

Aus dem  
Institut für Tieranatomie  
Lehrstuhl für Tieranatomie I, insbesondere Systematische  
und Topographisch-klinische Anatomie  
Vorstand Prof. Dr. Dr. h.c. mult. H.-G. Liebich

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. J. Maierl

# Funktionelle Anatomie des Gelenkknorpels

eine Literaturstudie

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Kristin Bötsch  
aus  
München

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Berichterstatter: PD Dr. Maierl

Korreferent: Prof. Dr. Gerhards

2. Korreferent: PD Dr. Reese

Tag der Promotion: 09. Februar 2007

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	11
Anatomie des Gelenkknorpels.....	13
1 Aufbau des Gelenkknorpels.....	13
1.1 Chondrozyten.....	13
1.1.1 Der Aufbau der Chondrozyten.....	14
1.1.2 Das Zytoskelett der Chondrozyten.....	16
1.1.2.1 Mikrofilamente.....	17
1.1.2.2 Mikrotubuli.....	18
1.1.2.3 Intermediäre Filamente.....	18
1.2 Extrazelluläre Matrix.....	19
1.2.1 Allgemeines.....	19
1.2.2 Matrixregionen und Chondrone.....	21
1.2.2.1 Das Chondron.....	22
1.2.2.2 Die perizelluläre Matrix.....	24
1.2.2.3 Die perizelluläre Kapsel.....	25
1.2.2.4 Territoriale Region.....	27
1.2.2.5 Interterritoriale Region.....	28
1.2.3 Matrixvesikel.....	29
1.2.4 Bestandteile der Matrix.....	32
1.2.4.1 Gewebeflüssigkeit.....	32
1.2.4.2 Makromoleküle.....	32
1.2.4.2.1 Kollagene.....	34
1.2.4.2.1.1 Allgemeines.....	34
1.2.4.2.1.2 Aufbau der Kollagenmoleküle.....	34
1.2.4.2.1.3 Kollagen-Typen.....	37
1.2.4.2.1.3.1 Kollagen II.....	40
1.2.4.2.1.3.2 Kollagen IX.....	41
1.2.4.2.1.3.3 Kollagen XI.....	44
1.2.4.2.1.3.4 Kollagen VI.....	46
1.2.4.2.1.3.5 Kollagen X.....	49
1.2.4.2.1.3.6 Kollagen XII.....	50
1.2.4.2.1.3.7 Kollagen XVI.....	52
1.2.4.2.1.4 Aufbau der Kollagenfibrillen.....	53

1.2.4.2.1.5 Kollagendurchmesser und –dicke .....	58
1.2.4.2.2 Proteoglykane.....	60
1.2.4.2.2.1 Allgemeines .....	60
1.2.4.2.2.2 Bestandteile der Proteoglykane .....	62
1.2.4.2.2.2.1 Glykosaminoglykane .....	62
1.2.4.2.2.2.2 Kernprotein .....	68
1.2.4.2.2.3 Die verschiedenen Proteoglykane .....	69
1.2.4.2.2.3.1 Aggrekane .....	71
1.2.4.2.2.3.2 Versikan .....	86
1.2.4.2.2.3.3 Kleine Proteoglykane.....	87
1.2.4.2.3 Nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine.....	99
1.2.4.2.3.1 Fibronektin .....	100
1.2.4.2.3.2 COMP .....	105
1.2.4.2.3.3 Thrombospondin .....	108
1.2.4.2.3.4 Weitere nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine .....	110
2 Struktur des Gelenkknorpels.....	115
2.1 Unterschiede der Matrixstruktur verschiedener Gelenke.....	115
2.2 Zonale Unterschiede des Gelenkknorpels.....	118
2.2.1 Zonale Unterschiede der Chondrozyten .....	119
2.2.2 Zonale Unterschiede der Matrix.....	123
2.2.3 Zonenspezifischer Verlauf der Kollagenfibrillen .....	125
2.3 Knorpeloberfläche .....	129
2.4 Knorpelzonen .....	134
2.4.1 Oberflächenzone .....	134
2.4.2 Übergangszone .....	134
2.4.3 Radiäre Zone .....	135
2.4.4 Kalzifizierte Knorpelzone .....	136
2.5 Knorpeldicke .....	138
PHYSIOLOGIE DES GELENKKNORPELS.....	139
3 Stoffwechsel des Gelenkknorpels.....	139
3.1 Stoffwechsel der Proteoglykane .....	147
3.1.1 Biosynthese der Proteoglykane .....	147
3.1.2 Abbau der Proteoglykane .....	151
3.1.3 Altersbedingte Veränderungen der Proteoglykane .....	154

3.2 Stoffwechsel der Kollagene .....	157
3.2.1 Biosynthese der Kollagene .....	158
3.2.2 Entstehung der Kollagenfibrillen .....	162
3.2.3 Kollagenolyse .....	163
3.3 Beeinflussung des Knorpelstoffwechsels .....	164
3.3.1 Einfluss der Zytokine .....	166
3.3.2 Einfluss der Wachstumsfaktoren .....	167
3.3.2.1 IGF .....	168
3.3.2.2 TGF .....	170
3.3.2.3 Andere Wachstumsfaktoren und Einflüsse.....	172
4 Ernährung des Knorpels .....	173
4.1 Allgemeines.....	173
4.2 Diffusion .....	177
4.2.1 Einfluss der Solute auf die Diffusion .....	178
4.2.2 Einfluss der Knorpelstruktur auf die Diffusion .....	180
4.2.2.1 Einfluss der Proteoglykane.....	181
4.2.2.2 Einfluss der Knorpeloberfläche .....	182
4.2.3 Einfluss des Konzentrationsgradienten auf die Diffusion .....	183
4.2.4 Einfluss der Zeit auf die Diffusion .....	183
4.2.5 Einfluss der Temperatur auf die Diffusion.....	183
4.3 Konvektion .....	184
4.4 Glukosetransport.....	186
5 Flüssigkeitshaushalt des Gelenkknorpels .....	187
5.1 Flüssigkeitsfluss .....	187
5.2 Permeabilität .....	191
5.3 Viskoelastizität .....	193
5.4 Das Schwellungsverhalten des Gelenkknorpels .....	194
5.5 Schmierfilm der Gelenkflächen .....	196
6 Einfluss der Knorpeldeformation auf den Flüssigkeits- und Soluttransport.....	201
7 Einfluss der Biomechanik auf den Knorpel .....	205
7.1 Einfluss der Biomechanik auf die Chondrozyten .....	207
7.2 Auswirkungen unterschiedlicher Kompression	
auf den Knorpelstoffwechsel .....	214
7.2.1 Statische Kompression .....	216

7.2.1.1 Dynamische Kompression .....	219
7.2.1.1.1 Zonale Unterschiede bei dynamischer Kompression.....	222
7.2.1.1.2 Der Effekt dynamischer Belastung auf den Fibronektinstoffwechsel .....	223
7.2.2 Effekte der Belastungsentfernung auf das Knorpelgewebe .....	224
Zusammenfassung.....	227
Summary .....	231
Literaturverzeichnis .....	235

## **Abkürzungsverzeichnis**

ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motif
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BP	Bindungsprotein
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CEM	Cryoscanning Elektron Mikroskopie
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CILP	Cartilage Intermediate Layer Protein
CLD	C-Typ Lektin-ähnliche Domain
COL-Domäne	Kollagene Domäne
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CRP	Complement Regulatory Protein B Component
CS	Chondroitinsulfat
CZ	Chondrozyt
D	Diffusionskoeffizient
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dermatansulfat
EGF	Epidermal Growth Factor
EM	Elektronenmikroskop
FACIT	Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triplehelices
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy
FGF	Fibroblasten-Growth Factor (Wachstumsfaktor)
GAG	Glykosaminoglykan
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcN	Glukosamin
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GlcNS	Glukosaminsulfat
GlcS	Glukuronsäure
GLUT	Glukosetransporter
HP	Hydroxylysylpyridinolin
HS	Heparansulfat

IF	Intermediäre Filamente
IF $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IGD	Interglobuläre Domäne
IGF	Insulin-like Growth Factor
IH	Immunohistochemisch
IL	Interleukin
K	Grenzflächenteilungskoeffizient
KS	Keratansulfat
LTBP	Latent TGF $\beta$ Binding Protein
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MG	Molekulargewicht
MMP	Matrixmetalloproteinase
MTOZ	Mikrotubuli Organisierendes Zentrum
NC-Domäne	Nicht-kollagene Domäne
NS-Domäne	Aminsulfatdomäne
Pa	Pascal
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PG	Proteoglykan
PM	Polarisationsmikroskopie
PPI	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
PRELEP	Prolin- and Arginin-rich end Leucin Repeat Protein
PTH	Parathormon
PTHrp	Parathormon-related protein
PTR	Proteoglycan Tandem Repeat
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat Sequenz
RNS	Ribonukleinsäure
SCR	Short Complement Repeat
SEM	Scanning Elektron Mikroskopie (Rasterelektronenmikroskopie)
SMA	Smooth Muscle Aktin
SZP	Superficial Zone Protein
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie

## Abkürzungsverzeichnis

---

TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSP	Thrombospondin
UDP	Uridindiphosphat

## Einleitung

Der hyaline Gelenkknorpel überzieht die Gelenkenden der artikulierenden Knochen in synovialen Gelenken. Obwohl er nur wenige Millimeter dick ist, zeigt er eine erstaunliche Widerstandsfähigkeit gegenüber Kompression, ist viskoelastisch und zudem im Normalfall extrem haltbar. Auf diese Weise kann er das gesamte Leben lang eine normale Gelenkfunktion aufrechterhalten. Er verteilt die bei der Artikulation entstehenden Belastungen und minimiert somit die Lastspitzen im Kontaktbereich. Das kommt auch den anderen beteiligten Gewebeschichten, inklusive subchondralem Knochen zugute. Außerdem trägt er zur Schmierung der Gelenkoberflächen bei und ermöglicht somit eine nahezu reibungslose Bewegung der Gelenkkörper.

Die extreme Belastbarkeit des Gelenkknorpels ist auf seine äußerst komplexe Struktur und die umfassenden Wechselwirkungen zwischen seinen verschiedenen Komponenten zurückzuführen. Die Knorpelzellen können als funktionelle Einheit des Knorpels betrachtet werden, da sie während des gesamten Lebens die verschiedenen Bestandteile der extrazellulären Matrix je nach Bedarf synthetisieren oder abbauen. Dieses dynamische Gleichgewicht ist jedoch relativ empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen. Sowohl Gelenkimmobilisierung, als auch zu starke Knorpelbelastungen können ebenso wie Knorpelerkrankungen zu einem Ungleichgewicht führen. Die Schädigungen des Knorpels können bis zu einem gewissen Grad zwar ausge bessert werden, der ursprüngliche Zustand ist jedoch nicht mehr vollständig wiederherstellbar. Die biomechanisch minderwertige Ersatzmatrix zieht eine progressive Verschlechterung der Knorpelqualität nach sich. Da nach Eintritt der Skelettreife außerdem keine Zellteilung mehr stattfindet, können auch defekte Chondrozyten nicht ersetzt werden.

Für das Verständnis von Ätiologie und Pathogenese der Gelenkknorpelerkrankungen und die Entwicklung von Therapeutika und Arthroplastiken ist ein genaues Kenntnis von Knorpelstruktur, -zusammensetzung, -physiologie und -biomechanik von größter Bedeutung. Obwohl die verschiedensten Untersuchungsmethoden laufend verbessert werden, sind noch immer nicht alle Gelenkknorpelbestandteile identifiziert und auch ihre Funktionen und gegenseitigen Wechselwirkungen nur partiell erforscht. Bezüglich seiner Struktur insbesondere im Bereich der Knorpeloberfläche, sowie seiner Ernährung und der Schmierung seiner Oberfläche herrschen ebenfalls

noch einige Unstimmigkeiten in der Literatur. Die folgende Arbeit soll dazu beitragen, aus den zahlreichen wissenschaftlichen Einzelarbeiten einen Überblick über den derzeitigen wissenschaftlichen Stand zu vermitteln - als Grundlage für weiterführende Untersuchungen auf dem Gebiet des Gelenkknorpels.

# Anatomie des Gelenkknorpels

## 1 Aufbau des Gelenkknorpels

Der hyaline Gelenkknorpel weist im Vergleich zu anderen Körpergeweben einige strukturelle Besonderheiten auf, zum Beispiel das Fehlen von Basalmembranen an allen Seiten des Gewebes (KUETTNER, 1992) sowie eines Epithels zwischen Gelenkoberfläche und Synovialflüssigkeit (HALL et al., 2003). Um seiner gewichttragenden und –verteilenden Funktion innerhalb des Gelenks gerecht werden zu können, enthält er außerdem keine verletzbaren Strukturen wie zum Beispiel Nerven, Blut- oder Lymphgefäße (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; DIJKGRAAF et al., 1995; HALL et al., 2003; PFISTER et al., 2001).

### 1.1 Chondrozyten

Die einzigen Zellen, die physiologischerweise im Gelenkknorpel vorkommen, sind die Chondrozyten. Ihr Anteil am Gesamtgewicht des Gelenkknorpels beträgt nur etwa 10% (COHEN et al., 1998; FEDERICO et al., 2005) und bezüglich des Knorpelvolumens 5% (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994; HALL et al., 2003; SZAFRANSKI et al., 2004) bis 10% (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003; VANWANSEEELE et al., 2002). Trotz dieses geringen Anteils sind die Knorpelzellen für den Stoffwechsel und in geringem Umfang auch für die Reparatur des Knorpelgewebes verantwortlich (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Obwohl die Stoffwechselaktivität der einzelnen Zellen zwar relativ hoch ist (die Glykolyserate ist ähnlich hoch wie die der Zellen in vaskularisiertem Gewebe), ist das Knorpelgewebe aufgrund der geringen Zelldichte insgesamt jedoch eher stoffwechselträge (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003; BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Je nach Tierart, Gelenktyp und Alter variiert die Größe der Chondrozyten (PUHL, 1974; TRIPPEL et al., 1980). Aber auch innerhalb des Knorpels eines Gelenks sind die Chondrozyten nicht einheitlich, sondern zeigen je nach Knorpeltiefe Unterschiede in Form, Größe und Stoffwechselaktivität (AYDELOTTE et al., 1991; CLARK et al., 2003; QUINN et al., 2005) (Genaueres siehe 2.2.1 Zonale Unterschiede der Chondrozyten). Der Durchmesser boviner Gelenkknorpelzellen beispielsweise liegt

zwischen 52 und 72  $\mu\text{m}$ . Kleine Chondrozyten enthalten einen kleinen euchromatinreichen Kern und geringe Mengen an Zytoplasma, große Chondrozyten hingegen besitzen einen von viel Zytoplasma umgebenen größeren, eher heterochromatinreichen Kern mit gelegentlich erkennbaren Nukleoli (TRIPPEL et al., 1980). Zellgröße und Stoffwechselaktivität stehen zueinander in Relation. So wurde in den von TRIPPEL et al. (1980) gefundenen größten Chondrozyten eine sechsmal höhere Stoffwechselaktivität gemessen als bei den kleinsten.

Jede Knorpelzelle muss als funktionelle Einheit des Knorpels betrachtet werden und ist für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix in ihrer direkten Umgebung verantwortlich. Da sich die Chondrozyten selbst mit der von ihnen synthetisierten Matrix umgeben (KUETTNER, 1992), sind sie weder interzellulär miteinander verbunden (KUETTNER et al., 1982), noch haben sie direkten Kontakt zueinander (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003). Die Kommunikation zwischen den einzelnen Knorpelzellen erfolgt somit über die Matrix (KUETTNER, 1992). Während in unreifem Gelenkknorpel die einzelnen Chondrozyten noch sehr nah beieinander liegen, ist der interzelluläre Abstand in reifem Knorpel deutlich größer (JADIN et al., 2005).

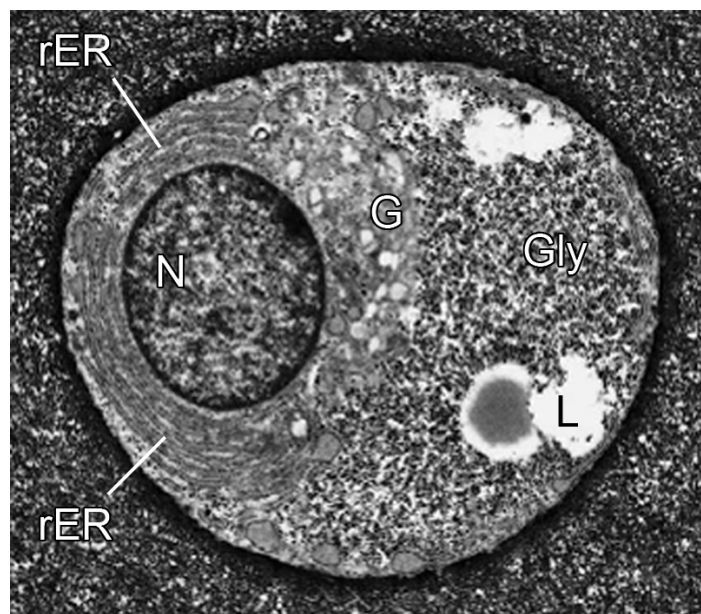
In gesundem Gelenkknorpel findet nach der Skelett reife keine Mitose der langlebigen Chondrozyten mehr statt (HALL et al., 2003; KUETTNER, 1992; MUIR, 1995). Bei Zellverlust, zum Beispiel durch ein mechanisches Trauma, können somit keine Zellen ersetzt werden. Die übrigen Knorpelzellen steigern dann ihren Stoffwechsel um den normalen Matrixstoffwechsel aufrechtzuerhalten (HALL et al., 2003). Der vorherige Zustand der Matrix kann jedoch nicht mehr vollkommen erreicht werden und seine reduzierten biomechanischen Eigenschaften führen zu einer progressiven Verschlechterung des Gelenkknorpels (MUIR, 1995). Die Chondrozyten behalten allerdings ihre Kapazität zur Replikation bei. Sie kann bei einer Schädigung des Kollagennetzes ihrer lokalen Matrix aktiviert werden, wie dies zum Beispiel bei Osteoarthritis der Fall ist (MUIR, 1995). Auf welche Weise dies erfolgt ist jedoch noch nicht geklärt. Jedenfalls findet im Spätstadium der Knorpeldegeneration eine Teilung der Chondrozyten statt, die an einer Gruppenbildung der Knorpelzellen zu erkennen ist (MURRAY et al., 2001)

### **1.1.1 Der Aufbau der Chondrozyten**

Isolierte Chondrozyten sind kugelförmig, wohingegen ihre Form im Knorpel in vivo zonale Unterschiede aufweist (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003; KUETTNER et

al., 1982). Neben runden sind im Knorpel auch polygonale und an den Gewebsgrenzen flache oder diskoidale Zellen anzutreffen (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003).

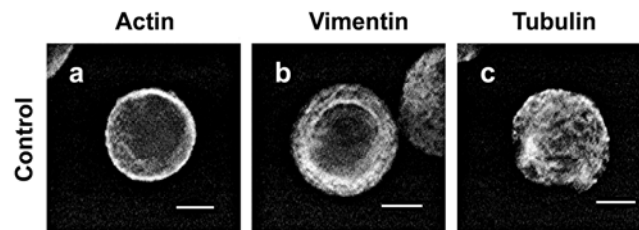
Unabhängig von ihrer Größe können alle Knorpelzellen Matrix synthetisieren und besitzen die hierfür nötigen Organellen. Der Zellkern liegt oft exzentrisch und enthält polydisperses Euchromatin. Im Zytoplasma dominieren neben zahlreichen freien Ribosomen (KUETTNER et al., 1982) das raue endoplasmatische Retikulum (rER) und der Golgi-Apparat (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; KUETTNER et al., 1982). Viele Zellen besitzen außerdem noch intrazytoplasmatische Filamente, Lipide, Glykogen, Vesikel und manchmal auch kurze Zilien, die in die Matrix hineinragen und dort mechanische Veränderungen registrieren (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003; BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Die dreischichtige Plasmamembran der Knorpelzellen ist charakterisiert durch Mikrovilli, die in den perizellulären Raum hineinragen. Durch diese feinen Einziehungen und Protrusionen, die bei jungen Knorpelzellen größer und häufiger anzutreffen sind als bei alten, wird die Zelloberfläche vergrößert und damit der Stoffaustausch mit der extrazellulären Matrix erleichtert. Die filamentösen Proteoglykane der Matrix stehen mit der Plasmamembran über ihre gesamte Oberfläche, einschließlich der Mikrovilli, in Kontakt (ARSENAULT und KOHLER, 1994).



**Abbildung 1:** EM eines artikulären Chondrozyten mit dezentralem Zellkern. Im CZ enthalten sind raues Endoplasmatisches Retikulum (rER), juxtanukleärer Golgi-Apparat (G), Nukleus (N) und Glykogenspeicher (Gly) inklusive Lipidtröpfchenreste (L). Aus ARCHER und FRANCIS-W. (2003).

### 1.1.2 Das Zytoskelett der Chondrozyten

Wie das Zytoskelett anderer Zellen auch, besteht das der Chondrozyten aus einem dreidimensionalen Netzwerk der Proteine Aktin, Vimentin und Tubulin, die entsprechend zu Mikrofilamenten, intermediären Filamenten (IF) und Mikrotubuli zusammengesetzt werden (BENJAMIN et al., 1994; DURRANT et al., 1999; LANGELIER et al., 1999).



**Abbildung 2:** Das Zytoskelett der Chondrozyten. Fluoreszenzfärbung von Aktin (a), Vimentin (b) und Tubulin (c). Balken = 5 µm. Aus TRICKEY et al. (2004).

Das Zytoskelett ist sowohl für die Zellform, als auch für die Bewegung der Zellen und Organellen von größter Wichtigkeit. Es wird angenommen, dass es sowohl für Chondrogenese als auch Zellteilung und intrazellulären Verkehr von Bedeutung ist (BENJAMIN et al., 1994). Nach der Knorpelreife können sich die Chondrozyten innerhalb der zähen Matrix nicht mehr bewegen und werden ausschließlich passiv bei Knorpelkompression deformiert (SKAGGS et al., 1993). Aktiv ist ihre Form nur bei einer Hypertrophie veränderbar.

Auch bezüglich der mechanischen und biomechanischen Eigenschaften der Zelle, sowie ihrer Wechselwirkungen mit der umliegenden Matrix spielt das Zytoskelett eine wichtige Rolle (GUILAK und MOW, 2000; LEE et al., 2000; MOW et al., 1999). So konnten TRICKEY et al. (2004) zeigen, dass durch seine Beschädigung (hier durch chemische Agenzien) die mechanischen Zelleigenschaften verändert werden. Die Viskoelastizität der Chondrozyten nimmt dabei mit zunehmender Zerstörung der Zytoskelettkomponenten immer mehr ab. Für diese Viskoelastizität (TRICKEY et al., 2000) sind jedoch nur die Mikrofilamente und intermediären Filamente verantwortlich (siehe Kapitel 1.1.2.1 Mikrofilamente und 1.1.2.3 Intermediäre Filamente). Eine Zerstörung der Mikrotubuli hingegen beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Chondrozyten nicht merklich (TRICKEY et al., 2004).

Die Ursache für die Viskoelastizität der Chondrozyten ist noch nicht vollständig geklärt, kann aber wohl in flussabhängige (Wechselwirkungen zwischen flüssig und

fest sowie Flüssigkeitsviskosität) (KOAY et al., 2001) und flussunabhängige Mechanismen (Viskoelastizität des Zytoskeletts) unterteilt werden (HOCHMUTH, 2000).

### 1.1.2.1 Mikrofilamente

Bei den Mikrofilamenten handelt es sich um Polymere aus  $\beta$ -Aktin-Untereinheiten mit einem dynamischen Gleichgewicht zwischen polymerisierten und nicht-polymerisierten Untereinheiten (BENJAMIN et al., 1994). Die Mikrofibrillen befinden sich in der Zellperipherie (Zellrinde) und bilden dort ein stabiles Netzwerk mit zum Nukleus hinstrahlenden Spitzen (DURRANT et al., 1999; LANGELIER et al., 1999; LEE et al., 2000; TRICKEY et al., 2004). Dieses Netzwerk kann sich bei starker Belastung verflüssigen (TRICKEY et al., 2004).

Die Mikrofilamente verleihen der Zelloberfläche mechanische Stärke, ermöglichen den Zellen sich zu verformen und spielen eine Rolle beim intrazellulären Transport. Außerdem stellten TRICKEY et al. (2004) bei Beeinträchtigung der Mikrofilamente eine Veränderung der Beziehung zwischen der Deformation der extrazellulären Matrix und der des Chondrozytenkerns fest. Somit scheint Aktin teilweise für die Übermittlung der mechanischen Deformation durch die Zellmembran hindurch verantwortlich zu sein (TRICKEY et al., 2004).

Außerdem können die Chondrozyten (Untersuchungen an Zellkulturen mit Chondrozyten von reifem humanem und caninem Gelenkknorpel) die kontraktile Aktin-Isoform  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) synthetisieren (KIM und SPECTOR, 2000; KINNER und SPECTOR, 2001; WANG et al., 2000). Dabei ist die Anzahl der in situ  $\alpha$ -SMA enthaltenden Chondrozyten in der oberflächlichen Knorpelhälfte beim Hund mit 50% (WANG et al., 2000) und Mensch mit 60% (KINNER und SPECTOR, 2001) deutlich höher als in der tieferen Knorpelhälfte mit entsprechend 23% (WANG et al., 2000) und 28% (KINNER und SPECTOR, 2001).

$\alpha$ -SMA enthaltende Chondrozyten sind dazu in der Lage, eine Kontraktion der extrazellulären Matrix zu bewirken, wobei eine direkte Beziehung zwischen  $\alpha$ -SMA-Gehalt und Kontraktionsgrad besteht (KINNER und SPECTOR, 2001).

### 1.1.2.2 Mikrotubuli

Die Mikrotubuli bestehen aus zytoplasmatischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten, die sich zu 13 longitudinalen Reihen zusammenlagern und um das hohle Zentrum eines jeden Mikrotubulus anordnen. Dabei bilden sie Tubulindimere, die Kopf-zu-Schwanz entlang der Längsachse des Mikrotubulus angeordnet sind. Die dadurch entstehende Polarisierung ist für viele Funktionen von Nutzen (BENJAMIN et al., 1994).

Innerhalb der Zelle breiten sich die Mikrotubuli ausgehend vom Mikrotubuli organisierenden Zentrum (MTOZ) im gesamten Zytoplasma aus (BENJAMIN et al., 1994; LANGELIER et al., 1999; LEE et al., 2000; TRICKEY et al., 2004). Beim MTOZ handelt es sich üblicherweise um ein Zentriol in der Nähe des Zellkerns (DURRANT et al., 1999; TRICKEY et al., 2004),

Mikrotubuli werden sowohl in sich teilenden Zellen jungen Knorpels als auch in der mittleren Zone reifen Knorpels angetroffen. Sie spielen eine Hauptrolle bei Verteilung der Organellen, Antrieb der Ziliarbewegungen, intrazellulärem Verkehr und Zellteilung. Genauer gesagt bestimmen sie die Lokalisation von Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum. Außerdem ist ihre Integrität innerhalb der Chondrozyten für Synthese und Sekretion von Kollagenen und Proteoglykanen von großer Bedeutung (BENJAMIN et al., 1994).

Es wird vermutet, dass sich die Mikrotubuli in einem Zustand relativ schnellen Stoffwechsels, genannt „dynamische Instabilität“, befinden und ständig polymerisieren und depolymerisieren (NEUMANN et al., 2001). Dies ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass sie nicht merklich zu den mechanischen Zelleigenschaften beitragen (TRICKEY et al., 2004).

Viele Chondrozyten besitzen eine 9+0 Zilie. Da das Fehlen eines zentralen Mikrotubulus typisch für unbewegliche Zilien ist, handelt es sich bei diesen Zilien eventuell um sensorische Strukturen für mechanische, physiochemische und/oder osmotische Reize in der peripheren Umgebung (Chondron) (POOLE et al., 1987).

### 1.1.2.3 Intermediäre Filamente

Die IFs, zu denen Vimentin gehört, sind besonders in den Chondrozyten der mittleren Gelenkknorpelzone anzutreffen (EGGLI et al., 1988). Dort lagern sie sich oft zu dichten Wirbeln zusammen, die große Teile des Zytoplasmas vereinnahmen. Häufig sind sie auch mit Lipidtröpfchen verbunden (BENJAMIN et al., 1994). Laut DURRANT et al. (1999) bilden sie Netzwerke an der Cortex und um den Nukleus

herum, von denen verbindende Filamente durch das Zytosol hindurchstrahlen. TRICKEY et al. (2004) berichten jedoch von einer generellen Verteilung des Vimentin durch das gesamte Zytosol hindurch und von definierten Filamenten in Nukleusnähe. Ihre Funktionen sind kaum bekannt, sie werden aber als mechanische Integratoren des intrazellulären Raums betrachtet. Zusammen mit anderen Elementen des Zytoskeletts bilden die IFs einen Teil des mechanischen Transduktionssystems, womit Zellen auf externe Kräfte antworten und Veränderungen der äußeren Umgebung wahrnehmen (BENJAMIN et al., 1994). Im Gegensatz zu den Mikrofilamenten kommt es hier bei starker Belastung jedoch zu einer Versteifung des Netzwerks der IFs (TRICKEY et al., 2004).

Die Chondrozyten steigern ihren IF-Gehalt als Antwort auf mechanische Belastung. IFs sind daher vermehrt in den gewichttragenden Bereichen des Gelenkknorpels anzutreffen. Außerdem ist ihr Gehalt in älteren Chondrozyten höher als in jungen Knorpelzellen.

Weiterhin lässt die sehr spezifische Verteilung verschiedener IFs im Gelenkknorpel von Ratten annehmen, dass die Filamente spezielle Funktionen im Gewebe innehaben. Die Zytokeratine der Oberflächennzone zum Beispiel könnten im Zusammenhang mit der abgeflachten Form der dortigen Zellen oder mit den kombinierten Scher- und Druckkräften stehen, denen diese ausgesetzt sind. Es könnte auch eine Korrelation der IFs mit den Varianten der extrazellulären Matrix in verschiedenen Knorpeltiefen bestehen (BENJAMIN et al., 1994).

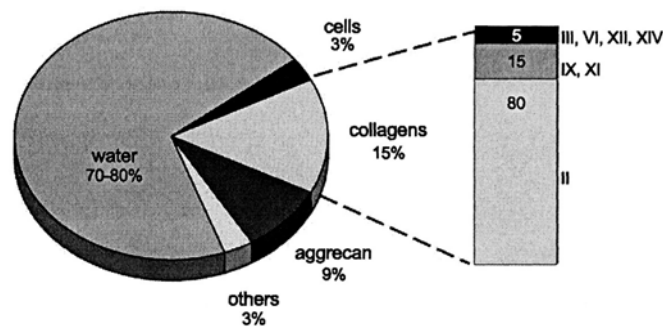
Die unterschiedliche Expression der Zytokeratine hängt möglicherweise mit den verschiedenen Integrintypen der Zellmembran von Knorpelzellen und der Natur der perizellulären Matrix zusammen. SALTER et al. (1992) fanden nämlich heraus, dass Chondrozyten eine Vielfalt an Integrin-Untereinheiten exprimieren, wobei die Expression heterogen erfolgt, wahrscheinlich abhängig vom Abstand zur Gelenkoberfläche.

## **1.2 Extrazelluläre Matrix**

### **1.2.1 Allgemeines**

Die Matrix des Gelenkknorpels besteht aus zwei Komponenten: der Gewebeflüssigkeit und dem Gerüst aus Makromolekülen, das dem Gewebe seine Form und Stabilität verleiht. Wechselwirkungen zwischen den beiden Komponenten sorgen für die Festigkeit und Viskoelastizität des Knorpels (BUCKWALTER und

MOW, 1992; MOW und ROSENWASSER, 1988). Die Makromoleküle der Matrix bilden nämlich ein Netzwerk, welches das Wasser innerhalb der Matrix hält, den Wasserfluss durch die Matrix kontrolliert und auch Anlagerungsstellen an der Zellmembran zur Verfügung stellt (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988).



**Abbildung 3:** Molekulare Zusammensetzung des Gelenkknorpels. Aus AIGNER und STÖVE (2003).

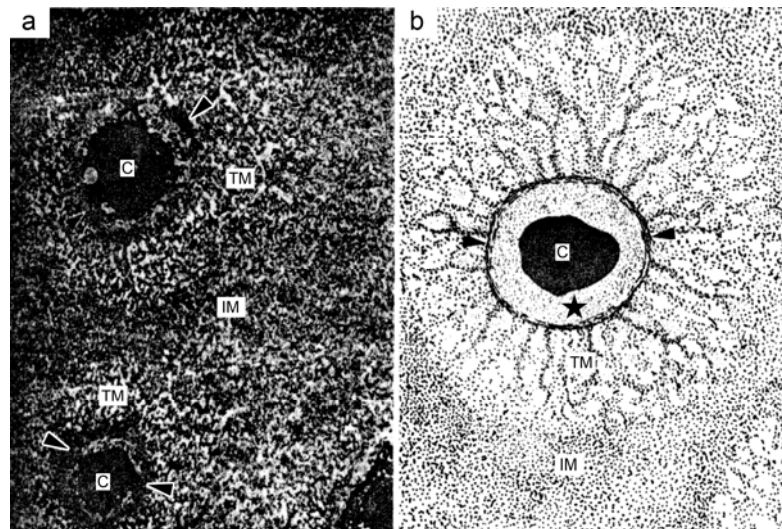
Aber auch chemische, mechanische und physikalische Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Matrixkomponenten selbst sind sowohl für die Aufrechterhaltung der Matrix, als auch die biomechanische Funktion des Gelenkknorpels essentiell (BROOM und SILYN-ROBERTS, 1990; MOW et al., 1992; ZHU et al., 1993).

Die biochemische Zusammensetzung der Matrix variiert sowohl inter-individuell als auch intra-individuell, je nach Alter, Gelenk, Knorpeltiefe und Knorpelregion (DIJKGRAAF et al., 1995). Chemische Zusammensetzung, molekulare Organisation und biomechanische Eigenschaften können sich jedoch auch während Differenzierung, physikalischem Training und Mineralisation verändern (MODIS et al., 1996).

Die elektronendurchlässige Matrix besitzt keine sichtbare Suprastruktur und ist im Netz der meist quergestreiften Kollagenfibrillen eingebettet. Bei Belastung des Knorpels kommt es zur Kompression der Matrix und daraufhin zu einer Zugbelastung des fibrillären Netzes (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Die Kombination aus Kollagenfasern und hydriertem Proteoglykangel stellt eine einzigartige Anpassung an die duale Funktion von geringer Reibung bei Artikulation an der Gelenkoberfläche und Belastungsübertragung durch das Gelenk zum darunterliegenden Knochen dar (JEFFERY et al., 1991).

### 1.2.2 Matrixregionen und Chondrone

In reifem Gelenkknorpel kann (KUETTNER, 1992) die Matrix der mittleren und tiefen Knorpelzone in drei, um einzelne oder mehrere Chondrozyten konzentrisch angeordnete Regionen unterteilen: eine perizelluläre, eine territoriale und eine interterritoriale Region (AIGNER und STÖVE, 2003; POOLE et al., 1984). Außerdem befindet sich in diesen Knorpelzonen zwischen der perizellulären und der territorialen Matrix eine perizelluläre Kapsel, die zusammen mit der perizellulären Matrix und den sich darin befindenden Chondrozyten eine funktionelle und metabolische Einheit des Knorpels bildet, die als Chondron bezeichnet wird (HORIKAWA et al., 2004; POOLE et al., 1987; YOUN et al., 2006). In der Oberflächenzone des Gelenkknorpels fehlt jedoch eine perizelluläre Kapsel (POOLE et al., 1984 und 1987).



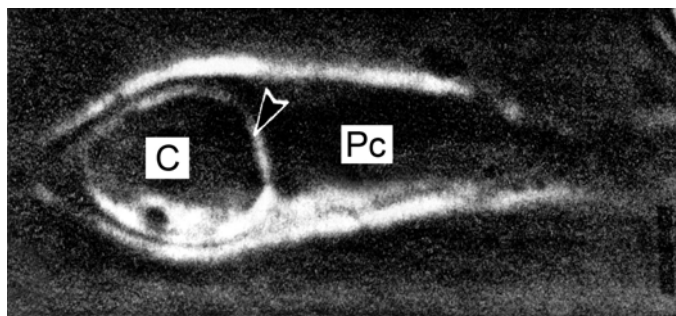
**Abbildung 4:** Transversaler Ausschnitt (a) und diagrammatische Darstellung (b) der tieferen Schichten caninen Tibiaknorpels mit konzentrisch angeordneten CZ (C), perizellulärer Matrix (\*), perizellulärer Kapsel (Pfeilspitzen), territorialer Matrix (TM) und interterritorialer Matrix (IM). x1930. Aus POOLE et al. (1984).

Die Matrixregionen, deren relative Größe variieren kann (KUETTNER, 1992), unterscheiden sich hinsichtlich Morphologie, biochemischen Eigenschaften und ihrer physikalischen Antwort auf Kompression. Sie wirken jedoch synergistisch und bilden ein integriertes biologisches hydroelastisches System (POOLE et al., 1984). Das Volumen der perizellulären Matrix ist jedoch in allen Knorpelzonen relativ konstant und beträgt etwas mehr als das Doppelte des Chondrozytenvolumens. Dies lässt vermuten, dass die Chondrozyten aller Knorpelzonen ein ähnliches Volumen an perizellulärer Matrix synthetisieren (YOUN et al., 2006).

