Aus der Abteilung Prothetik (kommissarischer Direktor Dr. med. dent. N. Gersdorff) im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Laminine während der Knorpelentwicklung, im gesunden Knorpel und deren Bedeutung für die Pathogenese der Osteoarthritis des Menschen

INAUGURAL – DISSERTATION

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

> vorgelegt von Boris Schminke aus Hessisch Lichtenau

> > Göttingen 2011

Dekan:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. Miosge

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

meinem Großvater Karl Schminke

1. Einleitung	1	
1.1 Knorpelgewebe	1	
1.1.1 Überblick	1	
1.1.2 Chondrogenese	2	
1.1.3 Der Chondrozyt	3	
1.1.4 Die extrazelluläre Matrix des Knorpels	4	
1.2 Osteoarthritis	6	
1.2.1 Einleitung	6	
1.2.2 Biomechanische Modulation der Chondrozytenfunktion: Krankhaft		
erhöhte Belastung in normalem Knorpel oder normale Belastung in		
krankhaftem Knorpel?	8	
1.2.3 Vergleich zum alternden Knorpel	9	
1.2.4 Ist Osteoarthritis eine genetische Erkrankung?	9	
1.2.5 Auswirkung der phänotypischen Anpassung zur Chondrozytenfunktion		
1.2.6 Die Rolle der Entzündung: Welche Signalmoleküle gibt es und woher		
kommen sie?	12	
1.2.7 Katabolisch versus Anabolisch: Was verändert sich?	14	
1.2.8 Welche Rolle spielt der subchondrale Knochen?	15	
1.2.9 Therapie der Osteoarthritis	16	
1.3 Laminine	19	
1.3.1 Überblick		
1.3.2 Struktur und Nomenklatur		
1.3.3 Laminin in der Basalmembran und im Knorpelgewebe	21	
1.3.4 Rezeptoren	22	
1.3.5 Embryonalentwicklung	24	
1.4 Aufgabenstellung		

2 Material und Methoden	26
2.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie von Laminin-1 und Laminin-10 auf	
Protein-Ebene im humanen Knorpelgewebe und humanen embryonalen	
Gewebe	26
2.1.1 Allgemeines zur Methode	

2.1.2 Gewebepräparation	27
2.1.3 Protokoll	32
2.2 In-Situ-Hybridisierung	35
2.2.1 Sondenbau zur in-situ-Hybridisierung von Laminin	35
2.2.1.1 Allgemeines zur Methode	35
2.2.1.2 PCR	36
2.2.1.3 In-vitro-Transkription und Labeln der RNA-Sonden	39
2.2.1.4 Fällen der RNA	40
2.2.1.5 Dot Blot	41
2.2.2 In-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten	43
2.2.2.1 Allgemeines zur Methode	43
2.2.2.2 Protokoll für Laminin	44
2.3 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Laminin-1 und	
Laminin-10, sowie Kolokalisation mit Integrinen in vivo auf Protein-Ebene im	
humanen Knorpelgewebe	48
2.3.1 Gewebepräparation	48
2.3.2 Kolloidales Gold herstellen und Antikörper koppeln	51
2.3.2.1 Kolloidales Gold herstellen	51
2.3.2.2 Antikörper koppeln	53
2.3.3 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Laminin- α 1 - α 5, -	
β1 und -γ1	55
2.3.3.1 Allgemeines zur Methode	55
2.3.3.2 Protokoll	55
2.3.4 Statistik	57
2.4 Zellisolation und Zellkultivierung	57
2.4.1 Zellisolation	57
2.4.2 Zellkultivierung	59
2.5 Zelladhäsionsassay	59
2.5.1 Allgemeines zur Methode	59
2.5.2 Protokoll Zelladhäsionsassay	59
2.6 Vergleichende Genexpressionsanalyse von Chondrozyten nach Stimulation	
mit Laminin-1 in Alginatkultur	61
2.6.1 Alginatkultur	61
2.6.2 Isolation der mRNA aus primären Zellen	62

2.6.3 Umschreiben der mRNA in cDNA	63	
2.6.4 Quantitative real-time RT-PCR	63	
2.6.4.1 Allgemeines zur Methode	63	
2.6.4.2 Protokoll	64	
2.6.4.3 PCR-Protokoll	65	
2.6.5 Statistik	65	
2.6.6 Primerdesign	66	
2.6.7 Gradienten-PCR	67	
2.6.8 Sequenzierung der PCR-Produkte und BLAST-Algorithmus (Basic Local		
Alignment Search Tool)	68	
2.7 Microarray	68	
2.7.1 Allgemeines zur Methode	68	
2.7.2 Isolierung der mRNA	69	
2.7.3 Durchführung des Microarray		
2.8 Western-Blot	71	
2.8.1 Allgemeines zur Methode		
2.8.2 Probenvorbereitung		
2.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)		
2.8.4 Western-Blot	76	
2.8.5 Proteinfärbung auf der PVDF-Membran	77	
2.8.6 Immunreaktion	78	

80
80
86
88
89
90

3.6 Vergleichende Genexpressionsanalyse von Chondrozyten nach Stimulation	
mit Laminin-1 in 3D-Alginat-Kultur	91
3.7 Microarray	93
4. Diskussion	94
4.1 Laminine als Bestandteile der extrazellulären Matrix in humanem	
Knorpelgewebe	94
4.2 Unterschiede in der Laminin-Quantität in Abhängigkeit vom Knorpelareal	
und dem Chondrozytenphänotyp	99
4.3 Nachweise von Laminin-Chondrozyten-Interaktionen	102
5. Zusammenfassung	104
6. Literaturverzeichnis	105
7. Abbildungsverzeichnis	121
8. Tabellenverzeichnis	124

AEC	3-Amino-9-Ethylkarbazol	
AK	Antikörper	
aqua dest.	destilliertes Wasser	
BMP	bone morphogenetic protein	
BSA	bovine serum albumin	
bzw.	beziehungsweise	
С°С	Grad Celsius	
ca.	circa	
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	
DAB	Diaminobenzidin	
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-phenylindol	
DIG	Digoxigenin	
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
EZM	extrazelluläre Matrix	
FBS	fötales Kälberserum	
FGF	fibroblast growth factor	
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	
GW	Gestationswoche	
h	Stunde	
HE	Hämalaun – Eosin	
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)	
lgG	Immunglobulin G	
Lsg.	Lösung	
min	Minute	
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure	
OA	Osteoarthrose	
ОТ	Objektträger	
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase	
PBS	Phosphate buffered saline	
PE	Phycoerythrin	

P/S	Penicillin / Streptomycin	
RT	Raumtemperatur	
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	
S.	Seite	
S.	siehe	
sek	Sekunde	
SSC	Natriumzitrat-Puffer	
SYBR Green	interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von	
	dsDNA	
TEP	Total-Endoprothese	
ü.N.	über Nacht	
UpM	Umdrehungen pro Minute	
v.a.	vor allem	

1.1 Knorpelgewebe

1.1.1 Überblick

Knorpelgewebe besteht aus Chondrozyten und extrazellulärer Matrix. Man unterscheidet drei verschiedene Formen des Knorpels: Den Faserknorpel, den elastischen Knorpel und den hyalinen Knorpel (Kuettner 1992).

Da sich diese Arbeit ausschließlich mit hyalinem Knorpel befasst, geht es im Folgenden auch nur um diese besondere Art des Gelenkknorpels.

Der humane hyaline Knorpel ist ein hypozelluläres, avaskuläres, aneurales und alymphatisches Gewebe, das die artikulären Knochenenden eines synovialen Gelenks überzieht. Es besteht aus Chondrozyten und einer extrazellulären Matrix. Die Versorgung der Chondrozyten erfolgt ausschließlich über Diffusion durch die extrazelluläre Matrix hindurch, welche hauptsächlich aus Kollagenen, Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht. Verhältnis Das der Matrixkomponenten zueinander bestimmt die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes und ermöglicht die Absorption der einwirkenden Kräfte (Kuettner 1992).



Abb. 1: Längsschnitt durch den hyalinen Gelenkknorpel

Betrachtet man das Bild von der Knorpeloberfläche bis zum subchondralen

Knochen, so ist zunächst die Tangentialzone (TA) mit ihren abgeflachten Chondrozyten sichtbar. Es folgt die Transitionalzone (TR), die Radialzone (R), die Tidemark (T) und die kalzifizierte Mineralisierungszone (CC), welche den Übergang zum subchondralen Knochen darstellt (Poole et al. 1984).

1.1.2 Chondrogenese

Während der Embryonalentwicklung führt die Chondrogenese zur Bildung des beginnt mit der Proliferation Skelettsystems. Sie und Kondensation mesenchymaler Stammzellen (Goldring MB et al. 2006). Man nimmt an, dass mesenchymal-epitheliale Zellinteraktionen Rolle eine zu Beginn der Chondrogenese spielen (Li WJ et al. 2005). Nach Beginn der Kondensation entstehen Prächondrozyten, womit erstmalig die Expression von Kollagen Typ II beobachtet wurde (Xie et al. 1997). Die folgende Entwicklung zu Chondroblasten geht mit dem Anstieg der Zellproliferation und Matrixproduktion einher. Weiterhin wird verstärkt Kollagen Typ II und Aggrekan gebildet. Außerdem werden auch Linkerproteine wie Kollagen Typ IX und XI erstmalig nachweisbar (Gebhard et al. 2004). Die Zellen proliferieren weiter und differenzieren sich nun zu reifen Chondrozyten. Während der Entwicklung wird eine Avaskularisierung des Gewebes beobachtet, was die Voraussetzung für die Bildung der knorpelspezifischen Matrix ist (Jelic et al. 2001). Die Proliferation kommt erst beim Übergang zum prähypertrophen Chondrozyten zum Stillstand. Bei der nun beginnenden Knochenentwicklung werden die Chondrozyten hypertroph und bauen gleichzeitig eine Matrix für die einwandernden Präosteoblasten und die folgende Mineralisierung auf.

Diese Hypertrophie wird an den Gelenkflächen des Knochens verhindert. Sie erhalten ihren prähypertrophen Phänotyp und haben so die Voraussetzung für die Bildung der artikulären Knorpelmatrix (Goldring MB et al. 2006). Eine wichtige Rolle für die Erhaltung dieses Differenzierungsstatus der artikulären Chondrozyten spielen der erniedrigte Sauerstoffgehalt in einem avaskulären Gewebe, die mechanische Stimulation und die Wirkung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) und der Transforming Growth Factor ß1 (TGF-ß1) (Wang et al. 2004).

2

1.1.3 Der Chondrozyt

Chondrozyten haben eine Lebensspanne, welche mit der des Individuums identisch ist. Sie sind zu einer morphologischen und metabolischen Grundeinheit des Knorpels, welche Chondron genannt wird, organisiert. Die Zellzahl eines Chondrons ist abhängig von der Position in der Knorpelschicht. Durch die avaskuläre und alymphatische Lokalisation der Chondrozyten im hyalinen Knorpel wird dieser vor die Aufgabe gestellt, autark zu funktionieren. Sowohl die Synthese spezifischer Produkte als auch Entzündungsreaktionen und unspezifische Immunantworten müssen von diesen Zellen bewältig werden (Muehleman et al. 2004).

Die Chondrozyten des gesunden hyalinen Gelenkknorpels besitzen keine Zell-Zell-Kontakte und sind somit auf Zell-Matrix-Interaktionen angewiesen (Kuettner 1992). Daher werden den Informationen zur Homöostase und zur adaptiven Veränderung der Matrixstruktur einige Schlüsselfaktoren zukommen, für die der Chondrozyt Rezeptoren besitzt. Die Information kann prinzipiell in drei Formen verfügbar sein (Mollenhauer et al. 2002):

- Erkennung spezifischer Komponenten, wie z.B. Kollagen Typ II, Aggrekan oder Hyaluronsäure;
- Erkennung von Mengen spezifischer Komponenten über die Zahl der verfügbaren Rezeptoren oder die Bindungskonstanten;
- Erkennung von Druck- und Zugkräften durch Molekülkomplexe wie fokale Kontaktstellen und Veränderung des Zytoskeletts oder Deformation von Ionenkanälen.

Eine vollständige Beschreibung aller bekannten Rezeptoren des Chondrozyten würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, daher wird im Folgenden die Integrin-Familie näher beschrieben, weil diese u. a. für die Bindung von Lamininen verantwortlich sind.

Integrine sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche eine Signaltransduktion in die Zelle ermöglichen, wenn ein Ligand bindet (Belkin und Step 2000). Dem Knorpel stehen sechs α - (α 1, 2, 3, 6, 10, V) und drei β - (β 1, 2, 3) Kettenkombinationen zur Verfügung. Als Bindungspartner in der extrazelluären Matrix gelten u. a. Kollagen Typ II, Kollagen Typ VI, *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), Fibronektin, und *cartilage morphogenetic protein* (CMP). Auffällig ist die Clusterung von Integrinen an den fokalen Kontaktstellen der Chondrozyten in der Zellkultur.

Was die Zellorganellen der Chondrozyten betrifft, so fällt auf, dass sie ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum und einen großen Golgi-Apparat besitzen, was für eine hohe sezernierende Aktivität der Chondrozyten spricht (Mollenhauer et al. 2002).

1.1.4 Die extrazelluläre Matrix des Knorpels

Die extrazelluläre Matrix wird topographisch in die perizelluläre, territoriale welche das Chondron begrenzt - und interterritoriale Matrix eingeteilt. Dabei stellt die interterritoriale Matrix mit über 90% der Biomasse den größten Anteil dar.

Der hyaline Knorpel beinhaltet haupsächlich Kollagen Typ II, VI, IX, X und XI. Die Halbwertszeit von Kollagen beträgt bis zu 100 Jahre (Maroudas et al. 1992). Für die biomechanische Funktion des Gewebes ist von Bedeutung, dass die Kollagen-Typ-II-Fibrillen eine arkadenartige Anordnung haben. Sie ziehen vom subchondralen Knochen ausgehend zunächst senkrecht in Richtung Knorpeloberfläche und durchlaufen dabei die Zone des mineralisierten Knorpels sowie die Radiärzone. Im weiteren Verlauf machen sie einen Bogen durch die Tangentialzone, bis sie die Oberfläche des Gelenkknorpels bzw. die Tangentialzone erreichen, um dann wieder zum Knochen hinabzuziehen.

Kollagen Typ II bildet zusätzlich Quervernetzungen untereinander aus (Wu und Eyre 1989). Kollagen Typ XI wurde innerhalb der Kollagen-Typ-II-Fibrillen gefunden und könnte somit eine Rolle in der Fibrillenorganisation spielen (Bruckner et al. 1992). Kollagen Typ X wird von den hypertrophen Chondrozyten innerhalb der metabolisch aktiven Zone des kalzifizierten Knorpels synthetisiert (Eavey et al. 1987) und Kollagen Typ VI markiert die Chondrongrenze (Poole et al. 1988).

Neben den Kollagenen enthält die extrazelluläre Matrix Proteoglykane, die in komprimierter, nur teilweise hydrierter Form in das Kollagen-Fibrillen-Netzwerk eingebunden vorliegen und somit für die viskoelastischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich sind. 90% der Proteoglykanmasse stellt Aggrekan dar, welches große Aggregate bildet, die über Linker-Proteine an Hyaluronan, ein Polysaccharid, gebunden sind. Hyaluronan ist bis in die territoriale Matrix mit dem Chondrozyt über den CD44-Rezeptor verbunden (Knudson und Knudson 1993). Diese Aggregate haben aufgrund ihrer negativ geladenen Glykosaminoglykan-

seitenketten, Chondroitinsulfat und Keratansulfat, eine starke Tendenz zur Wasserbindung. Dadurch entsteht ein hoher endosmotischer Quellungsdruck, welcher ohne die Begrenzung durch die Kollagen-Fibrillen zu einem fünfmal größeren Quellungsvolumen führen würde. Der Quellungsdruck von 0,2 MPa setzt die Fibrillen unter eine entsprechend hohe Zugspannung (Maroudas et al. 1980).



Abb. 2: Molekularer Aufbau der extrazellulären Matrix; modifiziert nach: Lüllmann-Rauch (2003) S. 138; Ch-zyt: Chondrozyt, Agg: Aggrekan, VP: Linkerprotein, HA: Hyaluronan.

Die Biomechanik des Gelenkknorpels wird mit Hilfe des biphasischen und viskoelastischen Modells verständlich (Mobasheri 1998). Das biphasische Modell unterscheidet eine feste Phase, Zellen und extrazelluläre Matrix, und eine bewegliche Phase, die interstitielle Flüssigkeit. Wird das Gewebe bei mechanischer Beanspruchung zusammengedrückt, entweicht die bewegliche Phase zu den Seiten, während die feste Phase zunehmend verdichtet wird, was die Permeabilität verringert. Die Flüssigkeit kann durch die so erhöhte Reibung an der extrazellulären Matrix zunehmend schwerer abfließen, mit der Folge eines Anstiegs des hydrostatischen Drucks im Gewebe. Daraufhin entsteht ein Äquilibrium zwischen dem sich aufbauenden hydrostatischen Druck und der einwirkenden Last, wodurch die Kompression zum Stillstand kommt. Zusätzlich kommt es zu einem Anstieg des elektrostatischen Widerstands, durch die Annährung der negativ geladen Molekülaggregate. Bei Entlastung quillt das

Gewebe zum Ursprungsvolumen zurück, es kommt zur Repulsion der Ladungen und die interstitielle Flüssigkeit zieht sich wieder zurück in das Gewebe, bis das Kollagennetz erneut Einhalt gebietet (Kim et al. 1995).

Außer Aggrekan gibt es noch eine Reihe weiterer Proteoglykane, wie Fibromodulin, Decorin oder Biglykan. Zu den Glykoproteinen des Knorpels zählen u. a. COMP, Chondronektin, das Matrix GIA-Protein, Ancorin und Perlekan, welches hauptsächlich in Basalmembranen vorkommt. Erst kürzlich wurden außerdem alle Basalmembran-Komponenten im hyalinen Gelenkknorpel der Maus und des Rindes beschrieben (Kvist et al. 2008). Weiterhin kommen im Knorpel Matrixmetalloproteinasen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren vor (Goldring MB et al. 2006).

1.2 Osteoarthritis

1.2.1 Einleitung

Die Mehrheit aller über 65-Jährigen hat radiologische Kennzeichen der Osteoarthritis. Klinisch am häufigsten betroffen sind Hand, Knie, Hüfte und Wirbelsäule. Die Symptome sind assoziiert mit funktionellen Einschränkungen, Entzündung, Schmerz, Steifheit und einer verringerten Mobilität der betroffenen Gelenke (Felson 2006). Osteoarthritis ist gekennzeichnet durch Degeneration des Gelenkknorpels, Entzündung im Gelenkspalt mit Synovitis und Veränderungen im subchondralen Knochen. Die Pathogenese der Osteoarthritis beinhaltet verschiedene Faktoren, wie mechanische Einflüsse, die Effekte des Alterns auf die Zusammensetzung und die Struktur der extrazellulären Matrix des Knorpels und genetische Faktoren. Während der frühen Stadien der Osteoarthritis zeigen die Chondrozyten eine gesteigerte Zellproliferation sowie eine verstärkte Synthese von Matrixproteinen, Proteinasen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren. Der Chondrozyt stellt den zellulären Mediator in der Pathogenese der Osteoarthritis dar. Die anderen Zellen und Gewebe des Gelenks, wie die Synovialmembran und der subchondrale Knochen, spielen bei der Pathogenese der Osteoarthritis aber ebenfalls eine Rolle. Der adulte artikuläre Chondrozyt sorgt nur für einen geringen "turnover" der extrazellulären Matrixkomponenten. Er hat eine limitierte Kapazität, die originale Knorpelmatrix zu regenerieren.

Pharmakologische Therapien, die sich gegen chronische Schmerzen richten, sind geprüfte Struktur-modifizierende-Medikamente insuffizient und sind nicht erhältlich. Das Knorpel "Tissue Engineering" mit oder ohne Gentherapie ist Gegenstand einer intensiven Forschung. Es gibt mehrere Tiermodelle mit Osteoarthritis, aber keines davon weist genau die gleiche Symptomatik wie die Osteoarthritis beim Menschen auf (Goldring MB und Goldring SR 2007). Anatomische und histopathologische Analysen haben geholfen, die Osteoarthritis zu definieren und somit eine Abgrenzung zum gesunden Gelenkknorpel zu schaffen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Osteoarthritis nicht nur auf den Gelenkknorpel beschränkt ist (Brandt et al. 2006). Es sind immer mehrere Osteoarthritis betroffen. Komponenten des Gelenks von SO wie die Synovialmembran und der subchondrale Knochen. Die Progression der Osteoarthritis wird multifaktoriell beeinflusst. wie z.B. durch Gelenkinstabilität/Fehlstellung, Fettleibigkeit, zunehmendes Alter, Ablagerungen von intraartikulären Kristallen, Muskelschwäche und periphere Neuropathien. Diese Faktoren können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden:

- o genetische Faktoren,
- o mechanische Faktoren und
- o Effekte des Alterns (Goldring MB und Goldring SR 2007).



Abb. 3: Schema: Pathogenese der Osteoarthritis (Goldring MB und Goldring SR 2007, S. 627)

1.2.2 Biomechanische Modulation der Chondrozytenfunktion: Krankhaft erhöhte Belastung in normalem Knorpel oder normale Belastung in krankhaftem Knorpel?

Das Altern ist wohl als Hauptfaktor für osteoarthritisch veränderten Knorpel zu sehen, außerdem zu nennen sind hereditäre Faktoren, wodurch eine Störung der Chondrozytendifferenzierung und Chondrozytenfunktion verursacht wird. Dies hat Einfluss auf die Zusammensetzung und die Struktur der Knorpelmatrix. Unabhängig vom Alter sind erhöhte biomechanische Belastungen, durch z.B. Übergewicht und bzw. oder Fehlstellungen, zu nennen.

Die Gelenkoberfläche spielt eine essentielle Rolle während des Belastungstransfers durch das Gelenk. Es wurde gezeigt, dass unter bestimmten Bedingungen, welche einen erhöhten Belastungstransfer zeigen und zusätzlich verformte oder veränderte Gelenkstrukturen haben, während der Belastung eine Beschleunigung der Initiation bzw. Progression der Osteoarthritis fördern (Roos 2005).

Außerdem wurde gezeigt, dass die Risikofaktoren für Initiation und Progression der Osteoarthritis identisch sind mit denen für die idiopathische Osteoarthritis (Englund und Lohmander 2004). Chondrozyten reagieren auf biomechanische Störungen mit einer Hochregulierung der synthetischen Aktivität oder mit einer erhöhten Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Der Konsens von in-vitromechanischen Belastungsexperimenten ist. dass schädliche statische Kompression einen Abbau von Proteoglykanen, eine Beschädigung des Kollagennetzwerks und eine verringerte Synthese von Knorpelmatrixproteinen zur Folge hat, während eine dynamische Kompression eine verstärkte Synthese von Knorpelmatrixproteinen fördert (Guilak et al. 2004). Die Reaktionen auf eine traumatische Verletzung sind eine allgemein aktivierte Genexpression, in Form von gesteigerter Synthese inflammatorischer Mediatoren, Knorpel abbauenden Proteinasen und Stressfaktoren (Kurz et al. 2005). Chondrozyten haben Rezeptoren, welche auf mechanische Stimulation reagieren. Viele von diesen Rezeptoren interagieren ebenfalls mit den Komponenten der extrazellulären Matrix (Salter et al. 2004). Unter diesen Rezeptoren sind einige Integrine, welche z.B. an Fibronektin, Kollagen Typ II und an bestimmte Laminine binden. Die Aktivierung dieser Rezeptoren kann die Produktion von Matrix-abbauenden Proteinasen, inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen fördern (Pulai et al. 2005). Der Discoidin-Domain-Rezeptor-2 bindet ebenfalls an Kollagen Typ II und aktiviert die Matrixmetalloproteinase-13 (Xu L et al. 2007).

1.2.3 Vergleich zum alternden Knorpel

Die artikuläre Oberfläche wird im Verlauf des Alterns weicher, außerdem kommt es zu einem Abfall der Zugbelastung und Biegfestigkeit. Diese Effekte beruhen auf strukturellen Veränderungen in der Matrixorganisation. Wesentlich hierbei ist das Hauptproteoglykan des Knorpels, Aggrekan, welches vermindert exprimiert und verändert synthetisiert wird, wodurch es wiederum zu einer stärkeren Vernetzung der Kollagene kommt. Dadurch steigt die Festigkeit im Knorpel an und es kommt zu Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften. Die Fähigkeit der Chondrozyten zur Regeneration und zur Aufrechterhaltung eines "turnovers" von Knorpel-Matrix-Proteinen verringert sich im Laufe des Alterungsprozesses, dies führt zu einer geringeren anabolischen Aktivität der Zelle (Aigner et Gerwin 2007). Normale Chondrozyten verbleiben ihr ganzes Leben in einer Art postmitotischem Ruhestadium - der S-Phase -, wobei die Fähigkeit zur Proliferation mit dem Alter abnimmt. Dieser Effekt wird u. A. durch verringerte DNS-Reparatur und verkürzte Telomerlängen verursacht (Martin et al. 2004). Einen Streitpunkt in der Forschung über Osteoarthritis stellt die gesteigerte Apoptoserate, sowie die beginnende Clusterbildung als eine Art lokaler Regeneration der Chondrozyten dar (Horton et al. 2005). Außerdem wird vermutet, dass es durch die Ansammlung von Knorpel-Matrix-Proteinen im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat der Chondrozyten, unter Stresseinwirkung während des Alterungsprozesses, zu einer Induktion der Apoptose kommt (Yang et al. 2005).

1.2.4 Ist Osteoarthritis eine genetische Erkrankung?

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass genetische Abweichungen den Beginn einer Osteoarthritis zur Folge haben. Epidemiologische Studien lassen auf eine genetische Disposition für Osteoarthritis schließen; z.B. wurde gezeigt, dass der Einfluss genetischer Faktoren bis zu 70% in der Osteoarthritis betragen kann (Valdes et al. 2006). Die Folgende Liste gibt eine Übersicht über die Gene, welche in der Osteoarthritis eine Rolle spielen könnten(Valdes et al. 2007):

mögliche Kanidatengene für die Enstehung einer Osteoarthritis:

Proteine der extrazellulären Matrix

- Type II collagen (COL2A1)
- Type IX collagen (COL9A1)
- o Aggrecan (AGC1)
- Cartilage intermediate layer protein (CILP)
- o ADAM12

Signalmoleküle:

- Vitamin D receptor (VDR)
- Estrogen receptor a (ESR1)
- o IL-1 gene cluster
- Bone morphogenetic protein-2 (BMP2)
- o CD36
- Cyclooxygenase (COX) 2

- o COL9A1
- o Matrilin-3 (MATN3)
- o CILP

- Secreted frizzled related protein-3 (FRZB)
- Bone morphogenetic protein-5 (BMP5)
- o Interleukin-4 receptor (IL4R)
- o Asporin (ASPN)
- o Calmodulin 1 (CALM1)
- BMP2 Osteoprotegerin (OPG) IL-17A & F
- Nuclear co-repressor (NCOR) 2
 Growth and differentiation factor (GDF) 5

Interessanterweise gibt es dabei Unterschiede zwischen Männern und Frauen, sowie auch bei Menschen verschiedener Körpergrößen (Bukulmez et al. 2006). Viele Gendefekte, die eine Auswirkung auf die Struktur der Knorpelmatrix und des Knochens während der Entwicklung haben, resultieren in einer angeborenen Knorpeldysplasie. Die gegenüberstehenden Effekte von Gelenkfehlstellungen und Gelenkkongruenz können ebenfalls zu einem Verlust von Gelenkknorpel führen und dadurch eine Initiation von Osteoarthritis zur Folge haben (Li X et al. 2007).

1.2.5 Auswirkung der phänotypischen Anpassung zur Chondrozytenfunktion

Der Chondrozyt ist der einzige Zelltyp in der extrazellulären Matrix des Knorpels, hat eine geringe metabolische Aktivität und überlebt unter relativ sauerstoffarmen Bedingungen. Er ist verantwortlich für die Erneuerung und Aufrechterhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität der Knorpelmatrix und besitzt außerdem eine geringe regenerative Aktivität.

