lokalisation von SMURF2	39
3.2 Ergebnisse im Meniskus	42
3.2.1 Einteilung des Meniskus nach histologischen Merkmalen	42
3.2.2 Nachweis und Lokalisation von SMURF1	44
3.2.3 Nachweis und Lokalisation von SMURF2	45

4 DISKUSSION	48
4.1 Diskussion der histologischen Graduierung des Knorpelgewebes	48
4.2 Diskussion des immunhistochemischen Nachweises von SMURF1 und SMURF2 im Knorpel	50
4.3 Diskussion der histologischen Graduierung des Meniskusgewebes	52
4.4 Diskussion des immunhistochemischen Nachweises von SMURF1 und SMURF2 im Meniskus	54
5 ZUSAMMENFASSUNG	56
6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
7 TABELLENVERZEICHNIS	58
8 LITERATURVERZEICHNIS	59

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Co-SMAD	Co-Mediator SMAD
COX	Cyclooxygenase
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
HE	Hämatoxylin-Eosin
HECT	<i>homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i>
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
I-SMAD	inhibitorisches SMAD
LM	lateral Meniskus
MH	<i>mad homology</i>
MM	medialer Meniskus
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAR	nichtsteroidales Antirheumatikum

OA	Osteoarthrose
OACH	<i>Osteoarthritis Cartilage Histopathology</i>
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
R-SMAD	Rezeptor-reguliertes SMAD
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SMURF	<i>SMAD ubiquitination regulatory factor</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween 20</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sind durch Osteoarthrose (OA) verändertes Knorpel- und Meniskusgewebe des humanen Kniegelenkes auf die Proteine *SMAD ubiquitination regulatory factor 1* (SMURF1) und SMURF2, zwei bedeutende Mediatoren des *transforming growth factor-beta* (TGF- β)-Signalweges, hin untersucht worden. Der Nachweis erfolgte mithilfe der Immunhistochemie (IHC).

1.1 Osteoarthrose

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die OA, im angloamerikanischen Raum auch als *osteoarthritis* bezeichnet, ist eine degenerative Gelenkerkrankung. In der Vergangenheit wurde die OA als eine Funktionsstörung erachtet, welche allein das Knorpelgewebe betrifft. Heute jedoch weiß man, dass es sich um eine Erkrankung des gesamten Gelenkes einschließlich der Muskeln, Sehnen, Bänder, der Innenauskleidung der Gelenkhöhle (*Membrana synovialis*) und des Knochens handelt (Loeser et al. 2012). Es ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung Erwachsener und der Hauptgrund für Schmerzen und Invalidität im Erwachsenenalter (Johnson und Hunter 2014).

In Deutschland sind laut einer Studie zur Gesundheit Erwachsener 20,3 % der Personen im Alter zwischen 18 und 79 Jahren, also rund 12,4 Millionen Menschen betroffen. Dabei steigt die Erkrankungsrate mit zunehmenden Alter stark an und ist bei mehr als der Hälfte der Betroffenen im Kniegelenk (Gonarthrose) lokalisiert. Frauen (22,3 %) sind im Vergleich zu Männern (18,1 %) in Deutschland signifikant häufiger von OA betroffen (Fuchs et al. 2013). Dabei steigt vor allem um die Zeit der Menopause das Erkrankungsrisiko für Frauen an (Srikanth et al. 2005).

1.1.2 Risikofaktoren und Pathogenese

Die OA ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, deren Ursache noch nicht vollständig verstanden ist. Studien beweisen jedoch die Existenz potenzieller Risikofaktoren für die Entstehung einer OA. Hierzu zählen zum einen das Alter, das weibliche Geschlecht, eine genetische Disposition, der sozioökonomische Status sowie Übergewicht. Auf Gelenk-Ebene sind traumatische Gelenkverletzungen, wie Meniskusläsionen, Rupturen des vorderen Kreuzbandes oder eine direkte Verletzung des Gelenkknorpels, als Risiko für eine Gonarthrose zu nennen (Allen und Golightly 2015; Neogi und Zhang 2013). Auch eine Fehlstellung beziehungsweise Achsabweichung des Knie- oder Hüftgelenks (Valgus- oder Varusdeformität) kann einen Risikofaktor für die Entstehung einer OA darstellen (Räuchle et al. 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine berufsbedingte Überlastung von Gelenken das Risiko für OA im Hüft- und Kniegelenk erhöht (Johnson und Hunter 2014; Neogi und Zhang 2013). So ist als Beispiel die Arbeit als Fliesenleger oder Installateur häufig mit Tätigkeiten in kniender sowie hockender Haltung assoziiert, weshalb diese Berufsgruppen ein höheres Erkrankungsrisiko für eine Gonarthrose besitzen (Ditchen 2012). Andere Faktoren wie die Ernährung, insbesondere der Zusammenhang eines Vitamin-D-Mangels mit OA sowie der Einfluss von Rauchen werden noch diskutiert (Allen und Golightly 2015).

Bei dem Krankheitsbild der OA kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Degeneration und Reparatur der Gewebe des Gelenkes. Zusätzlich zu der Schädigung und dem Verlust von Knorpelgewebe finden im Gelenk Umbauprozesse im Knochen unterhalb des Knorpels (subchondraler Knochen), Knochenneubildungen in Form von Osteophyten, eine Lockerung der Bänder sowie eine Schwächung der periartikulären Muskulatur statt (Hutton 1989; Litwic et al. 2013). Zudem können Entzündungen auftreten, die sich aber im Vergleich zur rheumatoiden Arthritis ausschließlich auf das Gelenk beziehen und eine niedrigere Qualität besitzen (Jones 2016).

1.1.3 Klinik, Diagnose und Therapiemöglichkeiten

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf dem Kniegelenk, weshalb sich die folgenden Ausführungen auf das Krankheitsbild der Gonarthrose beziehen. Erkrankte Patienten geben als Symptome Bewegungseinschränkungen sowie Anlaufschmerzen im Knie an (Michael et al. 2010). In der Anfangsphase kann eine OA auch stumm verlaufen und sich erst in einem fortgeschrittenen Stadium mit Schmerzen bemerkbar machen (Räuchle et al. 2012). Das Spätstadium der Erkrankung ist vor allem durch Dauerschmerzen charakterisiert (Michael et al. 2010).

Die Diagnostik der OA ist zum einen durch klinische Untersuchungen und zum anderen durch radiologische Bildgebungsverfahren möglich. Mithilfe konventioneller Röntgenaufnahmen kann der Schweregrad der OA nach dem Kellgren-Score in einen von vier Schweregraden eingeteilt werden. Dabei sind die Gelenkaufnahmen nach der Größe des Gelenkspaltes und dem Vorhandensein von Osteophyten, Sklerosierungen und Deformierungen zu bewerten (Kellgren und Lawrence 1957). Die *World Health Organization* hat diese Kriterien als Standard für epidemiologische Studien über OA übernommen (Litwic et al. 2013). Konventionelle Röntgenaufnahmen lassen jedoch aufgrund ihrer zweidimensionalen Natur nur eine begrenzte Sicht auf das Krankheitsgeschehen zu. Zudem kann eine Abweichung zwischen den Symptomen des Patienten und dem röntgenologisch festgestellten Schweregrad der OA beobachtet werden (Räuchle et al. 2012). Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht eine gute Darstellung der Strukturen des Kniegelenks wie das Knorpelvolumen, Knorpeldefekte, die Biochemie des Gelenkknorpels, die Meniskuspathologie, Knochenmarkläsionen und die Größe des subchondralen Knochens. Jedoch hat die MRT in der Diagnostik der OA im Frühstadium ihre Grenzen (Jones 2016).

Therapieziele der Gonarthrose sind Schmerzreduktion sowie die Erhaltung der Gelenkfunktion. Das Fortschreiten der Krankheit soll verzögert oder aufgehalten werden. Eine vollständige Heilung der OA ist aus heutiger Sicht nicht möglich. Im Folgenden werden konservative (nichtmedikamentöse und medikamentöse) sowie operative Therapiemöglichkeiten vorgestellt.

Der Ansatz der nichtmedikamentösen Therapie sind körperliche Bewegung und Physiotherapie, damit sollen die Symptome gemildert und die funktionelle Leistung des Gelenkes verbessert werden. Da Übergewicht einen Risikofaktor für die Verschlechterung der OA darstellt, kann sich ein durch körperliche Bewegung erreichter Gewichtsverlust zusätzlich positiv auf den Verlauf der OA auswirken. Patienten können durch Schmerzen und Gelenksteifheit körperlich eingeschränkt sein, weshalb die Bewegungsübungen individuell auf den Patienten abzustimmen sind (Yusuf 2016).

Die medikamentöse Therapie sollte neben der Symptommilderung möglichst die in der OA geschädigten Strukturen günstig beeinflussen (Yusuf 2016). Das Analgetikum der ersten Wahl ist Paracetamol. Dieses hat bei einer korrekten Einnahme lediglich leichte Nebenwirkungen und ist ausschließlich bei schwachen Schmerzen anzuwenden. Verschiedene Studien belegen, dass Paracetamol im Vergleich zur Placebogruppe signifikante, wenn auch nur geringfügige Effekte bei OA-Patienten erzielt (Machado et al. 2015). Eine weitere Medikamentengruppe sind die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR). Diese werden bei stärkeren Schmerzen empfohlen und haben neben der analgetischen auch antipyretische (fiebersenkende) und in höheren Dosen antiphlogistische Wirkung. Sie greifen über die Hemmung der Enzyme Cyclooxygenase (COX)-1 und/oder COX-2 in die Prostaglandinsynthese ein (Yusuf 2016). Die Leitlinie der *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) empfiehlt nicht-selektive NSAR für die Therapie von Gonarthrose. Allerdings sind diese aufgrund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen vor allem auf den Gastrointestinaltrakt nicht bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für gastrointestinale Blutungen anzuwenden. Hier sind selektive COX-Hemmer zu empfehlen, welche nur COX-2 inhibieren und weniger gastrointestinale Nebenwirkungen zeigen (McAlindon et al. 2014). Bei Patienten, bei denen alle vorgenannten Analgetika versagen beziehungsweise bei denen aufgrund von Kontraindikationen eine operative Therapie nicht möglich ist, können Opiode verschrieben werden. Diese sind aufgrund ihres großen Nebenwirkungsspektrums und hohem Abhängigkeitspotenzial nur bei strenger Indikation anzuwenden (Yusuf 2016).

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist die intraartikuläre Injektion von Glukokortikoiden. Diese hemmen die Produktion von Kollagenasen, die bei der Schädigung des

Gelenkknorpels eine Rolle spielen. Therapieeffekte sind neben der Symptommilderung die Verbesserung der Bewegungsfunktion des Kniegelenks. Die Injektionen zeigen jedoch nach der heutigen Studienlage nur kurzzeitige Effekte, weshalb sie nicht standardmäßig bei Gonarthrosepatienten angewendet werden sollten (Jüni et al. 2015).

Eine operative Therapie ist nach Versagen konservativer Behandlungsmöglichkeiten meist die einzige Möglichkeit, die Lebensqualität der Patienten langfristig zu erhalten. Dabei können durch einen endoprothetischen Gelenkersatzes im Vergleich zur nicht-operativen Therapie signifikante Erfolge in Bezug auf die Funktion und Schmerzen für den Patienten erzielt werden (Skou et al. 2015).

1.2 Gelenkknorpel

1.2.1 Anatomie des Gelenkknorpels

Die artikulierenden Flächen echter Gelenke (Diarthrosen) sind mit hyalinem Knorpel überzogen. Hyaliner Knorpel weist eine glatte Oberfläche auf und ermöglicht so ein effektives Gleiten während der Gelenkbewegung. Daneben wirkt er als Stoßdämpfer, der auftretende Belastungen abfedert (Poole AR et al. 2001; Loeser et al. 2012). Der hyaline Knorpel besteht aus ovalen Knorpelzellen (Chondrozyten) sowie der extrazellulären Matrix (EZM). Diese setzt sich aus einem Netzwerk arkadenartig angeordneter Kollagenfasern sowie Proteoglykanen und Glykoproteinen zusammen (Kuettner 1992; Umlauf et al. 2010). Typ II Kollagen ist der Hauptbestandteil des gesunden Gelenkknorpels, aber auch die Kollagentypen III, VI, IX, X, XI, XII, XIV sind in der EZM nachzuweisen (Eyre D 2002). Als Proteoglykan ist im hyalinen Knorpel vor allem Aggrecan vorzufinden, welches mit Hyaluronsäure Molekül-Komplexe bildet (Knudson CB und Knudson W 2001). Diese besitzen gute wasserbindende Eigenschaften und sind zusammen mit dem Kollagennetzwerk maßgeblich für die Formstabilität und hervorragenden mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels verantwortlich (Söder und Aigner 2011). Neben Aggrecan sind auch andere Proteoglykane wie

Biglycan und Decorin im Knorpelgewebe nachzuweisen (Poole AR et al. 1996). Die EZM macht etwa 95 % des Knorpelvolumens aus und ist als perizelluläre, territoriale und interterritoriale Matrix organisiert. Die perizelluläre Matrix umgibt die Chondrozyten als schmaler Saum. Knorpelzellen mit einer gemeinsamen perizellulären Matrix werden unter dem Begriff Chondron zusammengefasst (Poole CA 1997; Söder und Aigner 2011). An sie grenzt unmittelbar die territoriale Matrix an, welche vor allem Kollagentyp VI enthält (Goldring MB und Goldring SR 2010). Die Region zwischen den territorialen Matrices der Chondrone wird als interterritoriale Matrix bezeichnet (Söder und Aigner 2011). Das Knorpelgewebe besitzt keine Nerven sowie Lymph- und Blutgefäße. Ernährt wird es deshalb zum größten Teil durch freie Diffusion von Nährstoffen über die Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit), aber auch über Blutgefäße des subchondralen Knochenmarks (Wang Y et al. 2012).

Lichtmikroskopisch kann der Gelenkknorpel in eine obere, mittlere, tiefe und kalzifizierte Zone eingeteilt werden (siehe Abbildung 1). In Bezug auf den Kollagen- und Proteoglykangehalt weisen die Bereiche regionale Unterschiede auf (Poole AR et al. 2001). Die obere Zone besteht aus flachen, parallel angeordneten Chondrozyten und nimmt etwa 10 % der Knorpeldicke ein (Söder und Aigner 2011). Hier verlaufen dünne Kollagenfibrillen in einem engen Verbund parallel zur Knorpeloberfläche. Zudem verfügt dieser Bereich über einen hohen Decorin- und Biglycangehalt (Poole AR et al. 1996). Die mittlere Zone liegt im sich anschließenden oberen Knorpeldrittel und ist reich an Aggrecan. Hier haben die zumeist einzeln liegenden Chondrozyten eine rundliche Form. Die Kollagenfibrillen haben einen größeren Durchmesser und weisen eine willkürliche Anordnung auf (Poole AR et al. 2001). Darauf folgt die zwischen der mittleren Zone und dem kalzifizierten Knorpel gelegene tiefe Zone. Die Zellen sind in diesem Bereich säulenartig angeordnet. Diese Zone ist durch ihren hohen Aggrecangehalt und ein Netzwerk aus radial verlaufenden Kollagenfasern charakterisiert (Poole CA 1997). Die vierte Zone ist der kalzifizierte Knorpel. Diese Region stellt eine Pufferzone zwischen dem unkalzifizierten Knorpel und dem subchondralen Knochen dar. Die hier vorkommenden Chondrozyten sind hypertroph und in der Lage, Kollagen X zu synthetisieren sowie die EZM zu kalzifizieren (Poole AR et al. 2001). Zwischen der

tiefen Knorpelzone und dem kalzifizierten Knorpel liegt eine Trennlinie, die als *Tidemark* zu bezeichnen ist (Lyons et al. 2006).

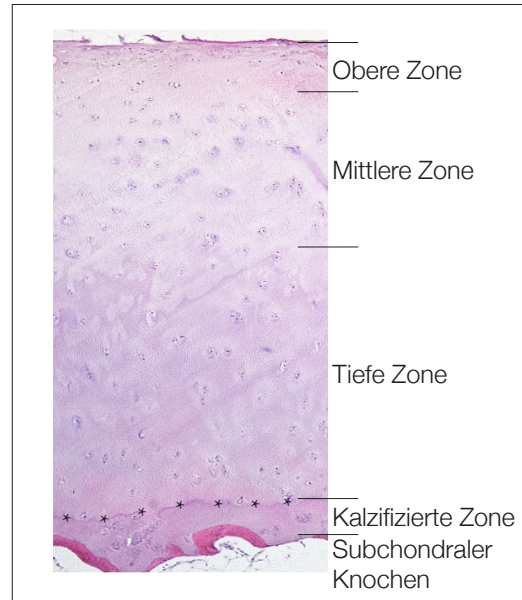


Abbildung 1: Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels. Einteilung in obere, mittlere, tiefe und kalzifizierte Zone sowie angrenzenden subchondralen Knochen. **Tidemark* als Grenzlinie zwischen nichtkalzifiziertem und kalzifiziertem Knorpel. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. 40-fache Vergrößerung.