### 1.2.2.1 Das Chondron

Die Nomenklatur von perizellulärer Matrix und Kapsel ist sehr uneinheitlich. So wird die perizelluläre Matrix auch als Lakuna, Graben, Hof, Korona oder Kapsel bezeichnet und die perizelluläre Kapsel als perilakunare Mauer, Ring oder Grenze, kondensierter Ring oder territoriale Matrix (POOLE et al., 1987). In dieser Arbeit werden die Bezeichnungen perizelluläre Matrix und perizelluläre Kapsel übernommen.

Die einzelnen Chondrone zeigen eine längliche Form. Besonders bei Chondronen, die nur einen Chondrozyten enthalten, läuft die Kapsel an einem der beiden Pole häufig zu einem spitzen, bis zu 100 µm langen Schwanz aus. Seine Funktion ist bislang ungeklärt. Da der Schwanz jedoch mit der Matrix fest verbunden ist, könnte er als Verankerung des Chondrons in der Matrix dienen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Bildung spezialisierter Kanäle durch die Schwänze in der Matrix. Chondrone ohne Schwanz sind oval und haben oft kleine kanalähnliche Erweiterungen an einem Pol (POOLE et al., 1988).



**Abbildung 5:** Einzelchondron mit CZ (C), seiner perizellulären Matrix (Pfeil) und perizellulären Kapsel (Pc). Am rechten Pol ist die Kapsel zu einem Schwanz ausgezogen. Balken = 10 µm. Aus POOLE et al. (1988).

Ein Chondron kann einen oder mehrere Chondrozyten enthalten (MUIR, 1995). Bei den Chondronen wiederum gibt es einzelne, doppelte und multiple Chondrone, die aus drei bis acht Chondronen bestehen. Letztere sind ausnahmslos linear angeordnet und erscheinen den Chondrozytensäulen der tieferen Knorpelschichten identisch (POOLE et al., 1988; YOUN et al., 2006). In doppelten und multiplen Chondronen wird jeder einzelne Chondrozyt mit seiner perizellulären Matrix von den benachbarten Zellen durch eine dichte kapsuläre Scheide getrennt, die entlang der linear angeordneten Chondron-Säulen kontinuierlich weiterverläuft (POOLE et al., 1988).

An den einzelnen und doppelten Chondronen heften keine Kollagenfasern an. Die multiplen Chondrone hingegen sind mit vielen Kollagenbündeln verbunden, die sich strahlenförmig vom Körper der Chondronsäule ausbreiten (Gelenkknorpel von 2-5 Jahre alten Hunden). Sie scheinen eine, den Scherkräften widerstehende strukturelle Beziehung zwischen den kapsulären Komponenten der Chondrone und den Kollagenfasern des Typ II darzustellen (POOLE et al., 1988). Da der lokale Kollagenverlauf der interterritorialen Matrix in allen Knorpelzonen der Chondronorientierung entspricht, scheinen die Kollagene auch die Form und Ausrichtung der Chondrozyten und ihrer perizellulären Matrix zu beeinflussen (YOUN et al., 2006).

Chondrone enthalten neben Flüssigkeit (MODIS et al., 1996) viele Proteoglykanmonomere, die sich hauptsächlich im Schwanz und in den verbindenden Segmenten der Kapsel zwischen benachbarten Chondronen konzentrieren. Dort dienen sie wahrscheinlich als Schutz und Stabilisierung der Chondrozyten. Außerdem befinden sich in den Chondronen Epitope von Keratansulfat (KS), Chondroitinsulfat (CS), Hyaluronsäure-bindenden Regionen und Kernproteinen. Der KS-Gehalt konzentriert sich hauptsächlich an Schwanz und Verbindungssegment der Chondronsäulen und ist nur in sehr geringer Konzentration in anderen Teilen der Kapsel anzutreffen. CS ist konstanter in der ganzen Kapsel verteilt, jedoch mit denselben Schwerpunkten wie KS. Bindungsproteine sind besonders in der perizellulären Region um den Chondrozyten anzutreffen (POOLE et al., 1991).

Chondrone enthalten auch noch andere Bestandteile wie zum Beispiel Kollagen II, IX, XI und das ausschließlich in der perizellulären Matrix vorkommende Kollagen VI (AIGNER und STÖVE, 2003; MUIR et al., 1995; YOUN et al., 2006). Während sich Kollagen IX hauptsächlich im äußeren Rand der Chondronkapsel befindet (MUIR, 1995), ist das zellassozierte Kollagen XI hingegen in der perizellulären Matrix anzutreffen (POOLE et al., 1991). Die Chondrone tragen also auch zur Elastizität des Knorpels und zum mechanischen Schutz der Chondrozyten bei (MODIS et al., 1996).

Die Chondrone sind vergleichbar mit kompressionsresistenten flüssigkeitsgefüllten Blasen, die durch dynamische Belastung induzierte mechanische, osmotische und physiochemische Veränderungen dämpfen und die Bewegung der perizellulären Matrix und der Chondrozyten bei Kompression einschränken. Ihre Längsachsen sind

parallel zu den Kräftelinien angeordnet (MODIS et al., 1996; POOLE et al., 1984). Das Chondron verhält sich also hydrodynamisch, um die Integrität und Lebensfähigkeit der Chondrozyten und ihrer perizellulären Mikroumgebung während kompressiver Belastung zu schützen (MAYNE, 1989; YOUN et al., 2006). Außerdem ist es wahrscheinlich auch bei belastungsinduzierter Matrixdeformation an der Weiterleitung mechanischer Signale zu den Chondrozyten beteiligt, da perizelluläre Matrix und Kapsel die Zellmembran mit den Matrixmolekülen verbinden (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Diese extrinsischen mechanischen, physiochemischen und/oder osmotischen Signale können in Stimuli umgewandelt werden, die die Chondrozyten benötigen um ihre Syntheseaktivität und Sekretion schnell zu modifizieren (POOLE et al., 1987). Das Chondron wirkt außerdem mit der territorialen und interterritorialen Matrix synergistisch, um den Verlust von Proteoglykan-gebundenem Wasser aus der Matrix zu regulieren und so der kompressiven Deformation bei Belastung zu widerstehen (POOLE et al., 1991).

#### **1.2.2.2 Die perizelluläre Matrix**

Die direkt an der Chondrozytenmembran anliegende perizelluläre Matrix (AIGNER und STÖVE, 2003) stellt in den mittleren und tiefen Knorpelschichten das flüssigste und deformierbarste Kompartiment der verschiedenen Matrixregionen dar (POOLE et al., 1984). Sie sorgt für eine bestimmte biochemische und biomechanische Mikroumgebung der Chondrozyten (GELSE et al., 2003; YOUN et al., 2006) und schützt die Knorpelzellen besonders bei Kompression (MAYNE, 1989). Die perizelluläre Matrix ist besonders reich an Proteoglykanen mit einem großen Anteil an Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat. Der Gehalt an Proteoglykanaggregaten nimmt in den tieferen Knorpelschichten zur Peripherie der perizellulären Matrix hin zu (POOLE et al., 1984). Weiterhin sind auch nicht-kollagene Proteine wie Fibronektin (YOUN et al., 2006) und Annexin V anzutreffen, das sich an der Zellmembran befindet (PFAFFLE et al., 1990).

Der Kollagengehalt der perizellulären Matrix ist sehr gering. Neben den nur in geringen Mengen vorkommenden fibrillären Kollagenen II, IX und XI, ist das für die perizelluläre Matrix spezifische nicht-fibrilläre Kollagen VI anzutreffen (AIGNER und STÖVE, 2003; HAGIWARA et al., 1993; MARCELINO und McDEVITT, 1995; SÖDER et al., 2002; YOUN et al., 2006). Kollagen VI bindet an die Integrin-Rezeptoren der Chondrozytenmembran und an Proteine der perizellulären Matrix

und stellt somit wahrscheinlich ein Verbindungsstück zwischen der steifen interterritorialen Matrix und den Knorpelzellen dar. Es ist sowohl an der Zellverankerung (AIGNER und STÖVE, 2003; HORIKAWA et al., 2004) als auch an der Signalübertragung zwischen Matrix und Zellen beteiligt (AIGNER und STÖVE, 2003; YOUN et al., 2006). In osteoarthritischem Gelenkknorpel, in dem das gesamte Kollagen VI zerstört sein kann, ist ein bis zu 2,5-facher Anstieg der Chondronpermeabilität möglich (YOUN et al., 2006).

### **1.2.2.3 Die perizelluläre Kapsel**

Die perizelluläre Matrix der mittleren und tiefen Knorpelschichten wird von einer kokonförmigen, fibrösen perizellulären Kapsel umschlossen (POOLE et al., 1987).

Diese stellt die äußere Grenze des Chondrons dar und trennt den Chondrozyten und seine perizelluläre Matrix physikalisch von der gröber strukturierten territorialen Matrix mit ihren strahlenförmig angeordneten Kollagenfasern (POOLE et al., 1984 und 1987). Die Kapsel ist mechanisch steif und behält in Versuchsproben auch leer ihre Form bei (POOLE et al., 1988). Ihre normale anatomische Position wird durch die proteoglykanbedingte Hydratation der perizellulären Matrix aufrechterhalten (POOLE et al., 1987). Die Chondrozyten sind strukturell zwar von der sie umgebenden Kapsel unabhängig, treten mit ihr aber über zahlreiche zytoplasmatische Fortsätze und das Protein Annexin V in Kontakt, ohne jedoch den inneren Rand der Kapsel zu penetrieren (KUETTNER, 1992; POOLE et al., 1987 und 1988).

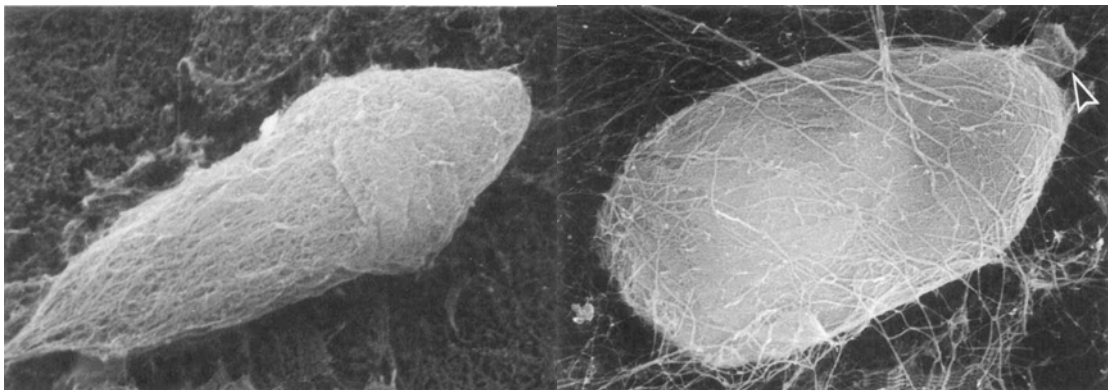
Die in den tiefen Knorpelschichten vorkommenden Chondrozytensäulen werden jeweils als Ganzes von einer deutlich orientierten Kapsel umschlossen, die dichter und kompakter als in den mittleren Lagen erscheint (POOLE et al., 1987).

Das filzähnliche Gewebe der perizellulären Kapsel bildet eine fenestrierte Lamina, deren Porengröße von der inneren zur äußeren Kapselgrenze hin progressiv abnimmt. So bildet das lockere Fibrillengeflecht der inneren Kapseloberfläche eine Vielzahl von Makroporen mit einem mittleren Durchmesser von  $170 \text{ nm} \pm 90 \text{ nm}$ . Der Durchmesser der dicht gedrängten, kleinen Mikroporen zwischen den feinen kompakten Fibrillen der äußeren Kapseloberfläche hingegen beträgt durchschnittlich nur  $30 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ . Bei Kompression des Knorpels kommt es zur lateralen Deformation des Chondrons und zum Flüssigkeitsfluss aus der perizellulären Matrix durch die Poren der Kapsel hindurch in die territoriale und interterritoriale Matrix. So

wird die Belastung bei Kompression gedämpft und der Chondrozyt hydraulisch geschützt (POOLE et al., 1987).

Die Ultrastruktur der perizellulären Kapsel variiert je nach Gelenk, Individuum und Lokalisation im Knorpel. Gelenkgröße und Alter des Individuums hingegen haben keinen Einfluss auf ihre Struktur (POOLE et al., 1988). Die genaue Zusammensetzung der Chondronkapsel ist bisher noch nicht bekannt. Sie enthält jedoch kugelförmige, etwa 30-40 nm große (KUETTNER et al., 1982) Proteoglykanaggregate, die in einem dreidimensionalen Gerüst aus Kollagenfasern der Typen II, VI und IX eingebettet sind (POOLE et al., 1991). Die Vernetzung von Fibrillen und Proteoglykanen erfolgt möglicherweise über Glutaraldehyd-Verbindungen (KUETTNER et al., 1982).

Die Kollagenfibrillen treten in Bündeln aus parallelen Fäden auf und verlaufen longitudinal, transversal, schräg und zirkulär um die Peripherie der perizellulären Matrix. Sie werden untereinander durch feine, 57 nm lange Fäden und Klumpen aus dichtem amorphem Material verbunden (POOLE et al., 1984). Sowohl Faserdichte, als auch deren Durchmesser sind in der Kapsel größer als in der perizellulären Matrix (POOLE et al., 1987). Letzterer liegt zwischen 10 und 40 nm (KUETTNER et al., 1982; POOLE et al., 1987).



**Abbildung 6:** Die feine fibrilläre Organisation der Chondronkapsel. Während sie am konischen Pol verdichtet ist, weist sie am anderen Pol eine lockerere Anordnung auf. In der Abbildung rechts sind dickere Kollagenfasern über den dicht gelagerten Kollagenfibrillen der Kapseloberfläche zu erkennen. An einem Pol befindet sich ein Auszug (Pfeil). Aus POOLE et al. (1988).

Jede Kapsel zeigt eine klar definierte Orientierung mit einem zur Knorpeloberfläche weisenden artikulären Pol und einem entgegengesetzten basalen Pol. Am basalen Pol der Kapsel ist das Gefüge der Kollagenfibrillen lockerer und ihre Anordnung weniger gerichtet als am artikulären Pol. Die Kollagenfibrillen sind oft nach außen hin

verlängert und mit den radialen Kollagenfasern der territorialen Matrix verwoben (POOLE et al., 1984).

Der artikuläre Pol bildet eine glatte, dichte Kuppel bis über den seitlichen Rand des Komplexes aus Zelle und perizellulärer Matrix (POOLE et al., 1987). Seine feinen Fibrillen sind in konzentrischen Schichten aus transversalen und longitudinalen Fibrillen angeordnet, wobei die querliegenden oft einen konzentrischen Wirbel um die Kapselkuppe bilden. In einigen Fällen formen periodisch gestreifte Kollagenfasern der territorialen Matrix einen zusätzlichen schleifenähnlichen Gürtel außen um die Kapsel herum (POOLE et al., 1984).

Am artikulären Kapselpol der tieferen Knorpelzonen ist häufig ein Kanal anzutreffen, der die perizelluläre und territoriale Matrix miteinander verbindet. Die 0,2 bis 1,8  $\mu\text{m}$  breiten Kanäle befinden sich an der Kapselkuppe und sind immer in Richtung zur Gelenkoberfläche ausgerichtet. Mit Ausnahme einiger kurzer Kanäle sind sie meist lang und kurvig und enthalten oft membrangebundene Matrixvesikel und elektronendichtes Material in ihrem Lumen (POOLE et al., 1984).

Die Wände dieser perizellulären Kanäle werden durch Konvergenz, Verdichtung und Umordnung der Kapselfibrillen gebildet. Bei Belastung kommt es zur Streckung der Kanäle, wodurch sie besser sichtbar werden (POOLE et al., 1984). Dies lässt vermuten, dass unter Belastung Flüssigkeit durch die perizellulären Kanäle aus der perizellulären Matrix wegfliest. Das konstante Verteilungsmuster von Matrixvesikeln innerhalb und direkt außerhalb der Kanäle deutet außerdem auch auf einen Materialfluss von der perizellulären zur territorialen Matrix hin. Möglicherweise erfolgt dies als Antwort auf kleinste Druckgradienten, die während der Druckdeformierung der nicht dehnbaren Kapsel entstehen.

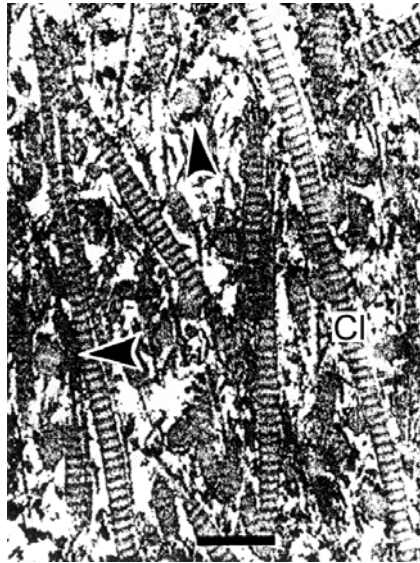
#### **1.2.2.4 Territoriale Region**

Die 5-10  $\mu\text{m}$  dicke territoriale Matrix liegt der perizellulären Kapsel außen direkt an und wird selbst wiederum von der interterritorialen Matrix umgeben (POOLE et al., 1984). Sie besteht aus 0,2–0,8  $\mu\text{m}$  breiten Kollagenfaserbündeln, durchsetzt mit 0,13–1,0  $\mu\text{m}$  breiten Zwischenräumen, in denen sich Proteoglykanaggregate konzentrieren. Die Kollagenbündel werden durch ein Chondroitinsulfat-reiches Gel voneinander getrennt, das den Bündeln das Deformieren und Kollabieren zu einem synchronen Wellenmuster bei Knorpelbelastung erleichtert (POOLE et al., 1984).

Die Kollagenfibrillen nahe der perizellulären Matrix scheinen an dieser zu haften. Die weiter von ihr entfernt gelegenen Kollagenfibrillen hingegen kreuzen sich in verschiedenen Winkeln und bilden ein Geflecht, das als mechanischer Gewebeschutz während Belastung und Deformation dient (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Zusammen mit den GAGs bilden die Kollagenfasern eine dichte korbähnliche Struktur um die Chondrozyten und vervollständigen somit deren mechanischen Schutz (MODIS et al., 1996). Im Vergleich zur interterritorialen Matrix enthält die territoriale Matrix eine größere Zahl an intakten Matrixvesikeln, jedoch kein elektronendichtes Material. Außerdem sind ihre Kollagenfasern dünner und weniger dicht gelagert (POOLE et al., 1987). Auf diese Weise kommt es an der Grenze zwischen territorialer und interterritorialer Matrix zu einem unvermittelten Anstieg des Durchmessers der Kollagenfasern und ihre korbähnliche Anordnung wechselt zugunsten einer eher parallelen (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Im reifen Gelenkknorpel üben die Chondrozyten eine sehr aktive metabolische Kontrolle über ihre territoriale Matrix aus, während ihr Einfluss auf die interterritoriale Matrix geringer ist. Diese scheint metabolisch eher inert zu sein.

#### **1.2.2.5 Interterritoriale Region**

Das größte und von den Chondrozyten am weitesten entfernt liegende Kompartiment ist die interterritoriale Matrix (AIGNER und STÖVE, 2003; KUETTNER, 1992). Sie enthält die meisten Proteoglykane und Kollagenfibrillen, die in dieser Matrixregion zugleich den größten Durchmesser und die größte Dichte aufweisen (KUETTNER, 1992; POOLE et al., 1984). Auf supramolekularer Ebene besteht die interterritoriale Matrix aus zwei Hauptkomponenten: der fibrillären und der extrafibrillären Matrix. Letztere setzt sich hauptsächlich aus Aggrekanaggregaten, aber auch aus kleinen Proteoglykanen, Knorpelmatrixproteinen und anderen zum Teil noch unbekannten Bestandteilen zusammen (AIGNER und STÖVE, 2003). Beim fibrillären Anteil handelt es sich um ein Netzwerk aus den Kollagenen II, IX, XI und XVI. Die Kollagenfibrillen der interterritorialen Matrix verlaufen in der oberflächlichen Zone parallel, in der Übergangszone eher schräg und in der radiären Zone senkrecht zur Gelenkoberfläche (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; MODIS et al., 1996).



**Abbildung 7:** Interterritoriale Matrix mit dicken, dicht gelagerten Kollagenfasern (CI) umgeben von amorphem, elektronendichtem Material (Pfeile). Aus POOLE et al. (1987).

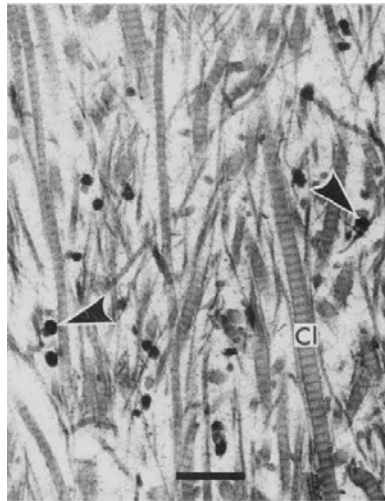
Außerdem enthält die interterritoriale Matrix große Mengen eines amorphen, elektronendichten Materials, das fast ausschließlich mit den Kollagenfasern verbunden ist. Die Konzentration dieses Materials, das in der Oberflächenzone vollkommen fehlt, steigt mit zunehmender Knorpeltiefe. Es ummantelt bestimmte Kollagenfasern, die dann fragmentiert oder der Länge nach gespalten erscheinen. Bei stärkerer Vergrößerung unter dem Elektronenmikroskop hat das Material ein getupftes granuläres Aussehen und ist durch Dekalzifizierung nicht entfernbar (POOLE et al., 1984). Gelegentlich sind Matrixvesikel mit diesem Material verbunden, oder es scheint aus Matrixvesikeln auszuströmen und benachbarte Kollagenfasern zu umgeben (POOLE et al., 1987).

Durch den hohen Gehalt der interterritorialen Matrix an Keratansulfat wird eine zentrifugale Bewegung von Material aus der territorialen Matrix bei Kompression eingeschränkt und somit der Widerstand gegenüber druckbedingter Deformation und lateralem Materialfluss erhöht (POOLE et al., 1984).

### 1.2.3 Matrixvesikel

Bei den Matrixvesikeln handelt es sich um membranumschlossene Mikrostrukturen, die von der Plasmamembran der Chondrozyten freigesetzt werden (D'ANGELO et al., 2001). Ihre Verteilung, Konzentration, Größe, Form, Inhalt und Elektronendichte variieren vor allem abhängig von der jeweiligen Knorpeltiefe (POOLE et al., 1987). In den oberflächlichen Knorpelschichten befinden sich die Vesikel ausschließlich in der

Peripherie der perizellulären Matrix, während sie in den mittleren und tiefen Knorpelschichten eher in der territorialen und interterritorialen Matrix verteilt sind (POOLE et al., 1984). Die äußere Oberfläche der Matrixvesikel ist mit extrazellulären Matrixbestandteilen, wie Aggrekanen, Bindungsproteinen und Kollagenen vom Typ II und X verbunden (D'ANGELO et al., 2001).



**Abbildung 8:** Territoriale Matrix mit locker angeordneten dicken und dünnen Kollagenfasern (CI) sowie Matrix Vesikeln (Pfeile). Balken = 0,5  $\mu\text{m}$ . Aus POOLE et al. (1987).

Im Gegensatz zu den glatten, runderen Matrixvesikeln der perizellulären und territorialen Matrix, sind die im perizellulären Kapselgewebe eingebetteten Matrixvesikel oft unregelmäßig deformiert, da sie sich hier häufig innerhalb der Kapselporen befinden (POOLE et al., 1987). Der Durchmesser der Vesikel beträgt zwischen 70 und 920 nm (POOLE et al., 1984). Auch der Inhalt der Matrixvesikel scheint beträchtlich zu variieren. So sind einige einheitlich elektronendicht, andere enthalten kleinere membrangebundene Vesikel, elektronendichte Granula oder elektronendichtes Material, das teilweise Hydroxylapatit-Kristallen ähnelt (POOLE et al., 1984). Die Matrixvesikel enthalten verschiedene Proteine, inklusive Annexin II, V und VI, sowie die Metalloproteinasen MMP-2, -9 und -13, den Transforming Growth Factor $\beta$  (TGF $\beta$ ) und alkalische Phosphatasen. Diese Bestandteile deuten bereits auf die äußerst wichtige Rolle der Matrixvesikel bei der Einleitung der Knorpelmineralisierung hin (D'ANGELO et al., 2001). Während die Vesikel nahe der Tidemark in den Kalzifizierungsprozess mit einbezogen sind, liegen sie im übrigen Gelenkknorpel eventuell in inaktiver Form vor und nutzen ihr Kalzifikationspotential

nur unter besonderen Bedingungen, wie zum Beispiel Knorpelverletzungen, chirurgischen Manipulationen oder Verpflanzungen (POOLE et al., 1984 und 1987). Im Rahmen der physiologischen Mineralisierung der Wachstumsplatten wandeln die intraluminalen alkalischen Phosphatasen organische Phosphate in anorganische um. Die Annexine wiederum, bei denen es sich um  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-bildende Proteine handelt, ermöglichen den Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Vesikel. Auf diese Weise beginnt die intraluminale Bildung und das Wachstum der ersten Kristalle. Erreichen diese Kristalle eine bestimmte Größe, zerreißen sie die Membran und wachsen in der extrazellulären Matrix der Wachstumsplatte weiter (D'ANGELO et al., 2001; MOLLENHAUER et al., 1999).

Der in den Vesikeln lokalisierte TGF $\beta$  kommt sowohl in aktiver als auch inaktiver Form vor, wobei letztere durch MMP-13 aktiviert werden kann. Aktiver TGF $\beta$  ist ein wichtiger Faktor bei der Einleitung der Osteoblastendifferenzierung in der hypertrophischen Wachstumsplatte des mineralisierenden Knorpels und damit beim Ersatz des Knorpels durch den Knochen (D'ANGELO et al., 2001).

Bei Knorpelkompression kommt es zur lateralen Deformation des Chondrons und zum Fluss von Flüssigkeit und Matrixvesikeln aus der perizellulären in die territoriale und interterritoriale Matrix. Dieser Fluss erfolgt sowohl durch die Poren des Kapselgewebes, als auch durch die perizellulären Kanäle. Zum einen wird auf diese Weise die Kompression gedämpft und der Chondrozyt hydraulisch geschützt. Zum anderen können die Matrixvesikel mitsamt ihrem Inhalt, wie zum Beispiel biochemischen Systemen, zu ihrem von der Zelle entfernt liegenden Wirkungsort gepresst werden. So kann der innerhalb von perizellulärer Matrix und Kapsel gefangene Chondrozyt die weiter entfernt gelegene Matrix homöostatisch kontrollieren. Einige der Matrixvesikel könnten beispielsweise den Verteilungsmechanismus für Keratansulfat zur interterritorialen Matrix darstellen, in der es hochkonzentriert vorkommt (POOLE et al., 1984). Manche der Matrixvesikel scheinen auch zu bersten und ihren Inhalt in die Matrix zu entleeren, da hier oft ähnliches Material an den Kollagenfasern anzutreffen ist (POOLE et al., 1984 und 1987).

## **1.2.4 Bestandteile der Matrix**

### **1.2.4.1 Gewebeflüssigkeit**

Der Wasseranteil im Gelenkknorpel ist mit 60-80% des Feuchtgewichts sehr hoch (AIGNER und STÖVE, 2003; AP GWYNN et al., 2002; VANWANSEELE et al., 2002). Der Großteil davon ist im intermolekularen Raum anzutreffen und kann sich frei ins und aus dem Gewebe bewegen, etwa 30% sind an Kollagenfibrillen gebunden und ein geringer Anteil befindet sich intrazellulär (MOW et al., 1984).

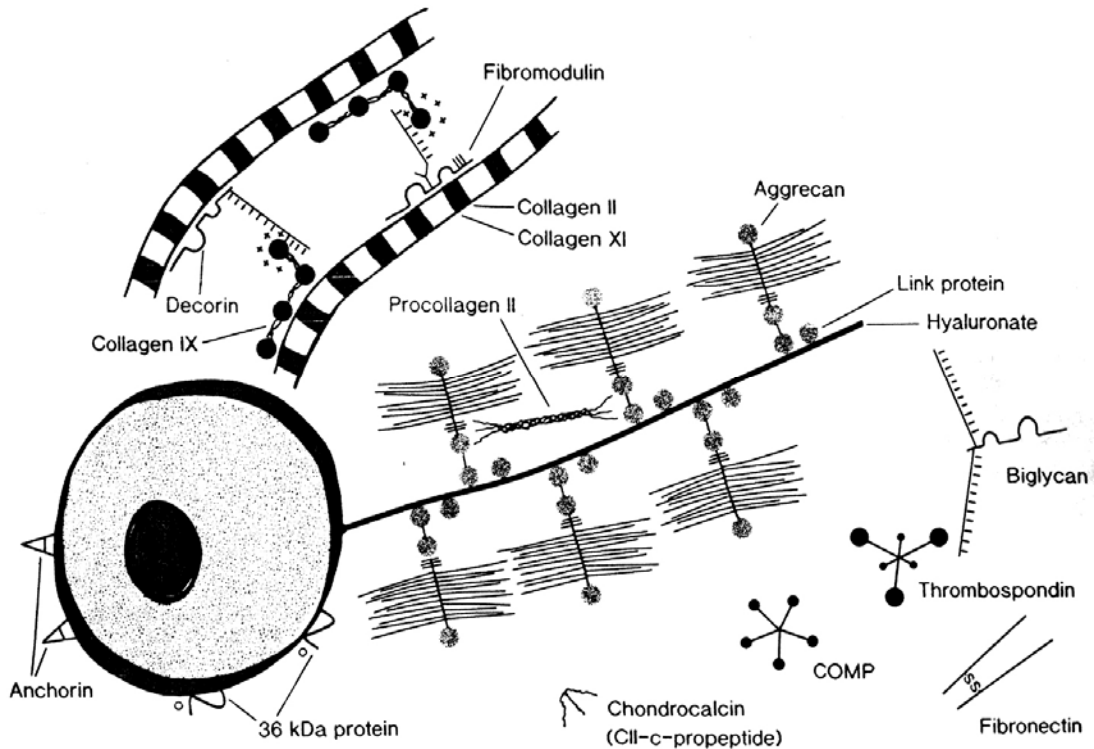
Die Flüssigkeit enthält Gase, kleine Proteine, anorganische Salze, Lipide, Metabolite, Nährstoffe und Elektrolyte (HALL et al., 2003; VANWANSEELE et al., 2002) mit einer hohen Konzentration an Kationen, die die negative Ladung der Proteoglykane ausgleichen. Die Konzentration der mobilen Kationen ist, verglichen mit der Synovialflüssigkeit, deutlich höher (z. B.  $\text{Na}^+$  ~280 mmol/l), die der Anionen hingegen geringer ( $\text{Cl}^-$  ~70 mmol/l) (HALL et al., 1996). Die daraus resultierende Osmolarität des Gelenkknorpels liegt zwischen 350 und 450 mOsm, die der Synovialflüssigkeit bei ~300 mOsm. Der genaue Wert hängt jedoch von der vorherrschenden GAG-Konzentration ab (HALL et al., 2003).

Durch die physikalischen Eigenschaften der Makromoleküle, besonders die der großen aggregierenden Proteoglykane, wird die Flüssigkeit mit den darin gelösten Elektrolyten in der Matrix festgehalten (KUETTNER, 1992). Auf diese Weise werden osmotische Eigenschaften, Ionenzusammensetzung, sowie Volumen und Verhalten der Interstitialflüssigkeit innerhalb des Knorpels mitbestimmt (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; HALL et al., 2003).

### **1.2.4.2 Makromoleküle**

Es gibt drei große Gruppen von Makromolekülen, die zusammen etwa 20-40% des Knorpelgewichts ausmachen (BUCKWALTER et al., 1990; WOLF et al., 2003). Den größten Anteil davon bilden die Kollagene mit bis zu 60% der Trockenmasse, gefolgt von den Proteoglykanen mit 25-35% (AP GWYNN et al., 2002; BUCKWALTER und MANKIN, 1997) und den nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen mit 15-20% (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). LOHMANDER (1988) hingegen gibt bezüglich der Trockenmasse folgende Werte an: 70% Kollagene (hauptsächlich Typ II), 20% Proteoglykane und 10% andere Proteine. DIJKGRAAF et al. (1995) geben den Anteil der Glykoproteine an der Trockenmasse mit 5-15% an. Diese anteiligen

Unterschiede basieren auf der Abhängigkeit der biochemischen Bestandteile von Spezies, Alter des Individuums, Gelenk und Lokalisation innerhalb von Gelenk und Knorpel (WILLIAMSON et al., 2001).



**Abbildung 9:** Schema der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix und ihrer Wechselwirkungen. Aus KUETTNER (1992).

Die Proteoglykane formen eine Matrix, in der die Kollagenfibrillen in spezifischen Mustern, je nach Position zur Gelenkoberfläche, eingebettet sind (HARRIS et al., 1972). Einige der nicht-kollagenen Proteine und Proteoglykane, die sich teilweise an das kollagene Netz binden, stabilisieren das makromolekulare Gerüst der Matrix mit, andere helfen den Chondrozyten sich an Makromoleküle zu binden (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Die physikalischen Eigenschaften des Gelenkknorpels, also seine Fähigkeit sich bei Kompression zu deformieren, beruhen unter anderem auf den Wechselwirkungen zwischen der Extrazellulärflüssigkeit und seinen extrazellulären Komponenten, hauptsächlich Kollagenen und Proteoglykanen (HARRIS et al., 1972; MAUCK et al., 2003).

#### 1.2.4.2.1 Kollagene

##### 1.2.4.2.1.1 Allgemeines

Bei den Kollagenen handelt es sich um extrazelluläre Proteine, die in Knorpel und vielen anderen Körpergeweben vorkommen. Von den bisher 26 bekannten genetisch unterschiedlichen Kollagentypen sind im Gelenkknorpel die Kollagene II, VI, IX, X und XI (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; GELSE et al., 2003), sowie I, III (TESHIMA et al., 2004; WACHSMUTH et al., 2006), V (WACHSMUTH et al., 2006), Kollagen XVI (KASSNER et al., 2003 und 2004), XII und XIV anzutreffen (EYRE, 2002).

Die Kollagene stellen den Hauptbestandteil der Knorpelproteine dar (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994; GELSE et al., 2003) und machen etwa zwei Drittel des Trockengewichts reifen Gelenkknorpels (AP GWYNN et al., 2002; EYRE, 2002) beziehungsweise 10-20% des Feuchtgewichts aus (KUETTNER, 1992). Sie werden von den Chondrozyten synthetisiert, wobei eine Zelle gleichzeitig verschiedene Kollagentypen, zum Beispiel Kollagen II und IX, bilden kann (RUGGIERO et al., 1993).

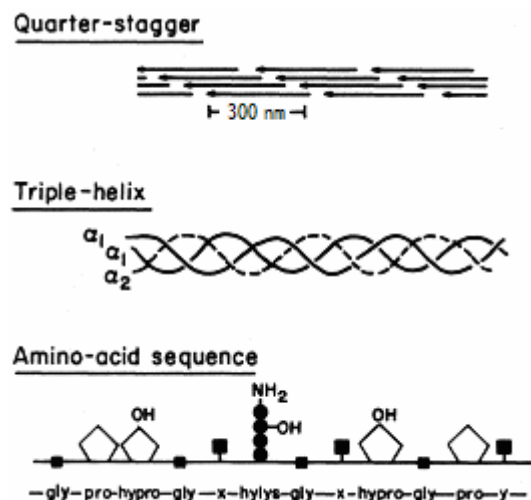
Die unlöslichen Kollagenfasern der verschiedenen Kollagentypen bilden miteinander ein dreidimensionales Netz (EYRE, 1991), das die Chondrozyten schützt, lösliche Komponenten wie Proteoglykane und Glykoproteine in sich gefangen oder chemisch gebunden hält und den Gelenkknorpel am subchondralen Knochen verankert. Es verleiht dem Gelenkknorpel seine Form, Viskoelastizität und extreme Zugfestigkeit (DIJKGRAAF et al., 1995; KUETTNER, 1992). Zur Veranschaulichung der außerordentlichen Zugfestigkeit der Kollagenfasern dient folgendes Beispiel: Bei einem Faserdurchmesser von 1 mm benötigt man zwischen 10 und 40 kg Last (125-500 MPa), um die Faser zu zerreißen (PETRIDES, 1990). Auch bezüglich der Knorpelform sind die Kollagene von überaus großer Bedeutung. So sind sie selbst bei enzymatischer Zerstörung der Proteoglykane dazu fähig, Wasser zu binden und die normale Knorpelform und -größe aufrechtzuerhalten. Bei Inkubation des Gelenkknorpels mit Kollagenase hingegen nimmt die Knorpeldicke ab (HARRIS et al., 1972).

##### 1.2.4.2.1.2 Aufbau der Kollagenmoleküle

Alle Kollagenmoleküle bestehen aus drei jeweils etwa 1050 Aminosäuren langen Polypeptidketten ( $\alpha$ -Ketten). Ihre Primärstruktur besteht im Hauptkollagentyp II über fast die gesamte Länge der Polypeptidkette, in den anderen Knorpelkollagentypen

nur in einzelnen Molekülbereichen aus der charakteristischen Prolin-reichen Tripeptidsequenz Gly-X-Y. Bei X handelt es sich meist um die Aminosäure Prolin und bei Y oft um Hydroxyprolin (GELSE et al., 2003; MUIR, 1995). Der Anteil am Gesamtaminosäuregehalt eines Kollagenmoleküls beträgt nämlich für Glycin 33,5%, für Prolin 12% und für Hydroxyprolin 10% (PETRIDES, 1990). Diese Dreiersequenz ist für die Bildung der für Kollagene typischen trimeren Tripelhelix verantwortlich.

