Aus der Abteilung Histologie (Komm. Leiter: Prof. Dr. med. N. Miosge)

im Zentrum Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Cartilage oligomeric matrix protein in der Pathogenese der Arthrosis deformans

INAUGURAL – DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Till S. Clauditz aus Göttingen

Göttingen 2007

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. Miosge
- II. Berichterstatter/in:
- III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 3.1	Seite 18	Tabelle 1	Seite 3
Abb. 3.2	Seite 18	Tabelle 2	Seite 5-6
Abb. 3.3	Seite 18		
Abb. 3.4	Seite 19		
Abb. 3.5	Seite 19		
Abb. 3.6	Seite 19		
Abb. 3.7	Seite 21		
Abb. 3.8	Seite 23		
Abb. 3.9	Seite 25		
Abb. 3.9.1	Seite 27		
Abb. 3.9.2	Seite 28		
Abb. 3.9.3	Seite 30		
Abb. 3.9.4	Seite 31		
Abb. 3.9.5	Seite 32		

1. EINLEITUNG	1
1.1 Osteoarthrose	1
1.1.1 Pathogenese der Arthrosis deformans	
1.2 FUNKTION DES HYALINEN GELENKKNORPELS DES MENSCHEN	
1.2.1 Aufbau des hyalinen Knorpels	
1.2.2 Stadieneinteilung der Arthrose	5
1.3 CARTILAGE OLIGOMERIC MATRIX PROTEIN (COMP)	
1.4 Fragestellung	
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 PROBEN UND PRÄPARATION	
2.1.1 Lichtmikroskopische Präparate	
2.1.2 Elektronenmikroskopische Präparate	
2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbetechnik	
2.3 Alcianblau-Färbetechnik	
2.4 Herkunft der Antikörper	
2.5 LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE IMMUNOHISTOCHEMIE	
2.5.1 Lichtmikroskopische Immunohistochemie nach der PAP-Methode	
2.5.2 Elektronenmikroskopische Immunohistochemie	
2.5.3 Kontrollen	
2.6 Sondenherstellung	
2.7 LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	
2.7.1 Lichtmikroskopische In-situ-Hybridisierung	
2.7.2 Elektronenmikroskopische In-situ-Hybridisierung	
2.7.3 Kontrollen	
3. ERGEBNISSE	
3.1 Klassifizierung der Knorpelproben	
3.1.1 Klassifizierung der H.EProben	
3.1.2 Klassifizierung der Alcianblau-Färbung	
3.2 Auswertung der Immunohistochemie	
3.2.1 Lichtmikroskopische Immunohistochemie	
3.2.2 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie	
3.3 Auswertung der In-Situ-Hybridisierung	
3.3.1 Lichtmikroskopische In-situ-Hybridisierung	
3.3.2 Elektronenmikroskopische In-situ-Hybridisierung	
3.3.3 Statistische Auswertung der ultrastrukturellen In-situ-Hybridisierung	
4. DISKUSSION	
4.1 Methoden-Diskussion	
4.2 Diskussion der Immunogoldhistochemie	
4.3 DISKUSSION DER ULTRASTRUKTURELLEN IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH)	
4.4 CARTILAGE-OLIGOMERIC-MATRIX-PROTEIN (COMP) IM SPÄTSTADIUM DER ARTHROSE	
5. ZUSAMMENFASSUNG	
6. LITERATURVERZEICHNIS	

<u>1. Einleitung</u>

Gonarthrose, eine primäre Arthrose des Kniegelenkes, ist eine chronisch degenerative Gelenkerkrankung, bei der sich hyaliner Gelenkknorpel in seiner Struktur sowie Zellbiologie verändert. Das Resultat ist eine Einschränkung der Funktion des betroffenen Gelenkes, welche in ihrer Ausprägung unterschiedlich sein kann. Neben der Störung des Metabolismus der Proteoglykane und Kollagene, den Hauptbestandteilen der extrazellulären Matrix, sind ebenfalls Veränderungen im Stoffwechsel von Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) zu finden.

<u>1.1 Osteoarthrose</u>

Die Arthrosis deformans (Osteoarthrose) ist ein Prozess, bei dem am Ende die vollständige Zerstörung des hyalinen Gelenkknorpels steht. Es ist kein primär entzündlicher Prozess (Hesse et al. 1990), der zu diesem Gewebsverlust führt, sondern ein multifaktorieller Vorgang (Gardner 1994). Zwei Formen der Osteoarthrose sind voneinander zu unterscheiden:

Die primäre beziehungsweise idiopathische Form, deren Ursache noch nicht endgültig geklärt ist, sowie die sekundäre Form. Im Gegensatz zur primären liegen bei der sekundären Osteoarthrose präarthrotische Knorpelläsionen vor. Diese Läsionen können durch Traumata, Infekte, Stoffwechselstörungen und genetische Störungen verursacht sein. Für die Pseudoachondroplasie (PSACH) und die "multiple epiphyseal dysplasia (MED)" konnte ein genetischer Nachweis erbracht und ein Zusammenhang mit der Entstehung einer frühen Arthrosis deformans bewiesen werden (Briggs et al. 1995).

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Arthrosis deformans scheint die gestörte Zell-Matrix-Interaktion zu sein (Poole 1999). Die ersten Läsionen beim Prozess der Arthrose scheinen von den Chondrozyten und der sie umgebenden Knorpelmatrix auszugehen (von der Mark und Glückert 1990). Dieser Prozess wird sekundär von ossären Veränderungen in Form von Sklerosierung und der Entstehung von zystenähnlichen Strukturen begleitet. Eine Unterscheidung von den entzündlichen Arthritiden, bei denen der sekundären Gelenkschädigung eine entzündliche Reaktion vorausgeht, ist an dieser Stelle möglich. Der weitere Progress der Arthrose führt zu einer Zerstörung der Knorpelmatrix sowie einem erhöhten Wassergehalt im Knorpelgewebe, was einen Verlust der Festigkeit im Gewebe bewirkt (Buckwalter und Mankin 1998). Trotz ablaufender De- und Regenerationsprozesse kommt es in Folge der Progredienz zu einer Zerstörung der Knorpelsubstanz bis auf den subchondralen Knochen.

1.1.1 Pathogenese der Arthrosis deformans

In dem Anfangsstadium der Arthrosis deformans kommt es zu einer Fibrillierung kollagener Fasern im Bereich der Superfizialschicht. Des Weiteren geht dieser Prozess mit einem Verlust von Proteoglykanen einher, wobei Aggrecan und Decorin stark betroffen sind. Resultat des Umbaus der Knorpelsubstanz ist der Verlust von Elastizität und Barrierefunktion der superfizialen Zone, die einen Schutz gegen Moleküle aus der Synovia darstellt (Poole 1999, Buckwalter und Mankin 1998).

Als Folge des Proteoglykanverlustes kommt es im Rahmen der Regenerationsversuche zu einer gesteigerten Translation. Dabei werden die Proteoglykane Decorin und Biglykan im fortgeschrittenen Stadium der Arthrose verstärkt exprimiert (Bock et al. 2001). Mit dem Verlust von Knorpelsubstanz geht eine erhöhte Wasserpermeabilität einher, die bei mechanischer Belastung zu einem beschleunigten Austritt von in der Matrix gebundenem Wasser führt. Durch das Fehlen an Wasser in der kartilaginären Matrix kommt es zu einer Einschränkung der Fähigkeit des Gelenkknorpels, wieder in seinen Ausgangszustand zurückzukehren (Hesse et al. 1990). Zudem führt der progressive Krankheitsverlauf langfristig zu einem fortschreitenden Verlust der Knorpelschichten, wobei sich vertikal gerichtete Fissuren von der freien Gelenkfläche in die Tiefe ausdehnen.

Der Veränderung der Kollagen- und Proteoglykanverteilung folgt die Bildung von Zellclustern (Poole et al. 1991), die Anfangs nur in den oberen Anteilen der Knorpelmatrix zu finden sind und sich im Krankheitsverlauf auch in den tiefen Schichten bilden. Für die zu Clustern angeordneten Zellen konnte bewiesen werden, dass sie über eine hohe Stoffwechselaktivität verfügen (Kouri et al. 1996).

Der zerstörte Knorpel wird durch fibrokartilaginäres Gewebe ersetzt (Gardner 1994), dessen Zusammensetzung verglichen mit gesundem Knorpel sich darin unterscheidet, dass statt Kollagen Typ II vermehrt Kollagen Typ I und Typ III enthalten sind (Miosge et al. 1998, Sandell und Aigner 2001). Die neu entstandene Matrix ist aufgrund ihrer Komponenten jedoch nicht in der Lage, den biomechanischen Belastungen standzuhalten und ein Voranschreiten der Gelenkzerstörung kann durch das Ersatzgewebe nicht verhindert werden.

Auf zellulärer Ebene wurden drei unterschiedliche Subtypen von Chondrozyten entdeckt, die mit Hilfe ultrastruktureller Kriterien sowie ihres Verteilungsmusters im arthrotischen Knorpel klassifiziert wurden (Kouri et al. 1996).

Subpopulation	Zellphänotyp	Lokalisation	Morphologie
	Normal	Superfizial- & obere	Elongiert, perinukleäre Filamente
		Mittelzone	Rund, viele perinukleäre Filamente
Тур І			
	Klonal	Superfizial- & obere	Rund, groß, zerrissene Filamente
		Mittelzone	Zentriolen, peripher primäre Zilien
	Sekretorisch 2a	Mittelzone	Irreguläre Form, prominentes rER
			und Golgi-Komplex, viele intra-
			zytoplasmatische Vakuolen, peri-
Typ II			pher Zilien und Zentriolen
	Sekretorisch 2b	Nur tiefe Zone	Irreguläre Form, erweitertes rER,
			kein Golgi-Komplex
			Unterschiedlicher Grad der Dege-
			neration, pyknotischer Kern, dich-
Typ III	Degenerativ	Alle Zonen	tes Zytosol, dilatierte Kernmemb-
			ran, teilweise Loslösung des Zyto-
			plasmas vom Kern



Das Auftreten der unterschiedlichen Typen von Chondrozyten auf ultrastruktureller Ebene in den Stadien der Arthrose lässt neben den beschriebenen degenerativen Prozessen vermuten, dass es sich dabei um Versuche der Geweberegeneration handelt (Aigner und McKenna 2002, Sandell und Aigner 2001).

Typ-1-Chondrozyten sind vor allem in den Bereichen des arthrotischen Knorpels zu finden, welche sich makroskopisch als intakt darstellen. Dieser Zelltyp weist den charakteristischen Phänotyp eines gesunden Chondrozyten auf. Im Vergleich dazu gibt es die Typ-2-Chondrozyten, welche eine elongierte Form aufweisen und den sekretorisch aktiven Phänotyp darstellen (Bock et al. 2001, Tesche und Miosge 2004, Miosge et al. 1998). Im Spätstadium

der Osteoarthrose wird von den Typ-2-Zellen Kollagen I und III (Poole 1999) exprimiert und eine Abnahme von Kollagen II (Miosge et al. 1998), dem Hauptbestandteil der Kollagene im hyalinen Knorpel, beobachtet. Ebenfalls ist die Syntheserate für Biglycan und Decorin in den Chondrozyten vom Typ 2 erhöht (Bock et al. 2001).

Trotz aller Versuche der Zellen, den hyalinen Gelenkknorpel zu regenerieren, kann das Fortschreiten der Knorpeldegeneration, welche durch Gewebeproteasen unterstützt wird, nicht aufgehalten werden und es kommt zu einer völligen Zerstörung des Knorpels, die eine Freilegung des Knochens zur Folge hat (Poole 1999, Martel-Pelletier 1999, Tesche und Miosge 2004).

<u>1.2 Funktion des hyalinen Gelenkknorpels des Menschen</u>

Der hyaline Knorpel ist im Bereich der Gelenkflächen zu finden. Dort bildet er die letzte Schicht der Diarthrose und stellt eine wichtige Funktion für die Bewegungsabläufe im Gelenk dar (Kuettner 1992). Aufgrund seiner Eigenschaften, hoher Druck- sowie leichter Zugelastizität ausgesetzt zu werden, ist es dem Gewebe möglich, sich nach Deformierung durch Kräfte, die von außen auf es einwirken, wieder in seine Ursprungsform zurückzukehren. Beim gesunden Erwachsenen wird der Knorpel einzig und allein durch Diffusion ernährt, da eine Versorgung mit Blutgefäßen nicht besteht. Die Nährstoffe bezieht der Gelenkknorpel nur über die sich im Gelenk befindliche Synovialflüssigkeit. Das Fehlen von Lymphgefäßen und nervaler Innervation ist ebenfalls zu erwähnen (Muir 1995).

Die hohe mechanische Belastung ist durch ein Netzwerk von Kollagenen und Proteoglykanen möglich, welche den Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix (EZM) darstellen (Morris et al. 2002). Einen großen Anteil des hyalinen Knorpels stellt Wasser mit 70-80%, was in Zusammenhang mit den Proteoglykanen und Kollagen zu der hohen Druckbelastbarkeit führt (Muir 1995). Die EZM besteht zu mehr als 50 % aus Kollagen, wobei es sich zu circa 90% um das Kollagen vom Typ-II handelt. Die Interaktion und Anordnung der Kollagenfibrillen und die hydrophilen Eigenschaften der Proteoglykane führen gemeinsam zu der Fähigkeit nach Belastung wieder in die Ausgangsposition zurückzukehren (Kuettner 1992).