1.2.2 Mikroskopische Knorpelveränderungen bei Osteoarthrose

Als Antwort auf mechanischen Stress, den Einfluss von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren kommt es im progressiven Verlauf der OA zu degenerativen Veränderungen im Gelenkknorpel. Zum einen sinkt der Proteoglykangehalt der Matrix, welches am stärksten ausgeprägt im oberen Knorpelabschnitt sichtbar wird (Goldring MB und Marcu 2009). Zum anderen ist auf zellulärer Ebene eine erhöhte Zellproliferation ein frühes Zeichen degenerativer Umwandlungen. Auf der Knorpeloberfläche sind Oberflächenunregelmäßigkeiten und im fortgeschrittenen Stadium der OA größere Rissformationen sichtbar, die sich in ihrer maximalen Ausprägung bis unterhalb der *Tidemark* erstrecken können. Kompensatorisch kann es bei ausgedehnten Schädigungen zur Bildung von pannusartigem Ersatzgewebe kommen (Söder und Aigner 2011). Ein weiteres Zeichen degenerativer Veränderungen sind sogenannte Cluster. Sie stellen Komplexe aus mehr als 20

Chondrozyten dar und scheinen das Ergebnis der vermehrten Zellproliferation zu sein. Lokalisiert in großen Lakunen, sind sie vor allem in der oberen Knorpelzone in der Nähe von Oberflächenfissuren aufzufinden (Lotz et al. 2010). Cluster weisen zudem proliferatives Potenzial sowie Eigenschaften von Progenitorzellen auf (Lotz et al. 2010; Hoshiyama et al. 2015). Daneben können im osteoarthritisch veränderten Knorpel Unterbrechungen der *Tidemark* in Verbindung mit der Einwanderung von Blutgefäßen beobachtet werden (Koelling et al. 2009).

1.2.3 Systeme zur histologischen Klassifizierung des Gelenkknorpels

Bewertungssysteme zur Beurteilung des osteoarthritisch veränderten Knorpelgewebes sollten den Fokus auf die degenerativen Merkmale legen (Rutgers et al. 2010). Collins (1949) entwickelte ein System zur makroskopischen Klassifizierung von osteoarthritisch verändertem Knorpelgewebe des Kniegelenkes. Nach Beurteilung der Knorpeloberfläche, Läsionsgröße und knöcherner Veränderungen konnte das Gewebe in einen von vier möglichen Schweregraden eingeteilt werden (Collins 1949; Pritzker et al. 2006).

Mankin et al. entwarfen 1971 ein mikroskopisches Graduierungssystem zur Bewertung von osteoarthritischen Knorpelgeweben (Mankin et al. 1971). Ursprünglich zur Beschreibung des Knorpelgewebes von osteoarthritischen Hüften entwickelt, ist das Mankin-Grading das heute am häufigsten verwendete System zur histologischen Graduierung des Knorpels aller Synovialgelenke (Pearson et al. 2011). Für die Beurteilung werden die Struktur des Knorpels, die Zellularität, der Proteoglykangehalt anhand der Intensität der Safranin O-Färbung sowie die Integrität der *Tidemark* erfasst. Durch Addition der einzelnen Kategorien kann je nach Schweregrad eine Punktzahl von 0 (normal) bis 14 (schwere OA) erreicht werden (Mankin et al. 1971; Rutgers et al. 2010). Die Ergebnisse des Mankin-Systems korrelieren dabei mit der makroskopischen Bewertung sowie mit biochemischen Parametern (Ostergaard et al. 1999; Moojen et al. 2002; Rutgers et al. 2010).

Mit dem Ziel, eine noch effektivere Methode für die klinische und experimentelle Beurteilung der OA zu entwerfen, entwickelte eine Arbeitsgruppe der OARSI 1998 das

Osteoarthritis Cartilage Histopathology (OACH)-Bewertungssystem (Pritzker et al. 2006; Rutgers et al. 2010). Der OACH-Punktwert setzt sich aus der histopathologischen Bewertung des Stadiums sowie des Grades der OA zusammen. Dabei basiert die Beurteilung des Grades auf der vertikalen Ausprägung osteoarthritischer Läsionen von der Knorpeloberfläche bis zum subchondralen Knochen. Möglich ist eine Einteilung in Grad 0 bis Grad 6. Der Grad 0 beschreibt einen intakten Knorpel, der Grad 6 hingegen stellt den größtmöglichen Schädigungsgrad des Knorpels dar, der mit einer Knochendeformierung einhergeht. Die Einteilung in eines von vier Stadien erfolgt auf Grundlage der Ausdehnung der in die OA involvierten Oberflächen und Regionen. Das Stadium 0 beschreibt dabei einen normalen Zustand, Stadium 4 hingegen stellt ein Vorliegen degenerativer Veränderungen in über 50% der Knorpelbereiche dar (Pritzker et al. 2006; Pauli et al. 2012).

1.3 Meniskus

1.3.1 Anatomie des Meniskus

Die Menisken stellen zwei sichelförmige fibrocartilaginöse Gewebsstrukturen dar, die innerhalb des Kniegelenks zwischen dem Tibiaplateau und den Femurkondylen gelegen sind. Das humane Kniegelenk besitzt einen lateralen Meniskus (LM) und einen medialen Meniskus (MM). Jeder Meniskus besteht aus einem Meniskuskörper sowie einem Vorder- und Hinterhorn. Im Querschnitt sind beide keilförmig und über ihren konvexen peripheren Rand an die Gelenkkapsel sowie durch Bänder an die Tibia befestigt. Ihre proximale, dem Femur zugewandte Seite ist konkav, wohingegen sie an ihrer Unterseite flach dem Tibiaplateau anliegen. In der Aufsicht ist der MM als C-förmig, der LM als stark gebogen zu beschreiben (Verdonk et al. 2013). Mit ihrer spezifischen Form gleichen sie die Inkongruenz der Gelenkflächen zwischen dem planen Tibiaplateau und den walzenförmigen Kondylen des Femurs aus. Zudem erhöhen sie die Stabilität des Kniegelenks, verteilen axiale Lasten und absorbieren aufkommende Stöße (Sweigart und Athanasiou 2001).

In Bezug auf sein Feuchtgewicht ist der Meniskus mit einem Wasseranteil von 72 % stark hydratisiert. Die übrigen 28 % des Gewebes bestehen aus organischen Substanzen, vor allem EZM und Zellen. Kollagen macht den Hauptanteil der organischen Bestandteile aus (75 %), gefolgt von Glykosaminoglykanen (17 %), Desoxyribonukleinsäure (DNS, 2 %), Adhäsionsglykoproteinen (< 1 %) und Elastin (< 1 %) (Herwig et al. 1984; Makris et al. 2011). Als Kollagen ist in der EZM vor allem Kollagen I vorzufinden, aber auch Kollagen II, III und IV können im Meniskusgewebe nachgewiesen werden (Eyre DR und Wu 1983). Die Anordnung der Kollagenfasern folgt der Funktion des Gewebes. Dabei ist die Oberfläche des Meniskus von einem Netzwerk dünner Fibrillen überzogen. Darunter folgt eine Schicht lamellenartig angeordneter Kollagenbündel, die sich in ihrem Verlauf unter verschiedenen Winkeln kreuzen. Zentral im Inneren des Meniskus kommt der Hauptanteil der Kollagenfibrillen vor. Diese verlaufen in dieser Region sowie in der äußeren Zirkumferenz zirkulär. In der oberflächlichen Schicht und der inneren Zirkumferenz liegt Faserknorpel vor. Straffes sehnartiges Bindegewebe macht die äußere Zirkumferenz des Meniskus aus (Petersen und Tillmann 1999).

Es können im Meniskus drei verschiedene Zelltypen unterschieden werden: Fibroblasten-ähnliche Zellen, Fibrochondrozyten und Zellen der superfizialen Zone (siehe Abbildung 2). Zellen der äußeren Zone sind oval bis spindelförmig und besitzen lange Ausläufer, die ihnen die Kommunikation mit anderen Zellen oder der EZM ermöglichen. Sie werden deshalb auch Fibroblasten-ähnliche Zellen genannt. Die innere Region des Gewebes weist runde Zellen auf, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Knorpelzellen als Fibrochondrozyten bezeichnet werden. Sie synthetisieren hauptsächlich Kollagen I sowie in kleineren Mengen auch Kollagen II und Aggrecan. Die dritte Zellpopulation ist in der superfizialen Zone zu finden. Sie ist durch ein flaches, spindelförmiges Aussehen charakterisiert, besitzt aber, anders als die Fibroblasten-ähnlichen Zellen, keine Ausläufer (McDevitt et al. 2002).

Die Blutversorgung sowie nervale Innervation weist innerhalb des Meniskus regionale Unterschiede auf. Noch zur Geburt vollständig vaskularisiert, ist im Laufe der Entwicklung im zweiten Lebensjahrzehnt nur noch die dritte, äußere Zone des Meniskus vaskularisiert (Petersen und Tillmann 1995). Diese peripheren 10-25 % werden über

die Äste der medialen, mittleren und lateralen Kniearterie versorgt, welche aus der Arteria poplitea entstammen (Arnoczky und Warren 1982). Die übrigen Bereiche des Meniskus werden durch Diffusion über die Synovialflüssigkeit ernährt (Fox et al. 2012). Die unterschiedliche Vaskularisierung des Meniskusgewebes hat Auswirkungen auf die Heilung von Meniskusverletzungen (Danzig et al. 1983). Dabei zeigen periphere Meniskusläsionen aufgrund ihrer guten Blutversorgung über das straffe Bindegewebe ein vergleichsweise gutes Heilungsverhalten (Petersen und Tillmann 1999).

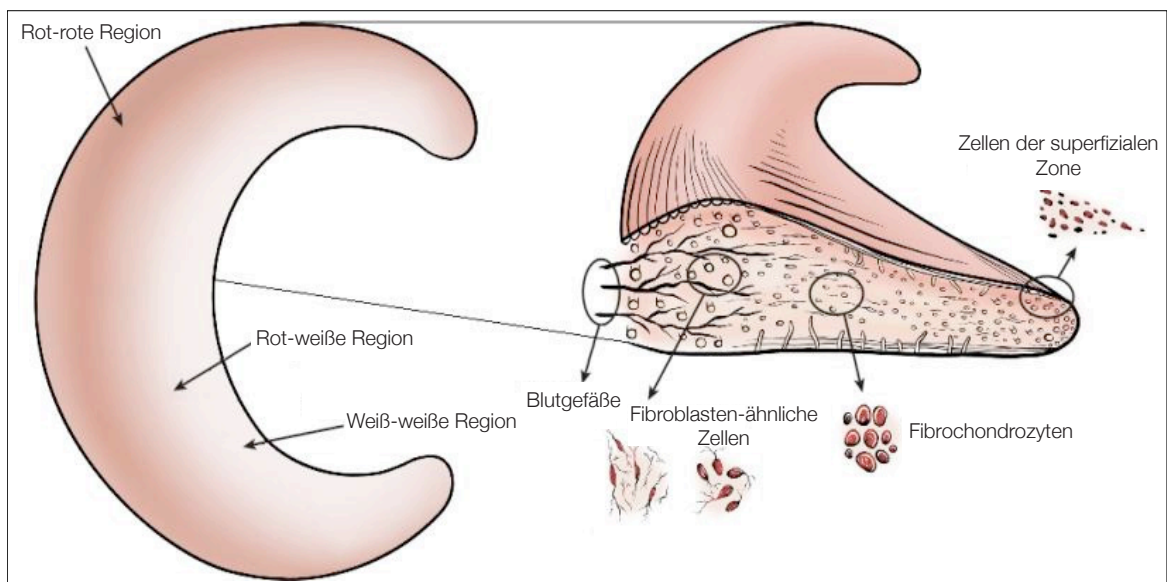


Abbildung 2: Regionale Unterschiede der Vaskularisation und Zelltypen des Meniskus. Die Abbildung ist modifiziert nach Makris et al. 2011, S. 7413. Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch den Elsevier-Verlag.

Das perimeniskale Gewebe ist stark innerviert, einzelne Axone ziehen von hier in die periphere Zone des Meniskus sowie zum Vorder- und Hinterhorn. Die inneren zwei Drittel sind nervenfrei (Day et al. 1985; Zimny et al. 1988). Die Existenz von Mechanorezeptoren wie Ruffini-Körperchen und Pacini-Körperchen sowie freien Nervenendigungen im perimeniskalen Bereich lassen vermuten, dass die Menisken maßgeblich an der Propriozeption des Kniegelenks beteiligt sind (Jerosch et al. 1996).

Zusammenfassend kann der Meniskus in Bezug auf die Vaskularisation und Innervation, wie in Abbildung 2 zu sehen, in drei Zonen eingeteilt werden. Die äußere rot-rote Zone ist vaskularisiert und nerval innerviert, die innere weiß-weiße Zone enthält keine Blutgefäße und ist aneural. Dazwischen liegt die rot-weiße Zone, die Bestandteile der anderen zwei Bereiche enthält (Makris et al. 2011).

1.3.2 Degeneration des Meniskus bei Osteoarthrose

In Studien konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Meniskusdegeneration und der OA aufgezeigt werden. Auf der einen Seite sind in OA-befallenen Kniegelenken nahezu keine makroskopisch und mikroskopisch normal erscheinenden Menisken vorzufinden (Englund et al. 2009). Auf der anderen Seite ist eine Meniskusläsion ein potenzieller Risikofaktor für die Entstehung einer OA. Die Degeneration im Meniskus beginnt innerhalb des Gewebes, während die Oberfläche intakt verbleibt. Dies stellt einen direkten Kontrast zum Gelenkknorpel dar, bei welchem sich der Prozess von der Oberfläche in das Innere fortsetzt (Pauli et al. 2011). Charakteristisch sind Veränderungen der EZM. Dabei kommt es zu einer Desorganisation und einem Verlust von Kollagen vor allem in den mittleren und tiefen Zonen. Im Kontrast dazu steigt in diesen Regionen der Proteoglykangehalt an (Sun et al. 2012). Auch unter diesem Aspekt unterscheidet sich die Degeneration der EZM des Meniskusgewebes von der des Knorpelgewebes, wo es zu einem Absinken des Gehaltes an Proteoglykanen kommt. Des Weiteren wird im Laufe des Lebens eine zunehmende Fetteinlagerung im Meniskus sichtbar. Diese „fettige Degeneration“ ist ein physiologischer Vorgang, welcher bei stärkerer Ausprägungen jedoch ein Anzeichen einer Meniskopathie darstellen kann (Fisseler-Eckhoff und Müller 2011). Ähnlich wie im Knorpelgewebe ist auch im Meniskusgewebe das Auftreten von Clustern ein Anzeichen degenerativer Veränderungen (Hellio Le Graverand et al. 2001). Darüber hinaus weisen Menisken von osteoarthritischen Kniegelenken häufig Risse sowie Mazerationen auf. So zeigten Bhattacharyya et al. (2003) in einer klinischen Studie, dass bei 91 % der Patienten mit einer symptomatischen Gonarthrose Meniskusrisse zu finden sind. Außerdem sind aufgrund einer vermehrten Produktion von Calciummineralien durch Meniskuszellen im degenerativen Menisken oft Kalzifikationen vorzufinden. Dies stellt einen

pathologischen Vorgang dar, der prädisponierend für Schäden am Gelenkknorpel sein kann (Sun et al. 2010). Folglich können sich pathologisch veränderte Gelenkknorpel und Menisken gegenseitig negativ beeinflussen. In einer MRT-Studie demonstrierten Arno et al. (2016) den Zusammenhang zwischen dem Verlust der Meniskusintegrität, insbesondere in Form einer Degeneration innerhalb des Gewebes, mit einem höheren Risiko für eine Gelenkknorpeldegeneration. Auch Ashraf et al. (2010) beschrieben in einer Studie die Korrelation zwischen Knorpelschäden und Meniskusdegeneration. So sind Schäden des tibiofemorale Gelenkknorpels assoziiert mit einer veränderten Matrixstruktur sowie einer höheren Dichte an Blutgefäßen und sensorischen Nerven im Meniskusgewebe. Ashraf et al. nahmen an, dass diese Prozesse zu Knieschmerzen bei Gonarthrosepatienten beitragen können (Ashraf et al. 2010).

1.3.3 Systeme zur histologischen Klassifizierung des Meniskus

Zur histologischen Graduierung osteoarthritisch veränderten Meniskusgewebes existieren zur Zeit keine etablierten Bewertungssysteme, wie sie für das Knorpelgewebe bekannt sind.

Krenn et al. (2010) entwickelten einen „Degenerations-Score des Faserknorpelgewebes“, in dem die Zellularität sowie Matrixveränderungen als Bewertungskriterien zur histologischen Beurteilung degenerierter Menisken herangezogen wurden. Auf Grundlage von Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen kann eine Einteilung der Meniskusschnitte in eine leichte, mäßige oder schwere Degeneration erfolgen (ebenda).

Mit dem Ziel, ein verbessertes und standardisiertes Protokoll zur Analyse des Meniskus zu entwerfen, entwickelten Pauli et. al 2011 ein weiteres makroskopisches und mikroskopisches Grading-System. Für die histologische Beurteilung wurden mit HE und Safranin O gefärbte Meniskusschnitte nach der Beschaffenheit der Geweboberfläche, der Zellularität, der Matrix- und Kollagenorganisation sowie der Intensität der Safranin O-Färbung bewertet und in den entsprechenden Erkrankungsgrad eingeteilt. Die Unterscheidung in der Studie erfolgte in normales Gewebe, leichte Degeneration, moderate Degeneration und stärkste Degeneration (ebenda).