Während der skelettalen Entwicklung stammen die Chondrozyten von mesenchymalen Progenitorzellen ab und synthetisieren die Knorpelanlagen für die Extremitäten. Nach der mesenchymalen Kondensation und Zelldifferenzierung proliferieren und differenzieren sich die Chondrozyten am Ende zu hypertrophen Chondrozyten. Dieser Prozess wird als Chondrogenese bezeichnet (Goldring MB et al. 2006). Die enchondrale Ossifikation beginnt mit der Apoptose der hypertrophen Chondrozyten und endet mit deren Ersatz durch Knochen. Die gleiche Abfolge dieser Prozesse gibt es postnatal in der Wachstumsfuge, was zu schnellem skelettalen Wachstum führt.

Im adulten Knorpel sind die Chondrozyten voll differenziert und verbleiben in der extrazellulären Matrix. Der adulte Chondrozyt spielt eine kritische Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis, er reagiert auf gegensätzliche umgebungsbedingte Stimulation, wodurch der Abbau der Matrix gefördert und essentielle Prozesse der Knorpelregeneration gehemmt werden. In Abwesenheit einer Erkrankung halten die Chondrozyten eine geringe "Turnover-Rate" von Knorpel-Matrix-Proteinen, mit einer Halbwertszeit für Kollagen von mehr als 100 Jahren, aufrecht (Verzijl et al. 2000). Die Halbwertszeit für Aggrekan beträgt dagegen 3 bis 24 Jahre (Maroudas et al. 1998).

In der frühen Osteoarthritis versuchen die Chondrozyten die Matrixkomponenten zu regenerieren, indem die synthetische Aktivität für Kollagen Typ II, Kollagen Typ IX, Kollagen Typ XI, Kollagen Typ VI und Aggrekan gesteigert wird (Poole AR 1999). Das veränderte Verhalten der Chondrozyten in der Osteoarthritis wird durch verschiedene Anzeichen wie z.B. Fibrillenbildung, Abbau der Knorpelmatrix, Clusterbildung von Chondrozyten und Veränderungen in der Quantität, Zusammensetzung und Struktur der Knorpelmatrix deutlich (Pritzker et al. 2006). Die phänotypische Modulation der Chondrozyten spiegelt sich vor allem in der Präsenz von Kollagenen wie z.B. Kollagen Typ X, welches normalerweise nicht im Knorpel oberhalb der Tidemark vorkommt oder durch Differenzierungsgene der Knorpelentwicklung wider (Tchetina et al. 2005).

1.2.6 Die Rolle der Entzündung: Welche Signalmoleküle gibt es und woher kommen sie?

Osteoarthritis wird nicht als eine klassische entzündliche Gelenkerkrankung betrachtet, weil es keine neutrophilen Granulozyten in der Gelenkflüssigkeit und keine systemische Manifestation der Entzündung gibt. Osteoarthritis geht jedoch oft mit Entzündungssyndromen einher, wie z.B. Gelenk-Schmerz, -Schwellung, hin zu erheblichen funktionellen Einschränkungen -Steifheit bis und Arbeitsunfähigkeit (Felson 2006). Eine wichtige Rolle spielt die Synovitis in der frühen und späten Osteoarthritis. Sie wird begleitet von einer Infiltration mit aktivierten Bund T-Lymphozyten und einer Überexpression von Entzündungsmediatoren (Benito et al. 2005). Die Synovitis ist wahrscheinlich eine der Faktoren, die zu einer Dysregulation der Chondrozytenfunktion und zu einem Ungleichgewicht zwischen anabolischen und katabolischen Aktivitäten der Chondrozyten im "turnover" der Knorpelmatrix führt (Ekenstedt et al. 2006). Invitro- und in-vivo-Studien haben gezeigt, dass Chondrozyten mit verschiedenen Zytokinen und Chemokinen reagieren, welche in osteoarthritischem Gelenkgewebe bzw. der Gelenkflüssigkeit präsent sind, die sie auch selbst produzieren können.



Abb. 4: Mediatoren in der Pathogenese der Osteoarthritis; modifiziert nach: Samuels et al. 2008, S. 245; IL1: Interleukin 1, IL8: Interleukin 8, NO: Stickstoffmonoxid, PGE 2: Prostaglandin E2, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor α , TGF- β : Transforming Growth Factor β , BMP-2: Bone Morphogenetic Protein 2, MMP-13: Matrixmetalloproteinase 13, TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteinases.

Die Beziehung zwischen dem ansteigenden Level von katabolischen Enzymen und Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Stickstoffmonoxid, dem Gehalt Tumor-Nekrose-Faktor-α von Interleukin-1β (IL-1β) und $(TNF-\alpha)$ in osteoarthritischer Gelenkflüssigkeit und Gelenkgeweben ist gut dokumentiert, obwohl die genauen Mechanismen für die Initiation der Synthese von inflammatorischen Mediatoren noch unklar sind. Wahrscheinlich sind aber ungewöhnliche mechanische und oxidative Belastungen involviert. Chondrozyten im osteoarthritischen Knorpel, speziell die in Clustern, bilden Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-1β-Convertingenzyme und Typ-1-IL-1-Rezeptor (IL-1RI). IL-1 wird von Chondrozyten in einer Konzentration synthetisiert, welche imstande ist, die Expression von MMPs, Aggrekanase, und anderen katabolischen Genen zu induzieren. Außerdem ist IL-1 mit TNF-α, MMP-1, -3, -8 und -13 und Kollagen Typ II in Regionen des osteoarthritischen Knorpels kolokalisiert, in denen gerade ein Martixabbau stattfindet (Tetlow et al. 2001). Zusätzlich zur Synthese von MMPs

und anderen Proteinasen führen IL-1 und TNF-α zu einer gesteigerten Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2), indem sie die Expression oder die Aktivität der Cyclooxigenase-2 (COX-2), der mikrosomalen PGE-Synthetase-1 (mPGES-1) Phospholipase A2 stimulieren. Weiterhin stimulieren sie Stickstoffund der monoxid-Synthetasen (iNOS oder NOS2), wodurch es zu einer ansteigenden Produktion von Stickstoffmonoxid kommt. IL-1ß induziert ebenfalls die Synthese von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF), IL-17, IL-18 und Chemokinen wie IL-8. Außerdem unterdrückt IL-1β die Expression einer Reihe von Genen, die in differenzierten Chondrozyten exprimiert sind, wie z.B. Kollagen Typ II A1 (Goldring SR und Goldring MB 2004). Chondrozyten bilden verschiedene Chemokine und Chemokinrezeptoren, welche zu einem Knorpelabbau beitragen könnten (Borzi et al. 2004). IL-17, ein T-Lymphozyten-Produkt, stimuliert die Synthese von anderen proinflammatorischen Zytokinen und hat die gleichen Effekte auf die Chondrozyten wie IL-1 (Lubberts et al. 2005).

Viele von diesen Faktoren reagieren, im Sinne eines Synergieeffektes (Barksby et al. 2006). Die Hochregulation von IL-1β über die COX2-, MMP13- und NOS2-Genexpression in Chondrozyten und auch anderen Zelltypen wird durch Induktion und Aktivierung von vielen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF-kB, C/EBP, AP-1 und ETS-Familienmitglieder, ermöglicht. Diese Transkriptionsfaktoren sind generell an Stress- und Entzündungsreaktionen beteiligt (Goldring MB et al. 2006).

1.2.7 Katabolisch versus Anabolisch: Was verändert sich?

Die Effekte von abnormaler mechanischer Belastung und Synovitis können zu einer Dysregulation der Chondrozytenfunktion beitragen, vor allem gibt es ein Ungleichgewicht zwischen katabolischen und anabolischen Aktivitäten der Chondrozytenfunktion beim Umbau der Knorpelmatrix. Die Vorstellung der ansteigenden Synthese von Proteinasen, wie MMP-1, -3, -8, -13 und "А Aggrekanasen, speziell Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin-5 " (ADAMTS-5) und gleichzeitigen Knorpelschäden ist etabliert (Cawston und Wilson, 2006). Der lokale Verlust von Proteoglykanen und die Spaltung von Kollagen Typ II tritt als erstes an der Knorpeloberfläche auf, führt zu einem erhöhten Wassergehalt und zu einem Verlust der Zugbelastung der

Knorpelmatrix. Es gibt Grund zu der Annahme, dass es in tiefer gelegenen Regionen des artikulären Knorpels zu einem kompensatorischen Anstieg der Kollagen-Typ-II-Synthese kommt (Tchetina et al. 2007). Genomische und proteomische Analysen des Knorpels haben den ansteigenden Gehalt von Kollagen Typ II bestätigt (Bau et al. 2002). Der erhöhte Gehalt von anabolischen Faktoren wie BMP-2, inhibin bA/activin, Mitglieder der TGF-ß Familie (Yamada et al. 2003) und Prostaglandine (Tchetina et al. 2006), deuten ebenfalls auf diese Mechanismen hin. Dennoch haben Aigner et al. 2006 gezeigt, dass die Expression vom Kollagen-Typ-II-Gen (COL2A1) in höher gelegenen osteoarthritischen Knorpelregionen unterdrückt wird und mit einer Matrixzerstörung einhergeht, obwohl die globale COL2A1 Genexpression in späten Stadien der Osteoarthritis, im Gegensatz zum gesunden Knorpel und frühen Stadien der Osteoarthritis, erhöht ist. Bedeutend ist, dass sich der Knorpel abbaut und der Chondrozyt nicht in der Lage ist, die komplexen ursprünglichen Anordnungen von Kollagen zu regenerieren (Goldring MB et al. 2006).

1.2.8 Welche Rolle spielt der subchondrale Knochen?

Zusätzlich zum Verlust des artikulären Knorpels, ist die Osteoarthritis charakterisiert durch eine verstärkte subchondrale Sklerosierung, Bildung von Osteophyten und sogenannten subchondralen Geröllzysten (Hill et al. 2001). Außerdem kommt es an der Kontaktstelle vom subchondralen Knochen und artikulären hyalinen Knorpel zu einer Vaskularisierung und zu einem Fortschreiten dieser, in die Region der Tidemark, was zu einem weiteren Abfall der Knorpeldicke führt (Lane et al. 1977). Eine neue Studie zeigt, dass die Angiogenese in der osteochondralen Kontaktstelle unabhängig von einer synovialen Angiogenese und einer Synovitis ist, aber immer in Verbindung mit Knorpelschäden und klinischen Erkrankungszeichen auftritt (Walsh et al. 2007). strukturellen Veränderungen können einen Anhaltspunkt für die Diese Modifikation der Kontur der angrenzenden Gelenkoberfläche darstellen (Radin und Rose, 1986). Die begleitenden Veränderungen im subchondralen Knochenumbau können ferner zu der Entwicklung eines ungünstigen biomechanischen Umfelds und zu einer progressiven Zerstörung des artikulären Knorpels beitragen.

Die Veränderungen im Mineralgehalt und Dicke des kalzifizierten Knorpels und

15

das vorrücken der Tidemark können Ausdruck der Lokalisation von KollagenTyp X A1, MMP-13 und Runx2 in den tieferen Regionen des osteoarthritischen Knorpels sein. Dort haben die Chondrozyten das Bestreben den Defekt zu reparieren, wobei sie dann einen hypertrophen Phänotyp darstellen (Wang et al. 2004). Obwohl der Rezeptoraktivator von NFkB (RANK), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, RANK ligand (RANKL) und der löslische Rezeptor Osteoprotegrin (OPG), welche die Osteoklastendifferenzierung und Aktivität regulieren, in adulten artikulären Chondrozyten exprimiert sind, wurde ihnen keine direkte Funktion im Knorpel zugeschrieben (Komuro et al. 2001).

Interessanterweise ist die von Runx2 abhängige Expression von RANKL in hypertrophen Chondrozyten an der Grenze zum kalzifizierten Knorpel in der Wachstumsfuge nachweisbar (Kishimoto et al. 2005). Obwohl die Inhibition von RANKL nicht direkt die Knorpelzerstörung hemmt, sind dieser Inhibition jedoch indirekte Effekte für die Knochenprotektion zuzuschreiben (Pettit et al. 2001).

Unterstützend für das Konzept der modifizierten biologischen Aktivitäten im subchondralen Knochen von Patienten mit Osteoarthritis ist die Identifizierung von Polymorphismen in dem Gen welches für Asporin kodiert. Asporin hemmt den Knorpelanabolismus indem es an TGF-β bindet (Seki et al. 2005). Weiterhin gibt es Polymorphismen in FRZB-Gen, welches sFRP3 codiert (Kelman et al. 2006). Mitglieder der sFRP-Familie, auch sFRP3, sind Glykoproteine, die mit Wnt-Liganden um den gleichen Membranrezeptor konkurrieren. Mit der Aktivierung von ß-Catenin im adulten Knorpel, werden die Chondrozyten hyperthroph, die Matrix mineralisiert, es kommt zur Expression von VEGF, ADAMT-5, MMP-13 (Tamamura et al. 2005). Die fehlerhafte Inhibition der Wnt-Signaltransduktion zum FRZB Polymorphismus kann die normale Homöostase stören und zu abnormen Knorpel- und Knochenmetabolismus führen. Das GADD45b-Protein, ein Mediator für das Zellüberleben und für die Expression von MMP-13 und Kollagen Typ X A1 in hypertrophen Chondrozyten in der Wachstumsfuge, kann ebenfalls als Mediator, der den Chondrozytenphänotyp in osteoarthritischen Knorpel verändert, betrachtet werden (ljiri et al. 1995).

1.2.9 Therapie der Osteoarthritis

Die konservative und operative Behandlung der Osteoarthritis zählt zum wichtigsten Aufgabenbereich der Orthopäden. 6,77 Milliarden Euro wurden für die

Behandlung von Osteoarthritis in Deutschland im Jahr 2004 aufgewandt Im Folgenden wird eine Übersicht der Behandlungsmöglichkeiten dargestellt (Krugluger und Knahr 2001), wobei erwähnt werden muss, dass die operativen Behandlungsmöglichkeiten, ausgenommen die Endoprothesen, nur bei jungen Patienten Erfolg versprechen.

konservative Behandlungsmöglichkeiten:

Medikamentöse perorale	SMOAD's (symptom modifiing osteoarthritis drugs):	
Therapie:	Schmerz- und Entzündungsreduktion; z.B.	
	Kortikosteroide	
	DMOAD's (disease modifying osthearthritis drugs):	
	nehmen Einfluss auf das Substrat des	
	Krankheitsprozesses; z.B. Chondroprotektiva	
lokale Salbenbehandlung	z.B. Voltaren	
intraartikuläre Therapie	Injektion von Kortikosteroiden, Hylane oder bzw.	
	und Lokalanästhetika	
physikalische Therapie	Elektrotherapie, Physiotherapie, Ergotherapie,	
	Mechanotherapie, Thermotherapie,	
	Magnetfeldtherapie, pulsierende Signalfeldtherapie,	
	Laserbehandlung	

Tab. 1: konservative Behandlungsmöglichkeiten der Osteoarthritis, Krugluger und Knahr 2001.

operative Behandlungsmöglichkeiten:

autologe osteochondrale	Hierbei wird in einem arthroskopisch vorgebohrten
Transplantation bzw.	Loch ein an anderer gesunder Stelle
Mosaikplastik	ausgestanzter Knochenknorpelzylinder
	eingepflanzt.
allogene osteochondrale	Sind durch ihre begrenzte Vitalität limitiert.
Transplantate	
Transplantation von	Periost, Perichondrium und besonders
chondrogenen Strukturen	Rippenperichondriumknorpel
Replantation von	Dabei wird nach Anfrischung eines
kultivierten Chondrozyten –	osteochondralen

autologe Chondrozyten-	Defektes dieser mit einem Periostlappen
Transplantation	wasserdicht abgedeckt und mit einer
	Chondrozytensuspension/
	Suspension chondrogener pluripotenter
	Stammzellen unterspritzt.
Osteotomien	Eine unikompartimentelle Knorpelschädigung bei
	einer biomechanisch relevanten Fehlstellung ist
	durch gezielte Neu-Osteosynthese zu korrigieren.
Endoprothesen	Gelenksflächenersatz durch Endoprothesen,
	ist die am häufigsten angewandte Methode in den
	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis.
Debridement	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung
Debridement Mikrofrakturierung, Pridie-	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung Der subchondrale Markraum wird eröffnet und
Debridement Mikrofrakturierung, Pridie- Bohrung, Beck`sche	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung Der subchondrale Markraum wird eröffnet und Fibroblasten haben die Möglichkeit, einzuwandern
Debridement Mikrofrakturierung, Pridie- Bohrung, Beck`sche Bohrung	 ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung Der subchondrale Markraum wird eröffnet und Fibroblasten haben die Möglichkeit, einzuwandern und Faserknorpel zu bilden; jedoch sind diesem
Debridement Mikrofrakturierung, Pridie- Bohrung, Beck`sche Bohrung	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung Der subchondrale Markraum wird eröffnet und Fibroblasten haben die Möglichkeit, einzuwandern und Faserknorpel zu bilden; jedoch sind diesem Verfahren wegen unzureichender Stabilität und
Debridement Mikrofrakturierung, Pridie- Bohrung, Beck`sche Bohrung	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung Der subchondrale Markraum wird eröffnet und Fibroblasten haben die Möglichkeit, einzuwandern und Faserknorpel zu bilden; jedoch sind diesem Verfahren wegen unzureichender Stabilität und Belastbarkeit des gebildeten Faserknorpels
Debridement Mikrofrakturierung, Pridie- Bohrung, Beck`sche Bohrung	ist die am häufigsten angewandte Methode in den späten Stadien der Osteoarthritis. Knorpelglättung Der subchondrale Markraum wird eröffnet und Fibroblasten haben die Möglichkeit, einzuwandern und Faserknorpel zu bilden; jedoch sind diesem Verfahren wegen unzureichender Stabilität und Belastbarkeit des gebildeten Faserknorpels Grenzen gesetzt

Tab. 2: operative Behandlungsmöglichkeiten der Osteoarthritis, Krugluger und Knahr 2001.

1.3 Laminine

1.3.1 Überblick

Laminine sind große heterotrimere Glykoproteine (Colognato und Yurchenco 2000), welche mit Nidogen-1, -2, Kollagen Typ IV und Perlekan die Hauptbestandteile von Basalmembranen ausmachen. Sie bilden eine besondere extrazelluläre Matrix (Kalluri 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Hauptbestandteile der Basalmembran in der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe der Maus vorhanden sind (Kvist et al. 2008).

1.3.2 Struktur und Nomenklatur

Es gibt drei verschiedene Erscheinungsformen der Laminin Heterotrimere, die kreuzförmigen, Y-förmigen und stabförmigen. Alle bekannten Laminine bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Es gibt fünf α -, drei β - und drei γ -Untereinheiten von Laminin. Aktuell sind fünfzehn verschiedene heterotrimere Anordnungen von Laminin bekannt (Colognato und Yurchenco 2000), welche unten in neuer und alter Nomenklatur unterschiedlich benannt werden.

Alte Nomenklatur (Burgeson et al.	Neue Nomenklatur (Aumailley et al.
1994)	2005)
Laminin-1	Laminin α 1 β 1 γ 1
Laminin-2	Laminin α 2 β 1 γ 1
Laminin-3	Laminin α 1 β 2 γ 1
Laminin-4	Laminin α 2 β 2 γ 1
Laminin-5	Laminin α 3A β 3 γ 2
Laminin-5B	Laminin α 3B β 3 γ 2
Laminin-6	Laminin α 3 β 1 γ 1
Laminin-7	Laminin α 3 β 2 γ 1
Laminin-8	Laminin α 4 β 1 γ 1
Laminin-9	Laminin α 4 β 2 γ 1
Laminin-10	Laminin α 5 β 1 γ 1
Laminin-11	Laminin α 5 β 2 γ 1
Laminin-12	Laminin α 2 β 1 γ 3

Laminin-14	Laminin α 4 β 2 γ 3
Laminin-15	Laminin α 5 β 2 γ 3

Tab.3: Lamininnomenklaturen

Laminin-1, -2, -3, -4, -10, -11, -12 und -15 sind kreuzförmig. Laminin-6, -7, -8, -9 und -14 sind Y-förmig. Laminin-5 ist stabförmig (Colognato und Yurchenco 2000). Die α-Ketten enthalten alle eine große, 100kDa, COOH-terminale, globuläre G-Domäne. Von dieser G-Domäne gibt es fünf verschiedene, welche den fünf a-Untereinheiten entsprechen. Außerdem enthält jede α -Kette eine große coiled-coil Domäne (I/II), welche die heterotrimere Anordnung mit den entsprechenden Domänen der β - und v-Kette ermöglicht (Sasaki und Timpl 2001). Die Laminin- α 1, -α2, -α3B und -α5 Ketten enthalten einen kurzen Arm, der aus alternierenden globulären Domänen besteht (IVa, IVb, VI) und eine stabförmige Domäne (IIIa, IIIb, V). Die Laminin-α3A- und -α4-Kette haben sehr kurze Arme. Die Lamininα3A- und die Laminin-α3B-Ketten werden von einem Gen kodiert und werden durch alternative Promotoren in zwei verschiedene Formen exprimiert. Die Laminin-β-und -y-Ketten enthalten ebenfalls die Domänen I, II, V und VI, jedoch nicht die Domänen III und IV. Der Unterschied zwischen den Lamininß- und den γ-Ketten besteht in dem sogenannten α-Loop zwischen den Domänen I und II der Laminin- β -Kette. Den Laminin-y-Ketten fehlt diese Struktur (Miner 2008).

Alle Laminin-Ketten haben ein N-terminales Sekretionssignal, und gelangen nach ihrer Biosynthese zum endoplasmatischen Retikulum. Es wird vermutet, dass sich die einzelnen Untereinheiten im endoplamatischen Retikulum zu Heterotrimeren anordnen. Dann werden sie glykosyliert und in den extrazellulären Raum abgegeben. In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, dass die N-terminale Domäne die Polymerisation zu Netzen, über intermolekulare Wechselwirkungen, indiziert (Yurchenco und Cheng 1993).



Laminins-1,2,3,4,10,11,12,15

Abb. 5: Die drei Lamininkonformationen (Miner 2008, S.350)

1.3.3 Laminin in der Basalmembran und im Knorpelgewebe

Die Basalmembran ist phylogenetisch betrachtet eine hoch konservierte Struktur (Hohenester und Engel 2002). Laminin ist schon lange, als eines der vier Hauptbestandteile von Basalmembranen, wie auch Kollagen Typ IV, Nidogene und Perlekan, bekannt. Basalmembranen sind spezialisierte Strukturen der extrazellulären Matrix, mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm (Kalluri 2003). Basalmembranen sind unterhalb von Epithelien und Endothelien lokalisiert. Sie verschiedene Zellen, wie z.B. Schwannzellen. Muskelzellen, umgeben Adipozyten, periphere Nervenzellen und teilweise auch Zellen des zentralen Nervensystems (Timpl und Aumailley 1989). Allerdings weicht die molekulare Zusammensetzung in den unterschiedlichen Geweben voneinander ab, so dass sie an die jeweiligen Bedingungen der verschieder Gewebe angepasst sind. Besonders weicht die Zusammensetzung der Laminin-Ketten voneinander ab (Yurchenco et al. 2004). Basalmembranen spielen eine wichtige Rolle für den Zellmetabolismus, die Zellpolarität, -differenzierung, -migration, die Filtration in der Niere und für verschiedene Prozesse in der Embryonalentwicklung (Timpl und Aumailley 1989). Die Malignität von verschiedenen Tumoren wird dadurch gekennzeichnet, dass sie in der Lage sind die Basalmembran enzymatisch, durch

Matrixmetalloproteinasen, zu zersetzen, wodurch eine Metastasierung erst möglich wird.

Im Elektronenmikroskop erscheinen Basalmembranen als dreischichtige Strukturen. Direkt unter den Zellen liegt die hell erscheinende Lamina lucida, ihr liegt die etwas dunkler erscheinende Lamina densa an und darunter befindet sich die Lamina fibroretikularis (Quondamatteo 2002).

Basalmembranen bestehen aus einem stabilisierenden Kollagen Typ IV Netzwerk und einem flexibleren Netzwerk aus Laminin. Diese beiden Netzwerke sind miteinander über Linker-Proteine wie Nidogene verbunden. Außerdem können die einzelnen Bestandteile der Basalmembran an Rezeptoren auf den angrenzenden Zellmembranen binden (Miosge et al. 2000).

Verschiedene Untersuchungen an Mäusen haben ergeben, dass das Lamininnetzwerk absolut notwendig ist um intakte Basalmembranen auszubilden (Costell et al. 1999). Es wurde gezeigt, dass Nidogene nicht notwenig als Zwischenglied zwischen Laminin und Kollagen Typ IV in der Basalmembran sind. Fehlt ein Nidogen, kann es durch das Andere kompensiert werden. Fehlen beide Nidogene, wird trotzdem eine Basalmembran ausgebildet (Miosge et al. 2002). Perlekan ist ebenfalls nicht zwingend notwendig für die Ausbildung einer Basalmembran (Costell et al. 1999). Kollagen Typ IV Mutationen zeigten trotz des Todes der Maus Anordnungen von Basalmembranen (Poschl et al. 2004).

Außerhalb von Basalmembranen wurden verschiedene Laminine im Mäusen Knorpelgewebe von nachgewiesen, so wie auch andere Hauptbestandteile der Basalmembran, Nidogen, Kollagen Typ IV und Perlekan (Kvist et al. 2008).

1.3.4 Rezeptoren

Es ist nicht möglich die Funktion der Laminine zu verstehen, wenn man nicht die entsprechenden Rezeptoren kennt mit denen sie interagieren. Diese Rezeptoren werden in Integrine und Nicht-Integrin-Rezeptoren eingeteilt.

Integrine sind Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche eine Signaltransduktion in die Zelle ermöglichen, wenn ein Ligand bindet. Über Integrine kann die Zelle also mit der extrazellulären Matrix kommunizieren (Belkin und Stepp 2000).

Folgende	Integrine	interagieren	mit Lamininen	(Sasaki und	Timpl 2001):
- 5				1	P /

Laminin-1	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-2	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -αVβ3
Laminin-3	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-4	Integrin $\alpha 1\beta 1$, $-\alpha 2\beta 1$, $-\alpha 3\beta 1$, $-\alpha 6\beta 1$, $-\alpha 6\beta 4$, $-\alpha V\beta 3$
Laminin-5	Integrin α1β1, -α2β1, -α6β1, -α7β1, -αVβ3
Laminin-6	Integrin α1β1, -α2β1, -α6β1, -α7β1, -αVβ3
Laminin-7	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-8	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-9	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-10	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-11	Integrin α1β1, -α2β1, -α7β1, -αVβ3
Laminin-12	Integrin α1β1, -α2β1, -α7β1, -αVβ3
Laminin-13	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-14	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3
Laminin-15	Integrin α1β1, -α2β1, -α3β1, -α6β1, -α6β4, -α7β1, -
	αVβ3

Tab.4: Lamininrezeptoren.

Zu den Nicht-Integrin Rezeptoren gehören Dystroglykan (Henry und Campell 1999), Syndekan (Hoffman et al. 1998) und Lutheran (Moulson et al. 2001).

1.3.5 Embryonalentwicklung:

Laminin-1 und Laminin-10 sind die einzigen Laminine. die in der Embryonalentwicklung, z.B. während der Gastrulation, exprimiert werden. Die embryonale Basalmembran trennt das Ektoderm vom viszeralen Endoderm. In dieser Basalmembran sind Laminin-1 und Laminin-10 präsent. Weiterhin ist in der Reichert's Membran Laminin-1 gezeigt worden. An Laminin-a5-Knockout-Embryos, welche kein Laminin-10 synthetisieren können, wurde gezeigt, dass Laminin-1 den Ausfall von Laminin-10 kompensieren kann (Miner et al. 1998). Gibt es Mutationen in den Genen für Laminin-β1 oder Laminin-γ1, so dass weder Laminin-1 noch Laminin-10 synthetisiert werden kann, ist das letal für die Embryonen (Miner et al. 2004, Smyth et al. 1999).

Die Betrachtung verschiedener Laminin Mutationen bestätigt, wie wichtig Laminin-1, Laminin-10 und die Basalmembran für diverse Entwicklungsprozesse sowie für die Organentwicklung und die Organfunktion sind.