Die einzelnen Polypeptidketten stellen die Sekundärstruktur der Kollagene dar. Sie bilden jeweils eine linksgedrehte Helix, bestehend aus 18 Aminosäuren pro Drehung. Die drei Polypeptidketten eines Kollagenmoleküls wiederum sind um eine zentrale Achse zu einer rechtgewundenen Helix verdrillt und bilden so die seilähnliche Tertiärstruktur, genannt Tripelhelix (GELSE et al., 2003; MUIR, 1995). Eine Windungstour der Tripelhelix beträgt 8,6 nm (PETRIDES, 1990).



**Abbildung 10:** Struktur der Kollagene. Aus LANE und WEISS (1975).

Der Glycinrest an jeder dritten Stelle der Polypeptidketten ist eine der strukturellen Voraussetzungen für die Anordnung zur Tripelhelix. Glycin ist nämlich die kleinste proteinogene Aminosäure. Daher befinden sich die Glycinreste alle im gedrängten Zentrum der Tripelhelix und die größeren Seitenketten der anderen Aminosäuren in den äußeren Positionen. Auf diese Weise wird eine möglichst große Verdichtung entlang der zentralen Molekülachse erreicht. Außerdem kann die Aminogruppe des Glycin im Zentrum Wasserstoffbrückenbindungen mit Ketogruppen der

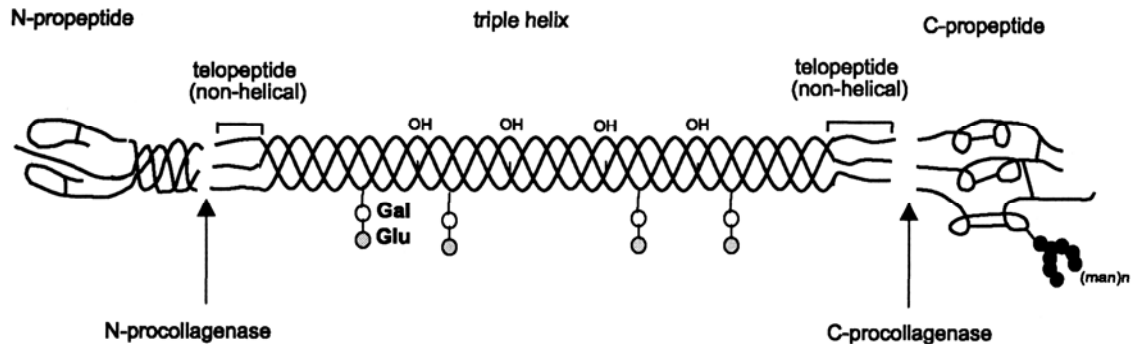
Peptidbindungen anderer Ketten eingehen und auf diese Weise die Tripelhelix stabilisieren (GELSE et al., 2003; MUIR, 1995).

Auch die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin in den Positionen X und Y tragen zur Stabilisierung der Tripelhelix bei: Da das Stickstoffatom von Prolin in einem Ring fixiert ist, schränkt es die Rotation der Polypeptidkette ein. Außerdem sorgt die Ketogruppe des Prolin in dieser Position für eine ungewöhnlich starke elektronegative Gruppe und bildet deshalb eine besonders starke Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminogruppe von Glycin in einer der beiden anderen Ketten aus (PETRIDES, 1990). Hydroxyprolin schränkt die Drehung der Polypeptidketten noch weiter ein (GELSE et al., 2003). Auch Lysin und Hydroxylysin, eine essentielle kollagenspezifische Aminosäure, sorgen für Querverbindungen zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen und damit für deren Stabilisierung (MUIR, 1995).

Die Tripelhelix kann aus drei identischen Ketten (Homotrimere), wie bei Kollagen II und X, oder aus zwei oder mehr verschiedenen Ketten (Heterotrimere), wie bei Kollagen VI, IX und XI, gebildet werden (GELSE et al., 2003). In den fibrillenbildenden Kollagenmolekülen vom Typ II sind die drei Polypeptidketten in ihrer Gesamtlänge zu einer 300 nm langen Helix verdreht, bei den anderen Knorpelkollagentypen sind diese Bereiche deutlich kürzer oder enthalten nicht-helikale Unterbrechungen (GELSE et al., 2003; MUIR, 1995). So besteht der tripelhelikale Teil bei Kollagen VI aus 200 Aminosäuren und bei Kollagen X aus 460 Aminosäuren. Die nicht-kollagenen Domänen der verschiedenen Kollagentypen unterscheiden sich strukturell und funktionell stärker als die jeweiligen helikalen Regionen (GELSE et al., 2003).

Obwohl die Tripelhelix die Schlüsselerscheinung der Kollagene ist, sind auch die aus 16 bis 25 Aminosäuren bestehenden (PETRIDES, 1990) nicht-helikalen Telopeptide strukturell bedeutsam. Diese begrenzen den zentralen helikalen Teil sowohl am Amino- als auch am Carboxylende und sind an den kovalenten Querverbindungen der Kollagenmoleküle miteinander sowie an der Verbindung mit anderen Molekülen der umgebenden Matrix beteiligt. Aber auch die beide Enden flankierenden nicht-kollagenen Domänen (genannt N-Propeptid und C-Propeptid) sind nicht funktionslos. So scheint das N-Propeptid bei der Regulierung des primären Fibrillendurchmessers

mitzuwirken, wohingegen das C-Propeptid vermutlich eine entscheidende Rolle in der Einleitung der Bildung der Tripelhelix spielt (GELSE et al., 2003).



**Abbildung 11:** Molekülstruktur fibrillärer Kollagene mit ihren verschiedenen Subdomänen und Spaltungsstellen für N- und C-Prokollagenasen (hier anhand eines Typ-I-Kollagen Moleküls). Aus GELSE et al. (2003).

#### 1.2.4.2.1.3 Kollagen-Typen

Die verschiedenen Kollagentypen kommen im Gelenkknorpel in folgendem Mengenverhältnis vor:

Kollagen II	85-95% des Gesamtkollagengehalts (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; BUCKWALTER und MANKIN, 1997; EYRE et al., 2002; HALL et al., 2003; HORIKAWA et al., 2004)
Kollagen XI	3% (TRIPPEL, 1990)
Kollagen IX	1-2% (HAGG et al., 1998; KUETTNER, 1992)
Kollagen VI	1-2% (EYRE, 2002; HORIKAWA et al., 2004; MAYNE, 1989)

In noch geringeren Mengen sind die Kollagene

I	(GREGORY et al., 2001; TESHIMA et al., 2004; WACHSMUTH et al., 2006),
III	(EYRE, 2002; TESHIMA et al., 2004; WACHSMUTH et al., 2006; YOUNG et al., 2000),
V	(GREGORY et al., 2001; WACHSMUTH et al., 2006),
XII, XIV	(EYRE, 2002; WATT et al., 1992) und
XVI	(KASSNER et al., 2003 und 2004; LAI und CHU, 1996) im Gelenkknorpel anzutreffen.
X	(GELSE et al., 2003; EYRE, 2002)

Von diesen Kollagentypen sind die Kollagene II, IX und XI zwar typisch für Knorpel, keineswegs aber spezifisch (EIKENBERRY et al., 1992; GELSE et al., 2003).

**Tab. 1:** Die verschiedenen Kollagentypen und ihre Zugehörigkeit zu den Hauptkollagenfamilien. Aus GELSE et al. (2003) abgeändert nach den Angaben von GREGORY et al. (2001) und WACHSMUTH et al. (2006)

<b>Kollagentyp</b>	<b>Molekülzusammensetzung</b>
<i>Fibrillenbildende Kollagene</i>	
Kollagen I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$
Kollagen II	$[\alpha 1(II)]_3$
Kollagen III	$[\alpha 1(III)]_3$
Kollagen XI	$(1\alpha 2\alpha 3\alpha), \alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$
Kollagen V	$\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$
<i>Mikrofibrilläres Kollagen</i>	
Kollagen VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$
<i>FACIT Kollagene</i>	
Kollagen IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$
Kollagen XII	$[\alpha 1(XII)]_3$
Kollagen XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$
Kollagen XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$
<i>Hexagonale Netze bildende Kollagene</i>	
Kollagen X	$[\alpha 1(X)]_3$
<i>Transmembrane Kollagene</i>	
Kollagen XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$

Die Kollagene II und XI gehören zur Untergruppe der fibrillenbildenden Kollagene und sind strukturell eng verwandt (GELSE et al., 2003; VAN DER REST und GARRONE, 1991), da ihre Gene ursprünglich von einem einzigen Gen abstammen. Fibrillenbildende Kollagene unterscheiden sich hauptsächlich in ihren N-Propeptiden, die alle eine kurze tripelhelikale Domäne und eine N-terminale Region von variabler Größe (7 bis 407 Reste) und Struktur enthalten. Die C-Propeptide hingegen sind bei allen homolog. Zusammen mit den C-Telopeptiden enthalten diese die Information für Kettenselektion, Assoziation und Kernbildung der Tripelhelixformation (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994).

Die fibrillenbildenden Kollagene setzen sich zu speziell ausgerichteten supra-molekularen Aggregaten mit charakteristischer Suprastruktur und Fibrillenordnung (Durchmesser zwischen 25 und 400 nm) zusammen (GELSE et al., 2003).

Die Kollagene IX, XII und XIV gehören zu den sogenannten FACIT-Kollagenen (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices) (EYRE, 2002; GELSE et al., 2003; OLSEN, 1997). Diese bestehen aus verschiedenen kurzen nicht-helikalen Domänen (NC-Domänen), die die helikalen (COL-Domänen) unterbrechen (GELSE et al., 2003; OLSEN et al., 1995; OLSEN, 1995; SHAW und OLSEN, 1991). Durch die Unterbrechungen der Tripelhelix kommt es wahrscheinlich zu erhöhter intramolekularer Flexibilität und zur Möglichkeit spezifischer proteolytischer Spaltungen. Tripelhelikale Strukturen können sonst nämlich nur durch verschiedene Typen spezifischer Kollagenasen abgebaut werden, da sie gegenüber Proteasen wie zum Beispiel Pepsin, Trypsin oder Chymotrypsin sehr widerstandsfähig sind (GELSE et al., 2003)

FACIT-Moleküle weisen Sequenzähnlichkeiten besonders in ihren COL1-Domänen auf. Sie scheinen in der Matrix nicht-kovalent polymerisiert zu sein, an Oberflächen von Kollagenfibrillen aber physikalisch über ihre COL1/NC1-Domänen zu binden (EYRE, 2002).

Lange Zeit war man der Meinung, dass sich die Kollagene I und III ausschließlich an der Gelenkoberfläche von fetalem und neonatalem Knorpel befinden (RUGGIERO et al., 1993). Da diese beiden Kollagentypen in nur sehr geringen Mengen (weniger als 1% des Knorpelvolumens) in reifem Gelenkknorpel vorkommen (TESHIMA et al., 2004), konnten sie bislang nur immunohistochemisch nachgewiesen werden (AIGNER et al., 1993; TESHIMA et al., 2004; WACHSMUTH et al., 2006). Mit bio-chemischen Nachweismethoden hingegen waren sie bisher nicht nachweisbar, da ihr Volumen möglicherweise unterhalb der erkennbaren Menge lag (TESHIMA et al., 2004).

Während sich Kollagen I ausschließlich in der oberflächlichsten Schicht (Lamina splendens) reifen Gelenkknorpels befindet (GREGORY et al., 2001; TESHIMA et al., 2004; WACHSMUTH et al., 2006), ist Kollagen III im gesamten Gelenkknorpel anzutreffen, meist verbunden mit Kollagen II (EYRE, 2002; GREGORY et al., 2001; WACHSMUTH et al., 2006; YOUNG et al., 2000).

Kollagen V befindet sich hauptsächlich in der Übergangs- und radiären Zone des Gelenkknorpels. Ist sein Gehalt in der interterritorialen Matrix hoch, so ist es weder in der perizellulären, noch in der territorialen Matrix anzutreffen. Kommt es jedoch nur in geringen Mengen im interterritorialen Matrixkompartiment vor, befindet sich Kollagen V zusätzlich auch in den anderen beiden Matrixregionen (WACHSMUTH et al., 2006).

Im Folgenden sind die wichtigsten Kollagenfasertypen des Gelenkknorpels detailliert aufgeführt:

#### 1.2.4.2.1.3.1 Kollagen II

Kollagen II ist das dominierende Kollagen im Gelenkknorpel (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; BUCKWALTER und MANKIN, 1997; EYRE et al., 2002; HALL et al., 2003; HORIKAWA et al., 2004). Jedes Molekül dieses fibrillären Kollagens besteht aus einer 300 nm langen Tripelhelix, die sich aus drei identischen  $\alpha 1(\text{II})$ -Polypeptidketten zusammensetzt. Es handelt sich hierbei also um ein Homotrimer. An jedem Kettenende befindet sich zusätzlich ein kurzes Telozeptid (GELSE et al., 2003; KUETTNER, 1992; TRIPPEL, 1990). Die Ketten haben einen hohen Anteil an Hydroxylysin (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; GELSE et al., 2003) sowie Glukosyl- und Galaktosylresten, die Wechselwirkungen mit Proteoglykanen und anderen Matrixbestandteilen vermitteln (GELSE et al., 2003).

Kollagen II wird als Prokollagen-Vorläufer mit zusätzlichen nicht-helikalen Amino- und Carboxylpeptiden synthetisiert und sezerniert, die vor dem Einbau des Moleküls in die Matrix jedoch enzymatisch entfernt werden. Sobald die Kollagenmoleküle die Zellen verlassen haben, formen sie innerhalb der Matrix Fibrillen (KUETTNER, 1992).

Die Zugfestigkeit der Kollagen-II-Fibrillen wird durch kovalente intermolekulare Querverbindungen zwischen den einzelnen Kollagenmolekülen erhöht. Hierfür werden von Hydroxylysinresten 3-Hydroxypyridinium-Verbindungen gebildet (KUETTNER, 1992). Die trivalenten Querverbindungen finden an zwei intermolekularen Stellen statt: Eine verbindet zwei C-Telopectide mit dem Rest 87 und die andere verbindet zwei N-Telopectide mit dem Rest 930 der Tripelhelix (WU und EYRE, 1995). Die Zahl der Querverbindungen steigt mit zunehmendem Alter (KUETTNER, 1992).

Kollagen II bildet, wie bereits erwähnt, auch mit Kollagen IX Querverbindungen. Die feinen Kollagenfibrillen des Typ II stehen aber auch mit den Proteoglykanen in enger

physikalischer Beziehung. Die Wechselwirkungen zwischen ihnen tragen direkt zur Organisation der Matrix und den mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels bei (JEFFERY et al., 1991). Das Netz aus Typ-II-Kollagenfibrillen verleiht dem Knorpel außerdem seine Zugfestigkeit und die Stabilität bei der Einwirkung von Drehkräften (MAYNE, 1989; GELSE et al., 2003). Aber auch für den Erhalt von Volumen und Form des Knorpelgewebes ist dieser Kollagentyp essentiell (KUETTNER, 1992).

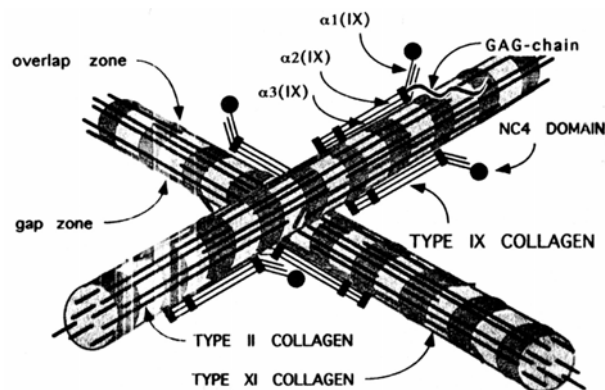
#### 1.2.4.2.1.3.2 Kollagen IX

Bei Kollagen IX handelt es sich um ein Fibrillen assoziiertes Kollagen, das zur Subfamilie der FACITs gehört (GELSE et al., 2003; OLSEN et al., 1995; OLSEN, 1995; SHAW und OLSEN, 1991). Da die Helix mit 150 nm Länge relativ kurz ist, werden diese Kollagene den Kurz-Helix-Molekülen zugeordnet (KUETTNER, 1992). Kollagen IX setzt sich aus den drei genetisch unterschiedlichen Polypeptidketten  $\alpha 1(\text{IX})$ ,  $\alpha 2(\text{IX})$  und  $\alpha 3(\text{IX})$  zusammen (KUETTNER, 1992; PIHLAJAMAA et al., 2004), die eine stangenähnliche Struktur von etwa 190 nm Länge aufweisen (OLSEN, 1997) und ein Heterotrimer im Verhältnis 1:1:1 bilden (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Alle drei Ketten bestehen aus je drei kollagenen Domänen mit tripelhelikalen Sequenzen (COL1, COL2, COL3), die durch vier kurze nicht-kollagene, globuläre Domänen (NC1-4) getrennt und flankiert sind (GELSE et al., 2003; PIHLAJAMAA et al., 2004; WU und EYRE, 1995). Neben dieser im Knorpel ausschließlich vorkommenden langen Form des Kollagen-IX-Moleküls gibt es als Ergebnis alternativer Nutzung zweier Promotoren im  $\alpha 1(\text{IX})$ -Kollagen-Gen auch eine kurze Form, der die große aminoterminal Domäne NC4 fehlt. Letztere kommt im Gelenkknorpel nicht vor (OLSEN, 1997).

Mit Ausnahme der 245 Aminosäurenreste langen, N-terminalen NC4-Domäne der  $\alpha 1(\text{IX})$  Kette, die sich auf bestimmte Weise zusammenfaltet (PIHLAJAMAA et al., 2004) sind die nicht-helikalen Domänen aller Ketten mit weniger als 30 Resten eher kurz (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994; PIHLAJAMAA et al., 2004). So enthält beispielsweise die NC3-Region der Ketten  $\alpha 1(\text{IX})$ ,  $\alpha 2(\text{IX})$  und  $\alpha 3(\text{IX})$  entsprechend 12, 15 und 17 Aminosäurenreste. Sie stellt gleichzeitig die strukturelle Basis für den Knick in dieser Region dar, der bei Typ-IX-Molekülen im Elektronenmikroskop zu erkennen ist (OLSEN, 1997).

Die NC1- und NC3-Domänen aller drei Ketten bilden intramolekulare stabilisierende Disulfidbrücken (PIHLAJAMAA et al., 2004; WU und EYRE, 1984). Die in der NC2- und NC4-Domäne der  $\alpha 1(\text{IX})$  Kette zusätzlich vorhandenen Cysteinreste hingegen können in diese intramolekularen Disulfidbrückenbindungen nicht involviert sein, da sie in den homologen Domänen der anderen Ketten fehlen (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994).

Da in der NC3-Domäne der  $\alpha 2(\text{IX})$  Kette ein Serinrest als Ankerplatz für eine Chondroitinsulfat- oder Dermatansulfatkette dient, kann Kollagen IX auch als Proteoglykan klassifiziert werden. Die GAG-Seitenkette ist im Knorpel jedoch relativ kurz (50 kDa) und nicht alle Kollagen-IX-Moleküle sind glykosyliert (JAY et al., 2001; OLSEN, 1997). Außerdem unterscheidet sich die den Serinrest umgebende Aminosäuresequenz von der anderer Proteoglykane (MUIR, 1995), da sie eher aus Serin-Alanin als aus Serin-Glycin besteht (ROUGHLEY und LEE, 1994).



**Abbildung 12:** Molekülstruktur der Kollagenfibrillen des Knorpels. Die Fibrillen setzen sich aus versetzt angeordneten Kollagen-II- und -XI-Molekülen zusammen. An der Fibrillenoberfläche befinden sich Typ-IX-Moleküle, stabilisiert durch kovalente Querverbindungen mit den Kollagen-II-Molekülen. Aus OLSEN (1997).

Kollagen IX befindet sich an der Oberfläche der heterotypischen Kollagenfibrillen und ist kovalent mit den Kollagen-II- und anderen Kollagen-IX-Molekülen verbunden (PIHLAJAMAA et al., 2004). Seine kompakte globuläre NC4-Domäne ragt, unterstützt von der äußerst stabilen COL3-Domäne, aus dem Fibrillenkörper heraus. Sie dient dort als Interaktionsstelle und makromolekulare Brücke sowohl zwischen benachbarten Fibrillen als auch zwischen Fibrillen und anderen Matrixkomponenten. Zu diesen gehören Proteoglykane (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; DIAB et al., 1996; EYRE et al., 2002; HAGG et al., 1998; PIHLAJAMAA et al., 2004; ROUGHLEY und LEE, 1994), bevorzugterweise HS-Proteoglykane (z. B. Perlekan),

und die nicht-kollagenen Proteine COMP (PIHLAJAMAA et al., 2004) und Matrilin (BUDDE et al., 2005). Besonders die kleinen HS-Proteoglykane, die sich hauptsächlich mit der am äußersten Ende der NC4-Domäne liegenden Heparin-Bindungsstelle verbinden, fungieren als Brücken zwischen den benachbarten Kollagen-IX-enthaltenden Fibrillen. Das erklärt auch die Bedeutung von Kollagen IX bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Kollagennetzes über lange Zeit (PIHLAJAMAA et al., 2004).

Somit trägt Kollagen IX zur Stabilität der Knorpelarchitektur bei (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994), erhöht den Widerstand gegenüber dem Schwellungsdruck der im Kollagennetz befindlichen Proteoglykane und ist daher auch für die kohäsiven und kompressiven Eigenschaften des Knorpels von Bedeutung (OLSEN, 1997). Sobald nämlich die Verbindungsmoleküle des Kollagen IX signifikant verändert werden oder verloren gehen, wie es zum Beispiel bei Osteoarthritis der Fall ist, erfolgt eine Desorganisation des kollagenen Netzwerks und die Veränderung seiner biochemischen Eigenschaften (KUETTNER, 1992). Auch Versuche an transgenen Mäusen mit Defekten in der COL2-Domäne oder inaktivierten  $\alpha 1(\text{IX})$  Allelen führen zu degenerativen Veränderungen des Gelenkknorpels, was vermuten lässt, dass Kollagen IX auch in der Langzeitstabilität des Gelenkknorpels eine Rolle spielt (OLSEN, 1997). Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, Gewebeinhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen und Membranrezeptoren an der Chondrozytenoberfläche spielt Kollagen IX möglicherweise auch eine Rolle in der Knorpelhomöostase (OLSEN, 1997).

Eine weitere Funktion des Kollagen IX ist die Kontrolle des lateralen Fibrillenwachstums (GELSE et al., 2003; TRIPPEL, 1990), da es sich hauptsächlich an der Oberfläche dünner Fibrillen befindet (MAYNE, 1989). In unreifem Knorpel, in dem deutlich mehr dünne Fibrillen vorhanden sind als in reifem Knorpel, beträgt der Gehalt an Kollagen IX beispielsweise fast 10% des Gesamtkollagengehalts. Im Vergleich dazu beträgt der Gehalt an Kollagen IX in maturem Knorpel nur 1 - 2% (HAGG et al., 1998). Die hier in großen Mengen vorkommenden dicken Fibrillen enthalten kein Kollagen IX, jedoch das Proteoglykan Dekorin. Der Gehalt von Kollagen IX und das Vorkommen dünner Kollagenfibrillen korrelieren also miteinander (KASSNER et al., 2003). Im Knorpel von Mastochsen zum Beispiel, der viele dicke Kollagenfibrillen enthält, ist der Anteil von Kollagen IX am Gesamtkollagengehalt sehr gering (MAYNE, 1989) und Studien an Schweineknorpel

zeigen eine Häufung des Kollagens in der perizellulären Umgebung der Chondrozyten, in der die dünnen Fibrillen dominieren (HAGG et al., 1998).

Es ist also möglich, dass die Aufnahme von Kollagen IX an der Fibrillenoberfläche als Kontrolle des lateralen Fibrillenwachstums dient und Verlust oder Abwesenheit von Kollagen IX eventuell zu einer Fibrillenaggregation führen (GELSE et al., 2003; MAYNE, 1989; VAN DER REST, 1991).

#### 1.2.4.2.1.3.3 Kollagen XI

Der Anteil des Kollagen XI am Gesamtkollagengehalt beträgt in reifem Gelenkknorpel etwa 3% (TRIPPEL, 1990), in fetalem Knorpel 10% (WU und EYRE, 1995). Es ist hauptsächlich in der perizellulären Matrix anzutreffen und sein Gehalt steigt mit zunehmender Knorpeltiefe (GREGORY et al., 2001). Wie auch Kollagen II gehört es zur Familie der fibrillenbildenden Kollagene (GELSE et al., 2003; KUETTNER, 1992) und bildet periodisch gestreifte Fibrillen (WU und EYRE, 1995). Zusammen mit den Kollagenen II und IX bildet es gemischte Fibrillen (KUETTNER, 1992). Im Gegensatz zu Kollagen IX befindet es sich jedoch nicht an der Fibrillenoberfläche, sondern in der Tiefe der Fibrillen (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; AIGNER und STÖVE, 2003; GELSE et al., 2003; RUGGIERO et al., 1993). Allerdings ist noch unklar, ob sie im Fibrillenzentrum einen Kern bilden oder unter der Oberfläche der Typ-II-Fibrillen verteilt sind (WU und EYRE, 1995), deren Moleküle sie möglicherweise organisieren (KUETTNER, 1992). Jedenfalls scheinen sie als interfibrilläre Verbindung an der Fibrillenbildung und zusammen mit Kollagen IX an der Limitierung des Fibrillendurchmessers beteiligt zu sein (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; AIGNER und STÖVE, 2003). Kollagen XI befindet sich nämlich sowohl in fetalem als auch in maturem Knorpel hauptsächlich an Fibrillen mit kleinem Durchmesser (GREGORY et al., 2001). Eventuell spielt Kollagen XI auch eine Rolle bei der Gewebeorganisation (KUETTNER, 1992).

Als Heterotrimer besteht Kollagen XI aus den drei genetisch unterschiedlichen Ketten  $\alpha 1(XI)$ ,  $\alpha 2(XI)$  und  $\alpha 3(XI)$  (KUETTNER, 1992), wobei die Ketten  $\alpha 1(XI)$  und  $\alpha 2(XI)$  eng mit den entsprechenden Ketten des Kollagen V verwandt sind (MAYNE, 1989). So stimmt die Sequenz der Ketten  $\alpha 1(XI)$  und  $\alpha 1(V)$  zu 85% überein, die von  $\alpha 1(XI)$  und  $\alpha 3(V)$  zu 70% und die von  $\alpha 1(XI)$  und  $\alpha 2(V)$  zu weniger als 50% (PETIT et al., 1992). Im reifen Gelenkknorpel sind die Ketten  $\alpha 1(XI)$  und  $\alpha 1(V)$  in nahezu gleichen Anteilen im Kollagen XI enthalten. Letztere scheint sogar häufiger in

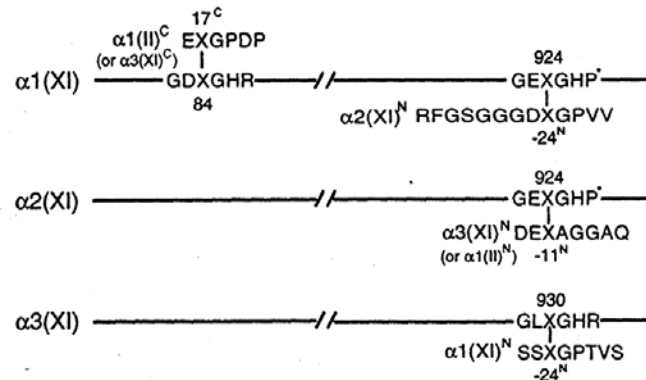
Hybridmolekülen mit  $\alpha 1(XI)$  und/oder  $\alpha 2(XI)$  Ketten vorzukommen als in typischen Kollagen-V-Molekülen (EYRE, 2002). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten sowie des Vorkommens heterotypischer Moleküle sollten diese beiden Kollagene laut PETIT et al. (1992) als Isoformen betrachtet werden.

Bei der  $\alpha 3(XI)$  Kette hingegen handelt es sich um die überglykosylierte Form der  $\alpha 1(II)$  Kette (MAYNE, 1989). Beide Ketten sind Produkt desselben Gens und unterscheiden sich nur im Grad ihrer Glykosylierung und Hydroxylierung (GELSE et al., 2003). Die Primärstruktur von  $\alpha 3(XI)$  und  $\alpha 1(II)B$ , der splicing Variante des Kollagen-II-Gens, ist identisch (EYRE, 2002), zeigt aber Unterschiede bei den Querverbindungen (WU und EYRE, 1995). Wahrscheinlich setzt sich ein Kollagen-XI-Molekül jeweils aus den Ketten  $\alpha 1(XI)$   $\alpha 2(XI)$   $\alpha 1(II)$  zusammen, wodurch ein interaktiver Molekülrand entsteht, der die Inkorporation in die Typ-II-Kollagenfibrillen erleichtert (MAYNE, 1989).

Sowohl  $\alpha 1(XI)$  als auch  $\alpha 2(XI)$  besitzen ein ungewöhnlich großes, nicht-kollagenes globuläres Aminoende (NC 3), das zusammen mit der kollagenen Domäne (COL 2) das N-Propeptid bildet. Jedes N-Propeptid zählt mehr als etwa 25% der Gesamtkettenmasse (GELSE et al., 2003; WU und EYRE, 1995). Die N-Propeptide aller drei Ketten überragen die übrigen Domänen des vierdimensionalen Kollagen-netzes und gehen wahrscheinlich selektive Wechselwirkungen mit anderen Matrixmolekülen ein. Außerdem regulieren sie die intermolekularen Querverbindungen und kontrollieren Zusammensetzung, Wachstum und Durchmesser der Heterofibrillen (GELSE et al., 2003; GREGORY et al., 2000; WU und EYRE, 1995).

Beim Großteil der Bindungen von Kollagen XI handelt es sich um kovalente Bindungen mit anderen Kollagen-XI-Molekülen (EYRE, 2002), was vermuten lässt, dass anfangs eine Bildung von Homopolymeren erfolgt (WU und EYRE, 1995; KUETTNER, 1992). Die Verknüpfung der Kollagen-XI-Moleküle miteinander zu Filamenten erfolgt meist quer in Form von kettenpezifischen Kopf-zu-Schwanz Verbindungen zwischen den N-Telopeptiden und COOH-terminalen Stellen der Tripelhelix benachbarter Moleküle (EYRE, 2002; WU und EYRE, 1995). In der Tripelhelix jeden Moleküls gibt es dafür zwei mögliche Verbindungsstellen, von denen jedoch nur die in der Nähe des COOH-Endes besetzt zu werden scheint. So ist die  $\alpha 1(XI)$  Kette mit dem  $\alpha 2(XI)$  N-Telopeptid verbunden,  $\alpha 2(XI)$  mit dem  $\alpha 3(XI)$  (oder  $\alpha 1(II)$ ) N-Telopeptid und  $\alpha 3(XI)$  mit dem  $\alpha 1(XI)$  N-Telopeptid. Da die letzte

Sequenz der  $\alpha 1(\text{II})$  und  $\alpha 3(\text{XI})$  Kette identisch ist, ist unklar, von welchem Molekül sie abstammt (WU und EYRE, 1995).



**Abbildung 13:** Identifizierung der Querverbindungsstellen innerhalb der tripelhelikalen Domäne boviner Typ-XI-Kollagene. Die Nummerierung der Telopeptid-Reste erfolgt bei den N-Telopeptiden vom Anfang der Tripelhelix aus nach rückwärts und für die C-Telopeptide vorwärts. Aus WU und EYRE (1995).

Nur die  $\alpha 1(\text{XI})$  Kette ist außerdem am Hydroxypyridinium-Rest 84 des Aminoendes der Helix mit einem C-Telopeptid der  $\alpha 1(\text{II})$  (oder  $\alpha 3(\text{XI})$ ) Kette kovalent verbunden (EYRE, 2002; KUETTNER, 1992; WU und EYRE, 1995). Mit Ausnahme der C-Telopeptide dieser beiden Ketten gibt es in den C-Telopeptiden sonst keine querverbindenden Lysine (EYRE, 2002). Die Querverbindungen erfolgen nämlich, wie bei den Kollagenen II und IX, durch einen Lysyl-Oxidase vermittelten Mechanismus (WU und EYRE, 1995). Die querverbindenden Lysine der N-Telopeptide in  $\alpha 1(\text{XI})$ ,  $\alpha 1(\text{V})$  und  $\alpha 2(\text{XI})$  liegen außerhalb der möglichen Spaltungsstellen für Metalloproteinasen, weshalb vermutet wird, dass eine Spaltung die selektive Depolymerisierung von Kollagen XI zur Folge hat (EYRE, 2002).

Kollagen XI besitzt in seinen tripelhelikalen Domänen auch noch Bindungsstellen mit hoher Affinität für Heparan- und Heparinsulfat (VAUGHAN-THOMAS et al., 2001).

#### 1.2.4.2.1.3.4 Kollagen VI

Kollagen VI ist ein mikrofibrilläres Kollagen (GELSE et al., 2003), das im Gelenkknorpel in nur geringen Mengen vorkommt (EYRE, 2002; HORIKAWA et al., 2004; MAYNE, 1989). Es ist zwar auch in juvenilem, jedoch vermehrt in reifem Gelenkknorpel anzutreffen (HAGIWARA et al., 1993).

Kollagen VI gehört zu den Kurz-Helix-Molekülen (HORIKAWA et al., 2004). Die Tripelhelix dieses Heterotrimers wird aus drei verschiedenen Ketten,  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$

und  $\alpha 3(\text{VI})$ , mit je einem Molekulargewicht von 150 KDa, 140 KDa beziehungsweise 260 KDa gebildet. An den Enden der 105 nm langen Tripelhelix befinden sich große globuläre Domänen (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994; GELSE et al., 2003; SÖDER et al., 2002; WIBERG et al., 2003).

Die  $\alpha 3(\text{VI})$  Kette ist aufgrund ihrer besonders großen N- und C-terminalen globulären Domänen fast doppelt so lang wie die beiden anderen Ketten (GELSE et al., 2003). Sie zeigt auch die komplexeste Organisation mit bis zu neun von Willebrand Faktor A-Domänen in der aminoterminalen NC-Region (CHU et al., 1990; WIBERG et al., 2003). In ihrer C-terminalen NC-Region befinden sich zwei ähnliche Domänen. Sowohl die  $\alpha 1(\text{VI})$  als auch die  $\alpha 2(\text{VI})$  Kette besitzen ebenfalls jeweils eine A-Domäne am aminoterminalen Ende der NC-Region und je zwei an ihrer C-terminalen NC-Region. Die  $\alpha 2(\text{VI})$  und  $\alpha 3(\text{VI})$  Ketten kommen abhängig vom alternativen Splicing der A-Domänen in unterschiedlichen Formen vor (SAITTA et al., 1990).

Innerhalb der Chondrozyten lagern sich jeweils zwei Kollagen-VI-Monomere antiparallel zu einer gemeinsamen Helix von 75 nm Länge zusammen und bilden auf diese Weise ein Dimer. Durch parallele Aggregation zweier Dimere wiederum entstehen Tetramere. Die kovalente Verbindung erfolgt durch Disulfidbrücken. Nach ihrer Sekretion in die extrazelluläre Matrix aggregieren die Tetramere zu Filamenten (EYRE, 2002; GELSE et al., 2003; HORIKAWA et al., 2004; SÖDER et al., 2002; WIBERG et al., 2003). Diese werden durch nicht-kovalente Bindungen miteinander und mit anderen Kollagenfibrillen zu einem filamentösen Netz verstrickt (EYRE, 2002; GELSE et al., 2003; HORIKAWA et al., 2004).

In fast allen Bindegewebsregionen des Körpers ist Kollagen VI in Form von feinen Filamenten, Mikrofibrillen oder Segmenten anzutreffen (GELSE et al., 2003; SÖDER et al., 2002). Im Gelenkknorpel wurden bisher nur Segmente und perlschnurartige Filamente gefunden (HAGIWARA et al., 1993). Das perlschnurartige Aussehen der Filamente entsteht durch Aneinanderlagerung der globulären Domänen der Tetramere. Durch die Verdickung in der Region der globulären Domänen wird auch die für Kollagen VI typische schwach sichtbare Querstreifung mit periodischer Länge von 110 nm hervorgerufen (GELSE et al., 2003; HAGIWARA et al., 1993; SÖDER et al., 2002).

Im Gelenkknorpel junger Mäuse sind die Fibrillen des Kollagen VI etwa 12 bis 20 nm dick und verlaufen einzeln und unregelmäßig. In reifem Mäuseknorpel hingegen sind sie zwischen 20 und 50 nm dick und verlaufen meist parallel, wobei teilweise

schmale Bündel aus 3 bis 10 Fibrillen geformt werden. Es gibt aber auch Filamente, die dünner als 10 nm sind und keine Querstreifung aufweisen. Sie verlaufen ohne Knick gestreckt oder gebogen und „anastomosieren“ mit benachbarten Filamenten, wodurch sie ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Ihre Verankerung erfolgt über die globulären Domänen in unklar abgegrenzten Plaques mit einem Durchmesser von 80 bis 170 nm. In einem Plaque sind etwa 20 oder mehr Filamente befestigt. Bisher ist allerdings noch unklar, ob diese Plaques ausschließlich aus den globulären Domänen des Kollagen VI bestehen. Sie sind meist im fibrillenfreien Raum lokalisiert, wo sie mit den Fibrillen der Umgebung in Kontakt treten. Gelegentlich sind sie auch direkt an der Fibrillenoberfläche oder an deren Kreuzungsstellen anzutreffen. Nur selten befinden sie sich oberhalb der strahlenförmig angeordneten Filamente, die von den Plaques wegziehen. Im Knorpel junger Mäuse sind weniger Filamente und Plaques anzutreffen als bei adulten (HAGIWARA et al., 1993).