1.4 TGF- β -Signalweg

1.4.1 Grundlagen

TGF- β ist eine Superfamilie multifunktionaler Proteine, welche zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Bildung der EZM sowie Apoptose regulieren. Viele von ihnen erfüllen bedeutende Funktionen während der embryonalen Entwicklung. Im adulten Organismus spielen sie eine essenzielle Rolle bei der Modulation des Immunsystems sowie bei der Reparatur von Gewebedefekten (Heldin et al. 1997). Dabei umfasst die TGF- β -Superfamilie verschiedene Subfamilien, unter anderem die TGF- β -Familie, die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und die Aktivine. Als Liganden binden diese Proteine an Rezeptoren mit Serin-/Threoninkinaseaktivität. Diese Rezeptoren bestehen aus zwei verschiedenen Transmembranproteinen, dem Typ I- und Typ II-Rezeptor. Durch Bindung eines Liganden assoziieren der Typ I- und Typ II-Rezeptor zu einem heterodimeren Komplex, was zu einer Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor an der GS-Box führt (Wrana et al. 1994; Attisano und Wrana 2002). Dies wiederum aktiviert die Rezeptor I Kinase, welche SMAD-Proteine phosphorylieren und aktivieren kann. Aktuell sind sieben verschiedene Typ I-Rezeptoren und vier verschiedene Typ II-Rezeptoren bekannt (ten Dijke et al. 1994a, b; Goumans und Mummery 2000). Die jeweiligen Proteine der TGF- β -Superfamilie binden oft an mehr als eine spezifische Typ I und Typ II Rezeptorkombination, wodurch der für den Liganden spezifische nachgeschaltete Signalweg über SMAD-Proteine induziert wird (Goumans und Mummery 2000).

SMAD-Proteine sind intrazelluläre Mediatoren. Der Begriff SMAD leitet sich ab von dem *Drosophila*-Gen MAD (*mothers against decapentaplegic*) und den drei MAD-Homologen, welche in *Caenorhabditis elegans* entdeckt und als Sma (*small body size*) bezeichnet wurden (Massagué 1998; Savage et al. 1996; Sekelsky et al. 1995). Gegenwärtig konnten bei Säugetieren acht verschiedene SMAD-Proteine identifiziert werden, welche hinsichtlich ihrer Struktur und Funktion in drei Klassen einzuteilen sind: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 sowie SMAD8 sind Rezeptor-regulierte SMADs (R-SMADs), SMAD4 ein Co-Mediator SMAD (Co-SMAD) und SMAD6 sowie

SMAD7 inhibitorische SMADs (I-SMADs) (Goumans und Mummery 2000, Heldin et al. 1997). R-SMADs und SMAD4 besitzen an ihrem N-terminalen Ende eine *mad homology* (MH)1-Domäne und an ihrem C-terminalen Ende eine MH2-Domäne, welche über eine prolinreiche Linkersequenz miteinander verbunden sind (Heldin et al. 1997). Die genaue Funktion dieser Sequenz scheint noch nicht vollständig verstanden, jedoch zeigten Zhu et al. (1999) in einer Studie, dass die Linkersequenz von R-SMADs eine PPXY-Sequenz („PY“-Motiv) aufweist, an die SMURF-Proteine binden können. Die gleiche Sequenz weisen auch die I-SMADs SMAD6 und SMAD7 auf (Ebisawa et al. 2001). Die MH1-Domäne bindet sequenzspezifisch an die DNS und kann die Funktion der MH2-Domäne negativ regulieren. Die MH2-Domäne hingegen ermöglicht Rezeptorinteraktionen, die Assoziation mit anderen SMAD-Proteinen, DNS-bindenden Co-Faktoren sowie mit transkriptionellen Coaktivatoren und Repressoren (Massagué 1998). Nur R-SMADs können über den Typ I-Rezeptor aktiviert werden. Sie weisen hierfür charakteristisch an ihrem C-terminalen Ende eine SSXS-Sequenz auf, an welcher sie durch den aktivierten Typ I-Rezeptor phosphoryliert werden können. Phosphorylierte R-SMADs oligomerisieren mit SMAD4 und bilden einen heterooligomeren Komplex, welcher im Zellkern die Transkription der Zielgene ligandenspezifisch reguliert (ten Dijke et al. 2000). Typ I-Rezeptoren für Aktivin und TGF- β werden durch die R-SMADs SMAD2 und SMAD3 erkannt, Typ I-Rezeptoren für BMP durch SMAD1, SMAD5 sowie SMAD8 (Massagué und Chen 2000). I-SMADs besitzen nur eine MH2-Domäne und gelten als Inhibitoren des Signalweges. Induziert werden sie durch TGF- β -Liganden gemäß einer negativen Rückkopplung (Inoue und Imamura 2008). Sie interagieren mit dem aktivierten Typ I-Rezeptor im Sinne einer kompetitiven Hemmung. Zudem konkurrieren sie mit R-SMADs um die Bindungsstelle und reduzieren somit die Phosphorylierung von R-SMADs. SMAD6 verhindert zudem durch Bindung an SMAD1 die Komplexbildung zwischen SMAD1 und SMAD4, wodurch SMAD6 bevorzugt einen Inhibitor des BMP-Signalweges darstellt (Hata et al. 1998). SMAD7 interagiert mit durch TGF- β und BMP-aktivierten Typ I-Rezeptoren (Souchelnytskyi et al. 1998). Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung über den Signalweg der TGF- β -Familie.

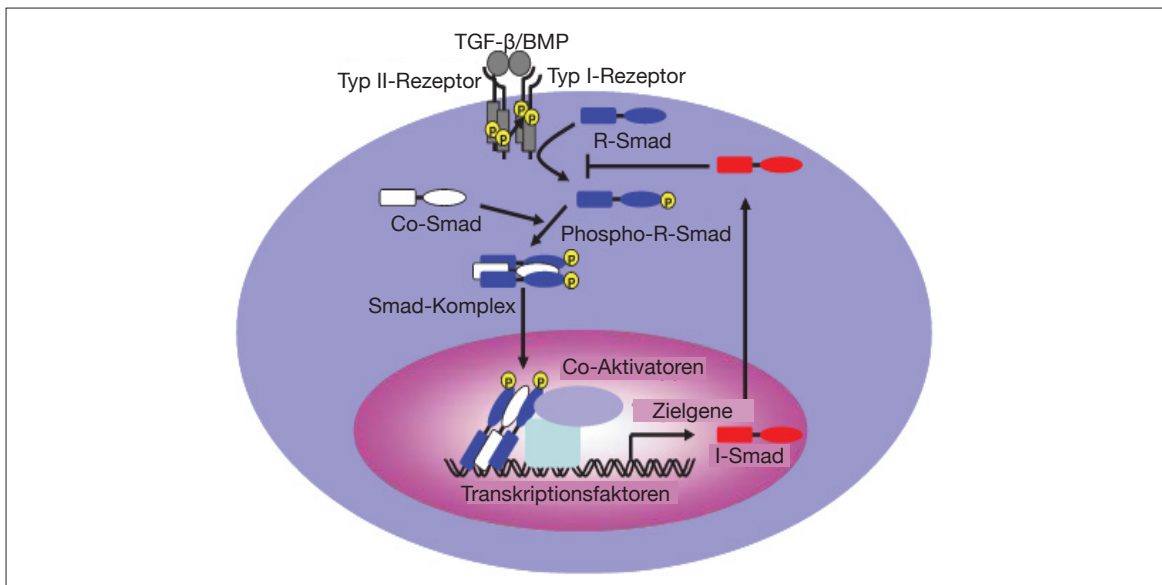


Abbildung 3: Schematische Abbildung des Signalweges der TGF- β -Familie. Die Bindung eines Liganden der TGF- β -Familie induziert die Assoziation des Typ I- und Typ II-Rezeptors zu einem heterodimeren Komplex. Der Typ II-Rezeptor phosphoryliert den Typ I-Rezeptor, wodurch die aktivierte Rezeptor I-Kinase R-SMAD phosphorylieren kann. Aktivierte R-SMADs formen Komplexe mit Co-SMAD und wandern in den Zellkern. Dort binden sie an Transkriptionsfaktoren. I-SMADs agieren im Sinne einer negativen Rückkopplung durch Inhibition der Signalkaskade. Modifiziert nach Inoue und Imamura 2008, S. 2108. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch John Wiley & Sons.

1.4.2 Regulation des TGF- β -Signalweges durch SMURF1 und SMURF2

Weiterhin ist der TGF- β -Signalweg über den selektiven Abbau von SMAD-Proteinen über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg reguliert. Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt einen wesentlichen Weg zur gezielten Degradation von Proteinen dar und wird durch eine Kaskade von Enzymen katalysiert. Für den Signalweg der TGF- β -Familie spielen die SMURF-Proteine als E3 Ubiquitin-Ligasen eine entscheidende Rolle in der Erkennung und dem anschließendem Abbau von SMAD-Signalmolekülen durch das 26s Proteasom (Laney und Hochstrasser 1999). Zwei strukturell miteinander verwandte SMURF-Proteine konnten bislang identifiziert werden: SMURF1 und SMURF2. Beide sind in die Klasse der Ubiquitin-Ligasen vom HECT (*homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)-Domänentyp einzuordnen. Sie besitzen für die Memb-

ranbindung an ihrem N-terminalem Ende eine C2-Domäne. In der Mitte sind zwei bis drei WW-Domänen vorzufinden, welche nach dem Vorhandensein der Aminosäure Tryptophan benannt sind. Diese Domäne ermöglicht die Protein-Protein-Interaktion durch Bindung an das „PY“-Motiv innerhalb der Linkerregion anderer Moleküle. Am C-terminalen Ende liegt die HECT-Domäne, welche die Ubiquitin-Ligation an den Zielgenen katalysiert (Zhu et al. 1999; Kavsak et al. 2000).

SMURF1 kommt sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vor. Die Verteilung im Zytoplasma ist durch eine Signalsequenz im Carboxyl-Terminus möglich, die SMURF1 zu einem Export aus dem Zellkern befähigt (Tajima et al. 2003). Durch Ubiquitinierung von SMAD1 und SMAD5 reguliert SMURF1 den BMP-Signalweg auf eine negative Weise (Ying et al. 2003; Sapkota et al. 2007). Des Weiteren reguliert SMURF1 in einem Komplex mit SMAD6 die Ubiquitinierung des knochenspezifischen Transkriptionsfaktors *runt-related transcription factor 2* (RUNX2) und bietet somit einen negativen Regulationsmechanismus für den BMP-SMAD-RUNX2-Signalweg (Shen et al. 2006).

SMURF2 ist hauptsächlich ein Kernprotein, kann jedoch mit SMAD7 einen Komplex bilden und so in das Zytoplasma exportiert werden (Kavsak et al. 2000). Es degradiert SMAD1 und SMAD2 für den proteasomalen Abbau, allerdings mit einer Präferenz für SMAD2. Obwohl SMAD3 strukturell eng mit SMAD2 verwandt ist, zeigt SMURF2 auf SMAD3 keine Wirkung (Lin et al. 2000).

Darüber hinaus fördern SMURF1 und SMURF2 die inhibitorische Wirkung der I-SMADs. Sie sind in der Lage, mit SMAD7 einen Komplex zu bilden und so den nuklearen Export von SMAD7 zu induzieren. Dadurch kann der SMURF-SMAD7-Komplex in effektiver Interaktion mit dem TGF- β -Typ I-Rezeptor in der Plasmamembran treten und so dessen Degradierung herbeiführen, was indirekt in einer Hemmung der Aktivierung von R-SMADs resultiert (Kavsak et al. 2000; Ebisawa et al. 2001). Die SMURFs bewirken auf diese Weise eine negative Regulation der TGF- β -Superfamilie. Neben der Degradation anderer Substrate können E3 Ubiquitin-Ligasen ihren eigenen Abbau katalysieren. Wiesner et al. (2007) demonstrierten, dass durch intramolekulare Interaktion zwischen der C2- und der HECT-Domäne von SMURF2 dessen

Aktivität inhibiert sowie das Niveau von SMURF2 innerhalb der Zelle stabilisiert wird. Weiterhin spielen SMAD2 und SMAD7 eine bedeutende Rolle in der Regulation von SMURF2. SMAD7 kann durch sein N-terminales Ende die katalytische Funktion der SMURF2 HECT-Domäne über die Verankerung eines Ubiquitin konjugierenden Enzyms E2 regulieren (Ogunjimi et al. 2005). In Anwesenheit eines TGF- β -Signals kann SMAD2 hingegen einen Komplex mit SMURF2 bilden, in welchem SMURF2 die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von SnoN, einem transkriptionellen Corepressor des TGF- β -Signalweges, vermittelt (Bonni et al. 2001).

SMURF-Proteine scheinen außerdem einen regulativen Einfluss auf die Zelladhäsion und Migration zu haben. So konnte in Studien gezeigt werden, dass SMURF1 den *ras homolog family member A* sowie SMURF2 das *ras-related protein 1B* ubiquitiniert, zwei Moleküle, die für diese Vorgänge eine entscheidende Rolle spielen (Wang H-R et al. 2003; Schwamborn et al. 2007; Huang C 2010).

1.4.3 TGF- β -Signalweg im osteoarthritisch veränderten Knorpel- und Meniskusgewebe

Im gesunden Knorpel- und Meniskusgewebe herrscht eine Balance aus anabolen und katabolen Vorgängen, welche die strukturelle sowie funktionelle Integrität der EZM aufrechterhält. Durch die OA kommt es jedoch zu einer Störung in der Regulation dieses Gleichgewichts, was in einem Verlust von Matrixkomponenten sowie in einer Verschlechterung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Gewebes resultiert (Goldring SR und Goldring MB 2004; Loeser 2017). Im initialen Stadium der OA kann in Knorpelzellen eine erhöhte Produktion von EZM und Expression von TGF- β beobachtet werden (van der Kraan et al. 1997). Dies stellt jedoch nur einen temporären Zustand dar, der die katabolen Prozesse auf längere Dauer nicht kompensieren kann. Als Mediatoren kataboler Vorgänge in der Progression der OA im Gelenkknorpel und Meniskus gelten unter anderem das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), welche die Zellen zur Produktion von

Stickstoffmonoxid, Matrix-Metalloproteinasen und Aggrecanasen anregen (Goldring SR und Goldring MB 2004; Vuolteenaho et al. 2005; McNulty et al. 2013).

He et al. (2017) untersuchten im Rahmen einer Studie die Serum-Konzentration von TGF- β 1 in von OA befallenen Kniegelenken. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation von TGF- β 1 und dem röntgenologisch bestätigten Schweregrad der OA-Erkrankung. He et al. sehen deshalb TGF- β 1 als einen potenziellen Biomarker für die Diagnose der Knie-OA (He et al. 2017).

Blaney Davidson et al. (2006) hingegen demonstrierten in einer Studie an Kniegelenken von Mäusen, dass ein Mangel von TGF- β 3 mit Knorpelschäden assoziiert ist. TGF- β 3 nimmt eine protektive Rolle ein, welche im Verlauf der OA verloren zu gehen scheint. Des Weiteren zeigten Davidson et al., dass TGF- β 3 schon früh in die Entwicklung von Osteophyten involviert ist, wohingegen sich BMP erst in der späten Phase an der Osteophyten-Entstehung beteiligt (ebenda). TGF- β scheint weiterhin eine bedeutende Funktion als Gegenspieler wichtiger kataboler Mediatoren zu erfüllen. So reduziert TGF- β die durch IL-1 induzierte Produktion von Stickstoffmonoxid in Chondrozyten (Vuolteenaho et al. 2005). Fast die Hälfte aller von IL-1 gesteuerten Gene werden durch TGF- β gegenreguliert. Andersherum sind nur knapp 15 % der von TGF- β regulierten Gene durch IL-1 betroffen (Takahashi et al. 2005).

1.5 Aufgabenstellung

Die SMURF-Proteine stellen einen wesentlichen Regulator des TGF- β -Signalweges dar. Dabei scheinen sie auch in der Pathogenese der OA eine bedeutende Rolle einzunehmen. Wu et al. (2008) zeigten in einer Studie an Mäusen, dass die Überexpression von SMURF2 spontan das Erscheinungsbild einer OA auslöst, einhergehend mit einer Verminderung des TGF- β -Signalweges sowie einer Degradation des phosphorylierten SMAD3. Der genaue Mechanismus hierfür ist bislang jedoch noch nicht abschließend verstanden.

In noch nicht veröffentlichten Arbeiten analysierten Thomas Gelis und Manuel Altherr, zwei Mitglieder der Arbeitsgruppe unter Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge, die

Funktion von SMURF1 und SMURF2 in Bezug auf die Differenzierung von chondrogenen Progenitorzellen und Meniskus-Progenitorzellen sowie deren Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 (*sex determining region Y-box 9*).