1.2.1 Aufbau des hyalinen Knorpels

Der hyaline Gelenkknorpel lässt sich im Bereich von Gelenkfläche bis zum subchondralen Knochen in vier Zonen beziehungsweise Schichten einteilen (Buckwalter und Mankin 1998). Die Superfizialzone, welche den Abschluss zur freien Gelenkfläche bildet, ist die dünnste der vier Schichten. Sie besteht aus parallel zur Knorpeloberfläche verlaufenden und dicht gepackten Fibrillen. Charakteristisch für diese Zone ist die längliche, ellipsoide Form der Chondrozyten (Collins und McElligott 1960). In der darauf folgenden Transitionalzone sind Chondrozyten anzutreffen, deren Form schon rundlicher wirkt und die zum Teil schon in Chondronen organisiert sind. Die dritte Zone ist die Radialzone, deren Chondrozyten rundlich bis elongiert sind. Charakteristisch für diesen Bereich des Knorpels sind die große Tiefenausdehnung und die säulenförmige Anordnung der Chondrozyten. Im Bezug zur Knorpeloberfläche fällt bei gesundem Knorpel eine senkrechte Ausrichtung der Chondrozytensäulen auf (Morris et al. 2002). Die letze Schicht ist die kalzifizierende Zone, welche durch die Tidemark von der Radialzone getrennt wird. Die Tidemark wird von eng zusammenliegenden Mineralien mit Vesikeln der EZM gebildet. Unabhängig von Dicke und Vorhandensein der übrigen Zonen des hyalinen Knorpels fällt auf, dass die Zone des kalzifizierenden Knorpels in ihrer Tiefenausdehnung konstant bleibt.

1.2.2 Stadieneinteilung der Arthrose

Anhand unterschiedlicher makroskopisch und histologisch beurteilbarer Kriterien kann das Stadium der Arthrose im arthrotischen Knorpelgewebe klassifiziert werden. Die Folgende Tabelle wurde in Anlehnung an das Graduierungsschema von Collins und McElligott (1960) erstellt.

Arthrose-	Chondrozyten	Knorpelgewebe / -zonen	Alcianblau-Färbung
grad			
Grad 0	 Zellverteilung gleichmäßig Zellgröße der Zone entspre- chend 	 Gesundes Gewebe mit glatter Oberfläche Zonen zeigen keine Ver- änderung 	 Superfizial keine Anfärbung Transitional- bis Radiärzone starke Färbung
Grad I	- vereinzelt kleine Cluster anzu- treffen	 tangentiale Fibrillisation der Superfizialzone vertikale Fissuren reichen in die Transitionalzone 	- Anfärbbarkeit der Transitionalzone leicht vermindert

Fortsetzung der Tabelle auf Seite 6

Arthrose-	Chondrozyten	Knorpelgewebe / -zonen	Alcianblau-Färbung
grad			
Grad III Grad III	 Bildung großer Cluster Anstieg der Clusteranzahl Bildung großer Cluster Cluster Cluster Cluster reichen bis in tiefe Zo- nen 	 Totalverlust der Superfizialzone Transitionalzone z. T. vorhanden Fissuren von Knorpeloberfläche bis in die Radiärzone kompletter Knorpelverlust in kleinem Bereich der Hauptbelastungszone Gewebsverlust bis Transitional- und Radiärzone, in übrigen Bereichen möglich fibrillierte Radiärzone 	 weiter Rückgang der Anfärbbarkeit mit Alcianblau starke Färbung im Clusterbereich starke Minderung der Anfärbbarkeit Clusterbereiche wei- terhin gut anfärbbar
Grad IV	 vergleichbar mit Angaben unter Arthrosegrad 3 	 makroskopisch vollständi- ger Knorpelverlust in aus- gedehntem Areal der Ge- lenkfläche freiliegender subchondra- ler Knochen weiter in der Peripherie noch Knorpelgewebe mit Merkmalen von Grad 3 zu finden 	 starke Minderung der Anfärbbarkeit Clusterbereiche wei- terhin gut anfärbbar

<u>Tabelle 2:</u> Einteilung der Arthrosegrade anhand von Morphologie und Färbung in Anlehnung an Collins und McElligott (1960)

<u>1.3 Cartilage oligomeric matrix Protein (COMP)</u>

COMP ist ein Protein der extrazellulären Matrix. Neben dem Vorkommen in menschlichem Gelenkknorpel (Hedbom et al. 1992) kann es in den Menisken, Kreuzbändern (Ligg. Cruciatae) und in Sehnen nachgewiesen werden (Müller et al. 1998, DiCesare P et al. 1994). Darüber hinaus ist es in menschlichen Rippen und der Trachea nachweisbar (Neidhart et al. 1997). Ein Nachweis des "cartilage oilgomeric matrix protein" konnte auch in den Sehnen vom Rind, der Maus sowie Knorpel der Ratte und des Schweines geführt werden (Ekman et al. 1997).

COMP ist ein anionisches Glykoprotein, dessen spezifisches Gewicht ca. 550 kDa beträgt. Es hat die Form eines Pentamers, welches durch Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Eine weitere Bezeichnung für das Protein ist Thrombospondin 5, da es zur Genfamilie der Thrombospondine zählt, dessen Gensequenz beim Menschen auf Chromosom 19 zu finden ist. In der Zentralregion von COMP sind "epidermal-growth-factor" -ähnliche sowie Kalzium-Bindungsregionen nachweisbar (Oldenberg et al. 1992, Newton et al. 1994). Über die Funktion des Proteins ist noch nichts Genaueres bekannt, jedoch ist eine Chondrozytenbindung in vitro nachweisbar (Chen et al. 2005). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass COMP in der Lage ist, an Matrilin und Kollagen I, II sowie IX zu binden (Mann et al. 2004, Rosenberg et al. 1998, Thur et al. 2001). Eine Affinität zu anderen Mitgliedern der Thrombospondinfamilie besteht bei COMP nicht (DiCesare et al. 1996).

Mechanokompression der Chondrozyten sowie das DNA-Bindungsprotein SP1 sind in der Lage, die Expression von COMP auszulösen. Hingegen kann die Expression durch den "leukemia/lymphoma-related factor" unterbrochen werden (Deere et al. 2001, Giannoni et al. 2003, Liu et al. 2004).

Mutationen des COMP-Genes auf Chromosom 19 können Pseudoachondroplasie (PSACH) sowie die Multiple epiphysiale Dysplasie (MED) verursachen (Hecht et al. 1995, Briggs et al. 1995, Kennedy et al. 2005). Weiter ist eine erhöhte Expression des Proteins nach Traumata des Knies zu beobachten (Kuhne et al. 1998), was auch in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis und der Osteoarthritis der Fall ist (DiCesare et al. 1996, Mansson et al. 1995, Sharif et al. 2004).

Die Einbindung von COMP in die Knorpelentwicklung konnte anhand von Tiermodellen nachgewiesen werden. In diesen Modellen wurde gezeigt, dass während der Entwicklung einer Maus COMP im Bereich der reifen Chondrozyten anzufinden war, wobei es in einem Entwicklungsmodell der Ratte hauptsächlich mit der Wachstumsplatte assoziiert war (Murphy et al. 1999, Shen et al. 1995). Um den Tag 10 der Mausentwicklung ist das Glykoprotein im

kondensierenden Mesenchym nachweisbar gewesen. In der weiteren Entwicklung war es im Bereich der Wachstumsplatte und dem sich darüber entwickelnden Gelenkknorpel zu finden. Zum Zeitpunkt der Geburt befand sich COMP in Bereichen des Perichondriums, Periosts und hypertropher Zonen des Knorpels (Fang et al. 2000). Diese Ergebnisse verglichen mit den invitro-Ergebnissen lassen annehmen, dass COMP unabkömmlich für die Knorpelentwicklung ist (Kipnes et al. 2003). Jedoch hat ein "knockout-mouse" -Modell, bei dem das COMP-Gen entfernt worden war, keine besonderen Auffälligkeiten der Knochen- und Knorpelentwicklung gezeigt (Svensson et al. 2002).

1.4 Fragestellung

Veränderungen des gesunden Gelenkknorpels im Rahmen der Osteoarthrose sind anhand der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix deutlich zu erkennen. Hierbei sind Kollagene und Proteoglykane die Komponenten, die einer deutlichen Veränderung unterliegen. Dies macht sich bei der Verteilung, der Funktion sowie der Expression bemerkbar (Kuettner 1992, Poole 1999), wodurch der Progress der Arthrose beeinflusst wird. Für die Proteoglykane Decorin, Biglycan (Bock et al. 2001), Perlecan (Tesche und Miosge 2004) und einige Kollagentypen (Aigner und McKenna 2002, Miosge et al. 1998) sind Veränderungen bereits beschrieben worden. Neben den genannten Hauptkomponenten ist Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) ein Bestandteil der extrazellulären Matrix (Hedbom et al. 1992).

Mit humanen Knorpelproben von Patienten, die sich im Spätstadium der Osteoarthrose befinden, soll COMP untersucht werden. Hierbei werden Proben von Patienten verwandt, die sich einer totalendoprothetischen Versorgung des betroffenen Kniegelenkes unterzogen haben.

Die Untersuchung wird sich auf das Verteilungsmuster sowie die Syntheserate des Cartilage oligomeric matrix proteins beziehen, um festzustellen, welche Veränderungen sich in vivo im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse abspielen. Eine erste Beurteilung des gesammelten Patientenmaterials soll mit Hilfe einer lichtmikroskopischen Untersuchung erfolgen. Nach Einteilung der Proben soll eine licht- und elektronenmikroskopische Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung durchgeführt werden.

Das Ziel der Versuche soll es sein herauszufinden, welche Veränderungen in der Verteilung von COMP sich im osteoarthrotischen Knorpel, verglichen mit gesundem Knorpel, vorfinden.

2. Material und Methoden

2.1 Proben und Präparation

Die Knorpelproben, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von zwölf Patienten im Alter zwischen 55 und 75 Jahren. Bei allen Patienten lag eine Gonarthrose im Spätstadium vor. Zur Untersuchung wurden Proben aus dem makroskopisch intakt erscheinenden Bereich, welcher sich lateral der Gelenkfläche befand, entnommen. Des Weiteren wurde Gewebe aus der zentralen Läsion sowie aus dem Übergang, der sich zwischen makroskopisch intakt erscheinendem und defektem Knorpel befand, gewonnen.

Die schriftliche Einwilligung der Patienten erfolgte, nachdem sie entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission der Georg-August-Universität Göttingen aufgeklärt worden waren.

2.1.1 Lichtmikroskopische Präparate

Die Gewebeproben, welche für die lichtmikroskopischen Untersuchungen genutzt wurden, sind im ersten Schritt zu ca. 10mm x 8mm großen, quaderförmigen Stücken zurechtgeschnitten worden und wurden im Anschluss mit Hilfe einer Formaldehydlösung über einen Zeitraum von 48 Stunden fixiert. Darauf folgte die Entkalkung des Knochens mit EDTA über einen Zeitraum von vierzehn Tagen. Im vierten Arbeitsschritt sind die Knorpelproben unter laufendem Wasser vom EDTA befreit und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%) entwässert worden. Vor der Praffineinbettung erfolgte eine zweite Entwässerung mit Zuhilfenahme des Einbettungsautomaten Shandon Citadel™ 2000. Nachdem die Knorpelproben den Einbettungsautomaten durchlaufen hatten wurden sie in Ausgießformen eingebracht und mit flüssigem Paraplast (Rothi-plast, Roth, Karlsruhe) übergossen. Nach dem Aushärten des Paraffins über Nacht, konnten die entstandenen Paraffinblöcke aus den Formen herausgelöst werden. Nun konnten Schnitte mit einer Stärke von 4-5 µm angefertigt und auf Objektträger überführt werden.

Im Anschluss wurde ein Teil der Schnitte zur pathohistologischen Einteilung sowie topographischen Orientierung mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) und Alcianblau gefärbt.

2.1.2 Elektronenmikroskopische Präparate

Die zur elektronenmikroskopischen Untersuchung benötigten Gewebeproben wurden in 1 mm³ großen Würfeln aus dem gewonnenen Knorpel präpariert und fixiert. Die Fixierung des Knorpels erfolgte wie folgt:

- 15 min. Fixierung in Lösung aus Paraformaldehyd (8%), 0,3M Sörensen Phosphatpuffer & Glutaraldehyd (25%)
- 2. 10 min. Reinigung in 0,15M Sörensen Phosphatpuffer
- 3. 45 min. in 0,01M Ammoniumchloridlösung bei 4°C
- 4. 3 x 10 min. Reinigung in 0,15M Sörensen Phosphatpuffer
- 5. Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (30-70%) bei 4°C
- 6. 60 min. in hydrophilem Polymer LR-Gold bei -25°C in Dunkelheit infiltriert
- Inkubation über Nacht bei -20°C in LR-Gold mit 0,8%igem Benzil in dunkler Umgebung
- Gewebeprobe, LR-Gold mit Benzil (8%) in Beemkapsel (Plano GmbH, Wetzlar), Polymerisierung unter UV-Licht bei -25°C

Die LR-Gold Blöcke wurden in einem weiteren Arbeitsschritt mir einer scharfen Klinge unter einer Stereolupe pyramidenförmig getrimmt. Die Weiterverarbeitung der Gewebeproben zu 80 nm großen Ultradünnschnitten wurde im Anschluss mit einem Diamantmesser (Diatome, Heidelberg) an einem Mikrotom vom Typ Ultracut E (Reichert-Jung, Heidelberg) durchgeführt. Die dabei entstandenen Ultradünnschnitte sind anschließend auf Formvar[®] - Nickelgrids übertragen worden.