Die großen globulären Domänen der  $\alpha 3(\text{VI})$  Kette können sich nicht-kovalent an Hyaluronsäure binden und so die Filamente stabilisieren und wahrscheinlich formen (KNUPP und SQUIRE, 2001). Außerdem enthält Kollagen VI auch viele Adhäsionsdomänen für Zellen und andere Matrixkomponenten (EYRE, 2002), wie zum Beispiel Kollagene, Decorin, Biglykan, Fibromodulin, Fibronectin und Matrilin-1 (SÖDER et al., 2002; WIBERG et al., 2003; YOUNG et al., 2005), über die es mit Kollagen II (RUGGIERO et al., 1993) und Aggrekan verbunden ist (YOUNG et al., 2005).

Kollagen VI ist Hauptbestandteil der perizellulären Matrix und fast ausschließlich dort anzutreffen (HORIKAWA et al., 2004; KUETTNER, 1992; SÖDER et al., 2002; WACHSMUTH et al., 2006). Seine Filamente bilden ein feines Netzwerk um die Chondrozyten. Die Verbindung erfolgt über Integrine der Zellmembran, wodurch eine feste Verankerung zwischen Zelloberfläche und perizellulärer Matrix erreicht wird (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; SÖDER et al., 2002). Darüber hinaus bildet Kollagen VI auch eine Verbindung zwischen Chondrozytenoberfläche und dem Kollagen-II-Netzwerk. Es erfolgt also auch eine Verknüpfung von Zelle und territorialer und interterritorialer Matrix (HORIKAWA et al., 2004; SÖDER et al., 2002). Kollagen VI ist also wahrscheinlich an der Verbindung von Matrixstrukturen untereinander und mit den Zellen, an der Verankerung und Signalübermittlung der Zellen sowie an der Stabilisierung fibrillärer Bündel beteiligt (HAGIWARA et al., 1993; HORIKAWA et al., 2004; MARCELINO und McDEVITT, 1995; SÖDER et al., 2002; REINBOTH et al., 2006).

#### 1.2.4.2.1.3.5 Kollagen X

Bei Kollagen X handelt es sich um ein Homotrimer, das ebenfalls zu den Kurz-Helix-Molekülen gehört (MAYNE, 1989). Seine tripelhelikale Domäne ist um mehr als die Hälfte kürzer als die der Typ-II-Kollagenmoleküle (KUETTNER, 1992). Ein Kollagen-X-Molekül besteht aus drei  $\alpha 1(X)$  Ketten mit jeweils einem Molekulargewicht von 59 KDa (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). An jedem Ende der  $\alpha$ -Ketten sitzen nicht-helikale globuläre Domänen (MUIR, 1995). Die C-terminale Domäne ist groß, die N-terminale hingegen klein (GELSE et al., 2003).

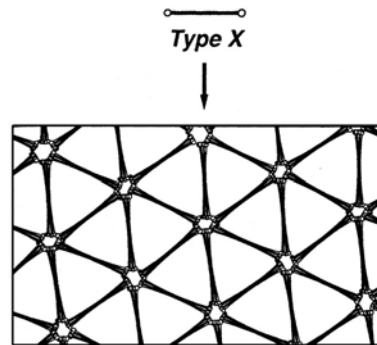
Die tripelhelikale Domäne besteht aus 460 Aminoalkylresten, die acht unvollkommene repetitive Gly-Xaa-Yaa Sequenzen enthalten. Bei zwei dieser Sequenzen vom Typ Gly-Xaa-Yaa-Xaa-Yaa, die nahe der Tripelhelixenden lokalisiert sind, handelt es sich um Spaltungsstellen für die Kollagenase Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) (WELGUS et al., 1990), die zwischen Gly und Xaa spaltet. Die entstehenden Xaa-Reste sind hydrophob. Einer der Reste ist Leu 93, der andere Ile 421. Die N-terminale NC-Domäne ist 34 Reste lang, die C-terminale NC-Domäne 162 Reste.

Die zentrale tripelhelikale Region des Kollagen X ist mit einer Denaturierungstemperatur von 47°C sehr hitzestabil. Die meisten anderen Spaltprodukte der Kollagenase denaturieren bereits bei 43°C. Da das Tripelhelixfragment also bei physiologischen Temperaturen nicht auseinanderfällt, werden für den Abbau von Kollagen X andere kollagenolytische Aktivitäten benötigt (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994).

Kollagen X ist nur in der territorialen Matrix (WACHSMUTH et al., 2006) der kalzifizierten Knorpelzone (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; EYRE, 2002; WACHSMUTH et al., 2006) und im hypertrophischen Knorpel anzutreffen (GELSE et al., 2003; GREGORY et al., 2001; MAYNE, 1989; TRIPPEL, 1990). Man nimmt an, dass es eine Rolle bei enchondraler Ossifikation, Kalzifizierung der Knorpelmatrix (GELSE et al., 2003) und der Entwicklung der Wachstumsplatte spielt (MAYNE, 1989).

Im hypertrophischen Gelenkknorpel erscheint Kollagen X in Form filamentöser Matten, getrennt von den gestreiften Fibrillen, die aus den Kollagenen II, IX und XI gebildet werden. Da die hantelförmigen Kollagen-X-Molekül in vitro ein hexagonales Netz bilden (GELSE et al., 2003; BRUCKNER und VAN DER REST, 1994), könnten die filamentösen Matten ein hexagonales Netzwerk aus aggregiertem Kollagen X

darstellen. Die Knoten dieses Netzes werden durch Kopf-an-Kopf-Verbindungen der carboxyterminalen Domänen der einzelnen Monomere gebildet. Die Verbindung hingegen erfolgt durch die tripelhelikalen Domänen, die seitlich in paralleler und antiparalleler Richtung aggregieren (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994).



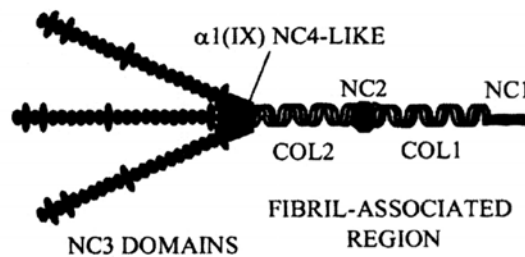
**Abbildung 14:** Supramolekulare Zusammensetzung des Kollagen X. Aus BRUCKNER und VAN DER REST (1994).

Kollagen X ist jedoch auch in nicht-hypertrophischem Knorpel anzutreffen, wo es keine mattenähnliche Struktur ausbildet, sondern ausschließlich mit gestreiften Fibrillen verbunden ist. Auch laut MAYNE (1989) erscheint Kollagen X im Elektronenmikroskop in Gebieten, die reich an Typ-II-Kollagenfibrillen sind und ohne signifikante Akkumulierung in kalzifizierenden Regionen. Bedeutung und molekulare Eigenschaften sind hier jedoch noch unklar (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994).

Die genaue Funktion von Kollagen X ist noch nicht bekannt. Da es jedoch dosisabhängig an Kalzium bindet, kapselt es dieses eventuell ab und setzt es frei, sobald es abgebaut ist. Ob es sich dabei jedoch um seine Hauptfunktion handelt, bleibt abzuklären (MUIR, 1995).

#### 1.2.4.2.1.3.6 Kollagen XII

Kollagen XII gehört zu den FACIT-Kollagenen. Es handelt sich um ein Homotrimer, bestehend aus zwei kurzen (30 kDa) tripelhelikalen kollagenen Domänen (COL1 und COL 2), die von drei nicht-kollagenen Domänen (NC1, NC2, NC3) flankiert werden. Die drei langgestreckten NC3-Domänen vereinnahmen fast 85% des Moleküls und bestehen aus einer  $\alpha 1(\text{IX})$ -NC4-ähnlichen Domäne, sowie aus wiederholenden Fibronektin-Typ III-Wiederholungen und von Willebrand Faktor A Domänen (GREGORY et al., 2001).



**Abbildung 15:** Schema des Typ-XII-Kollagens. Die NC3-Domänen umfassen je eine  $\alpha 1(\text{IX})$  NC4-ähnliche Domäne (Fünfeck), sich wiederholende Fibronektin-Typ III-Wiederholungen (Kreise) und von Willebrand Faktor A Domänen (Ovale). Aus GREGORY et al. (2001).

Alternatives splicing der mRNA führt zur Bildung unterschiedlich langer Varianten der NC1- und NC3-Domänen und damit zur Existenz von vier verschiedenen Kollagen-XII-Isoformen im Knorpel. Bei den Isoformen (XIIA-1, XIIA-2, XIIB-1, XIIB-2) bedeutet A die lange Form der NC3-Domäne, B die kurze; 1 bedeutet die lange Form der NC1-Domäne, 2 deren kurze Form. Da reifer Gelenkknorpel nur die Isoform XIIB-2 enthält, embryonaler jedoch alle vier Isoformen, geht man davon aus, dass es entwicklungsabhängig regulierte Veränderungen im splicing gibt (GREGORY et al., 2001).

Auch die Verteilung von Kollagen XII im Knorpel ist entwicklungsabhängig:

In embryonalem Knorpel ist das Kollagen hauptsächlich an der Gelenkoberfläche bis fast 6 Zellen Knorpeltiefe bei Ratten lokalisiert, wobei der Gehalt mit zunehmender Oberflächenentfernung abnimmt. Postnatal steigt der Kollagen-XII-Gehalt an der Gelenkoberfläche mit zunehmender Knorpelreifung an, während er im darunterliegenden Knorpel deutlich geringer ist. Der sich entwickelnde Knorpel kann auf diese Weise sogar unterteilt werden in eine oberflächliche Zone (bei Ratten bis zu 3 Zellen tief) mit hohem Gehalt an Kollagen XII und geringem Gehalt an Kollagen XI, sowie eine tiefere Zone (bei Ratten Knorpeltiefe Zelle 4 bis 6) mit umgekehrten Mengenverhältnissen. Im muren Knorpelgewebe ist Kollagen XII durch die gesamte Knorpeltiefe des nicht-kalzifizierten Knorpels bis hin zur Tidemark anzutreffen. In der kalzifizierten Knorpelzone hingegen kommt es nicht vor (GREGORY et al., 2001).

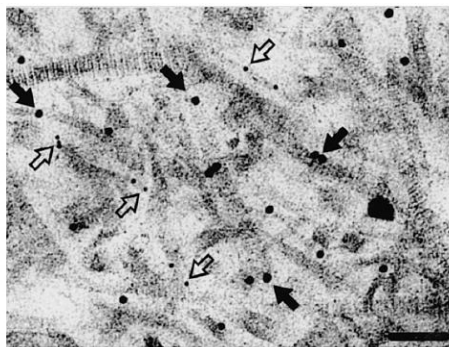
Kollagen XII verteilt sich in Knorpelgebieten mit spezifischer Fibrillenorientierung (z. B. Oberflächenzone) entlang der Kollagen-II-Fibrillen, mit deren Oberfläche es sich auch verbindet. Es wird daher angenommen, dass Kollagen XII die laterale

Anordnung und Stabilisierung dieser Orientierung fördert und auf diese Weise zur Bildung einer belastungsfähigen Matrix beiträgt (GREGORY et al., 2001).

#### 1.2.4.2.1.3.7 Kollagen XVI

Bei Kollagen XVI handelt es sich ebenfalls um ein FACIT-Kollagen, das nur in relativ geringen Mengen im Knorpel anzutreffen ist (KASSNER et al., 2003 und 2004). Jede der 3  $\alpha 1$ -Ketten dieses Homotrimers hat ein Molekulargewicht von 210 kDa. Seine 32 Cysteinreste tragen durch die Bildung von Disulfidbrücken zu einer hohen thermalen Stabilität bei. Es besteht aus 10 kollagenen Domänen und 11 nicht-kollagenen Regionen (NC). Zwei seiner drei N-Glykosylierungsstellen liegen in der aminoterminalen globulären NC11-Region, die aus 313 Aminosäure-Resten besteht. Für die Anlagerung einer GAG-Kette gibt es hingegen keine Hinweise (KASSNER et al., 2004).

Die Form dieses Kollagenmoleküls mit seinen Biegungen und Knicken beruht auf der großen Flexibilität der verschiedenen NC-Domänen, welche die steiferen tripelhelikalen Domänen unterbrechen. Diese Flexibilität führt zu einer Vielzahl räumlicher Konfigurationen und damit zu einem hohen Anpassungsgrad des Kollagens an seine Mikroumgebung. Außerdem repräsentieren die flexiblen NC-Segmente möglicherweise Bindungsstellen mit variabler Verfügbarkeit (KASSNER et al., 2004).



**Abbildung 16:** Doppelmarkierung von Kollagen XVI (große Partikel, schwarze Pfeile) und Kollagen IX (kleine Partikel, weiße Pfeile). Sie befinden sich nicht in Co-Lokalisation miteinander, sondern sind mit verschiedenen D-periodisch gestreiften Fibrillenfragmenten verbunden. Balken = 0,18 $\mu$ m. Aus KASSNER et al. (2003)

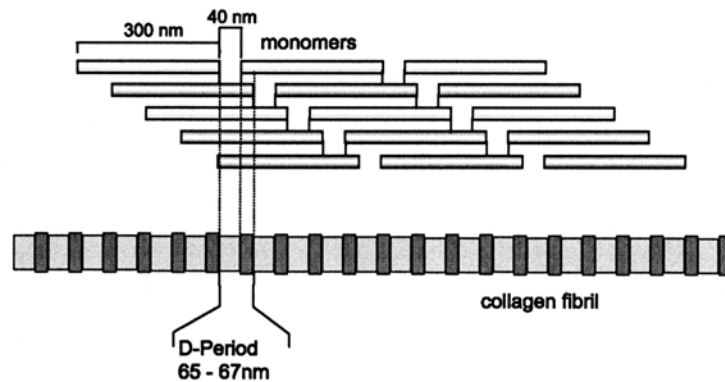
Kollagen XVI befindet sich in den territorialen Matrixregionen an dünnen, heterotypischen, schwach gestreiften Kollagenfibrillen, die auch Kollagen II und XI enthalten. Kollagen IX ist in diesen Fibrillen ebenfalls anzutreffen, jedoch immer

getrennt von Kollagen XVI. Da immer nur entweder Kollagen IX oder XVI mit den Kollagenfibrillen verbunden sind, scheint die territoriale Matrix aus mindestens zwei Subpopulationen dünner Fibrillen mit unterschiedlichen molekularen Zusammensetzungen zu bestehen (KASSNER et al., 2003).

#### 1.2.4.2.1.4 Aufbau der Kollagenfibrillen

Fibrilläres Kollagen stellt die eigentliche biologisch funktionelle Form des Kollagens dar (MUIR, 1995). Die makroskopisch erkennbare Kollagenstruktur ist die Kollagenfaser. Unter dem Lichtmikroskop sind die Kollagenfibrillen und unter dem Elektronenmikroskop die Mikrofibrillen zu erkennen. Diese kleinste Untereinheit der Fasern hat im Knorpel einen Durchmesser zwischen 15 und 25 nm, wobei dieser mit zunehmendem Alter ansteigt (PETRIDES, 1990).

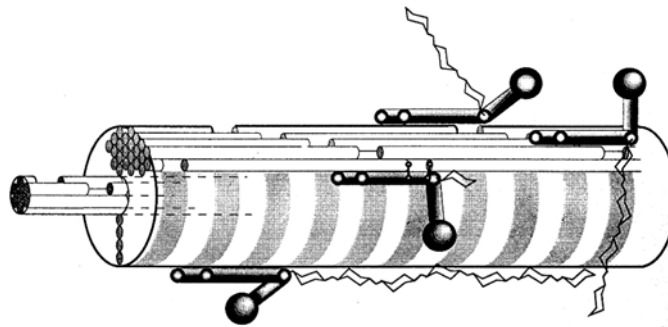
Die Mikrofibrillen setzen sich aus Kollagenmolekülen zusammen, die die Form eines Stäbchens von durchschnittlich 280 nm Länge (GELSE et al., 2003) und etwa 1,4 nm Durchmesser besitzen. Die Kollagenmoleküle, die den typischen Aufbau einer Tripelhelix aufweisen, liegen hintereinandergereiht (PETRIDES, 1990) in antiparalleler Orientierung (MUIR, 1995). Zusätzlich aggregieren sie um jeweils ein Viertel versetzt parallel zueinander. Zwischen den aneinandergrenzenden Enden der Kollagenmoleküle einer Reihe liegt je ein 35 nm großer Spaltraum, der zur charakteristischen Querstreifung der Mikrofibrillen führt. Da die Spalträume der einzelnen Reihen im Vergleich zu den benachbarten Reihen auch jeweils um ein Viertel der Lage des Kollagenmoleküls verschoben sind, entsteht eine gestaffelte Parallelaggregation mit entsprechender Verschiebung der Spalten von Reihe zu Reihe (PETRIDES, 1990). Durch die Länge der Kollagenmoleküle von etwa 280 nm muss aufgrund der Viertelversetzung zwangsläufig eine Periodizität der Querstreifung von etwa 70 nm auftreten, genannt D-Periode. Typischerweise beträgt der Abstand 67 nm (GELSE et al., 2003; PETRIDES, 1990).



**Abbildung 17:** Schema der supramolekularen Zusammensetzung von Kollagenfibrillen in der charakteristischen viertelversetzten Form. Aus GELSE et al. (2003).

Die antiparallele Orientierung der Kollagenmoleküle ermöglicht die Ausbildung von Querverbindungen zwischen verschiedenen Kollagenfibrillen (MUIR, 1995). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität verlaufen die Kollagenfibrillen in paralleler und antiparalleler Richtung zueinander, im Verhältnis etwa 1:1 (HEDLUND et al., 1993). Die interfibrillären Verbindungen erstrecken sich von relativ lockeren Gruppierungen bis hin zu extrem eng verbundenen Fibrillen, die eine Art hochorganisierte chemische Affinität vermuten lassen. Diese Verbindungen dienen einem höheren strukturellen Zweck, zum Beispiel bilden sie aus einer primär radialen Fibrillenordnung in der allgemeinen Knorpelmatrix ein dreidimensional verbundenes Netzwerk, in dem die hydrierte Grundsubstanz gehalten wird (BROOM und MARRA, 1986).

Bei den Kollagenfibrillen des Gelenkknorpels handelt es sich um Heterofibrillen, die sich aus dem dominierenden Kollagen II sowie den Kollagenen IX und XI zusammensetzen (EIKENBERRY et al., 1992; GELSE et al., 2003; RUGGIERO et al., 1993). Primäre Knorpelfibrillen bestehen zu 80% aus Kollagen II und zu jeweils 10% aus Kollagen IX und XI (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Die beiden letzteren limitieren den Durchmesser der Fibrillen auf 15-50 nm (HAGG et al., 1998). Daher ist auch der Anteil dieser beiden Kollagentypen in den perizellulären Bereichen, in denen die dünnsten Fibrillen anzutreffen sind, am höchsten (EYRE, 2002; VAUGHAN-THOMAS et al., 2001). Die Verringerung ihres Anteils bei der Reifung der dünnen, neu entstandenen Fibrillen erfolgt entweder durch Entfernung von Kollagen IX und XI oder/und durch Addition neuer Typ-II-Kollagene (HOLMES et al., 2001).



**Abbildung 18:** Schema der Kollagenanordnung in den Kollagenfibrillen. Das aminoterminal Ende zeigt nach links. Ein Kern aus viertelversetzten Kollagen-XI-Molekülen (dunkel schraffierte Kreise) wird von Kollagen-II-Molekülen ummantelt (hell schraffierte Kreise). Kollagen IX ist mit seinen kugelförmigen NC-Domänen in antiparalleler Richtung an die Fibrillenoberfläche angelagert. Seine aminoterminalen NC4-Domäne ragt hervor. An seiner NC3-Domäne sind Chondroitinsulfat-Ketten variabler Länge angelagert (gezackte Linien). Aus BRUCKNER und VAN DER REST (1994)

Die drei Kollagentypen der heterotypischen Fibrillen sind in typischer D-periodischer Anordnung aneinandergliedert. Dabei bildet Kollagen XI meist den zentralen Fibrillenkern und liegt unter Kollagen II verborgen, wodurch Kollagen XI immunochemisch auch erst nach Verdauung der Fibrillen mit Pepsin darstellbar ist (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Es kann sich jedoch auch außen an Kollagen II befinden (EYRE, 2002). Kollagen II bildet das Rückgrat (EYRE et al., 2002) und gleichzeitig auch die Masse des Fibrillenkörpers und ist für Antikörper bereits in intakten Fibrillen zugänglich (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994).

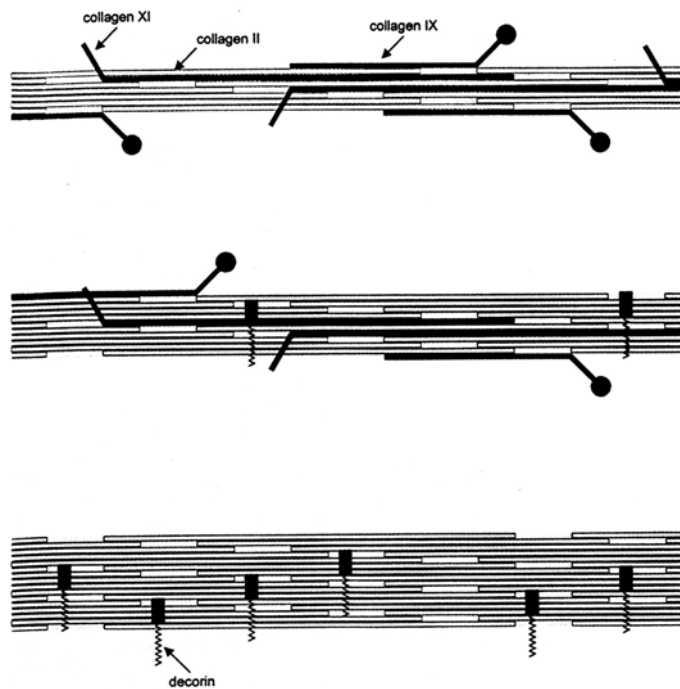
Die Basisstruktur der Kollagenfibrillen besteht aus einem 4-dimensional gestaffelten Polymer von Kollagen-II-Molekülen, die miteinander durch stabile Kopf-zu-Schwanz-Querverbindungen der Hydroxylsypyrindinolin- (HP-) Reste an den beiden Übergangsstellen zwischen Telopeptiden und Helix verbunden sind (EYRE, 2002). Die Kollagen-IX-Moleküle sind periodisch entlang der Oberfläche der Typ-II-Kollagenfibrillen in antiparalleler Richtung angeordnet (AIGNER und STÖVE, 2003; GELSE et al., 2003; OLSEN, 1997; WU und EYRE, 1995). Sie sind hauptsächlich durch intrafibrilläre, von Lysin abstammende Hydroxypyridinium-Querverbindungen zwischen dem Aminoende der Typ-II-Kollagene und dem NC3-Bereich der Typ-IX-Kollagene miteinander verknüpft (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). MAYNE (1989) beschreibt eine trifunktionale Hydroxypyridinium-Querverbindung zwischen den nicht-kollagenen Amino-Telopeptiden von zwei  $\alpha 1(\text{II})$  Ketten und dem Aminoende der COL2-Domäne der  $\alpha 2(\text{IX})$  Kette. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die beiden  $\alpha 1(\text{II})$  Ketten von einem oder zwei getrennten Molekülen abstammen. Wenn sie zu zwei verschiedenen Molekülen gehören, könnten Typ-IX-Kollagene eine

Querverbindung zwischen den Kollagen-II-Molekülen unterschiedlicher Fibrillen darstellen und somit zur Stabilisierung des fibrillären Netzwerks beitragen (MAYNE, 1989).

Hydroxypyridinium-Brücken verbinden jedoch auch Kollagen-IX-Moleküle untereinander (OLSEN, 1997). Diese sind besonders reich an solchen Querverbindungen (MAYNE, 1989; OLSEN, 1997) und ihre Konzentration ist sogar höher als in Kollagen-II-Molekülen.

Kollagen IX geht aber auch kovalente Bindungen mit der Oberfläche der Kollagen-II-Fibrillen ein. Auf diese Weise wird die mechanische Integrität des Netzwerks weiter erhöht und der osmotische Schwellungsdruck der eingeschlossenen Proteoglykane beschränkt (EYRE, 2002). ICHIMURA et al. (2000) berichten von mindestens sechs Querverbindungsstellen pro Kollagen-IX-Molekül, an denen kovalente Bindungen mit Kollagen-II- oder -IX-Molekülen gebildet werden. Bei den Querverbindungsresten handelt es sich entweder um trivalente Pyridinoline oder divalente mit Borohydrid reduzierbare Zwischenstufen (EYRE, 2002).

Durch seine hervorragende Kationen-Domäne NC4 und die GAG-Kette versieht Kollagen IX die Kollagenfibrillen mit einer starken Ladung. Da die extrafibrilläre Matrix zum Großteil aus stark polyanionischen Makromolekülen besteht, ist es vorstellbar, dass die Interaktionen mit den Matrixmolekülen auf elektrostatischen oder anderen hydrophilen Kräften beruhen (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Durch eine solche Verbindung mit den polyanionischen GAG-Ketten der Matrixproteoglykane (GELSE et al., 2003; MAYNE, 1989; BRUCKNER und VAN DER REST, 1994) könnten auch Scherkräfte zwischen den Fibrillen des Kollagenetzes ohne direkte interfibrilläre kovalente Brücken eingeschränkt werden (EYRE, 2002). Außerdem sorgen die hervorstehenden Domänen des Kollagen IX für den interfibrillären Zusammenhalt des kollagenen Netzwerks (AIGNER und STÖVE, 2003; DIAB et al., 1996; EYRE, 2002; ROUGHLEY und LEE, 1994).



**Abbildung 19:** Schema der biochemischen Heterogenität von D-periodischen Fibrillen in reifem Gelenkknorpel. Die dünnsten Fibrillen (17-20 nm) sind reich an Kollagen IX und XI. Bei Fibrillen mittlerer Größe ist der Gehalt an Kollagen IX geringer, zusätzlich kann Dekorin vorkommen. An den dicksten Kollagenfibrillen fehlen Kollagen IX und XI, während Dekorin häufig enthalten ist. Aus HAGG et al. (1998).

An der Fibrillenoberfläche befinden sich außerdem auch die Kollagene XII, XIV (WATT et al., 1992) und XVI. Letzteres besitzt möglicherweise ebenfalls von der Fibrillenoberfläche hervorstehende Domänen, die ein laterales Fibrillenwachstum verhindern. Im Gegensatz zu Kollagen IX besitzen diese Domänen bei Kollagen XVI allerdings keine Ladung (KASSNER et al., 2003). Darüber hinaus sind an der Fibrillenoberfläche auch nicht-kollagene Bestandteile zu finden wie beispielsweise die kleinen Proteoglykane Dekorin und Fibromodulin. Das Proteoglykan Dekorin kommt im Gegensatz zu Kollagen IX hauptsächlich an der Oberfläche dicker Kollagenfibrillen vor (HAGG et al., 1998) und damit vermehrt in maturem Knorpel (KASSNER et al., 2003). Auf diese Weise ist meist entweder nur Kollagen IX oder Dekorin an den Fibrillen anzutreffen. Selten können jedoch auch beide gemeinsam an Fibrillen mittleren Durchmessers vorkommen (HAGG et al., 1998).

Auch diese Makromoleküle der Fibrillenoberfläche vermitteln Wechselwirkungen mit benachbarten Fibrillen und perifibrillären Matrixkomponenten. Durch ihre Rolle in der Kohäsion zwischen Matrix und Fibrillen sind sie wahrscheinlich sowohl an der Organisation makromolekularer Aggregate, als auch an der Bestimmung biomechanischer Eigenschaften des Knorpelgewebes beteiligt (HAGG et al., 1998).

#### 1.2.4.2.1.5 Kollagendurchmesser und –dichte

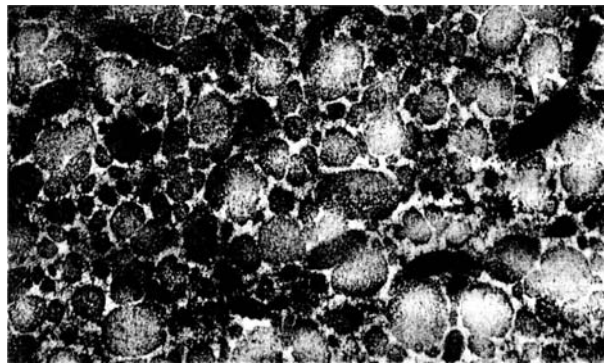
Innerhalb des gesamten Gelenkknorpels variiert der Durchmesser der Kollagenfibrillen zwischen 40 und 640 nm, wobei der Durchschnitt bei 100 bis 350 nm liegt. Außerdem sind in allen Knorpelzonen dünne Fibrillen mit einer Dicke von weniger als 10 nm anzutreffen. Generell weisen die Kollagene jedoch je nach Knorpelzone und Matrixregion Unterschiede bezüglich ihres Durchmessers auf. Während der durchschnittliche Durchmesser der Kollagenfibrillen in den territorialen und interterritorialen Kompartimenten mit zunehmender Entfernung von Gelenkoberfläche und Zellen zunimmt (EYRE, 2002; HEDLUND et al., 1993; HLAVACEEK, 2000; HWANG et al., 1992; MAYNE, 1989), bleibt er in den perizellulären Regionen unabhängig der Knorpeltiefe relativ gleichbleibend dünn (siehe Tabelle 2) (HEDLUND et al., 1993). Auch die Kollagenvolumendichte steigt mit zunehmender Distanz zu Knorpeloberfläche und Zellen an (HEDLUND et al., 1993).

**Tab. 2:** Durchmesser der Kollagenfibrillen des Gelenkknorpels boviner Tarsometatarsalgelenke. (Alle Angaben in nm) Durchschnitt mit Standardabweichung in Klammern (n = 3). Aus HEDLUND et al. (1993).

Zone (nicht kalzifizierter Knorpel)	Kompartiment		
	perizellulär	territorial	Interterritorial
oberflächlicher Teil	12,2 (2,6)	17,1 (3,6)	17,0 (4,2)
Mittelteil	12,4 (2,8)	18,4 (3,7)	32,3 (7,4)
unterer Teil	11,7 (2,7)	21,0 (3,7)	38,0 (8,9)

Die Werte der Kollagendurchmesser in humanem Gelenkknorpel (Humeruskopf, Femurkopf, medialem Tibiaplateau und Metatarsus) unterscheiden sich zwar von denen des bovinen Gelenkknorpels, aber auch hier ist die Tendenz eines steigenden Fibrillendurchmessers mit zunehmender Knorpeltiefe festzustellen: So sind die Fibrillen der Oberflächenzone mit einem Durchmesser von 25-50 nm relativ dünn und zu kompakten Gruppen aus je 5-6 Fibrillen zusammengelagert. Die Kollagenfibrillen der Übergangszone (Zone 2) sind heterogener und weisen einen Durchmesser zwischen 60 und 140 nm auf, während der Fibrillendurchmesser der tiefer liegenden Zone 3 bis zu 160 nm beträgt (HWANG et al., 1992).

In allen Knorpelzonen und Matrixregionen sind dünne und mitteldicke Fibrillen vorzufinden. In den territorialen und interterritorialen Kompartimenten, besonders der mittleren und tieferen Knorpelzone, sind zusätzlich jedoch auch dickere Fibrillen vorhanden. Diese vermitteln den Großteil der Last und sind für die mechanische Festigkeit des Gewebes verantwortlich. Die dünnen Fibrillen hingegen sind für die Elastizität des Knorpels von Bedeutung. Von daher ist die Mischung der unterschiedlich dicken Fibrillen für die mechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels unerlässlich (HEDLUND et al., 1993).



**Abbildung 20:** Der Querschnitt durch die Kollagenfibrillen der radiären Zone bovinen Gelenkknorpels veranschaulicht die Bandbreite des Fibrillendurchmessers im Knorpel. Aus HEDLUND et al. (1993).

ZAMBRANO et al. (1982) konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen Knorpelbelastung und Durchmesser der Kollagenfibrillen feststellen. So enthält Knorpel, der großem Druck ausgesetzt ist, Kollagenfibrillen mit dickerem und variablerem Durchmesser als Knorpel, der nicht so stark belastet wird.

Weiterhin besteht zwischen Alter des Individuums und Durchmesser der Kollagenfasern ein Zusammenhang. Der Faserdurchmesser von Embryonen und heranwachsenden Tieren ist bei allen Spezies gleich und ist mit 17 bis 20 nm relativ gering. Die Fasern älterer Tiere hingegen werden zunehmend dicker. Manche dieser Fasern breiten sich an den Enden mit zahlreichen hervorstehenden 20 nm dicken Fasern fächerförmig aus. Diese Beobachtungen lassen zum einen vermuten, dass die Chondrozyten anfangs nur dünne Fasern bilden, die als primäre Fasern betrachtet werden können. Die breiteren Fasern entstehen dann im extrazellulären Raum durch Fusion der primären Fasern. Zum anderen wird das Dickenwachstum der primären Fasern streng kontrolliert. (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Kollagen-II-Moleküle lagern sich bis zu einem Fibrillendurchmesser von ca. 17 nm

kontinuierlich an. Dadurch entsteht eine Konfiguration, die optimal für die Bindung von Kollagen IX ist, wodurch das weitere Dickenwachstum gehemmt wird.

Außerdem besteht auch ein Zusammenhang zwischen Proteoglykangehalt und Durchmesser der Kollagenfibrillen. Dabei scheinen besonders die Proteoglykanaggregate das Vorkommen dicker Kollagenfibrillen positiv zu beeinflussen: Sowohl der Fibrillendurchmesser, als auch der Proteoglykangehalt nehmen mit zunehmender Knorpeltiefe zu. Außerdem sind Proteoglykangehalt und Kollagenfibrillendicke in fetalem Gelenkknorpel deutlich geringer als in reifem Knorpelgewebe. Auch in degenerativ verändertem Gelenkknorpel, in dem es zu einem Verlust von Proteoglykanen kommt, ist der Gehalt an dicken Kollagenfibrillen deutlich reduziert (CURTIN und REVILLE, 1995). Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt, aber Verknüpfungen und Wechselwirkungen von Proteoglykanen und Kollagenfibrillen sind bereits erwiesen (siehe Kapitel 1.2.4.2.2.3.3 Kleine Proteoglykane, sowie 1.2.4.2.3.4 Weitere nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine).

Mit zunehmender Reife ändert sich jedoch auch die Zusammensetzung der Kollagenfibrillen. So bestehen die dünnen Kollagenfibrillen des jungen, sich noch im Wachstum befindlichen Knorpels aus  $\geq 10\%$  Kollagen IX,  $\geq 10\%$  Kollagen XI und  $\leq 80\%$  Kollagen II. Die dickeren und im Durchmesser stärker variierenden Fibrillen reifen Gelenkknorpels hingegen setzen sich aus  $\sim 1\%$  Kollagen IX,  $\sim 3\%$  Kollagen XI und  $\geq 90\%$  Kollagen II zusammen (EYRE, 2002).

#### 1.2.4.2.2 Proteoglykane

##### 1.2.4.2.2.1 Allgemeines

Proteoglykane sind in allen Körpergeweben intrazellulär, an der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix anzutreffen, wobei Letzteres überwiegt (LOHMANDER, 1988). Es handelt sich um eine Subgruppe von Glykokonjugaten mit großen strukturellen und funktionellen Unterschieden (HARDINGHAM und BAYLISS, 1990; HASCALL, 1988). Als gemeinsames Merkmal bestehen jedoch alle aus einem Kernprotein, an das mindestens eine Glykosaminoglykankette kovalent gebunden ist (WATANABE et al., 1998). Da bei sämtlichen Proteoglykanen die Struktur ihrer Kernproteine sehr ähnlich ist, bilden sie eine gemeinsame Genfamilie (MARGOLIS und MARGOLIS, 1994). Die Genomstruktur weist auch spezieübergreifend (Ratten,

Hühner, Mäuse, Menschen) große Ähnlichkeit auf (DOEGE et al., 1994; LI und SCHWARTZ, 1995; VALHMU et al., 1995; WATANABE et al., 1995).

In der extrazellulären Matrix des hyalinen Gelenkknorpels kommen neben den aggregierenden Proteoglykanen, Aggrekan und Versikan, auch verschiedene kleine, nicht-aggregierende Proteoglykane vor, wie zum Beispiel Dekorin, Biglykan, Fibromodulin, Perlekan und SZP (IOZZO et al., 1994; KNUDSON und KNUDSON, 2001; KRISHNAN et al., 2004; MIOSGE et al., 1994; POOLE et al., 1996; ROUGHLEY und LEE, 1994; ROUGHLEY, 2001b; SCHUMACHER et al., 1999). Die Monomere der verschiedenen Proteoglykane variieren bezüglich Größe, Molekulargewicht und Zusammensetzung. Ihre Größe wird hauptsächlich durch die Länge des Kernproteins, die Zahl der angelagerten Glykosaminoglykanketten und die Durchschnittslänge der Gruppen der Glykosaminoglykanketten bestimmt, wobei Letztere innerhalb eines Monomers kaum variieren.