In der vorliegenden Arbeit wird osteoarthritisch erkranktes Knorpel- und Meniskusgewebe auf histologischer Ebene auf SMURF1 und SMURF2 untersucht. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der immunhistochemischen Detektion der Proteine im Knorpel und Meniskus unterschiedlicher Degenerationsgrade. Mithilfe geeigneter Klassifizierungssysteme werden die Gewebe histopathologisch bewertet und graduiert. Diese Graduierung wird vorgenommen, um mögliche Differenzen im Regenerationsverhalten der Gewebe feststellen zu können.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die Rolle der SMURF-Proteine im Pathogenese der OA besser verstehen zu können und so langfristig neue Therapieansätze in der Behandlung der OA zu finden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine vorbereitende Maßnahmen

2.1.1 Herkunft der Gewebeproben

Als Grundlage für das Vorgehen diente bereits entkalkifiziertes und in Paraffin eingebettetes Knorpel- und Meniskusgewebe. Die Gewebeproben stammten von Patienten aus dem Göttinger Krankenhaus Neu Mariahilf, denen aufgrund einer fortgeschrittenen OA im Kniegelenk eine totale Endoprothese implantiert wurde. Das Probenmaterial wurde nach Aufklärung sowie Einwilligung der Patienten der wissenschaftlichen Abteilung überlassen. Der hierfür genehmigte Ethikantrag ist unter der Aktennummer 25/12/10 einsehbar.

2.1.2 Anfertigung der histologischen Schnitte

Mithilfe eines Mikrotoms (Jung Biocut 2035, Leica, Nussloch, DE) wurden ca. 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend in ein Wasserbad (1052, GFL, Burgwedel, DE) überführt und von Objektträgern (SuperFrost® und SuperFrost Ultra Plus®, Gerhard Menzel, Braunschweig, DE) aufgenommen. Auf einer Wärmeplatte (14081, Medax, Rendsburg, DE) wurden die Schnitte ca. 1 h bei 42 °C getrocknet. Die weitere Trocknung der Objektträger erfolgte im Wärmeschrank (B 5042, Heraeus, Hanau, DE) bei 37 °C für ca. 48 h.

2.1.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Wie Tabelle 1 zeigt, wurden die Gewebeschnitte als Vorbereitung für die nachfolgenden Färbungen mithilfe von Xylol (CN 80.2, Roth, Karlsruhe, DE) entparaffiniert und mit Ethanol (Walter CMP, Kiel, DE) in absteigenden Konzentrationen rehydriert.

Tabelle 1: Ablauf der Entparaffinierung und Rehydrierung

Reihenfolge	Schritt	Behandlungsdauer
1	Xylol	2 × 10 min
2	Ethanol 100 %	5 min
3	Ethanol 90 %	5 min
4	Ethanol 80 %	5 min
5	Ethanol 70 %	5 min
6	Ethanol 60 %	5 min
7	Ethanol 50 %	5 min
8	Aqua dest.	1 min
9	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 min

2.2 Histologische Färbungen für die Lichtmikroskopie

2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Meniskusgewebe

Die HE-Färbung diente zur Übersichtsdarstellung und als Grundlage für die histologische Einteilung der Meniskus- und Knorpelschnitte nach Degenerationszeichen. HE färbt die Zellkerne blau-violett, die Knorpelmatrix pink sowie leicht bläulich in Bereichen mit einem hohem Proteoglykangehalt (Schmitz et al. 2010). Als Färbelösungen wurden eine mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) 1:4 verdünnte Hämalaunlösung nach Meyer (109249, Merck, Darmstadt, DE) und eine 0,1%ige Eosinlösung verwendet. Diese wurde durch Lösen von 0,1 g Eosin (E6003, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 100 ml Aqua dest. hergestellt. Mit einem Tropfen Eisessig (3738.2, Roth, Karlsruhe, DE) wurde die 0,1%ige Eosinlösung angesäuert. Tabelle 2 zeigt das Protokoll der HE-Färbung. Im Anschluss wurden die angefärbten und dehydrierten Gewebeschnitte wie unter Abschnitt 2.3.8 beschrieben eingedeckelt.

Tabelle 2: Protokoll der HE-Färbung

Reihenfolge	Schritt	Behandlungsdauer
1	Färbung mit Hämalaun (Verdünnung 1:4)	4 min
2	Bläuen unter fließendem Leitungswasser	15 min
3	Färbung mit angesäuerten Eosin	7 min
4	Ethanol 50 %	10 s
5	Ethanol 70 %	30 s
6	Ethanol 80 %	1 min
7	Ethanol 90 %	1 min
8	Ethanol 100 %	2 min
9	Xylol	2 × 10 min

2.2.2 Safranin O-/Fast Green-Färbung von Knorpelgewebe

Als Grundlage für die histologische Graduierung des Knorpelgewebes wurde zusätzlich eine Safranin O-Färbung (115948, Merck, Darmstadt, DE) gewählt. Safranin O ist ein kationischer Farbstoff, der sowohl Proteoglykane als auch Glykosaminoglykane anfärbt. Dabei ist die Safranin O-Anfärbbarkeit im normalen Knorpel proportional zu dem Gehalt an Proteoglykanen zu sehen (Schmitz et al. 2010). Als Gegenfärbung zur übersichtlicheren Darstellung diente Fast Green FCF certified (F7258, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als Färbelösung. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, das Protokoll der Färbung ist Tabelle 4 zu entnehmen. Anschließend wurden die angefärbten und dehydrierten Gewebeschnitte wie unter Abschnitt 2.3.8 beschrieben eingedeckelt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Safranin O- und Fast Green-Lösung

Safranin O-Lösung 1 %	
Safranin O	1 g
Aqua dest.	100 ml
Fast Green-Lösung 0,02 %	
Fast Green	0,02 g
Aqua dest.	100 ml

Tabelle 4: Protokoll der Safranin O-Färbung

Reihenfolge	Schritt	Behandlungsdauer
1	Safranin O	4 min
2	Aqua dest.	4 × 20 s
3	Fast Green	30 s
4	Essigsäure 1 %	30 s
5	Aqua dest.	10 s
6	Ethanol 50 %	10 s
7	Ethanol 70 %	30 s
8	Ethanol 90 %	1 min
9	Ethanol 100 %	2 min
10	Xylol	2 × 10 min

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Allgemeines zur Methode

Die IHC ermöglicht mithilfe von Antikörpern den spezifischen Nachweis von Proteinen. Mit einer solchen Antigen-Antikörper-Reaktion können Proteine innerhalb des Gewebes klar lokalisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte Immunmarkierung durchgeführt, die Markierung erfolgt somit nicht direkt am Primärantikörper, sondern über einen enzymgekoppelten Antikörper. Dabei bindet ein Primärantikörper an das nachzuweisende Protein, welches als Antigen zu bezeichnen ist. Der Bereich, in dem der Primärantikörper an das Antigen bindet, wird Epitop genannt. Ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper ermöglicht die Bindung eines Enzymkomplexes. Dieser ist über Polymermoleküle an alkalische Phosphatasen (AP) gekoppelt. Durch die Umsetzung eines geeigneten Substrates über eine enzymatische Reaktion, bei der Phosphat abgespalten wird, entsteht nach Zugabe eines Chromogens ein farbiger Niederschlag und ermöglicht somit den Nachweis des Antigens am Ort der Antikörperbindung (Romeis 2010).

2.3.2 Vorbehandlung des Knorpel- und Meniskusgewebes

Um eine Bindung des Primärantikörpers an das Antigen zu ermöglichen, musste das Knorpel- und Meniskusgewebe entsprechend vorbehandelt werden. Die entparaffinierten und rehydrierten Gewebeschnitte wurden für 1 min in Aqua dest. und anschließend für 3 min in TBS-T (*tris-buffered saline with Tween 20*) gewaschen. Da für die Markierung APs dienten, wurden die natürlich im Gewebe vorkommenden endogenen Phosphatasen mittels eines Universal-Blocks (71-00-61, KPL, Gaithersburg, USA) geblockt, um das Auftreten von unspezifischen Hintergrundfärbungen zu minimieren (Romeis 2010).

2.3.3 Antigendemaskierung

Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS-T erfolgte die Antigendemaskierung. Durch den Vorgang der Fixierung, Dehydrierung und das Einbetten der Gewebe können die Epitope der Antigene so verändert sein, dass der Primärantikörper diese nicht mehr erkennen kann. Mittels der Antigendemaskierung werden die Bindungsstellen von maskierenden Substanzen befreit und die Proteinstruktur durch Renaturierung und Denaturierung so verändert, dass die Epitope an der Oberfläche des Proteins für den Primärantikörper frei zugänglich sind (Romeis 2010). Die Gewebeschnitte wurden dafür im Wasserbad (Typ 1002, GFL, Burgwedel, DE) bei 70 °C für 30 min mit ProTaq_s I Antigen-Enhancer (401602092, ProTaq_s, Biocyc, Luckenwalde, DE) behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS-T wurde das Enzym Protease 24 (P8038, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur weiteren Antigendemaskierung für 110 s aufgetragen. Im Anschluss folgte ein Waschschrift mit TBS-T.

2.3.4 Blockierung unspezifischer Bindungen

Um hydrophobe Regionen sowie Stellen mit besonders vielen positiven Ladungen zu überdecken und so Hintergrundmarkierungen durch unspezifische Bindungen zu verhindern (Romeis 2010), wurden die Schnitte mit bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) inkubiert. Hierzu diente eine 1%ige BSA/TBS-Lösung, die für 10 min auf das Gewebe gegeben wurde.

2.3.5 Verwendete Primärantikörper

Nach dem Waschen der Gewebeschnitte mit TBS-T für 5 min wurden der jeweilige Antikörper (siehe Tabelle 5) aufgetragen. Zur Verdünnung und zur Verhinderung von unspezifischen Antigen-Antikörperreaktionen während der Inkubation wurde der Primärantikörper in 74 µl Emerald: Antibody Diluent (936B, Cell Marque, Rocklin, USA) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte 16 h in einer Feuchtkammer bei 4 °C inkubiert.

SMURF1 (1D7): H00057154-M01

Bei dem Antikörper der Firma Abnova handelt es sich um einen monoklonalen, in der Maus produzierten Antikörper.

SMURF2 (Y-21): sc-130878

Bei dem Antikörper der Firma Santa Biotechnology handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper, der im Kaninchen produziert wurde.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klonalität	Wirt	Reaktivität	Herkunft	Verdünnung
SMURF1	monoklonal	Maus	Mensch	Abnova, Taipeh, Taiwan	1:75
SMURF2	polyklonal	Kaninchen	Mensch, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	1:75

2.3.6 Visualisierung der Antigene

Der jeweilige Primärantikörper konnte mithilfe des HiDef Detection™ Alk Phos Mouse/Rabbit Polymer System (962D, Cell Marque, Rocklin, USA), einem über AP gekoppelten Nachweissystem, sichtbar gemacht werden. Es handelt sich um ein Zweiflaschensystem, das aus einem HiDef Detection™ Amplifier sowie einem HiDef Detection™ Alk-Phos Polymer Detector besteht. Nach einem Waschschrift mit TBS-T wurden die Gewebeschnitte für 30 min mit dem HiDef Detection™ Amplifier inkubiert, welcher den Sekundärantikörper enthielt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde der HiDef Detection™ Alk-Phos Polymer Detector aufgetragen und für weitere 20 min auf den Schnitten belassen. Dieser stellt einen Enzymkomplex dar, über den die nach dem Waschschrift mit TBS-T aufgetragene Substrat-Chromogen-Lösung Perma-Red/AP-Auto (K049 Auto, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA) reagiert. Durch

die enzymatische Umsetzung der Substrat-Chromogen-Lösung wurden die Antigenstellen rot gefärbt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 10 min in TBS-T gewaschen.

2.3.7 Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Die Gewebeschnitte wurden wie unter 2.1.3 beschrieben entparaffiniert sowie rehydriert. Im Anschluss wurde die immunhistochemische Färbung, wie aus der Tabelle 6 zu entnehmen, durchgeführt. Zu jeder immunhistochemischen Färbung wurde jeweils eine Kontrolle mitgeführt. Diese Negativkontrollen wurden gemäß dem Protokoll der Tabelle 6 behandelt, jedoch erfolgte keine Inkubation mit dem primären Antikörper. Nachfolgend sind die Zusammensetzungen der für die IHC angesetzten Lösungen aufgelistet.

Tabelle 6: Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Reihenfolge	Schritt	Behandlungsdauer
1	Waschen in Aqua dest.	1 min
2	Waschen in TBS-T	3 min
3	Zugabe von Universalblock	30 min
4	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 × 3 min
5	Antigendemaskierung mit ProTaq _s I Antigen-Enhancer bei 70 °C	30 min
6	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 × 3 min
7	Vorverdau mit Protease 24	110 s
8	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 × 3 min
9	Inkubation mit BSA/TBS	10 min
10	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	5 min
11	Inkubation mit primären Antikörper bei 4 °C	16 h
12	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 × 3 min
13	Inkubation mit HiDef Detection™ Amplifier	30 min
14	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 × 3 min
15	Inkubation mit HiDef Detection™ Alk-Phos Polymer Detector	20 min
16	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	3 × 3 min
17	Färben mit Perma Red	5 min
18	Präparate in TBS-T-Puffer waschen	10 min

TBS 10 x

24,2 g Tris 200 mM (Roth, Karlsruhe, DE)

87,6 g NaCl 1,5 M (Roth, Karlsruhe, DE)

auf 1 Liter Auffüllen mit Aqua dest.

pH auf 7,4 einstellen

1 × TBS-T

500 µl Tween 0,05 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

87,6 g NaCl 1,5 M auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

Protease 24

45 ml Aqua dest.

25 mg Protease XXIV (P8038, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

25 mg CaCl₂ (Merck, Darmstadt, DE)

5 ml 0,05 M Tris HCl (Roth, Karlsruhe, DE)

pH auf 7,6 einstellen

1%iges BSA/TBS

1 g BSA (A9647, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

100 ml TBS

ProTaq_s I Antigen-Enhancer

20 ml ProTaq_s I Antigen-Enhancer (50x)

1 Liter Aqua dest. zugeben

auf pH 6,0 einstellen

2.3.8 Gegenfärben, Dehydrieren und Eindeckeln

Nach der erfolgreichen Immunmarkierung wurden die Gewebeschnitte mit dem Farbstoff Lichtgrün, welcher vorher mit Aqua dest. 1:4 verdünnt wurde, für 3 s gegengefärbt. Lichtgrün ist ein saurer Farbstoff, der bindegewebige Anteile grün anfärbt. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung der Färbelösung.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Lichtgrün-Färbelösung

Lichtgrün	
Lichtgrün SF gelblich (861200, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	0,2 g
Eisessig	0,2 ml
Aqua dest.	100 ml

Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 s in 1%iger Essigsäure und nachfolgend in Aqua dest. gewaschen sowie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Aus Tabelle 8 ist das Protokoll der Lichtgrün-Färbung und der Dehydrierung zu entnehmen. Nach der weiteren Behandlung der Gewebeschnitte mit Xylol wurden diese mit dem Eindeckmedium Eukitt® (Eukitt® quick-hardening mounting medium, 03989, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und einem Deckglass (Cover Slips, Menzel, Braunschweig, DE) eingedeckelt.

Tabelle 8: Protokoll der Lichtgrün-Färbung und Dehydrierung

Reihenfolge	Schritt	Behandlungsdauer
1	Lichtgrün (1:4)	3 s
2	Essigsäure 1 %	30 s
3	Aqua dest.	15 s
4	Ethanol 50 %	10 s
5	Ethanol 70 %	30 s
6	Ethanol 90 %	1 min
7	Ethanol 100 %	2 min
8	Xylol	2 x 10 min

2.3.9 Auswertung der immunhistologischen Ergebnisse

Die lichtmikroskopische Auswertung der angefärbten Gewebeschnitte erfolgte mit einem Primostar Lichtmikroskop (415500-0004-000, Carl Zeiss, Göttingen, DE).

2.4 Einteilung des Knorpel- und Meniskusgewebes

2.4.1 Histologische Graduierung des Knorpelgewebes

Mit dem Ziel, das Knorpelgewebe in die Kategorien normal, gering geschädigt oder schwer geschädigt einteilen zu können, wurde das histologische Graduierungssystem nach Mankin angewandt (Mankin et al. 1971). Als Grundlage dienten mit HE und Safranin O/Fast Green angefärbte Gewebeschnitte. Für die Beurteilung wurden die Struktur des Knorpels, die Zellularität, der Proteoglykangehalt anhand der Intensität der Safranin O-Färbung sowie die Integrität der *Tidemark* erfasst (Mankin et al. 1971). Tabelle 9 gibt eine Übersicht über das Gradingssystem. Bei der histologischen Auswertung der Färbungen wurde die Summe aller Punkte der jeweiligen Kategorien für jedes Präparat gebildet. Dabei konnte eine maximale Punktzahl von 14 Punkten erreicht werden. Bei einem Punktwert von 0 wurde das Präparat als normal, bei 1-4 wurde das Knorpelgewebe in die Kategorie gering geschädigt eingestuft und ab einem Wert von ≥ 5 als schwer geschädigt bewertet.

Tabelle 9: Histologisches Gradingssystem nach Mankin

Kriterium	Histologische Merkmale	Punktwert
I. Struktur	Normal	0
	Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Pannus und Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Risse bis in die Übergangszone	3
	Risse bis in die tiefe Zone	4
	Risse bis in die kalzifizierte Zone	5
	Komplette Desorganisation	6
II. Zellularität	Normal	0
	Diffuse Hyperzellularität	1
	Zellklone	2
	Hypozellularität	3
III. Proteoglykangehalt (Safranin O-Färbung)	Normal	0
	Leicht reduzierte Anfärbung	1
	Mäßig reduzierte Anfärbung	2
	Stark reduzierte Anfärbung	3
	Keine Färbung nachweisbar	4
IV. Integrität der <i>Tidemark</i>	Intakt	0
	Von Gefäßen durchzogen	1

Als Summe der Punktwerte der einzelnen Kategorien konnte eine Maximalpunktzahl von 14 erreicht werden. Erhielt das Präparat eine Punktzahl von 0, wurde es als normal eingestuft, bei einer Punktzahl von 1-4 wurde das Knorpelgewebe als gering geschädigt klassifiziert und ab einem Wert von ≥ 5 als schwer geschädigt eingestuft.