2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbetechnik

Um zu einem ersten Eindruck der Gewebsmorphologie zu kommen, wurde mit Hämatoxylin-Eosin (H.E.) eine Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte angefertigt. In einem H.E.-Färbeautomaten wurden im ersten Schritt die lichtmikroskopischen Schnitte mit Hilfe von Dimethylbenzen (Xylol) entparaffiniert. Darauf folgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua dest. Nach der erfolgten Rehydrierung wurden die Präparate 4 Minuten mit Hämalaun gefärbt und weitere 16 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die gewaschenen Präparate wurden im Anschluss über einen Zeitraum von 7 Minuten in Eosin gefärbt und danach in Aqua dest. gewaschen. Nach dem Färben folgte eine Rehydrierung der Präparate mit zu Hilfenahme einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 80%, 96% und absoluter Alkohol) und Xylol. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit dem Klebstoff Entellan (Merck, Darmstadt) und Deckgläsern eingedeckelt.

2.3 Alcianblau-Färbetechnik

Zur genaueren Einstufung der Arthrose wurde der Proteoglykangehalt der Knorpelproben mit Hilfe der Alcianblau-Färbung dargestellt.

Im ersten Schritt wurden die zu färbenden Schnitte mit Xylol über einen Zeitraum von zweimal 5 Minuten entparaffiniert. Darauf wurden die Schnitte mit Aqua dest. vom Übrigen an den Schnitten befindlichem Xylol befreit. Es folgte ein Bad in 3 % Essigsäure. Nach dem Bad wurden die Präparate für 30 Minuten mit 1 % Alcianblau in 3 % Essigsäure bei einem pH von 2,5 gefärbt. Dem Färbeschritt folgte ein weiters Bad in 3 % Essigsäure. Nach einem zweiten Waschen in Aqua dest. wurden die Proben in Kernechtrot gegengefärbt und durch ein drittes Bad in Aqua dest. von der restlichen Farbe gereinigt. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (60 % bis 100 %) wurden die Präparate dehydriert. Auf ein 6 Minuten langes Bad in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläsern eingedeckelt.

2.4 Herkunft der Antikörper

Bei dem anti-COMP Antikörper handelt es sich um einen polykonalen Rabbit-Anti-Bovine-IgG der affinitätschromatogaphisch gereinigt worden ist (Hedbom et al. 1992). Weiter wurden ein Sheep-Anti-Digoxigenin (DIG) Antikörper der Firma Quartett (Berlin) sowie ein Peroxidase markierter Anti-DIG Antikörper von Dakopats (Hamburg) verwandt.

2.5 Licht- und elektronenmikroskopische Immunohistochemie

2.5.1 Lichtmikroskopische Immunohistochemie nach der PAP-Methode

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate wurde mit der Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP-Methode) durchgeführt. Nach dem Entparaffinieren der Schnitte wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei Dunkelheit geblockt. Dazu wurde eine Lösung aus 700 ml Methanol und 700 μ l H₂O₂ (3%) in einer Küvette angesetzt, in die die Präparate für 45 Minuten eingebracht wurden. Anschließend wurde das Gewebe mittels Protex II über einen Zeitraum von 20 min. bei 65°C in einem Inkubationsschrank angedaut. Diesem Schritt folgte die Behandlung der Schnitte mit Protease XXIV von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) für 4 min in einer feuchten Kammer. Die Behandlung der lichtmikroskopischen Präparate mit Protex II und Protease XXIV dienten der Demaskierung der Antigene, die durch die vorausgegangene Formalinbehandlung maskiert gewesen sein könnten.

Im Anschluss folgte das Auftragen des Primär-Antikörpers gegen COMP in der Verdünnung von 1:100 in PBS/BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Als sekundärer Antikörper wurde ein Sheep-Anti-Digoxigenin (DIG) in einer Verdünnung von 1:50 für 30 min. bei RT auf die Schnitte pipettiert. Dieser Antikörper (AK) erfüllt die Funktion als Brückenantikörper. Aufgrund der geringen Verdünnung kann sich nur ein Fab-Fragment des AKs an den Primär-AK binden. Dies hat zur Folge, dass das freie Fab-Fragment als Bindungsstelle für den PAP-Komplex genutzt werden kann. Der PAP-Komplex besteht aus dem Enzym Peroxidase sowie AKs gegen Rabbit-Peroxidase und wurde in einer Verdünnung von 1:150 auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation für den dritten AK betrug 30 min. Alle drei Schritte der AK-Behandlung erfolgten in einer feuchten Kammer, die mit TBS getränktem Filterpapier ausgelegt war. Hierauf folgte die Anfärbung der Peroxidase mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) in einer Substratlösung. Eine mit dieser Lösung gefüllte Küvette wurde mit den vorbehandelten Objektträgern bestück und für 4 min. in Dunkelheit inkubiert. Im Rahmen dieser Behanlung kam es zu einer braunen Anfärbung der Peroxidase. Zwischen jedem Schritt erfolgte ein Waschen der Objektträger in TBS gefüllten Küvetten über einen Zeitraum von 10 min.

Nach einem letzten Waschen der Objektträger wurden diese 5 Sekunden in Hämalaun getaucht, um die Schnitte gegenzufärben. Nach dem Spülen der Präparate für 15 min. unter fließendem Leitungswasser, wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (60-100%) dehydriert. Im letzten Schritt erfolgte ein 6 minütiges Bad in Xylol, was zu einer besseren Transparenz der Schnitte führen sollte. Hierauf wurden die Schnitte mit Deckgläsern und Entellan eingedeckelt.

2.5.2 Elektronenmikroskopische Immunohistochemie

Die elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie wurde wie bei der PAP-Methode in einer feuchten Kammer durchgeführt. Hierzu wurde ein TBS getränktes Stück Filterpapier in eine Petrischale gelegt und ein Stück Parafilm auf das Papier gelegt. Zur Vorverdauung wurde Hyaluronidase in 20 µl Tropfen auf den Parafilm pipettiert und die mit Schnitten bestückten Nickelgrids auf diesen Tropfen platziert. Nach einem Zeitraum von 5 min. wurden die Grids mit TBS (pH 7,4) aus einer Spritzflasche über einem Becherglas von der restlichen Hyaluronidase befreit. An den Waschschritt schloss sich eine weitere Vorverdauung mit Hilfe von Protease XXIV für 3 min. Hierauf folgte ein weiterer Waschschritt. Im Anschluss wurden 20 µl Tropfen, mit einer Verdünnung von 1:200 in PBS, des Primärantikörpers gegen COMP auf den Parafilm aufgebracht. Hierauf inkubierten die Schnitte für 16 Stunden bei RT. Am nächsten Morgen folgte die Behandlung mit einem Anit-Rabbit IgG (Medac, Deutschland) als Sekundärantikörper, der zuvor mit Goldpartikeln gekoppelt worden war. Der sekundäre AK wurde in einer Verdünnung von 1:300 für 20 Minuten abermals bei RT inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären AK wurden die Nickelgrids mit Aqua dest. gewaschen und kontrastiert. Hierzu wurden die Grids jeweils 8 min. auf Uranylacetat und Bleicitrat aufgebracht. Nach 1 stündigem Trocknen in der Gridbox konnten die Schnitte im Anschluss mit dem Elektronenmikroskop (EM 906 Leo, Oberkochen) beurteilt werden.

2.5.3 Kontrollen

Um eine unspezifische Hintergrundreaktion bei der PAP-Methode ausschließen zu können, die der sekundäre AK verursacht haben könnte, wurde bei der Negativ-Kontrolle der Primär-AK gegen PBS ersetzt. Nach dem Ersetzen des Primär-AKs wurde die Methode wie oben beschrieben fortgesetzt. Bei der DAB-Färbung kam es zu keiner braunen Verfärbung des Gewebes, was als negativ bewertet wurde.

Die Vorgehensweise zum Erstellen einer Negativ-Kontrolle im Rahmen der Immunogoldhistochemie war wie bei der PAP-Methode. Der einzige Unterschied bestand darin, dass der Primär-AK durch PBS ersetzt und 16 Stunden inkubiert wurde. Auch hier fiel die Kontrolle negativ aus.

2.6 Sondenherstellung

Die Sondenherstellung erfolgte wie von Miosge et al. 2004 beschrieben: Nach der Extraktion von RNA aus Chondrozyten ist diese in COMP-spezifische cDNA transkribiert worden. Im Anschluss an die cDNA-Transkription ist eine PCR mit 35 Cyclen durchgeführt worden. Hierbei wurde mit Hilfe der Hotstartaq-Polymerase, die sich in einem PCR-Ansatz zusammen mit der cDNA und dem gewünschten spezifischen Promotorprimer (Sp6/T7) befand, ein PCR-Produkt prozessiert. Für die Herstellung des PCR-Produktes wurden ein SP6 COMP primer mit der foreward-Sequenz AGG GAG ATC GTG CAG ACA A <3' und ein T7 COMP primer mit der reverse Sequenz GAA GCT GGA GCT GTC CTG GTA G <3' der Firma Roth GmbH (Karlsruhe) verwendet. Nachdem das entstandene PCR-Produkt elektrophoretisch gereinigt worden ist, wurde eine in-vitro-Transkription druchgeführt. Hierzu wurde ein Dig-RNA-Labeling-Kit der Firma Boehringer (Mannheim) sowie SP6- bzw. T7-Polymerasen der

Firma Gibco (Heidelberg) verwandt. Nach einer Inkubation von 2,5 Stunden bei 37°C konnte die RNA in einem weiteren Schritt mit Phenol-Chloroform in Ethanol präzipitiert werden. Der Überstand wird in einem letzten Schritt abpipettiert und die RNA in Diethyl-pyrocarbonat-Aqua dest. (DECP-Aqua dest.) gelöst.

2.7 Licht- und elektronenmikroskopische In-situ-Hybridisierung

2.7.1 Lichtmikroskopische In-situ-Hybridisierung

Um eine In-situ-Hybridisierung mit den lichtmikroskopischen Präparaten durchführen zu können mussten diese im ersten Schritt entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Objektträger auf eine Wärmeplatte gelegt und das Paraffin angeschmolzen, wonach sie direkt in eine mit Xylol gefüllte Küvette überführt wurden. Nach einem Xylol-Bad über 2 x 15 min. wurden die Präparate nach Abtropfen für 5 min. in Propanol getaucht. Hierauf folgte eine absteigende Alkoholreihe (90%, 80%, 60%), wobei die Objektträger je 5 min. in den mit Alkohol gefüllten Küvetten standen. Auf die Alkoholreihe folgte ein Bad in PBS (autoklaviertes 1xPBS) über 2 x 5 min. Bevor nun die Hybridisierung vorgenommen werden konnte, wurde die DIGgekoppelte Antisense-Sonde (T7), von der 100ng in 100 μ l Hybridisierungslösung (HL) gelöst waren, in einem Verhältinis von 1:30 mit der HL weiter verdünnt. Nach der Verdünnung wurden auf jeden Schnitt 30 μ l der Sonde Pipettiert und bei 45°C für 18 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht wurde am nächsten Morgen die Sonde von den Objektträgern gewaschen. Hierzu kamen die Präparate für 5 min. bei 50°C in eine mit 2 x SSC (autoclaviert) gefüllte Küvette. Hierauf folgte ein weiterer Waschvorgang bei 60°C in 1 x SSC über weitere 5 min.

Nachdem die Präparate gewaschen waren, wurde die endogene Peroxidase mit Hilfe von 3%igem H₂O₂ in Dunkelheit für 10 min. bei RT geblockt. Nach dem Blocken folgten zwei weitere Waschvorgänge mit autoclaviertem PBS über je 5 Minuten.