Auf der Basis dieser Betrachtungen kann man folgende Feststellungen machen:

- Laminin-1 ist notwendig f
 ür fr
 ühe Periimplantationsabl
 äufe, wie z.B. die Gastrulation.
- Die anderen Laminine sind wichtig f
 ür die postnatale Organentwicklung und Gewebespezialisierung (Miner 2008).

1.4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es als erstes zu zeigen, dass Laminin-1 und Laminin-10 im humanen hyalinen Knorpel vorkommen. Hierfür wurden lichtmikroskopische Methoden zum Nachweis oben genannten Laminine auf Proteinebene sowie auf mRNA-Ebene im gesunden und erkrankten humanen hyalinen Knorpel durchgeführt.Auf Proteinebene wurden diese Laminine ebenfalls im Primodialskelett des Menschen nachgewiesen.

Außerdem sollten mögliche Unterschiede von Laminin-1 und Laminin-10 im gesunden und osteoarthritischen Knorpel mittels elektronenmikroskopischer Darstellung des Proteins und quantitativer Erfassung von mRNA durch quantitative real-time RT-PCR dargestellt werden.

Um Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung auf das Zellverhalten durch Chondrozyten-Laminin-Interaktionen zu finden, welche für die Knorpelintegrität in der Osteoarthritis eine Rolle spielen könnten, wurden in-vitro-, aber auch in-vivo-Methoden angewandt.

2 Material und Methoden

2.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie von Laminin-1 und Laminin-10 auf Protein-Ebene im humanen Knorpelgewebe und humanen embryonalen Gewebe

2.1.1 Allgemeines zur Methode

Im Folgenden sind zwei verschiedene Methoden erklärt, welche für den Nachweis der Laminin- α 1, - α 5, - β 1 und - γ 1 Untereinheiten (indirekte Methode und PAP-Methode) benutzt wurden. Diese Methoden beruhen darauf, die nachzuweisenden Proteine mithilfe von Antikörpern in einem Gewebeschnitt sichtbar machen zu können. Sie unterscheiden sich methodisch vor allem in der Anzahl der benutzten Antikörper und darin, dass bei der indirekten Methode gekoppelte Antikörper und bei der PAP-Methode ein Enzym-Anti-Enzym-Immunkomplex verwendet wird.

Zuerst wird der primäre Antikörper, der sich direkt gegen das gesuchte Antigen richtet auf den Schnitt gegeben. Danach wird ein sekundärer Antikörper auf das Gewebe pipettiert, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Dieser kann entweder schon mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt sein und im nächsten Schritt mit z.B. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) sichtbar gemacht werden (= indirekte Methode). Oder er wird auch als Brückenantikörper bezeichnet und ist somit eine Verbindung zum darauf folgenden tertiären Antikörper. Dieser ist ein Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Komplex, d.h. er besteht aus dem Enzym Meerrettich-Peroxidase und einem Antikörper gegen die Peroxidase. Dieser Antikörper ist aus der gleichen Spezies wie der primäre Antikörper und kann somit eine Verbindung zum Brückenantikörper eingehen (= PAP-Methode). Auch hierbei wird im nächsten Schritt DAB genutzt um eine farbliche Reaktion sichtbar zu machen.

Das Prinzip der DAB-Reaktion beruht darauf die Meerrettich-Peroxidase mit H_2O_2 reagieren zu lassen, wodurch O_2 und $2H_2O$ entsteht. Das O_2 wiederum reagiert mit dem DAB zu einem unlöslichen braunen Reaktionsprodukt. Das Problem möglicher unspezifischer Reaktionen ist hierbei die endogene Peroxidase in den Zellen des Gewebes. Dies kann damit verhindert werden, dass man zu Beginn die endogene Peroxidase mit H_2O_2 in Methanol blockiert.

Die Gewebeschnitte sind hier in Paraffin eingebettet worden, sodass es sein

kann, dass das Antigen für den Antikörper möglicherweise maskiert ist. Auch kann das gesuchte Antigen durch Verbindungen zu anderen Proteinen oder Kollagenen blockiert sein. Hierfür gibt es verschiedene Vorverdau-Möglichkeiten mit unterschiedlichsten Enzymen die für jedes nachzuweisende Antigen neu ausprobiert werden müssen. Um die Antigenbindungsstellen für die Lamininuntereinheiten freizulegen wurden zum einen Protags I (Biocyc GmbH, # 401602092) eingesetzt. Diese Lösung ist ein Antigenverstärker, allerdings ist nur dem Hersteller bekannt, woraus es besteht. Weiterhin wurde Protease XXIV, Hyaluronidase und Chondroitinase genutzt, um mögliche Bindungsstellen an den Proteinen freizulegen.

2.1.2 Gewebepräparation

Humane Feten und gesunder humaner Gelenkknorpel wurden, entsprechend den Anordnungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, gesammelt. Die Feten wurden wie folgt klassifiziert: Gestationswoche (GW) 11. Die GW's wurden entsprechend den Carnegie-Stadien eingeteilt (Muller und O'Rahilly 1987). Es wurden keine Fehlbildungen oder andere Abnormalitäten gefunden.

Krankes Knorpelgewebe von Patienten mit späten Stadien der Osteoarthritis, ohne Zeichen rheumatoider Veränderungen, wurde von 3 Patienten (Alter zwischen 65-75 Jahre) gewonnen, welche eine Knie-Total-Endo-Prothese eingesetzt bekamen. Das Knorpelgewebe wurde direkt nach Entfernung in einer 1:1 PBS/DMEM-Lösung gegeben und danach sofort weiterverarbeitet. Alle den "American College Patienten entsprachen of Rheumatologv"-Klassifikationskriterien für Knie-Osteoarthritis (Altman et al. 1986). Sie gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben und wurden über die Ziele dieser Studie aufgeklärt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt. Für die lichtmikroskopische Gewebepräparation (Koelling et al. 2006) wurden die Osteoarthritis-Knie zuerst makroskopisch in einen noch gesund-aussehenden Bereich (= intaktes Areal) und in einen Defekt-Bereich (=Osteoarthritis-Defekt) eingeteilt. Daraufhin wurden mithilfe eines Skalpells ca. 1 x 0,5cm große Knorpelstücke aus den jeweiligen Bereichen ausgeschnitten. Hierbei wurde auch darauf geachtet, dass ein Teil des darunter liegenden Knochens mit entfernt wird.
Diese Präparation galt auch für den ganz gesunden Knorpel. Sowohl die Embryos als auch die ausgeschnittenen Knorpelpräparate wurden sofort in gepuffertes Formalin überführt.

gepuffertes Formalin nach Lillie, pH 7,4: 37% Formalin (Merck; # 3997) 100 ml 333 ml 0,3 M Sörensen Puffer 566 ml aqua dest. 0,3 M Sörensen, pH 7,4: Lösung A Lösung B (Kaliumdihydrogenphosphat): (Di-Natriumhydrogenphosphat): 41,37 g KH₂PO₄ 42,58 g Na₂HPO₄ 1 | aqua dest. \rightarrow bei 4°C |agern 1 I aqua dest. \rightarrow bei RT lagern → für fertigen 0,3 M Sörensen Puffer 18,2 ml Lsg. A + 81,8 ml Lsg. B mischen.

Die Fixierung wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Danach wurden die Knorpelstücke aufgrund des noch anliegenden Knochens für ca. 4 Wochen in 20% EDTA zur Entkalkung überführt.

20% EDTA, pH 7,4:

895 ml aqua dest.

105 ml 5N NaOH

200 g EDTA (Sigma-Aldrich, E5134)

 \rightarrow in brauner Flasche auf einem Magnetrührer bei ~50-70°C für 1-2h rühren bis Lsg. klar.

 \rightarrow pH kontrollieren und bei RT lagern.

Pro Knorpelstück wurden 50ml der EDTA-Lsg. dazugegeben. Diese wurde täglich gewechselt. Nach vollständiger Entkalkung wurde der Knorpel, wie auch die Embryos direkt nach der Fixierung, für mindestens 3 Tage in 70% Ethanol überführt und bei 4°C gelagert. Das dann folgende Einbettungsprotokoll, mit den aufsteigenden Alkoholreihen und Xylol für die Dehydrierung der Präparate, bis hin zum Paraffin, wurde sowohl für die Embryos, als auch die Knorpelpräparate

mithilfe eines Einbettungsautomaten (Duplex Processer, Shandon Elliot, Cheshire, England) wie folgt durchgeführt.

Position 1	70% Ethanol	3 h
Position 2	80%Ethanol	1 h
Position 3	90% Ethanol	1 h
Position 4	96% Ethanol	1 h
Position 5	abs. Ethanol	2h
Position 6	abs. Ethanol	2 h – nur für embryonales Gewebe
	Isopropylalkohol	2 h – nur für adultes Gewebe
Position 7	Isopropylalkohol	1,5 h
Position 8	Xylol	30 min
Position 9	Xylol	45 min
Position 10	Xylol	45 min
Position 11	Paraplast Plus (52°C)	6h (60°C)
Position 12	Paraplast Plus (56°C)	7h (60°C)

Die Präparate wurden dann einzeln in spezielle Formen gelegt und mithilfe einer Ausgießstation in Paraffin eingebettet. Über Nacht konnte das Paraffin bei Raumtemperatur aushärten und die Paraffin-Blöcke konnten für die lichtmikroskopischen Untersuchungen weiterverwendet werden.

Für die histopathologische Klassifikation der Knorpelstücke aus Osteoarthritis-Gewebe wurden Serienschnitte des Knorpels mit einem Jung Biocut 2035-Mikrotom (Leica, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Jeder 5. Schnitt wurde auf einen Objektträger überführt und über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Dann wurden sie mithilfe der Hämalaun-Eosin-Färbung bzw. der Toluidinblau-Färbung in einem Färbeautomaten (Stainix DiaPath, Weinkauf Medizintechnik, Deutschland) angefärbt. Die Hämalaun-Eosin-Färbung diente dabei der rein strukturellen Analyse des Knorpelgewebes. Die Toluidinblau-Färbung diente dem Nachweis von *Glykosaminoglykan (*GAG's) der im Knorpel vorhandenen Proteoglykane. Hierdurch konnte die von Pritzker et al. (2006)

Material & Methoden

vorgeschlagene Grad-Einteilung des Osteoarthritis-Gewebes vorgenommen werden. Auch der gesunde Knorpel wurde dementsprechend untersucht um eine vielleicht schon beginnende Osteoarthritis auszuschließen. Die Protokolle der Färbungen und die Rezepte der Färbe-Lösungen sind weiter unten tabellarisch aufgelistet. Die Objektträger werden in eine für den Automaten spezielle Halterung eingehängt. Der erste Schritt – das Entparaffinieren der Schnitte mit Xylol – wurde per Hand durchgeführt. Dabei wurde die Objektträger-Halterung für 15 min in ein Xylolbad eingehängt. Die folgenden Schritte wurden dann mithilfe des Automaten durchgeführt.

Hämalaun (nach Meyer):	0,04% Toluidinblau O:
(Merck, # 1.09249)	0,04g Toluidin Blue O (Sigma-Aldrich,
\rightarrow Kann in der gekauften Konzentration	# T3260)
genutzt werden	100ml 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4
	[3 M Natriumacetat Puffer (Sigma-
	Aldrich, # S2404) \rightarrow 4 ml des Puffers
	auf 120 ml aqua dest. $ ightarrow$ mit HCL auf
	pH 4 einstellen]
0,1% Eosin Y :	0,1% Fast Green FCF:
1g Eosin Y (AppliChem, # A0822,0025)	0,1g Fast Green FCF (Sigma-Aldrich,
1 I aqua dest.	# F7258)
\rightarrow vor der Färbung 2 Tropfen Eisessig	100ml aqua dest.
dazugeben	

Hämalaun-Eosin-Färbung		Toluidinblau-Färbung	
abs. Ethanol	5 min	abs. Ethanol	4 min
80% Ethanol	10 min	80% Ethanol	4 min
aqua dest.	5 min	aqua dest.	2 min
Hämalaun (nach	4 min	0,04% Toluidinblau O	10 min
Meyer)			
aqua dest.	1 min	aqua dest.	2 min
fließend Wasser	15 min	fließend Wasser	1 min
0,1% Eosin Y	7 min	0,1% Fast Green FCF	2 min
aqua dest.	1 min	fließend Wasser	1 min
80% Ethanol	5 min	aqua dest.	2 min
abs. Ethanol	2 min	80% Ethanol	2 min
abs. Ethanol	2 min	abs. Ethanol	5 min
Xylol	3 min	Xylol	3 min

Nach den Färbungen wurden die Objektträger mit Deckgläschen und einem Einbettmedium (Eukitt, Sigma-Aldrich, #03989) eingedeckt. Danach wurden die Objektträger kurze Zeit bei Raumtemperatur getrocknet. Die Präparate konnten dann histopathologisch mittels Lichtmikroskop (PrimoStar, Zeiss, Göttingen, Deutschland) beurteilt werden.

2.1.3 Protokoll

Die Objektträger wurden in eine Halterung eingehängt und in folgender Reihenfolge rehydriert:

- 1.15min Xylol
- 2.10min Xylol
- 3.5min abs. Ethanol
- 4.5min 96% Ethanol
- 5.5min 90% Ethanol
- 6.5min 80% Ethanol
- 7.5min 70% Ethanol
- 8.5min 50% Ethanol
- 9.10min 1xPBS zum Spülen.

Nach jedem der folgenden Schritte wurden die Schnitte in einer Standküvette je 1x mit 1xPBS für 10min bei Raumtemperatur gewaschen.

Die Objektträger wurden für 45min bei Raumtemperatur in eine Küvette mit 70ml Methanol und 700µl 30%iges H_2O_2 zum Blocken der endogenen Peroxidase gestellt. Die Küvette wurde mit Aluminiumfolie, wegen der Empfindlichkeit der Reaktion von H_2O_2 mit der endogenen Peroxidase gegenüber Licht, abgedeckt. Danach folgte der erste Vorverdau mit Protaqs I für 20min bei 60°C. Eine Petrischale wurde mit Filterpapier ausgelegt und dieses mit aqua dest. angefeuchtet. Die Petrischale wurde mit einem Deckel abgedeckt und für alle weiteren Schritte benutzt. Die Objektträger wurden nach dem Waschen einzeln aus dem PBS genommen und vorsichtig – ohne das Präparat zu beschädigen – um den Schnitt herum mit Filterpapier abgewischt. Die Objektträger wurden in die Petrischale gelegt, und es wurden ca. 50-100µl Hyaluronidase 0,2% in 1x PBS auf den Schnitt pipettiert und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nacheinader ca. 50-100µl Protease XXIV und Chondroitinase auf den Schnitt pipettiert und jeweils 10min bei Raumtemperatur inkubiert.

Protease XXIV, pH 7,6: 25 mg Protease XXIV (Sigma-Aldrich, P8038) 45 ml aqua dest. 25 mg CaCl₂ 5 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6

0,05 MTris-HCl, pH 7,6: 6 g Tris Base 250 ml aqua dest. 36 ml 1N HCl → auf 1l mit aqua dest. auffüllen

Chondroitinase ABC: In 100ml aq. dest. werden gelöst: 0,61g Tris NH₂C(CH₂OH)₃ (50mM, pH 8.0) 0,492g Natriumacetat C₂H₃NaO₂ (60mM) (Merck Nr. 1.06264) 0,02g BSA (0,02%) (Sigma A9647) 1 Unit Chondroitinase (Sigma C2905) wird in 1ml dieses Ansatzes gelöst

Hyaluronidase: 6,66 ml einer 0,3 M Sörensen-Pufferlösung (s. Puffer/Lsg. oder Fix LM) werden mit aq. dest. auf 100ml aufgefüllt (Endkonz.: 0,02 M Phosphatpufferlsg.) 0,45g NaCl (77mM) 0,01g BSA (0,01%) 100mg Hyaluronidase (1mg/ ml) (Sigma H3506)

Nach dem Vorverdau wurden die primären Antikörper vorbereitet. Sie wurden 1:100 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt. Pro Schnitt wurden 50-100 μ l Antikörper verwendet. Die primären Antikörper wurden für über Nacht bei RT inkubiert. Als Negativ-Kontrolle – um unspezifische Bindungen der sekundären Antikörper oder des PAP-Komplexes zu erkennen – wurden die Schnitte nur mit 1% BSA in PBS (pH 7,4), ohne den primären Antikörper inkubiert. Danach wurden die Schnitte für den Laminin- α 1 (Miosge et al. 1995) und - β 1-Nachweis

(Chemicon, # MAB1928) für 1h mit einem sekundären anti-rat-Antikörper/HRPgekoppelt (Dako, # P0450) inkubiert. Der Antikörper wurde 1:100 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt und davon wieder 50-100µl auf jeden Schnitt pipettiert. Für den Nachweis von Laminin- α 5 (Aumailley et al. 1987) wurden die Schnitte mit einem 1:50 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnten Anti-Rabbit Brückenantikörper (Dako, # Z0196) (50-100µl/Schnitt) für 30min behandelt. Danach folgte ein Rabbit-PAP-Komplex (Dako, # Z0113). Dieser wurde 1:150 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt und 50-100µl/Schnitt auf die Schnitte pipettiert und für 30min inkubiert. Für Nachweis von Laminin-y1 (Acris, #AM00391PU-N) wurde die Schnitte mit einem 1:50 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnten Anti-Maus Brückenantikörper (Dako, # Z0259) (50-100µl/Schnitt) für 30min behandelt. Danach folgte ein Mouse-PAP-Komplex (Dako, # P0850). Dieser wurde 1:150 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt und 50-100µl/Schnitt auf die Schnitte pipettiert und für 30min inkubiert. Die nächsten Schritte sind für alle vier Antikörper wieder identisch. Die Schnitte wurden mit 200µl/Schnitt DAB in der Petrischale für 10min behandelt. Die Petrischale wurde dabei wieder lichtundurchlässig mit Aluminiumfolie umschlossen.

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Sigma FAST[™] DAB-Tabletten, Sigma-Aldrich, # D4293)

1 Tablette DAB

1 Tablette H₂O₂

5 ml aqua dest.

 \rightarrow immer frisch ansetzen! \rightarrow im Dunkeln aufbewahren \rightarrow kanzerogen!

Die Reaktionen wurden nach 10min mit 1xPBS gestoppt. Um das nicht-angefärbte Gewebe sichtbar zu machen, wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer (Merck, # 1.09249) durchgeführt. Um die Gegenfärbung nicht zu stark werden zu lassen, wurde das Hämalaun 1:4 mit aqua dest. verdünnt. Die Objektträger wurden 10sek in der Lösung geschwenkt. Danach wurden sie in einer Küvette 10min unter fließendes Wasser gestellt, um das überschüssige Hämalaun abzuwaschen. Die Schnitte wurden dann in einer Alkoholreihe wie folgt dehydriert:

- 1. 5min 50% Ethanol
- 2. 5min 70% Ethanol
- 3. 5min 80% Ethanol
- 4. 5min 90% Ethanol
- 5. 5min 96% Ethanol
- 6. 5min abs. Ethanol
- 7. 5min Xylol (2x)

Danach wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt, getrocknet und konnten Lichtmikroskopisch beurteilt werden.

2.2 In-Situ-Hybridisierung

2.2.1 Sondenbau zur in-situ-Hybridisierung von Laminin

2.2.1.1 Allgemeines zur Methode

Der Sondenbau dient der Herstellung spezifischer Nukleotidsequenzen bei der die hergestellten Antisense-Sonden den exakten komplementeren Gegenstücken (Hybriden) für die Laminin- α 1, - α 5, - γ 1 bzw. - β 1 mRNA entsprechen. Die Sense-Sonde hingegen ist zu dem mRNA-Strang identisch, kann somit nicht an diesen binden, und wird als Kontrolle genutzt.

Die Primer, welche auch für PCR's genutzt werden, werden hier jeweils vor dem 5'-Ende mit spezifischen T7- (Antisense) bzw. T3 (Sense)-Nukleotidsequenzen erweitert (= Promotor-primer). Dann wird mithilfe einer PCR ein gewünschtes Produkt angefertigt. Die Produkte werden danach entweder mit einer spezifischen T3 Polymerase für die Sense-Sonde oder mit einer T7 Polymerase für die Antisense-Sonde transkribiert. Gleichzeitig werden die dabei entstehenden Sonden mit Digoxigenin markiert. Hierdurch kann die Sonde dann später mithilfe eines Antikörpers (Anti-DIG; Alkalische-Phosphatase-gekoppelt) markiert und die Alkalische Phosphatase mittels NBT/BCIP-Färbelösung angefärbt werden. Beim Sondenbau ist die Färbung zum Abschluss für die Ermittlung der Konzentration der Sonden, bzw. der Effizienz der Sondenmarkierung wichtig.

2.2.1.2 PCR

Die Laminin-Primer wurden vor dem 5`-Ende mit spezifischen T7- (Antisense) bzw. T3 (Sense)-Nukleotidsequenzen verlängert. Die spezischen Sequenzen wurden zu Operon Biotechnologie GmbH (Operon Biotechnologie GmbH, Köln, Deutschland) gesendet. Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und mit Nuklease-freiem H_2O resuspendiert. Auch hier wurde mittels Gradienten-PCR die Annealing-Temperatur ermittelt.

	T7 + reverse	T3 + forward	Annealing
Zielgen	(5´→ 3´)	(5´→ 3´)	(°C)
Longinin			
Laminin	taatacgactcactatagggaga	aattaaccctcactaaagggaga	
α5	agacagtccctcttggagga	actgtgacatctgcacggc	62,5
Laminin	taatacgactcactatagggaga	aattaaccctcactaaagggaga	
α1	cacctctccttacaactcttgacc	ctacctgggttcatacggca	55,5
Laminin	taatacgactcactatagggaga	aattaaccctcactaaagggaga	
ß1	accctctcctctgcctcaa	cacaacttcccaaagcaa	63
Laminin	taatacgactcactatagggaga	aattaaccctcactaaagggaga	
γ1	ttggataggaattgccctga	gcatctctcgagtggtcctc	55,5

Für den PCR-Ansatz wurde cDNA aus der Plazenta verwendet, da hier aufgrund der vorkommenden Basalmembranen viel Produkt erwartet werden konnte. Die PCR wurde mithilfe der Hotstartaq-Polymerase von Qiagen durchgeführt und wurde wie folgt angesetzt.

Ansatz PCR:

- 2 µI dNTP-Mix (10mM Fa. Roche)
- 2 µI T3-Promotorprimer (100pMol Fa. Roth)
- 2 μI T7-Promotorprimer (100pMol Fa. Roth)
- 10 µl PCR-Puffer (Qiagen, Kit # 203605)
- 10 µl Q-Solution (Qiagen, Kit # 203605)
- 2 µl cDNA (1ng/µl)
- 0,5 µl HotStarTaqPlus-Polymerase (Qiagen, Kit # 203605)
- 71,5 µl DEPC-Wasser füllt auf 100µl Volumen auf

PCR-Protokoll:

Initiale Denaturierung	5min	95°C	
Denaturierung	45sek	94°C	
Anlagerung	45sek	50-68°C	40 Zyklen
Verlängerung	1min	72°C	
Letzte Verlängerung	10min	72°C	
	ø	4°C	

Das PCR-Produkt wurde danach in einem Agarose-Gel überprüft.

Agarose-Gel:

0,75 g Agarose

50 ml 1x TAE-Puffer

 \rightarrow aufkochen

→ mit 8µl Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzen

50x TAE-Puffer:

242 g Trishydroxyaminomethan/Tris-Base (Merck, # 1.08219)

57,1 ml Eisessig

18,61 g EDTA in 100ml aqua dest. Zugeben

→ auf 1000 ml mit aqua dest. Auffüllen

1x TAE-Puffer:10 ml 50x TAE-Puffer490 ml aqua dest.

Das noch flüssige Agarose-Gel wurde in einen Gelschlitten gegossen und für die Geltaschen wurde ein Plastikkamm in das Gel gehängt. Nach ca. 45min war das Gel ausgehärtet und die PCR-Produkte konnten in folgender Verdünnung in jeweils eine Tasche pipettiert werden.

10µl PCR-Produkt +

2µl Ladepuffer (Fermentas, # R0611)

Als Kontrolle wurden 10µl DNA-Leiter (Fermentas, # SM0321) in das Gel pipettiert. Die PCR-Produkte und die DNA-Leiter wurden bei 80V für ca. 40min elektrophoretisch in 1xTAE-Puffer aufgetrennt.

Nachdem eine deutliche Bande des gewünschten PCR-Produktes im Gel sichtbar war, wurde das restliche PCR-Produkt mit Micro-Spin S300 Säulen (Amersham, # 27-5130-01) aufgereinigt. Hierbei wurde der Bodenverschluss der Säule abgebrochen und der Deckel abgeschraubt. Die Säulen wurden in einem 1,5-ml-Eppendorfcup 2min bei 3000UpM zentrifugiert. Dann wurden die Säulen in ein neues Eppendorfcup überführt und das gesamte PCR-Produkt auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde erneut 2min bei 3000UpM in dem Eppendorfcup zentrifugiert. Das so gereinigte PCR-Produkt wurde in einem weiteren Agarosegel überprüft. Wenn die Banden auch nach dem Reinigen gut sichtbar waren, konnte es zum Sondenbau weiterverwendet werden.

2.2.1.3 In-vitro-Transkription und Labeln der RNA-Sonden

Die folgenden Schritte wurden genutzt, um mithilfe von zwei unterschiedlichen RNA-Polymerasen die Antisense- bzw. die Sense-Sonde für Laminin- α 1, - α 5, - γ 1 bzw. - β 1 herzustellen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze eingesetzt.

Antisense-Sonde:		Sense-Sonde:			
5x Transkriptionspuffer		4 µl	5x Transkriptionspuffer		4 µl
DTT (0,1M)		2 µl	DTT (0,1M)		2 µl
Dig-Labeling Mix (10x)		2 µl	Dig-Labeling Mix (10x) 2		2 µl
T7 RNA-Polymerase		2 µl	T3 RNA-Polymerase 2 µ		2 µl
RNase-Inhibitor		1 µl	RNase-Inhibitor		1 µl
Gereinigtes	PCR-	5 µl	Gereinigtes	PCR-	5 µl
Produkt		4 µl	Produkt		4 µl
DEPC-Wasser			DEPC-Wasser		
			1		

5x Transkriptionspuffer	(Fermentas, # EP0111)
DTT (0,1M)	(Boehringer Mannheim, # 1788558)
Dig-LabelingMix (10x)	(Roche, # 11277073910)
T7 RNA-Polymerase	(Fermentas, # EP0111)
SP-6 RNA-Polymerase	(Fermentas, # EP0131)
RNase-Inhibitor	(Fermentas, # EO0311)

DEPC-Wasser:

5 ml DEPC (= Diethylpyrocarbonat; kanzerogen)

1 l aqua dest.

- → ü.N. bei RT rühren
- \rightarrow autoklavieren \rightarrow danach ist das DEPC-Wasser ungiftig

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und anschließend für 2,5h bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert.

Die Polymerasen erkennen hier spezifisch die durch die PCR entstandenen

Produkte der vorher angefügten T7- oder T3-Primersequenzen. Dadurch wird in dem einen Eppendorfcup nur die Antisense-Sonde und in dem anderen die Sense-Sonde gebildet. Gleichzeitig werden die Sonden bei der Transkription mithilfe des Dig-Labeling Mix mit Digoxigenin markiert. Dies ist für den späteren Nachweis der Sonden wichtig.

2.2.1.4 Fällen der RNA

Um die entstandene RNA auszufällen, wurde den Proben jeweils 3µl 0,2M EDTA, 2,5µl 4M LiCl und 75µl abs. Ethanol hinzugefügt. Die Proben wurden dann 30min bei -70°C aufbewahrt.

0,2 M Ethylendiamintetraacetat:
0,74 g EDTA
10 ml aqua dest.
→ aliquotieren → bei -20°C lagern

4 M Lithiumchlorid:
1,69 g LiCl
10 ml aqua dest.
→ aliquotieren → bei – 20°C lagern

In dieser Zeit fällt die RNA aus und die Eppendorfcups wurden dann bei 14000UpM 30min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dann wurden 100µl 75% Ethanol zum Pellet dazugegeben, gemischt und 15min bei 14000UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und das Pellet soweit getrocknet, dass der Alkohol vollständig verdunstet war ohne dass das Pellet austrocknet. Das Pellet wurde danach mit 25µl DEPC-Wasser gemischt und die so entstandenen Sonden konnten bei -80°C weggefroren werden.