2.4.2 Histologische Graduierung des Meniskugewebes

Im Folgenden wurde der von Roth (2014) veröffentlichte Degenerationsscore zur Einteilung geschädigter Menisken weiterentwickelt. Es wurde dabei ein Bewertungssystem (siehe Tabelle 10) geschaffen, mit dessen Hilfe das Meniskugewebe in die Kategorien normal, leicht degeneriert und stark degeneriert eingeteilt werden konnte. Grundlage hierfür war eine Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte mit HE. Die Kriterien für die Beurteilung waren (1) die superfizielle Zone (vollständig erhalten oder unvollständig), (2) das Vorhandensein von Zellclustern (vorhanden oder nicht vorhanden), (3) die Zellularität (normal, diffuse Hyperzellularität oder diffuse Hypozellularität) sowie (4) Hinweise auf Verkalkungen (vorhanden oder nicht vorhanden). Für die erste und zweite Kategorie wurden jeweils 0 oder 1 Punkt verteilt. Die dritte Kategorie konnte mit 0, 1 oder 2 Punkten und die vierte Kategorie mit 0 oder 1 Punkt bewertet werden. Als Summe war ein maximaler Wert von 5 zu erreichen, welcher den Zustand der stärksten Degeneration darstellte. Erhielt der Meniskusschnitt eine Punktzahl von 0, lag normales Gewebe vor. Bei Präparaten mit höherer Punktzahl wurde der Schnitt bei einem Wert von 1-2 als leicht degeneriert bewertet, bei einem Punktwert von ≥ 3 als stark degeneriert.

Tabelle 10: Bewertungssystem zur Beurteilung des Meniskusgewebes

Kriterium	Histologische Merkmale	Punktwert
I. Superfizielle Zone	Superfizielle Zone vorhanden	0
	Superfizielle Zone nicht mehr vorhanden	1
II. Zellcluster	Zellcluster nicht vorhanden	0
	Zellcluster vorhanden	1
III. Zellularität	Normal	0
	Diffuse Hyperzellularität	1
	Diffuse Hypozellularität	2
IV. Verkalkungen	Zeichen von Verkalkungen nicht vorhanden	0
	Zeichen von Verkalkungen vorhanden	1

Als Summe der Punktwerte der einzelnen Kategorien konnte eine Maximalpunktzahl von 5 erreicht werden. Erhielt das Präparat eine Punktzahl von 0 wurde es als normal eingestuft, bei einer Punktzahl von 1-2 wurde das Meniskusgewebe als leicht degeneriert klassifiziert und bei einer Punktzahl von 3-5 als stark degeneriert bewertet.

3 Ergebnisse

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist der immunhistochemische Nachweis von SMURF1 und SMURF2 im Knorpel- und Meniskusgewebe. Im folgenden Abschnitt werden die lichtmikroskopischen Untersuchungen, die als Grundlage zur Einteilung der Präparate nach Schädigungsgrad dienen, und die immunhistochemischen Nachweisreaktionen sowie deren Ergebnisse dargestellt.

3.1 Ergebnisse im Knorpelgewebe

3.1.1 Einteilung des Knorpels nach histologischen Merkmalen

Auf Grundlage des unter Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Grading-Systems wurden die Knorpelpräparate nach Degenerationszeichen in die Kategorien normal, gering oder schwer geschädigt eingeteilt. Insgesamt wurden zehn Präparate ($n = 10$) lichtmikroskopisch untersucht, wobei vier Präparate einen Punktwert von 1-4 (Mittelwert 3,75) aufwiesen und in die Kategorie gering geschädigt eingeteilt wurden. Sechs erhielten einen Punktwert ≥ 5 (Mittelwert 7,67) und wurden deshalb als schwer geschädigt eingestuft. Keines der untersuchten Präparate erhielt eine Punktzahl < 1 , weshalb kein Knorpelschnitt als normal eingestuft werden konnte. Abbildung 4 zeigt exemplarisch einen vertikalen histologischen Schnitt von einem gering und einem schwer geschädigten Knorpel. Beide wurden mit Safranin O angefärbt. Der gering geschädigte Knorpel weist Oberflächenunregelmäßigkeiten sowie eine verminderte Safranin O-Anfärbbarkeit auf. Der schwer geschädigte Knorpel zeigt Risse bis in die Übergangszone sowie mehrere Cluster als Zeichen der Degeneration.

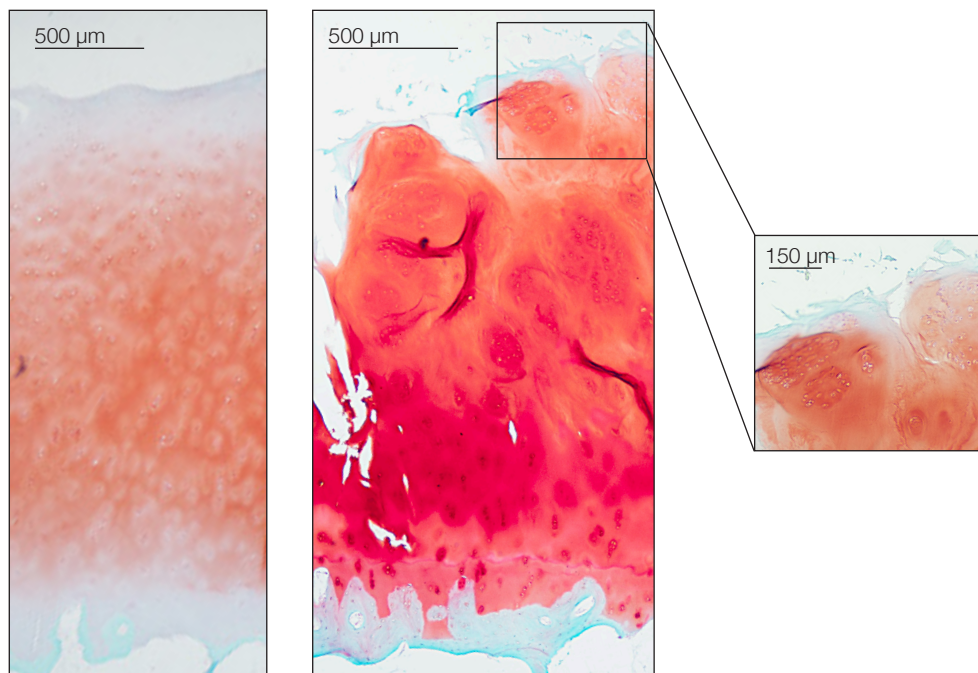


Abbildung 4: Knorpelquerschnitt eines gering geschädigten Knorpels (links) im Vergleich zu einem schwer geschädigten Knorpel (Mitte). Beide Färbungen zeigen eine verminderte beziehungsweise fehlende Safranin O-Anfärbung der oberen Zone. In der Detailaufnahme (rechts) sind Cluster zu erkennen, die vor allem in der oberen und mittleren Zone vorzufinden sind. Die Bereiche um die Zellcluster herum sind weitestgehend azellulär. Die Färbung erfolgte mit Safranin O/Fast Green. In der linken und mittigen Abbildung entspricht der Messbalken 500 µm, der Messbalken der rechten Detailaufnahme entspricht 150 µm.

3.1.2 Nachweis und Lokalisation von SMURF1

Insgesamt wurden acht verschiedene Knorpelpräparate ($n = 8$), von denen vier als gering geschädigt und vier als schwer geschädigt bewertet wurden, auf das Vorhandensein von SMURF1 untersucht. Für SMURF1 konnte im humanen Knorpelgewebe in allen untersuchten Präparaten ein intrazellulärer Nachweis erbracht werden. Die für SMURF1 positiv gefärbten Zellen sind dabei über alle Knorpelzonen verteilt (siehe Abbildung 5). Eine Ausnahme hierfür bildeten zwei der als schwer geschädigt eingeteilten Knorpelpräparate, bei denen in der mittleren und oberen Zone kein beziehungsweise nur ein schwach positiver Nachweis erfolgen konnte (siehe Abbildung 6).

Neben der Färbung des Zellkerns zeigte sich in einigen Knorpelpräparaten zudem eine schwach positive Färbung des Zytoplasmas.

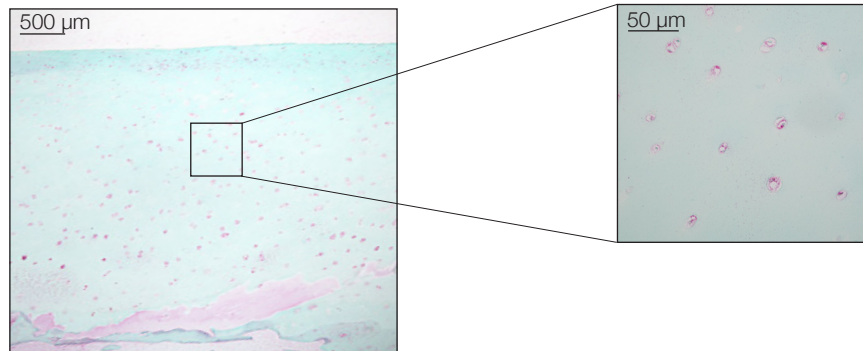


Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 im gering geschädigten Knorpel. Es zeigt sich eine Verteilung der positiv gefärbten Chondrozyten über den gesamten Knorpelschnitt. Die Detailaufnahme lässt positiv gefärbte Knorpelzellen mit Anfärbung des Nukleus und zum Teil des Zytoplasmas erkennen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Lichtgrün. In der linken Abbildung entspricht der Messbalken 500 µm, der Messbalken der rechten Detailaufnahme zeigt 50 µm an.

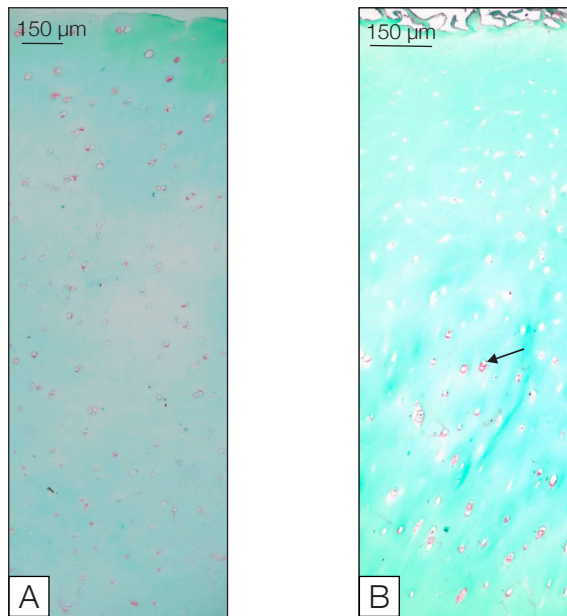


Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 im Knorpelgewebe. A) zeigt einen gering und B) einen schwer geschädigten Gelenkknorpel. Im Vergleich zu A) kann bei B) ein intrazellulärer Nachweis ab der tiefen Knorpelzone erbracht werden. (→) zeigt eine für SMURF1 positiv gefärbte Zelle mit angefärbtem Nucleus und Zytoplasma. Die Gegenfärbung erfolgte mit Lichtgrün. Die Messbalken entsprechen 150 µm.

3.1.3 Nachweis und Lokalisation von SMURF2

Neun Knorpelpräparate (n = 9) wurden auf das Vorhandensein von SMURF2 untersucht, wobei vier als gering geschädigt und fünf als schwer geschädigt beurteilt wurden. In allen untersuchten Knorpelschnitten konnte ein positiver intrazellulärer Nachweis erbracht werden (siehe Abbildung 7). Dabei lässt die Reaktion des Antikörpers keine regionalen Unterschiede erkennen, nur bei zwei als schwer geschädigt eingestuftem Knorpelpräparaten zeigte sich in der oberen und mittleren Zone lediglich ein schwach positiver Nachweis.

Abbildung 8 zeigt die intrazelluläre Lokalisation von SMURF1 und SMURF2. Im Allgemeinen lässt sich zwischen gering geschädigtem und schwer geschädigtem Knorpelgewebe kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktion mit den SMURF-Proteinen erkennen.

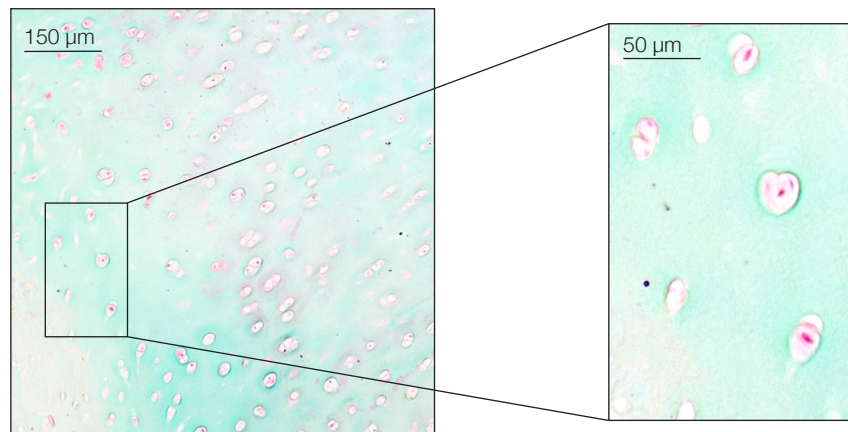


Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 im schwer geschädigten Knorpel. Die Detailaufnahme rechts lässt positiv gefärbte Knorpelzellen mit Anfärbung des Zellkerns erkennen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Lichtgrün. In der linken Abbildung entspricht der Messbalken 150 µm, der Messbalken der rechten Detailaufnahme entspricht 50 µm.

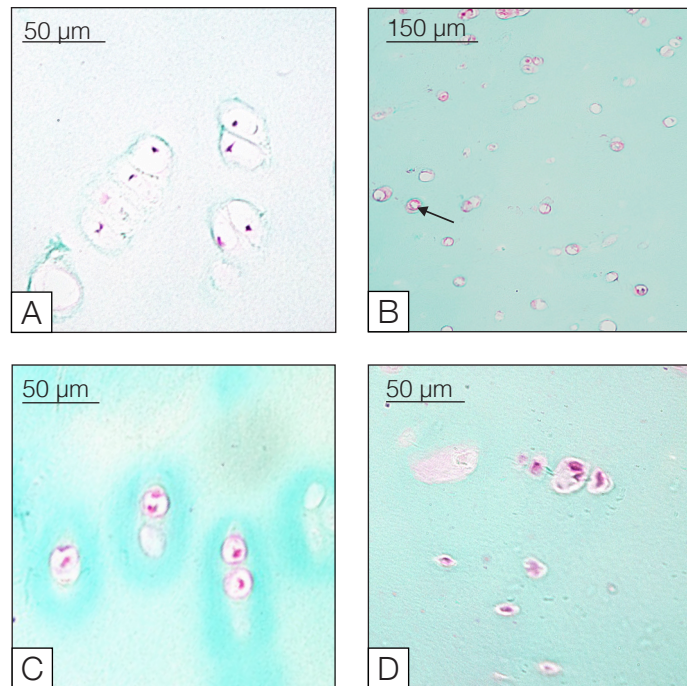


Abbildung 8: Vergleich des immunhistochemischen Nachweises von SMURF1 und SMURF2 im Knorpelgewebe. A) SMURF1 im gering geschädigten und B) schwer geschädigten Gelenkknorpel. Immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 im C) gering und D) schwer geschädigten Gelenkknorpel. Es zeigt sich bei allen vier Abbildungen eine intrazelluläre Rotfärbung des Zellkerns und zum Teil des Zytoplasmas (→). Die Gegenfärbung erfolgte mit Lichtgrün. In Abbildung A), C) und D) entspricht der Messbalken 50 µm, in Abbildung B) zeigt der Messbalken 150 µm an.

3.2 Ergebnisse im Meniskus

3.2.1 Einteilung des Meniskus nach histologischen Merkmalen

Die zu untersuchenden Präparate wurden auf Grundlage des unter 2.4.2 beschriebenen Bewertungssystems in die möglichen Kategorien normal, leicht degeneriert und stark degeneriert eingeteilt. Elf Präparate ($n = 11$) wurden lichtmikroskopisch bewertet, wobei kein Präparat eine Punktzahl < 1 aufwies. Sechs Präparate erhielten eine Punktzahl von 1-2 (Mittelwert 1,0) und wurden somit in die Kategorie leicht degeneriert eingeteilt. Fünf Präparate erhielten einen Punktwert von 3-5 (Mittelwert 4,2) und wurden in die Kategorie stark degeneriert eingeordnet. Abbildung 9 zeigt die Beurteilung der Zellularität und Abbildung 10 lässt die histologischen Merkmale degenerativ veränderter Menisken erkennen.