Die Sichtbarmachung wurde mit zwei AKs durchgeführt. Hierzu wurde als Primär-AK der "Anti-DIG-HRP-AK P5104 Dako rabbit" (DAKO, Koppenhagen, Dänemark) mit der Reagenz Ak Diluent S3022 Dako in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Nachdem 30 µl des Reagenz auf jeden Schnitt pipettiert worden sind, wurden die Präparate für 60 min. bei Dunkelheit inkubiert. Nach Inkubation mit dem Primär-AK wurden die Präparate 2 x 5 min. in autoclaviertem PBS gewaschen. Hierauf folgte die Anwendung des sekundären AKs "Envision goat anit-rabbit HRP Dako K4002", der für weitere 30 min. auf die Präparate aufgetragen wurde. Auch der sekundäre AK wurde bei RT und Dunkelheit inkubiert. Auf die Behandlung der Schnitte mit dem Sekundär-AK folgte wiederum ein einmaliger Waschschritt. Um die AK-Reaktion sichtbar machen zu können wurde fertig angemischtes AEC-Chromogen (3amino-9-ethylcarbazol) der Firma Dako (Dänemark) für 35 min. bei 37°C auf die Schnitte pipettiert. Nach weiterem Spülen wurden die Präparate mit Hämalaun gegengefärbt und dem Klebstoff Aquamount eingedeckelt.

2.7.2 Elektronenmikroskopische In-situ-Hybridisierung

Auch für die elektronenmikroskopische In-situ-Hybridisierung wurde DIG-gekoppelte Antisense-Sonde (T7) für COMP verwendet. Pro Nickelgrid wurden 20 µl Hybridisierungslösung mit einer Sondenkonzentration von 100 ng verwandt. Die Grids sind für 19 Stunden bei 50 °C in einer feuchten Kammer inkubiert worden, wie sie bereits unter 2.5.2 beschrieben worden ist. Auf die Behandlung mit der Sonde folgte der gleiche oben genannte Spülprozess (siehe 2.7.1). Hierzu wurden 20 µl der oben genannten Lösungen auf Parafilm pipettiert und je ein Grid auf den Tropfen abgelegt. An den Waschvorgang schloss sich die Inkubation mit einem Gold-gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:60) für eine Stunde bei RT an. Nachdem die Grids mit den Antikörpern behandelt worden waren, wurde nach dem Waschen mit PBS die Kontrastierung mit Uranylacetat sowie Bleicitrat durchgeführt (wie in 2.5.2 beschrieben). Die Auswertung der In-situ-Hybridisierung erfolgte nach einstündigem Trocknen in der Gridbox mit Hilfe des Zeiss EM Leo 906E.

2.7.3 Kontrollen

Neben jeder Hybridisierung wurde eine Negativ-Kontrolle mit einer äquivalenten Menge an Sense-Sonde (SP6) durchgeführt. Darüber hinaus wurden keine anderen RNA-Sonden für die Kontrollen verwendet. Auf ultrastruktureller Ebene erfolgte sowohl eine Reaktion nur mit kolloidaler Goldlösung als auch mit dem gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper allein. Bei der lichtmikroskopischen sowie der elektronenmikroskopischen Auswertung der Kontrollen waren keine spezifischen Reaktionen zu erkennen.

3. Ergebnisse

3.1 Klassifizierung der Knorpelproben

Anhand von lichtmikroskopischen Schnitten eines Patienten aus dem Pool der gesammelten Knorpelproben sollen die H.E.- und Alcianblau-Färbung exemplarisch dargestellt werden. Zur Klassifizierung des Arthrosegrades wurden alle gewonnenen Proben H.E. gefärbt, um eine Übersicht des Gewebes zu erhalten. Des Weiteren wurden die verwendeten Knorpelproben mit Alcianblau gefärbt, um sich einen Überblick über die Verteilung der Proteoglykane im Knorpelgewebe verschaffen zu können.

3.1.1 Klassifizierung der H.E.-Proben

Die in Abbildung 3.1 (Abb. 3.1) gezeigte Probe ist ein H.E.-gefärbter Schnitt, der aus dem makroskopisch gesunden Bereich des Gelenkknorpels gewonnen worden ist. Verglichen mit gesundem hyalinem Knorpel ist eine Minderung der Gewebehöhe nicht feststellbar. Die Oberflächenstruktur erscheint homogen und eine Einteilung in Superfizial-, Transitional-, Radiärund kalzifiziernede Zone ist möglich. Zellausrichtung und –zahl des Untersuchten Gewebes ist mit gesundem Knorpel vergleichbar. Bei dem abgebildeten Schnitt sind keine Gefäßstrukturen in der Tidemark erkennbar.

Die Gewebeprobe in Abbildung 3.2 (Abb. 3.2) zeigt einen Knorpelschnitt, dessen Gewebe aus dem Übergangsbereich vom makroskopisch gesunden zum defekten Knorpel, gewonnen worden ist. Dieser Bereich wird in den folgenden Ausführungen als Randbereich bezeichnet.

In diesem Beispiel ist eine Minderung der Höhe verglichen mit Abb. 3.1 nicht deutlich zu erkennen. jedoch ist eine Minderung der H.E.-Färbung in den obern Anteilen deutlich, was auf eine Minderung der Interzellulären Matrix hinweist. Die Zellzahl ist verglichen mit dem Präparat aus dem makroskopisch gesunden Bereich verringert und die typische Anordnung der Chondrozyten ist nicht mehr zu erkennen. Des Weiteren sind Zellcluster, die auf eine pathologische Veränderung hinweisen, bis in die Radiärzone zu erkennen. Auch hier ist die Tidemark nicht von Gefäßen durchzogen.

Der in Abbildung 3.3 (Abb. 3.3) gezeigte Schnitt ist aus dem Gewebe des Defektbereiches gewonnen worden. Hier ist eine deutliche Höhenminderung des Gewebes, bei einer zerklüfteten Oberfläche, zu erkennen. Ebenfalls ist die Zellzahl verglichen mit Abb. 3.2 weiter stark zurückgegangen. Nur vereinzelte Chondrozyten sowie Cluster sind in dieser Aufnahme zu sehen. Fissuren ziehen im defekten Schnitt zum Teil bis in die Tidemark, welche nicht von Blutgefäßen penetriert ist.

Hämatoxylin-Eosin Färbung Übersicht



Abb. 3.1

Abb. 3.2

Abb. 3.3

3.1.2 Klassifizieren der Alcianblau-Färbung

Die Superfizialschicht des gesunden Knorpels (Abb. 3.4 Seite 19) lässt sich erst in ihren tiefen Anteilen mit Alcianblau anfärben. Diese flächendeckende Anfärbbarkeit erstreckt sich bis in die oberen Anteile der Radiärzone, welche in ihren tieferen Abschnitten jedoch nur eine perichondrale Farbreaktion mit Alcianblau aufweist. Diese Reduktion der Anfärbbarkeit erstreckt sich im Verlauf bis in die kalzifizierende Zone.

Im Randbereich (Abb. 3.5 Seite 19) ist die Superfizialschicht in weiten Bereichen leicht mit Alcianblau angefärbt. In der Transitional- und Radiärzone nimmt der Anteil an Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix deutlich zu. Die verstärkte perichondrozytäre Blaufärbung in der tiefen Transitional- sowie den oberen Anteilen der Radiärzone weist hier auf einen erhöhten Proteoglykananteil im Gewebe hin. Des Weiteren ist in der Radiärzone des Randbereiches, verglichen mit Abb. 3.4, eine deutliche Erhöhung der Proteoglykane festzustellen. Der Defektbereich (Abb. 3.6) weist einen Verlust der Superfizial- sowie anteilig der Transitionalzone auf. Die Alcianblau-Reaktion ist in der Transitionalzone nur zum Teil zu erkennen, was durch eine Schlierenbildung in Abb. 3.6 auffält. In der Umgebung der Cluster ist eine stärkere Blaufärbung zu erkennen, die zur Peripherie hin schwächer wird. In der Radiär- und kalzifizierenden Zone sind nur noch perichondral Proteoglykane nachweisbar. Die typische Anordnung der Chondrozyten ist im Defektbereich völlig aufgehoben und in keiner Zone mehr zu erkennen.

Alcianblau-Färbung Übersicht



Abb. 3.4

Abb. 3.5

Abb. 3.6

3.2 Auswertung der Immunohistochemie

Zur ersten Bewertung der COMP-Verteilung in den verwendeten Knorpelproben wurde eine lichtmikroskopische Immunohistochemie mit dem unter 2.4 (Seite 12) genannten AK gegen COMP durchgeführt. Hierbei konnte ein erster Eindruck des Verteilungsmusters gewonnen werden. Um einen Unterschied der Quantität des Proteins in den Proben erkennen und die Verteilung in der extrazellulären Matrix bestimmen zu können, wurde anschließend eine ultrastrukturelle Untersuchung eines Teiles des Patientenmaterials mit dem Verfahren der Immunogoldhisto-chemie durchgeführt.

Bei der Beurteilung wurden die Chondrozyten näher betrachtet und eine Unterteilung in perizellulär, territorial und interterritorial gemacht. Als perizellulär ist der Bereich direkt um die Zellwand zu betrachten. Der territoriale Bereich umgibt einen Chondrozyten bzw. ein Chondrom (Zellpaar von Chondrozyten) in der Ausdehnung des Chondrozytenhofes. Der Platz zwischen den territorialen Bereichen ist definitionsgemäß der interterritoriale Bereich.

3.2.1 Lichtmikroskopische Immunohistochemie

Aus dem gesunden Bereich des Gelenkknorpels stammt Abb. 3.7 (a) auf Seite 21. Wie man der Aufnahme entnehmen kann, ist im oberen Anteil der Spuerfizialzone eine deutliche Reaktion gegen das Protein COMP zu erkennen, welche sich in den darunter liegenden Zonen abschwächt. Betrachtet man die Chondrozyten der Superfizialzone, kann man sagen, dass perizellulär, territorial und interterritorial eine Reaktion zu finden ist. Dieses Verteilungsmuster setzt sich bis in die Radiärzone fort. Hier kommt es nun zu einer Veränderung in der COMP-Verteilung. Die Radiärzone und Tidemark weisen nur noch eine Reaktion perizellulär sowie territorial auf, was der Vergrößerungsausschnitt in Abb. 3.7 (a) darstellen soll. In der kalzifizierenden Zone ist kein COMP nachweisbar.

Bei der Beurteilung des Defektes [Abb. 3.7 (b) S.21] ist eine Veränderung der Verteilung, verglichen mit dem gesunden Knorpel, zu sehen. Die Superfizialzone und Teile der Transitionalzone sind nicht mehr vorhanden. Es ist auffällig, dass die Signalintensität interterritorial enorm zurückgegangen ist. Bei der Untersuchung der aus dem Defekt gewonnenen Präparate fiel eine stärkere Reaktion um die Zellcluster, siehe Vergrößerung in Abb. 3.7 (b), auf. Hier war die Farbreaktion perizellulär und territorial deutlich stärker ausgeprägt. Des Weiteren sind in der Radiärzone nur noch vereinzelt Reaktionen zu verzeichnen, die jedoch nur perizellulär vorhanden sind. Auch hier ist in der kalzifizierenden Zone kein COMP nachweisbar. Die mit dem Pfeil markierten Regionen dienten als Ort der Vergrößerung. Der schwarze Bal-

ken in Abb. 3.7 (a) und (b) dient der Veranschaulichung des Grössenverhältnisses und gibt 70

 μ m an. Der im Vergrößerungsausschnitt von Abb. 3.7 (a) und (b) verwandte Balken hat ein Verhältnis von 40 μ m. Die zur Darstellung der Reaktion verwendeten Abbildungen 3.7 (a) und 3.7 (b) sind exemplarisch zur Veranschaulichung der Immunohistochemie ausgewählt worden und spiegeln die Versuchsergebnisse wider.



Abb. 3.7

3.2.2 Elektronenmikroskopische Immunogoldhistochemie

Abbildung (Abb.) 3.8 (Seite 23) zeigt die Immunogoldhistochemie auf ultrastruktureller Ebene. In Abb. 3.8 (a) ist ein Ausschnitt zu erkennen, der den perizellulären und territorialen Bereich vergrößert darstellt. In diesen Bereichen ist COMP nachweisbar. Dies wird durch die Goldkugeln deutlich, die perizellulär (Pfeil) und territorial (Stern) zu sehen sind. Der interterritoriale Bereich, welcher in Abb. 3.8 (c) vergrößert dargestellt ist, weist ebenfalls vereinzelt Goldpartikel auf, was die Anwesenheit von COMP bestätigt.

Die Probe aus dem Randbereich in Abb. 3.8 (b) zeigt, verglichen mit dem gesunden Präparat, eine eindeutige Erhöhung der Anzahl an Goldpartikeln im mit Pfeilen markierten Perizellulärbereich. Der territoriale Bereich ist in diesem Bild nicht mit angeschnitten, weist jedoch eine ähnliche Quantität an Goldpartikeln auf. Abb. 3.8 (c) zeigt die oben links eingefügte Vergrößerung den Interterritorialbereich einer Knorpelprobe aus dem Übergang zum Defekt. Auch hier ist die Anzahl an Goldpartikeln gegenüber dem gesunden Präparat in Abb. 3.8 (c) deutlich erhöht. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Goldpartikel zum Teil an Fibrillen angelagert sind.

Die an den Rändern von Abb. 3.8 (a) und (b) eingefügten Balken stellen ein Größenverhältnis von 0,4µm dar. Der Balken in Abb. 3.8 (c) sowie der Vergrößerung hat ein Verhältnis von 0,2µm.