2.2.1.5 Dot Blot

Um die Effizienz der Sondenmarkierung zu bestimmen und eine Aussage über die Konzentration der Sonden machen zu können, wurde ein Dot Blot angefertigt. Dafür wurde eine Nylon-Membran (Amersham, # RPN2020N) in ein 4 x 5 cm großes Stück zugeschnitten und mit einem Bleistift in 4 x 5 Quadrate unterteilt. Von den Antisense- bzw. Sense-Sonden wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10000 hergestellt. Als Kontrolle wurde eine Digoxigenin-markierte Kontroll-RNA (Boehringer Mannheim, #1585746) mit einer bekannten Konzentration (100ng/µl) ebenso verdünnt.

Verdünnungsreihe der		Verdünnungsreihe der	
Sonden:		Kontroll-RNA:	
1µl Sonde		1µl K-RNA	1:10
+ 9µl DEPC-Wasser	= 1:10	+ 9µI DEPC-Wasser	(10ng/µl)
1µl Sonde 1:10		1µl K-RNA 1:10	1:100
+ 9µl DEPC-Wasser	= 1:100	+ 9µl DEPC-Wasser	(1ng/µl)
1µl Sonde 1:100		1µl K-RNA 1:100	1:1000
+ 9µl DEPC-Wasser	= 1:1000	+ 9µl DEPC-Wasser	(0,1ng/µl)
1µl Sonde 1:1000		1µl K-RNA 1:1000	1:10000
+ 9µl DEPC-Wasser	= 1:10000	+ 9µl DEPC-Wasser	(0,01ng/µl)

Sowohl von den unverdünnten Ansätzen, als auch von den Verdünnungen wurden dann je 1µl auf die Membran aufgetragen. Nachdem die Tropfen getrocknet waren, wurden sie mithilfe eines UV-Transilluminator auf der Membran fixiert und diese anschließend in eine Petrischale gelegt. Die folgenden Mengenangaben der Lösungen hingen von der Größe der Petrischale ab. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Membran immer von der Flüssigkeit überspült wurde. Die nächsten Schritte wurden alle bei RT auf einem Rüttler durchgeführt. Die Membran wurde kurz in 5ml Puffer I gespült. Danach wurden 5ml Puffer II, welcher Milchpulver zum Blocken unspezifischer Bindungen enthält, auf die Membran gegeben und diese für 30min inkubiert. Ein Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 mit Puffer II gemischt und 5ml dieser Lösung wurden mit der Membran für 30min inkubiert. Danach wurde 2x

mit Puffer I für 15min gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit Puffer III für 5min inkubiert und in dieser Zeit das Färbereagenz vorbereitet. Hierzu wurden in 5ml Puffer III 100µl NBT/BCIP Färbereagenz gelöst. Diese Lösung wurde auf die Membran gegeben und für maximal 10min inkubiert. Danach wurde die Färbung mit sterilem aqua dest. gestoppt. Nun wurden durch die Farbintensität die hergestellten Laminin-Sonden mit der Kontroll-RNA verglichen. So konnte die Konzentration der Sonden semi-quantitativ bestimmt werden.

Puffer I; pH 7,5:

12 g Trishydroxyaminomethan / Tris-Base (Merck, # 1.08219)

8,8 g NaCl

1000 ml aqua dest. \rightarrow pH einstellen \rightarrow autoklavieren

Puffer II; pH 7,5: 10 ml Puffer I (autoklaviert) 500 mg Milchpulver

Puffer III; pH 9,5:

6,0 g Trishydroxyaminomethan / Tris-Base

2,9 g NaCl

2,4 g MgCl₂ x 6 H₂O

500 ml autoklaviertes aqua dest.

 \rightarrow pH einstellen \rightarrow Lösung darf nicht autoklaviert werden, da das MgCl₂ ausfällt

Anti-DIG-alkalische Phosphatase:

1 µl Anti-DIG-AP (Roche, # 1093274)

4999 µl Puffer II

NBT/BCIP-Färbelösung:

100 µl NBT/BCIP Stocksolution (Roche, # 11681 451 001)

5 ml Puffer III

2.2.2 In-situ-Hybridisierung an Paraffinschnitten

Die Gewebepräparation ist identisch mit der lichtmikroskopischen Immunhistochemie von Laminin-1 und Laminin-10 auf Protein-Ebene. Die Paraffin-Schnitte wurden mithilfe eines Jung Biocut 2035-Mikrotoms (Leica), für die gesunden (n = 1) und auch Osteoarthritis- (intaktes Areal und Defekt) Knorpelpräparate (n = 3) angefertigt. Die Schnitte wurden für die in-situ-Hybridisierung auf Superfrostplus-Objektträger überführt, über Nacht in einem 37°C Wärmeschrank getrocknet, und konnten dann weiterverwendet werden.

2.2.2.1 Allgemeines zur Methode

Bei der hier verwendeten in-situ-Hybridisierung wird mithilfe von Digoxigeninmarkierten Sonden eine gesuchte Nukleinsäuren Sequenz in den Zellen direkt im Paraffin-Schnitt nachgewiesen. Dabei entspricht die Antisense-Sonde dem genauen Hybrid der gesuchten mRNA. Als Kontrolle wird eine Sense-Sonde benutzt, die der mRNA ähnelt und somit nicht an dieser binden kann.

Hierbei wird zuerst die Sonde mit den Schnitten inkubiert, wobei sowohl die richtige Temperatur (37-55°C), Zeit (1-16h) und Sondenkonzentration für die Hybridisierung gefunden werden muss. Je höher die Temperatur desto spezifischer wäre die Reaktion, da die Basen bei hoher Temperatur beweglicher sind und sich somit schneller wieder lösen. Nach der Hybridisierung folgt ein Waschschritt mit unterschiedlichem SSC, welches auch individuell eingestellt werden muss. Das SSC dient dazu die überschüssigen, nicht gut passenden Basenpaarungen abzuwaschen, d.h. je mehr gewaschen wird und je höher die Temperatur dabei, desto spezifischer wird die Reaktion. Die Konzentration des SSC ist hierbei auch von Bedeutung. Je niedriger die Konzentration des SSC desto stärker wird gewaschen und desto höher ist am Ende die Spezifität der Reaktion. Prinzipiell sollte man also mit niedrigen Hybridisierungstemperaturen, und hohen SSC-Konzentrationen beginnen, um zu sehen, wie gut und ob die Sonde überhaupt funktioniert. Auch bei der in-situ-Hybridisierung sind wie bei der Immunhistochemie verschiedene Vorverdaue möglich, falls die Antisense-Sonde gar keine oder nur sehr schwache Reaktionen zeigt. Das Digoxigenin der Sonden wird mithilfe eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers nachgewiesen. Dieser ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Da es auch hier aufgrund der endogenen Peroxidase somit zu unspezifischen Bindungen kommen kann, folgt der Hybridisierung ein Blocken der endogenen Peroxidase mit H₂O₂. Der Grund, dass nicht der schon für den Sondenbau genutzte Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper verwendet wurde, ist die Menge an Alkalischer Phosphatase im Knorpelgewebe, wodurch es zu noch stärkeren Hintergrundreaktionen gekommen wäre. Als Färbelösung für die HRP wurde hier das Substrat AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) benutzt. Hierdurch entstand bei positiver Reaktion eine Rotfärbung des Zytosols der Zellen. Das Färbeprinzip ist das gleiche wie mit DAB.

2.2.2.2 Protokoll für Laminin

Im Folgenden wird das Protokoll für die Laminin in-situ-Hybridisierung näher beschrieben. Alle Lösungen wurden einen Tag vor Beginn angesetzt, da die meisten autoklaviert wurden. Die verwendeten Küvetten, Messzylinder und -becher sind in einem Heizofen einen Tag zuvor für 4h bei 180°C ausgebrannt wurden.

Die Objektträger wurden für ca. 10min auf eine Heizplatte gelegt (~ 70°C), damit das Paraffin schmelzen konnte und sich die Schnitte im Verlauf nicht vom Objektträger gelöst haben. Danach wurden sie in eine Halterung gestellt und wie folgt entparaffiniert und rehydriert:

- 1. 15 min Xylol (2x)
- 2. 5 min Isopropanol
- 3. 5 min 90% Ethanol
- 4. 5 min 80% Ethanol
- 5. 5 min 60% Ethanol
- 6. 5 min 1x PBS (2x).

Währenddessen wurde eine Petrischale mit 70% Ethanol gereinigt, mit Filterpapier ausgelegt und mit autoklaviertem aqua dest. angefeuchtet. Die OT wurden in die Petrischale gelegt und es wurde wie folg ein Vorverdau durchgeführt, wobei von jedem Reagenz ca. 50-100µl pro Schnitt verwendet wurden.

- 1. 0,1M Glycin (inhibiert Proteasen, blocken des Backgrounds) in 0,1M Tris pH7,0
- 2. 5min 0,3% Triton x-100 (Sigma #T8787) in PBS (permeabilisiert & entfernt Lipide)
- 3. 5min 3x5min spülen in PBS
- 4. 5-30min bei 37°C 10µg Proteinase K/ml Tris/EDTA, pH 8,0 (100mMTris+50mM EDTA)
- 5. 1-3min in 4% Paraformaldehyd (Postfixierung & inaktiviert Proteinase K)
- 6. 10min in 0,25% Essigsäureanhydrid in 0,1M Trap pH 8,0 (reduziert den Background)

Nach jedem Schritt wurden die Objektträger mit PBS gewaschen.

Die Laminin-Sonden wurden in einem Thermoblock für 3min bei 65°C inkubiert und gleich danach in Eis gelegt, um mögliche Hybridisierungen, die in der Zeit der Lagerung entstanden sind, aufzubrechen. Die Laminin-Sonden wurden dann jeweils mit einer Hybridisierungslösung so gemischt, dass jeder Schnitt mit 50ng Sonde inkubiert werden konnte.

deionisiertes Formaid:
50 ml Formamid (Fluka, # 613339)
5 g Ionenaustauscher (Biorad, # 153-0022)
→ 30min, RT, rühren
→ 2x filtrieren
→ -20°C lagern

50% Dextransulfat:

- 20 ml aqua dest.
- 10 mg Dextransulfat (Amersham, # 170340)

→ bei 50°C lösen

→ -20°C lagern

100x Denhardt'sche Lösung:

- 2g BSA
- 2 g Polyvidon 25 (Serva, # 33420.02)
- 2 g Ficoll 400 (Amersham, # 170300)

100 ml aqua dest.

→ -20°C lagern

Hybridisierungslösung:

- 5 ml deionisiertes Formamid
- 2 ml 50%iges Dextransulfat
- 0,1 ml 100x Denhardt'sche Lösung
- 1 ml Lachs-Spermien-DNA (10mg/ml, Stratagene, # 201190-81)
- 0,25 ml t-RNA (10mg/ml, Ambion, # AM7119)

0,83 ml 30x SSC

30x SSC:

```
131,4 g NaCl
```

```
66,15 g Na<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) x 2H<sub>2</sub>O (Tri-Natrium-Citrat-dihydrat)
```

500 ml aqua dest.

→ pH mit 2M Zitronensäuremonohydrat einstellen

Die Objektträger wurden nach dem Rehydrieren nah um das Präparat – ohne es zu beschädigen – mit Filterpapier abgewischt. 50µl der Antisense- bzw. der Sense-Sonden wurden auf jeweils einen Schnitt pipettiert. Die Petrischale wurde abgedeckt und in einem Wärmeschrank bei 37°C ü.N. inkubiert.

Die Objektträger wurden am nächsten Tag in einer Küvette mit 2x SSC (2x für je 5min) gewaschen. Danach folgte das Blocken der endogenen Peroxidase mit 3% igem H_2O_2 bei Raumtemperatur in einer mit Aluminiumfolie abgedunkelten Küvette.

3% H_2O_2 : 10 ml 30% H_2O_2 90 ml aqua dest. \rightarrow mit Aluminiumfolie abdunkeln 20x SSC, pH 7,0: 87,6 g NaCl 44,1 g Na₃(C₆H₅O₇) x 2H₂O (Tri-Natriumcitrat-dihydrat) 500 ml aqua dest. → pH mit 2 M Zitronensäuremonohydrat einstellen → autoklavieren

2x SSC; pH 7,0: 10 ml 20x SSC 100 ml aqua dest.

Die Präparate wurden anschließend 2x für 5min mit 1xPBS gewaschen. Im Weiteren wurde ein Rabbit-anti-dig-HRP-Antikörper (Dako, # P5104) mit einem Blockierungsreagenz ("AK Diluent", Dako, # S3022) 1:50 verdünnt und je 50µl/Schnitt auf die Präparate pipettiert und für 1h im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Präparate wurden danach erneut 2x für 5min mit 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper "Envision" (Goat-anti-rabbit-HRP-Antikörper; Dako, # K4002) für 30min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser ist schon eine fertige Lösung und muss deshalb nicht weiter verdünnt werden, sondern es können 2 Tropfen direkt auf das Präparat gegeben werden. Die Präparate wurden danach erneut 2x für 5min mit 1xPBS gewaschen. Dann folgte die Sichtbarmachung mit der Färbelösung AEC (Dako, # K3464). wobei 2 Tropfen fertige Lösung des AEC auf je einen Schnitt gegeben wurde. Die Objekträger wurden für 45min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Präparate 2x je 5min mit agua dest. gewaschen. Die Kerne und die restliche extrazelluläre Matrix (EZM) wurden für 10sek mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt und die Schnitte dann für 5min unter laufendem Wasser gespült. Die Schnitte wurden danach mit "Aqueous Mounting Medium" (Dako, # S3025) und Deckgläschen eingedeckt. Die Objektträger wurden getrocknet und konnten dann lichtmikroskopisch beurteilt werden.

2.3 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Laminin-1 und Laminin-10, sowie Kolokalisation mit Integrinen in vivo auf Protein-Ebene im humanen Knorpelgewebe

2.3.1 Gewebepräparation

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde der Knorpel wie folgt präpariert und eingebettet (Miosge et al. 1994). Von den oberen intermediären Zonen des gesunden Knorpels und des intakten Areals bzw. des Defektes der Osteoarthritis wurden pro Patient 5 Knorpelstücke von je 1mm³ entnommen und in kleine Rollrandgläser überführt. Die Präparate wurden dann sofort mit je 4ml LR-Gold-Fixans fixiert.

LR-Gold-Fixans, pH 7,4:

20 ml 8% Paraformaldehyd

20 ml 0,3 M Sörensen-Puffer

0,8 ml 25% Glutaraldehyd

8% Paraformaldehyd, pH 7,4:

8 g Paraformaldehyd (Roth, # 0335.3)

100 ml aqua dest.

→ auf einem Magnetrührer bei 150°C kurz aufheizen, dann auf 60-70°C einstellen und 1h lang rühren. Wichtig: die Lösung darf nicht überhitzen!

ightarrow 1-2 Tropfen 1N NaOH langsam dazugeben bis die Lösung klar wird

→ Lösung abkühlen lassen und filtrieren

→ pH muss bei 7,4 liegen!

0,3M Sörensen Puffer, pH 7,4:

→ Rezept, s. Gewebepräparation Lichtmikroskopie

25% Glutaraldehyd:

→ käuflich zu erwerben, z.B. bei Serva (# 23114)

Da die Gewebestücke für die elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie weiter-verwendet werden sollten, wurden sie für nur 20min bei 4°C in dem Fixans

belassen und im Folgenden weiter in LR-Gold eingebettet. So ist gewährleistet, dass die Präparate zum einen noch eine gute Ultrastruktur behalten, sie zum anderen aber auch immunreaktiv bleiben.

Die Präparate wurden nach der Fixierung mit 0,15 M Sörensen-Puffer gewaschen. Dann wurden sie mit 10 mM Ammoniumchlorid-Lsg. In 0,15 M Sörensen-Puffer für 45min bei 4°C inkubiert.

0,15 M Sörensen-Puffer, pH 7,4 20 ml 0,3 M Sörensen-Puffer 20 ml aqua dest.

10 mM Ammoniumchlorid-Lsg., pH 7,40,053 g NH₄Cl100 ml 0,15 M Sörensen-Puffer

Im nächsten Schritt wurden die Präparate jeweils 3x 5min bei 4°C mit 0,15 M Sörensen-Puffer gewaschen. Danach wurden sie in einer Ethanol-Reihe wie folgt dehydriert.

- 1. 2ml 30% Ethanol für 15min bei 4°C
- 2. 2ml 50% Ethanol für 15min bei 4°C
- 3. 2ml 70% Ethanol für 15min bei 4°C

Die Präparate wurden dann für 1h mit purem LR-Gold bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde für 16h bei -20°C LR-Gold + 0,8% Benzil dazugegeben.

LR-Gold + 0,8% Benzil:

25 ml LR-Gold (Polysciences, Europe GmbH, # 17412)

0,2 g Benzil (= Beschleuniger) (Polysciences, Europe GmbH, # 01946)

 \rightarrow das Benzil benötigt ungefähr 15-30min bis es vollständig gelöst ist

Damit das LR-Gold/Benzil richtig aushärten kann, werden die Präparate am nächsten Tag einzeln in kleine Beem-Kapseln überführt. Die Kapseln werden bis über den Rand hinweg mit LR-Gold/Benzil aufgefüllt. So können sie luftdicht verschlossen werden, und in einem dafür vorgesehenen Ständer über Nacht mithilfe von UV-Licht bei -25°C aushärten. Die Blöcke wurden dann aus den Beem-Kapseln entfernt und konnten nun mit einem Reichert-Jung Ultracut E (Leica, Bensheim, Deutschland) weiter bearbeitet werden.

Zuerst wurden ca. 1µm dicke Semidünn-Schnitte mithilfe eines Diamantmessers (Schmied-Labortechnik, Bielefeld, Deutschland) angefertigt, auf einen Objektträger überführt, getrocknet und mit Richardson-Blau für 10sek auf einer Heizplatte bei 70°C angefärbt. Die überschüssige Richardson-Blau-Lösung wurde mit aqua dest. Abgespült und die Schnitte mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt.

Richardson-Blau:

<u>Lsg. A: 1% Azur II</u>	Lsg. B: 2% Methylenblau	<u>Lsg. C: 2% Borax</u>
1 g Azur II (Merck,	2 g Methylenblau (Merck,	2 g Na ₂ B ₄ O ₇ (Merck,
# 1.09211)	# 1.15943)	# 1.06309)
100 ml aqua dest.	100 ml aqua dest.	100 ml aqua dest.

→ 20 ml Lsg. A + 10 ml Lsg. B + 10 ml Lsg. C mischen

 \rightarrow filtrieren

Die Semidünn-Schnitte dienten hier nicht in erster Linie der späteren Auswertung oder Weiterverwendung. Sie dienten einzig der Orientierung in dem Gewebe, um herauszufinden wo in dem Schnitt die meisten Zellen liegen. Dadurch konnte der Block dann mithilfe einer Rasierklinge gezielt kleiner getrimmt werden, ohne die Zellen zu verlieren.

Danach wurden mit dem Diamantmesser 90nm dicke Ultradünn-Schnitte des jeweiligen Präparates angefertigt. Ungefähr 3 dieser Schnitte (abhängig von der getrimmten Größe) wurden auf einen vorher vorbereiteten Formvar-befilmten Nickelgrid gezogen.

0,3% Formvar:

0,3 g Formvar

100 ml Chloroform

- \rightarrow filtrieren
- \rightarrow in dunkler Flasche bei RT aufbewahren

Die Grids wurden dann in eine für sie vorgesehene Grid-Box gestellt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag konnten sie dann weiterverwendet werden.

2.3.2 Kolloidales Gold herstellen und Antikörper koppeln

In diesem Abschnitt soll genauer dargestellt werden, wie das kolloidale Gold hergestellt wurde. Daran anschließend wird das Koppeln der verschiedenen Antikörper an das Gold beschrieben.

2.3.2.1 Kolloidales Gold herstellen

Prinzipiell gibt es verschiedenste Möglichkeiten kolloidales Gold unterschiedlicher Größen herzustellen (Beesley 1989). Das genutzte Reduktionsmittel spielt dabei die ausschlaggebende Rolle. Für sehr kleine Goldpartikel (~ 3-8nm) kann z.B. weißer Phosphor benutzt werden. Größere Goldkugeln (8-64nm) können hingegen mithilfe von Tri-Natrium-Citrat hergestellt werden. Letztere Methode soll hier genauer beschrieben werden; sowohl für 8-nm-, 16-nm- und auch 20-nm-Goldkugeln.

Wie schon erwähnt, ist das Reduktionsmittel von Bedeutung; allerdings nicht nur, welches Reduktionsmittel man benutzt, sondern auch, wie viel man benutzt. Je mehr Reduktionsmittel zur Goldlösung hinzugegeben wird, desto kleiner werden die Goldkugeln. Das liegt daran, dass mehr Reduktionsmittel auch mehr Oberfläche benetzen kann und stabilisieren kann. Da ein bestimmtes Volumen von 8-nm-Gold-Lösung mehr Oberfläche besitzt als das gleiche Volumen 16-nm-bzw. 20-nm-Gold-Lösung, wird also für das kleinere Gold mehr Reduktionsmittel benötigt. Dies spiegelt sich auch in den folgenden Protokollen wieder.

Für 8-nm-Goldkugeln wurden in einem sterilen Zwei-Hals-Kolben, welcher an eine Rückflusskühlung angeschlossen war, 106ml 2,2 mM Tri-Natrium-Citrat mithilfe eines Brenners unterm Abzug erhitzt. Die Rückflusskühlung ist wichtig, damit das Volumen der Lösung im Verlauf des Kochens nicht kleiner wird, ansonsten würde die Goldkugelgröße am Ende zu stark variieren. Die Lösung sollte 5min lang sprudelnd kochen. Danach werden 955µl einer 1%igen Tetrachlorgoldsäure-Lösung dazu pipettiert. Das ganze muss dann mindestens 15min kochen. In den 15min muss sich die Farbe der Lösung von golden über dunkelgrau-schwarz, violett zu einem hellen Weinrot verändern. Erst wenn die Farbe durchgehend rot ist, ohne Violett-Stich ist das kolloidale Gold fertig.

Da sich für das Koppeln von Antikörpern ein pH von 9 bewährt hat, wurde das Gold nach dem Abkühlen mit ~650 μ I 0,2 M K₂CO₃ auf diesen eingestellt.

2,2 mM Tri-Natrium-Citrat:

0,65 g Na₃(C₆H₅O₇) x 2H₂O (Roth, # 3580.3)

1000 ml aqua dest.

1% Tetrachlorgoldsäure:

1 g HAuCl₄ (Roth, # 3867.1)

100 ml aqua dest.

0,2 M Kaliumkarbonat:

1,32 g K₂CO₃

40 ml aqua dest.

Für 16-nm-Goldkugeln wurden zuerst 49,5ml aqua dest. Mit 0,5ml 1%ige Tetrachlor-goldsäure in einem sterilen Zwei-Hals-Kolben auch wie oben mit einer Rückflusskühlung erhitzt. Die Lösung sollte 5min lang sprudelnd kochen. Danach wurde 1,2ml 1%ige Tri-Natrium-Citrat-dihydrat-Lösung dazugegeben und weitere 10min gekocht. Auch hier fand ein Farbumschlag zu einem hellen Rot statt. Die 16-nm-Goldkugeln wurden mit ca. 400µl 0,2 M K₂CO₃ auf einen pH von 9 eingestellt. Für 20-nm-Goldkugeln wird nur 1ml 1%ige Tri-Natrium-Citrat-dihydrat-Lösung dazugegeben. Der folgende Farbumschlag zeigt ein etwas dunkleres rot als bei den 16-nm-Goldkugeln.

1% Tri-Natrium-Citrat-dihydrat:

1 g Na₃(C₆H₅O₇) x 2H₂O (Roth, # 3580.3)

100 ml aqua dest.

2.3.2.2 Antikörper koppeln

Die hier benutzten Antikörper sind weiter oben tabellarisch aufgeführt. Für die elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie wurden anti-rat- und anti-rabbit-Antikörper an 16-nm-Gold (Bock et al. 2001) bzw. anti-mouse-Antikörper für die Kolokalisationsversuche an 8-nm-Gold (Miosge et al. 2000) gekoppelt. Die Stammlösung der Antikörper wurde 1:10 mit aqua dest. pH 9 (pH mit 0,2 M K₂CO₃ einstellen) verdünnt. Diese wurde dann für eine Verdünnungsreihe benutzt, um die optimale Menge an Antikörper herauszufinden, die benötigt wird, um eine bestimmte Menge Gold zu stabilisieren. Für die Verdünnungsreihe wurden in eine 96-well-Platte aufsteigende Mengen der verschiedenen Antikörper in die Wells pipettiert. Begonnen wurde mit $1\mu l \rightarrow 2\mu l \rightarrow$ usw.. Dazu wurde in jedes Well je 100µl des jeweiligen kolloidalen Goldes pipettiert und vorsichtig gemischt. Dann wurde 2min gewartet, damit sich der Antikörper an das Gold anlagern konnte. Danach wurden in jedes Well 100µl 10%iges NaCl dazugegeben.

10% Natriumchlorid:

10 g NaCl 100 ml aqua dest.

Da ungekoppeltes kolloidales Gold sehr empfindlich auf Elektrolyte reagiert und das Gold ausfällt, ist es bei unzureichenden Mengen an Antikörper zu einer Farbänderung von rot zu blau gekommen. Die Menge des Antikörpers, die diese Farbänderung nicht zeigte war die optimale Menge Antikörper, um 100µl Gold zu koppeln.

Für das eigentliche Koppeln wurde die 10-fache Menge des Antikörpers 1:10 mit aqua dest. pH 9 verdünnt, da hier nicht nur 100µl sondern insgesamt 1000µl Gold eingesetzt wurden.

Der Antikörper und die 1000µl Gold wurden in einen 2-ml-Eppendorfcup pipettiert, kurz geschüttelt und zum koppeln 2min stehen gelassen. Um das Gold danach noch maximal zu stabilisieren und damit für mindestens 2 Wochen verwendbar zu machen, wurden in den Eppendorfcup noch zusätzlich 1/10 des Gesamtvolumens des Antikörper-Goldes 10%iges BSA in PBS pH 9 pipettiert. Dazu kam danach noch 1%iges BSA in PBS pH 9, welches soweit aufgefüllt wurde, dass das Endvolumen insgesamt 1700µl betrug. Beispielrechnung (wenn 6µl 1:100 optimale Menge in Verdünnungsreihe):

60µl 1:10 verdünnter Antikörper

- + 1000µl Gold
- + 106µl 10%iges BSA in PBS pH 9
- + 534µl 1%iges BSA in PBS pH 9

<u>= 1700µl</u>

10% BSA in PBS pH 9:	1% BSA in PBS pH 9:	1% BSA in PBS pH 7,4:
10 g BSA	1 g BSA	1g BSA
100 ml 1x PBS	100 ml 1x PBS	100 ml 1x PBS

 \rightarrow pH 9 wird mit 0,2 M K₂CO₃ eingestellt. pH 7,4 wird kontrolliert.

10x PBS (pH 7,4):

- 81,8 g NaCl
- 2 g KCl
- 16 g Na₂HPO₄
- 2 g KH₂PO₄
- 1 I aqua dest.
- → pH überprüfen, ggf. mit HCl oder NaOH einstellen
- → für 1xPBS die Lsg. 1:10 mit aqua dest. verdünnen

Die Eppendorfcups mit dem 16-nm-Gold wurden danach mithilfe einer Zentrifuge bei 12000 UpM für 30min, das 8-nm-Gold dagegen mit 14000 UpM für 35min und das 20-nm-Gold bei 10000UpM für 25min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Eppendorfcups für 5min in einem Ständer stehen gelassen. Das sich am Boden des Eppendorfcups befindende Sediment (~15µl) wurde danach mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einen 1,5-ml-Eppendorfcup überführt. Zum Schluss wurde das Sediment 1:10 mit einer Hälfte 1% BSA in PBS pH 9 und mit der anderen Hälfte 1% BSA in PBS pH 7,5 verdünnt um das gekoppelte Gold länger haltbar zu machen. Das fertig-gekoppelte Gold konnte so ca. 2 Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden.