Die direkte Beziehung zwischen steigendem Molekulargewicht der Monomere und zunehmender Monomerlänge sowie steigender Seitenkettenanzahl zeigt, dass die Variabilität in Größe und Zusammensetzung der Monomere hauptsächlich von der unterschiedlichen Länge der Chondroitinsulfat-reichen Region abhängt. Mit zunehmendem Molekulargewicht und Gehalt an Chondroitinsulfat nimmt der Gehalt an Keratansulfat und Protein ab (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988).

Die Proteoglykane sind für die Kompressibilität und Festigkeit des Gelenkknorpels von entscheidender Bedeutung. Die Komprimierbarkeit des Knorpels kann sogar als Index seines Proteoglykangehalts angesehen werden. Bei enzymatischer Entfernung der Proteoglykane verliert der Gelenkknorpel nämlich an Festigkeit und wird biegsamer. Außerdem wird seine Kapazität, Deformationen zu widerstehen, reduziert (HARRIS et al., 1972).

Ihre besonderen Eigenschaften erhalten die Proteoglykane durch die Glykosaminoglykane mit ihrer großen Anzahl an negativ geladenen Sulfat- und Carboxylgruppen. Auf diese Weise ziehen sie Kationen, wie zum Beispiel Natrium und damit auch Wasser an, und stoßen Anionen, wie zum Beispiel Chlorid, ab (AP GWYNN et al., 2002; BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Dem Schwellungsdruck, der durch die Hydratation der polyanionischen Proteoglykane entsteht, wirkt das Netzwerk der Kollagenfibrillen entgegen, in dem die Proteoglykane sowohl mechanisch als auch biochemisch verankert sind (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; AP GWYNN et al., 2002; DIJKGRAAF et al., 1995; DUDHIA, 2005; HASCALL,

1988; HARDINGHAM und BAYLISS, 1990; MUEHLEMAN et al., 2003; WINDHABER et al., 2003).

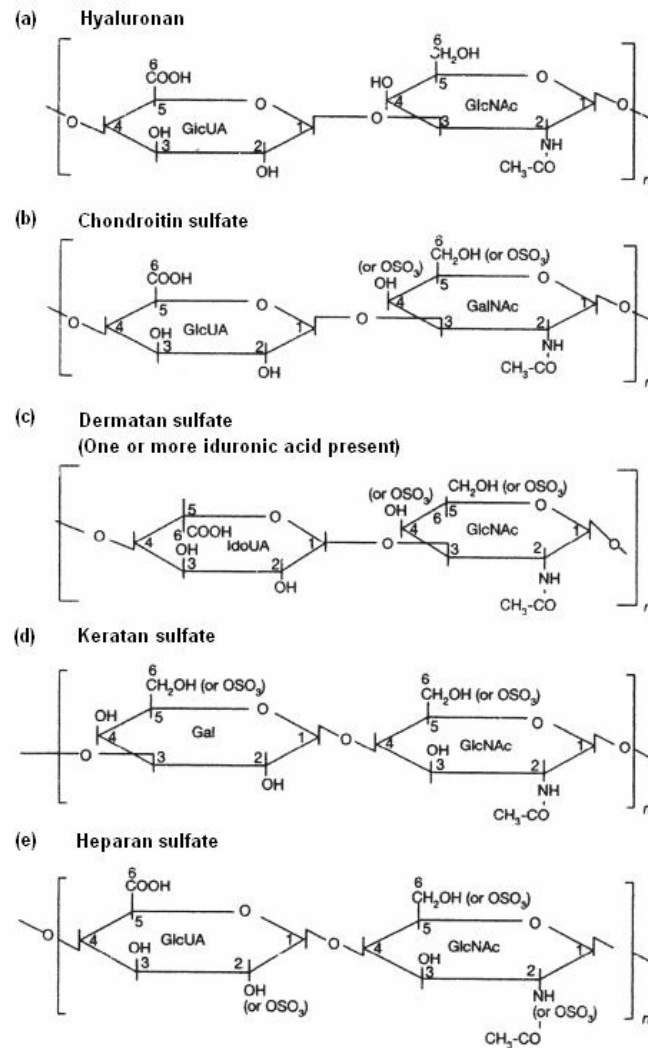
#### 1.2.4.2.2.2 Bestandteile der Proteoglykane

Proteoglykane bestehen zu etwa 80-94% aus Glykosaminoglykanen (GAG) und zu 6-20% aus einem zentralen fadenförmigen Kernprotein (LOHMANDER, 1988). Die Verknüpfung erfolgt O-glykosidisch über die Hydroxylgruppe eines Serinrestes der Polypeptidkette und einen Xyloserest der GAG-Kette (DUDHIA, 2005; LOHMANDER, 1988). Mit Ausnahme von Keratansulfat besteht die Bindungsregion der GAG-Ketten zum Kernprotein aus einem Tetrasaccharid, das zusätzlich zum Xyloserest noch zwei Galaktosereste und eine Uronsäure enthält (DUDHIA, 2005). Die Anzahl der GAG-Ketten, die an ein Akzeptorprotein gebunden werden, ist unterschiedlich und liegt zwischen einer und mehr als hundert, wobei in einem Proteoglykanmolekül verschiedene GAGs nebeneinander vorkommen können (LÖFFLER, 1990).

Generell ist die GAG-Konzentration im Gelenkknorpel an belasteten Stellen höher als in typischerweise unbelasteten Lokalisationen desselben Gelenks. Durch Bewegung kann die Konzentration im Knorpel über einen bestimmten Basiswert hinaus erhöht werden, während sie bei Immobilisierung des Gelenks schnell abnimmt (RICHARDSON und CLARK, 1991).

##### 1.2.4.2.2.2.1 Glykosaminoglykane

Bei den GAGs handelt es sich um lange, unverzweigte Polysaccharidketten aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten. Jedes der Disaccharide setzt sich wiederum aus einem Hexosamin (Glukosamin, Galaktosamin bzw. deren N-acetylierten Derivate) und einem stickstofffreien Monosaccharid, meist Glukuronsäure, zusammen (LÖFFLER, 1990). Außerdem besitzt jede Disaccharideinheit mindestens eine negativ geladene Carboxyl- oder Sulfatgruppe, so dass die GAGs lange, negativ geladene Fäden bilden (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).



**Abbildung 21:** Die sich wiederholenden Disaccharideinheiten der GAGs. Alle Disaccharide (außer die der Hyaluronsäure) können mit Ester oder aminogebundenen Sulfatgruppen ( $-\text{OSO}_3$ ) substituiert sein und kommen nicht sulfatiert, mono- (z.B. Chondroitin-4-Sulfat oder Chondroitin-6-Sulfat) und disulfatiert vor. GlcUA – Glukuronsäure; GlcNAc – N-Acetylglukosamin; GalNAc – N-Acetylgalaktosamin; IdoUA – Iduronsäure; Gal – Galaktose. Aus DUDHIA et al. (2005).

Die GAGs verleihen dem Knorpelgewebe nicht nur seine Kompressionssteifigkeit, Haltbarkeit, Elastizität und hohen Hydratationsgrad, sondern regulieren auch Diffusion und Molekülfluss durch den Knorpel. Bei Abnahme des GAG-Gehalts werden diese Eigenschaften wesentlich beeinträchtigt (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988).

Insgesamt gibt es fünf sulfatierte GAGs, zu denen Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin gehören und ein nicht-sulfatiertes GAG, die Hyaluronsäure (DUDHIA, 2005; LAURENT und FRASER, 1992). Mit Ausnahme von Heparin kommen alle im Gelenkknorpel vor (ROUGHLEY und LEE, 1994). Allerdings sind nur die sulfatierten GAGs Bestandteile der Proteoglykane (JACKSON

et al., 1991). Sie kommen im Gegensatz zur Hyaluronsäure nicht in freier Form im Knorpel vor, sondern ausschließlich an den Proteoglykanen.

Der Anteil der GAGs in humanem Gelenkknorpel beträgt etwa 15% seines Trockengewichts. Bei 90% der GAGs handelt es sich um Chondroitin-6-Sulfat und Keratansulfat und bei weniger als 5% um Chondroitin-4-Sulfat (DIJKGRAAF et al., 1995). Die Konzentrationen der verschiedenen GAGs sind allerdings von Alter und Knorpellokalisation abhängig und verändern sich auch bei Verletzungen oder Krankheiten (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

**Tab. 3:** Die Glykosaminoglykane des Gelenkknorpels. Aus LÖFFLER (1990 und 1998) und ROUGHLEY und LEE (1994).

GAG (Position des Sulfats)	Molekular- gewicht	Anzahl der Disaccharide pro Kette	Struktur
Chondroitinsulfat (4 oder 6)	$2-5 \times 10^4$	50	GlcS-GalNAc-GlcS- GalNAc
Dermatansulfat (4)	$2-5 \times 10^4$	50	IdS-GalNAc-GlcS- GalNAc
Keratansulfat (6)	$5-20 \times 10^3$	15	Gal-GlcNAc-Gal- GlcNAc
Heparansulfat (N)	$2-10 \times 10^3$	50	IdS-GlcNSO <sub>3</sub> -GlcS- GlcNAc
Hyaluronsäure (-)	$1-3 \times 10^6$	10.000	GlcS-GlcNAc-GlcS- GlcNAc

GlcS – Glukuronsäure; GalNAc - N-Acetyl-Galactosamin; IdS - Iduuronsäure; Gal - Galaktose; GlcNAc - N-Acetyl-Glukosamin; GlcNSO<sub>3</sub> - Glukosamin-N-Sulfat.

### Chondroitinsulfat

Chondroitinsulfat (CS) ist ein wichtiger Bestandteil des Gelenkknorpels und kommt hier in relativ hoher Konzentration (40 bis 80 mg/ml) hauptsächlich in Aggrekan, aber auch in kleineren Mengen in den Proteoglykanen Dekorin und Biglykan vor (HARDINGHAM, 1995). Sein Molekulargewicht beträgt im Gelenkknorpel zwischen 20.000 und 50.000 (PETRIDES, 1990 und 1998; ROUGHLEY und LEE, 1994). Es handelt sich um ein gestrecktes Polysaccharid aus 20-60 sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die sich aus Glukuronsäure (GlcS) und N-Acetyl-Galaktosamin

(GalNAc) zusammensetzen. Die Sulfatgruppe befindet sich im Hexosaminteil (ROUGHLEY und LEE, 1994). So trägt bei den Aggrekanen ein Großteil der Galaktosaminreste an Position 4 oder 6 eine einzelne Sulfatgruppe, 1-5% der Reste sind nicht sulfatiert und nur weniger als 1% sind disulfatiert mit 4-,6-disulfatiertem Galaktosamin oder einigen 2-sulfatierten Glukuronsäureresten (HARDINGHAM, 1995). Die Sulfatgruppen sorgen zusammen mit den Carboxylgruppen der Glukuronsäure für eine dicht gepackte Ansammlung anionischer Ladung entlang der GAG-Kette und sind somit für die hydrophilen und raumfüllenden Eigenschaften der Proteoglykane verantwortlich.

Die Bindungsregion der CS-Ketten besteht aus einem Tetrasaccharid, mit der Sequenz  $\beta$ -GlcS-(1,3)- $\beta$ -Gal-(1,3)- $\beta$ -Gal-(1,4)- $\beta$ -Xyl (LOHMANDER, 1988; RABENSTEIN, 2002), wobei der Xyloserest in neu synthetisierten Proteoglykanen zu einem Großteil an Position 2 phosphoryliert ist (LOHMANDER, 1988).

Die Synthese von CS startet an Akzeptor-Serinresten des Kernproteins durch Anlagerung eines Xyloserests, gefolgt von aufeinanderfolgenden Galaktoseresten und einem GlcS-Rest. Diesen folgt die sich wiederholende Addition von GalNAc und GlcS. Während der Verlängerung der Polysaccharidkette findet auch die Sulfatierung der GalNAc-Reste statt (ROUGHLEY und LEE, 1994). Die Struktur von Chondroitinsulfat variiert abhängig von Alter (siehe 3.1.3 Altersbedingte Veränderungen der Proteoglykane) und Gesundheitszustand des Individuums sowie auch von der anatomischer Lage des Gelenkknorpels (ROUGHLEY und LEE, 1994) (genauerer siehe 2.1 Unterschiede der Matrixstruktur verschiedener Gelenke).

### Dermatansulfat

Dermatansulfat (DS) unterscheidet sich von Chondroitinsulfat durch die Anwesenheit von Iduronsäureresten an Stelle von etwa 10-20% der GlcS-Reste. Die Iduronsäurereste werden nicht durch eine spezifische Glykosyltransferase hinzugefügt, sondern mit Hilfe einer Epimerase aus Glukuronsäure gebildet. Dermatansulfat kann also als eine modifizierte Form des CS betrachtet werden. Tatsächlich wurde Dermatansulfat auch ursprünglich als „Chondroitinsulfat B“ bezeichnet. Die Iduronsäurereste können an Position 2 sulfatiert sein (ROUGHLEY und LEE, 1994). Da es für die Epimerisierung kein festes Schema gibt, variieren wahrscheinlich Proportion und Position der DS-Ketten in verschiedenen Gelenkknorpeln (ROUGHLEY und LEE, 1994).

### Keratansulfat

Die Keratansulfatketten des Gelenkknorpels haben ein Molekulargewicht zwischen 2.000 und 8.000. Ein Aggrekanmolekül enthält im Durchschnitt etwa 40 dieser Ketten. Der Großteil von ihnen ist dabei in der Zwischenregion des Kernproteins lokalisiert (LOHMANDER, 1988).

Keratansulfat (KS) ist das einzige GAG, das keine Uronsäuren enthält. Stattdessen ist es aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten von Galaktose und N-Acetyl-Glukosamin (GlcNAc) zusammengesetzt, wobei Letzteres gewöhnlich an Position 6 sulfatiert ist. Manchmal erfolgt die Sulfatierung aber auch an der Position 6 des Galaktoserestes (ROUGHLEY und LEE, 1994).

KS unterscheidet sich von den anderen sulfatierten GAGs auch hinsichtlich seiner Verbindungsweise mit dem Kernprotein. Es kann sowohl über eine Glykosidbindung zwischen GalNAc und der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin des Kernproteins als auch an die Aminogruppe von Asparagin binden, indem es Verbindungsstrukturen nutzt, die viele O- und N-gebundene Oligosaccharide in Glykoproteinen haben.

Der Gehalt an KS im Gelenkknorpel steigt mit zunehmendem Alter (ROUGHLEY und LEE, 1994).

### Heparansulfat

Heparansulfat (HS) unterscheidet sich von den übrigen GAGs nicht nur hinsichtlich seiner Struktur, sondern auch bezüglich seines Vorkommens an Zell-assoziierten Proteoglykanen (ROUGHLEY und LEE, 1994). HS ist ein lineares Polysaccharid, das sich aus 50 bis 200 Disaccharid-Untereinheiten zusammensetzt. Diese aus Uronsäure (Glukuron- oder Iduronsäure) und Glukosamin (GlcN) bzw. GlcNAc bestehenden Disaccharide sind mit variablen Mustern von N-Sulfat, O-Sulfat und N-Acetylgruppen substituiert (LÖFFLER, 1990; RABENSTEIN, 2002). Es kann sowohl eine O-Sulfatierung an Position 6 des GlcN-Rests und Position 2 des Iduronsäurerests stattfinden als auch manchmal eine Sulfatierung an Position 3 des Glukosaminrests. Außerdem variiert, wie bei Dermatansulfat auch, das Verhältnis von GlcS-Resten, die zu Iduronsäure epimerisiert werden. Diese große Variabilität lässt HS zu einer sehr heterogenen Struktur werden, die eine Vielzahl an Wechselwirkungen mit verschiedenen Proteinen ermöglicht (RABENSTEIN, 2002; ROUGHLEY und LEE, 1994).

Die Verbindung innerhalb der Disaccharide kann im Gegensatz zu den anderen GAGs nicht nur  $\alpha$ -, sondern auch  $\beta$ -glykosidisch erfolgen (LÖFFLER, 1990; RABENSTEIN, 2002). Den größten Anteil der Polysaccharidkette bilden zahlreiche aneinandergereihte unsulfatierte GlcS-(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc Disaccharidsequenzen. Weiterhin gibt es eine Region, die sich aus Disacchariden von Iduronsäure und sulfatierten Glukosaminen (GlcNS) zusammensetzt. Zwischen diesen beiden Regionen liegt ein Bereich, der sowohl GlcNAc als auch GlcNS in seinen Disaccharideinheiten enthält (RABENSTEIN, 2002).

Die Bindung der HS-Polysaccharid-Ketten an die Kernproteine der HS-Proteoglykane, zu denen Perlekan und laut GOVINDRAJ et al. (2002) auch Aggrekan gehören, erfolgt über dieselbe Tetrasaccharid-Sequenz wie bei CS (RABENSTEIN, 2002; ROUGHLEY und LEE, 1994). Auch ihre Sequenz für die Anlagerung an Serinreste stimmt überein (ROUGHLEY und LEE, 1994). Erst durch diese Bindung erlangen die HS-Proteoglykane viele ihrer biologischen Funktionen, zu denen unter anderem Zelladhäsion, Regulierung von Zellwachstum und –proliferation, die Bindung von Proteinen an die Zellen und die damit verbundene Regulierung der Proteinaktivitäten gehören. Die selektiven Wechselwirkungen mit bestimmten Proteinen beruhen auf der dreidimensionalen Struktur, den Sulfatierungsmustern, der Flexibilität der Pyranoseringe der Iduronsäurereste und den Rotationen um die Glykosidbindungen der HS-Ketten. Besonders die Flexibilität des Pyranoserings erklärt die bemerkenswerte Fähigkeit der HS, an eine Vielzahl von Proteinen binden zu können. Sie erleichtert die hauptsächlich elektrostatisch stattfindenden Wechselwirkungen zwischen den anionischen HS-Gruppen und den kationischen Bindungsstellen der Proteine (RABENSTEIN, 2002).

Die an der Zelloberfläche befindlichen HS-Proteoglykane sind in einem dynamischen Zustand, da die HS-Struktur von der Zelle als Antwort auf extrazelluläre Signale, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, bestimmt wird. Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen von HS mit Proteinen bewirken Veränderungen der Proteinkonformation, erleichtern Protein-Protein Wechselwirkungen und fungieren als Co-Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Die hohe Bindungsaffinität für ihre Rezeptoren erhalten bestimmte Wachstumsfaktoren nämlich erst durch die HS-Proteoglykane, die Konformationsänderungen sowohl des Wachstumsfaktors, als auch des Rezeptors induzieren und somit eine Signalübertragung bewirken (RABENSTEIN, 2002).

### Hyaluronsäure

Bei Hyaluronsäure handelt es sich um ein lineares, nicht sulfatiertes Polysaccharid aus sich wiederholenden Glukuronsäure- und N-Acetyl-Glukosaminresten. Ihr Anteil am Gesamtproteoglykangehalt des Knorpels beträgt gewöhnlich etwa 1-2%. Hyaluronsäure unterscheidet sich von den sulfatierten GAGs in mehreren Punkten: Zum einen durch ihre extreme Länge (zwischen weniger als 100 nm und mehr als 10.000 nm) (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988) sowie das Fehlen zusätzlicher Polymermodifikationen (ROUGHLEY und LEE, 1994). Zum anderen benötigt sie weder zum Starten ihrer Synthese ein Akzeptorprotein, noch ist sie zu einem späteren Zeitpunkt kovalent an ein Protein gebunden (LOHMANDER, 1988; ROUGHLEY und LEE, 1994).

Hyaluronsäure sorgt für ein Gel, an das sich die Chondrozyten über Hyaluronsäurespezifische Oberflächenrezeptoren binden können. Außerdem stellt sie die zentrale Komponente der Proteoglykanggregate dar, da die Aggrekane eine Hyaluronsäurebindende Domäne besitzen. Durch ihre Bindungsfähigkeit mit noch weiteren Matrixkomponenten, wie zum Beispiel Kollagen VI und Bindungsproteinen, spielt sie im Knorpel zudem eine stabilisierende Rolle (MUIR, 1995).

#### 1.2.4.2.2.2 Kernprotein

Das Kernprotein der Proteoglykane ist eine Polypeptidkette, die sich aus drei globulären (G-Regionen) und zwei erweiterten interglobulären Domänen zusammensetzt (KUETTNER, 1992). Die am Aminoende liegende G1-Region kann sich mit Hyaluronsäure nicht-kovalent verbinden und wird deshalb auch als Hyaluronsäure-bindende Region bezeichnet (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; DUDHIA, 2005). Sie besitzt eine doppelschlaufige Struktur, die selektiv mit fünf der sich wiederholenden Disaccharideinheiten der Hyaluronsäure interagiert. Da somit für diese Verbindung nur wenige Disaccharide pro Proteoglykanmolekül benötigt werden (TRIPPEL, 1990), können viele Proteoglykanmoleküle an nur einen Hyaluronsäurefaden binden (MUIR, 1995). Die Verbindung wird durch Bindungsproteine stabilisiert, die ebenfalls eine doppelschlaufige Struktur aufweisen und sowohl mit Hyaluronsäure als auch mit der G1-Region interagieren (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Alle an Hyaluronsäure bindenden

Proteoglykane und Bindungsproteine enthalten diese Region (WATANABE et al., 1998).

Die G2-Region befindet sich direkt anschließend an die Hyaluronsäure-bindende Region, zu der sie auch homolog ist. Sie hat ebenfalls die Form einer Doppelschleife, bindet aber selbst scheinbar nicht an Hyaluronsäure (TRIPPEL, 1990). Laut WATANABE et al. (1998) ist sie jedoch nur bei Aggrekanen anzutreffen.

Auf die G2-Region folgt der nicht globuläre Bereich des Kernproteins mit den Anlagerungsstellen für die GAG-Seitenketten. Zwischen den verschiedenen Proteoglykanen herrscht in dieser Region eine starke Heterogenität mit sehr unterschiedlicher Anzahl und Größe der Bindungsstellen (ROUGHLEY und LEE, 1994).

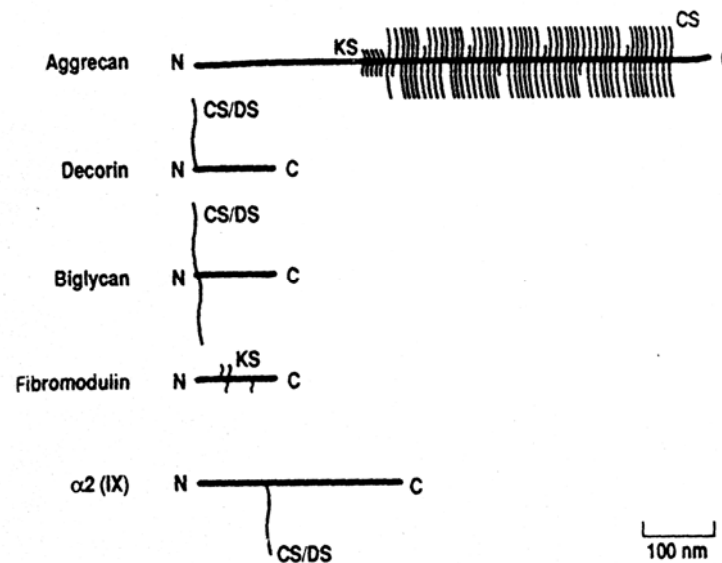
Am Carboxyende des Kernproteins liegt die G3-Region. Ihre Funktion ist noch unklar, eventuell ist sie jedoch an der Bindung an andere Saccharide, einschließlich Galaktose und Fruktose, beteiligt (TRIPPEL, 1990).

Die Kernproteinstruktur des Proteoglykans Aggrekan wurde von mehreren Autoren genauer untersucht und wird im Kapitel 1.2.4.2.2.3.1 Aggrekane ausführlich besprochen.

#### 1.2.4.2.2.3 Die verschiedenen Proteoglykane

Wie bereits erwähnt kommen im Knorpel zwei unterschiedliche Klassen von Proteoglykanen vor: die großen aggregierenden Proteoglykane Aggrekan (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; IOZZO et al., 1994; ROUGHLEY und LEE, 1994) und Versikan (MATSUMOTO et al., 2006) sowie die kleinen Proteoglykane wie Dekorin, Biglykan, Fibromodulin, Perlekan und andere (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; IOZZO et al., 1994; ROUGHLEY und LEE, 1994).

Die Aggrekane machen etwa 90% der Gesamtproteoglykanmasse des Knorpels aus (HALL et al., 2003), die großen nicht-aggregierenden Proteoglykane maximal 10% und die kleinen Proteoglykane bis zu 3%. Betrachtet man jedoch die molare Menge, so ist die der kleinen Proteoglykane gleich der großen oder sogar höher (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).



**Abbildung 22:** Struktur der Knorpelproteoglykane. Horizontale Linie: Kernproteinlänge basierend auf der Anzahl der Aminosäuren-Reste im intakten Molekül nach der Sekretion. Vertikale Linien: GAG-Ketten. Bei Aggrecan sind auch vereinzelt KS-Ketten in der CS-reichen Region anzutreffen. C – Carboxyende des Kernproteins; CS/DS – Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat; KS – Keratansulfat; N – Aminoende des Kernproteins. Aus ROUGHLEY und LEE (1994).

**Tab. 4:** Die verschiedenen Proteoglykantypen des Gelenkknorpels. Aus ROUGHLEY und LEE, 1994. Ergänzt aus MATSUMOTO et al. (2006).

Proteoglykan-Typ <sup>1</sup>	GAG-Typ <sup>2</sup>	Anzahl GAG-Ketten	Protein-größe <sup>3</sup>	Chromosomen-Lokation	Gen-größe (kb)	Exon-Zahl
Aggrecan	CS und KS	>100	2297	15	>50	15
Versikan	CS	20	-	-	-	-
Dekorin	CS/DS	1	329	12	>38	8
Biglycan	CS/DS	2	331	X	8	8
Fibromodulin	KS	4	357	-	-	-
α2(IX)	CS/DS	1	677	-	-	32

<sup>1</sup>Alle Daten beziehen sich auf humane Proteoglykane, außer die von Fibromodulin, die von Boviden stammen und die von α2(IX), die von Hühnern stammen. <sup>2</sup>Abkürzungen: CS - Chondroitinsulfat; DS - Dermatansulfat; KS – Keratansulfat; X – X-Chromosom. <sup>3</sup>Die Proteingröße wird repräsentiert durch die Anzahl vorhandener Aminosäuren.

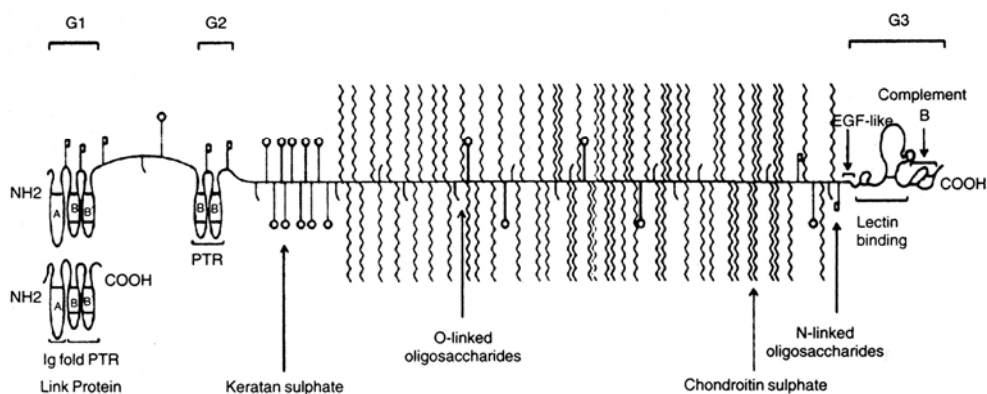
Bei den großen, nicht-aggregierenden Proteoglykanen, die den Aggrecanen in Struktur und Zusammensetzung ähneln, handelt es sich wahrscheinlich um deren Abbauprodukte (BUCKWALTER et al., 1994). Mit den aggregierenden Proteoglykanen haben sie den hohen Gehalt an Serin, Glutamat/Glutamin und Glycin

gemeinsam, während ihr Gehalt an CS-Seitenketten wesentlich geringer ist. Da ihr Kernprotein im Vergleich zu den übrigen Proteoglykanen ein deutlich anderes Peptidmuster aufweist, repräsentieren diese Proteoglykane laut HEINEGARD et al. (1986) jedoch eine eigene Molekülgruppe.

#### 1.2.4.2.2.3.1 Aggrekane

Das aggregierende Hauptproteoglykan des Gelenkknorpels heißt Aggrekan und ist knorpelspezifisch. Die Bezeichnung aggregierendes Proteoglykan beruht auf der Fähigkeit der einzelnen Aggrekanmonomere, sich mit Hyaluronsäure nicht-kovalent verbinden zu können und auf diese Weise große Proteoglykanaggregate zu bilden (BUCKWALTER et al., 1994; DEAN et al., 2003; DOEGE et al., 1991; DUDHIA, 2005; HARDINGHAM und FOSANG, 1992; VANWANSEELE et al., 2002). Aggrekan gehört somit zur Familie der Hyaluronsäure bindenden Proteine, genannt Hyaloadherine (DUDHIA, 2005; ROUGHLEY und LEE, 1994). Die Anwesenheit großer Mengen von Proteoglykanaggregaten ist allgemein ein Charakteristikum für hyalinen Knorpel und speziell für Gelenkknorpel (COHEN et al., 1998).

Die Struktur eines Aggrekanmonomers gleicht der einer Flaschenbürste mit einem zentralen Kernprotein (Molekulargewicht > 200.000) (MUIR, 1995), das entlang seiner gesamten Länge CS- und KS-Ketten, sowie N- oder O-gebundene Oligosaccharide kovalent gebunden hat (DUDHIA, 2005; MUIR, 1995). Das Gesamtmolekulargewicht dieses Makromoleküls liegt bei  $1-3 \times 10^6$  (LOHMANDER, 1988). BUCKWALTER und ROSENBERG (1988) und MUIR (1995) hingegen berichten von einem Molekulargewicht von  $1-4 \times 10^6$  ( $\approx 2,5 \times 10^6$ ).



**Abbildung 23:** Molekulares Schema eines aggregierenden Proteoglykans und Bindungsproteins (Link Protein). G1 – Hyaluronsäure-bindende Region. Aus MUIR (1995).

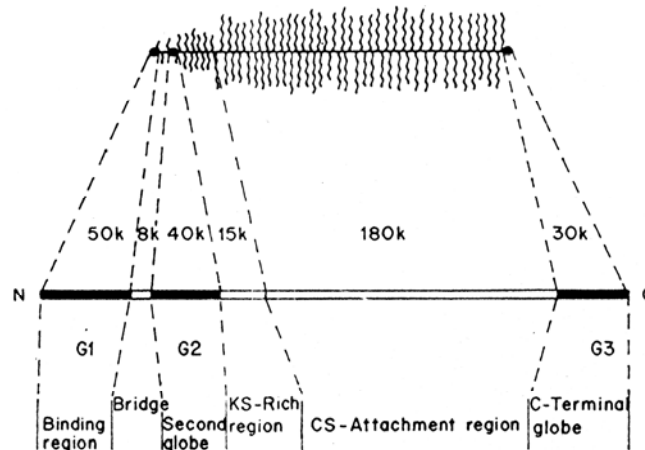
Die GAG-Ketten vereinnahmen etwa 90% der Gesamtmasse des Aggrekans (KUETTNER, 1992). Der Durchschnitt liegt bei etwa 110 CS- und mehr als 30 KS-Ketten pro Aggrekanmolekül (DUDHIA, 2005; ROUGHLEY 2001b). Der KS-Gehalt scheint variabler als der von CS zu sein, wobei es mit zunehmendem Alter meist zu einem Anstieg des KS im Verhältnis zum CS kommt (HARDINGHAM et al., 1986). Weiterhin sind noch etwa 50 O-gebundenen und 5-10 N-gebundenen Oligosaccharide angelagert (LOHMANDER 1988).

Die Aggrekane sind aufgrund der stark anionischen Ladung ihrer sulfatierten GAGs und der Immobilisierung im umliegenden Kollagenetz größtenteils für die osmotischen Eigenschaften des Knorpels verantwortlich. Auf diese Weise tragen die Aggrekane auch maßgeblich zur extremen Belastbarkeit des Gelenkknorpels bei.

### Kernprotein

Das Kernprotein des Aggrekans besteht aus etwa 2.000 Aminosäuren (LOHMANDER, 1988). Es wird durch ein einziges Gen kodiert, das 18 Exons enthält und deren Organisation streng mit den spezifischen Domänen korreliert (WATANABE et al., 1998).

Vom Amino- zum Carboxyende hin folgen aufeinander die globuläre Bindungsregion für Hyaluronsäure G1, eine 21 bis 25 nm große interglobuläre Domäne (IGD), die G2-Region, eine KS-reiche Region (KS-Region), eine CS-reiche Region (CS-Region) und die altersabhängig vorhandene G3-Region (DUDHIA, 2005) (siehe Kapitel 3.1.3 Altersbedingte Veränderungen der Proteoglykane). Das Molekulargewicht des gesamten Kernproteins liegt bei etwa 300 (SZAFRANSKI et al., 2004) bis 320 kDa (HARDINGHAM et al., 1986), wobei die G1-Region ca. 50.000, die Zwischenregion ca. 8.000, die G2-Region ca. 40.000, die KS-reiche Region etwa 15.000, die CS-reiche Region etwa 180.000 und die G3-Region etwa 30.000 Da groß ist (WATANABE et al., 1998). Damit stellt das Kernprotein etwa 10-20% des Gewichts des gesamten Proteoglykans. Bezogen auf die Molekularmasse des Kernproteins wiederum beträgt der Anteil der Anlagerungsregionen von CS und KS 80% (DUDHIA, 2005).



**Abbildung 24:** Kernprotein der aggregierenden Proteoglykane porcinen Knorpels. Aus HARDINGHAM et al. (1986).

Der Bereich am Aminoende beinhaltet die zwei globulären Regionen G1 und G2. Sie weisen jeweils einen Durchmesser von 6 bis 8 nm auf (HARDINGHAM et al., 1986) und sind durch die IGD voneinander getrennt (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998). Dieses Segment scheint durch eventuell angelagerte Kohlenhydratketten versteift zu sein (HARDINGHAM et al., 1986). Die G1- und G2-Region enthalten wenige oder keine GAG-Ketten, aber die meisten der N-gebundenen Oligosaccharide. So beträgt der Anteil der Oligosaccharide am Gesamtmolekulargewicht der G1-Region 30% (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Beide Domänen reagieren speziell mit Hyaluronsäure und dem Bindungsprotein zur Bildung von Proteoglykanaggregaten. Da die Aggregation der Proteoglykane deren Immobilisierung in der Matrix zur Folge hat, ist dieser Bereich des Kernproteins somit von großer funktioneller Bedeutung für den Gelenkknorpel (LOHMANDER, 1988).

Die G1-Region besteht aus drei schlaufenförmigen, miteinander über Disulfidbrücken verbundenen Subdomänen A, B und B'. B und B' bilden jeweils eine doppelschlaufige Struktur, genannt Proteoglykan tandem repeat (PTR). Eine solche PTR-Schleife stellt die funktionelle Stelle für die Wechselwirkungen mit Hyaluronsäure dar (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998). Da jedoch die Hyaluronsäure-bindende Region unter reduzierten Bedingungen nicht an Hyaluronsäure bindet, scheint auch die Ternärstruktur der PTR, die durch zwei Disulfidbrücken gebildet wird, für die Funktion essentiell zu sein (YU und TOOLE, 1995). Zusätzlich sind aber auch die Kohlenhydratketten der G1-Region für die

Bindung an Hyaluronsäure von Bedeutung (BARTOLAZZI et al., 1996; DUDHIA, 2005).

Versuche von WATANABE et al. (1998) zeigten, dass das kleinste noch an Hyaluronsäure bindende Aggrekansegment das B-B'-Segment der G1-Region ist. Es wird jedoch angenommen, dass eine einzelne PTR-Schleife für Wechselwirkungen mit Hyaluronsäure ausreicht. Der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 (STAMENCOVIC, 1989) und das Arthritis-assoziierte Protein Tumor-Nekrosefaktor stimulierte Gen 6 (LEE et al., 1992) beispielsweise können nämlich an Hyaluronsäure binden, obwohl sie nur jeweils eine PTR-Schleife pro Molekül besitzen. Studien mit Kernresonanzspektroskopie von HORITA et al. (1994) an Peptiden aus Bindungsregionen von Knorpelproteinen konnten das jedoch nicht bestätigen. Auch Versuche von WATANABE et al. (1997) mit rekombinanten Aggrekandomänen zeigen, dass eine einzelne PTR keine Hyaluronsäure-bindende Aktivität mehr besitzt. Die A-Schleife der G1-Region bildet eine Immunoglobulinfalte (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998). Vermutlich reagiert sie mit dem Bindungsprotein und möglicherweise auch mit anderen Regionen. Außerdem verstärkt die A-Schleife die Wechselwirkungen des B-B'-Segments mit Hyaluronsäure, wobei auch hier die Ternärstruktur von Bedeutung ist (WATANABE et al., 1998).

Bei der interglobulären Domäne (IGD) handelt es sich um eine, beim humanen Aggrekan aus 127 Resten bestehende, 25 nm kurze Proteinregion (DUDHIA, 2005), die stangenförmig zwischen der G1- und G2-Region liegt. Sie enthält spezifische Spaltungsstellen für eine Reihe von Proteasen, zum Beispiel die Matrix Metalloproteinasen 1, 2, 3 und 8, die Serinprotease Plasmin und saure Proteasen wie Kathepsin B (HARDINGHAM und FOSANG, 1995). Studien an Aggrekanfragmenten aus Gelenkknorpel und Synovialflüssigkeit deuten auf die Anwesenheit einer Protease hin, die spezielle Stellen der IGD spaltet und Aggrekanase genannt wird. In gesundem reifem Gelenkknorpel wurden mindestens elf verschiedene Aggrekanfragmente mit Molekulargewichten zwischen 43.000 und 300.000 gefunden (SANDY et al., 1995). Da der Abbau am C-Ende zu beginnen scheint, spaltet das Enzym also nicht nur eine bestimmte Stelle der IGD, sondern noch vier ähnliche Stellen in der CS-reichen Region (LARK et al., 1997).