Abb. 3.8

3.3 Auswertung der In-Situ-Hybridisierung

Da man trotz der unter 3.2 dargestellten Erkenntnisse keine Aussage über die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten machen konnte, wurde nach der Immunohistochemie eine In-situ-Hybridisierung (IsH) eines Teiles der Proben durchgeführt.

3.3.1 Lichtmikroskopische In-situ-Hybridisierung

Die in Abb. 3.9 (a) (S. 25) gezeigte In-situ-Hybridisierung (IsH) stellt eine positive Reaktion dar. Im Vergleich zu dem positiven Befund zeigt die in Abb. 3.9 (a) unten rechts eingefügte Vergrößerung eine negative Kontrolle, welche mit der SP6-Sonde inkubiert wurde.

Bei der Aufnahme in Abb. 3.9 (a) handelt es sich um einen exemplarischen Schnitt aus dem Übergangsbereich zum Defekt (Rand), der eine positive Hybridisierung aufweist. Des Weiteren wurden Hybridisierungen mit lichmikroskopischen Präparaten aus dem makroskopisch gesunden und dem Defektbereich gemacht, welche ebenfalls eine positive Reaktion ergaben. In den Schnitten des defekten Knorpels ist auch in den Zellclustern eine deutliche Reaktion erkennbar, die exemplarisch in Abb. 3.9 (b) gezeigt wird.

Die mit Hilfe der T7-Sonde dargestellte COMP-mRNA war somit in allen Bereichen der gesammelten Proben nachweisbar. Wenn man die Verteilung der positiven Reaktionen in den einzelnen Zonen des Gelenkknorpels betrachtet, ist festzuhalten, dass vor allem COMPmRNA in der Superfizial-, Transitional- und Radiärzone nachweisbar war. Die kalzifizierende Zone war unauffällig. Ebenfalls waren in den Zellclustern verglichen mit einzelnen Chondorzyten oder Chondronen häufiger positive Reaktionen zu finden, was auf eine hohe Zellaktivität hinweist.

Der schwarze Balken in Abb. 3.9 (a) und (b) dient der Veranschaulichung des Größenverhältnisses und gibt 70 μ m an. Der im Inset von Abb. 3.9 (a) verwandte Balken hat ein Verhältnis von 40 μ m. Die zur Darstellung der Reaktion verwendeten Abbildungen 3.9 (a) und 3.9 (b) sind exemplarisch zur Veranschaulichung der Immunohistochemie ausgewählt worden und spiegeln die Versuchsergebnisse wider.





3.3.2 Elektronenmikroskopische In-situ-Hybridisierung

Da die Ergebnisse der lichtmikroskopischen IsH lediglich eine aktive Proteinbiosynthese von COMP beweisen und man keine Aussage über die Quantität treffen kann, wurde im Folgenden eine IsH auf ultrastruktureller Ebene durchgeführt. Hierbei wurden die nach Kouri et al. (1996) eingeteilten Typ-I- und Typ-II-Chondrozyten miteinander verglichen. Die Typ –I – Chondrozyten sind vor allem im makroskopisch gesund erscheinenden Knropel des arthrotischen Gewebes zu finden. Im Übergangsbereich zum Defekt ist hingegen der fibroblastenartige, elongierte Typ-II-Chondrozyt anzutreffen, was sich nicht für die Typ-I-Zelle bestätigen lässt (Bock et al. 2001, Tesche und Miosge 2005). Im gesund erscheinenden Knorpel kann nur eine geringe Zahl an Typ-II-Chondrozyten gefunden werden, was im Umkehrschluss auf die Typ-I-Zellen im Übergangsbereich zutrifft.

Um festzustellen, ob in der mRNA-Expression ein Unterschied erkennbar ist, erfolgte ein Vergleich zwischen beiden Zelltypen aus Proben des makroskopisch gesunden und des Übergangs zum Defekt.

Das in Abb. 3.9.1 (a) (Seite 27) gezeigte Bild stellt einen Typ-II-Chnodrozyten dar. Im Bereich des Pfeiles ist das raue endoplasmatische Retikulum (reR) zu sehen, in dessen unmittelbarer Nähe eine mit Goldpartikeln markierte T7-Sonde mRNA gebunden hat. Zur Veranschaulichung befindet sich im Bild oben links eine Vergrößerung des reR, in der mit Pfeilen die Reaktion hervorgehoben ist. Abb. 3.9.1 (b) zeigt einen Typ- I- Chondrozyten, der ebenfalls eine positive IsH im Bereich des reRs aufweist (Pfeil). Das reR der Typ-I-Zelle wurde in Abb. 3.9.1 (c) hervorgehoben und exemplarisch eine Reaktion markiert (Pfeil). Bei den in Abb. 3.9.1 abgebildeten Zellen handelt es sich um Zellen einer Probe aus dem makroskopisch gesunden Bereich des osteoarthrotischen Knorpels.



Abb. 3.9.1

Zum Vergleich mit den Proben aus dem makroskopisch gesunden Bereich werden in Abb. 3.9.2 (Seite 28) Zellen aus dem Übergangsbereich zum Defekt dargestellt. Hier ist bei beiden Zelltypen eine deutlich höhere Anzahl an Goldpartikeln zu verzeichnen. Die in Abb. 3.9.2 (a) gezeigte Aufnahme stellt einen Typ-II-Chondrozyten dar, der verglichen mit Abb. 3.9.1 (a) eine weit höhere Expression an COMP mRNA besitzt. Diese ist in der Vergrößerung des reR in Abb. 3.9.2 (a) noch deutlicher zu erkennen. Bei dem Typ-II-Chondrozyten [Abb. 3.9.2 (b)] fällt, wie bei der Zelle vom Typ II, eine massive Erhöhung der Proteinbiosynthese von COMP auf. Dies spiegelt sich in der Anzahl der Goldpartikel (Pfeil) in der Umgebung des reRs wider, welches in Abb. 3.9.2 (c) nochmals vergrößert aufgenommen wurde.

Die Größenrelation der in Abb. 3.9.1 (a) und (b) bzw. Abb. 3.9.2 (a) und (b) eingefügten Balken auf Seite 27/28 beträgt 0,3 μ m. Die schwarzen Balken in Abb. 3.9.1 (c) und 3.9.2 (c) sowie dem Ausschnitt in Abb. 3.9.1 (a) und 3.9.2 (a) haben eine Relation von 0,25 μ m. Der Zellkern ist in den Bildern von Abb. 3.9.1 und 3.9.2 mit einem **n** markiert.



Abb. 3.9.2

3.3.3 Statistische Auswertung der ultrastrukturellen In-situ-Hybridisierung

Die Ergebnisse der Untersuchung werden im Folgenden anhand von Boxplots dargestellt (Abb. 3.9.3 & 3.9.4 Seite 30/31). Hierbei wurden die Typ-I- bzw. Typ-II-Zellen aus dem makroskopisch gesunden Bereich mit denen des Randbereiches gegeneinander verglichen. Die Statistische Auswertung testet die Hypothese (H₀): Die Expression von COMP-RNA im Knorpel aus dem makroskopisch gesunden Bereich unterscheidet sich nicht von der im Randbereich. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p entspricht der Wahrscheinlichkeit die H₀-Hypothese fälschlicherweise zu verwerfen. Zur statistischen Auswertung wurde ein Test für nicht verbundene Stichproben bei unklarer Verteilung, nicht parametrischer Test, angewendet. Die statistische Evaluation unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab bei paarweisem Vergleich einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Goldpartikel von p<0,001.

Zur Vereinfachung wurde mit Ermittlung des arithmetischen Mittels der Goldpartikel ein Balkendiagramm erstellt, um die Signifikanz des Ergebnisses zu untermauern (Abb. 3.9.5 Seite 32).



<u>Abb. 3.9.3</u>: Gegenüberstellung der Anzahl an Goldpartikeln in einem Boxplot bei Präparaten aus Knorpel des makroskopisch gesunden Bereiches (linker Plot) und Randbereiches (rechterPlot) im Rahmen der In-situ-Hybridisierung von Typ-I-Chondrozyten;



<u>Abb. 3.9.4</u>: Gegenüberstellung der Anzahl an Goldpartikeln in einem Boxplot bei Präparaten aus Knorpel des makroskopisch gesunden Bereiches (linker Plot) und Randbereiches (rechter Plot) im Rahmen der In-situ-Hybridisierung von Typ-II-Chondrozyten



Abb. 3.9.5: Arithmetisches Mittel der in der ultrastrukturellen IsH bestimmten Goldpartikel

<u>4. Diskussion</u>

4.1 Methoden-Diskussion

Die Osteoarthrose ist ein sich über Jahre bis Jahrzehnte entwickelndes Krankheitsbild. Im frühen Stadium ist die langsam, degenerativ voranschreitende Erkrankung meist asymptomatisch. Daher manifestiert sich die Arthrose klinisch meist erst im späten Stadium. Hier sind die radiologischen sowie histologischen Krankheitsmerkmale deutlich zu erkennen, die sich jedoch in Bezug auf die Symptomatik von Patient zu Patient unterscheiden. Die individuellen Unterschiede erschweren die Diagnose einer Osteoarthrose deutlich.

Als nichtinvasive Untersuchungsmethode stehen lediglich das Röntgen und die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) zur Verfügung. In Bezug auf das Röntgen kann man sagen, dass hiermit die Aussagekraft in Bezug auf die Einteilung in einen bestimmten Arthrosegrad schwer möglich ist. Hier sind im Spätstadium lediglich eine Verschmälerung des Gelenkspaltes, Geröllzysten oder osteophytäre Ausziehungen deutlich zu erkennen. Über die Knorpelsubstanz an sich, kann jedoch keine Aussage getroffen werden. Eine genauere Untersuchung ist mittels MRT möglich. Hiermit ist eine genauere Darstellung des Kniegelenks möglich, bei der eine Beurteilung der Weichteile, wie des Gelenkknorpels, eher möglich ist. Des Weiteren kann man mit dieser Methode die Indikation zu einer totalen Knie-Endoprothese (TEP) engmaschiger stellen. Letzte Klarheit schafft die histopathologische Untersuchung.

Zur quantitativen Graduierung der Reparaturvorgänge bei Knorpeldefekten wurde von Pineda et al. 1992 ein Schema erstellt. Dieses Schema beruht auf einer tierexperimentellen Untersuchung, bei der durch künstlich gesetzte Läsionen in den hyalinen Gelenkknorpel von Kaninchen die Reparaturprozesse beobachtet wurden. Verglichen mit der menschlichen Osteoarthrose kann in einem derartigen Tierexperiment der störende Einfluss und die Abweichung in Bezug auf Anatomie und Physiologie besser ausgeschlossen werden. Da es sich auf der einen Seite bei der Arthrose des Menschen um ein multifaktorielles Krankheitsbild handelt, das durch Risikofaktoren wie z.B. Adipositas begünstigt wird und auf der anderen Seite einen langwierigen zum Teil schleichenden Verlauf hat, kann das Tiermodell von Pineda et al. nicht direkt mit dem des Menschen verglichen werden.

Eine weitere Klassifikation, die in Betracht gezogen werden könnte ist, die Arthroseklassifikation nach Mankin et al. (1971). Hierbei wird mit Hilfe von definierten Parametern (z.B. Proteoglykangehalt), die in den unterschiedlichen Arthrosestadien verschieden stark ausgeprägt sind, an Hand eines Punktesystems das Krankheitsstadium bestimmt. Trotz des Alters der von Mankin et al. entwickelten Klassifikation findet diese bis zum heutigen Tage Anwendung. Im Rahmen einer Studie von Ostergaard et al. (1999) wurde jedoch bewiesen, dass die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses gering ist, auch wenn die Untersucher eine gute Kenntnis besitzen. Auf Grund der fehlenden Objektivität des Untersuchers können unterschiedliche Knorpelproben bei verschiedenen histochemischen Eigenschaften dennoch demselben Arthrosegrad zugeordnet werden. Damit ist das von Mankin et al. entwickelte System deutlich von der Subjektivität des Untersuchenden abhängig.

In dieser Arbeit wurde, aufgrund der Schwierigkeiten der Einteilung in ein bestimmtes Arthrosestadium, die Bestimmung in Anlehnung an die Klassifikation von Collins und McElligott (1960) durchgeführt. Anhand dieser Kriterien konnte der in den Versuchen verwendete Gelenkknorpel den Graden III und IV zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwölf Patienten aus einem Pool von 50 Personen zufällig ausgewählt. Somit konnten die im Spätstadium der Arthrose auftretenden Knorpelveränderungen verlässlich untersucht werden. Ein Teil der verwandten Patienten war nach dem von Broca entwickelten BMI (body mass index) als übergewichtig zu werten. Auf den Progess der Osteoarthrose wirkt sich die Adipositas begünstigend aus.

Der gesammelte Knorpel wurde im Rahmen einer totalen Endoprothese des Knies gewonnen und direkt weiter verarbeitet. Hierbei wurden Proben aus dem makroskopisch gesund erscheinenden Bereich, aus der Hauptbelastungszone (Defekt) und dem Bereich zwischen den genannten Zonen (Übergangsbereich) entnommen. Zum Teil war der Knorpel in der Hauptbelastungszone bis auf den Knochen abgetragen. In diesem Fall wurde die Probe aus dem angrenzenden Bereich des Defektes gewonnen. Der Einteilung nach wurden die aus der Hauptbelastungszone gewonnenen Knorpelproben dem Arthrosegrad IV zugeordnet. Da die Gewebedegeneration im Bereich des Defektes am weitesten fortgeschritten war, konnte hier der Arthrosegrad am besten bestimmt werden.