2.3.3 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie von Laminin- α 1 - α 5, - β 1 und - γ 1

Die Anfertigung der Ultradünn-Schnitte ist im Abschnitt "2.3.1 Gewebepräparation" beschrieben wurden. Die Immunogoldhistochemie wurde mit einem gesunden und drei Osteoarthritis Knorpelpräparaten durchgeführt.

2.3.3.1 Allgemeines zur Methode

Die hier angewandte Immunogoldhistochemie entspricht prinzipiell der indirekten Methode der oben beschriebenen Immunhistochemie. Dem primären Antikörper folgt ein sekundärer Antikörper mit dem Unterschied, dass hier der sekundäre an Goldkugeln gekoppelt wurde und auf diese Weise elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann. Das Re- und Dehydrieren, sowie das Blocken können hingegen entfallen. Grundsätzlich muss man bei dieser Methode mit allen Parametern spielen die es gibt, um am Ende eine spezifische Reaktion zu bekommen; z.B. die Verdünnung der Antikörper, die Inkubationszeit und die Temperatur. Auch bei dieser Methode können, wenn nötig, Vorverdau-Schritte verwendet werden. Die Protokolle müssen also individuell auf jeden Antikörper abgestimmt werden.

2.3.3.2 Protokoll

Für die Grids wird eine Petrischale mit Filterpapier ausgelegt und mit aqua dest. angefeuchtet. Auf das Filterpapier wird Parafilm gelegt. Danach wurden die primären Antikörper vor-bereitet.

Laminin- α 1 und - α 5 wurde 1:150 Laminin- β 1 1:200 und Laminin- γ 1 wurden 1:120 in 1% BSA in PBS (pH 7,4) verdünnt. Von jedem verdünnten Antikörper wurde 20µl/Grid auf den Parafilm pipettiert. Der Grid wurde dann mit einer Pinzette auf den Tropfen gelegt. Die Petrischale wurde abgedeckt und die Grids wurden für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Grids mit ca. 100ml/Grid 1xPBS abgespült und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier vorsichtig vom Grid abgezogen. Die sekundären Antikörper wurden wie oben beschrieben an 20nm kolloidales Gold gekoppelt und sind bereits 1:10 verdünnt. Für die Inkubation wurde sowohl der sekundäre Anti-Rat für Laminin- α 1und - β 1 als auch der Anti-Rabbit für Laminin- α 5 und der Anti-Mouse für Laminin- γ 1 und Integrin β 1 nochmals 1:20 mit 1x PBS verdünnt. Dadurch war die Verdünnung der Antikörper am Ende 1:200. Die Antikörper wurden wieder zu je 20 µl auf den Parafilm pipettiert und die Grids für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Grids mit ca. 100 ml/Grid aqua dest. abgespült und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier vorsichtig vom Grid abgezogen.

Als Negativ-Kontrollen wurde der primäre Antikörper weggelassen und stattdessen 1% BSA in PBS benutzt. Um eine mögliche Bindung von ungekoppeltem kolloidalem Gold an Gewebestrukturen auszuschließen, wurden die Grids nur mit purem kolloidalem Gold inkubiert.

Um die Gewebe im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen wurden die Grids kontrastiert. Dafür wurden 20 µl/Grid 1%iges Uranylacetat auf den Parafilm pipettiert und die Grids für 10min auf die Tropfen gelegt. Dann wurden die Grids mit ca. 100 ml/Grid aqua dest. abgespült und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier abgezogen. Danach wurde 20 µl/Grid Bleizitrat auf den Parafilm pipettiert und die Grids wieder für 10min auf die Tropfen gelegt. Da die Bleikugeln sehr schwer vom Grid abgehen, und sie den gesamten Grid verschmutzen können, wurde das Bleizitrat mit diesmal 250 ml/Grid aqua dest. abgespült. Die restliche Flüssigkeit wurde wieder mit Filterpapier vorsichtig vom Grid abgezogen.

1% Uranylacetat:

0,1 g Uranylacetat (Merck, # 1.08473)

10 ml aqua dest.

- \rightarrow Filtrieren \rightarrow 10 Tage verwendbar
- → leicht radioaktiv → Handschuhe!

Bleizitrat; pH 12:

1,33 g Pb(NO₃)₂ (Blei-II-nitrat, Sigma-Aldrich, # 22,862-1)

30 ml aqua dest.

 \rightarrow in 50 ml Messkolben lösen

1,76 g Na₃(C₆H₅O₇) x 2H₂O (Tri-Natrium-Citrat-dihydrat) dazugeben

→ 1min kräftig schütteln

→ 30min zur Umwandlung in Bleizitrat bei RT stehen lassen; gelentlich schütteln

8 ml 1N NaOH zugeben

→ mit aqua dest. auf 50 ml auffüllen und schütteln → das Bleizitrat löst sich → Filtrieren

Die Grids wurden in die Grid-Box zurückgestellt und für mindestens 20min getrocknet. Danach konnte die Immunogoldhistochemie mithilfe eines LEO 906 E Elektronenmikroskops analysiert und statistisch ausgewertet werden.

2.3.4 Statistik

In der statistischen Auswertung wurde zwischen gesunden Chondrozyten aus gesundem Knorpel (n=1) und erkrankten bzw. elongierten Chondrozyten jeweils aus dem intakten bzw. defekten Areal der OA (n=3) unterschieden. Jeweils 10 der verschiedenen Zelltypen, mit Nahaufnahmen der perizellulären Matrix, wurde pro Patient fotografiert. Dann wurde das perizelluläre Laminin welches mittels 20-nm-Goldkugeln sichtbar gemacht werden konnte, mithilfe von Schablonen in einem Areal von 2000 nm² ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählung wurden daraufhin für jeden Zelltyp aus den unterschiedlichen Arealen zu einem Mittelwert zusammengefasst und der Standardfehler berechnet. Um signifikante Unterschiede zwischen dem perizellulären Protein der verschiedenen Zelltypen und Areale festzustellen, wurde der Wilcoxon/Mann-Whitney Test für ungleiche Stichproben genutzt. Als signifikant wurden hierbei p-Werte \leq 0,05 angesehen.

2.4 Zellisolation und Zellkultivierung

Für den Nachweis, dass Chondrozyten mit Laminin über Rezeptoren interagieren und um zu untersuchen, welche Veränderungen eine Stimulation der Chondrozyten durch Laminin in ihren Genexpressionsmustern hervorruft, wurden die Zellen isoliert und kultiviert. Krankes Knorpelgewebe von Patienten mit späten Stadien der Osteoarthritis, ohne Zeichen rheumatoider Veränderungen, wurde von 3 Patienten (Alter zwischen 65–75 Jahre) gewonnen, welche eine Knie-Total-Endo-Prothese eingesetzt bekamen. Gesunder humaner Gelenkknorpel wurde, entsprechend den Anordnungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, von einem Patienten gespendet.

2.4.1 Zellisolation

Chondrozyten aus Osteoarthritis-Gewebe Bei der Isolation der wurde makroskopisch zwischen einem intakten Bereich und einem Defekt unterschieden. Unter sterilen Bedingungen wurde der Knorpel in einer Petrischale in Form von ca. 8mm² kleinen Stücken mithilfe eines Skalpells vorsichtig vom

Material & Methoden

darunter liegenden Knochen abgetrennt. Die Knorpelstücke wurden in 50-ml-Röhrchen überführt, 2x mit 1x PBS gewaschen und danach mithilfe einer Feinwaage gewogen. Das ermittelte Gewicht diente der Berechnung der benötigten Menge Verdaulösung. Dabei wurde für 500 – 1000mg Knorpelgewebe folgender Ansatz verwendet:

10 mg Kollagenase I (152 units/ml; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
10 mg Kollagenase II (280 units/ml; Biochrom, Berlin, Deutschland)
→ in 10 ml Kultivierungsmedium lösen

Die Lösung wurde durch einen CA & GF-Vorfilter (0,2µm; Nalgene, # 190-2520) steril filtriert.

Kultivierungsmedium:

- 500 ml DMEM (Gibco, # 21885)
- 50 ml FBS (Gibco, 10270-106)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (50000units/50mg; PAN Biotech, # P06-07100)

Die Knorpelchips wurden zusammen mit der Verdaulösung in eine sterile 15-ml-Glasflasche mit sterilem Magnetrührstab gegeben und im Zellkulturschrank bei 37°C auf einem Magnetrührer inkubiert. Da der Knorpel aus dem Osteoarthritis-Defekt eine weichere Konsistenz aufwies als der Knorpel aus dem intakten Areal und aus dem gesunden Knorpel, wurde der Verdau für 2h mit dem Knorpel des Osteoarthritis-Defektes und für 4h mit dem Knorpel des intakten Areals und aus dem gesunden Knorpe durchgeführt. Nach dem Verdau wurden die Lösungen jeweils durch ein Zellsieb (40µm; BD Biosciences, # 352340) in ein 50-ml-Röhrchen filtriert. Das Zellsieb diente hierbei der Entfernung größerer Zell-Matrixreste. Die Zellen wurden bei 1200UpM für 10min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen jeweils in 1ml 1x PBS verdünnt. Danach wurden die Zellen mithilfe eines Cellometers (AutoT4, PeqLab, Erlangen, Deutschland) gezählt.

2.4.2 Zellkultivierung

Nun wurden die Chondrozyten in großen Flaschen (75cm², Sarstedt, # 83.1813.002) in einer Konzentration von 3x10³ Zellen/cm² ausgesät und mit 10ml/großer Flasche Kultivierungsmedium versetzt. Das Kultivierungsmedium wurde alle zwei Tage ausgetauscht. Die Zellen wurden für zwei Wochen im Zellkulturschrank bei 37°C vermehrt, bis eine ausreichende Zellzahl für das Zelladhäsionsassay und die Alginatkultur erreicht wurde.

2.5 Zelladhäsionsassay

2.5.1 Allgemeines zur Methode

Die in-vitro-Zelladhäsionsassays wurden benutzt um die Adhäsionsfähigkeit der Chondrozyten aus den verschiedenen Osteoarthritis-Arealen an Laminin-1 zu untersuchen.

Das Prinzip beruht darauf in einer z.B. 96-well-Platte, die Wells mit aufsteigenden Mengen an Protein zu beschichten. Um die richtigen Proteinmengen zu finden, die nötig sind damit die Zellen haften, muss man verschiedene Ansätze ausprobieren. Um zusätzliche Bindungen der Zellen an noch freiem Plastik zu vermeiden, werden die Wells nach der Proteinbeschichtung mit 1% BSA in aqua dest. beschichtet. Gleichzeitig dienen nur mit BSA-beschichtete Wells als Negativkontrolle und unbeschichtete Wells als Positivkontrolle. Dann wird jeweils die gleiche Menge an Zellen in die Wells pipettiert. Die Zellen müssen hier in Serum-freiem Medium verdünnt sein, da das FBS die Zelladhäsion begünstigt und damit die Ergebnisse verfälschen würde. Auch die Dauer der Adhäsionsassays muss individuell an das jeweilige Protein und den Zelltyp angepasst werden. Mit steigenden Proteinkonzentrationen sollte auch die Menge an adhäsiven Zellen ansteigen.

2.5.2 Protokoll Zelladhäsionsassay

Die 96-well-Platten (Sarstedt, # 83.1835) wurden unter sterilen Bedingungen mit aufsteigenden Konzentrationen von Laminin-1 (0 – 8μ g/ml aqua dest.; 100 μ l/well) über Nacht bei 4°C beschichtet. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die

Wells mit je 100µl 1% BSA über Nacht, bei 4°C inkubiert.

1% BSA; pH 7,4:1 g BSA100 ml aqua dest. (steril)

Das BSA wurde abgesaugt, sobald die Chondrozyten in die Wells pipettiert werden konnten.

Die Chondrozyten wurden mit einem Cellometer gezählt. Je nach Anzahl der Zellen wurden die Zellen entweder weiter verdünnt, oder aber nochmals bei 1200UpM für 10min abzentrifugiert, mit 500µl Serum-freiem Medium verdünnt, gezählt und weiter verdünnt bis zu einer Zellkonzentration von 5000 Zellen/200µl. Die Zellen wurden zu je 200µl in die vorbereiteten Wells pipettiert und 3h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Wells 2x mit je 200µl 1x PBS vorsichtig gewaschen und danach die Zellkerne der adhäsiven Zellen mit 100µl/Well DAPI-Lösung im Dunkeln angefärbt.

DAPI:

5 µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)

5 ml aqua dest. (steril)

→ mit Aluminiumfolie abdunkeln

Die DAPI-Lösung wurde nach 10min abgesaugt und auf die Zellen 100µl/Well 1xPBS pipettiert. Dann wurden die Zellen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 40 CFL) manuell ausgezählt. Die gezählten Zellen aus der Negativkontrolle wurden von den Ergebnissen des eigentlichen Assays subtrahiert.

2.6. Vergleichende Genexpressionsanalyse von Chondrozyten nach Stimulation mit Laminin-1 in Alginatkultur

2.6.1 Alginatkultur

Um den Chondrozyten eine möglichst physiologische Umgebung zu bieten, wurden sie in Alginat eingebettet. Für die Alginatkultur wurden die Chondrozyten gezählt und zu je 60000 Zellen in 20µl 2,4% Alginat/0,15 M NaCl 1:1 gelöst und mit einer Hülsennpipette aufgenommen. Um die Auswirkungen von Laminin-1 zu untersuchen wurde die Alginatkultur in zwei Gruppen eingeteilt. Einmal wurden von jedem Patienten die Kugeln wie oben beschrieben hergestellt und einmal wurde zu jeder Kugel 2,5µg Laminin-1 als Protein hinzubegeben. Dann wurde die Suspension in 102 mM CaCl₂-Lösung für maximal 10min polymerisiert. Um eine möglichst runde Form der Kugeln zu gewährleisten musste hierfür der Kolben mit dem enthaltenen CaCl₂ leicht geschwenkt werden. Die entstanden Kugeln wurden dann vorsichtig mit einer 25ml Pipette abgesaugt und auf eine 24-Well-Platte gegeben. In ein Well kamen 5 Kugeln. Das restliche noch im Well vorhandene CaCl₂ wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und die Alginatkugeln zweimal mit NaCl gewaschen. Dann wurden zu den Kugeln 500µl DMEM 10% FBS, 1%P/S gegeben und bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Das Medium der Laminin-Gruppe wurde zusätzlich mit 2,5µg Laminin pro Well versetzt. Die Zellen wurden zehn Tage inkubiert. Danach wurden die Alginatkugeln in HEPES-EDTA-Puffer lysiert und die mRNA isoliert.

0,15M NaCl: 0,876 g NaCl 100ml aqua dest.

102mM CaCl₂: 1,132g CaCl₂ 100ml aqua dest.

2,4% Alginat: 0,12g Alginat 5ml auqa dest. HEPES-EDTA-Puffer: 55mM EDTA: 2,047 g EDTA 100 ml aqua dest. 10mM HEPES: 0,2383 g HEPES 100 ml aqua dest. beides 1:1 mischen

Alle Lösungen müssen steril filtriert werden!

2.6.2 Isolation der mRNA aus primären Zellen

Das Kultivierungsmedium wurde vorsichtig aus den 24-well-Platten abgesaugt. Anschließend wurden die Alginatkugeln mit PBS gewaschen. Nun wurden die Kugeln vorsichtig, in 15ml Röhrchen überführt und mit 1ml HEPES-EDTA-Lyse-Puffer aufgelöst. Danach wurden die Zellen für 10min bei 1200rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 350µl RLT-Puffer (Qiagen, # 79216) und 3,5µl ß-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, # 63689) gut gemischt und danach 350µl abs. Ethanol dazugegeben. Diese 700µl wurden auf eine RNAeasy Mini Säule (Qiagen, # 1011708) pipettiert, kurz durchzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die RNA bindet hier an eine Silicat-Membran und lässt sich hierdurch sehr einfach reinigen. Die folgenden Puffer wurden in die Säule pipettiert, danach zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

- 1. 700µl RW1-Puffer (Qiagen, # 1015763)
- 2. 500µl RPE-Puffer (Qiagen, # 1018013)

Danach wurden die Säulen in ein neues Sammelröhrchen gegeben und diese 1min bei 13600UpM trocken zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein Biopur 1,5ml-Eppendorfcup überführt. Direkt auf die Membran wurde 50µl RNAse-freies H₂O pipettiert und für 10min bei RT stehen gelassen. Dann wurde 1min bei 13600UpM zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss enthält die RNA. Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels eines Biophotometers (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) spektroskopisch vorgenommen. Hierzu wurden 2µl der RNA-Lsg. verwendet und die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen.

2.6.3 Umschreiben der mRNA in cDNA

Mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, # 205313) erfolgte die cDNA-Synthese der oben beschriebenen RNA wie folgt.

Das Endvolumen von 200µl sollte eine cDNA-Konzentration von 1ng/µl enthalten. Hierfür wurde die Menge an RNA berechnet die dafür eingesetzt werden sollte. Es wurde dabei davon ausgegangen, dass das reverse transkriptase Enzym einen Umsatz von 1:1 RNA zu cDNA erreicht.

Zunächst wurde die RNA in einem genomic DNA Wipeout Buffer bei 42°C für 2min inkubiert. Hierdurch konnte durch die darin enthaltenen DNasen die eventuell vorhandene genomische DNA eliminiert werden. Danach wurde die RNA mit einem Primer Mix, einem Puffer und Reverse Transkriptase für 15min bei 42°C inkubiert. Hier wurde die RNA zu cDNA umgeschrieben. Zum Schluss wurde die Reverse Transkriptase in 2min bei 95°C inaktiviert.

2.6.4 Quantitative real-time RT-PCR

2.6.4.1 Allgemeines zur Methode

Die quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) dient der Amplifikation bestimmter Nukleotidmatrizen, wodurch die Anzahl dieser bestimmt werden kann. Sie ist somit eine molekularbiologische Methode zur quantitativen Analyse der Transkription und Expression bestimmter Gene. Hierbei können schon geringste Mengen an Ausgangsmaterial zur Analyse ausreichen. Die PCR wird mittels einer hitzestabilen Taq-Polymerase und einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) durchgeführt und besteht aus mehreren Schritten.

- 1. Die DNA wird bei 95 °C in Einzelstränge denaturiert
- Dann folgt die Anlagerung der Primer an die DNA (Annealing). Die Temperatur ist individuell von jedem Primer selbst abhängig (siehe. "Gradienten-PCR").
- 3. Synthetisierung der Komplementärstränge (Verlängerung) durch die Taq-Polymerase und Einbau des SYBR-Green-Fluoreszenzfarbstoffes

Diese drei Schritte werden bis zu 45-mal wiederholt, wobei sich bei jedem Zyklus der Amplifikation die DNA theoretisch verdoppelt. Durch die Einlagerung des SYBR-Green in die DNA kann diese Amplifikation sichtbar gemacht werden.
Während der PCR ist ein Schwellenwert vom Programm festgelegt. Der Zyklus bei dem dieser Schwellenwert überschritten wird gibt den ct-Wert an (= threshold cycle). Aufgrund der Proportionalität der Fluoreszenz zu der eingesetzten Anzahl der DNA-Moleküle kann man mithilfe dieses ct-Wertes Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt des Zielgens ziehen. Das heißt, je höher die Menge an DNA-Molekülen in der Probe ist, desto früher wird der ct-Wert erreicht, bzw. je größer der ct-Wert desto weniger von der gesuchten DNA ist in der Probe.

2.6.4.2 Protokoll

Für die qRT-PCR wurde die gewonnene cDNA aus der Laminin Gruppe und der Gruppe ohne Stimulation durch Laminin (jeweils drei Patienten mit Osteoarthritis mit gesunden und defekten Areal und dem ganz gesunden Patienten) nach folgendem Schema vorbereitet.

	Pro Well	Mastermix (3x)
cDNA	10 ng	30 ng
Primer (for + rev)	je 20 pmol	je 60 pmol
SYBR-Green Mix	5 µl	15 µl
Nuklease-freies Wasser	auf 10µl auffüllen	auf 30µl auffüllen

Der Mastermix wurde danach in eine PCR-96-well-Platte zu jeweils 10µl/Well pipettiert. Die Wells wurden mit Optical Flat Caps verschlossen und die Platte dann kurz für 10sek anzentrifugiert, um zu gewährleisten, dass sich der gesamte Ansatz unten im Well befindet.

Die qRT-PCR wurde jeweils 3-mal mit 3-fachen Ansätzen mithilfe eines Mastercycler Realplex² S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und folgendem Protokoll durchgeführt:

Material & Methoden

2.6.4.3 PCR-Protokoll:			
Initiale Denaturierung	3min	95°C	
Denaturierung	20sek	95°C	
Anlagerung	20sek	53-63°C	45 Zyklen
(Annealing)			
Verlängerung	20sek	72°C	
Letzte Verlängerung	10min	72	
		°C	
	00	4°C	

2.6.5 Statistik

Die erforderliche Normalisierung der PCR-Daten erfolgte gegen die mRNA von chondrogenen progenitor Zellen (Koelling et al. 2009) mithilfe des Housekeeping-Gens HPRT-1 nach Pfaffl (2001). Da HPRT-1 in unseren Proben identische ct-Werte aufwies, wurde es als Housekeeping-Gen eingesetzt.

Um die Effizienz der PCR zu bestimmen wurde eine Standardkurve exemplarisch für HPRT-1 durch eine Standardverdünnungsreihe generiert. Als Standard-DNA wurde die cDNA der chondrogenen progenitor Zellen mit einer Konzentration von 1 ng/µl eingesetzt. Der Verünnungsbereich der cDNA lag zwischen 1:1 und 1:1000 (Verdünnungen jeweils in 1:10 Schritten). Diese wurden in den oben beschriebenen PCR-Ansatz von 10µl eingesetzt.

Zur weiteren Berechnung der Ratio, durch die ein Vergleich der Proben möglich ist, wurde sichergestellt, dass alle durch die qRT-PCR ermittelten Ergebnisse (ct-Werte) einer Intertest- und Intratest-Variationsbreite von $\leq 1\%$ unterlagen. Der relative Expressionsunterschied zwischen dem Housekeeping-Gen zur Referenzprobe, normalisiert durch das Referenzgen HPRT-1, wird hierbei aus der arithmetischen Formel E^{- $\Delta\Delta$ CT} (E = Effizienz der PCR) berechnet. Die Effizienz des HPRT-1 ergab einen Wert von 2,01. Die Effizienz der Referenzprobe wurde somit als 2 angenommen, woraus sich die Formel: 2^{- $\Delta\Delta$ CT} für die Bestimmung der Ratio ergab.

2.6.6 Primerdesign

Die Primersequenzen für die PCR wurden mithilfe der Primer3 shareware hergestellt. Alle Primersequenzen wurden mithilfe der Datenbank von NCBI Blast (Nucleotide-Nucleotide *Blast* (blastn), http://www.ncbi.nlm.nih.gov überprüft. Bei der Herstellung wurde auf folgendes geachtet. Die Primer sollten eine maximale Länge von 18-22 Basen nicht überschreiten und Guanin und Cytosin sollten einen Gehalt von ca. 50% aufweisen. Um auszuschließen, dass die Primer nicht auch Nukleotidsequenzen anderer Gene ähneln, wurden sie bei der Online-Datenbank von NCBI abgeglichen.

Die spezifischen Sequenzen wurden zu Operon Biotechnologie GmbH (Operon Biotechnologie GmbH, Köln, Deutschland) gesendet. Diese synthetisierte die Primer, welche lyophilisiert geliefert wurden. Die Primer wurden den Herstellerangaben nach mit Nuklease-freiem H₂O resuspendiert.

Zielgen	Reverse $(5^{\prime} \rightarrow 3^{\prime})$	Forward $(5' \rightarrow 3')$	Annealing Temperatur
			(°C)
Laminin α1	cacctctccttacaactcttgacc	ctacctgggttcatacggca	55,5
Laminin β1	accctctcctctgcctcaa	cacaacttcccaaagcaac	63
Laminin y1	ttggataggaattgccctga	gcatctctcgagtggtcctc	55,5
Laminin α5	agacagtccctcttggagga	actgtgacatctgcacggc	62,5
Kollagen I	cgtcatcgcacaacacct	ttcccccagccacaaagagtc	61
Kollagen II	accacgatcacccttgactc	ctcctggagcatctggagac	63
Kollagen IV	tttttcacccggtaatccag	ggagataaagggggctcaagg	61
Aggrekan	gtggaatgcagagg	acagctggggacat	60
Perlekan	taagctgcctccacgcttat	tcagtccttgtcaccatcca	61
Sox9	ccgttttaaggctcaaggtg	caggctttgcgatttaagga	60
Runx2	cagcgtcaacaccatcatt	ttccagaccagcagcactc	63
HPRT-1	ggtccttttcaccagcaagct	tgacactggcaaaacaatgca	61
Integrin β1	tttctggacaaggtgagca	ctgattggctggaggaatg	56
COMP	agctggagctgtcctggtag	agggagatcgtgcagacaa	61
Nidogen-1	tgagaatgtcgtatggaactgc	ctggggaaggtttattatcgag	61,6
MMP-13	ctatggtccaggagatgaag	agagtcttgcctgtatcctc	63
Osteonektin	aagtggcaggaagagtcgaa	cgagctggatgagaacaaca	62

Lipoprotein-	agoogogtgootgogot		50
lipase	yycayayiyaalyyyal	ayayucaadayaayuay	59

2.6.7 Gradienten-PCR

Um die für jeden Primer spezifische Annealing-Temperatur herauszufinden, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die Annealing-Temperatur entspricht der Temperatur, bei der sich der Primer am Besten an die cDNA anlagert. Hierfür wurden 8 verschiedene Annealing-Temperaturen pro Primer ausprobiert. Bei der verwendeten cDNA handelte es sich um Plazentagewebe bzw. Knorpelgewebe in einer Konzentration von 20ng/µl. Für jede Temperatur und jeden Primer wurde je ein Ansatz von 10µl eingesetzt. Pro Well wurde somit folgendes Pipettierschema verwendet:

Ansatz Gradienten-PCR:

cDNA	0,5 µl
Primer (for + rev)	2 µl
SYBR-Green Mix	5 µl
Nuklease-freies Wasser	2,5 µl

PCR-Protokoll:

Initiale Denaturierung	3min	95°C	
Denaturierung	20sek	94°C	
Anlagerung	20sek	variabel	45 Zyklen
(Annealing)			
Verlängerung	20sek	72°C	
Letzte Verlängerung	10min	72°C	
	ø	4°C	

Der hier verwendete SYBR-Green Mix (Invitrogen, # 11733-046) enthält neben MgCl₂ und einem dNTP-Mix, eine thermostabile rekombinante Taq DNA-Polymerase zum Vervielfältigen der gewünschten DNA und auch den mit der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green.

Mithilfe der fluoreszenzvermittelten Extinktion wurde die spezifische Annealing-Temperatur ermittelt. Hierdurch konnten Rückschlüsse auf die Effektivität der Primer gezogen werden. Somit wurde die Temperatur mit der höchsten Extinktion, welche einen einzelnen, hohen, schlanken Pieck in der Schmelzkurve aufwies, als die für den Primer spezifische Annealing-Temperatur festgelegt. Die Annealing-Temperaturen der hier verwendeten Primer sind in der oben abgebildeten Tabelle dargestellt.

2.6.8 Sequenzierung der PCR-Produkte und BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool)

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde durchgeführt um die Spezifität und Signifikanz der Primer zu ermitteln. Diese wurde von den Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Deutschland) mithilfe der Methode nach Sanger durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine enzymatische DNA-Sequenzierung. Die durch die Sequenzierung entstandenen Nukleotidsequenzen wurden an uns übermittelt und konnten in der NCBI-Nikleotiddatenbank dann (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) miteinander verglichen werden. So wurde festgestellt, ob das PCR-Produkt dem Zielgen entsprach. Dann konnten die Primer für die quantitative real-time RT-PCR eingesetzt werden, bzw. die Laminin-Primer wurden auch für die oben beschriebene in-situ-Hybridisierung verwendet.