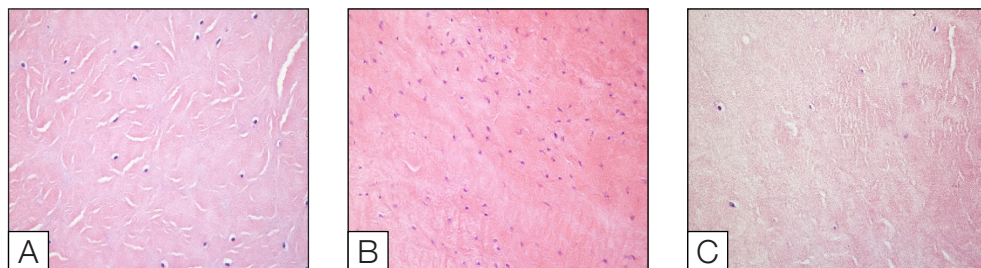


Abbildung 9: Histologische Beurteilung der Zellularität des Meniskus. A) zeigt eine normale Zellverteilung der Meniskuszellen innerhalb des Gewebes. B) lässt eine diffuse Hyperzellularität erkennen und C) zeigt eine verminderte Zellzahl, die als diffuse Hypozellularität zu bezeichnen ist. Alle drei Meniskusschnitte wurden mit HE angefärbt und sind 40-fach vergrößert.

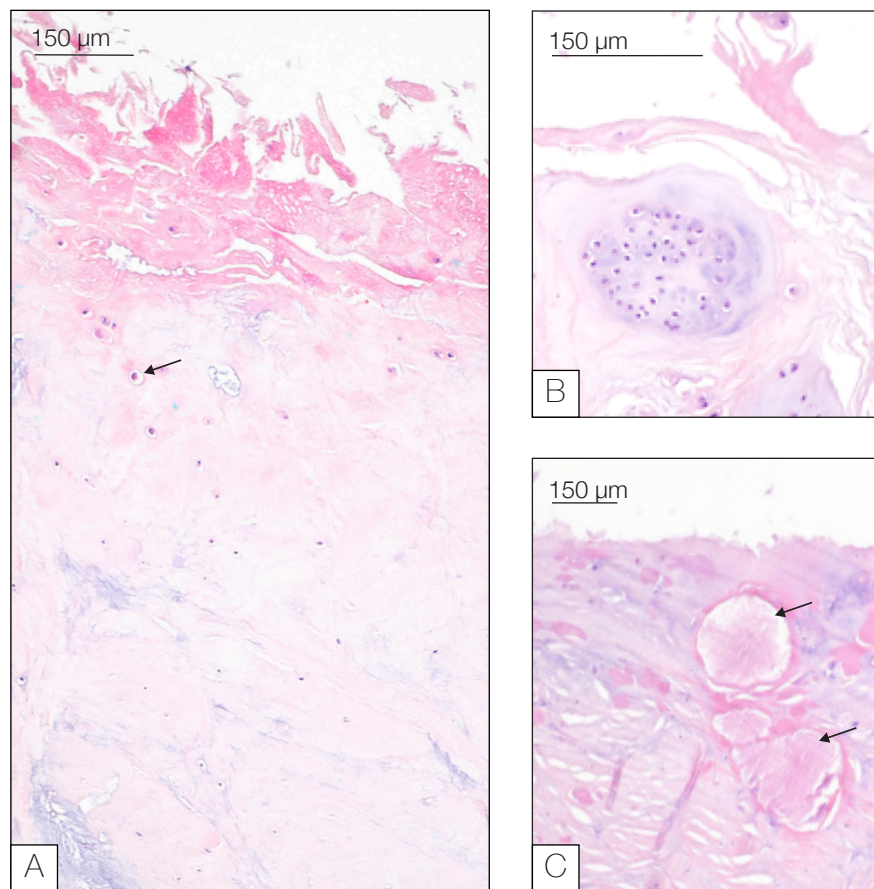


Abbildung 10: Zeichen des degenerativ veränderten Meniskus. Abbildung A) zeigt die weitgehende Zerstörung der superfizialen Zone eines stark geschädigten Meniskus. Aufgrund der fortgeschrittenen Zerstörung sind keine superfizialen Zellen mehr sichtbar. (→) zeigt einen Fibrochondrozyten. Die Abbildung B) lässt einen Zellcluster als Ansammlung von Meniskuszellen in Nähe einer zerstörten Meniskusoberfläche erkennen. Die Abbildung C) zeigt Verkalkungen (→) innerhalb des Meniskugewebes. In allen drei Abbildungen ist eine HE-Färbung zu sehen. Der Messbalken zeigt in jeder der drei Abbildungen 150 µm an.

3.2.2 Nachweis und Lokalisation von SMURF1

Für den Nachweis von SMURF1 im Gewebe wurden insgesamt sechs Menisken ($n = 6$), von denen drei als leicht degeneriert sowie drei als stark degeneriert bewertet wurden, immunhistochemisch untersucht. In allen sechs Schnitten konnte ein positiver intrazellulärer Nachweis erbracht werden (siehe Abbildung 11 und Abbildung 13). In drei der Präparate, davon in einem als leicht degeneriert eingestuft und zwei mit Zeichen starker degenerativer Veränderungen, konnte ein positiver Nachweis nur für die superfizialen Zellen beobachtet werden. Die anderen untersuchten Schnitte zeigten einen intrazellulären Nachweis in allen Regionen.

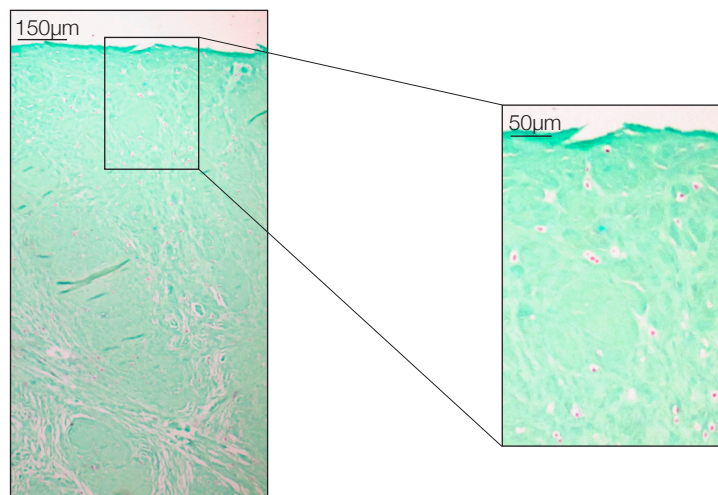


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 im leicht degenerierten Meniskus. Es zeigt sich ein intrazellulärer Nachweis. Dabei sind positiv gefärbte Zellen über den gesamten Meniskusschnitt verteilt. Als Gegenfärbung wurde Lichtgrün verwendet. In der linken Abbildung entspricht der Messbalken 150 µm, der Messbalken der rechten Detailaufnahme zeigt 50 µm an.

3.2.3 Nachweis und Lokalisation von SMURF2

Zehn Präparate (n = 10) wurden immunhistochemisch auf SMURF2 untersucht, von denen fünf als leicht degeneriert sowie fünf Präparate als stark degeneriert eingeordnet wurden. In allen Proben konnte ein positiver Nachweis für SMURF2 innerhalb der Meniskuszellen erbracht werden (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13). In fünf Proben wurde nur ein positiver Nachweis der superfizialen Zellen beobachtet. Zwei davon wurden als leicht degeneriert bewertet, drei davon wiesen starke Degenerationszeichen auf. Die anderen Präparate zeigten, wie in Abbildung 12 zu sehen, einen positiven Nachweis über alle Regionen des Meniskusgewebes. Wie die Abbildung 14 zeigt, konnte zudem ein positiver Nachweis von SMURF2 in Endothelzellen und in Myofibroblasten im Bereich von Blutgefäßen in peripheren Meniskusabschnitten beobachtet werden.

In Abbildung 13 ist der positive intrazelluläre Nachweis von SMURF1 und SMURF2 im Meniskusgewebe zu sehen. Im Allgemeinen lässt sich zwischen leicht degeneriertem und stark degeneriertem Meniskusgewebe kein signifikanter Unterschied in der Immunreaktion mit den SMURF-Proteinen erkennen.

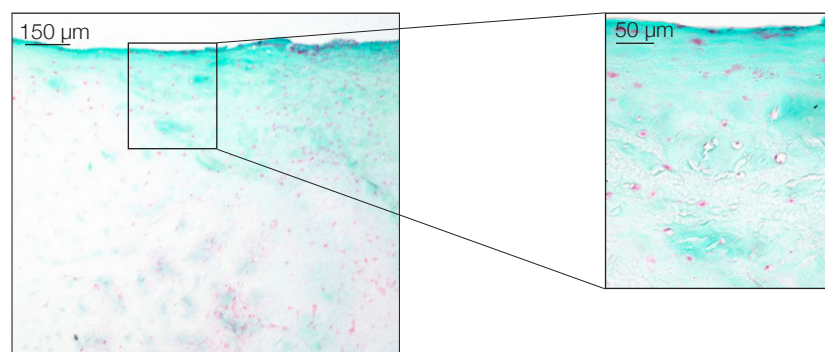


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 im stark degenerierten Meniskus. Positiv gefärbte Meniskuszellen sind über den gesamten Gewebeschnitt verteilt. Die Detailaufnahme zeigt einen positiven Nachweis für SMURF2 durch Rotfärbung der Zellkerne. Als Gegenfärbung wurde Lichtgrün verwendet. In der linken Abbildung entspricht der Messbalken 150 µm, der Messbalken der rechten Detailaufnahme zeigt 50 µm an.

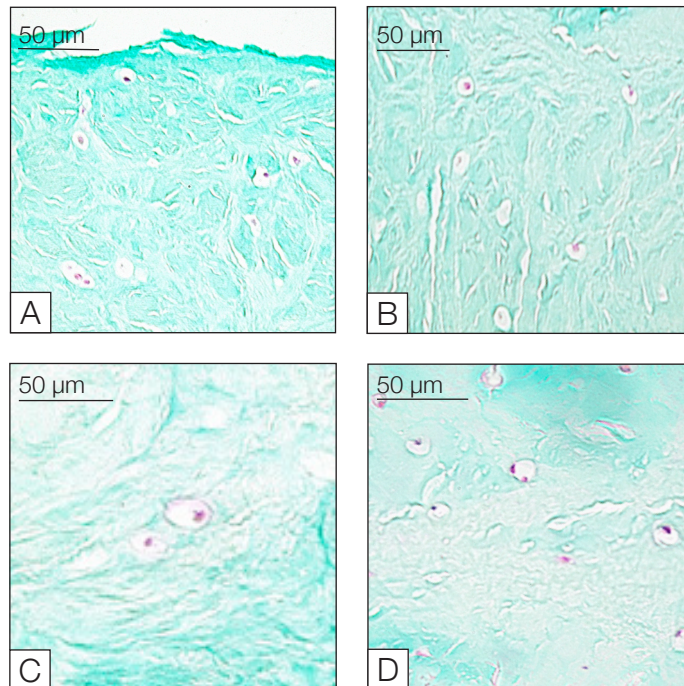


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 und SMURF2 im Meniskusgewebe. Nachweis von SMURF1 im A) leicht und im B) stark degenerierten Meniskus. Immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 C) im leicht und D) im stark degenerierten Meniskusgewebe. Wie in allen vier Abbildungen zu sehen, erfolgte für SMURF1 wie auch für SMURF2 eine positive Anfärbung durch Rotfärbung des Zellkernes. Als Gegenfärbung wurde Lichtgrün verwendet. Alle abgebildeten Messbalken entsprechen 50 µm.

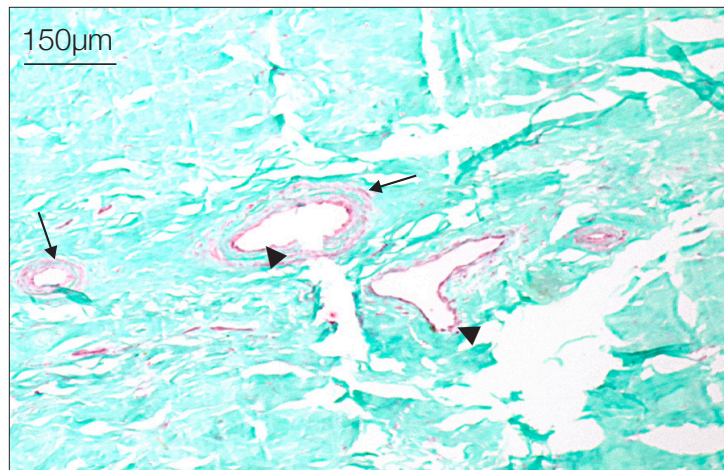


Abbildung 14: Positiver immunohistochemischer Nachweis von SMURF2 in einem Blutgefäß aus dem peripheren Bereich des Meniskus. Es zeigt sich ein positiver Nachweis durch Rotfärbung der Endothelzellen (▼) und von Myofibroblasten (→) im Bereich der Blutgefäße. Die Gegenfärbung erfolgte mit Lichtgrün. Der Messbalken zeigt 150 µm an.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der histologischen Graduierung des Knorpelgewebes

Das Knorpelgewebe wurde in der vorliegenden Arbeit auf Grundlage des Mankin-Grading-Systems histologisch bewertet (Mankin et al. 1971). Pearson et al. (2011) beurteilen das Mankin-Grading, im Vergleich zu anderen etablierten Graduierungssystemen, wie dem histologischen Klassifikationssystem der OARSI, als eine geeignete Methode zur Einteilung des Knorpelgewebes nach dem Schädigungsgrad. Auch Custers et al. (2007) kommen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass das Mankin-System eine exzellente Intra- und Interobserver-Variabilität sowie Reproduzierbarkeit aufweist. Außerdem korrelieren die Werte des Mankin-Gradings mit den makroskopischen und biochemischen Ergebnissen (ebenda). Einige Autoren hinterfragen jedoch den Einsatz dieses Gradingsystems für die klinische und experimentelle Bewertung von Knorpelgewebe. Als Kritikpunkte werden zum einem die mangelhafte Beurteilung der OA im Anfangsstadium genannt, da das Graduierungssystem basierend auf der Beurteilung von Knorpelpräparaten aus dem Endstadium der OA entwickelt wurde. Zum anderen wird das Bewertungssystem aufgrund einer fehlenden Staging-Komponente kritisiert (Pritzker et al. 2006; Waldstein et al. 2016).

In der Studie von Wu et al. (2008) wurde humanes osteoarthritisches Knorpelgewebe, welches immunhistologisch auf das Protein SMURF2 untersucht werden sollte, anhand des Mankin-Systems histologisch bewertet. Jedoch wurde in dieser Studie eine modifizierte Mankin-Skala angewendet, bei der nur die Struktur des Gewebes betrachtet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz dazu alle Bewertungskriterien des Mankin-Systems bei der histologischen Bewertung berücksichtigt. Diese sind die Struktur, die Zellularität, der Proteoglykangehalt anhand der Safranin O-Anfärbbarkeit sowie die Integrität der *Tidemark*. Alle Kriterien werden unabhängig voneinander bewertet. Diese histopathologischen Merkmale der Degeneration werden auch bei dem Klassifikationssystem der OARSI berücksichtigt, jedoch nur als assoziierte Kriterien. Die Hauptkriterien sind die Einteilung in das jeweilige Stadium

und den jeweiligen Schweregrad, die als Summe den OACH-Score ergeben (Pritzker et al. 2006; Pearson et al. 2011).

Wie unter Abschnitt 1.2.3 sowie im vorhergehenden Absatz beschrieben, ist die Bewertung Safranin O angefärbter Knorpelschnitte ein wichtiges Kriterium des Mankin-Systems. Durch die Beurteilung der Safranin O-Anfärbung kann eine semiquantitative Aussage über den Proteoglykangehalt eines Knorpelschnittes gegeben werden (Rosenberg 1971). Der Rückgang des Proteoglykangehaltes ist ein bedeutendes histologisches Merkmal der OA im Knorpel (Goldring MB und Marcu 2009), weshalb die Safranin O-Anfärbbarkeit auch in dieser Arbeit berücksichtigt wurde. Um ungewünschte Abweichungen in der Färbung zu reduzieren und eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle untersuchten Knorpelschnitte in Bezug auf die Färbelösungen und die Färbedauer gemäß dem Protokoll gleichbehandelt.

Einige Studien sehen die Safranin O-Anfärbbarkeit jedoch nicht als sensitiven Indikator für den Gehalt an Proteoglykanen und stellen die Safranin O-Anfärbbarkeit als geeignetes Kriterium für die histologische Bewertung in Frage. Camplejohn und Allard (1988) demonstrieren in ihrer Studie, dass der Proteoglykangehalt nur bei normalem Knorpel, nicht aber bei Knorpelgewebe aus dem fortgeschrittenen Stadium der OA proportional zur Anfärbung ist. Des Weiteren wird diskutiert, ob der Gehalt an Proteoglykanen durch die Fixation und Entkalkifizierung des Knorpels künstlich vermindert wird (Kiviranta et al. 1984; Ostergaard et al. 1999). Dies dürfte nur einer der Gründe sein, weshalb das Mankin-System oft nur modifiziert angewendet wird. Diese Modifikationen haben jedoch zur Folge, dass der Vergleich und die Interpretation zwischen unterschiedlichen Studien zunehmend erschwert wird (Waldstein et al. 2016). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit alle ursprünglich von Mankin genannten Kriterien für die Bewertung berücksichtigt.