Da die präzise Aussage über den Grad der Erkrankung nicht allein mit radiologischen und makroskopischen Untersuchungen getroffen werden kann, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene histologische Methoden angewandt, um einen genauen Einblick in die Pathophysiologie des Gewebes zu erhalten. Somit konnte die Subjektivität des Untersuchers, bezogen auf eine rein makroskopische Untersuchung, deutlich gemindert werden.

4.2 Diskussion der Immunogoldhistochemie

Bei der Gewebeuntersuchung auf ultrastruktureller Ebene lassen sich Zellen und die sie umgebende Matrix detaillierter darstellen. Daher stellt die Methode der Immunogoldhistochemie eine Verbesserung, verglichen mit den lichtmikroskpischen Möglichkeiten, des Einblickes in die Gewebestruktur dar. Durch diese Methode kann auf elektronenmikroskopischer Ebene ein spezifischer Nachweis von Proteinen und dessen Lokalisation im Gewebe betrieben werden.

Nach Kouri et al. (1996) lassen sich Chondrozyten des hyalinen Knorpels bezogen auf ihren Phänotyp ultrastrukturell genau klassifizieren. Diese Einteilung bezieht sich jedoch auf Knorpelgewebe im späten Stadium der Osteoarthrose. In der vorliegenden Arbeit wurden die Chondrozyten vom Typ I und II genauer betrachtet, wobei erwähnt werden muss, dass eine Einteilung in die Subtypen nicht möglich war. Auf Grund der Verwendung des Einbettungsmediums LR-Gold®, das Einfluss auf die Zellmorphologie hat, war eine Unterscheidung zwischen den beiden Subtypen Chondrozyt Typ IIa und Typ IIb nicht mehr möglich.

In der Arbeit von Kouri et al. wurde das Einbettungsmedium verwandt. Dieses Medium ist hydrophob und bewahrt im Gegensatz zu LR-Gold® die Ultrastruktur der Zellen, so dass die Zellorganellen gut erhalten sind und damit eine bessere Beurteilung möglich ist. Ein Nachteil von Spurr® ist, dass dieses Medium besser für ultrastrukturelle als für immunhistochemische Versuche genutzt werden kann. Hingegen verfügt das in dieser Arbeit verwendete Einbettungsmedium über eine lange Haltbarkeit der eingebetteten Gewebe und ermöglicht die Durchführung einer elektronenmikroskopischen Immunhistochemie. Ein Nachteil ergibt sich jedoch aus den geringfügigen Veränderungen der Ultrastruktur (Egger et al. 1994).

Um die Lokalisation von COMP im Gewebe herausfinden zu können, wurde der unter 2.4 beschriebene AK gegen COMP verwandt. Dieser AK wurde mit einem Sekundärantikörper, welcher an kolloidales Gold gekoppelt war, markiert. Bei der Betrachtung unter einem Elektronenmikroskop weist Gold die Eigenschaft auf, deutlich erkennbar zu sein (Le Guellec 1998). Somit war es möglich die Versuchsergebnisse, nach elektronenmikroskopischer Untersuchung der verschiedenen Zelltypen, miteinander zu vergleichen.

4.3 Diskussion der ultrastrukturellen In-situ-Hybridisierung (IsH)

Die unter 4.2 beschriebene Immunhistochemie ist um die IsH erweitert worden. Da die Methode der Immunhistochemie nur einen Überblick über die Proteinverteilung ermöglicht, kann man mit der Methode der in-situ-Hybridisierung die mRNA-Expression einer Zelle darstellen. Hiermit erhält man einen genauen Einblick in die Stoffwechselaktivität der Zelle Chondrozyten. Darüber hinaus ist es möglich, auf ultrastruktureller Ebene den genauen Ort der Proteinbiosynthese herauszufinden. Des Weiteren können Veränderungen des Status der mRNA-Expression Informationen über Entwicklungsstadien sowie den Progress einer Erkrankung geben (Kher und Bacallao 2006).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte ISH sollte einen noch genaueren Einblick in die Proteinbiosynthese von COMP ermöglichen. Wie bereits erwähnt, wurde Gelenkknorpel aus dem makroskopisch gesunden Knorpel und dem Übergangsbereich verwandt und miteinander verglichen. Auch hier wurden die Chondrozyten vom Typ I mit denen vom Typ II aus beiden "Gewebetypen" miteinander verglichen.

Es gibt unterschiedliche Formen der Hybridisierung, die sich schon direkt nach der Gewinnung des Gewebes voneinander unterscheiden. Von Morel et. al (1986) wurde die Hybridisierung kryotechnisch behandelter Proben beschrieben. Bei dieser Methode werden die Gefrierschnitte ohne vorherige Einbettung mit der entsprechenden Sonde behandelt. Theoretisch können auf diese Weise alle Nukleinsäuren hybridisiert werden. Da das Gewebe unbehandelt ist, können mit Hilfe der Kryotechnik geringe Mengen an mRNA nachgewiesen werden, das zu einer hohen Sensitivität führt. Der Hauptnachteil ist, dass ein Erhalten der Ultrastruktur des Gewebes nicht möglich ist (Le Guellec 1998).

Croissant et al. (1972) haben als Erste die Hybridisierung vor dem Einbetten (pre-embedding Methode) beschrieben. Hierbei werden Schnitte von 50 µm mit einer größeren Menge an Hybridisierungslösung (HL) inkubiert, um ein Ergebnis zu erzielen. Der Vorteil der preembedding Methode ist, dass die Ultrastruktur am Besten erhalten wird. Jedoch ist ein klarer Nachteil die verlängerte Inkubationszeit sowie eine schlechtere Bildgebung. Ebenfalls ist das Verwenden von kolloidalem Gold bei dieser Methode nicht möglich (Le Guellec 1998).

Die dritte Möglichkeit, auf die hier Bezug genommen wird, ist die Hybridisierung, nachdem das Einbetten erfolgt ist (post-embedding Methode). Hierzu wird der gewonnene Knorpel in ein hydrophiles Kunstharz wie LR-Gold® eingebettet. Bei der Hybridisierung der eingebetteten Präparate können Goldpartikel als Marker genutzt werden, die die beste Auflösung besit-

zen (Le Guellec 1998). Die Goldpartikel sind an Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt, welche mit der in 2.7.2 beschriebenen Sonde reagieren, wobei Digoxigenin gut zur Markierung von cDNA, RNA sowie Oligonucleotiden geeignet ist (McNicol und Farquharson 1997). Des Weiteren hat Steel et al. (1998) darüber berichtet, dass man mit der Methode der Digoxigenin-Markierung eine Sensitivität sowie eine Spezifität erreicht, die mit der radioaktiven Markierung vergleichbar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die post-embedding-Methode angewandt. Obwohl diese von den oben beschriebenen Methoden die geringste Sensitivität besitzt, haben andere Faktoren für die Anwendung gesprochen. Man kann für die Methode Schnitte verwenden, die in LR-Gold eingebettet sind (McFadden et al. 1988) und diese mit Gold gekoppelten AK inkubiernen. Der Vorteil der LR-Gold-Einbettung besteht darin, dass das fixierte Gewebe über einen längeren Zeitraum genutzt werden kann und Versuchsreihen über eine gewisse Zeit durchgeführt werden können. Verglichen mit der Kryotechnik und der pre-embedding-Methode, bei denen entweder das Gewebe nur einmal genutzt werden kann oder die Hybridisierung vor dem Einbetten erfolgt, treffen diese negativen Faktoren nicht auf die post-embedding-Methode zu. Durch eine hohe bildliche Auflösung unter dem Elektronenmikroskop, kombiniert mit der Verwendung von kolloidalem Gold, ist somit eine genaue Auswertung des hybridisierten Gewebes möglich gewesen. Bezogen auf die Fragestellung der Proteinexpression war genau dieser Aspekt wichtig für die Beurteilung der Genexpression. Wie unter 4.2 bereits beschrieben, kommt es bei der Verwendung von LR-Gold zu leichten Veränderungen der Ultrastruktur (Egger et al. 1994).

4.4 Cartilage-oligomeric-matrix-protein (COMP) im Spätstadium der Arthrose

In der vorliegenden Arbeit wurde der hyaline Gelenkknorpel aus dem Bereich der Femurkondyle gewonnen. Bei den Patienten, die für diese Arbeit in Frage kamen, lag eine Osteoarthrose im Spätstadium vor. Zuerst wurde der Grad der Arthrose mit Hilfe der unter 1.2.2 (Seite 5) dargestellten Tabelle, die in Anlehnung an Collins und McElligott (1960) erstellt worden ist, bestimmt. Um einen ersten Eindruck von der Verteilung von COMP im hyalinen Knorpel zu bekommen, wurde mit der PAP-Methode immunhistochemisch im makroskopisch gesunden Knorpel, dem Übergangs- sowie dem Defektbereich das Protein lokalisiert und beurteilt. In der LM-Immunhistochemie konnte COMP in der Superfizial-, Transitional- und Radiärzone des Gelenkknorpels nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren ist an dieser Stelle nur begrenzt möglich, da Nachweise des Proteins in arthrotischem Knorpel des Menschen in dieser Form bisher nicht durchgeführt worden sind.

Salminen et al. (2000) haben mit Hilfe eines transgenen Maus-Modells versucht herauszufinden, ob COMP als Marker für die Degeneration des Gelenkknorpels bei Osteoarthrose dienen kann. In diesem Rahmen haben sie bei 60 männlichen Mäusen, die heterozygot für den Lokus Del1 waren, ein mutiertes Gen eingefügt. Die transgenen Mäuse (Del1-Maus) trugen, verglichen mit der Kontrollgruppe, sechs Kopien eines Col2 α 1-Gens mit einer Deletionsmutation. Alle Mäuse wurden gemeinsam gehalten und in bestimmten Abständen getötet. Danach wurden die Veränderungen von COMP im Kniegelenksknorpel der Del1-Mäuse mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Die immunhistochemische Untersuchung auf COMP ergab, dass die Del1-Mäuse nach 4-9 Monaten einen deutlichen Anstieg von COMP in der Transitionalzone hatten. Des Weiteren war bei den Tieren lichtmikroskopisch ein Anstieg des Proteins in der Tidemark zu erkennen. Die Kontrollgruppe wies eine schwächere Reaktion mit gleichmäßigem Verteilungsmuster in den Knorpelzonen auf.

Gewebeschnitte von 15 Monate alten Tieren ergaben bei den Dell-Mäusen einen teilweisen Verlust der oberen Knorpelzonen. COMP war bei diesen Mäusen häufig perizellulär anzufinden. Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen einen Verlust des Gelenkknorpels im Bereich der Hauptbelastungszone auf und hatten das Verteilungsmuster wie die Dell-Mäuse nach 4-9 Monaten.

Vergleicht man die immunhistochemischen Ergebnisse bezüglich des von Salminen et al. durchgeführten Modells mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, können zum Teil Parallelen zum Spätstadium der Osteoarthrose des Menschen gezogen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen bei den Proben aus dem makroskopisch gesunden Bereich ein gleichmäßiges Verteilungsmuster von COMP bis zur Radiärzone, in der das Protein nur noch perizellulär zu finden ist. In der Tidemark ist COMP ebenfalls nur perizellulär zu finden. Bei der Knotrollgruppe (4-9 Monate) der Versuche von Salminen et al. (2000), ist eine gleichmäßige Verteilung von COMP in allen Zonen des gesamten Knorpels zu sehen. Die Dell-Mäuse aus den Versuchen von Salminen et al. lassen jedoch parallelen zu den osteoarthrotischen Knorpelproben des Menschen zu. Bei den 4-9 Monate alten transgenen Tieren ist eine stärkere Anfärbung von COMP des Knorpels der Transitionalzone zu beobachten. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Proben ist dieses Phänomen jedoch auf die Superfizialschicht begrenzt. Betrachtet man den Knorpel der 15 Monate alten Dell-Mäuse, kann dieser zum Vergleich mit dem defekten osteoarthrotischen Knorpel des Menschen herangezogen werden. In den verbliebenen Zonen des defekten Knorpels ist bei den Mäusen sowie dem Humangewebe eine perizelluläre Verteilung von COMP zu sehen. Jedoch weist der osteoarthrotische Knorpel des Menschen, im Gegensatz zu den Proben von Salminen et al., auch territorial COMP auf.

Wenn man von der Theorie ausgeht, dass COMP eine Funktion bei der Knorpelsynthese sowie der Regeneration erfüllt, so könnte man sich diese Ergebnisse erklären. Eine verstärkte Anfärbbarkeit von COMP in der Superfizialzone beim arthrotischen Knorpel des Menschen kann als Regenerationsversuch gedeutet werden, wobei die Häufung in der Transitionalzone der Del1-Mäuse auf eine erhöhte Synthese im Rahmen der Chondrogenese ausleget werden kann. Weiter ist das Erscheinungsbild der humanen Knorpelproben aus dem Bereich des Defektes mit den Proben der 15 Monate alten Del1-Mäuse vergleichbar, was die Funktion von COMP als ein an der Chondrogenese beteiligtes Protein bestärkt.