Die G2-Region kommt nur bei Aggrekanen vor. Fast 67% ihrer Aminosäuresequenz und somit auch ihre Tertiärstruktur sind mit der B-B'-Subdomäne der G1-Region identisch (FOSANG und HARDINGHAM, 1991; WATANABE et al., 1998), eine Immunglobulinfalte fehlt ihr jedoch (DUDHIA, 2005). Im Unterschied zur G1-Region kann diese Region nicht an Hyaluronsäure binden (DUDHIA, 2005; FOSANG und HARDINGHAM, 1991; WATANABE et al., 1998). Der entscheidende Unterschied konnte bisher nicht gefunden werden. Möglicherweise verhindert hier jedoch eine Glykosylierung nahe der potentiellen Hyaluronsäure bindenden Stelle die Wechselwirkungen (FOSANG und HARDINGHAM, 1991).

Auch die genaue Funktion der G2-Region ist noch unbekannt. Sie scheint jedoch zusammen mit der G1-Region die Sekretion von Aggrekan zu verzögern, um sicherzustellen, dass nur vollständig glykosylierte Aggrekanmonomere sezerniert werden (KIANI et al., 2001). Die G1-Region wirkt wahrscheinlich außerdem regulierend auf die Synthese des Aggrekans, indem sie die Anlagerung der GAG-Ketten an das Kernprotein hemmt (YANG et al., 2000). Es wird vermutet, dass die G2-Region ebenfalls die GAG-Anlagerung beeinflusst (DUDHIA, 2005).

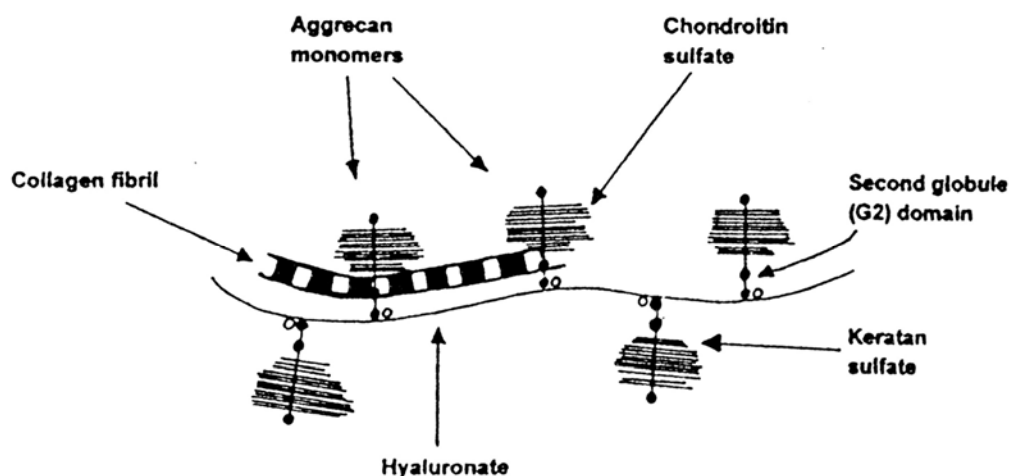
Auf das Carboxyende der G2-Region folgt die KS-reiche Region, in der sich fast 60% der KS-Ketten eines Aggrekanmoleküls befinden (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988). Weitere KS-Ketten sind in den Aggrekanmolekülen noch O- und N-gebunden in der G1-Region anzutreffen, sowie über O-gebundene Substitutionen an den Threoninresten der CS-reichen Region (DUDHIA, 2005).

Die KS-Region wird durch das Exon 11 codiert und zeigt spezie-spezifische Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz. So konnte die mögliche Sequenz für die Anlagerung von KS beim Menschen (E-(E,K)-P-F-P-S oder E-E-P-(S,F)-P-S) weder bei Ratten noch Mäusen gefunden werden. Das Fehlen dieser Sequenzen hängt aber möglicherweise damit zusammen, dass die Aggrekane von Nagetieren keine KS-Ketten enthalten (WATANABE et al., 1998).

Knorpelzellen innerhalb desselben Knorpels können sowohl Aggrekanmonomere mit geringem als auch mit hohem KS-Gehalt synthetisieren (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988; HEDLUND et al., 1999). So ist beispielsweise der Gehalt in den Oberflächenzonen bovinen Knorpels im Gegensatz zu den tieferen Knorpelschichten relativ gering (HEDLUND et al., 1999).

Die Primärstruktur der KS-Region besteht aus sich wiederholenden Prolin-reichen Hexapeptid-Einheiten mit einer typischen Sequenz von Glu-Glu/Lys-Pro-Phe-Pro-Ser (DUDHIA, 2005). Von den 23 Einheiten dieser Kernproteinregion ist die erste Position in 22 Fällen und die zweite Position in 11 Fällen mit Glutamatresten besetzt (HEDLUND et al., 1999). Die KS-Ketten sind an die jeweiligen Serinreste angelagert. Die Anzahl dieser übereinstimmenden Sequenzen variiert spezies-spezifisch zwischen 4 und 23 Wiederholungen, obwohl beispielsweise das Aggrekan von Ratten und Mäusen trotz vier solcher Wiederholungen keine einzige KS-Kette besitzt (DUDHIA, 2005).

Die genaue Funktion der KS-Region ist noch unbekannt. Ihre Primärstruktur mit den Prolin-reichen Wiederholungen lässt jedoch auf ein Potential für die Bindung an Kollagenfibrillen schließen (DUDHIA, 2005; HEDLUND et al., 1999). Diese Wechselwirkung wird wahrscheinlich sowohl durch die Bildung einer Polyprolin-Rolle, als auch durch die starre und langgestreckte Konformation der KS-Region ermöglicht. Beides zusammen ermöglicht der Kollagenfibrille, das Zentrum der Aggregate zu durchqueren und möglicherweise bei der Zusammensetzung und Integrität der Aggregate mitzuhelfen (DUDHIA, 2005). HEDLUND et al. (1999) gehen davon aus, dass eine Kollagenfibrille als Rückgrat innerhalb des Aggrekankomplexes verläuft und sich mit den KS-Regionen mehrerer Aggrekanmonomere verbindet.



**Abbildung 25:** Schematische Illustration einer möglichen Wechselwirkung zwischen einer Kollagenfibrille und Aggrekanmonomeren über deren KS-reiche Region. Wegen der Vielzahl an Wechselwirkungen mit dem Proteoglykanaggregat dient die Fibrille wahrscheinlich als Rückgrat des Aggrekankomplexes. Aus HEDLUND et al. (1999).

Obwohl jede KS-Region nur eine relativ schwache Bindung mit der Kollagenfibrille eingeht, führt ihre Vielzahl im Aggregat zur Bildung eines äußerst stabilen

Komplexes. Durch diese molekulare Architektur sorgt die Region also einerseits für eine Stabilisierung des Aggrekanaggregats und andererseits aber auch für die zur Bildung von Kollagenfibrillen möglicherweise nötige Mikroumgebung. Da die langgestreckte Struktur der KS-Region nämlich nur von freiem Raum umgeben ist, fungiert sie innerhalb des Aggregats möglicherweise auch als eine Art Platzhalter. Auf diese Weise wird eventuell die Diffusion einiger Matrixkomponenten, wie zum Beispiel Prokollagen, ermöglicht (HEDLUND et al., 1999).

Die nahe bis unmittelbare Lage der KS-Regionen an den Kollagenfibrillen innerhalb der perizellulären und territorialen Matrix unterstützt ebenfalls die Annahme von Wechselwirkungen dieser Region mit Kollagenen. Die KS-Regionen befinden sich dabei hauptsächlich an der Zwischenregion innerhalb der D-Periode der Fibrille (HEDLUND et al., 1999).

Weiterhin wurde in Versuchen eine Affinität für isoliertes Kollagen I und II nachgewiesen, die durch enzymatische Verdauung der KS-Ketten nicht zu verändern war, während sie durch eine Spaltung des Kernproteins erlosch. Damit ist gesichert, dass die Wechselwirkungen dieser Region mit den Kollagenfibrillen vom Kernprotein abhängen (HEDLUND et al., 1999). Andere Versuche ergaben auch die Beteiligung geladener Gruppen an der Verbindung mit Kollagenfibrillen. Die negativen Ladungen der Glutamate, deren Gehalt in dieser Kernproteinregion sehr hoch ist, könnten also ebenfalls bei den Wechselwirkungen zwischen Fibrillen und KS-Region eine Rolle spielen. Da die Bindungen jedoch auch unter relativ hohen NaCl-Konzentrationen stattfinden, müssen zusätzlich zu den elektrostatischen Anziehungen noch andere Kräfte in diese Protein-Protein Wechselwirkungen involviert sein (HEDLUND et al., 1999).

Nach der KS-reichen Region folgt die größte Kernproteinregion mit mehr als 80% der gesamten Molekülmasse (HEDLUND et al., 1999). Es handelt sich um die CS-reiche Region, in der sich fast 90% der CS-Ketten des Aggrekanmoleküls befinden. Zusätzlich zu den fast hundert angelagerten CS-Ketten (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998) enthält sie noch einige KS-Ketten (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988) und auch HS (GOVINDRAJ et al., 2002).

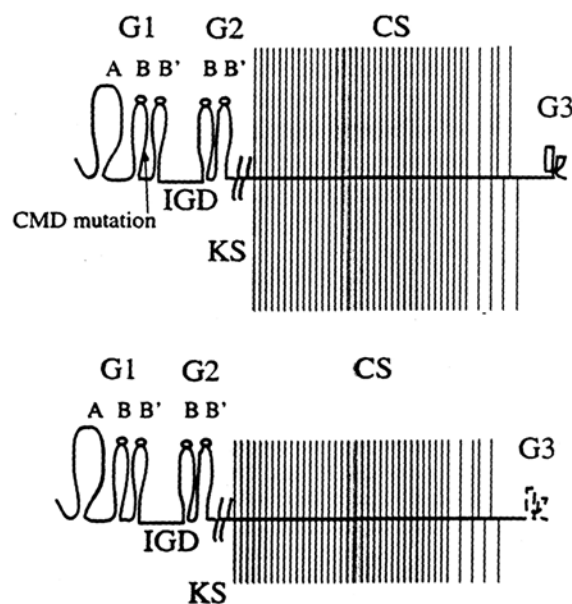
Die Region wird durch das Exon 12 codiert. Ihr Gehalt an den Aminosäuren Serin, Glycin, Prolin und Glutamat/Glutamin ist besonders hoch (HARDINGHAM et al., 1986). Entlang ihrer gesamten Länge besteht die CS-Region aus fast 120 Ser-Gly-

Wiederholungen (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998). Die möglichen Erkennungssequenzen für die Anlagerung der CS- und HS-Ketten lauten Ser-Gly-X-Gly oder (D,E)-X-Ser-Gly (GOVINDRAJ et al., 2002; WATANABE et al., 1998), beziehungsweise (Asp/Glu)-X-Ser-Gly, wobei die Serinreste die Lokalisation für die Xylosylierung darstellen. Allerdings sind nicht alle Anlagerungsstellen mit CS-Ketten besetzt (DUDHIA, 2005). Zur vollständigen Erkennung sind zusätzlich zur Primärsequenz wahrscheinlich noch molekulare Überwachungsmechanismen und Enzyme für posttranslationale Modifikationen der CS- und KS-Ketten notwendig (WATANABE et al., 1998). Diese Modifikationen resultieren in Substitutionen vieler GalNAc-Reste mit Sulfateestern, was wiederum zu nicht sulfatierten, mono- und disulfatierten Resten führt. Auf diese Weise entstehen zwischen 8.000 und 10.000 negativ geladene Gruppen, die alle am Kernprotein fixiert sind und somit einen hohen Grad an Hydratation der Aggregate nach sich ziehen (DUDHIA, 2005).

Innerhalb der CS-Region kann man zwei verschiedene Muster von Wiederholungssequenzen unterscheiden, genannt Wiederholungsregion CS-1 und CS-2 (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998). Diese zwei Bereiche sind auch aufgrund der Verteilung ihrer CS-Ketten erkennbar. Der näher an der Hyaluronsäurebindenden Region liegende Teil trägt seine CS-Seitenketten in scheinbar wahlloser Verteilung an sich wiederholenden Gruppen von jeweils 40 Aminosäureresten. Der zweite Bereich hingegen enthält 7 aufeinanderfolgende Wiederholungen von 100 Aminosäureresten, an denen sich die CS-Ketten gruppenartig verteilen (TRIPPEL, 1990).

Die Zahl an CS-Ketten pro Kernproteinmonomer kann um bis zu 40 variieren. Nimmt man eine totale Substitution an, so befinden sich zwischen den zwei Allelen zwischen 132 und 172 CS-Ketten, was eine Variation von 30% bedeutet (WATANABE et al., 1998). Da die CS-Regionen der verschiedenen Spezies nicht so konstant sind wie die globulären Proteindomänen, scheinen die präzise Anzahl und das genaue Muster der Ser-Gly-Sequenzen für die Anlagerung der vielen CS-Ketten nicht von entscheidender Bedeutung zu sein (DUDHIA, 2005). Da die CS-Ketten allerdings zu der für den Knorpel einzigartigen hydrierten, gelartigen Struktur beitragen, die Kompressionsbelastungen absorbiert, beeinflusst die variable Zahl an Tandemwiederholungen möglicherweise aber die Knorpelfunktion (DUDHIA, 2005; WATANABE et al., 1998). Von daher ist auch die Verminderung der Länge der CS-Ketten mit zunehmendem Alter von Bedeutung (PLAAS et al., 1997).

Die Gesamtlänge dieser beiden nicht-globulären Kernproteinregionen beträgt etwa 260 nm (KUETTNER, 1992). Die angelagerten KS-Ketten sind kürzer als die längeren und dichter gelagerten CS-Ketten der CS-Region (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988). Zusätzlich sind in diesen beiden Regionen auch O-gebundene Oligosaccharide angelagert, wohingegen sich die N-gebundenen Oligosaccharide in der G1- und G2-Region und nahe der G3-Region befinden (KUETTNER, 1992). Die Zahl der Bindungsstellen für CS und KS variiert spezies-spezifisch und erklärt die Unterschiede ihrer Aggrekane in Molekülgröße und GAG-Zusammensetzung (ROUGHLEY und LEE, 1994).



**Abbildung 26:** Zwei Typen von Aggrekanmolekülen aus humanem Gelenkknorpel. Oben: Neonataler Typ mit längeren CS-Ketten. Unten: Reifer Typ mit kürzeren CS-Ketten und fehlender G3-Domäne. Aus WATANABE et al. (1998).

Die am Carboxyende liegende G3-Region besteht aus einer Reihe durch Disulfidbrücken verbundener Domänen und ist nur bei neu synthetisierten, unreifen Aggrekanen anzutreffen (DUDHIA et al., 1996 und 2005; LOHMANDER, 1988; PLAAS et al., 1997). Sie wird kurz nach der Synthese vom reifen Aggrekanmolekül verloren und ist in humanem Knorpel mit zunehmendem Alter immer seltener anzutreffen (DUDHIA et al., 1996 und 2005; PLAAS et al., 1997). FLANNERY et al. (1992) vermuten, dass diese Region bei vielen Aggrekanmolekülen im Zuge ihrer Sekretion durch die Chondrozyten entfernt wird. WATANABE et al. (1998) hingegen gehen eher von einer proteolytischen Spaltung in der Matrix als von intrazellulären Modifikationen aus.

Laut WATANABE et al. (1998) besteht die G3-Region aus drei Bereichen, genannt epidermal growth factor (EGF)-ähnlicher Teil, carbohydrate recognition domain (CRD), der den Typ-C-Lektinen sehr ähnlich ist, und complement regulatory protein B component (CRP) Teil bzw. laut DUDHIA (2005) short complement repeat (SCR) genannt. Der EGF-Teil besteht aus den zwei Teilen EGF-1 (DUDHIA, 2005) und EGF-2 (DUDHIA, 2005; FULOP et al., 1993), wobei ihre Expression spezies-spezifisch variiert (FULOP et al., 1996). So sind in humanem Knorpel beide Teile anzutreffen, während bei bovinem EGF-1 nur selten vorkommt und bei Mäusen, Ratten und Hunden EGF-1 Teil des Introns ist, von dem keine Translation erfolgt.

Die G3-Region enthält keine GAGs, aber einige N-gebundene Oligosaccharide (LOHMANDER, 1988). Unter den 280 Aminosäuren dieses carboxyterminalen Kernprotein-Endes fallen besonders Cystein- und Serin-reiche Regionen auf, während nur zwei Ser-Gly-Sequenzen vorhanden sind. Die Cystein-reiche Region faltet sich selbst zusammen und bildet so die im Elektronenmikroskop beobachtete globuläre Struktur. Diese besteht aus einer Reihe flexibler Windungen und nur einer Region mit der Form einer starren  $\alpha$ -Helix. Summiert man die Ladungen der Aminosäuren der einzelnen Regionen der G3-Region, so hat ihre aminoterminalen Region eine stark positive Ladung und die carboxyterminale eine eher negative. Diese Tatsache würde ein Umschlagen des C-terminalen Molekülendes und somit die Bildung eines globulären Endes in der Cystein-reichen Region unterstützen (HEINEGARD et al., 1986).

Die G3-Region ragt aus dem Kernprotein hervor und ist für die hydrophile Natur des Proteoglykans verantwortlich (LOHMANDER, 1988). Ihre genaue Funktion ist noch unklar, sie könnte jedoch in intrazelluläre Prozesse während der Biosynthese verwickelt sein (HARDINGHAM et al., 1986), da sie das Kernprotein mit einer gefalteten C-terminalen Kappe versieht, die für die intrazelluläre Wanderung des Aggrekans und die Förderung der Glykosaminoglykosilierung des Kernproteins nötig ist (CHEN et al., 2002). Eine Funktion im frisch sezernierten Aggrekan während der Zusammensetzung des PG-Ternärkomplexes in der extrazellulären Matrix wäre denkbar, während ihre Bedeutung zu einem späteren Zeitpunkt eher untergeordnet zu sein scheint (DUDHIA, 2005). Aufgrund ihres Lektin-ähnlichen Bereiches werden auch Wechselwirkungen mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix in Betracht gezogen (ROUGHLEY, 2001b).

### Oligosaccharide

Die 5 bis 10 N-gebundenen Oligosaccharide eines Aggrekanmoleküls gruppieren sich am aminoterminalen Ende des Kernproteins (KUETTNER, 1992; LOHMANDER, 1988). Eine weitere mögliche Anlagerungsstelle liegt in der G3-Domäne, wo sie über einen Asparaginrest an das Protein gebunden sind (LOHMANDER, 1988).

Die O-gebundenen Oligosaccharide befinden sich an den nicht-globulären Regionen des Kernproteins (KUETTNER, 1992; LOHMANDER, 1988). Sie variieren beachtlich in Größe und Struktur, wobei ihre Basisstruktur der Bindungsregion von Keratansulfat zum Kernprotein sehr ähnlich ist, was möglicherweise auf biosynthetische Beziehungen zwischen beiden hindeutet (LOHMANDER, 1988).

Aggrekanmoleküle enthalten außerdem einige Phosphatester, die hauptsächlich an den Xyloseresten, die die CS-Ketten am Kernprotein befestigen, aber auch an einigen Serinresten des Kernproteins lokalisiert sind. Die phosphorylierte Xylose fungiert wahrscheinlich als Erkennungssignal für Biosynthese, „Verpackung“ und/oder Translokation der Proteoglykane durch die Chondrozyten (KUETTNER, 1992).

### Proteoglykanaggregate

Die Proteoglykanaggregate erscheinen im Elektronenmikroskop als dünne Fäden mit multiplen angelagerten Aggrekanmonomeren (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988), die über ihre G1-Domänen ionisch mit dem zentralen Hyaluronsäurefaden verbunden sind (HEDLUND et al., 1999). Die Stabilisierung dieser Bindung erfolgt durch Bindungsproteine (LOHMANDER, 1988). Da allerdings auch Proteoglykanaggregate ohne Bindungsproteine isoliert wurden ist noch unklar, ob die Wechselwirkungen aller Aggrekanmoleküle durch Bindungsproteine stabilisiert werden (ROUGHLEY und LEE, 1994).

Bei den Bindungsproteinen handelt es sich um 41-48 kDa große (DUDHIA, 2005), von den Chondrozyten synthetisierte Glykoproteine (DEAN et al., 2003). Sie sind der Hyaluronsäure-bindenden Region der Aggrekane bezüglich ihrer Größe, Aminosäuresequenz sowie der Sequenz ihrer cDNS sehr ähnlich (DUDHIA, 2005; LOHMANDER, 1988). Außerdem besitzen auch sie die drei über Disulfatbrücken verbundenen Schleifen (DUDHIA, 2005; LOHMANDER, 1988). Die aminoterminal Schleife der Bindungsproteine (DUDHIA, 2005; MUIR, 1995), interagiert mit der

äquivalenten Domäne der G1-Region des Aggrekans (DUDHIA, 2005; ROUGHLEY und LEE, 1994).

In humanem Gelenkknorpel kommen die Bindungsproteine in den drei Isoformen BP1, BP2 und BP3 vor, die alle von demselben strukturellen Gen abstammen (DEAN et al., 2003). Ihr aus 339 Aminosäuren bestehendes Kernprotein (DUDHIA und HARDINGHAM, 1990) ist bei BP3 am Aminoende durch proteolytische Spaltung zwischen His16 und Ile17 um 16 Aminosäuren verkürzt (DEAN et al., 2003). Die Entfernung dieser 16 Aminosäuren hat jedoch keinerlei negative Auswirkungen auf die Stabilisierung der Aggrekan-Hyaluronsäure-Aggregate. Aufgrund proteolytischer Spaltungen an BP1 und BP2 durch die Matrixmetalloproteinase Stromelysin kommt es mit zunehmendem Alter zu einem Anstieg von BP3 am Gesamtgehalt der Bindungsproteine des humanen Gelenkknorpels (DEAN et al., 2003).

Die Angaben über das Gesamtmolekulargewicht der Proteoglykanaggregate in der Literatur divergieren sehr stark und liegen zwischen  $100\text{--}200 \times 10^6$  Da (LOHMANDER, 1988; VANWANSEELE et al., 2002) und  $500 \times 10^6$  (KUETTNER, 1992), bzw. bis zu 1 Milliarde (DUDHIA, 2005). COHEN et al. (1998) hingegen berichten von bis zu  $2 \times 10^5$  kDa und mehr. Diese starke Variabilität wird durch mehrere Faktoren hervorgerufen: Zum einen variiert die Anzahl an Monomeren von bis zu 200 (DOEGE et al., 1991; KUETTNER, 1992) bzw. 300 Aggrekanmolekülen pro Aggregat (BUCKWALTER und MANKIN, 1997) sowie die Länge des Hyaluronsäurefadens zwischen weniger als 100 nm und mehr als 10.000 nm (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988). Beide stehen jedoch miteinander im Zusammenhang, da die Zahl der Aggrekanmoleküle mit zunehmender Hyaluronsäurelänge steigt (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988).

Zum anderen unterscheiden sich die Längen der angelagerten Aggrekanmonomere (zw. 100 und 400 nm) (ROSENBERG et al., 1975) und die Abstände zwischen den Monomeren innerhalb der Aggregate. Letztere liegen bei durchschnittlich etwa 29 nm (ROSENBERG et al., 1975), steigen aber mit zunehmender Aggregatgröße etwas an. Die Längenunterschiede der Monomere hängen hauptsächlich von der variablen Länge ihrer dicken, CS-reichen Region ab. Betrachtet man nämlich unterschiedlich lange Monomere, so steigt die Länge der dicken Segmente mit zunehmender Gesamtlänge des Monomers, während die Länge der dünnen (KS-reichen) Segmente gleich bleibt (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988).

**Tab. 5:** Maße aus 7 Proteoglykanaggregaten von bovinem Gelenkknorpel des proximalen Humerus. Aus ROSENBERG et al. (1975).

Monomer- länge in nm	HS-Länge in nm	Monomere pro Aggregat	HS-Länge pro Monomer in nm	MG der HS <sup>a</sup> x10 <sup>-5</sup>	MG der Aggregate <sup>b</sup> x10 <sup>-6</sup>
228	447	19	24	1,9	29
208	973	44	22	4,1	66
212	1242	40	31	5,2	60
199	1494	75	20	6,2	113
255	1723	77	22	7,2	116
245	2259	70	32	9,4	106
235	4165	140	30	17,4	212

<sup>a</sup> bezüglich einem Molekulargewicht von 416 und 1 nm als Länge der sich wiederholenden Disaccharideinheit. <sup>b</sup> bezüglich der Summe der Molekulargewichte der Hyaluronsäure und der Gesamtzahl von Monomeren pro Aggregat, ein durchschnittliches Molekulargewicht der Monomere von  $1,5 \times 10^6$  benutzend. HS - Hyaluronsäure; MG – Molekulargewicht.

Auch die Bindungsproteine haben Auswirkungen auf die Aggregatgröße. Experimente in vitro zeigen, dass Bindungsproteine die Aggregate nicht nur stabilisieren, sondern auch zu einer Größenzunahme führen. Aggregate, die in Anwesenheit von Bindungsproteinen gebildet werden, sind deutlich länger und bestehen aus mehr Monomeren pro Aggregat als solche, die ohne Bindungsproteine gebildet wurden. Bei einer Konzentration des Bindungsproteins von 20% entstehen die größten Aggregate. Außerdem wird mit zunehmender Konzentration an Bindungsproteinen der Abstand zwischen den einzelnen Monomeren innerhalb des Aggregates regelmäßiger, was möglicherweise daran liegt, dass bei geringer Konzentration auch weniger Monomere pro Aggregat vorkommen. Auf diese Weise kann es zum Zusammenbruch oder Aufwickeln des zentralen Hyaluronsäurefadens kommen und somit zu Unregelmäßigkeiten in den Abständen (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988).

Aufgrund dieser Unterschiede gibt es zwei Populationen von Proteoglykanaggregaten: eine langsam sedimentierende mit geringem CS-Hyaluronsäure-Verhältnis und wenigen Monomeren pro Aggregat und eine schneller sedimentierende Population mit höherem CS-Hyaluronsäure-Verhältnis und einer höheren Monomeranzahl pro Aggregat (PITA et al., 1990). Erstgenannte befinden

sich hauptsächlich in den oberflächlichen Knorpelregionen, während in den tieferen Regionen beide Populationen anzutreffen sind (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Die Aggregatbildung der Aggrekanmoleküle ist für die Knorpelfunktion von essentieller Bedeutung, da die Proteoglykanaggregate aufgrund ihrer Größe im Kollagenetz immobilisiert werden und somit eine hohe Proteoglykankonzentration im Gewebe gehalten wird (LOHMANDER, 1988). Die Hyaluronsäurefäden der Aggregate bilden außerdem ein Gitterwerk, das von Kollagenfibrillen durchsetzt ist (ROUGHLEY und LEE, 1994).

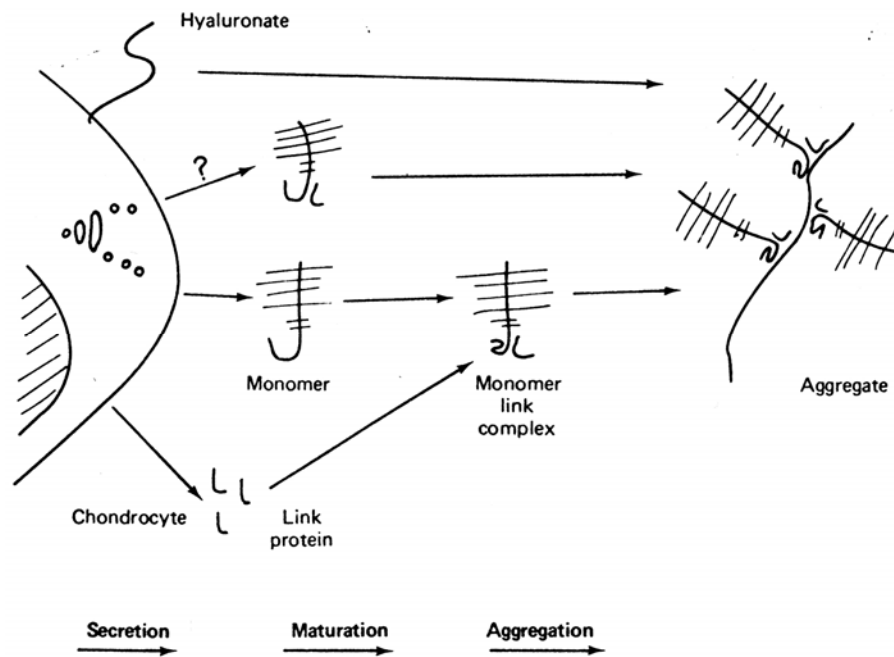
Die Proteoglykanaggregate sind aufgrund ihrer Struktur anfällig für Proteasen, die an den Hyaluronsäure-Bindungsstellen der Aggrekane und Bindungsproteinen angreifen, während die Hyaluronsäure selbst durch Substanzen, die freie Sauerstoffradikale bilden, geschädigt wird. Bereits ein geringer Abbau von Hyaluronsäure reduziert die Größe der Aggregate so, dass die Effektivität ihrer Immobilisierung im kollagenen Netz deutlich verringert wird (MUIR, 1995).

### Aggregatbildung

Die in den Chondrozyten synthetisierten Aggrekanmoleküle und Bindungsproteine werden aus den Knorpelzellen durch Exostose sezerniert. Die Hyaluronsäure hingegen wird direkt durch die Plasmamembran in den perizellulären Raum ausgeschleust (ROUGHLEY und LEE, 1994; WEIGEL, 2002) und bindet dort teilweise an ihren Zelloberflächenrezeptor CD44 (DUDHIA, 2005). In der extrazellulären Matrix erfolgt dann die spontane Zusammenlagerung zu Aggregaten (COHEN et al., 1998), die aus der perizellulären Matrix nicht mehr weg diffundieren können (DUDHIA, 2005) (siehe Abbildung 27).

Einige der frisch sezernierten Aggrekanmoleküle zeigen anfangs eine geringe Affinität für Hyaluronsäure und somit auch zur Aggregatbildung. Sie sind metabolisch aktiver als die Aggrekanmoleküle höherer Affinität, in die sie dann später innerhalb der Matrix umgewandelt werden (DUDHIA, 2005). Laut MELCHING und ROUGHLEY (1990) beträgt der Grad der Wechselwirkung mit Hyaluronsäure bei 4-Stunden-alten Chondrozyten in vitro nur 5-50% verglichen mit dem reifer Aggrekane. Diese verzögerte Aggregation scheint nicht nur bei älterer Matrix oder Chondrozyten vorzukommen, sondern ist auch im Knorpel Neugeborener anzutreffen (MELCHING und ROUGHLEY, 1990). Durch sie wird sichergestellt, dass neu sezernierte

Aggrekanmoleküle von den Zellen weg diffundieren können, um erst an weiter von den Zellen entfernt liegenden Matrixregionen durch die Bindung an Hyaluronsäure immobilisiert zu werden (BAYLISS et al., 2000; MUIR, 1995; MELCHING und ROUGHLEY, 1990).



**Abbildung 27:** Vermutlicher Mechanismus der Proteoglykanaggregation. Aus LOHMANDER (1988).

Ein derartiger Mechanismus lässt vermuten, dass auch frisch sezernierte Bindungsproteine zuerst kaum mit Hyaluronsäure interagieren. Da sich die Struktur von Bindungsprotein und Hyaluronsäure-bindender Region der Aggrekane ähneln, ist es möglich, dass die neu synthetisierten Bindungsproteine ebenfalls einem Reifungsprozess unterliegen (MELCHING und ROUGHLEY, 1990).

Die Mechanismen dieser Reifung sind noch nicht vollständig geklärt. Es sind aber wahrscheinlich sowohl steigende Disulfidbrückenbildungen als auch Konformationsänderungen der Hyaluronsäure-bindenden Region des Kernproteins daran beteiligt (LOHMANDER, 1988). In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Stabilisierung der interaktiven Konformation. Der Umformungsprozess erfolgt mit zunehmendem Alter langsamer (MUIR, 1995), ist jedoch in unreifem sowie reifem Knorpel anzutreffen (MELCHING und ROUGHLEY, 1990).

In vitro scheinen Bindungsproteine die anfängliche Veränderung der Hyaluronsäure-bindenden Region neu synthetisierter Proteoglykan-Untereinheiten zu beschleunigen und auf diese Weise stärkere Interaktionen mit Hyaluronsäure zu ermöglichen. Da

die Proteoglykane und Bindungsproteine in denselben Golgi-Vesikeln der Chondrozyten angetroffen werden, befinden sie sich nach der Sekretion in enger Nachbarschaft (MELCHING und ROUGHLEY, 1990).

Der zweite Schritt der Konversion hängt von den Umgebungsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Zeit und wahrscheinlich weiteren Faktoren ab. Bei höherer Temperatur und physiologischem pH interagieren die Proteoglykan-Untereinheiten besser. Der Einfluss des Bindungsproteins ist jedoch stärker als der des pH-Wertes (MELCHING und ROUGHLEY, 1990).

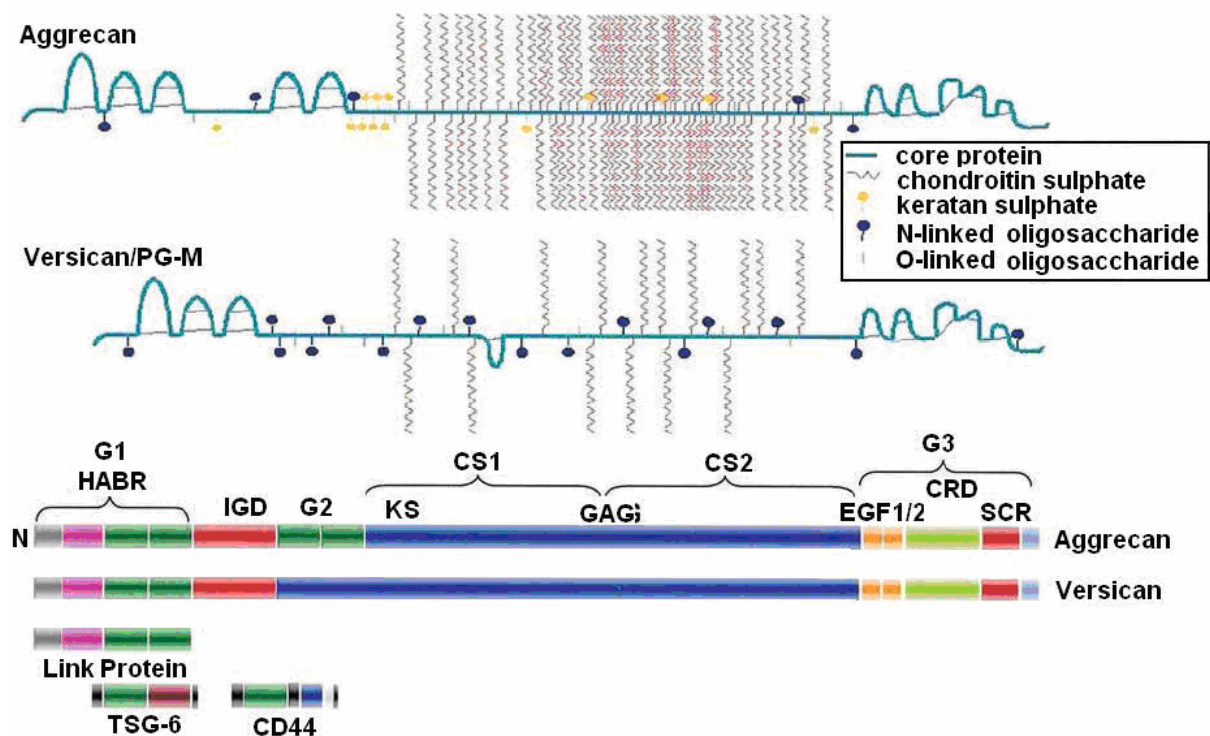
Die Aggregatbildung selbst beginnt in der Matrix wahrscheinlich mit der Verbindung des Bindungsproteins mit der A-Schleife der G1-Region des Kernproteins. Dieser Komplex reagiert dann mit Hyaluronsäure zur Bildung eines stabilen Aggregats. Die Bindung von Bindungsprotein und Hyaluronsäure an die G1-Region der Aggrekane verursacht dort vermutlich Konformationsänderungen, die zur Stabilisierung der gesamten Verbindung führen (LOHMANDER, 1988). Die drei Bestandteile sind auf diese Weise so fest miteinander verbunden, dass ihre Dissoziation unmessbar gering ist (MUIR, 1995).

#### 1.2.4.2.2.3.2 Versikan

Lange Zeit konnte Versikan im Gelenkknorpel nicht nachgewiesen werden und war als zweites aggregierendes Proteoglykan nur im fibrösen Bindegewebe bekannt (OLDBERG et al., 1990). Inzwischen konnte Versikan in Gelenkknorpel immunologisch und biochemisch in jedem Altersstadium nachgewiesen werden. Während sein Gehalt in der fetalen Phase noch relativ hoch ist, sinkt die Transkription seines Gens post partum jedoch dramatisch ab. Versikan befindet sich hauptsächlich in der interterritorialen Matrix der Gelenkoberfläche, wo es wahrscheinlich spezifische Aufgaben innehat, die sich von denen des in den tieferen Knorpelzonen vorkommenden Aggrekans unterscheiden (MATSUMOTO et al., 2006).