2.7 Microarray

2.7.1 Allgemeines zur Methode

Um einen Überblick über die Expressionsaktivität aller Gene des Genoms zu erhalten, wurden isolierte RNA-Proben von sechs Patienten, welche an Osteoarthritis erkrankt sind, und einem gesunden Patienen mit Hilfe der Microarray-Technik analysiert. Hierbei wurden die Genchips (HG_U133A Plus 2.0) mit den GeneChip[®] reagents Kits (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) nach den Protokollen des Herstellers verwendet. Die Analysen wurden im Tanskriptomanalyselabor des Zentrums Biochemie und Molekulare Zellbiologie der Medizinischen Fakultät in Göttingen und von der Atlas Biolabs GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

2.7.2 Isolierung der mRNA

Die Isolierung der RNA erfolge aus nativen Proben des osteoarthritischen Kniegelenkknorpels jeweils aus dem intakten bzw defekten Areal. Die Gewebe proben wurden mit Hilfe von flüssigen Stickstoff in einem sterilen Mörser pulverisiert. Das Gewebepulver wurde dann in sterilen Reaktionsgefäßen mit je 1ml *TriFast™* gemischt, über Nacht inkubiert und danach zusätzlich mit einem Homogenisatorstab (IKA-Werke, Staufen, Deutschland) weiter zerkleinert. Alle unlöslichen Bestandteile wurden bei 13600 UpM für 5min abzentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in neuen Reaktionsgefäßen mit 200µl Chloroform intensiv gemischt. Die jetzt trüben Lösungen wurden nach 2min bei Raumtemperatur mit 13600 UpM zentrifugiert. Nur die oberste, wässrige Phase wurde in sterile Reaktionsgefäße überführt und mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung intensiv gemischt. Nach weiteren 2min bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut bei 13600 UpM für 5min zentrifugiert. Den wässrigen Phasen wurden pro 100µl 350µl RLT-Puffer, versetzt mit 1% beta-Mercaptoethanol, hinzugefügt.

2.7.3 Durchführung des Microarray

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse werden maßgeblich von der Qualität der eingesetzten RNA beeinflußt. Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurden die Proben mit Hilfe eines Bioanalyzers 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) auf ihre Integrität überprüft. Hierbei wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt. Die gesamte Elektrophorese der einzelnen RNA-Proben wurde mit Hilfe eines Software Algorithmus automatisch analysiert und das Ergebnis als RNA-Integritäts-Grad (RIN) ausgegeben (Schroeder et al. 2006). Verwendet wurden nur Proben ohne oder mit nur geringen Zeichen von Degradierung, d.h. mit >6, mit einer Ausgangsmenge von >1µg. Im ersten Schritt der Microarraydie Analye wurden RNA-Proben mit vom Hersteller vorgegebenen Konzentrationen von Poly-A-Kontroll-RNAs gemischt. Die RNA-Mischungen wurden nach Zugabe des T7-Oligo(dT)-Primers für 10min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurde der First-Strand-Master-Mix hinzugefügt, das Gemisch für 2 min bei 42°C inkubiert und die Enzymmischung SuperScript II zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde zur Synthese komplementären, gesamte der einsträngigen cDNA bei 42°C für 60min inkubiert und danach bei 4°C abgekühlt.

Material & Methoden

Zur Synthese des Gegenstrangs wurde der Second-Strand Master-Mix hinzugegeben und der gesamte Reaktionsanstatz für weitere 2h bei 16°C inkubiert. Nach Zugabe der T4-DNA-Polymerase folgten weitere 5 min Inkubation bei 16°C. Die Reaktion wurde mit 0,5M EDTA gestoppt. Die nun doppelsträngige cDNA wurde dann bei Raumtemperatur mit Hilfe eines cDNA-Bindungspuffers und eines alkoholischen Waschpuffers in einer cDNA-Reinigungssäule über mehrere Zentrifugationsschritte (13600U/min) gereinigt und im Anschluss in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben.

Im nächsten Schritt wurde durch eine in-vitro-Transkription aus der doppelsträngigen cDNA eine cRNA synthetisiert, die gleichzeitig mit Biotin markiert wurde. Diese Reaktion lief nach Zugabe der entsprechenden Puffer, Enzyme und den Biotin-markierten Nukleotidtriphosphaten bei 37°C über Nacht ab. Die Biotin-markierte cRNA wurde ebenfalls bei Raumtemperatur mit Hilfe cRNA-Bindungspuffers und absoluten Ethanol in einer cRNAeines Reinigungssäule gebunden, mit einem cRNA-Waschpuffer und 80% Ethanol gereinigt und danach mit DEPC-Wasser in eine steriles Reaktionsgefäß gegeben. Die Konzentration der Biotin-markierten cRNA wurde spektrophotometrisch mit NanoDrop™1000 Hilfe des (Peglab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

15µg Biotin-markierter cRNA wurden für den folgenden Schritt verwendet und der Rest bei -80°C gelagert. Nach Zugabe des Fragmentierungspuffers wurden die verschiedenen cRNA-Proben bei 94°C für 35min in Fragmente von 35 bis 200 Basen gespalten und danach auf Eis gekühlt. Die Fragmentierung wurde in einem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) überprüft. Im Anschluss wurde Hybridisierungslösung aus der fragmentierten cRNA, Kontroll-Oligonukleotiden und Hybridisierungskontrollen mit dem Hybridisierungsgemisch und Dimethylsulfoxid gemischt und für 5min auf 99°C erhitzt. Währenddessen wurden die Genchips an die Raumtemperatur angelichen und danach mit einer Prähybridisierungslösung befüllt und bei 45°C für 10min rotierend inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde nach dem Erhitzen bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen, und danach in die Genchips gefüllt. Die befüllten Genchips wurden über Nacht bei 45°C rotierend (60 UpM) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Hybridiserungslösungen entfernt, die Genchips

mit nicht-bindendem Waschpuffer gefüllt und in die GeneChip[®] Fluidics Station[®] 450 (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) eingesetzt. Hier erfolgte automatisch das Waschen der Genchips und das Anfärben der gebundenen Biotin-markierten cRNA mit Hilfe einer Streptavidin-Phycoerythrin-(PE)-Lösung eines Biotin-markierten Anti-Streptavidin-Antikörpers und der erneuten Inkubation mit einer Streptavidin-PE-Lösung. Nach 90min wurde der fertig hybridisierte, angefärbte und gewaschene Genchip in den GeneChip® Scanner (Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA) eingesetzt und gescannt.

Nach Abschluss des Scanvorgangs wurden die Messergebnisse statistisch analysiert. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit Hilfe der Quantinormalisierung (Irizarry et al. 2003). Die Daten zu den eingesetzten RNA-Proben wurden in Varianzanalysen einzeln und in Gruppen verglichen.

2.8 Western-Blot

2.8.1 Allgemeines zur Methode

Der Western-Blot ist eine quantitative analytische Methode aus der Proteinbiochemie. Mittels Immobilisierung von Proteinen auf Membranen können durch monoklonale oder polyklonale Antikörper bestimmte Proteine nachgewiesen und quantitativ Unterschiede ermittelt werden.

Vor der Protein Immobilisierung auf der PVDF (Polyvinylidenfluorid)- oder der Nitrozellulose-Membran werden diese mittels SDSeiner Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrem spezifischen nach Molekulargewicht aufgetrennt. Nun wird der eigentliche Blot durchgeführt. Beim Western-Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Aber die Proteine sind nun für weitere Methoden zugänglich, wie z. B. eine Antikörper-Bindung. Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen werden. Daher können die Proteine renaturieren, d. h. teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur. Für diese elektrophoretische Übertragung wurde das Tank-Blot-System verwendet.

Unabhängig vom Trägermaterial der Proteine, Membran oder Gel, können die unterschiedlichen Proteinbanden mittels Färbungen, wie z. B. Coomassie Blue, dargestellt werden. Bevor eine Immunreaktion durchgeführt wird, kann hiermit eingeschätzt werden, ob und wie viel Protein vorhanden ist.

2.8.2 Probenvorbereitung

Krankes Knorpelgewebe von Patienten mit späten Stadien der Osteoarthritis, ohne Zeichen rheumatoider Veränderungen, wurde von 3 Patienten (Alter zwischen 65–75 Jahre) gewonnen, welche eine Knie-Total-Endo-Prothese eingesetzt bekamen. Für die Gewebepräparation (Koelling et al. 2006) wurden die Osteoarthritis-Knie zuerst makroskopisch in einen noch gesund-aussehenden Bereich (= intaktes Areal) und in einen Rand-Bereich (=Osteoarthritis-Defekt) eingeteilt. Daraufhin wurden mithilfe eines Skalpells entprechende Knorpelstücke aus den jeweiligen Bereichen ausgeschnitten.

Die Proben wurden in flüssigen Stickstoff Schockgefroren und vorsichtig mit Mörser und Pistell zerkleinert. Um ein homogenes Pulver aus nativem Knorpel zu erhalten wurden die Proben mit einem Mikro Dismembrator S (Sartorius, Göttingen, Deutschland), nach Herstellerangaben, weiter zerkleinert.

Von jeder Probe wurden 0,3 g abgewogen in ein 2 ml Eppendorfcup gegeben und mit 0,9 ml 3xSDS-Probenpuffer versetzt.

3xSDS-Probenpuffer:

- 3,6 g 0,3 M Tris
- 9 g 9 % SDS
- 22,5 g 22,5 % Glycerin

Spatelspitze Bromphenolblau vor SDS-Zugabe mit HCl auf pH 6,7 ad 100ml mit H₂O

Das Gemisch wird nun vorsichtig mit dem ULTRA-TURRAX[®] (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert, dabei wurde darauf geachtet, dass das Proteingemisch nicht zu warm wird und deshalb immer wieder kurz auf Eis gelegt wurde. Nun wurde auf 450 μ I 3X SDS-Probenpuffer 50 μ I β -Mercaptoethanol

Material & Methoden

gegeben und gut gemischt. Davon wurden 100 μ l mit 200 μ l des Homogenats versetzt, in ein 2 ml Eppedorfcup eluiert, gut gemischt und für 30 min auf Eis gelegt. Die Proben wurden während dieser Zeit immer wieder mal bewegt. Anschließend wurden die Proben bei 10000 rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 200 μ l davon erneut mit 100 μ l 3X SDS-Probenpuffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Der SDS-Probenpuffer bewirkt eine konstante negative Ladung der Proteine, welche durch Erhitzen denaturieren, wobei das β -Mercaptoethanol entsprechende Disulfidbrücken der einzelnen Tertiärstrukturen spaltet.

2.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Zur Auftrennung des Proteins werden die denaturierten Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid pipettiert. Danach wird eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkt. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Am Ende des Vorganges sind alle Proteine nach Größe aufgetrennt.

Um das entsprechende Gel herzustellen werden folgende Lösungen verwendet. Trenngelpuffer:

45,4 g 1,5 M Tris

mit HCl auf pH 8,9 ad 250 ml mit H_2O

Sammelgelpuffer: 15,1 g 0,5 M Tris

mit HCl auf pH 6,8 ad 250 ml mit H_2O

10 % SDS:

100 g SDS auf 1000 ml H_2O , RT

Acrylamid:

30 % Acrylamid

0,8 % Bisacrylamid

10 % Ammonium-peroxodisulfat:

1 g Ammonium-peroxodisulfat

 $10 \text{ ml } H_2O$

Laufpuffer 5X:

- 30,3 g 0,25 M Tris
- 142,6 g 1,9 M Glycine
- 0,5 % SDS \rightarrow 50 ml 10% SDS
- auf 1000 ml mit H_2O RT

Für das Sammelgel (5 %) werden folgende Reagenzien gemischt:

- 1,25ml Sammelgelpuffer
 - 50µl 10% SDS
 - 5µl TEMED
- 0,8 ml Acrylamid
- 2,7ml H₂O
- 0,2ml 10 % Ammonium-peroxodisulfat

Für das Trenngel (8 %) werden folgende Reagenzien gemischt:

1,4ml	Trenngelpuffer
55µl	10% SDS
5µl	TEMED
1,48ml	Acrylamid
2,36ml	H ₂ O

0,25ml 10 % Ammonium-peroxodisulfat

Bevor der Aufbau der Elektrophoresekammer beginnt muss die Glasplatte und die Platte mit dem Spacer mit 100% Ethanol gereinigt werden. Die Gummidichtung wird zwischen die Glasplatten platziert, welche dann zusammengeklammert werden. 6cm vom unteren Rand der Platten wird eine Markierung eingezeichnet. Das Trenngel wird nun zusammen pipettiert, vorsichtig gemischt, zwischen die beiden Glasplatten bis zur Markierung gegossen und anschließend mit 100% Ethanol überschichtet, um eine Polymerisation des Gels zu ermöglichen. Nach der Polymerisation des Gels wird der Alkohol wieder abgegossen. Nun wird das Sammelgel zusammen pipettiert, vorsichtig gemischt, auf das Trenngel gegossen und anschließend ein Kamm für die Proben eingesetzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem Nachbau der Biometra Elektophoresekammer. Das Dichtungsgummi und der Kamm werden entfernt und die Platten in die mit 1X Laufpuffer gefüllte Kammer gestellt, dabei dürfen keine Luftblasen unter dem Gel entstehen. Es wird ein Probenvolumen von 30µl pro Tasche verwendet. Eine Proteinleiter (Fermentas, #SM0671) wird mit einem Volumen von 5µl aufgetragen. Im Sammelgel werden die Proben zwischen 10-15mA bis zur Trenngelkante konzentriert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt im Trenngel bei 20-25mA, für ca. 1h.

2.8.4 Western-Blot

Für den Western-Blot werden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran in einem Tank-Blot-System übertragen. Diese Art des Blots wird auch als Nassblot bezeichnet.

Zuerst muss ein Transferpuffer hergestellt werden:

6.05g	25mM Tris
28.8g	192mM Glycine
400ml	20% (v/v) Methanol
mit H ₂ O a	auf 2000ml auffüllen, pH 8,3

Zuerst werden pro Gel 6 Filterpapiere und eine Transfermembran auf ein Maß von 4,5cm x 6cm zugeschnitten, welches einige mm größer als das Gel sein sollte. Die PVDF-Membran (Immobilon-P 0,45 µm Millipore; # IPVH00010) wird 15sec in 100% Methanol getränkt und anschließend 2min in Wasser gelegt. Anschließend werden die Filterpapiere und die Membran mindestens 15min in kalten Transferpuffer eingelegt. Die Schwämme werden ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht und dabei die Luftblasen herausgedrückt. Der Zusammenbau des Gelsandwich erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale. Dazu legt man einen Schwamm auf die rote Seite der Kassette, darauf 3 getränkte Filterpapiere und dann die Transfermembran. Dann platziert man das Gel luftblasenfrei auf der Membran. Wobei mit einer im Transferpuffer angefeuchteten Pasteurpipette Luftblasen zwischen Gel und Membran heraus gerollt werden. Das Gel wird nun mit den restlichen Filterpapieren und dem zweiten Schwamm abgedeckt. Die Blot-Kassette wird geschlossen und mit 2 Gummibändern fixiert. Der Tank wird bis zur Hälfte mit Transferpuffer gefüllt und die Kassette entsprechend der Farbkodierung eingesetzt (Membran zur Anode: rot, positiv und Gel zur Katode: schwarz, negativ). Der Puffertank wird bis zur oberen Kante der Elektrodenplatten mit Transferpuffer gefüllt und ein Rührfisch in den Tank gegeben, damit eine gleichmäßige Temperatur und Ionenkonzentration herrscht. Bei ein bis zwei Gelen reicht eine Zeit von 90min mit einer Stromstärke von 350mA aus.

2.8.5 Proteinfärbung auf der PVDF-Membran

Wie oben beschrieben ist es möglich die Proteine unspezifisch, vor der Immunreaktion, mit einer Färbung darzustellen.

Färbelösung Coomassie-Blau:

0,1g 0,1% Coomassie[®] Brilliant Blue R250 Powder (Serva, #17525)

50ml 50% Methanol

7ml 7% Essigsäure

mit Wasser auf 100 ml

Entfärber I:

50ml 5% Methanol

7ml 7% Essigsäure

mit Wasser auf 100 ml

Entfärber II:

90ml 90% Methanol

10ml 10% Essigsäure

Die Membran wir für 2min in die Färbelösung gelegt und geschwenkt. Um die Hintergrundfärbung zu reduzieren wird die Membran jeweils für 2 bis 5 min in Entfärber I und anschließen in Entfärber II, unter Beobachtung, geschwenkt, so dass sich die einzelnen Proteinbanden deutlich darstellen. Das Ergebnis wird eingescannt und gespeichert. Vor der Immunreaktion muss die Membran noch zweimal mit TBS-T gewaschen werden.

2.8.6 Immunreaktion

Um nun das gewünschte Protein spezifisch auf der Membran nachweisen zu können werden Antikörper verwendet, welche nur an dieses binden.

Folgende Reagenzien werden für die Immunreaktion benötigt:

TBS 10x :

24,2g 200mM Tris

87,6g 1,5M NaCl

mit H₂O auf 1000 ml auffüllen, pH 7,4

TBS-T:

0,5g 0,05% Tween (Sigma, #P5927)

100ml 10x TBS

mit H₂O auf 1000 ml auffüllen

Blocklösung:

5% Milchpulver (Roth, #T145) in TBS-T frisch ansetzen

Verdünnungslösung für Antikörper

Primär Antikörper: 5% Milchpulver in TBS-T

Sekundär Antikörper: 5% Milchpulver in TBS-T

Sekundär Antiköper z.B.:

Anti-Rabbit IgG-Peroxidase (Sigma A0545) Verdünnung 1:100 000

Anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma A9917) Verdünnung 1:40 000

Material & Methoden

Alle Reaktionsschritte werden auf einer Wippe durchgeführt. Die Membran selbst Schale. Zuerst liegt dabei in einer kleinen werden unspezifische Bindungsmöglichkeiten für den primären Antikörper mit 5µl der Blocklösung maskiert. Dies wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wird der primäre Antikörper gegen Laminin-v1 in einer Verdünnung von 1:500 in 5% Milchpulver in TBS-T auf die Membran gegeben. Dieser Reaktionsschritt wurde im Kühlraum über Nacht durchgeführt. Bevor der sekundäre Antikörper aufgetragen wird, wird die Membran 5-mal für 5min in TBS-T gewaschen werden. Als sekundärer Antikörper, für Laminin-y1 wird Anti-Mouse in einer Verdünnung von 1:40000 in Blocllösung verwendet und für 1h, bei RT inkubiert. Danach wird die Membran wieder 5-mal für 5min in TBS-T gewaschen werden.

Die Antikörper können dann mit dem ECL Plus Detection System von Amersham (# RPN2106) nachgewiesen werden. Dazu mischt man Detektionslösung A und B in einen Verhältnis von 40:1 (z.B. 1ml Lösung A + 25µl B reicht für einen Blot). Auf die gewaschene Membran wird die gemischte Detektionslösung geben und 5min bei Raumtemperatur, abgedunkelt, inkubiert. Die Membran wird in eine Röntgenfilmkassette zwischen die Klarsichtfolie gelegt und eventuelle Luftblasen herausgestrichen. Die weiteren Schritte zur Entwicklung des Blots werden aufgrund der Empfindlichkeit des Fotopapiers gegenüber Licht in einer Dunkelkammer durchgeführt. Das Fotopapier (Amersham Hyperfilm ECL, #28-9068-35) wurde für 5min auf die Membran gelegt. Danach wurde das Fotopapier mit entwickelt, fixiert, gewaschen und getrocknet.

3.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie von Laminin-1 und Laminin-10 auf Protein-Ebene im humanen Knorpelgewebe und humanen embryonalen Gewebe

Dies ist die erste Studie, welche die Basalmembranproteine Laminin-1 und Laminin-10 bzw. deren einzelne Untereinheiten, sowohl als Bestandteil der extrazellulären Matrix in humanem Knorpelgewebe während der Extremitätenentwicklung des Embryos, als auch im gesunden humanen Kniegelenksknorpel und deren Veränderungen in der Osteoarthritis untersucht.

Lichtmikroskopische Immunhistochemie

Der lichtmikroskopische Nachweis der Laminin-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\gamma 1$ wurde auf Proteinebene, wie nachfolgende Bilder zeigen, erfolgreich, an Feten aus der Gestationswoche 11, drei Knorpelproben aus osteoarthitischen Kniegelenken und einer gesunden Probe durchgeführt.



Abb. 6: Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin-Untereinheit α 5 in den knorpeligen Anlagen der Fußknochen (links) und der Rippe (rechts).



Abb. 7: Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin-Untereinheiten α 1, α 5, β 1 und γ 1 in Knorpelanlagen des Metatarsus.

Die gleichmäßig homogene goldbraune Färbung zeigt die positiven Immunreaktionen, für Laminin- α 1, - β 1, - γ 1 und - α 5 in den knorpeligen Anlagen vom Mittelfuß und der Rippe. Die Reaktion für Laminin- α 5 ist etwas schwächer als für die anderen drei anderen Laminin-Untereinheiten.



Abb. 8: Laminin-α5 in der Zehanlage (links Übersicht und rechts vergrößert).

Auf der Abbildung ist die Ossifikation der knorpeligen Zehenanlage zu sehen. In den knorpligen Knochenvorstufen ist die Laminin- α 5-Kette sichtbar gemacht. In Bereichen, wo die Ossifikation bereits begonnen hat, fehlt Laminin- α 5, d.h. Laminin- α 5 ist nicht an der Ossifikation beteiligt.



Abb. 9: Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin-β1-Untereinheit im gesunden Kniegelenk, rechts in Übersicht und links in Vergrößerung.

Die Befunde aus dem gesunden Knorpel zeigen Laminin- β 1. In der Übersicht erscheint die Laminin- β 1-Kette relativ homogen verteilt in der extrazellulären Matrix des gesunden Knorpels, mit einer stärkeren Reaktion im perizellulären Bereich und an der Gelenkoberfläche. In der Vergrößerung sieht man, dass die Reaktion fast ausschließlich perizellulär und oberflächennah positiv ausfällt.



Abb. 10: Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin-Untereinheiten α1 und α5 in Übersicht und Vergrößerung während der Osteoarthritis im Kniegelenk.

Die Befunde aus osteoarthritisch verändertem Knorpel zeigen Nachweise für Laminin- α 1 und - α 5. Im Vergleich ist die Reaktion für Laminin- α 1 etwas schwächer als für Laminin- α 5 und bleibt auf den perizellulären Bereich beschränkt. Für Laminin- α 5 zeigt sich eine stärkere Reaktion, vor allen im Bereich der Gelenkoberfläche. Die Befunde zeigen Ähnlichkeit zum den gesunden Knorpel. Jedoch ist diese hier stärker und ausschließlich für Laminin- α 5.



Abb. 11: Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin-Untereinheiten β 1 und γ 1 in Übersicht und Vergrößerung während der Osteoarthritis im Kniegelenk.

Ebenfalls ist Laminin- β 1 und - γ 1 im osteoarthrischen Knorpel nachzuweisen. Es fällt auf, dass die Reaktion für Laminin- γ 1 ziemlich schwach und nur perizellulär zu lokalisiert ist. Laminin- β 1 hingegen zeigt eine sehr starke Reaktion für die perizellulären Bereiche und ist außerdem noch besonders stark im Defektbereich konzentriert. Im Vergleich mit der Laminin- β 1-Reaktion für den gesunden Knorpel scheint die Reaktion in der Osteoarthritis wesentlich stärker zu sein.

	Laminin-α1	Laminin-α5	Laminin-β1	Laminin-γ1
Fall 7 G	+	+	+	+
Fall 7 R	+	+	+	+
Fall 14 G	+	+	+	+
Fall 14 R	+	+	+	+
Fall 28 G	+	+	+	+
Fall 28 R	+	+	+	+
gesunder Patient	+	+	+	+

Die folgende Tabelle stellt einen Ergebnissüberblick dar:

Tab. 5: Ergebnisse lichtmikroskopische Immunhistochemie

Die Knorpelproben von Fall 7, 14 und 28 stammten von Patienten mit Osteoarthritis im Kniegelenk. Die Kennzeichnung R bedeutet, dass die Proben aus dem makroskopisch schon defekten Bereich stammen. G hingegen bedeutet, dass der Knorpel aus makroskopisch intaktem Areal stammt. Ob der Nachweis positiv oder negativ ausgefallen ist, wird durch ein + bzw. ein – symbolisiert.

3.2 Lichtmikroskopische In-Situ-Hybridisierung für die Laminin-Untereinheiten α 1, α 5, β 1 und γ 1

Dieser lichtmikroskopische Nachweis von mRNA wurde an den gleichen Patientenproben wie die lichtmikroskopische Immunhistochemie durchgeführt. Alle Laminin-Unterheiten konnten auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.



Abb. 12: Lichtmikroskopische In-Situ-Hybridisation für Laminin-α5, a: Übersicht im osteoarthritischen Knorpel und b: einzelner Chondrozyt.

Die Bilder zeigen die durch eine rote Färbung des Zytoplasmas gekennzeichnete mRNA für Laminin-α5. Die Reaktion befindet sich ausschließlich nur in den Chondrozyten und liegt nicht innerhalb der extrazellulären Matrix des Knorpels. In dem vergrößerten Ausschnitt sind zwei Chondrozyten abgebildet, in welchen man deutlich erkennen kann, dass die mRNA im Zytoplasma ist und der Kern, welcher in Blau gegengefärbt wurde, frei von mRNA ist.

	Laminin-α1	Laminin-α5	Laminin-β1	Laminin-y1
Fall 7 G	+	+	+	+
Fall 7 R	+	+	Ø	+
Fall 14 G	Ø	+	+	+
Fall 14 R	+	Ø	+	+
Fall 28 G	+	+	+	+
Fall 28 R	+	+	+	+
gesunder Patient	+	+	Ø	+

Die folgende Tabelle stellt einen Ergebnissüberblick dar:

Tab. 6: Ergebnisse lichtmikroskopische In-Situ-Hybridisierung.

Die Knorpelproben von Fall 7, 14 und 28 stammten von Patienten mit Osteoarthritis im Kniegelenk. Die Kennzeichnung R bedeutet, dass die Proben aus dem makroskopisch schon defekten Bereich stammen. G hingegen bedeutet, dass der Knorpel aus makroskopisch intaktem Areal stammt. Ein positiver Nachweis wird durch ein + bzw. kein Nachweis durch ein – symbolisiert. Ein \emptyset bedeutet, dass die Reaktion nicht eindeutig beurteilbar war.

3.3 Western-Blot

Der Western-Blot zeigt eindeutige Ergebnisse für die Laminin- β 1 und Laminin- γ 1 Untereinheiten



Abb. 13: Coomassie-Blue-Proteinfärbung (2 und 3) mit Leiter (1) (links) und Western Blot (rechts) für Laminin- γ 1 an osteoarthritischen Knorpel (4 und 5).

Die Abbildung zeigt, bei gleicher Menge an Probenmaterial, dass in der Probe aus dem makroskopisch defekten Bereich (=R) im SDS-Page generell mehr Protein vorhanden ist (3) als im makroskopisch gesunden Bereich (2). Im eigentlichen Blot ist mehr Laminin- γ 1 in der Probe aus dem makroskopisch defekten Bereich (=R; 5), als in der Probe aus dem makroskopisch intakten Areal stammt (=G; 4). Der Verlauf der Proteinleiter ist mit 1 gekennzeichnet. Die folgende Tabelle zeigt einen Ergebnisüberblick.

	Laminin-β1	Laminin-y1
Fall 433 G	+	+
Fall 433 R	-	+
Fall 434G	+	+
Fall 434R	+	+
Fall 435G	+	+
Fall 435R	+	+

Tab. 7: Ergebnisse Western-Blot.

3.4 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie



Abb. 14: Elektronenmikroskopische Immungoldhistochemie für Laminin-α5 in der Übersicht, links gesunder, mitte erkrankter und rechts elongierter Chondrozyt.

Links ist ein Chondrozyt aus gesundem hyalinem Knorpel abgebildet. Der Chondrozyt in der Mitte und der Chondrozyt rechts stammen beide aus osteoarthritischen Knorpel. In der Mitte ist der typisch erkrankte Chondrozyt aus der Osteoarthritis mit vielen Vakuolen zu sehen und rechts zeigt sich ein schmaler elongierter Chondrozyt mit viel rauen endoplasmatischen Retikulum.