Die Ergebnisse der Immunogoldhistochemie des menschlichen Knorpels hingegen lassen Parallelen zu den Ergebnissen von Ekman et al. (1997) zu. Hier wurde berichtet, dass im unreifen Knorpel des Schweines COMP in der EZM territorial stark nachweisbar sei. Dies weist im Rahmen des Wachstums auf eine erhöhte Syntheserate hin. Wenn man annimmt, dass die Chondrozyten beim osteoarthrotischen Knorpel des Menschen versuchen, den Knorpel neu zu synthetisieren, um den Verlust zu kompensieren, so ist dies eine ähnliche Bedingung. In der vorliegenden Arbeit konnte im gesunden Gewebe und dem Knorpel des Übergangsbereiches zum Defekt COMP perizellulär, territorial sowie interterritorial nachgewiesen werden. Die Anlagerung an Fibrillen der EZM läßt die Überlegung zu, dass COMP mit am Aufbau und der Stabilisierung der Knorpelmatrix beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass COMP Verbindungen mit Kollagen I, II und IX eingeht (Rosenberg et al. 1998, Thur et al. 2001). Auch bei Mutationen von COMP, die maßgeblich an der Entstehung von Pseudoachondroplasie (PSACH) und multipler epiphysialer Dysplasie (MED) beteiligt sind (Briggs et al. 1995), ist eine Bindung mit den Kollagenen I, II und IX möglich (Thur et al. 2001).

Des Weiteren ist von Mann et al. (2004) eine Interaktion des untersuchten Proteins mit den Matrilinen 1-4 nachgewiesen worden. Matriline (extrazelluläre Proteine) sind maßgeblich an der Vermittlung von Interaktionen der EZM-Bestandteile, wie Kollagen und Proteoglykanen, beteiligt (Hauser et al. 1996, Mann et al. 2004). In ihrer Arbeit berichten die Autoren über die Bindungsfähigkeit von COMP mit Matrilin-1, die durch Calzium begünstigt wird. Diese Fähigkeit führt wiederum zur Interaktion mit Kollagen II, da Matrilin-1 sich auf der Oberfläche von Kollagen II haltigen Fibrillen nachweisen lässt (Winterbottom et al. 1992). Diese Tatsache bestärkt die These, dass COMP eine strukturelle Funktion in der EZM des hyalinen Gelenkknorpels einnimmt.

Darüber hinaus war im Rahmen dieser Arbeit ein Nachweis des Proteins an den Chondrozyten (perizellulär) möglich, was auf eine Beteiligung an den Stoffwechselprozessen der Zellen hindeuten könnte, die für das Protein Decorin bereits nachgewiesen wurde (Tesche und Miosge 2005). Vitamin D3 (Cholecalciferol) und all-trans Retinol sind an der Morphogenese und den Reparaturprozessen von Knochen und Knorpel beteiligt. Hierbei fördert Calcitriol, die aktive Form des Vitamin D3, die Mineralisation von Knochen und Knorpel. Die Retinoide (Vitamin A) hingegen stellen einen wichtigen Faktor für die Entwicklung von Organen und Geweben dar. COMP bindet die genannten Hormone, die maßgeblich an der Entwicklung und Differenzierung von Geweben beteiligt sind, womit die Hormonbindung ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des Proteins an Stoffwechselprozessen sein könnte (Guo et al. 1998). Diese Theorie könnte die Anwesenheit von COMP in der direkten Umgebung der Chondrozyten erklären. Einen Beweis für die Interaktion mit Integrinen der Chondrozyten wurde von Chen et al. (2005) geliefert. In ihrem Versuchsablauf konnten sie die Bindung von COMP an chondrozytenspezifische Integrine beweisen, die durch Calcium (Ca2+) positiv beeinflusst (Chen et al 2005) wird. Die Bindung von Ca²⁺ führt zu einer Konformationsänderung von COMP (Chen et al. 2005), deren Funktion vermutlich im Zusammenhang mit der Zellinteraktion steht. Da Integrine wichtig für die Morphogenese und Differenzierung von Knorpel sind, kann somit gesagt werden, dass COMP möglicherweise eine Rolle bei der Chondrogenese spielt.

Das Fortschreiten der Osteoarthrose geht mit einer Erhöhung von COMP im Serum einher (Sharif et al. 2004). Die Ergebnisse der Arbeit von Sharif et al. deuten darauf hin, dass, je höher die Serumspiegel von COMP sind desto höher ist das Risiko der Progression der Osteoarthrose. Auch Neidhart et al. (1997) berichten in diesem Zusammenhang von dreimal höheren Serumspiegeln als bei der gesunden Kontrollgruppe. Im Rahmen der Osteoarthrose kommt es, speziell im Spätstadium, zu einer Veränderung der Zell-Matrix Verbindungen (Poole 1999, Tesche und Miosge 2005). Die Progression der Erkrankung beginnt mit einer kontinuierlichen Beschädigung des Netzwerkes der EZM (Martel-Pelletier 1999) und resultiert in einem Verlust der Festigkeit des Gewebes (Buckwalter und Mankin1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten im Rahmen einer licht- und elektronenmikroskopischen ISH untersucht. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung konnte eine RNA-Expression im Bereich von der Superfizial- bis zur Radiärzone festgestellt werden. Um einen Überblick über die Stoffwechselaktivität der in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen in den unterschiedlichen Geweben zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine ISH auf ultrastruktureller Ebene durchgeführt. Bei dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass die fibroblastenartigen Chondrozyten vom Typ II im Randbereich, verglichen mit den Zellen aus dem gesunden Knorpel, eine fünffach erhöhte Stoffwechselaktivität hatten. Da die Übergangsregion zum Defekt die Hauptregion der Regenerationsprozess darstellt (Sandell und Aigner 2001, Aigner und McKenna 2002), zeigt sich auch an den Ergebnissen dieser Arbeit. Betrachtet man die Typ-II-Zellen, so sind sie die einzigen Zellen, die im Spätstadium der Arthrose neu entstehen und damit einen Hinweis auf die Regenerationsprozesse des Knorpels geben (Aigner und McKenna 2002, Tesche und Miosge 2004, Tesche und Miosge 2005).

In Bezug auf die mRNA-Expression von COMP haben Hummel et al. (1998) eine ISH von Synovium durchgeführt. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass Zellen, die COMPmRNA exprimierten, grundsätzlich in direkter Nähe von Fibroblasten anzutreffen waren, die eine Erhöhung an Kollagen I mRNA besaßen. Die Verteilung der Kollagene wurde im Spätstadium der Osteoarthrose bereits von anderen Autoren beschrieben. Hierbei ist eine Abnahme von Kollagen II im hyalinen Gelenkknorpel zu beobachten (Poole 1999), welches auf Grund von Regenerationsversuchen im Spätstadium der Osteoarhtrose durch Kollagen I erstetzt wird. Dies ist durch eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression für Kollagen I im arthrotischen Gelenkknorpel nachweisbar. Diese Expression ist um ein 100faches erhöht, welche unter Zuhilfenahme der quantitativen real-time PCR von Miosge et al. (2004) nachgewiesen werden konnte. Die Synthese von Kollagen II gerät im Spätstatium der Arthrose in den Hintergrund, da nur noch die verbliebenen gesunden Chondrozyten Kollagen-II-mRNA exprimieren (Miosge et al. 1998). Im Bereich des C-terminalen Endes kann COMP mit den Kollagenen I und II eine Verbindung eingehen, die in Anwesenheit von Zink (Zn^{2+}) begünstigt wird (Rosenberg et al. 1998).

Ein weiterer Aspekt, der die Expression von COMP positiv beeinflusst, ist die Druckerhöhung auf den Knorpel. Zwei Tage nach der Druckerhöhung auf den Knorpel ist eine deutliche Erhöhung von COMP-mRNA nachweisbar (Giannoni et al. 2003). Da im Randbereich des untersuchten Knorpels die höchste Druckbelastung wirkt und hier ebenfalls die höchste Expression an COMP-mRNA nachweisbar ist, deckt sich das Ergebnis mit den Aussagen von Giannoni et al. Diese Tatsache kann zusammen mit den bisher gesammelten Erkenntnissen ein Hinweis darauf sein, dass die Chondrozyten COMP sezernieren, um ein Zerfallen der EZM zu verhindern. Eine erhöhte Syntheserate ist des Weiteren für die Proteine Decorin und Biglycan (Bock et al. 2001) sowie Perlecan (Tesche und Miosge 2005) bewiesen worden. Kollagen II, Hauptkollagen des hyalinen Knropels, wird in der Übergangsregion hingegen weniger exprimiert (Miosge et al. 1998).

Einer der bekannten Faktoren, die die COMP-Expression regulieren, wurde im Rahmen von Versuchen an Mäusen identifiziert. Hierbei handelt es sich um den Leukemia/Lymphomarelated Factor (LRF). Dieser inhibiert die COMP-Transkription und bewirkt parallel eine Erhöhung der Expression von Kollagen-II-mRNA, die durch Herabregulierung des bone morphogenic protein-2 bewirkt wird (Liu et al. 2004). Der Promoter des COMP-Genes des Menschen besitzt eine übereinstimmende Region, in der LRF beziehungsweise das "factor binding inducer of short transcripts protein-1" (FBI-1) binden kann (Liu et al. 2004). Wenn FBI-1 (Morrison et al. 1999) beim Menschen das Gegenstück zu dem LRF der Maus darstellt, würde FBI-1 eine Herabregulierung des humanen COMP bewirken. Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen jedoch eine eindeutig erhöhte Expression der Chondrozyten von COMP sowie eine geringere Synthese von Kollagen II (Miosge et al. 1998). Diese Erkenntnis unterscheidet sich von dem Maus-Modell, in dem gezeigt wurde, dass LRF/FBI-1 die Synthese von COMP und Kollagen II herabsetzt. Wenn man davon ausgeht, dass es bei der Osteoarthrose des Menschen initial zu einer Herabsetzung der Synthese von COMP und Kollagen II durch LRF/FBI-1 kommt, so würde der Zusammenbruch der EZM die Folge sein. Da durch den Verlust der Knorpelmatrix die Druckbelastung im Randbereich des arthrotischen Knropelgewebes jedoch erhöht wird, ist im Gegenzug das Resultat eine Erhöhung der COMP-Synthese. Somit würde die Druckbelastung dem Effekt von LRF/FBI-1 entgegenwirken und zu einem Anstieg von COMP im Spätstadium der Arthrose führen, wie es durch die Ergebinsse der vorliegenden Arbeit für den menschlichen osteoarthrotischen Knorpel *in vivo* gezeigt wurde.

5. Zusammenfassung

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP), ein Protein der extrazellulären Matrix, ist häufig mit Knorpelgewebe assoziiert. *In vitro* konnte für dieses Protein gezeigt werden, dass es auf Grund seiner Bindungsmöglichkeiten eine Rolle in der Regulation der Chondrogenese spielt, wobei über die Funktion von COMP *in vivo* nicht viel bekannt ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass COMP von Chondrozyten des adulten Gelenkknorpels produziert wird. Hierzu wurden Proben gesammelt, die von Patienten stammten, bei denen ein Spätstadium der Osteoarthrose vorlag und die sich einer total endoprothetischen Knieoperation unterzogen hatten. Nach der Präparation der gesammelten Knorpelproben, konnten diese für licht- und elektronenmikroskopische Versuche genutzt werden.

Mit Hilfe der Methoden der Immunohistochemie und In-situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass im Spätstadium der Osteoarthrose COMP von den Typ-1- sowie Typ-2-Chondrozyten produziert wird. Beim Vergleich von Proben aus dem makroskopisch gesunden Knorpelbereich mit denen aus dem Übergangsbereich zum Defekt konnte ein deutlicher Unterschied in der Quantität von COMP festgestellt werden. Das cartilage oligomeric matrix protein verfügt über vielfältige Bindungsmöglichkeiten und ist im Übergangsbereich zum Defekt deutlich mehr aufzufinden als im makroskopisch gesunden Knorpel der gesammelten Proben. Dies lässt die Vermutung zu, dass COMP in die Regenerationsversuche des osteoarthrotischen Knorpels eingebunden ist und die Chondrozyten mit einer gesteigerten Synthese versuchen, einen Untergang der Knorpelmatrix zu verhindern.

6. Literaturverzeichnis

Aigner T, McKenna L (2002):

Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci*; **59**:5-18.

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. (1986):

Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum;* **29**:1039-1049

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 late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*; <u>9</u>:654-663

Bretschneider HJ (1980):

Myocaridal protection. *Thorac Cardiovasc Surg;* <u>28</u>:295-302.

Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimoin DL, Lachman RS, Gaines ES, et al. (1995):

Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene.

Nat Genet; <u>10</u>:330-336.