GROVER und ROUGHLEY (1993) zählen das Proteoglykan Versikan zu den kleinen Proteoglykanen, obwohl die Größe seines Kernproteins, abgesehen vom Fehlen seiner G2-Domäne, der des Aggrekans ähnelt (MATSUMOTO et al., 2006; WATANABE et al., 1998). Sein Kernprotein besitzt ebenfalls die N- und C-terminalen globulären Domänen G1 und G3 und zwei CS-Domänen. Im Vergleich zu Aggrekan sind jedoch mit bis zu 20 CS-Ketten deutlich weniger angelagert und ihre

Sulfatierung ist ebenfalls wesentlich geringer. Die G1-Domäne besteht aus den Schleifen A, B und B' und bindet sowohl an Hyaluronsäure als auch an Bindungsprotein. Auf diese Weise kann es im Gelenkknorpel ebenfalls Aggregate bilden. Seine C-terminale G3-Domäne kann an HS-Proteoglykane, Fibronectin sowie Fibulin-1 und -2 binden. Da das in der extrazellulären Knorpelmatrix vorkommende Fibulin-1 mit dem Latent TGF $\beta$ -Binding Protein-1 (LTBP-1) interagiert, reguliert Versikan auf diesem Weg möglicherweise bei TGF $\beta$ -medierten Informationsübermittlungen mit (MATSUMOTO et al., 2006).



**Abbildung 28:** Modulare Struktur der Hyaloaderine. Das Fehlen der G2-Domäne und die geringere Anzahl an CS-Ketten sind die auffälligsten Erscheinungen beim Versikan. N – aminotermiales Ende des Kernproteins; HABR – Hyaluronsäure bindende Region; IGD – Interglobuläre Domäne; GAG – GAG-Anlagerungsregion; KS – KS-Anlagerungssegment; CS1 und CS2 – CS-Region1 und 2; EGF1/2 – epidermal Fibroblast Growth Factor-ähnliches Modul1 und 2; CRD – Carbohydrate Recognition Modul; SCR – Short Complement-Recognition module. Aus DUDHIA et al. (2005).

#### 1.2.4.2.2.3.3 Kleine Proteoglykane

Dekarin, Biglykan und Fibromodulin gehören zur Familie der kleinen Leucin-reichen Proteoglykane (KNUDSON und KNUDSON, 2001). Außerdem können noch Perlekan (GROVER und ROUGHLEY, 1993; IOZZO et al., 1994; ROUGHLEY, 2001b), das Superficial Zone Protein (SZP) (KRISHNAN et al., 2004; ROUGHLEY, 2001b; SCHUMACHER et al., 1999) sowie das Cartilage Intermediate Layer Protein

(CILP) zu den kleinen Proteoglykanen gezählt werden (FLANNERY et al., 1999; ROUGHLEY, 2001b). Wie bereits erwähnt, kann auch Kollagen IX als Proteoglykan betrachtet werden, da seine  $\alpha 2(\text{IX})$  Kette eine GAG-Kette tragen kann.

**Tab. 6:** Die kleinen Proteoglykane des Gelenkknorpels.

<b>Proteoglykan</b>	<b>Größe</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Funktion</b>
Dekarin	40 kDa	ITM; an Kollagenfasern großen Durchmessers	Beeinflussung Kollagenstoffwechsel; Hemmung lateralen KF-Wachstums
Biglykan	knapp 100 kDa	perizellulär	Beeinflussung Zellanlagerung u. – Proliferation
Fibromodulin	50-65 kDa	an KF angelagert	evtl. Regulierung der KF-Zusammensetzung u. deren Aufrechterhaltung
Perlekan	466 kDa	perizellulär; ggr. ITM	Vermittlung von Zell-Matrix-Wechselwirkungen
SZP	345 kDa	OKZ; Synovialhöhle	Gelenkschmierung; Bindung von Matrixkomponenten
CILP	unbekannt	mittlere Knorpelschicht	unbekannt
Kollagen IX	Helixlänge 150 nm	Oberfläche heterotypischer KF	Aufrechterhaltung der Kollagennetz-Integrität; Kontrolle des KF-Durchmessers

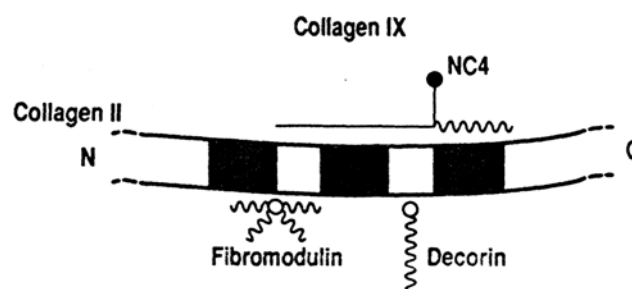
ITM – interterritoriale Matrix; OKZ – Oberflächliche Knorpelzone; KF – Kollagenfibrillen.

Alle Moleküle dieser Proteoglykanfamilie besitzen die Fähigkeit, mit Kollagen zu reagieren (ROUGHLEY und LEE, 1994). Ihre Konzentration im Gelenkknorpel ist gering, steigt aber mit zunehmendem Alter besonders in der oberflächlichen Knorpelschicht an (KUETTNER, 1992). BURTON-WURSTER et al. (2003) geben das Verhältnis der drei kleinen Hauptproteoglykane zueinander im Knorpel wie folgt an: Dekarin ist das häufigste Proteoglykan. Bezogen darauf kommt Biglykan mit 25-40% und Fibromodulin mit 7-15% relativ deutlich weniger vor. Laut CS-SZABO et al. (1997) beträgt im Knorpel erwachsener Menschen das Verhältnis der mRNS von Dekarin:Biglykan:Fibromodulin 158:8:1.

Während die Proteinstruktur der kleinen Proteoglykane große Ähnlichkeiten aufweist, unterscheiden sie sich jedoch bezüglich ihrer GAG-Zusammensetzung und Funktion (KUETTNER, 1992). Im Elektronenmikroskop erscheinen sie als getrennte globuläre Einheiten, die sich möglicherweise miteinander verbinden (ROUGHLEY und LEE,

1994). Sie haben kürzere Kernproteine als die Aggrekane und sind nicht direkt am mechanischen Verhalten des Gewebes beteiligt, können aber mit anderen Makromolekülen innerhalb der Matrix interagieren.

Dekorin und Fibromodulin verbinden sich über ihr Kernprotein mit der Oberfläche von Typ-II-Kollagenen, wodurch sie an der Organisation und Stabilisierung dieses Gerüsts beteiligt sind (HEDBOM und HEINEGARD, 1989 und 1993; HEDLUND et al., 1994). Da außerdem vor jeder Vergrößerung des Fibrillendurchmessers eine selektive Beseitigung dieser Proteoglykane, einschließlich der Typ-IX-Kollagene, erfolgen muss, regulieren sie auf diese Weise auch die Fibrillogenese der Kollagene (KUETTNER, 1992). Zudem spielen sie eine Rolle bei interfibrillären Wechselwirkungen (ROUGHLEY und LEE, 1994). Weiterhin können die kleinen Proteoglykane TGF binden und seine Aktivität im Knorpel beeinflussen (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; YOUNG et al., 2005). Im Gegenzug sind Biglykan und Dekorin empfindlich für TGF $\beta$  und Interleukin1 $\alpha$ , wobei TGF $\beta$  in vitro die Menge an Dekorin senkt und die von Biglykan erhöht (KÄHÄRI et al., 1991).



**Abbildung 29:** Wechselwirkungen zwischen Proteoglykanen und Kollagenfibrillen. Die Kernproteine der Proteoglykane sind globulär dargestellt, die GAG-Ketten als wellenförmige Linien. Die Kollagen-II-Fibrille ist quergestreift mit N- und C-terminalen Enden. Kollagen IX enthält zusätzlich zur zentralen GAG-Kette und der N-terminalen globulären Region (NC4) eine gestreckte tripelhelikale Domäne. Aus ROUGHLEY und LEE (1994).

Die beiden Proteoglykane Dekorin und Biglykan unterscheiden sich in Größe (monomeres Molekulargewicht von 67 kDa, bzw. fast 100 kDa), Struktur des Kernproteins und immunologischen Eigenschaften. Außerdem besitzt Dekorin eine, Biglykan zwei Dermatansulfatketten (KUETTNER, 1992), die sich alle in der aminoterminalen Region des Kernproteins befinden (ROUGHLEY, 2001b). Während bei Dekorin keine altersbedingten Veränderungen festzustellen sind, wird bei Biglykan die aminoterminalen Region inklusive der DS-Kette durch altersbedingte proteolytische Prozesse abgespalten. Diese Biglykan-Fragmente akkumulieren mit

dem Alter in der Knorpelmatrix, wobei die funktionellen Konsequenzen noch unklar sind (ROUGHLEY, 2001b).

Biglykan und Dekorin sind sowohl direkt an den Kollagenfasern als auch in deren Nähe anzutreffen. Sie kommen aber auch zwischen den Fasern in Verbindung mit eher globulären Matrixstrukturen vor. Beide können entlang derselben Kollagenfaser lokalisiert sein, wobei sie bisher nicht innerhalb derselben Faserregion beobachtet und auch keine Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen ihnen gefunden wurden. Die Konzentration beider nimmt mit zunehmender Knorpeltiefe ab (MIOSEGE et al., 1994).

**Tab. 7:** Lichtmikroskopische Verteilung von Dekorin und Biglykan in den verschiedenen Knorpelschichten. Aus MIOSEGE et al. (1994).

Struktur	Knorpelschicht	Dekorin	Biglykan
Chondrozyt	Oberflächenschicht	++	-
	Zwischenschicht	++	-
	tiefe Schicht	++	-
Perizelluläre Matrix	Oberflächenschicht	-	+++
	Zwischenschicht	-	+
	tiefe Schicht	-	+
Interterritoriale Matrix	Oberflächenschicht	+++	-
	Zwischenschicht	+	-
	tiefe Schicht	+++	-
Tidemark		+	++

+++ = sehr starke Reaktion; ++ = starke Reaktion; + = schwache Reaktion; - = keine Reaktion.

Dekorin ist hauptsächlich in der interterritorialen Matrix anzutreffen (BIANCO et al., 1990; MIOSEGE et al., 1994), während sich der Großteil des Biglykans in der perizellulären Matrix befindet (MIOSEGE et al., 1994). Diese Lokalisationen stimmen mit ihren vermuteten biologischen Funktionen überein, wie zum Beispiel die Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels durch Dekorin (MIOSEGE et al., 1994) sowie die Zellanlagerung und Proliferation durch Biglykan (BIANCO et al., 1990). Außerdem binden sowohl Dekorin als auch Biglykan an Fibronectin. Weiterhin schränken sie generell Zelladhäsion, Migration und Gerinnung ein. Auf diese Weise

hemmen sie Reparationsprozesse und sind eventuell an der Pathogenese von Osteoarthritis beteiligt (KUETTNER, 1992).

### Dekarin

Humanes Dekarin ist das Produkt eines Gens aus acht Exons auf dem Chromosom 12. Die mRNA des Dekarins codiert ein Präpro-Kernprotein aus 360 Aminosäuren, das in verschiedene strukturelle Domänen unterteilt werden kann (RAMAMURTHY et al., 1996):

- 1) Eine kurze Sequenz aus 16 Aminosäuren, die das Protein zum rauen endoplasmatischen Retikulum leitet,
- 2) ein Propeptid aus 14 Aminosäuren unbekannter Funktion, das dem reifen Dekarinmolekül fehlt,
- 3) eine GAG-Akzeptorregion,
- 4) eine globuläre hypervariable Cystein Domäne,
- 5) eine Leucin-reiche Domäne, die den Hauptteil des Kernproteins und drei Anlagerungsstellen für N-gebundene Oligosaccharide umfasst, sowie
- 6) eine carboxyterminale globuläre Domäne.

Das reife Kernprotein besteht aus 329 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa (RAMAMURTHY et al., 1996). Seine zentrale Domäne (IOZZO, 1997) besitzt 8 bis 12 homologe Leucin-reiche Tandemwiederholungen aus 20 bis 29 Resten mit Leucin in konservierten Positionen. Die Wiederholungen nahe dem Amino- und Carboxyende werden von Disulfidschlaufen flankiert und stellen möglicherweise eine spezialisierte Subgruppe innerhalb einer Leucin-reichen Überfamilie dar (RAMAMURTHY et al., 1996). Die zentrale Region des Kernproteins kann zwei oder drei N-gebundene Oligosaccharide enthalten. Außerdem besitzt Dekarin eine einzige GAG-Kette aus Dermatan- oder Chondroitinsulfat, die mit dem Serin des Restes 4 verbunden ist (ROUGHLEY und LEE, 1994).

Das Kernprotein von Dekarin ist bogenförmig (WEBER et al., 1996). An der inneren konkaven Oberfläche ist ein einzelnes tripelhelikales Kollagenmolekül an Teilen der zentralen Domäne und wahrscheinlich auch am Carboxyende des Kernproteins angelagert. Dadurch ist die nahe dem NH<sub>2</sub>-Ende lokalisierte GAG-Seitenkette relativ frei, kann sich in verschiedene Richtungen ausrichten und eventuell Wechselwirkungen mit extrafibrillären Strukturen eingehen (HAGG et al., 1998).

Die Sekundärstruktur, die für einige der Wechselwirkungen mit den Kollagenfibrillen essentiell ist, besteht zu 54% aus  $\beta$ -Faltblatt, 14%  $\beta$ -Schleifen, 12%  $\alpha$ -Helix und 20% wahllosen Knäuel. 70% des Dekorins haben also einen hohen Gehalt an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, was mengenmäßig dem Anteil der Leucin-reichen Domäne des Kernproteins entspricht (RAMAMURTHY et al., 1996).

Aufgrund von Größenunterschieden, die wahrscheinlich auf verschiedenen langen CS-Ketten mit unterschiedlicher Disaccharidzusammensetzung basieren, können die Dekorinmoleküle in zwei verschiedene Spezies unterteilt werden. Auch die Kernproteine kommen in zwei unterschiedlichen Formen, bei denen zwei bzw. drei N-gebundene Oligosaccharide an der langen zentralen Leucin-reichen Region angelagert sind. Obwohl es unwahrscheinlich ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die unterschiedlich langen GAG-Ketten auch an den unterschiedlichen Kernproteinen befinden (RAMAMURTHY et al., 1996).

Im Gegensatz zu Biglykan ist Dekorin nicht in der perizellulären Matrix, sondern fast ausschließlich in der interterritorialen Matrix, jedoch auch in zytoplasmatischen Vesikeln der Chondrozyten anzutreffen. Der Grund dafür liegt darin, dass Dekorin hauptsächlich an der Fibrillenoberfläche dicker Fibrillen mit einem Durchmesser von mehr als 26 nm vorzufinden ist, nicht aber an dünnen Fibrillen, die in den perizellulären Kompartimenten dominieren. Manchmal ist es auch zusammen mit Kollagen IX an Fibrillen mittleren Faserdurchmessers angelagert. Ein signifikanter Anteil des Dekorins ist jedoch nicht Fibrillen-assoziiert, sondern scheint sich in makromolekularen Aggregaten zu befinden (HAGG et al., 1998).

Die Konzentration von Dekorin ist in der oberflächlichen Knorpelschicht am stärksten, nimmt mit zunehmender Knorpeltiefe ab und wird in der tiefen Knorpelschicht wieder stärker. In der Tidemark liegt es in schwacher Konzentration vor (FLEISCHMAJER et al., 1991).

Die funktionellen Eigenschaften von Dekorin stehen in enger Verbindung mit seiner Fähigkeit mit Kollagenfasern vom Typ II reagieren zu können. Diese Eigenschaft wird durch das Kernprotein vermittelt und erfolgt auch in Abwesenheit der Region, die die GAG-Kette trägt (ROUGHLEY und LEE, 1994). Außerdem kann es auch an Kollagenfasern vom Typ I und VI binden (RAMAMURTHY et al., 1996).

Die Anlagerung des Dekorins verleiht den Kollagenfibrillen ihr „dekoriertes“ Aussehen im Elektronenmikroskop (ROUGHLEY und LEE, 1994). Die Bindung erfolgt über nicht kovalente, proteinabhängige Wechselwirkungen mit der Fibrillenoberfläche und zwar zu etwa 85% an spezifische Bindungsstellen in der Zwischenzone innerhalb der D-Periode (HAGG et al., 1998).

Die genaue Funktion des Dekorins in situ ist noch unklar. Es wird jedoch angenommen, dass Dekorin den Turnover der Kollagenfasern kontrolliert, mit denen es verbunden ist (FLEISCHMAJER et al., 1991; MIOSGE et al., 1994). In vitro kann Dekorin nämlich sowohl das Ausmaß der Fibrillogenese von Kollagen II als auch den Fibrillendurchmesser beeinflussen. Es verzögert die Fibrillogenese und führt durch Hemmung des radialen Wachstums zu dünneren Fasern (RAMAMURTHY et al., 1996). Außerdem hemmt es die Mineralisation des Knorpels (MIOSGE et al., 1994). Vermutet wird auch eine Beteiligung an der dichten Lagerung der Kollagenfibrillen über eine gegenseitige Verbindung der DS-Ketten der Dekorinmoleküle benachbarter Kollagenfibrillen. Stimmt diese Annahme, so könnte eine Beeinträchtigung der DS-Synthese zu Funktionsstörungen des ganzen Moleküls führen (ROUGHLEY und LEE, 1994).

Dekorin bindet außerdem an TGF $\beta$  und könnte somit auch für die gemeinsame Regulierung von zellulärem Wachstum und Differenzierung durch Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix von Bedeutung sein (HEDBOM et al., 1992).

### Biglykan

Biglykan wird durch ein Gen aus acht Exons kodiert, das bei Menschen am X Chromosom sitzt. Sein Kernprotein besteht aus 331 Aminosäuren. Der strukturelle Hauptunterschied zu Biglykan ist die Anwesenheit von zwei GAG-Ketten. Hierbei handelt sich um die GAGs Dermatansulfat oder Chondroitinsulfat, die in humanem Gelenkknorpel am Serin der Aminosäurenreste 5 und 10 sitzen. Möglicherweise existieren auch „Uniglykan“-Formen des Moleküls, bei denen nur eine der beiden genannten Stellen besetzt ist (ROUGHLEY und LEE, 1994).

Die Konzentration von Biglykan nimmt im Gelenkknorpel mit zunehmender Knorpeltiefe kontinuierlich ab. In der tiefen Schicht ist es nicht mehr feststellbar, während es in der Tidemark in hoher Konzentration vorliegt (MIOSGE et al., 1994). Im Gegensatz zu Dekorin befindet es sich hauptsächlich in der perizellulären Matrix,

ist aber auch in der interterritorialen Matrix anzutreffen. In der perizellulären Matrix, die besonders reich an Kollagen VI und Hyaluronsäure ist, wird durch Wechselwirkungen ein Netzwerk um die Zellen gebildet, an dessen Zusammensetzung Biglykan möglicherweise durch Reaktion mit Kollagen VI mitwirken kann. Seine genaue Funktion ist jedoch noch nicht geklärt, da Biglykan die Fibrillogenese nicht zu beeinflussen scheint (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; ROUGHLEY und LEE, 1994). MIOSGE et al. (1994) halten eine Rolle bei zellulären Aktivitäten, wie zum Beispiel Zellanlagerung und Beteiligung bei der Kontrolle der Chondrozytenproliferation, für wahrscheinlich.

### Fibromodulin

Fibromodulin hat ein Molekulargewicht zwischen 50 und 65 kDa (KUETTNER, 1992). Sein Kernprotein besteht aus 357 Aminosäuren und ist strukturell mit dem von Biglykan und Dekorin verwandt. Fibromodulin besitzt ebenfalls sowohl am Amino-, als auch am Carboxyende globuläre Domänen (KUETTNER, 1992; ROUGHLEY, 2001b), zwischen denen seine zentrale Leucin-reiche Region mit vier N-gebundenen KS-Seitenketten liegt (PLAAS et al., 1990). Im Unterschied zu Biglykan und Dekorin besitzt es keine einheitliche Sequenz für das Anheften von GAGs in der Nähe seines Aminoendes, an dem sich statt dessen eine Reihe sulfatierter Tyrosinreste befinden (KUETTNER, 1992). Fibromodulin enthält nur während des fetalen und juvenilen Stadiums KS-Ketten. Im reifen Knorpel hingegen ist es ausschließlich als Glykoprotein ohne die KS-Ketten anzutreffen (ROUGHLEY, 2001b).

So wie Dekorin besitzt auch Fibromodulin die Fähigkeit, mit Kollagenfibrillen reagieren zu können (ROUGHLEY, 2001b; ROUGHLEY und LEE, 1994). Es ist entlang der Kollagenfibrillen verteilt und über sein Kernprotein mit ihnen verbunden (HEDLUND et al., 1999). Seine Funktion ist jedoch auch noch unklar. Es könnte eine Rolle in der Limitierung der Interaktionen zwischen den Kollagenfibrillen spielen und auf diese Weise die Funktion von Dekorin einschränken (ROUGHLEY und LEE, 1994). Das stark glykosylierte Fibromodulin reguliert möglicherweise auch die Zusammensetzung und Aufrechterhaltung der Kollagenfibrillen. Es wird postuliert, dass sowohl das Ausmaß der Glykosylierung, als auch die KS-Ketten mit ihrer Variabilität in Länge und Grad an Sulfatierung verantwortlich für seine Rolle in der Knorpelmatrix sind (KUETTNER, 1992).

## Kollagen IX

Wie im Kapitel „Kollagentypen“ bereits besprochen, kann Kollagen IX auch als nicht-aggregierendes Proteoglykan betrachtet werden, da seine  $\alpha 2(\text{IX})$ -Kette eine CS- oder DS-Kette in der NC3-Region besitzen kann (SHAW und OLSEN, 1991). Die Anlagerungsstelle der NC3-Region unterscheidet sich von der anderer Proteoglykane, da sie meist aus Serin-Alanin statt aus Serin-Glycin besteht (ROUGHLEY und LEE, 1994). Obwohl noch unklar ist, welcher Anteil an Kollagen-IX-Molekülen in Form von Proteoglykanen im Gelenkknorpel vorliegt, scheinen die meisten der Kollagen-IX-Moleküle im Knorpel von Säugetieren jedoch keine GAG-Ketten angelagert zu haben. Ob die Anwesenheit der GAG-Kette die Funktion dieser Moleküle verändert, ist ebenfalls noch nicht bekannt (AYAD et al., 1991).

Die Kollagen-IX-Moleküle sitzen an der äußeren Oberfläche der Kollagenfibrillen und konkurrieren dort mit Decorin und Fibromodulin um den Platz (ROUGHLEY und LEE, 1994). Ihre NC4-Domäne ragt aus der Fibrilloberfläche heraus und dient als Interaktionsstelle zwischen benachbarten Kollagenfibrillen oder für verstreute Proteoglykane (SMITH und BRANDT, 1992).

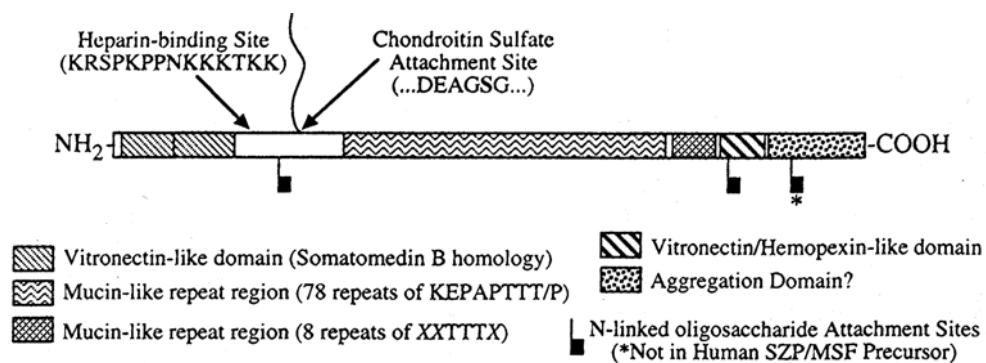
## Superficial Zone Protein (SZP)

Ebenfalls zu den Proteoglykanen gehört das erstmals 1994 von SCHUMACHER et al. beschriebene Oberflächenprotein superficial zone protein (SZP). Es wird ausschließlich von den Knorpelzellen der Gelenkoberfläche (KRISHNAN et al., 2004; SCHUMACHER et al., 1999) und einigen Synovialzellen synthetisiert, die sich in den Villi der Synovia von einfachen Gelenken befinden (ROUGHLEY, 2001b; SCHUMACHER et al., 1999), nicht jedoch von Chondrozyten der mittleren oder tiefen Knorpelzonen. Die Chondrozyten der Oberflächzone synthetisieren und erhalten nämlich eine spezialisierte Matrix aufrecht, die eine vitale Rolle bei der Bewahrung der Gelenkintegrität spielt und als Schutzbarriere für die tieferen Lagen agiert. Dazu gehört auch die Expression des SZP, das bei physiologischem Stoffwechsel sowohl die Zellanlagerung an der Gelenkoberfläche verhindert als auch dem Erhalt der schmierenden Eigenschaften an der Grenze zwischen Knorpel und Synovialflüssigkeit dient (FLANNERY et al., 1999; ROUGHLEY, 2001b).

SZP ist mit dem in der Synovialflüssigkeit vorkommenden und für die Schmierung der Gelenkknorpel zuständigen Glykoprotein Lubricin homolog (FLANNERY et al., 1999; JAY et al., 2001; ROUGHLEY, 2001b). Sie besitzen dieselbe Primärstruktur,

differieren jedoch in ihren posttranslationalen Modifikationen. Im Gegensatz zu Lubricin besitzt SZP ein höheres Molekulargewicht (etwa 345 kDa) sowie kleine Mengen an KS und CS (FLANNERY et al., 1999; JAY et al., 2001).

Es weist eine bei Mensch und Rind weitgehend übereinstimmende Aminosäurezusammensetzung auf. Die am Kernprotein angelagerten CS- und KS-Ketten sind, verglichen mit denen der anderen Proteoglykane, nur relativ kurz. Im Gegensatz zu den anderen Proteoglykanen, die in der extrazellulären Matrix zurückgehalten werden, wird der Hauptteil des SZP nach seiner Synthese von den Chondrozyten in die Umgebung, in vivo also in die Synovialhöhle sezerniert, und nur ein kleiner Teil akkumuliert in der oberflächlichen Knorpelmatrix (FLANNERY et al., 1999; ROUGHLEY, 2001b). Die Synthese des SZP in den Chondrozyten wird durch Interleukin1 gehemmt, während sie durch TGF $\beta$  und IGF1 gesteigert wird (FLANNERY et al., 1999).



**Abbildung 30:** Schematische Struktur des SZP, basierend auf biochemischen Analysen und Primärsequenz Information. Die funktionellen Domänen sind durch gemusterte Boxen angezeigt und zusätzlich die Sequenzen und/oder Stellen, die in Kohlenhydratbindung oder -substitution involviert sind. Aus FLANNERY et al. (1999).

Sowohl am Cystein-reichen Amino- als auch am Carboxyende enthält SZP strukturelle Motive, die ihm möglicherweise zellproliferative und matrixbindende Eigenschaften vermitteln. Außerdem enthält die C-terminale Region eine ungleichmäßige Anzahl von Cysteinresten, die eventuell die Umstellung von Disulfidbrücken erleichtern und selbstaggregierende Eigenschaften hervorrufen. Selbstaggregation wäre eine Erklärung für das Einfangen der sezernierten SZP an der Grenzfläche zwischen Gelenkknorpel und Synovialhöhle (FLANNERY et al., 1999).

Das Kernprotein besitzt bis zu drei potentielle Stellen (...NXS/T...) für die Substitution mit N-gebundenen Oligosacchariden (an Asn 206, Asn 1.159 und Asn 1.289) und ein

Serin als mögliche Anlagerungsstelle (...220DEAGSG225 ) für Chondroitinsulfate. Außerdem enthält SZP auch große und kleine Muzin-ähnliche Domänen. Sie sind reich an O-gebundenen Oligosacchariden und bestehen aus den sich wiederholenden Sequenzen KEPAPTTT/P (76-78 Wiederholungen) und XXTTTX (6-8 Wiederholungen) innerhalb einer zentralen Region aus etwa 940 Aminosäuren. Diese Domänen vermitteln dem SZP wahrscheinlich seine schmierenden Eigenschaften und sind für den Widerstand gegen natürliche Proteolyse von Bedeutung (FLANNERY et al., 1999).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die verschiedenen Strukturen des SZP-Moleküls für dessen verschiedene Funktionen wie Zellproliferation, Zytoprotektion, Schmierung, Selbstaggregation und Matrixbindung stehen.

### Perlekan

Lange Zeit galt Perlekan als Proteoglykan der Basalmembranen des Körpers. Umso überraschender war seine Entdeckung in Wachstumsplatte und Gelenkknorpel, wo Basalmembranen bekanntlicherweise fehlen (GOVINDRAJ et al., 2002; HASSELL et al., 2003; ROUGHLEY, 2001b).

Das Kernprotein von Perlekan besitzt ein Molekulargewicht von 400 kDa bei Mäusen beziehungsweise 466 kDa beim Menschen (HASSELL et al., 2003) und besteht aus fünf Domänen:

Die aminoterminal Domäne I ist einzigartig für Perlekan und besitzt drei Anlagerungsstellen für die HS-Ketten (GOVINDRAJ et al., 2002; HASSELL et al., 2003; MELROSE et al., 2005; TESCHE und MIOSGE, 2004). Domäne IV ist die größte Domäne und enthält bei Mäusen 14 Wiederholungen IgG-ähnlicher Motive, beim Menschen hingegen 21. Dies ist auch der Grund für das höhere Molekulargewicht des humanen Kernproteins (HASSELL et al., 2003). Die carboxyterminale Domäne V enthält 1 bis 2 (GOVINDRAJ et al., 2002) Anlagerungsstellen für GAGs, meist CS-Ketten (HASSELL et al., 2003; MELROSE et al., 2005).

Die Zusammensetzung von Perlekan bezüglich seiner angelagerten GAG-Seitenketten variiert. In Wachstumsplatte und reifem Gelenkknorpel sind sowohl HS-, als auch CS-Ketten angelagert (GOVINDRAJ et al., 2002; HASSELL et al., 2003). Obwohl die HS-Ketten von der Anzahl her überlegen sind, machen die deutlich längeren CS-Ketten 75% des Gesamt-GAG-Gehalts des Perlekanmoleküls in der

Wachstumsplatte aus (GOVINDRAJ et al., 2002). In der Basalmembran hingegen ist das Vorhandensein der CS-Ketten gewebeabhängig (HASSELL et al., 2003).

Perlekan befindet sich hauptsächlich perizellulär, jedoch auch innerhalb der interterritorialen Matrix (HASSELL et al., 2003; MELROSE et al., 2005). Die perizelluläre Lokalisation lässt auf eine wichtige Funktion bei der Kommunikation zwischen Zellen und Matrix, sowie bei der Stabilisierung ihrer Wechselwirkungen schließen (HASSELL et al., 2003; MELROSE et al., 2005; TESCH und MIOGGE, 2004). Perlekan bindet an verschiedene extrazelluläre Matrixmoleküle, wie zum Beispiel die Proteine Fibronektin (HASSELL et al., 2003; MELROSE et al., 2005) und PRELP (Prolin-and Arginin-rich end Leucin-rich Repeat Protein) (MELROSE et al., 2005), und ist damit auch an der Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix beteiligt. Außerdem kann es an Wachstumsfaktoren binden, die wiederum Zellproliferation und -differenzierung während Chondrogenese und enchondraler Ossifikation beeinflussen (GOVINDRAJ et al., 2002; HASSELL et al., 2003; MELROSE et al., 2005; TESCH und MIOGGE, 2004). Die Wichtigkeit von Perlekan für die normale Knorpelentwicklung kann man bei Mäusen beobachten, die genetisch Perlekan-frei sind. Ihre Wachstumsplatten sind unorganisiert und zeigen reduzierte Chondrozytenproliferation und –Differenzierung, sowie eine fehlerhafte enchondrale Ossifikation. Im Laufe der Knorpelentwicklung werden die Störungen der Matrix zunehmend stärker (HASSELL et al., 2003). Außerdem ist bei diesen Mäusen eine fehlerhafte Mineralisierung des hypertrophischen Knorpels festzustellen. Daher scheint Perlekan auch bei der Mineralisierung des Knorpels eine Rolle zu spielen (MELROSE et al., 2005).

Außer den bisher genannten Proteoglykanen wird auch noch das **Cartilage Intermediate Layer Protein (CILP)** erwähnt, das, wie der Name bereits sagt, in der mittleren, nicht aber in der oberflächlichen und tiefen Schicht des Gelenkknorpels vorkommt (FLANNERY et al., 1999; ROUGHLEY, 2001b). Sein Gehalt ist in reifem Knorpel deutlich höher als in juvenilem. CILP hat keine enge strukturelle Verwandtschaft zu den bis dato beschriebenen Proteoglykanen und auch seine Funktion ist noch unbekannt (ROUGHLEY, 2001b).

#### 1.2.4.2.3 Nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine

Die extrazelluläre Matrix des Gelenkknorpels enthält eine Vielzahl nicht-kollagener Proteine und Glykoproteine, von denen bislang noch nicht alle komplett charakterisiert sind (HEDBOM et al., 1992; ROUGHLEY, 2001b). Einige von ihnen, wie zum Beispiel Biglykan, Decorin und Fibromodulin sind mit GAGs substituiert und werden zu den kleinen Proteoglykanen gezählt, während andere keine GAGs besitzen (HEDBOM et al., 1992). Wieder andere stellen Abbauprodukte größerer Vorstufen dar, die aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit anderen Matrixkomponenten akkumulieren (ROUGHLEY, 2001b).

Aufgrund ihrer äußerst unterschiedlichen Strukturen und Funktionen ist es schwierig, gemeinsame Merkmale dieser Molekülgruppe festzulegen. Generell handelt es sich bei den nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen jedoch um Proteine, die über glykosidische Bindungen an Kohlenhydrate geknüpft sind (ROUGHLEY, 2001b). Im Knorpel besteht ihr Hauptanteil aus Proteinen. Der kovalent gebundene Kohlenhydratanteil wird durch Monosaccharidketten gebildet, die mit dem Protein über N-Glukosamin- oder O-Serylglykosidbindungen verknüpft sind. Neben den Aminosuktern N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalaktosamin sind auch oft die neutralen Monosaccharide Mannose, Galaktose, Fucose, Xylose und Glucose anzutreffen (LÖFFLER, 1990).

Obwohl die spezifischen Funktionen dieser Proteine noch immer nicht vollständig bekannt sind (DI CESARE et al., 2002; KUETTNER, 1992; ROUGHLEY, 2001b), ist bewiesen, dass sie besonders bei der Vermittlung von Wechselwirkungen zwischen Chondrozyten und Matrix sowie zwischen den einzelnen Matrixkomponenten von großer Wichtigkeit sind (DI CESARE et al., 2002). Einige dieser Proteine binden sich einzeln an Proteoglykane, während andere vorher selbst Aggregate bilden und dann en bloc an die Proteoglykane transferiert werden (ALETRAS und TSIGANOS, 1985). Die Bindung an Aggrekanmoleküle erfolgt über deren G3-Domäne (LUNDELL et al., 2004; OLIN et al., 2001).

Diese Proteingruppe ist also an der Organisation und Aufrechterhaltung der makromolekularen Matrixstruktur beteiligt (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; DI CESARE et al., 2002; KUETTNER, 1992) und beeinflusst somit auch die physikalischen Eigenschaften des Gelenkknorpels (DI CESARE et al., 2002). Einige der Wechselwirkungen benötigen die Anwesenheit von Kalziumionen. Diese binden sich an eine einzelne molekulare Domäne und wirken entweder direkt als Vermittler,

oder indirekt, indem sie eine molekulare Konformationsänderung induzieren, die für die Expression einer bestimmten Bindungsaktivität benötigt wird. Die indirekten Effekte sind wahrscheinlich häufiger (DI CESARE et al., 2002).

Andere dieser Knorpelproteine wiederum interagieren direkt mit den Chondrozyten und sind somit an der Regulierung der Zellfunktion involviert (DI CESARE et al., 2002; ROUGHLEY, 2001b) wie beispielsweise die Abbauprodukte einiger Matrixmoleküle, von denen bekannt ist, dass sie die Chondrozyten beeinflussen (ROUGHLEY, 2001b).

Die Glykoproteine interagieren mit Zellrezeptoren und regulieren die Adhäsion der Chondrozyten aneinander oder an andere Matrixproteine (MUIR, 1995). Außerdem können sie biologische Signale an die Matrix vermitteln und so auf die Zellfunktion Einfluss nehmen (DI CESARE et al., 1994 und 1995). Zu ihnen gehören Fibronectin (RENCIC et al., 1995; ZHANG et al., 1995) und Tenascin, die nicht nur im Knorpel sondern auch in vielen anderen Geweben des Körpers vorkommen (HAYASHI et al., 1996; LUNDELL et al., 2004; SALTER, 1993).