4.2 Diskussion des immunhistochemischen Nachweises von SMURF1 und SMURF2 im Knorpel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 und SMURF2 im Knorpelgewebe erbracht. Um mögliche Unterschiede in der Immunreaktion der Antikörper zwischen Knorpelgewebe unterschiedlicher Schädigungsgrade zu untersuchen, wurden die Präparate nach histopathologischen Merkmalen graduiert. Aufgrund der aktuellen Studienlage war für die Proteine SMURF1 und SMURF2 ein positiver immunhistochemischer Nachweis im gering und schwer geschädigten Knorpelgewebe zu erwarten.

Zum einen schreiben Huang H et al. (2016) SMURF2 eine bedeutende regulative Funktion bei der Pathogenese der OA zu. In der Studie wurden Chondrozyten eines SMURF2-Defizit-Mausmodells und einer Wildtyp-Maus untersucht. Es sollte analysiert werden, welchen Einfluss die SMURF2-Defizienz auf die chondrogene und katabole Expression sowie auf die Proteine SMURF1 und SMURF2 besitzt. Dabei wurden die Chondrozyten mit TGF- β 3 und IL-1 β behandelt. SMURF2 stieg in der Wildtyp-Maus durch TGF- β 3 an, aber sank durch die Gabe von IL-1 β . Huang et al. beschreiben zudem einen potenziellen aber schwachen Kompensationsmechanismus durch SMURF1 in Chondrozyten der SMURF2-Defizit-Maus. Es konnte gezeigt werden, dass SMURF1 durch Zugabe von TGF- β 3 in einer SMURF2-Defizit-Maus stärker nachzuweisen ist als im Wildtyp. Welche spezifische Rolle SMURF1 in der Entstehung von OA im humanen Knorpelgewebe einnimmt, ist jedoch noch nicht abschließend verstanden.

Zum anderen untersuchten Wu et al. (2008) die Rolle von SMURF2 in der Pathogenese der OA durch immunhistologische Untersuchungen an humanem normalem und osteoarthritisch verändertem Knorpelgewebe. Die in der Studie von Wu et al. als gering und stark geschädigt bewerteten Knorpelschnitte zeigten für SMURF2 eine signifikante intrazelluläre Färbung, welche im Nukleus lokalisiert war. Im Gegensatz dazu war im als normal bewerteten Knorpel keine Immunreaktion mit SMURF2 nachweisbar.

Die Beobachtung, dass die Proteine sowohl im gering als auch im schwer geschädigten Knorpel nachgewiesen werden können, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Zu diskutieren ist, weshalb bei zwei schwer geschädigten Knorpelpräparaten kein beziehungsweise nur ein schwach positiver Nachweis in der oberen und mittleren Zone für SMURF1 und SMURF2 zu beobachten war. Eine Erklärung könnte in dem unterschiedlichen Regenerations- und Degenerationsverhalten der Chondrozyten verschiedener Knorpelzonen liegen. Zum einen reagieren Chondrozyten der superfizialen Zone empfindlicher auf Zytokine wie IL-1 als Knorpelzellen aus tieferen Gewebeschichten (Häuselmann et al. 1996). Zum anderen berichten Aigner und Dudhia (1997) von einer zonal unterschiedlichen Genexpression im osteoarthritischen Knorpel. Im Gegensatz zur tiefen Zone weist die obere Zone eine signifikant verminderte Expression für Kollagen Typ-II und Aggrecan auf, was ein Zeichen für eine reduzierte anabolische Aktivität der Chondrozyten in dieser Region darstellt. Außerdem nehmen Aigner und Dudhia an, dass die Zerstörung des Kollagennetzwerkes, die schlussendlich zu einer kompletten Zerstörung der Knorpelmatrix und -zellen führt, in der oberen Region beginnt und sich von dort in tiefere Bereiche fortsetzt (ebenda). Zellen der superfizialen und oberen Zone könnten somit im Gegensatz zur tiefen und kalzifizierten Zone auch unterschiedliche Reaktionen auf SMURF1 und SMURF2 aufzeigen. Ob es sich bei diesen Präparaten um ein mögliches Reaktionsmuster für SMURF1 und SMURF2 handelt, kann die vorliegende Arbeit nicht abschließend klären. Um die Relevanz dieser Beobachtung zu prüfen, sollten die Untersuchungen in zukünftigen Arbeiten auf eine größere Anzahl an schwer erkrankten Gewebeproben ausgeweitet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit waren Knorpelpräparate unterschiedlicher Schädigungsgrade die Grundlage für die immunhistologischen Untersuchungen. Ideal wäre ein Vergleich zwischen normalem und geschädigtem Knorpel gewesen. Hier liegen jedoch die Grenzen dieser Arbeit. Da die Proben von Patienten stammen, denen aufgrund einer fortgeschrittenen OA das Kniegelenk operativ entfernt werden musste, wies keine der untersuchten Gewebeproben einen normalen Grad auf. So existierte

keine normale Kontrollgruppe und ein Vergleich konnte nur zwischen gering und schwer geschädigtem Knorpel stattfinden.

4.3 Diskussion der histologischen Graduierung des Meniskusgewebes

Auch das Meniskusgewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit histopathologisch bewertet. Generell ist für die histopathologische Beurteilung des Meniskus die Abgrenzung altersüblicher Meniskusveränderungen von unphysiologischen degenerativen Veränderungen essenziell (Fisseler-Eckhoff und Müller 2011). Als alterstypische Veränderungen des Meniskus sind die Abnahme der Zelldichte mit dem Auftreten azellulärer Regionen sowie dem Verlust der Kollagenfaserorganisation und dem Nachweis von mukoider Degeneration zu nennen (Pauli et al. 2011). Die mukoider Degeneration innerhalb des Meniskus ist charakterisiert durch eine Degradation des Faserknorpels mit einem Anstieg der mukoiden Grundsubstanz. Dieser Prozess beginnt um die Meniskuszellen herum und setzt sich von dort aus in interstitielle Bereiche fort (Boya et al. 2004). Des Weiteren beschreiben Pauli et al. (2011) einen Anstieg der Intensität der Safranin O-Färbung mit dem Alter. Sie interpretieren diesen Anstieg als einen Wechsel von einem fibroblastischen zu einem chondrozytischen Phänotyp während des Alterns und der frühen Degeneration. Andere Autoren bringen diese Steigerung nicht mit alterstypischen, sondern direkt mit pathologischen Veränderungen in osteoarthritischen Menisken in Verbindung (Ghosh et al. 1975; McDevitt und Webber 1990; Meister et al. 2004). Meister et al. (2004) werfen die Frage auf, welche Aussagekraft diese Färbung für die histopathologische Bewertung besitzt. In ihrer Studie konnte ein signifikanter Unterschied in der Aufnahme der Safranin O-Färbung in stärker degenerierten Bereichen nicht bestätigt werden. Es steht deshalb zur Diskussion, ob die Safranin O-Färbung ein geeignetes Kriterium für die histopathologische Bewertung des Meniskus darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eine HE-Übersichtsfärbung als Grundlage für die lichtmikroskopische Beurteilung der Schnitte gewählt, da sie die relevanten Degenerationszeichen im Meniskusgewebe sicher erfasst (ebenda).

Für die pathophysiologische Bewertung wurde der Zustand der superfizialen Zone berücksichtigt. Die Degeneration des Meniskus beginnt nicht an der Oberfläche, sondern im Inneren des Gewebes. Dabei werden Fibrillierungen und Risse zuerst im Inneren sichtbar, die sich an die Oberfläche des Meniskus ausbreiten und zu einer kompletten Zerstörung oder einem Verlust des Gewebes, vor allem in der avaskulären Zone, führen können (Pauli et al. 2011). Die Tatsache, dass mit dem Altern der Meniskus trotz abnormaler Matrixorganisation eine intakte Oberfläche aufweisen kann, verdeutlicht, dass eine zerstörte Oberfläche als altersuntypisches Degenerationszeichen einen bedeutenden Stellenwert einnimmt.

Weiterhin wurden die Existenz von Zellclustern sowie die Zellularität als Bewertungskriterien hinzugezogen. Zellcluster im Meniskusgewebe gelten als histopathologisches Merkmal der OA (Lotz et al. 2010). Sie können in der Nähe der Meniskusoberfläche beobachtet werden und sind typischerweise mit Rissen beziehungsweise einer ausgefransten Oberflächenstruktur assoziiert (Pauli et al. 2011). Hellio Le Graverand et al. (2001) demonstrierten in einer Studie an Menisken von Kaninchen die Entstehung von Zellclustern infolge einer induzierten OA. Die Existenz dieser in der Literatur beschriebenen Zellcluster konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Insgesamt wiesen vier der histologisch untersuchten Meniskuspräparate solche Zellnester auf (siehe Abbildung 10). In osteoarthritischem Meniskusgewebe können außerdem große Unterschiede in der Verteilung der Zellen über das Gewebe mit hyper- und hypozellulären Bereichen sowie azellulären Regionen beobachtet werden (Pauli et al. 2011). Kwok et al. (2016) untersuchten Menisken von Mäusen histopathologisch, an denen sie operativ eine OA induziert hatten. Das Gewebe zeigte daraufhin abnormale Zellanordnungen, die durch regionale Hyper- und Hypozellularität charakterisiert waren. Diese Merkmale konnten auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Alle als leicht sowie stark degeneriert bewerteten Menisken zeigten histopathologische Veränderungen in Bezug auf die Zellularität.

Des Weiteren wurden Anzeichen von Kalzifikationen als histopathologisches Merkmal für die Graduierung berücksichtigt. Drei der als stark degeneriert bewerteten Menisken zeigten bei der lichtmikroskopischen Untersuchung Kalzifikationen, wie sie in Abbildung 10 zu sehen sind. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der Entkalkung

des Gewebes diese nicht mehr direkt, sondern nur als Residualraum der ausgewaschenen Kalzifikation sichtbar sind. Auch andere Autoren kommen zu dem Schluss, dass Kalzifizierungen des Gewebes positiv mit der Degeneration des Meniskus infolge der OA assoziiert sind (Habata et al. 2001; MacMullan und McCarthy 2010; Sun und Mauerhan 2012). Zudem fanden Sun et al. (2010) in osteoarthritisch veränderten Menisken Ablagerungen von Kalziumkristallen, jedoch nicht in normalen Menisken. Dabei waren Gene, welche in der Biomineralisation von Gewebe involviert sind, bei der OA in Menisken hochreguliert (ebenda).

4.4 Diskussion des immunhistochemischen Nachweises von SMURF1 und SMURF2 im Meniskus

Die Lokalisation der SMURF-Proteine wurde innerhalb des Meniskusgewebes mithilfe der Immunhistochemie genauer untersucht. Dabei konnte ein positiver Nachweis der Proteine im Meniskus mit leichter sowie starker Degeneration erbracht werden. Einige Gewebeproben zeigten jedoch lediglich eine Anfärbung der superfizialen Zellen. Zur Diskussion steht, was die Ursache für diese unterschiedliche Verteilung darstellt. Diese nur auf die superfizialen Zellen beschränkte Anfärbung konnte sowohl im leicht als auch im stark degenerierten Meniskus beobachtet werden. Da die Meniskuspräparate wie auch die Knorpelpräparate von Patienten stammen, die von einer fortgeschrittenen Form der OA betroffen waren, konnte in der histologischen Bewertung keine der Proben als normales Meniskuspräparat identifiziert werden. Der Vergleich war, wie auch im Knorpelgewebe, nur zwischen leichter und starker Degeneration möglich. Es stellt sich dabei die Frage, ob ein normales Präparat die gleichen Anfärbungsmuster, wie sie die degenerierten Präparate zeigen, aufgewiesen hätte oder ob diese regionalen Unterschiede spezifisch für Menisken mit höherem Degenerationsgrad sind. Dies würde bedeuten, dass diese superfizialen Zellen eine andere Reaktion auf eine Schädigung zeigen als Zellen im Inneren des Gewebes. Kambic et al. (2000) schreiben den superfizialen Zellen des Meniskus eine aktive Rolle im Reparaturprozess zu. Dabei demonstrierten sie in ihrer Studie, dass Zellen der superfizialen Zone als Reaktion auf eine Verletzung eine gesteigerte Expression von *alpha smooth*

muscle actin (ASMA) zeigen und anscheinend die Fähigkeit besitzen, in die Wunde zu wandern. ASMA, welches unter anderem in Myofibroblasten exprimiert wird (Grinell 1994), scheint unabhängig vom Zelltyp ein allgemeines Merkmal der Reparatur im Bindegewebe zu sein (Kambic et al. 2000).

Hervorzuheben ist zudem, dass im Rahmen dieser Arbeit neben den Meniskuszellen auch positive Färbungen für SMURF2 in Blutgefäßen aus den peripheren Bereichen des Meniskus von fünf leicht sowie stark geschädigten Präparaten beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 14). Neben den Endothelzellen zeigten auch Myofibroblasten eine positive Färbung. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass der TGF- β -Weg sowohl in Endothelzellen als auch in Myofibroblasten eine regulatorische Funktion besitzt (Miyazawa et al. 2002; Honda et al. 2010). Noch herauszufinden ist jedoch, warum nur für SMURF2 und nicht für SMURF1 eine solche Reaktion beobachtet werden konnte.

Die Fragen, weshalb SMURF1 und SMURF2 regional verschiedene Nachweisreaktionen in den Meniskuszellen zeigen und warum ein positiver Nachweis für SMURF2 in Blutgefäßen einiger degenerierter Meniskuspräparate zu beobachten ist, kann die vorliegende Arbeit nicht endgültig beantworten. Um diese Fragen zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen. Die dargestellten immunhistochemischen Ergebnisse unterstützen jedoch die Annahme, dass die SMURF-Proteine und damit einhergehend der Signalweg der TGF- β -Familie in der Reaktion der Zellen im degenerierten Meniskus eine entscheidende Rolle spielt.

5 Zusammenfassung

Die OA ist eine degenerative Gelenkerkrankung, deren Pathogenese bis heute noch nicht vollständig verstanden ist. Die Untersuchung von Signalwegen im Knorpel- und Meniskusgewebe, wie dem TGF- β -Signalweg, stellt dabei einen bedeutenden Forschungsansatz für das Verständnis der Pathomechanismen der OA dar. Die Proteine SMURF1 und SMURF2 gelten als zwei wichtige Regulatoren des TGF- β -Signalweges. Im Rahmen dieser Arbeit wurde humanes osteoarthritisch erkranktes Knorpel- und Meniskusgewebe des Kniegelenkes mithilfe der IHC auf diese Proteine untersucht. Die Gewebeproben wurden zuvor histologisch klassifiziert, um mögliche Differenzen in der Immunreaktion von Präparaten unterschiedlicher Degenerationsgrade feststellen zu können. Für das Knorpelgewebe diente die Mankin-Skala als Grundlage für die histopathologische Beurteilung. Da für die Graduierung des Meniskusgewebes zur Zeit keine etablierten histologischen Bewertungssysteme existieren, wurden die Schnitte anhand eines Bewertungssystems eingeteilt, welches die spezifischen pathologisch-degenerativen Veränderungen der Menisken berücksichtigte. Alle untersuchten Knorpel- und Meniskuspräparate zeigten einen positiven immunhistochemischen Nachweis für SMURF1 und SMURF2. Sowohl zwischen gering und schwer geschädigtem Knorpelgewebe als auch zwischen leicht sowie stark degenerierten Menisken konnte kein signifikanter Unterschied in der immunhistochemischen Detektion der SMURF-Proteine beobachtet werden. Jedoch wiesen einige Knorpel- und Meniskusschnitte eine zonal differenzierte Anfärbung auf. Die dargestellten Ergebnisse rechtfertigen die Aussage, dass SMURF1 und SMURF2 auf Gewebeebene im humanen osteoarthritischen Knorpel und Meniskus immunhistochemisch nachzuweisen sind. Zusammenfassend lässt dies die Annahme zu, dass die SMURF-Proteine in der Pathologie der OA im Knorpel- wie auch im Meniskusgewebe eine wichtige Rolle spielen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels	7
Abbildung 2: Regionale Unterschiede der Vaskularisation und Zelltypen des Meniskus	11
Abbildung 3: Schematische Abbildung des Signalweges der TGF- β -Familie	16
Abbildung 4: Knorpelquerschnitt eines gering geschädigten Knorpels im Vergleich zu einem schwer geschädigten Knorpel	37
Abbildung 5: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 im gering geschädigten Knorpel	38
Abbildung 6: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 im Knorpelgewebe	39
Abbildung 7: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 im schwer geschädigten Knorpel	40
Abbildung 8: Vergleich des immunhistochemischen Nachweises von SMURF1 und SMURF2 im Knorpelgewebe	41
Abbildung 9: Histologische Beurteilung der Zellularität des Meniskus	42
Abbildung 10: Zeichen des degenerativ veränderten Meniskus	43
Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 im leicht degenerierten Meniskus	44
Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 im stark degenerierten Meniskus	45
Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von SMURF1 und SMURF2 im Meniskusgewebe	46
Abbildung 14: Positiver immunhistochemischer Nachweis von SMURF2 in einem Blutgefäß aus dem peripheren Bereich des Meniskus	47
	57