Abb. 15: Elektronenmikroskopische Immungoldhistochemie für Laminin-α5 in einem Auschnitt aus der perizellulären Matrix, links Matrix um einen gesunden, mitte Matrix um einen erkrankten und rechts Matrix um einen elongierten Chondrozyt.

Die schwarzen 20nm großen Kugeln in der perizellulären Matrix der Chondrozyten zeigen Laminin-α5. Das folgende Säulendiagramm beschreibt die quantitativen Unterschiede in Abhängigkeit vom Knorpelareal und Chondrozytenphänotyp.



Abb. 16: Unterschiede in der Laminin-α5-Quantität.

3.5 Zelladhäsionsassay

Die Chondrozyten binden mit steigender Zellanzahl, entsprechend an die mit aufsteigenden Laminin-1-Konzentrationen beschichteten Wells.



Abb. 17: Zelladhäsionsassay von Chondrozyten an Laminin-1, blau: Zellen aus osteoarthritischem Areal, pink: Zellen aus makroskopisch intakten Bereich.

3.6 Vergleichende Genexpressionsanalyse von Chondrozyten nach Stimulation mit Laminin-1 in 3D-Alginat-Kultur

Der Vergleich der Ct-Werte zeigt, dass die Stimulation der Chondrozyten aus osteoarthritischen Knorpel mit Laminin-1, im Gegensatz zu unstimulierten Chondrozyten aus osteoarthritischen Knorpel, eine verstärkte mRNA Expression zur Folge hat. Dies zeigt sich vor allen bei den typischen Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen II und COMP, aber auch bei den Bestandteilen der Basalmembran, wie z. B. der Laminin-γ1-Kette und dem Lamininrezeptor Integrin-ß1. Für die eben beschrieben mRNA's wurden die Ct-Werte nach Pfafll (2001) normalisiert und in den folgenden Säulendiagrammen dargestellt.



Abb. 18: RT-PCR-Daten: relative mRNA-Level für Col II, COMP, Laminin- γ 1& Integrin- β 1 nach Pfaffl normalisiert, im Vergleich mit bzw. ohne Laminin-1-Stimulation.

Die Gegenüberstellung in der 3D-Alginat-Kultur von gesundem Knorpel mit

osteoarthritischen Knorpel zeigt dessen typische Charakteristiken wie z. B. ein verstärkte Expression von Kollagen I und MMP-13 sowie eine verminderte Expression von Kollagen II und COMP.

Die Vergleiche von osteoarthritischen Knorpel, Laminin-1 stimulierten osteoarthritischen Knorpel, gesundem Knorpel und Laminin-1 stimulierten gesundem Knorpel mit chondrogenen Progenitorzellen zeigen, dass die chondrogenen Progenitorzellen eine erhöhte Expression für die typischen Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knorpels, wie z.B. für Kollagen II, und COMP aufweisen, ebenso gibt es eine verstärkte Expression der klassischen Basalmembrankomponenten wie z. B. für Perlekan, Kollagen IV und für die Laminin- γ 1-Kette. Interessanterweise sind auch für Knorpel untypische mRNA's wie z. B. alkalische Phosphatase und Kollagen I verstärkt exprimiert, dies zeigt wiederum den Stammzellcharakter der chondrogenen Progenitorzellen .

3.7 Microarray

Die Microarrayanalyse zeigte bei einem Vergleich von 3 männlichen und 3 weiblichen Proben aus osteoarthritischen Knorpel gegen eine Normalisierung von zwei embryonalen Zelllinien aus hyalinen Knorpel einen verstärkte mRNA-Expression für die Laminin- α 3-Untereinheit in den erkrankten Proben. Unterschiede der mRNA-Level in Abhängigkeit des Geschlechts sind ebenfalls in folgen Diagramm dargestellt und zeigen, dass Männer mit Osteoarthritis mehr Laminin- α 3 exprimieren als Frauen.



Abb. 19: Microarray für Laminin- α 3 in Mittelwerten für männliche und weibliche Proben.

4.1 Laminine als Bestandteile der extrazellulären Matrix in humanem Knorpelgewebe

Wie bereits von Miner et al. (2004) und Smyth et al. (1999) beschrieben wurde, sind Laminin-1 und Laminin-10 die einzigen Laminine die während der Embryonalentwicklung des Menschen exprimiert werden. Nachgewiesen wurden die entsprechenden Laminine in der embryonalen Basalmembran und in der Reichert's Membran der Maus, welche vor allem Laminin-1 und nur einen Laminin-y1-Untereinheit sterben, da diese Mäuse weder Laminin-1 noch Laminin-10 synthetisieren können und somit keine embryonalen Basalmembran und keine Reicherts-Membran ausbilden können (Smyth et al. 1999). Ein Mausmodell mit einem Laminin- α 5 -/- Knockout kann zwar kein Laminin-10 mehr synthetisieren, aber dies kann durch vermehrten Einsatz von Laminin-1 kompensiert werden (Miner 1998). Dagegen können Laminin-α1 -/- Knockout-Mäuse zwar die embryonale Basalmembran ausbilden, jedoch nicht Reichert's Membran. Die Embryonen sind ungewöhnlich klein und sterben schließlich (Miner et al. 2004). Um herauszufinden ob Laminin-1 und Laminin-10 auch Funktionen in der Knorpel-Knochen-Entstehung während der Embryonal- bzw. Fetalentwicklung haben, wurden an humanen lichtmikroskopischen Präparaten Immunreaktionen mit Antikörpern gegen einzelne Lamininuntereinheiten durchgeführt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich während der Extremitätenentwicklung in Gestationswoche 11, die Laminin-Untereinheiten α 1, α 5, β 1 und γ 1 ebenfalls im kondensierenden Mesenchym des Metatarsus befinden. Auch in den Rippenanlagen waren die Lamininuntereinheiten nachweisbar. Die Reaktionen waren für alle vier Antikörper gleichmäßig homogen in der extrazellulären Matrix verteilt. Hier kann spekuliert werden, ob sich die einzelnen Lamininuntereinheiten, in ihrer Heterotrimer-Struktur Laminin-1 und Laminin-10 anordnen, so wie es von Kvist et al. (2008) in der perizellulären Matrix von Maus-Chondrozyten beschrieben wurde, oder ob sie vielleicht als einzelne Untereinheiten getrennt in der extrazellulären Matrix vorliegen. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Laminine, außerhalb der perizellulären Matrix, keinen direkten Kontakt mehr zu den

Chondrozyten haben und Interaktionen mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix eingehen, wie z.B. mit Kollagen Typ VII, Agrin, Netrin oder indirekt über Link-Proteine wie die Nidogene mit Fibronektin (Hamill et al., 2009). Die im Ergebnisse weisen, zusätzlich zur embryonalen Basalmembran und der Reichert's Membran (Miner 2008), auf die Bedeutung von Laminin-1 und Laminin-10 für die Entstehung des Primordialskeletts hin. Daher kann man davon ausgehen, dass Laminin-1 und -10 Einfluss auf die mesenchymalen Stammzellen nehmen, indem sie die Differenzierung hin zu Chondrozyten stimulieren. In Arealen wo die Ossifikation der Knochen bereits begonnen hat, sind Laminin-1 und Laminin-10 nicht mehr zu finden. In Bereichen der Ossifikation könnte somit ein anderes Laminin zu erwarten sein. Es wurde gezeigt, dass Laminin-5 einen entscheidenden Einfluss auf die Knochenbildung hat. Bei humanen mesenchymalen Stammzellen wird in der Zellkultur die osteogene Differenzierung durch Laminin-5 stimuliert und chondrogene Differenzierung gehemmt. Deswegen kann man ebenfalls vermuten, dass Laminin-5 nicht im Knorpel des Primordialskeletts zu finden ist (Hashimoto et al. 2005).

Aufgrund der neuen Erkenntnisse über Laminin-1 und -10 für das Primordialskelett und der Arbeit von Durr et al. (1996), welche Laminin-1 als Bestandteil der superfiziellen Zone des humanen Knorpels zeigte, wurde weiterführend die Bedeutung von Laminin-1 und Laminin-10 im gesunden humanen hyalinen Gelenkknorpel und während der späten Stadien der Osteoarthritis auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht.

Mit Hilfe der lichtmikroskopischen In-Situ-Hybridisierung konnten die Laminin-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\gamma 1$ bei allen Proben bzw. Patienten nachgewiesen werden. Wie aus den Ergebnissen der lichtmikroskopischen Immunhistochemie, wo alle Laminin-Untereinheiten übergreifend immer perizellulär lokalisiert waren, nachzuvollziehen ist, exprimieren alle Chondrozyten die einzelnen Laminin-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\gamma 1$. Auf lichtmikroskopischer Ebene sind keine Unterschiede zwischen der mRNA des gesunden humanen hyalinen Gelenkknorpels und der Osteoarthritis feststellbar.

Durch die Verwendung der lichtmikroskopischen Immunhistochemie konnten alle Laminin-Untereinheiten nachgewiesen werden. Für Laminin- α 1 und Laminin- γ 1 zeigt sich eine vor allem perizelluläre Reaktion um die Chondrozyten. Dies kann

ebenfalls für Laminin-α5 gezeigt werden, zusätzlich ist aber eine homogen erscheinende Akkumulation des Proteins nahe der Gelenkoberfläche vorhanden, was darauf hindeutet, dass die Laminin-α5 Untereinheit nicht nur Funktionen im perizellulären Bereich hat. An der Gelenkoberfläche sind die Belastungen, gerade im schon osteoarthritisch veränderten Gelenk stark und daher könnte diese Ansammlung einen Versuch darstellen die auftreffenden Kräfte physiologischer auf die restliche Matrix des Knorpels bzw. den Knochen zu übertragen. Ähnliches wurde schon für die fibrilläre Anordnung von Laminin-6 zur besseren Mechanotransduktion in der Lunge von Jones et al. (2005), beschrieben. Außerdem ist denkbar, dass Laminin- α 5 auch allein als Monomer und nicht als Heterotrimer in der extrazellulären Matrix vorliegen kann, dies wurde bereits für alle Laminin-α-Untereinheiten in der Monolayer-Zellkultur von Yurchenco et al. (1997), gezeigt. Als Monomer hat die Laminin- α 5-Untereinheit wahrscheinlich ein ganz anderes Aufgabenspektrum, andere Bindungspartner, wie z.B. Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Fibronektin und eventuell andere Integrine als Rezeptoren und eine andere Lokalisation, so wie hier, in der territorialen Matrix. Ein anderer interessanter Punkt, der die Aussage von Yurchenco et al. (1997) unterstützt, ist, dass die Laminin-a-Untereinheiten und ihre spezifischen Interaktionen mit Integrin- und Nicht-Integrin-Rezeptoren entscheidend für die Anordnung als Heterotrimer und die Ausbildung von netzartigen Strukturen in der Basalmembran sind (Tzu und Marinkovich 2008). Da aber der beschriebenen Akkumulation von Laminin-a5 in der territorialen Matrix der Gelenkoberfläche genau diese Interaktionen mit Integrin- und Nicht-Integrin-Rezeptoren verwehrt bleiben, ist die Aussage von Yurchenco et al. (1997) umso wahrscheinlicher.

Ähnlich wie die Reaktionsergebnisse für Laminin- α 5 kann auch Laminin- β 1 gesehen werden, wobei sich bei Letzteren noch eine stärkere Reaktion direkt im Defektbereich nachweisen lässt, was ein mögliches regeneratives Potential andeutet. Im Vergleich zum gesunden humanen Knorpel sind bereits lichtmikroskopisch mit der Immunhistochemie, bis auf die Konzentration von Laminin-β1 direkt um den Defektbereich, keine Unterschiede zum osteoarthritischen humanen Knorpel festzustellen. Es ist bereits bekannt, dass Basalmembranen bzw. deren Bestandteile, wie Nidogene, Kollagen Typ IV, Perlekan und Laminin, die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix beeinflussen. Kvist et al. (2008) bezeichneten die perizelluläre Matrix der

Chondrozyten als Basalmembranäquivalent. So ist es z.B. denkbar, dass die Chondrozyten, die in osteoarthritisch veränderter Matrix eingebettet sind, diesen Zustand wahrnehmen und versuchen über eine verstärkte Expression der Basalmembrankomponente Laminin- β 1 die Integrität der Knorpelmatrix wieder herzustellen. Prinzipiell kann dies auf zwei verschiedene, kombinierbare Arten erfolgen. Zum einen könnte sich Laminin- β 1 in der extrazellulären Matrix, wie eben beschrieben im defekten Areal ansammeln und direkten Einfluss auf die Zusammensetzung der Knorpelmatrix nehmen. Zum anderen ist es möglich, dass die perizelluläre Martix der Chondrozyten bzw. das eben beschriebene Basalmembranäquivalent indirekten Einfluss auf die territoriale Matrix nimmt, indem sie über die verstärkte Expression von Laminin- β 1 mit dieser vermehrt in Kontakt tritt und so versucht wieder gesündere Verhältnisse einzustellen.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Laminin-Untereinheiten α 1, α 5, β 1 und γ 1 alle perizellulär um die Chondrozyten nachgewiesen werden können, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass sie sich auch in Form ihrer Heterotrimerstruktur, der Proteine Laminin-1 und Laminin-10, anordnen können. Kvist et al. (2008) zeigten bereits im Knorpel der Maus, dass sich Laminine im perizellulären Bereich der Chondrozyten befinden. Weiterhin wurden die anderen Bestandteile der Basalmembran wie Kollagen Typ IV, Nidogene, und Perlekan in der perizellulären Matrix gezeigt. Daher könnte man vermuten, dass sich die hier nachgewiesenen perizellulären Laminine ebenfalls wie in Basalmembranen als netzartige Strukturen anordnen und entscheidende Funktionen für den Knorpelstoffwechsel übernehmen können, da gerade Laminin-1 mit vielen Molekülen aus dem extrazellulären Bereich, wie z.B. Nidogen-1, -2, Perlekan, Fibulin-1 und Heparin, Verbindungen eingehen kann (Ekblom et al. 2003; Sasaki et al. 2002; Scheele et al. 2007) und diese Informationen über Integrine in die Chondrozyten überträgt (Sasaki und Timpl 2001; Belkin und Stepp 2000).

Warum nun gerade Laminin-1 und Laminin-10 im Knorpel eine Rolle zu spielen scheinen liegt in den molekularbiologischen Eigenschaften dieser beiden Heterotrimere begründet, denn diese müssen an die Umgebungsbedingungen des Knorpels angepasst sein. Die mittlerweile 16 beschriebenen Laminine zeigen doch eine relativ spezifische Verteilung in den unterschiedlichsten Geweben wie Muskulatur, Nervensystem, Niere, Lunge, Gefäßsystem, Haut und Haare. So

kommt z. B. in der Muskulatur, wo jede Muskelfaser von einer eigenen Basalmembran umgeben wird, vornehmlich Laminin-2 (Laminin $\alpha 2\beta 1\gamma 1$) (Patton 2000) und weniger Laminin-4 (α 2-, β 2- und γ 1-Untereinheit) (Sasaki et al. 2002) vor kommt. Eine Sonderstellung in der Muskulatur nimmt die motorische Endplatte ein, in der Laminin- $\alpha 2\beta 1\gamma 1$, Laminin- $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ und Laminin- $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ lokalisiert sind (Patton 2000). Gibt es Mutationen im Bereich von Laminin- α 2, so führt dies zur kongenitalen Muskeldystrophie (Xu H et al. 1994) oder im Gen für Laminin-β2, kommt es zu einer defekten bzw. irregulär ausgebildeten motorischen Endplatte, welche als Pierson-Syndrom bezeichnet wird (Noakes et al. 1995). Diese Mutationen unterstreichen die wichtige Bedeutung der Laminine für die Muskulatur und besonders die Rolle der Laminin-a-Untereinheit für die phänotypische Ausprägung der Mutation. Generell gilt, dass Laminin-2 und Laminin-4 den Anforderungen der Muskulatur, wie z.B. Flexibilität mit ausreichender Stabilität bei Bewegungen, standhalten müssen und deswegen genau diese Laminine in der Muskulatur präsent sind. Im Gefäßsystem sind die Laminin- α 4 β 2 γ 1, Laminin- α 5 β 1 γ 1 und Laminin- α 5 β 2 γ 1 in Laminin- α 4 β 1 γ 1, unterschiedlichen Anteilen vorhanden. So führen Mutationen im Gen für Laminin-Blutungen und Kardiomyopathien aufgrund der diskontinuierlich α4 zu ausgeprägten Basalmembran unter den Endothelzellen. Die Zusammensetzung von Lamininketten ist somit dafür verantwortlich, dass das Endothel im Gefäßsytem zusammen mit der Basalmembran eine entsprechende Dichtigkeit gewährleistet (Thyboll et al. 2002).

Die Erkenntnis, dass Laminin-1 und Laminin-10 im gesunden humanen hyalinen Gelenkknorpel vorkommen und eine anscheinend wichtige Rolle in der Osteoarthritis übernehmen, liegt zum einen in der Embryonalentwicklung begründet. Dort sind sie die einzigen Laminine, die überhaupt exprimiert werden und speziell, wie hier nachgewiesen wurde, für die Chondrogenese bedeutend bzw. für die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten, bis hin zu osteogenen Zellen mitverantwortlich sind. Zum anderen erfüllen Laminin-1 und Laminin-10 bzw. deren einzelne Untereinheiten wahrscheinlich genau die Anforderungen welche den Eigenschaften des Knorpels, wie Druckstabilität bzw. Druckelastizität, Resistenz gegenüber Scherkräften und ein gewisse Rigidität, entsprechen. Dies schließt aber nicht aus, dass auch andere Laminine im Knorpel vorkommen. Es ist z.B. durchaus denkbar, dass die Laminine des Gefäßsystems,

wie oben beschrieben, auch im osteoarthritischen Knorpel vorkommen können, da es in den späten Stadien zu einem Durchbruch der Tidemark kommt und eine Gefäßeinsprossung in den Knorpel erfolgt (Koelling et al. 2009).

4.2 Unterschiede in der Laminin-Quantität in Abhängigkeit vom Knorpelareal und dem Chondrozytenphänotyp

Die Gegenüberstellung in der 3D-Alginat-Kultur von gesundem Knorpel mit osteoarthritischem Knorpel zeigt dessen typische Charakteristiken wie z. B. eine verstärkte Expression von Kollagen Typ I und MMP-13 sowie eine verminderte Expression von Kollagen Typ II und COMP (Goldring et al. 2006). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Laminin- γ 1 zu unterschiedlichen Anteilen exprimiert wird. Die nicht erkrankten Chondrozyten haben generell weniger Laminin- γ 1 als die osteoarthritischen Chondrozyten. Bei Letzteren kann noch zwischen Proben aus dem makroskopisch defekten, welche mehr Laminin- γ 1 exprimieren, und dem makroskopisch intakten Bereich unterschieden werden.

Die Aussage, dass mehr Laminin in den makroskopisch defekten Bereichen vorkommt als in den makroskopisch intakten Bereichen des Gelenks bzw. in gesunden hyalinen Knorpel wird durch das Ergebnis der Western Blot Versuche gestützt. Besonders die Laminin-y1-Untereinheit zeigt eine stärkere Bande bzw. größere Proteinmenge bei den Proben aus dem makroskopisch defekten Areal. Daher kann man vermuten, dass die Laminine als Strukturproteine und Kommunikationspartner von Chondrozyten und weiteren Bestandteilen der extrazellulären Matrix versuchen, die Knorpelintegrität wieder herzustellen. Die Laminine sind wahrscheinlich nicht die einzigen Basalmembranproteine, welche eventuell ein regeneratives Potenzial haben, so wurde bereits von Kruegel et al. (2008) gezeigt, dass Nidogen-1 und Nidogen-2 im gesunden humanen hyalinen Gelenkknorpel vorkommen und eine Rolle in der Osteoarthritis spielen. Nidogen-1 befindet sich in der extrazellulären Matrix des Knorpels und wird in der Osteoarthritis weniger, Nidogen-2 hingegen liegt ausschließlich perizellulär und wird in der Osteoarthritis verstärkt exprimiert. Ähnliches wurde schon von Tesche und Miosge (2004) für Perlekan gezeigt, welches ebenfalls in die Pathogenese der Osteoarthritis involviert ist.

Ein weiterer interessanter Aspekt sind die Ergebnisse der Microarrayanalyse für
Laminin- α 3. Hier wurde gezeigt, dass Laminin- α 3 überhaupt im menschlichen Knorpel vorkommt und bei allen sechs Proben aus osteoarthritischen Knorpel mehr Laminin-α3 vorhanden ist als in den Proben aus zwei gesunden Chondrozyten-Zelllinien, somit scheinen auch andere Laminine ein ähnlich mögliches regeneratives Potenzial aufzuweisen. Dabei haben Proben von Männern zweimal so viel Laminin- α 3 und die Proben von Frauen eineinhalbmal so viel Laminin-α3 wie die gesunden Chondrozyten. Bemerkenswert ist allerdings der eben schon erwähnte geschlechtliche Unterschied in der Laminin-Expression, alle Proben der Männer zeigen einen höheren Gehalt an Laminin-α3 als die Proben der Frauen. Die Literatur bestätigt, dass mehr Frauen an Osteoarthritis erkranken als Männer (Bukulmez et al. 2006) und vielleicht spielt die verstärkte Lamininexpression bei den Männern eine Rolle bei der Prävention bzw. auch bei der von mir oben beschriebenen möglichen Regeneration der Osteoarthritis. Passend dazu sind die Resultate eines entsprechenden Rezeptors bzw. seiner Laminin- α 3, Untereinheit Integrin- αV . für welche ebenfalls in den Osteoarthritisproben erhöht sind (Koelling et al 2009). Die oben schon erwähnte Möglichkeit, der fibrillären Anordnung von Laminin-6 (α 3, β 1, γ 1) (Jones et al. 2005) wird durch die Ergebnisse des Microarray für Laminin-α3 bestätigt. So kann man sich vorstellen, dass der Knorpel versucht über diese widerstandsfähigen Fibrillen der mechanischen Überbelastung in der Osteoarthritis entgegen zu wirken und so einen vermehrten Abbau der extrazellulären Matrix verringert. Dabei wäre aber die Lokalisation von Laminin-6 entscheident, es müsste sich vor allem an der Gelenkoberfläche befinden und den dort als erstes auftretenden Belastungen sofort entgegen wirken.

Der quantitative Nachweis von Laminin-α5 mittels Immunogoldhistochemie im Elektronenmikroskop zeigt, dass mehr Laminin-α5 in den makroskopisch defekten Knorpelbereichen des Gelenks zu finden ist, als in den makroskopisch intakten Arealen. Dabei ist festzustellen, dass sich in den osteoarthritischen Knorpelproben aus dem makroskopisch defekten Bereich ein weiterer Chondrozytenphänotyp identifizieren lässt. Dieser Zelltyp lässt sich durch seinen spindelförmigen, schmalen Phänotyp und sein stark ausgeprägtes rauhes endoplasmatisches Retikulum charakterisieren. In der perizellulären Matrix

dieses Zelltyps befindet sich im Vergleich zu den normalen Chondrozyten aus den Osteoarthritisproben mehr Laminin- α 5. Hier kann spekuliert werden, ob es sich bei diesem Zelltyp eventuell um die von Koelling et al. (2009) beschriebenen chodrogenen Progenitorzellen handelt, welche regenerative Eigenschaften für die Knorpelmatrix in der Zellkultur gezeigt haben. Abgesehen von der auffälligen Gestallt der Zellen, ist der hohe Gehalt an Laminin-α5 ein weiteres Indiz für das oben besprochene regenerative Potential der Laminine. Da es sich hierbei gerade um Laminin- α 5 handelt, ist sehr interessant, wenn man bedenkt, das die Osteoarthritis auch eine Entzündung ist und Laminin-a5 antiinflammatorische Wirkung zeigt. So wurde von Khosnoodi et al. (2008) gezeigt, dass die Lamininα5-Untereinheit aufgrund ihrer langen N-terminalen Domäne ein sehr stabiles Netzwerk mit sich selbst als Heterotrimer, z.B. in Form von Laminin- α 5 β 1 γ 1, bilden kann. Diese Stabilität innerhalb einer Basalmembran, welche z.B. ein Gefäßendothel umgibt, zeigt seine antiinflammatorischen Wirkungen vor allem darin, dass es den Leukozyten nicht so schnell gelingt durch die Endothelauskleidung des Gefäßes und anschließend durch die entsprechende Basalmembran migratorisch in das Entzündungsgebiet zu gelangen. Wie oben beschrieben worden ist, stellt die perizelluläre Matrix der Chondrozyten ein Basalmembranäquivalent dar und deswegen ist es denkbar, dass die Chondrozyten versuchen sich selbst durch vor Entzündungsreizen durch eine erhöhte Sekretion von Laminin-α5 zu schützen. Interessanterweise wurde von Dangerfield et al. (2002) gezeigt, dass der entsprechende Integrin-Rezeptor α6β1 für Laminin-α5 in Entzündungen ebenfalls verstärkt exprimiert wird. Man könnte vermuten, dass die Chondrozyten in der Osteoarthritis diesen ebenfalls verstärkt exprimieren und so die perizelluläre Matrix als eine Art Entzündungsschutz umstrukturieren. Im Gegensatz zu Laminin-a5 ist Laminin-a4 hingegen eher proinflammatorisch, denn das Netzwerk von Laminin- $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ kann leichter von Leukozyten durchquert werden und stellt somit keine wirksame Barriere dar (Khoshnoodi et al. 2008) Die Gefäßeinsprossungen in den osteoarthritischen Knorpel könnten somit Zellen des Immunsystems anlocken, ob sie aber durch die Basalmembran gelangen hängt von ihrer Zusammensetzung ab.

4.3 Nachweise von Laminin-Chondrozyten-Interaktionen

Das Ergebnis des Experiments "Vergleichende Genexpressionsanalyse von Chondrozyten nach Stimulation mit Laminin-1 in 3D-Alginat-Kultur" macht deutlich, dass die Stimulation der Chondrozyten aus osteoarthritischen Knorpel mit Laminin-1, im Gegensatz zu unstimulierten Chondrozyten aus osteoarthritischen Knorpel, eine verstärkte mRNA Expression zur Folge hat. Dies zeigt sich vor allen bei den typischen Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen Typ II und COMP, aber auch bei den Bestandteilen der Basalmembran, wie z.B. der Laminin-y1-Kette und dem Bestandteil der Lamininrezeptoruntereinheit Integrin-ß1. Die verstärkte Expression von Kollagen Typ II und COMP lässt auf eine mögliche Regeneration der osteoarthritischen Chondrozyten in der 3D-Alginat-Kultur durch Laminin-1 schließen. Die Vergleiche von osteoarthritischen Knorpel, Laminin-1 stimulierten osteoarthritischen Knorpel, gesundem Knorpel, Laminin-1 stimulierten gesundem Knorpel und chondrogenen Progenitorzellen zeigen, dass die chondrogenen Progenitorzellen eine erhöhte Expression für die typischen Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knorpels, wie z.B. für Kollagen Typ II, und COMP aufweisen, ebenso gibt es eine verstärkte Expression der klassischen Basalmembrankomponenten wie z. B. für Perlekan, Kollagen IV und für die Laminin-y1-Kette. Interessanterweise sind auch für Knorpel untypische mRNA's wie z. B. alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I verstärkt exprimiert, was wiederum den Stammzellcharakter der chondrogenen Progenitorzellen unterstreicht. Die Auswertung der Chondrozytenzahlen des Zelladhäsionsassays zeigte, dass mit steigender Proteinkonzentration auch mehr Chondrozyten adhärierten. Dadurch wird bestätigt, dass die Chondrozyten mit Laminin-1 über Rezeptoren, wie z.B. Integrin- α 1 β 1, (Timpl et al. 2001) an der Zelloberfläche interagieren. Interessanterweise zeigen die Chondrozyten, welche dem Randbereich des Defekts isoliert wurden ein größeres aus Adhäsionspotenzial als die Chondrozyten die aus dem makroskopisch intakten Areal gewonnen wurden, deswegen kann man vermuten, dass die Chondrozyten aus dem Randbereich des Defekts mehr Oberflächenrezeptoren exprimieren. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse Genexpressionsanalyse von Chondrozyten bestätig, weil dort ebenfalls erhöhte mRNA-Level für Integrin-ß1 nachgewiesen werden konnten. Loeser et al. (1993) erbrachte bereits den

mit Antikörpern geblockt wurde und darauf hin das Attachment der Chondrozyten zu Fibronektin, Kollagen Typ II und VI um mehr als 90% reduziert wurde. In vivo hätte dies extreme Auswirkungen auf die Knorpelintegrität, so ist es z.B. denkbar, dadurch Festigkeit, Druckelastizität und die Resistenz gegenüber dass Scherkräften stark vermindert werden und somit keine physiologische Gelenkbelastung erfolgen kann. Weiterhin konnte von Carlson et al. (1994) in einem Primatenmodel für Osteoarthritis im Vergleich zum gesunden Primaten gezeigt werden, dass die Integrine verstärkt exprimiert werden und eine wichtige Rolle in der Osteoarthritis übernehmen. Die Integrinexpression wird über TGF-ß und TGF-1 reguliert (Loeser et al. 1993). Goldring (2006) diskutierte bereits, dass TGF-ß und TGF-1 im Verlauf der Osteoarthritis verstärkt gebildet werden. Aufgrund dieser Aussagen, kann man schlussfolgern, dass die Integrine, genau wie die oben diskutierten Laminine, in der Osteoarthritis verstärkt exprimiert werden.