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998):

Articular cartilage: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration and transplantation. *Instr Course Lect*; <u>47</u>:487-504

Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J (2005):

Cartilage Oligomeric Matrix Protein/Thrombospondin 5 Supports Chondrocyte Attachment through Interaction with Integrins. *J Biol Chem*; **80**:32655-32661.

Collins DH, McElligott TF (1960):

Sulphate (35SO4) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann Rheum Dis;* **19**:318-330.

Croissant O, Dauguet C, Jeanteur P, Orth G (1972):

Application of the molecular hybridization technic in situ for the demonstration with the electron microscope, of vegetative replication of viral DNA in the papillomas induced with Shope virus in cottontail rabbits.

CR Acad Sci Paris; <u>274(4):</u>614-617

Deere M, Rhoades Hall C, Gunning KB, LeFebvre V, Ridall AL, Hecht JT (2001):

Analysis of the promoter region of human cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Matrix Biol*; <u>19</u>:783-792.

DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M (1994):

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett*; <u>354</u>:237-240.

DiCesare PE, Carlson CS, Stolerman ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M (1996):

Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage.

J Orthop Res; <u>14</u>:946-955.

DiCesare PE, Fang C, Leslie MP, Tulli H, Perris R, Carlson CS (2000):

Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts.

J Orthop Res; <u>18</u>:713-720.

DiCesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R, Fang C (2002):

Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol;* **<u>21</u>**:461-470.

Egger D, Troxler M, Bienz K (1994):

Light and electron microscopic in situ hybridization: non-radioactive labeling and detection, double hybridization, and combined hybridization-immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*; 42(6):815-22.

Ekman S, Reinholt FP, Hultenby K, Heinegard D (1997):

Ultrastructural immunolocalization of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in porcine growth cartilage.

Calcif Tissue Int; <u>60</u>:547-553.

Fang C, Carlson CS, Leslie MP, Tulli H, Stolerman E, Perris R, Ni L, Di Cesare PE (2000):

Molecular cloning, sequencing, and tissue and developmental expression of mouse cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *J Orthop Res;* **18**:593-603.

Gardner DL (1994):

Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat*; **181**:465-476

Giannoni P, Siegrist M, Hunziker EB, Wong M (2003):

The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Biorheology*; <u>40</u>:101-109.

Guo Y, Bozic D, Malashkevich VN, Kammerer RA, Schulthess T, Engel J (1998):

All-trans retinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind in the axial pore of the five-stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein. *EMBO J*; <u>17(18)</u>:5265-72.

Hauser N, Paulsson M, Heinegard D, Morgelin M (1996):

Interaction of cartilage matrix protein with aggrecan. Increased covalent cross-linking with tissue maturation.

J Biol Chem; 271(50):32247-52.

Hecht JT, Nelson LD, Crowder E, Wang Y, Elder FF, Harrison WR, Francomano CA, Prange CK, Lennon GG, Deere M, et al. (1995):

Mutations in exon 17B of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) cause pseudoachondroplasia.

Nat Genet; <u>10</u>:325-329.

Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D (1992):

Cartilage matrix proteins: an acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem*; <u>267</u>:6132-6136.

Hesse I, Mohr W, Hesse W (1990):

Morphologische Veränderungen in frühen Stadien der Arthrose. *Orthopäde;* <u>19</u>:16-27.

Hummel KM, Neidhart M, Vilim V, Hauser N, Aicher WK, Gay RE, Gay S, Hauselmann HJ (1998):

Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fibroblasts and synovial fluids.

Br J Rheumatol; <u>37(7)</u>:721-8.

Kennedy J, Jackson G, Ramsden S, Taylor J, Newman W, Wright MJ, Donnai D, Elles R, Briggs MD (2005):

COMP mutation screening as an aid for the clinical diagnosis and counselling of patients with a suspected diagnosis of pseudoachondroplasia or multiple epiphyseal dysplasia. *Eur J Hum Genet*; <u>13</u>:547-555.

Kher R, Bacallao RL (2006):

Imaging gene expression. Nephron Exp Nephrol; 103(2):e75-80. Epub 2006 Mar 10. Review

Kipnes J, Carlberg AL, Loredo GA, Lawler J, Tuan RS, Hall DJ (2003):

Effect of cartilage oligomeric matrix protein on mesenchymal chondrogenesis in vitro. Osteoarthritis Cartilage; <u>11</u>:442-454. Erratum in: Osteoarthritis Cartilage 2003, <u>11</u>:831-835.

Kouri JB Jiménez SA, Quintero M, Chico A (1996):

Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage.

Osteoarthritis Cartilage; <u>4</u>:111-125

Kuettner KE (1992):

Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem;* <u>25</u>:155-163

Kuhne SA, Neidhart M, Everson MP, Hantzschel H, Fine PR, Gay S, Hauselmann HJ, Gay RE (1998):

Persistent high serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in a subgroup of patients with traumatic knee injury.

Rheumatol Int; <u>18</u>:21-25.

Le Guellec D (1998):

Ultrastructural in situ hybridization: a review of technical aspects. *Biol Cell;* **90(4)**:297-306.

Liu CJ, Prazak L, Fajardo M, Yu S, Tyagi N, DiCesare PE (2004):

Leukemia/lymphoma-related factor, a POZ domain-containing transcriptional repressor, interacts with histone deacetylase-1 and inhibits cartilage oligomeric matrix protein gene expression and chondrogenesis.

J Biol Chem; 279:47081-47091.

Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zaris A (1971):

Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg*; <u>53-A(3)</u>: 523-536

Mann HH, Ozbek S, Engel J, Paulsson M, Wagener R (2004):

Interactions between the cartilage oligomeric matrix protein and matrilins. Implications for matrix assembly and the pathogenesis of chondrodysplasias. *J Biol Chem*; <u>279</u>:25294-25298.

Mansson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, Heinegard D, Saxne T (1995):

Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest;* <u>95</u>:1071-1077.

Martel-Pelletier J (1999):

Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage;* <u>6</u>:371-373.

McFadden GI, Bonig I, Cornish EC, Clarke AE (1988):

A simple fixation and embedding method for use in hybridization histochemistry on plant tissues.

Histochem J; 20(10):575-86.

McNicol AM, Farquharson MA (1997):

In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J Pathol*; **182(3)**:250-61.

Miosge N, Waletzko K, Bode C, Quondamatteo F, Schultz W, Herken R (1998):

Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*; **6**:278-285.

Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R (2004):

Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol;* <u>122(3)</u>:229-36.

Morel G, Dubois P, Gossard F (1986):

Ultrastructural detection of messenger RNA coding for growth hormone in the rat anterior pituitary by in situ hybridization. *CR Acad Sci Paris;* **302(13)**:479-84.

Morris NP, Keene DR, Horton WA:

Morphology and chemical composition of connective tissue: Cartilage; in: Connective Tissue and its heritable disorders. *Band-I Herausgegeben von Royce PM; Wiley, New York* 2002, 41-65

Morrison DJ, Pendergrast PS, Stavropoulos P, Colmenares SU, Kobayashi R, Hernandez N (1999):

FBI-1, a factor that binds to the HIV-1 inducer of short transcripts (IST), is a POZ domain protein.

Nucleic Acids Res; 27:1251-1262.

Müller G, Michel A, Altenburg E (1998):

COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is synthesized in ligament, tendon, meniscus, and articular cartilage. *Connect Tissue Res*; **39**:233-244.

Muir H (1995):

The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bio Essays; 17(12):1039-1048.

Murphy JM, Heinegard R, McIntosh A, Sterchi D, Barry FP (1999):

Distribution of cartilage molecules in the developing mouse joint. *Matrix Biol;* **18**:487-497.

Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ (1997): Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol*; <u>36</u>:1151-1160.

Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lawler J (1994):

Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*; <u>24</u>:435-439.

Oldenberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D (1992):

COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem*; <u>267</u>:22346-22350.

Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K, Salter DM (1999):

Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis;* <u>58(4)</u>:208-13.

Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A (1992):

A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat, Basel;* **<u>143(4)</u>**:335-40.

Poole AR (1999):

An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*; <u>4</u>:D662-670.

Poole AR, Matsuoka A, Schofield JR (1991):

Chondrons from articular cartilage: III. Morphological changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated form osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*; <u>34(1)</u>:22-35

Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D (1998):

Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem*; <u>273</u>:20397-20403.

Salminen H, Perala M, Lorenzo P, Saxne T, Heinegard D, Saamanen AM, Vuorio E. (2000):

Up-regulation of cartilage oligomeric matrix protein at the onset of articular cartilage degeneration in a transgenic mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum;* **43(8)**:1742-8.

Sandell LJ, Aigner T (2001):

Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. Arthritis Res; $\underline{3}$:107-113.

Sharif M, Kirwan JR, Elson CJ, Granell R, Clarke S (2004):

Suggestion of nonlinear or phasic progression of knee osteoarthritis based on measurements of serum cartilage oligomeric matrix protein levels over five years. *Arthritis Rheum;* **50**:2479-2488.

Shen Z, Heinegard D, Sommarin Y (1995):

Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral head development. *Matrix Biol*; **14**:773-781.

Steel JH, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers LA, Poulsom R (1998):

Comparison of isotopic and non-isotopic labelling for in situ hybridisation of various mRNA targets with cRNA probes. *Eur J Histochem*; <u>42(2)</u>:143-50.

Svensson L, Aszodi A, Heinegard D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fassler R, Oldberg A (2002):

Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development. *Mol Cell Biol*; <u>22</u>:4366-4371.

Tesche F, Miosge N. (2004):

Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage;* <u>12</u>:852-862.

Tesche F, Miosge N (2005):

New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease.

Histol Histopathol; <u>**20**</u>:329-337.

Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegard D, Paulsson M, Maurer P (2001):

Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem*; <u>276</u>:6083-6092.

Von der Mark K, Glückert K (1990):

Biochemische und molekularbiologische Aspekte zur Früherfassung humaner Arthrosen. *Orthopäde*; <u>19</u>:2-15.

Winterbottom N, Tondravi MM, Harrington TL, Klier FG, Vertel BM, Goetinck PF (1992):

Cartilage matrix protein is a component of the collagen fibril of cartilage. *Dev Dyn*; **193(3)**:266-76.

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge, der als Betreuer dieser Arbeit fungierte, über die Vergabe des Themas bedanken. Er unterstützte mich bei der Arbeit mittels kritischer Durchsicht und einer hervorragenden Betreuung. Die unter meinem Doktorvater erworbenen Herangehensweisen, die zu einer Publikation meiner Ergebnisse führten, werden sicher auch künftig zu einem routinierteren Umgang mit wissenschaftlichen Themen beitragen.

Zudem gilt mein herzlichstes Beileid den Angehörigen der Familie um Herrn Prof. Dr. med. Rainer Herken, der uns im November 2005 plötzlich und unerwartet verließ. Bis zu diesem Zeitpunkt war er der Leiter des Institutes für Histologie der Medizinischen Fakultät und stand mit seiner herzlichen Art Allen zur Seite. Diese effektive und motivierende Unterstützung führte zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima und trug somit auch zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Weiter möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Fabio Quondamatteo bedanken, der mit seiner freundlichen Hilfsbereitschaft stets mit Rat und Tat half.

Zu guter Letzt danke ich herzlichst den Mitarbeitern Cyrilla Maelicke, Elke Heyder, Christina Zelent, Sonja Schwoch, Berti Manshausen und Rod Dungan der Abteilung Histologie. Ihre Unterstützung machte es möglich, die Methoden der Versuche zu erlernen und in Folge diese Arbeit zu verwirklichen. Ihre Fürsorge führte zu einer entspannten Arbeitsatmosphäre und trug maßgeblich zum Erfolg meiner Doktorarbeit bei.

Lebenslauf

Am 14. April 1978 wurde ich als Sohn von Rolf Clauditz, Forstoberrat, und Ina Clauditz, geborene Küchel, Musiklehrerin, in Göttingen geboren. Meine Schwester Alexandra, geboren am 14.09.1968, studierte Philologie an der Georg-August-Universität Göttingen, während mein Bruder Christopher, geboren am 21.06.1974, in der Filmbranche in Hamburg tätig ist. Nach dem Besuch der Grundschule am Königshof in Hann. Münden von 1984 bis 1988 war ich von 1988 bis 1990 Schüler an der Orientierungsstufe II im Auefeld in Hann. Münden. Im Anschluss besuchte ich von 1990 bis 1993 das Grotefendt-Gymnasium im selben Ort und wechselte 1993 auf das Gymnasium der Gesamtschule Witzenhausen. Hier setzte ich bis zum Jahre 1995 meine Schulausbildung fort. Nach dem Abschluss der Mittelstufe wechselte ich im selben Jahr auf das Berufliche Gymnasium Witzenhausen, wo ich 1998 meine allgemeine Hochschulreife erwarb.

Von November 1998 bis August 1999 leistete ich meinen Militärdienst am 1.PzFlaRak Bataillon in Fuldatal/Rothwesten ab.

Zum Wintersemester 1999 begann ich mit dem Studium der Wirtschaftsinformatik an der Georg-August-Universität Göttingen, das ich im Sommersemester 2000 vorzeitig beendet habe. Im Wintersemester 2000 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen, wo ich seither immatrikuliert bin.