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der Entparaffinierung und Rehydrierung	22
Tabelle 2: Protokoll der HE-Färbung	23
Tabelle 3: Zusammensetzung der Safranin O- und Fast Green-Lösung	24
Tabelle 4: Protokoll der Safranin O-Färbung	24
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper	27
Tabelle 6: Protokoll der immunhistochemischen Färbung	29
Tabelle 7: Zusammensetzung der Lichtgrün-Färbelösung	31
Tabelle 8: Protokoll der Lichtgrün-Färbung und Dehydrierung	31
Tabelle 9: Histologisches Gradingssystem nach Mankin	33
Tabelle 10: Bewertungssystem zur Beurteilung des Meniskusgewebes	35

8 Literaturverzeichnis

Aigner T, Dudhia J (1997): Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis* 56, 287–291

Allen KD, Golightly YM (2015): Epidemiology of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol* 27, 276–283

Arno S, Bell CP, Xia D, Regatte RR, Krasnokutsky S, Samuels J, Oh C, Abramson S, Walker PS (2016): Relationship between meniscal integrity and risk factors for cartilage degeneration. *Knee* 23, 686–691

Arnoczky SP, Warren RF (1982): Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 10, 90–95

Ashraf S, Wibberley H, Mapp PI, Hill R, Wilson D, Walsh DA (2010): Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 523–529

Attisano L, Wrana JL (2002): Signal Transduction by the TGF- β Superfamily. *Science* 296, 1646–1647

Bhattacharyya T, Gale D, Dewire P, Totterman S, Gale ME, McLaughlin S, Einhorn TA, Felson DT (2003): The Clinical Importance of Meniscal Tears Demonstrated by Magnetic Resonance Imaging in Osteoarthritis of the Knee. *J Bone Joint Surg Am* 85, 4–9

Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2006): Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* 65, 1414–1421

Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K, Wrana JL (2001): TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* 3, 587–595

Boya H, Pinar H, Gülay Z, Oktay G, Ozer E (2004): Clinical and arthroscopic features of meniscal tears and a search for the role of infection in histologically confirmed meniscal mucoid degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 12, 294–299

Camplejohn KL, Allard SA (1988): Limitations of safranin „O“ staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry* 89, 185–188

Collins DH: The pathology of articular and spinal diseases. Edward Arnold, London 1949

Custers RJH, Creemers LB, Verbout AJ, van Rijen MHP, Dhert WJA, Saris DBF (2007): Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 1241–1248

Danzig L, Resnick D, Gonsalves M, Akeson WH (1983): Blood supply to the normal and abnormal menisci of the human knee. *Clin Orthop Relat Res* 172, 271–276

Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G (1985): The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1, 58–62

Ditchen D: Erfassung arbeitsbedingter Kniebelastungen an ausgewählten Arbeitsplätzen. (IFA-Report 2012,2); DGUV, Berlin 2012

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K (2001): Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *J Biol Chem* 276, 12477–12480

Englund M, Guermazi A, Lohmander LS (2009): The meniscus in knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 35, 579–590

Eyre D (2002): Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4, 30–35

- Eyre DR, Wu JJ (1983): Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett* 158, 265–270
- Fisseler-Eckhoff A, Müller K-M (2011): Histopathologische Begutachtung des Meniskus. *Pathol* 32, 220
- Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA (2012): The Basic Science of Human Knee Menisci. *Sports Health* 4, 340–351
- Fuchs J, Rabenberg M, Scheidt-Nave C (2013): Prävalenz ausgewählter muskuloskelettaler Erkrankungen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 56, 678–686
- Ghosh P, Ingman AM, Taylor TK (1975): Variations in collagen, non-collagenous proteins, and hexosamine in menisci derived from osteoarthritic and rheumatoid arthritic knee joints. *J Rheumatol* 2, 100–107
- Goldring MB, Marcu KB (2009): Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11, 224
- Goldring MB, Goldring SR (2010): Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 230–237
- Goldring SR, Goldring MB (2004): The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 427, S27-36
- Goumans MJ, Mummery C (2000): Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44, 253–265
- Grinell F (1994): Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124, 401–404
- Habata T, Ohgushi H, Takakura Y, Tohno Y, Moriwake Y, Minami T, Fujisawa Y (2001): Relationship between meniscal degeneration and element contents. *Biol Trace Elem Res* 79, 247–256

- Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A (1998): Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 186–197
- Häuselmann HJ, Flechtenmacher J, Michal L, Thonar EJ-MA, Shinmei M, Kuettner KE, Aydelotte MB (1996): The superficial layer of human articular cartilage is more susceptible to interleukin-1-induced damage than the deeper layers. *Arthritis Rheum* 39, 478–488
- He J, Cao W, Azeem I, Zhao Q, Shao Z (2017): Transforming Growth Factor Beta1 being considered a novel biomarker in knee osteoarthritis. *Clin Chim Acta* 472, 96–101
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471
- Hellio Le Graverand MP, Sciore P, Eggerer J, Rattner JP, Vignon E, Barclay L, Hart DA, Rattner JB (2001): Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum* 44, 1808–1818
- Herwig J, Egner E, Buddecke E (1984): Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 43, 635–640
- Honda E, Yoshida K, Munakata H (2010): Transforming growth factor-beta upregulates the expression of integrin and related proteins in MRC-5 human myofibroblasts. *Tohoku J Exp Med* 220, 319–327
- Hoshiyama Y, Otsuki S, Oda S, Kurokawa Y, Nakajima M, Jotoku T, Tamura R, Okamoto Y, Lotz MK, Neo M (2015): Expression Pattern and Role of Chondrocyte Clusters in Osteoarthritic Human Knee Cartilage. *J Orthop Res* 33, 548–555
- Huang C (2010): Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr* 4, 10–18
- Huang H, Veien ES, Zhang H, Ayers DC, Song J (2016): Skeletal Characterization of Smurf2-Deficient Mice and In Vitro Analysis of Smurf2-Deficient Chondrocytes. *PloS One* 11, e0148088

- Hutton CW (1989): Osteoarthritis: the cause not result of joint failure? *Ann Rheum Dis* 48, 958–961
- Inoue Y, Imamura T (2008): Regulation of TGF- β family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* 99, 2107–2112
- Jerosch J, Prymka M, Castro WH (1996): Proprioception of knee joints with a lesion of the medial meniscus. *Acta Orthop Belg* 62, 41–45
- Johnson VL, Hunter DJ (2014): The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 28, 5–15
- Jones G (2016): What's new in osteoarthritis pathogenesis? *Intern Med J* 46, 229–236
- Jüni P, Hari R, Rutjes AWS, Fischer R, Silleta MG, Reichenbach S, da Costa BR (2015): Intra-articular corticosteroid for knee osteoarthritis. *Cochrane Database Syst* 2015 (10); CD005328
- Kambic HE, Futani H, McDevitt CA (2000): Cell, matrix changes and alpha-smooth muscle actin expression in repair of the canine meniscus. *Wound Repair Regen* 8, 554–561
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL (2000): Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF β Receptor for Degradation. *Mol Cell* 6, 1365–1375
- Kellgren JH, Lawrence JS (1957): Radiological Assessment of Osteo-Arthrosis. *Ann Rheum Dis* 16, 494–502
- Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Säämänen AM, Helminen HJ (1984): Fixation, decalcification, and tissue processing effects on articular cartilage proteoglycans. *Histochemistry* 80, 569–573
- Knudson CB, Knudson W (2001): Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 69–78

- Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory Chondrogenic Progenitor Cells from Repair Tissue during the Later Stages of Human Osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4, 324–335
- Krenn V, Kurz B, Krukemeyer MG, Knoess P, Jakobs M, Poremba C, Möllenhoff G (2010): Histopathologischer Degenerations-Score des Faserknorpels. *Z Rheumatol* 69, 644–652
- Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155–163
- Kwok J, Onuma H, Olmer M, Lotz MK, Grogan SP, D'Lima DD (2016): Histopathological analyses of murine menisci: implications for joint aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 709–718
- Laney JD, Hochstrasser M (1999): Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97, 427–430
- Lin X, Liang M, Feng XH (2000): Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 275, 36818–36822
- Litwic A, Edwards M, Dennison E, Cooper C (2013): Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. *Br Med Bull* 105, 185–199
- Loeser RF (2017): The Role of Aging in the Development of Osteoarthritis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 128, 44–54
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012): Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64, 1697–1707
- Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D (2010): Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum* 62, 2206–2218
- Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J (2006): The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord* 7, 52

- Machado GC, Maher CG, Ferreira PH, Pinheiro MB, Lin C-WC, Day RO, McLachlan AJ, Ferreira ML (2015): Efficacy and safety of paracetamol for spinal pain and osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *BMJ* 350, h1225
- MacMullan PA, McCarthy GM (2010): The meniscus, calcification and osteoarthritis: a pathologic team. *Arthritis Res Ther* 12, 116
- Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA (2011): The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 32, 7411–7431
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971): Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg* 53, 523–537
- Massagué J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753–791
- Massagué J, Chen YG (2000): Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14, 627–644
- McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, Hawker GA, Henrotin Y, Hunter DJ, Kawaguchi H, et al. (2014): OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 22, 363–388
- McDevitt CA, Webber RJ (1990): The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1990, 8–18
- McDevitt CA, Mukherjee S, Kambic H, Parker R (2002): Emerging concepts of the cell biology of the meniscus. *Curr Opin Orthop* 13; 345-350
- McNulty AL, Rothfusz NE, Leddy HA, Guilak F (2013): Synovial fluid concentrations and relative potency of interleukin-1 alpha and beta in cartilage and meniscus degradation. *J Orthop Res* 31, 1039–1045

- Meister K, Indelicato PA, Spanier S, Franklin J, Batts J (2004): Histology of the torn meniscus: a comparison of histologic differences in meniscal tissue between tears in anterior cruciate ligament-intact and anterior cruciate ligament-deficient knees. *Am J Sports Med* 32, 1479–1483
- Michael JW, Schlüter-Brust KU, Eysel P (2010): The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Dtsch Arztebl Int* 107, 152–162
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K (2002): Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes Cells* 7, 1191–1204
- Moojen DJF, Saris DBF, Auw Yang KG, Dhert WJA, Verbout AJ (2002): The correlation and reproducibility of histological scoring systems in cartilage repair. *Tissue Eng* 8, 627–634
- Neogi T, Zhang Y (2013): Epidemiology of OA. *Rheum Dis Clin North Am* 39, 1–19
- Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Kavsak P, Rasmussen RK, Seet BT, Sicheri F, Wrana JL (2005): Regulation of Smurf2 Ubiquitin Ligase Activity by Anchoring the E2 to the HECT Domain. *Mol Cell* 19, 297–308
- Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K, Salter DM (1999): Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis* 58, 208–213
- Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK, D’Lima DD (2011): Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1132–1141
- Pauli C, Whiteside R, Heras FL, Nesic D, Koziol J, Grogan SP, Matyas J, Pritzker KPH, D’Lima DD, Lotz MK (2012): Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 476–485

- Pearson RG, Kurien T, Shu KSS, Scammell BE (2011): Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis – reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 324–331
- Petersen W, Tillmann B (1995): Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand* 66, 308–312
- Petersen W, Tillmann B (1999): Struktur und Blutgefäßversorgung der Kniegelenkmenisken. *Z Orthop Unfall* 137, 31–37
- Poole AR, Rosenberg LC, Reiner A, Ionescu M, Bogoch E, Roughley PJ (1996): Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J Orthop Res* 14, 681–689
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Laverty S (2001): Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001, S26-33
- Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 191, 1–13
- Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier J-P, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006): Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 13–29
- Räuchle M, Cemerka M, Eibenberger B, Breitenseher M (2012): Arthrose – Update 2012. *Radiol* 52, 149–155
- Romeis - Mikroskopische Technik. Hrsg. v. Mulisch M, Welsch U, 18. Auflage; Springer Spektrum, Heidelberg 2010
- Rosenberg L (1971): Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 53, 69–82
- Roth M: Histologische Klassifikation für degenerativ geschädigte Menisken - die Wnt-Signalwegsmoleküle RSPO2 und SFRP2 in humanem Meniskusgewebe. Med. Diss. Göttingen 2014

- Rutgers M, van Pelt MJP, Dhert WJA, Creemers LB, Saris DBF (2010): Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 12–23
- Sapkota G, Alarcón C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massagué J (2007): Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* 25, 441–454
- Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW (1996): *Caenorhabditis elegans* genes *sma-2*, *sma-3*, and *sma-4* define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 790–794
- Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T (2010): Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage* 18 (3), S113–S116
- Schwamborn JC, Müller M, Becker AH, Püschel AW (2007): Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J* 26, 1410–1422
- Sekelsky JJ, Newfeld SJ, Raftery LA, Chartoff EH, Gelbart WM (1995): Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139, 1347–1358
- Shen R, Chen M, Wang Y-J, Kaneki H, Xing L, O’keefe RJ, Chen D (2006): Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation. *J Biol Chem* 281, 3569–3576
- Skou ST, Roos EM, Laursen MB, Rathleff MS, Arendt-Nielsen L, Simonsen O, Rasmussen S (2015): A Randomized, Controlled Trial of Total Knee Replacement. *N Engl J Med* 373, 1597–1606
- Söder S, Aigner T (2011): Osteoarthritis. Etiology, Typing, Staging and Histological Grading. *Pathol* 32, 183–192

- Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, Morén A, Heldin CH, Christian JL, ten Dijke P (1998): Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 273, 25364–25370
- Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G (2005): A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 769–781
- Sun Y, Mauerhan DR (2012): Meniscal calcification, pathogenesis and implications. *Curr Opin Rheumatol* 24, 152–157
- Sun Y, Mauerhan DR, Honeycutt PR, Kneisl JS, Norton HJ, Zinchenko N, Hanley EN, Gruber HE (2010): Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture. *Arthritis Res Ther* 12, R56
- Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, James Norton H, Zinchenko N, Ingram J, Hanley EN, Gruber HE (2012): Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *Open Rheumatol J* 6, 24–32
- Sweigart MA, Athanasiou KA (2001): Toward Tissue Engineering of the Knee Meniscus. *Tissue Eng* 7, 111–129
- Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, Miyazono K, Imamura T (2003): Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor- β signaling by Smad7. *J Biol Chem* 278, 10716–10721
- Takahashi N, Rieneck K, van der Kraan PM, van Beuningen HM, Vitters EL, Bendtzen K, van den Berg WB (2005): Elucidation of IL-1/TGF-beta interactions in mouse chondrocyte cell line by genome-wide gene expression. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 426–438

- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH (1994a): Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* 264, 101–104
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K (1994b): Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269, 16985–16988
- ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH (2000): Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* 25, 64–70
- Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J (2010): Cartilage biology, pathology, and repair. *Cell Mol Life Sci* 67, 4197–4211
- van der Kraan PM, Glansbeek HL, Vitters EL, van den Berg WB (1997): Early elevation of transforming growth factor-beta, decorin, and biglycan mRNA levels during cartilage matrix restoration after mild proteoglycan depletion. *J Rheumatol* 24, 543–549
- Verdonk R, Mendes JE, Monllau JC: *Meniscal Transplantation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2013
- Vuolteenaho K, Moilanen T, Jalonen U, Lahti A, Nieminen R, van Beuningen HM, van der Kraan PM, Moilanen E (2005): TGFbeta inhibits IL-1 -induced iNOS expression and NO production in immortalized chondrocytes. *Inflamm Res* 54, 420–427
- Waldstein W, Perino G, Gilbert SL, Maher SA, Windhager R, Boettner F (2016): OARSI osteoarthritis cartilage histopathology assessment system: A biomechanical evaluation in the human knee. *J Orthop Res* 34, 135–140
- Wang H-R, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomsen GH, Wrana JL (2003): Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775–1779
- Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X (2012): Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21, 1751–1762

- Wiesner S, Ogunjimi AA, Wang H-R, Rotin D, Sicheri F, Wrana JL, Forman-Kay JD (2007): Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* 130, 651–662
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994): Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341–347
- Wu Q, Kim K-O, Sampson ER, Chen D, Awad H, O'Brien T, Puzas JE, Drissi H, Schwarz EM, O'Keefe RJ, et al. (2008): Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice. *Arthritis Rheum* 58, 3132–3144
- Ying S-X, Hussain ZJ, Zhang YE (2003): Smurf1 Facilitates Myogenic Differentiation and Antagonizes the Bone Morphogenetic Protein-2-induced Osteoblast Conversion by Targeting Smad5 for Degradation. *J Biol Chem* 278, 39029–39036
- Yusuf E (2016): Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. *Curr Treatm Opt Rheumatol* 2, 111–125
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH (1999): A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400, 687–693
- Zimny ML, Albright DJ, Dabezies E (1988): Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat (Basel)* 133, 35–40

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie für die stets hervorragende Betreuung und Unterstützung. Darüber hinaus bot mir die Bearbeitung dieses Themas die Gelegenheit, einen breiten Einblick in den wissenschaftlichen Laboralltag zu erhalten.

Für die große Hilfsbereitschaft zu organisatorischen Fragestellungen möchte ich mich zudem bei Frau Andrea Bernhardt sowie Frau Christa Bode bedanken. Insbesondere die kompetente methodische Einarbeitung wusste ich sehr zu schätzen.

Auch Herrn Manuel Altherr, Herrn Philipp Buderer, Herrn Thomas Gelis, Herrn Jérôme Janßen und Frau Evi Tsiakourma danke ich für den kollegialen Austausch. Außerdem möchte ich allen weiteren Doktoranden und Mitarbeitern der „Arbeitsgemeinschaft orale Biologie und Geweberegeneration“ für die gegenseitige Motivation sowie für die zu jederzeit sehr angenehme Laboratmosphäre danken.