5. Zusammenfassung

Die Laminin-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, und $\gamma 1$ wurden in dieser Arbeit als Bestandteile der extrazellulären Matrix des menschlichen Knorpels und in den mesenchymalen Extremitätenanlagen nachgewiesen, wobei von allen, bis auf Laminin- α 1, noch nicht bekannt war, dass sie in diesen überhaupt vorkommen. Generell konnte nachgewiesen werden, dass mehr Laminin im osteoarthritischen Knorpel vorkommt als im gesunden. Dabei fiel auf, dass Männer mehr Laminin-α3 exprimieren als Frauen, welche bekanntlich häufiger an Osteoarthritis erkranken als Männer. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge von Laminin um die elongierten Chondrozyten bzw. die chondrogenen Progenitorzellen aus den späten Stadien der Osteoarthritis am stärksten erhöht war. Dies weist auf deren Regenerationsaktivität hin. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Lamininstimulation von osteoarthritischen Chondrozyten eine verstärke von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, welche gesunden Expression Verhältnissen entspricht, hervorruft. Auch dies lässt auf eine Bedeutung von Laminin-Ketten für das regenerative Potential der chondrogenen Progenitorzellen schließen. Zum Abschluss wurden adhäsive Eigenschaften spezifisch für Chondrozyten aus den späten Stadien der Osteoarthritis gezeigt, und Chondrozyten-Laminin-Interaktionen genauer beleuchtet. Insgesammt lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die untersuchten Laminine den Chondrozyten und den chondrogenen Progenitorzellen dabei helfen, mögliche Regenerationsprozesse durchzuführen und die Knorpelintegrität in den späten Stadien der Osteoarthritis wiederherzustellen. Deshalb scheint es möglich, dass diese eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielen.

6. Literaturverzeichnis

Aigner T, Gerwin N (2007): Growth plate cartilage as developmental model in osteoarthritis research--potentials and limitations. Curr Drug Targets <u>8</u>, 377-85

Akimov SS, Belkin AM (2001): Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGFbeta-dependent matrix deposition. J Cell Sci <u>114</u>, 2989-3000

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. Arthritis Rheum <u>29</u>, 1039-49

Ateshian GA, Wang H (1995): A theoretical solution for the frictionless rolling contact of cylindrical biphasic articular cartilage layers. J Biomech <u>28</u>, 1341-55

Aumailley M, Nurcombe V, Edgar D, Paulsson M, Timpl R (1987): The cellular interactions of laminin fragments. Cell adhesion correlates with two fragment-specific high affinity binding sites. J Biol Chem <u>262</u>, 11532-8

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC (2005): A simplified laminin nomenclature. Matrix Biol <u>24</u>, 326-32

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010): Integrins. Cell Tissue Res <u>339</u>, 269-80

Barksby HE, Milner JM, Patterson AM, Peake NJ, Hui W, Robson T, Lakey R, Middleton J, Cawston TE, Richards CD (2006): Matrix metalloproteinase 10 promotion of collagenolysis via procollagenase activation: implications for cartilage degradation in arthritis. Arthritis Rheum <u>54</u>, 3244-53

105

Bau B, Haag J, Schmid E, Kaiser M, Gebhard PM, Aigner T (2002): Bone morphogenetic protein-mediating receptor-associated Smads as well as common Smad are expressed in human articular chondrocytes but not up-regulated or down-regulated in osteoarthritic cartilage. J Bone Miner Res <u>17</u>, 2141-50

Beesley JE (1989): Immunolabelling and electron microscopy in cytochemistry. Curr Opin Immunol <u>2(6)</u>, 927-31

Belkin AM, Stepp MA (2000): Integrins as receptors for laminins. Microsc Res Tech <u>51</u>, 280-301

Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B (2005): Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. Ann Rheum Dis <u>64</u>, 1263-7

Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R ,Miosge N (2001): The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of latestage osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage <u>9</u>(7), 654-63

Borzi RM, Mazzetti I, Marcu KB, Facchini A (2004): Chemokines in cartilage degradation. Clin Orthop Relat Res <u>427</u>, S53-61

Brandt KD, Radin EL, Dieppe PA, van de Putte L (2006): Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. Ann Rheum Dis <u>65</u>, 1261-4

Bruckner JD, Lichtman DM, Alexander AH (1992): Complex dislocations of the distal radioulnar joint. Recognition and management. Clin Orthop Relat Res <u>275</u>, 90-103

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect <u>47</u>, 487-504

Bukulmez H, Matthews AL, Sullivan CM, Chen C, Kraay MJ, Elston RC, Moskowitz RW, Goldberg VM, Warman ML (2006): Hip joint replacement surgery for idiopathic osteoarthritis aggregates in families. Arthritis Res Ther <u>8</u>, R25

Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J (1994): A new nomenclature for the laminins. Matrix Biol <u>14</u>, 209-11

Carlson CS, Loeser RF, Jayo MJ, Weaver DS, Adams MR, Jerome CP (1994): Osteoarthritis in cynomolgus macaques: a primate model of naturally occurring disease. J Orthop Res <u>12</u>, 331-9

Cawston TE, Wilson AJ (2006): Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. Best Pract Res Clin Rheumatol <u>20</u>, 983-1002

Cheng YS, Champliaud MF, Burgeson RE, Marinkovich MP, Yurchenco PD (1997): Self-assembly of laminin isoforms. J Biol Chem <u>272</u>, 31525-32

Colognato H, Yurchenco PD (2000): Form and function: the laminin family of heterotrimers. Dev Dyn <u>218</u>, 213-34

Costell M, Gustafsson E, Aszodi A, Morgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fassler R (1999): Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. J Cell Biol <u>147</u>, 1109-22

Dangerfield J, Larbi KY, Huang MT, Dewar A, Nourshargh S (2002): PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. J Exp Med <u>196</u>, 1201-11

Durr J, Lammi P, Goodman SL, Aigner T, von der Mark K (1996): Identification and immunolocalization of laminin in cartilage. Exp Cell Res <u>222</u>, 225-33

Eavey RD, Schmid TM, Linsenmayer TF (1987): Development of the chick columella: immunohistochemical studies with anti-collagen monoclonal antibodies. Int J Pediatr Otorhinolaryngol <u>13</u>, 99-105

Ekblom P, Lonai P, Talts JF (2003): Expression and biological role of laminin-1. Matrix Biol <u>22</u>, 35-47

Ekenstedt KJ, Sonntag WE, Loeser RF, Lindgren BR ,Carlson CS (2006): Effects of chronic growth hormone and insulin-like growth factor 1 deficiency on osteoarthritis severity in rat knee joints. Arthritis Rheum <u>54</u>, 3850-8

Englund M, Lohmander LS (2004): Risk factors for symptomatic knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy. Arthritis Rheum <u>50</u>, 2811-9

Eyre D (2002): Collagen of articular cartilage. Arthritis Res 4, 30-5

Felson DT (2006): Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. N Engl J Med <u>354</u>, 841-8

Gebhard S, Poschl E, Riemer S, Bauer E, Hattori T, Eberspaecher H, Zhang Z, Lefebvre V, de Crombrugghe B ,von der Mark K (2004): A highly conserved enhancer in mammalian type X collagen genes drives high levels of tissue-specific expression in hypertrophic cartilage in vitro and in vivo. Matrix Biol <u>23</u>, 309-22

Goldring MB, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. J Cell Physiol 213, 626-34

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. J Cell Biochem <u>97</u>, 33-44

Goldring SR, Goldring MB (2004): The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. Clin Orthop Relat Res(<u>427</u> Suppl), S27-36

Grunder T, Gaissmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK (2004): Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. Osteoarthritis Cartilage <u>12</u>, 559-67

Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB (2004): The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. Clin Orthop Relat Res(423), 17-26

Gullberg D (2009): Shift happens--a paradigm shift for the role of integrins in fibrosis. Matrix Biol <u>28</u>, 383

Hamill KJ, Kligys K, Hopkinson SB, Jones JC (2009): Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. J Cell Sci <u>122</u>, 4409-17

Hashimoto J, Ogawa T, Tsubota Y, Miyazaki K (2005): Laminin-5 suppresses chondrogenic differentiation of murine teratocarcinoma cell line ATDC5. Exp Cell Res <u>310</u>, 256-69

Henry MD, Campbell KP (1999): Dystroglycan inside and out. Curr Opin Cell Biol <u>11</u>, 602-7

Hill CL, Gale DG, Chaisson CE, Skinner K, Kazis L, Gale ME ,Felson DT (2001): Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis. J Rheumatol <u>28</u>, 1330-7

Hoffman MP, Nomizu M, Roque E, Lee S, Jung DW, Yamada Y ,Kleinman HK (1998): Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. J Biol Chem <u>273</u>, 28633-41

Hohenester E, Engel J (2002): Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. Matrix Biol <u>21</u>, 115-28

Horton WE, Jr., Yagi R, Laverty D, Weiner S (2005): Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage. Clin Exp Rheumatol <u>23</u>, 103-12

Horton WE, Jr., Bennion P, Yang L (2006): Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. J Musculoskelet Neuronal Interact <u>6</u>, 379-81

Ijiri K, Jee WS, Ma YF, Yuan Z (1995): Remobilization partially restored the bone mass in a non-growing cancellous bone site following long term immobilization. Bone <u>17</u>, 213S-217S

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003): Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res <u>31(4)</u>, e15

Jelic M, Pecina M, Haspl M, Kos J, Taylor K, Maticic D, McCartney J, Yin S, Rueger D, Vukicevic S (2001): Regeneration of articular cartilage chondral defects by osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in sheep. Growth Factors <u>19</u>, 101-13

Jones JC, Lane K, Hopkinson SB, Lecuona E, Geiger RC, Dean DA, Correa-Meyer E, Gonzales M, Campbell K, Sznajder JI (2005): Laminin-6 assembles into multimolecular fibrillar complexes with perlecan and participates in mechanicalsignal transduction via a dystroglycan-dependent, integrin-independent mechanism. J Cell Sci <u>118</u>, 2557-66

Kalluri R (2003): Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer <u>3</u>, 422-33

Kelman A, Lui L, Yao W, Krumme A, Nevitt M, Lane NE (2006): Association of higher levels of serum cartilage oligomeric matrix protein and N-telopeptide crosslinks with the development of radiographic hip osteoarthritis in elderly women. Arthritis Rheum <u>54</u>, 236-43

Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008): Mammalian collagen IV. Microsc Res Tech <u>71</u>, 357-70

Kim YJ, Bonassar LJ, Grodzinsky AJ (1995): The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression. J Biomech <u>28</u>, 1055-66

Kishimoto K, Kitazawa R, Kurosaka M, Maeda S, Kitazawa S (2006): Expression profile of genes related to osteoclastogenesis in mouse growth plate and articular cartilage. Histochem Cell Biol <u>125</u>, 593-602

Knudson CB, Knudson W (1993): Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. FASEB J <u>7</u>, 1233-41

Koelling S, Miosge N (2009): Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. Expert Opin Biol Ther 9(11), 1399-405

Koelling S, Clauditz TS, Kaste M, Miosge N (2006): Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Res Ther <u>8</u>, R56

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 <u>4</u>, 324-35

Komuro H, Olee T, Kuhn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton-Achermann L, Lotz M (2001): The osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappaB/receptor activator of nuclear factor kappaB ligand system in cartilage. Arthritis Rheum <u>44</u>, 2768-76

Kruegel J, Sadowski B, Miosge N (2008): Nidogen-1 and nidogen-2 in healthy human cartilage and in late-stage osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum <u>58</u>, 1422-32

Krugluger J, Knahr K (2001): Minimally invasive disc surgery: a review. Int Orthop <u>24</u>, 303-6

Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. Clin Biochem <u>25</u>, 155-63

Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ ,Schunke M (2005): Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. Ann Anat <u>187</u>, 473-85

Kvist AJ, Nystrom A, Hultenby K, Sasaki T, Talts JF, Aspberg A (2008): The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent? Matrix Biol <u>27</u>, 22-33

Lane LB, Villacin A, Bullough PG (1977): The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. J Bone Joint Surg Br <u>59</u>, 272-8

Lee SK, Malpeli M, Cancedda R, Utani A, Yamada Y, Kleinman HK (1997): Laminin chain expression by chick chondrocytes and mouse cartilaginous tissues in vivo and in vitro. Exp Cell Res <u>236</u>, 212-22

Lefebvre V, Smits P (2005): Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. Birth Defects Res C Embryo Today <u>75</u>, 200-12

Li WJ, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS (2005): A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. Biomaterials <u>26</u>, 599-609

Li X, Benjamin Ma C, Link TM, Castillo DD, Blumenkrantz G, Lozano J, Carballido-Gamio J, Ries M ,Majumdar S (2007): In vivo T(1rho) and T(2) mapping of articular cartilage in osteoarthritis of the knee using 3 T MRI. Osteoarthritis Cartilage <u>15</u>, 789-97 **Loeser RF** (1993): Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins. Arthritis Rheum <u>36</u>, 1103-10

Loeser RF (2000): Chondrocyte integrin expression and function. Biorheology <u>37</u>, 109-16

Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB (2005): The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. Arthritis Res Ther <u>7</u>, 29-37

Lüllmann-Rauch R: Hyaliner Knorpel; in: Histologie. Verstehen - Lernen – Nachschlagen; 1. Auflage; Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart 2003, 138

Maroudas A, Bayliss MT, Venn MF (1980): Further studies on the composition of human femoral head cartilage. Ann Rheum Dis <u>39</u>, 514-23

Maroudas A, Palla G, Gilav E (1992): Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. Connect Tissue Res <u>28</u>, 161-9

Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R ,Gilav E (1998): Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. Arch Biochem Biophys <u>350</u>, 61-71

Martin JA, Brown T, Heiner A, Buckwalter JA (2004): Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. Biorheology <u>41</u>, 479-91

McDevitt CA (1973): Biochemistry of articular cartilage. Nature of proteoglycans and collagen of articular cartilage and their role in ageing and in osteoarthrosis. Ann Rheum Dis <u>32</u>, 364-78

Miner JH (2008): Laminins and their roles in mammals. Microsc Res Tech <u>71</u>, 349-56

Miner JH, Cunningham J, Sanes JR (1998): Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. J Cell Biol <u>143</u>, 1713-23

Miner JH, Li C, Mudd JL, Go G, Sutherland AE (2004): Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. Development <u>131</u>, 2247-56

Miosge N, Flachsbart K, Goetz W, Schultz W, Kresse H ,Herken R (1994): Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. Histochem J <u>26</u>, 939-45

Miosge N, Kother F, Heinemann S, Kohfeldt E, Herken R ,Timpl R (2000): Ultrastructural colocalization of nidogen-1 and nidogen-2 with laminin-1 in murine kidney basement membranes. Histochem Cell Biol <u>113</u>, 115-24

Miosge N, Sasaki T, Timpl R (2002): Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. Matrix Biol <u>21</u>, 611-21

Mobasheri A (1998): Correlation between [Na+], [glycosaminoglycan] and Na+/K+ pump density in the extracellular matrix of bovine articular cartilage. Physiol Res <u>47</u>, 47-52

Mollenhauer J, Aurich ME, Zhong Z, Muehleman C, Cole AA, Hasnah M, Oltulu O, Kuettner KE, Margulis A ,Chapman LD (2002): Diffraction-enhanced X-ray imaging of articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage <u>10</u>, 163-71

Moulson CL, Li C, Miner JH (2001): Localization of Lutheran, a novel laminin receptor, in normal, knockout, and transgenic mice suggests an interaction with laminin alpha5 in vivo. Dev Dyn <u>222</u>, 101-14

Muehleman C, Majumdar S, Issever AS, Arfelli F, Menk RH, Rigon L, Heitner G, Reime B, Metge J, Wagner A (2004): X-ray detection of structural orientation in human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage <u>12</u>, 97-105

Muller F, O'Rahilly R (1987): The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of secondary neurulation at stage 12. Anat Embryol (Berl) <u>176(4)</u>, 413-30

Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR ,Merlie JP (1995): Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. Nature <u>374</u>, 258-62

Patton BL (2000): Laminins of the neuromuscular system. Microsc Res Tech <u>51</u>, 247-61

Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, Benoist C, Gravallese EM (2001): TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. Am J Pathol <u>159</u>, 1689-99

PfaffI MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucleic Acids Res <u>29</u>, e45

Plantman S, Patarroyo M, Fried K, Domogatskaya A, Tryggvason K, Hammarberg H, Cullheim S (2008): Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. Mol Cell Neurosci <u>39</u>, 50-62

Poole AR (1999): An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. Front Biosci <u>4</u>, D662-70

Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Choi H, Rosenberg LC (1984): Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. J Cell Biol <u>98</u>, 54-65

Poole CA, Ayad S, Schofield JR (1988): Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. J Cell Sci <u>90, 6</u>35-43

Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004): Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. Development <u>131</u>, 1619-28

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006): Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cartilage <u>14</u>, 13-29

Pulai JI, Chen H, Im HJ, Kumar S, Hanning C, Hegde PS, Loeser RF (2005): NFkappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. J Immunol <u>174</u>, 5781-8

Quondamatteo F (2002): Assembly, stability and integrity of basement membranes in vivo. Histochem J <u>34</u>, 369-81

Radin EL, Rose RM (1986): Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. Clin Orthop Relat Res(213), 34-40

Roos EM (2005): Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. Curr Opin Rheumatol <u>17</u>, 195-200

Salter DM, Wright MO, Millward-Sadler SJ (2004): NMDA receptor expression and roles in human articular chondrocyte mechanotransduction. Biorheology <u>41</u>, 273-81

Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB (2008): Osteoarthritis: a tale of three tissues. Bull Hosp Jt Dis <u>66</u>, 244-50

Sasaki T, Timpl R (2001): Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive and binds beta1 and alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. FEBS Lett <u>509</u>, 181-5

Sasaki T, Giltay R, Talts U, Timpl R, Talts JF (2002): Expression and distribution of laminin alpha1 and alpha2 chains in embryonic and adult mouse tissues: an immunochemical approach. Exp Cell Res <u>275</u>, 185-99

Scheele S, Nystrom A, Durbeej M, Talts JF, Ekblom M ,Ekblom P (2007): Laminin isoforms in development and disease. J Mol Med <u>85</u>, 825-36

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M ,Ragg T (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol <u>7</u>, 3

Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, Mio F, Mori M, Miyamoto Y, Masuda I (2005): A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. Nat Genet <u>37</u>, 607-12

Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M ,Edgar D (1999): Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. J Cell Biol <u>144</u>, 151-60

Sorokin L (2010): The impact of the extracellular matrix on inflammation. Nat Rev Immunol <u>10</u>, 712-23

Sugawara K, Tsuruta D, Ishii M, Jones JC ,Kobayashi H (2008): Laminin-332 and -511 in skin. Exp Dermatol <u>17</u>, 473-80

Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M (2005): Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. J Biol Chem <u>280</u>, 19185-95

Tchetina EV, Squires G, Poole AR (2005): Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. J Rheumatol <u>32</u>, 876-86

Tchetina EV, Antoniou J, Tanzer M, Zukor DJ, Poole AR (2006): Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production. Am J Pathol <u>168</u>, 131-40

Tchetina EV, Di Battista JA, Zukor DJ, Antoniou J, Poole AR (2007): Prostaglandin PGE2 at very low concentrations suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic articular cartilage: this involves a decrease in expression of proinflammatory genes, collagenases and COL10A1, a gene linked to chondrocyte hypertrophy. Arthritis Res Ther <u>9</u>, R75

Tesche F, Miosge N (2004): Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. Osteoarthritis Cartilage <u>12</u>, 852-62

Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE (2001): Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. Arthritis Rheum <u>44</u>, 585-94

Timpl R, Aumailley M (1989): Biochemistry of basement membranes. Adv Nephrol Necker Hosp <u>18</u>, 59-76 **Thyboll J**, Kortesmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, Sorokin L, Risling M, Cao Y, Tryggvason K (2002): Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. Mol Cell Biol <u>22</u>, 1194-202

Tzu J, Marinkovich MP (2008): Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. Int J Biochem Cell Biol 40(2), 199-214

Valdes AM, Van Oene M, Hart DJ, Surdulescu GL, Loughlin J, Doherty M, Spector TD (2006): Reproducible genetic associations between candidate genes and clinical knee osteoarthritis in men and women. Arthritis Rheum <u>54</u>, 533-9

Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD (2007): Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum <u>56</u>, 137-46

Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP ,Tekoppele JM (2000): Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. Biochem J <u>350</u>, 381-7

Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M ,McWilliams DF (2007): Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage <u>15</u>, 743-51

Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH (2004): Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage <u>12</u>, 963-73

Wu JJ, Eyre DR (1989): Covalent interactions of type IX collagen in cartilage. Connect Tissue Res <u>20</u>, 241-6 **Xie Z**, Zhao W, Zheng X (1997): [Histological study on the using of autogenous costal perichondrium graft to repair the cartilage of condylar process of mandible]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi <u>11</u>, 199-202

Xu H, Christmas P, Wu XR, Wewer UM ,Engvall E (1994): Defective muscle basement membrane and lack of M-laminin in the dystrophic dy/dy mouse. Proc Natl Acad Sci U S A <u>91</u>, 5572-6

Xu L, Peng H, Glasson S, Lee PL, Hu K, Ijiri K, Olsen BR, Goldring MB ,Li Y (2007): Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Rheum <u>56</u>, 2663-73

Yamada K, Fukui T, Tsuruta A, Hanada K, Hosogai A, Kohno S ,Hayashi T (2003): The relationship between retruded contact position and intercuspal position in patients with TMJ osteoarthritis. Cranio <u>21</u>, 240-7

Yang C, Liang C, Huang W (2005): [Repair of thyroid cartilage defects with chondrocyte-allogenous acellular cartilaginous matrix composite in rabbits]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi <u>19</u>, 478-80

Yurchenco PD, Cheng YS (1993): Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. J Biol Chem <u>268</u>, 17286-99

Yurchenco PD, Quan Y, Colognato H, Mathus T, Harrison D, Yamada Y, O'Rear JJ (1997): The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. Proc Natl Acad Sci U S A <u>94</u>, 10189-94

Yurchenco PD, Cheng YS, Campbell K, Li S (2004): Loss of basement membrane, receptor and cytoskeletal lattices in a laminin-deficient muscular dystrophy. J Cell Sci <u>117</u>, 735-42

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Längsschnitt durch den hyalinen Gelenkknorpel	S. 1
Abb. 2:	Molekularer Aufbau der extrazellulären Matrix; modifiziert nach: Lüllmann-Rauch (2003) S. 138;	
	Ch-zyt: Chondrozyt, Agg: Aggrekan, VP: Linkerprotein, HA: Hyaluronan	S. 5
Abb. 3:	Schema: Pathogenese der Osteoarthritis (Goldring MB und Goldring SR 2007, S. 627)	S. 8
Abb. 4:	Mediatoren in der Pathogenese der Osteoarthritis; modifiziert nach: Samuels et al. 2008, S. 245; IL1: Interleukin 1, IL8: Interleukin 8, NO: Stickstoffmonoxid, PGE 2: Prostaglandin E2, TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor α , TGF- β : Transforming Growth Factor β , BMP-2: Bone Morphogenetic Protein 2, MMP-13: Matrixmetalloproteinase 13, TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteinases.	S.13
Abb. 5:	Die drei Lamininkonformationen (Miner 2008, S.350)	S. 21
Abb. 6:	Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin- Untereinheit α5 in den knorpeligen Anlagen der Fußknochen (links) und der Rippe (rechts)	S. 80
Abb. 7:	Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin- Untereinheiten α 1, α 5, β 1 und γ 1 in Knorpelanlagen des Metatarsus	S. 81
Abb. 8:	Laminin- α 5 in der Zehanlage, (links Übersicht und rechts vergrößert)	S. 81

121

- Abb. 9:Lichtmikroskopische Immunhistochemie: Die Laminin-β1-
Untereinheit im gesunden Kniegelenk, rechts in Übersicht
und links in VergrößerungS. 82
- Abb. 10:LichtmikroskopischeImmunhistochemie:DieLaminin-Untereinheiten α1 und α5 in Übersicht und Vergrößerung
während der Osteoarthritis im KniegelenkS. 83
- Abb. 11:LichtmikroskopischeImmunhistochemie:DieLaminin-Untereinheiten β1 und γ1 in Übersicht und Vergrößerung
während der Osteoarthritis im KniegelenkS. 84
- Abb. 12:Lichtmikroskopische In-Situ-Hybridisation für Laminin-α5, a:Übersicht im osteoarthritischen Knorpel und b: einzelnerChondrozytS. 86
- Abb. 13: Coomassie Blue Proteinfärbung mit Leiter (links) und Western Blot (rechts) für Laminin-γ1 an osteoarthritischen S. 88 Knorpel
- Abb. 14:ElektronenmikroskopischeImmungoldhistochemiefürLaminin-α5 in der Übersicht, links gesunder, mitte erkrankterund rechts elongierter ChondrozytS. 99
- Abb. 15: Elektronenmikroskopische Immungoldhistochemie für Laminin-α5 in einem Auschnitt aus der perizellulären Matrix, links Matrix um einen gesunden, mitte Matrix um einen erkrankten und rechts Matrix um einen elongierten Chondrozyt
- Abb. 16:Unterschiede in der Laminin-α5-QuantitätS. 90

Abb. 17: Zelladhäsionsassay von Chondrozyten an Laminin-1, blau Zellen aus osteoarthritischem Areal, pink Zellen aus makroskopisch intaktem Bereich S. 90
Abb. 18: RT-PCR-Daten: relative mRNA-Level für Col II, COMP, Laminin-γ1& Integrin-β1 nach Pfaffl normalisiert, im Vergleich mit bzw. ohne Laminin-1-Stimulation S. 91
Abb. 19: Microarray für Laminin-α3 in Mittelwerten für männliche und weibliche Proben S.93

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	konservative Behandlungsmöglichkeiten der Osteoarthritis	S. 17
Tab. 2:	operative Behandlungsmöglichkeiten der Osteoarthritis	S. 18
Tab. 3:	Lamininnomenklaturen	S. 20
Tab. 4:	Lamininrezeptoren	S. 23
Tab. 5:	Ergebnisse lichmikroskopische Immunhistochemie	S. 85
Tab. 6:	Ergebnisse lichtmikroskopische In-Situ-Hybridisierung	S. 87
Tab. 7:	Ergebnisse Western-Blot	S. 88

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nicolai Miosge für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Ein mindestens genauso großer Dank gilt ihm dafür, dass ich während der Zeit in seinem Labor die Freude und das Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten entdeckt habe.

Danken möchte ich Herrn Dr. Nikolaus Gersdorff, welcher mir die Dissertation in der Abteilung erst ermöglicht hat.

Frau Jenny Krügel danke ich ganz besonders für die Anregungen, sich mit den Basalmembrankomponenten im Knorpelgewebe auseinanderzusetzen, für ihr großes Interesse und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei vielen Fragen.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Sebastian Koelling für seine Hilfsbereitschaft und für die Durchführung der Microarrayanalyse.

Meinen Mitdoktoranden, Frau Bode und Frau Sadowski, danke ich für das prima Arbeitsklima und die wirklich immer gute Zusammenarbeit. Lebenslauf (aus Datenschutzgründen nicht digital verfügbar)