#### 1.2.4.2.3.1 Fibronectin

##### Allgemeines

Bei Fibronectin handelt es sich um ein großes, adhäsives Zelloberflächen- und Blutglykoprotein, das bei Zelladhäsion, -migration, -differenzierung und -metabolismus eine Rolle spielt (BURTON-WURSTER und LUST, 1984; DIJKGRAAF et al., 1995; JONES et al., 1987). Das in den meisten Geweben des Körpers vorkommende Glykoprotein (JONES et al., 1987) ist im Knorpel nur in sehr geringen Mengen anzutreffen (KUETTNER, 1992; WOLF et al., 2003). Es wird hier von den Chondrozyten produziert (WOLF et al., 2003) und aggregiert extrazellulär nahe der Zellmembran (DIJKGRAAF et al., 1995). Seine Biosynthese findet sowohl an der Knorpeloberfläche als auch in den tiefen Knorpelzonen statt (BROWN und JONES, 1992; HAYASHI et al., 1996). Synthese und Akkumulierung der Knorpelfibronektine werden über biochemische und mechanische Mediatoren gesteuert, erfolgen jedoch auch als Antwort auf pathologische Matrixveränderungen (BURTON-WURSTER et al., 1997b). Dies erklärt den starken Anstieg des Fibronektins besonders bei Osteoarthritis (WOLF et al., 2003).

## Aufbau

Als Dimer besteht Fibronectin aus zwei ähnlichen Polypeptidketten, die jeweils 60-70 nm lang und 2-3 nm dick und an ihren Carboxyenden durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (ROUGHLEY, 2001b; WOLF et al., 2003). Beide Ketten bestehen aus je sechs Domänen mit sich wiederholenden Aminosäuresequenzen. Die verschiedenen Domänen enthalten stark affine Bindungsstellen für Heparin, Kollagene, GAGs (hier besonders für Hyaluronsäure), Thrombospondin, COMP und andere Matrixbestandteile (DI CESARE et al., 2002; WOLF et al., 2003) sowie für bestimmte Integrine an der Zelloberfläche und verleihen Fibronectin auf diese Weise seine multiadhäsiven Eigenschaften (WOLF et al., 2003).

Die Proteinstruktur des Fibronectin setzt sich hauptsächlich aus drei Typen homologer, sich wiederholender Segmente (I, II und III) zusammen (BURTON-WURSTER et al., 1997b). Obwohl es nur von einem einzigen Gen encodiert wird, wurden bislang in den Körpergeweben mindestens 20 verschiedene Isoformen von Fibronectinketten identifiziert (WOLF et al., 2003). Diese Heterogenität ergibt sich aus alternativem splicing (MACLEOD et al., 1996; ROUGHLEY, 2001b) der pre-mRNS an mindestens drei Stellen, genannt Extra-Typ-III-Domäne-A (ED-A), Extra-Typ-III-Domäne-B (ED-B) und variable Region (V) (SCHWARZBAUER, 1991). Die Isoformen werden posttranslational durch Glykosylierung weiter modifiziert und können sich in verschiedenen Kombinationen zu Dimeren verbinden (BURTON-WURSTER et al., 1997a).

Die Isoformen des reifen Knorpelgewebes unterscheiden sich deutlich von denen anderer Gewebe und des Plasmas. Deshalb wird angenommen, dass ihre Bildung lokal innerhalb des Gelenks erfolgt (WOLF et al., 2003). Die vorkommenden Isoformen bestehen zu 20-30% aus ED-B(+)-Fibronectinen und zu 50-80% aus der knorpelspezifischen (V+C)<sup>-</sup>-Isoform. LEIPOLD et al. (1992) berichten außerdem von 2% ED-A(+)-Fibronectin im Gelenkknorpel adulter Hunde, während der Gehalt in humanem Gelenkknorpel bis zu 4% beträgt (RENCIC et al., 1995). Die für Knorpel spezifische (V+C)<sup>-</sup>-Isoform entsteht durch ein gewebespezifisches splicing Muster und ist in anderen Geweben des Körpers nicht oder nur in Spuren anzutreffen (BURTON-WURSTER et al., 1997b; WOLF et al., 2003). Dieser Isoform fehlen die Nukleotide, die die Proteinsegmente V, sowie III-15 und I-10 (zus. gen. „C“) encodieren. Sie ist im Knorpel sowohl als Homodimer als auch als Monomer anzutreffen (BURTON-WURSTER et al., 1997a; WOLF et al., 2003).

## Funktion

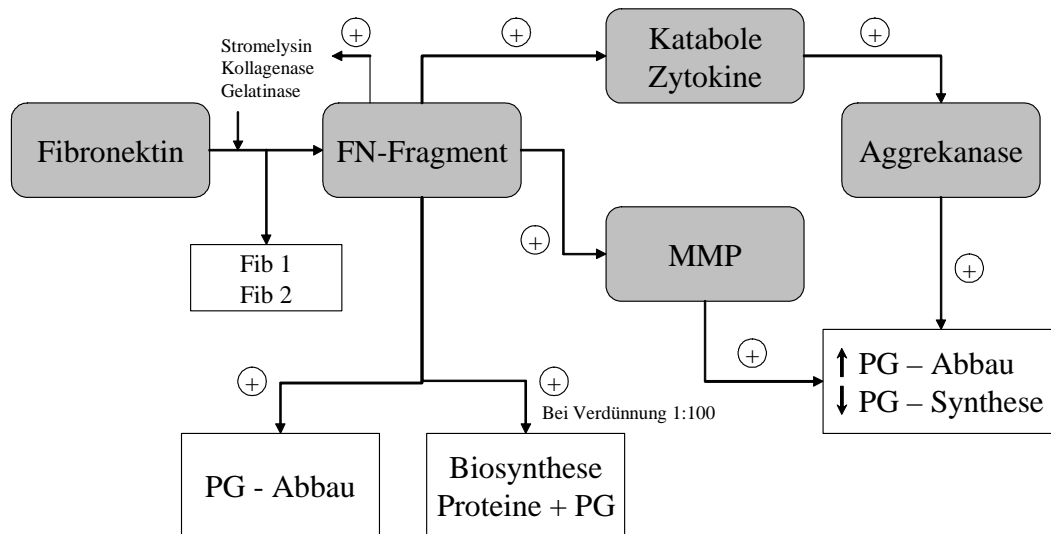
Die molekulare Zusammensetzung des Fibronektins ist auch bezüglich seiner Funktion im Knorpel von Bedeutung. So können zusätzliche oder fehlende Sequenzen in einem Teil des Fibronektins zu Konformationsänderungen führen und auf diese Weise die Funktion entfernter Sequenzen verändern (SCHWARZBAUER et al., 1991; FFRENCH-CONSTANT, 1995). Außerdem besitzen einige Fibronektin-domänen verborgene Aktivitäten, die nur durch Induzierung einer Konformationsänderung oder proteolytische Abspaltung eines Fragments frei werden (BURTON-WURSTER et al., 1997b). Zum Beispiel können die scheinbar am Amino- bzw. Carboxylende im Molekül eingebetteten Domänen Fib1 und Fib2 durch Stromelysin, Kollagenase und Gelatinase freigesetzt werden (FUKAI et al., 1995; REDISKE et al., 1995). Die entstehenden Fibronektinfragmente steigern wiederum die Aktivität dieser Enzyme (XIE et al., 1993).

Fibronektinfragmente haben im Gelenkknorpel eine katabole Wirkung (DANG et al., 2003). Bereits 1992 und 1993 wiesen HOMANDBERG et al. sowohl in vitro als auch in vivo nach, dass Fibronektinfragmente einen starken Verlust von Proteoglykanen bewirken. Auch bei intra-artikulären Injektionen von Fibronektinfragmenten wurden bei Kaninchen schwere Knorpelmatrix-Schädigungen hervorgerufen (HOMANDBERG et al., 2001). In 100-fach niedrigeren Konzentrationen allerdings bewirken die Fibronektinfragmente erstaunlicherweise eine Stimulierung der Biosynthese von Proteinen und besonders Proteoglykanen (XIE et al., 1993; HOMANDBERG und HUI, 1994).

Die Fibronektinfragmente bewirken einen Anstieg der katabolen Zytokine, inklusive Interleukine und  $\text{TNF}\alpha$  (DIJKGRAAF et al., 1995; HOMANDBERG und HUI, 1996; KUETTNER, 1992; NGUYEN et al., 1991). Diese wiederum stimulieren die Chondrozyten zur Synthese und vermehrten Freisetzung von MMPs (DANG et al., 2003; FORSYTH et al., 2002; YASUDA und POOLE, 2002) und Aggrekanase (DANG et al., 2003). Auf diese Weise kommt es zum Absinken der Proteoglykansynthese sowie zu vermehrtem Abbau der Proteoglykane. Fibronektinfragmente bewirken jedoch nicht nur über Zytokine, sondern auch direkt eine Freisetzung von MMPs (DANG et al., 2003).

Die Zytokine selbst beeinflussen jedoch auch wiederum die Aktivität der Fibronektinfragmente. In Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern für  $\text{IL-1}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , IL und  $\text{TNF}\alpha$  nimmt nämlich die Aktivität der Fragmente ab (DANG et al., 2003).

## Funktionen der Fibronektinfragmente



**Abbildung 31:** Funktionen der Fibronektinfragmente. Fib1, Fib2 – terminale Fibronektindomänen; FN – Fibronektin; MMP – Matrixmetalloproteinase; PG – Proteoglykan.

Aufgrund seiner Affinität zu den Chondrozyten ist Fibronektin auch an der Signalübermittlung der Zellen und somit für die Zellbiologie von großer Bedeutung (BURTON-WURSTER et al., 1997b; WOLF et al., 2003). Die Bindung an die Knorpelzellen wird durch verschiedene Integrine vermittelt (BURTON-WURSTER et al., 1997b; DIJKGRAAF et al., 1995; NISHIDA et al., 1995), von denen besonders der Fibronektin spezifische Integrinrezeptor ( $\alpha 5 \beta 1$ ) in großen Mengen an den Chondrozyten anzutreffen ist (LÖSER et al., 1993 und 1995; SALTER et al., 1992 und 1995). Dieser Rezeptor ist auch für den Anstieg der Zytokinproduktion verantwortlich, der in Chondrozytenkulturen mit Fibronektin-Zusatz beobachtet wurde (YONEZAWA et al., 1996).

Durch Wechselwirkungen mit den Matrixbestandteilen wirkt Fibronektin auch an der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mit und spielt auf diese Weise eine wichtige Rolle bei deren Organisation und Funktion (BURTON-WURSTER et al., 1997b; WOLF et al., 2003). Die Fähigkeit des Fibronektin, sich an der Matrixzusammensetzung beteiligen zu können, ist ein komplexer Prozess (AGUIRRE et al., 1994; HOCKING et al., 1994; SOTTILE und WILEY, 1994; SECHLER et al.,

1996). Zu Beginn des Matrixaufbaus ist die Arg-Gly-Asp-Sequenz seiner Zellbindungsdomäne entscheidend. Für den Einbau in eine fibrilläre Matrix hingegen scheinen nur die fünf Typ-I-Wiederholungen am Aminoende und die durch Disulfidbrücken zwischen den Ketten am Carboxylende medierte Dimerstruktur benötigt zu werden (BURTON-WURSTER et al., 1997b). Allerdings werden die Rate des Zusammenbaus und die Natur der gebildeten fibrillären Matrix möglicherweise auch durch die kryptische Bindungsstelle im III-1-Segment sowie durch Teile des C-Endes einschließlich des I-10-Proteinsegments beeinflusst (SOTTILE und MOSHER, 1993; ICHIHARA-TANAKA et al., 1995).

Die Wechselwirkungen des Fibronektins mit den GAGs erfolgen über seine carboxyterminale Heparinbindungsregion, die sowohl an Heparin als auch an CS binden kann. An der Bindung ist ein Argininpaar in der III-13-Wiederholung beteiligt. Die Affinität für die Bindung an CS ist jedoch schwächer, da sie durch Sequenzen am Aminoende gehemmt wird (BURTON-WURSTER et al., 1997b). Außerdem wird vermutet, dass das III-15-Proteinsegment, welches der knorpelspezifischen Fibronektin-Isoform (V+C)<sup>-</sup> fehlt, für die Bindung an CS, nicht aber an HS benötigt wird (BARKALOW und SCHWARZBAUER, 1994). Da CS das Haupt-GAG des Aggrekans darstellt, wird die Bindung von Fibronektin an Aggrekan möglicherweise durch die An- oder Abwesenheit dieses III-15-Segments reguliert (BURTON-WURSTER et al., 1997b).

Außerdem enthält die zentrale Region des Fibronektins auch die Zellbindungsregion in III-10, die eine kryptische GAG-Bindungsdomäne enthält. Diese bindet an kleine Proteoglykane, jedoch nur wenn sie durch die Anlagerung an ein Substrat demaskiert ist (BIDANSET et al., 1992). Eine Bindung an dieser Stelle scheint die Zellanlagerung an Fibronektin zu stören und unterstützt somit die Hypothese von NOYORI und JASIN (1994), dass die kleinen Proteoglykane eine Knorpelheilung unmöglich machen, indem sie die Migration der benötigten Zellen in den Knorpeldefekt blockieren. Bei Anwesenheit des III-15-Segments wird die Fähigkeit der kleinen Proteoglykane, die Zelladhäsion zu blockieren, stark reduziert. Wie bereits erwähnt, fehlt den im Knorpel zum Großteil vorkommenden (V+C)<sup>-</sup>Isoformen dieses Segment jedoch (BARKALOW und SCHWARZBAUER, 1994).

Eine weitere Funktion des Fibronektins liegt möglicherweise an der Gelenkfläche des Knorpels. Dort bedeckt es nämlich die Knorpeloberfläche (HAYASHI et al., 1996) und ist in geringen Konzentrationen auch in physiologischer Synovialflüssigkeit enthalten.

Auf diese Weise spielt es vermutlich eine Rolle bei der Gelenkschmierung und schützt den Knorpel durch die Bindung an Hyaluronsäure in der Synovialflüssigkeit (NISHIDA et al., 1995).

#### 1.2.4.2.3.2 COMP

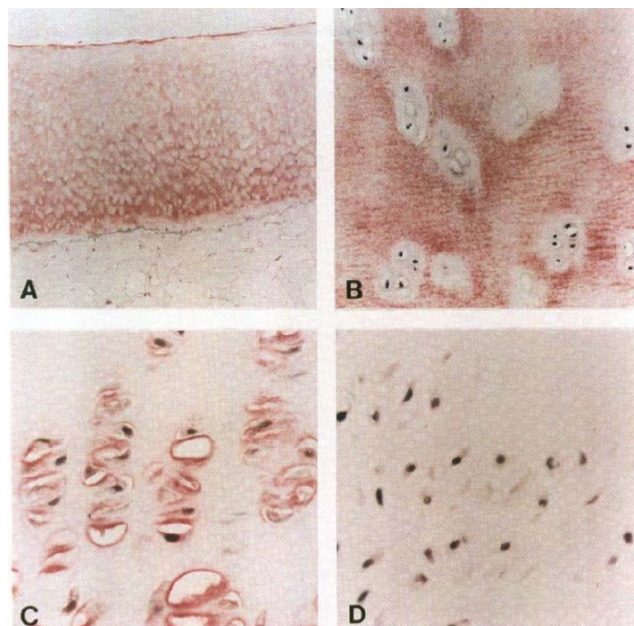
Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) gehört zu den bedeutenderen Glykoproteinen des Gelenkknorpels und macht ungefähr 1% des Knorpelfeuchtgewichts aus (DICKINSON et al., 2003). Es ist jedoch nicht knorpelspezifisch, wie lange Zeit angenommen, sondern kommt auch in anderen Körpergeweben vor (DI CESARE et al., 2002). Sein Molekulargewicht beträgt im Rinderknorpel 450 kDa und im Rattenknorpel 550 kDa (DI CESARE et al., 1994). Das Pentamer besteht aus fünf fast gleichen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 100 (KUETTNER, 1992) bis 110 kDa (DI CESARE et al., 1994 und 2002). Die Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken nahe ihrer aminoterminalen Regionen miteinander verbunden (DICKINSON et al., 2003; ROUGHLEY, 2001b) und gleichen mit ihren distal hervorstehenden, globulären carboxyterminalen Regionen (CHEN et al., 2005; HOLDEN et al., 2001) einer fünfarmigen Blume (siehe Abbildung 33) (DI CESARE et al., 1994).

Die C-terminalen Domänen können mit den Kollagenen I, II und IX interagieren (CHEN et al., 2005; ROUGHLEY, 2001b). Sie sind globulär,  $5,5 \pm 0,8$  nm groß und jeweils durch 1,5 nm dünne, flexible, etwa  $28 \pm 5$  nm bzw.  $26 \pm 6$  nm lange Fäden mit einer zentralen zylindrischen Domäne verbunden. Letztere hat einen Durchmesser von  $3,5 \pm 0,4$  nm und eine Länge von  $8,6 \pm 0,7$  nm (DI CESARE et al., 1994) und ist für die Pentamerisation des Moleküls und die Disulfidbrücken-Bildung zwischen den Ketten verantwortlich. Die fadenähnlichen Bereiche zwischen dem Amino- und Carboxylende beinhalten Typ-2-EGF-ähnliche und Typ-3-Kalzium-bindende Wiederholungen (CHEN et al., 2005).

COMP erhält seine nicht-kollagene Natur durch das Fehlen der Aminosäure Hydroxyprolin. Der hohe Gehalt an Aspartat und Glutamat mit zusammen mehr als 30% und die Substitution mit negativ geladenen Kohlenhydraten verleihen dem Protein seinen anionischen Charakter. Der Gehalt von 2,5% Cystein ist Hinweis auf zahlreiche Disulfidbindungen. Der weit höhere Gehalt an Galaktosaminen verglichen mit den Glukosaminen deutet auf eine ungewöhnliche Form der Glykosylierung hin. Zusammen mit der Anwesenheit von Xylose und Glukuronsäure in fast äquimolarer

Menge könnte dies auf eine Substitution mit CS hinweisen. Die Werte von Xylose, Glukuronsäure und Galaktosamin lassen vermuten, dass jede COMP-Untereinheit 3 bis 4 CS-Ketten trägt, von denen jede wiederum aus 14-15 Disacchariden besteht. Außerdem enthält das Protein nur N-gebundene, aber keine O-gebundenen Oligosaccharide oder Keratansulfate (HEDBOM et al., 1992).

Aufgrund struktureller Übereinstimmung einiger Molekülbereiche von COMP und Thrombospondin kann COMP auch zur Familie der Thrombospondine gezählt werden (OLDBERG et al., 1987) und wird auch als Thrombospondin5 bezeichnet (ROUGHLEY, 2001b). Dagegen konnte die früher herrschende Meinung, dass COMP ähnlich oder identisch dem Knorpel-Matrix-Glykoprotein sei (MÖRGELIN et al., 1992), widerlegt werden. Allerdings ähneln sich diese beiden Moleküle sowohl in der Größe ihrer Untereinheiten, als auch in ihrer oligomeren Struktur. Das definitive Ausmaß ihrer Gemeinsamkeiten und ihre Beziehung zueinander bleibt jedoch noch zu klären (DI CESARE et al., 1995).



**Abbildung 32:** Lokalisation von COMP in humanem Gelenkknorpel. **A** und **B**: Tibiaknorpel eines 52-Jährigen; **C**: Femurknorpel eines 21 Wochen alten Fetus. Immunofärbung mit Kaninchen-Antiserum für bovines und humanes COMP. **A** (Vergrößerung x28): Lokalisation des COMP in der interterritorialen Matrix des gesamten Knorpels mit leichtem Anstieg in den tieferen Zonen. Keine Färbung im subchondralen Knochen. **B** (Vergrößerung x550): Tiefere Knorpelzonen ohne Färbung der perizellulären und territorialen Matrix. **C** (Vergrößerung x550): Färbung der extrazellulären Matrix in unmittelbarer Chondrozytennähe. **D**. Negative Kontrollprobe (x550) Immunofärbung mit Preimmunserum. Aus DI CESARE et al. (1995).

COMP ist besonders während der Knorpelentwicklung in der Wachstumsplatte, jedoch auch in reifem Knorpel anzutreffen (ROUGHLEY, 2001b). Seine Verteilung innerhalb des extrazellulären Raums scheint ebenfalls altersabhängig zu sein. In

fetalem humanem Gelenkknorpel (DI CESARE et al., 1995), im Knorpel neugeborener Ratten (HEDBOM et al., 1992), sowie in der Wachstumsplatte (DI CESARE et al., 2002) ist COMP nämlich in der territorialen Matrix lokalisiert (CHEN et al., 2005; DI CESARE et al., 2002), wohingegen in reifem Gelenkknorpel eine Lokalisation in der interterritorialen Matrix festzustellen ist (CARLSON et al., 1994; CHEN et al., 2005; DI CESARE et al., 1995 und 2002). Insgesamt gesehen ist mit zunehmender Knorpeltiefe ein leichter Konzentrationsanstieg des COMP zu beobachten (CARLSON et al., 1994; CHEN et al., 2005), wobei sich unmittelbar oberhalb der Tidemark eine 100 bis 150 µm breite Zone mit nur geringem bis keinem Gehalt an COMP befindet (DI CESARE et al., 1995).

Bei COMP handelt es sich um ein Kalzium-bindendes Protein, dessen Konformation durch die Menge des gebundenen Kalziums beeinflusst wird (CHEN et al., 2005). Auf diese Weise kann das Glykoprotein mit verschiedenen Matrixkomponenten Wechselwirkungen eingehen und so die Zusammensetzung, Organisation und Aufrechterhaltung der Matrix mit beeinflussen (DICKINSON et al., 2003).

Über seine C-terminale Domäne kann COMP sowohl an die nicht-kollagenen Domänen des Kollagen IX (DI CESARE et al., 2002; HOLDEN et al., 2001) als auch an die kollagenen Regionen der Kollagene I und II binden (CHEN et al., 2005; DI CESARE et al., 2002; DICKINSON et al., 2003; HOLDEN et al., 2001). Die Bindung an die Kollagene erfolgt in der Anwesenheit des divalenten Kations  $\text{Zn}^{2+}$  (BUDDE et al., 2005; CHEN et al., 2005; DI CESARE et al., 2002; HOLDEN et al., 2001). COMP und Kollagen IX sind für die Knorpelentwicklung und Homöostase von großer Bedeutung. Da Mutationen von COMP zu schweren Schäden der Kollagenfibrillen bezüglich Anordnung, Durchmesser und Fibrillenfusion führen, wird COMP auch eine wichtige Rolle bei der Fibrillogenese der Kollagene zugeschrieben (HOLDEN et al., 2001).

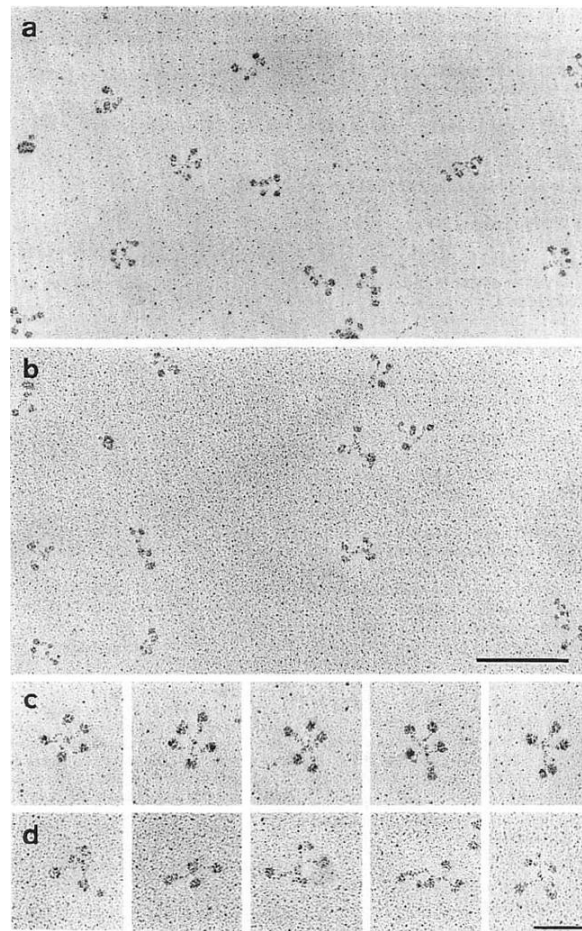
Außerdem kann COMP konzentrationsabhängig mit hoher Affinität an Fibronectin binden (CHEN et al., 2005; DI CESARE et al., 2002). Die ebenfalls über seine carboxyterminale Domäne stattfindende Bindung erfolgt hauptsächlich mit einer molekularen Domäne des Fibronectin, die etwa 14 nm von dessen aminoterminaler Domäne entfernt liegt. Auch für diese Bindung werden divalente Kationen benötigt, wobei in vitro die stärkste Bindung in der Anwesenheit von  $\text{Mn}^{2+}$  erfolgt. Durch seine Verbindung mit Fibronectin ist COMP auch an der Übermittlung von Matrix-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt (DI CESARE et al., 2002).

Weiterhin kann COMP über seine RGD-Sequenz Wechselwirkungen mit Integrinen der Chondrozytenoberfläche eingehen und somit sowohl an der Zellverankerung, als auch bei der Regulierung von Zellaktivitäten und deren Wechselwirkungen mit der umliegenden Matrix mitwirken. Da COMP in verschiedenen Konformationen vorkommt, kann es auch entsprechend mit verschiedenen Integrin-Rezeptoren, wie zum Beispiel  $\alpha 5 \beta 1$  und  $\alpha V \beta 3$  interagieren und so verschiedene zelluläre Antworten bewirken (CHEN et al., 2005).

#### 1.2.4.2.3.3 Thrombospondin

Thrombospondin (TSP) gehört ebenfalls zu den nicht-kollagenen Glykoproteinen der Matrix und kommt nicht nur im Knorpel, sondern auch in anderen Körpergeweben vor. Von den vier existierenden Arten TSP1, TSP2, TSP3 und TSP4 zeigten Untersuchungen bovinen Knorpels, dass TSP1 stark dominiert (DI CESARE et al., 1994; MISENHEIMER et al., 2001).

Bei den strukturell gleichen TSP1 und TSP2 (MISENHEIMER et al., 2001) handelt es sich um 480 kDa schwere Homotrimere aus drei identischen, im bovinen Gelenkknorpel 180 kDa (DI CESARE et al., 1994) und beim Menschen 150 kDa schweren Untereinheiten, die miteinander über Disulfidbrücken verbunden sind. Jedes dieser drei Monomere besteht aus einer N-terminalen globulären Domäne, gefolgt von einer Cystein-Reste enthaltenden Region, die für die Disulfidbrückenbildung zwischen den einzelnen Ketten zuständig sind. Neben anderen Regionen gibt es noch EGF-ähnliche Module sowie eine Aspartat-reiche  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Typ-III Domäne vor der carboxyterminalen Sequenz. Die carboxyterminale Region von TSP1 besitzt pro Monomer (inklusive der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Typ-III-Domäne) 10-11 Bindungsstellen für  $\text{Ca}^{2+}$  (MISENHEIMER et al., 2001).



**Abbildung 33:** Struktur von COMP und TSP1 mit Glycerolspray/rotary shadowing Elektronenmikroskopie. Fünfarmige Molekülstruktur des COMP (a) und dreiarmige Moleküle des TSP1 (b). Ausgewählte Moleküle des COMP (c) und TSP1 (d) bei höherer Vergrößerung. Balken = 100 nm (a,b) bzw. 50nm (c,d). Aus DI CESARE et al. (1994).

Bei TSP3 und TSP4 handelt es sich ebenso wie bei COMP um Pentamere. Ihre Struktur stimmt im Bereich der carboxyterminalen Region, einschließlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Typ-III-Domänen, die zu 60% identisch sind, mit der von TSP1 und -2 überein. In den anderen Monomerbereichen hingegen unterscheiden sie sich von ihnen (MISENHEIMER et al., 2001). So besitzt TSP1 dort im Gegensatz zu COMP eine Heparin-bindende Domäne, die für seine starke Affinität zu Heparin (FRAZIER, 1991), Zelloberflächen-HS-Proteoglykanen und Sulfatiden verantwortlich ist. Diese Affinität fehlt COMP. Letzteres kann sich jedoch im Gegensatz zu TSP1 an Chondrozyten anheften (DI CESARE et al., 1994).

Die Thrombospondine gehen Wechselwirkungen mit einem oder mehreren Bindungspartnern ein. Ihre Liganden sind Bestandteile der Zelloberfläche und/oder der extrazellulären Matrix (DI CESARE et al., 1994), wie zum Beispiel Proteoglykane, Kollagene und Fibronectin. TSP1 kann an die Kollagene I, II, III und V binden, mit der

höchsten Affinität für Kollagen V. TSP4 bindet über sein Carboxyende an die Kollagene I bis III, mit höchster Affinität zu Kollagen I (DI CESARE et al., 2002).

TSP1 und 2 unterstützen die Zelladhäsion durch Wechselwirkungen zwischen ihrer RGD-Sequenz, die tief innerhalb der Typ-III-Kalzium-bindenden Sequenz lokalisiert ist und verschiedenen Zellrezeptoren, inklusive Integrinen (CHEN et al., 2005). Allerdings ist auch bei den TSP die Adhäsion von Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, da ebenso wie bei COMP durch die Bindung von Kalzium eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, welche die Verfügbarkeit der RGD-Sequenz reguliert (CHEN et al., 2005; MISENHEIMER et al., 2001).

Außerdem sind die Thrombospondine an Interaktionen innerhalb der Matrix, Zellmigration und Proliferation beteiligt. In vitro Experimente zeigen zudem eine stark angiostatische Wirkung von TSP1. Auf diese Weise könnte TSP1 zum Schutz des Gelenkknorpels vor Degeneration beitragen, da letztere mit Gefäßeinsprossungen in den Knorpel verbunden ist (DI CESARE et al., 1994).

#### 1.2.4.2.3.4 Weitere nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine

Es gibt noch weitere Knorpelproteine, die zur Gruppe der nicht-kollagenen Proteine und Glykoproteine gehören, bisher aber noch nicht alle charakterisiert wurden. Zu ihnen gehören unter anderem Chondrocalcin, Annexin, Matrilin, Fibulin und WARP. Außerdem befindet sich in der Zell-assoziierten Matrix der Oberflächenzone das Protein Del1 (developmental endothelial locus-1) (PFISTER et al., 2001). Viele von ihnen sind an Wechselwirkungen und Verknüpfungen zwischen den großen Matrixkomponenten beteiligt und tragen auf diese Weise zur Stabilisierung der Matrixstrukturen bei.

Bei **Chondrocalcin** handelt es sich um ein 35 kDa schweres Propeptid am Carboxyende der Typ-II-Kollagene (KUETTNER, 1992), das beim Abbau von Kollagen II entsteht (ROUGHLEY, 2001b). Möglicherweise ist es an der Regulierung der Kollagensynthese beteiligt. Es wird an Orten der Kollagensynthese freigesetzt und kann als deren Marker gewertet und gemessen werden (KUETTNER, 1992; ROUGHLEY, 2001b). Außerdem bindet es mit hoher Affinität an Hydroxyapatitkristalle und spielt somit eventuell bei der Kalzifizierung eine Rolle (KUETTNER, 1992).

**Annexin V** wurde lange als Anchorin CII bezeichnet, da es auf der Chondrozytenoberfläche lokalisiert ist, wo es als Kollagenrezeptor dient. Durch die Verbindung mit Kollagen II verankert (engl.: anchor) es die Knorpelzellen in der extrazellulären Matrix (MOLLENHAUER et al. 1999; PFAFFLE et al., 1990). Dann wurde jedoch eine 100%ige Übereinstimmung von Protein und cDNS mit Annexin V aus anderen Geweben festgestellt (MOLLENHAUER et al., 1999). Bei den Annexinen handelt es sich um eine Familie Kalzium- und Phospholipid-bindender Proteine. Neben Annexin V kommen im Knorpel noch die Annexine II und VI vor (MOLLENHAUER et al., 1999).

Annexin V ist zwar in geringen Mengen auch in reifem Gelenkknorpel anzutreffen, hier hauptsächlich im oberen Knorpeldrittel, dominiert jedoch besonders in der Wachstumsplatte. Dort dient es als Kalziumkanal und stellt einen der Hauptbestandteile der Matrixvesikel dar, bei denen es sich um freigesetzte Plasmamembranelemente handelt (MOLLENHAUER et al., 1999).

Die **Matriline** stellen eine Familie nicht-kollagener, oligomerer extrazellulärer Matrixproteine mit modularer Struktur dar, die zur Superfamilie der von Willebrand-A-ähnlichen Domänen gehören. Alle Matriline enthalten bis zu 2 von Willebrand-A-ähnliche Domänen, bis zu 10 EGF-ähnliche Domänen und eine C-terminale  $\alpha$ -Helix, die die Bildung von Homo-Oligomeren vermittelt (BUDDE et al., 2005; WIBERG et al., 2003). Matrilin-3 (auch bezeichnet als Cartilage Matrix Protein, CMP) ist besonders in der epiphysealen Wachstumsplatte anzutreffen. Es kann entweder direkt mit der COL3 Domäne des Kollagen IX interagieren, oder indirekt über COMP als Adapter. Auf diese Weise wird Matrilin-3 in die Kollagen IX enthaltenden Knorpelfibrillen integriert (BUDDE et al., 2005). Matrilin-1, -3 und -4 können jedoch auch über Komplexe aus Biglykan und Dekorin an das Aminoende von Kollagen VI binden (BUDDE et al., 2005; WIBERG et al., 2003). Der Biglykan/Matrilin-1- oder Dekorin/Matrilin-1-Komplex dient als Verbindung zwischen den Kollagen-VI-Mikrofibrillen und Aggrekan oder Kollagen II, da Matrilin-1 mit diesen beiden interagieren kann. Matrilin-1 kann aber auch Wechselwirkungen zwischen Aggrekan und Kollagen II vermitteln (WIBERG et al., 2003).

Das extrazelluläre Matrixprotein **WARP** gehört ebenfalls zur Superfamilie der von Willebrand-Faktor-A-Domänen. Es wird von den Chondrozyten exprimiert und

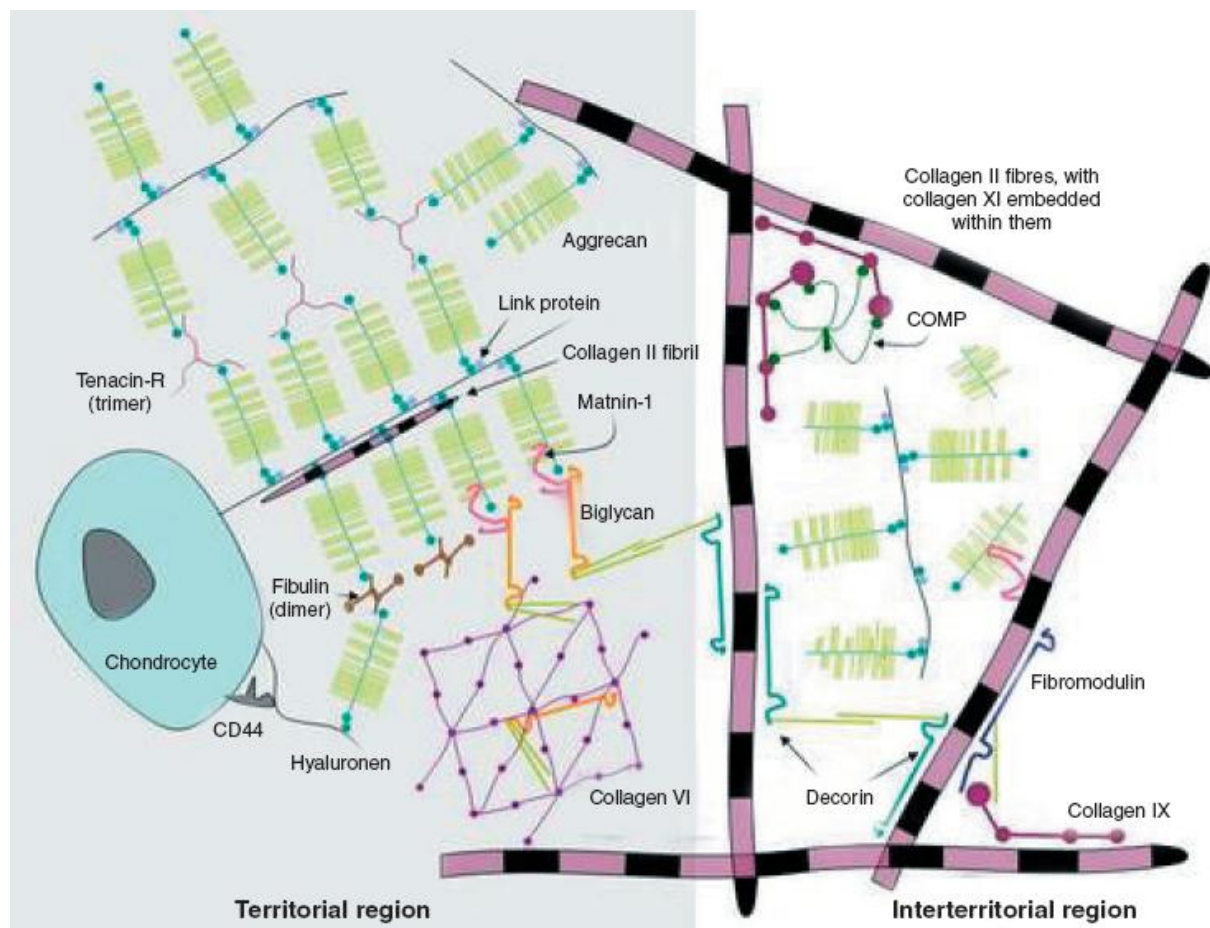
befindet sich im reifen Gelenkknorpel ausschließlich in der perizellulären Matrix, wo es zusammen mit Perlekan lokalisiert ist. WARP kann an die Domäne III-2 sowie an die HS-Ketten der Domäne I des Perlekans binden. Auf diese Weise bildet WARP makromolekulare Strukturen, die zur Zusammensetzung und Aufrechterhaltung der Knorpelstrukturen beitragen (ALLEN et al., 2006).

Bei den **Fibulinen** handelt es sich um eine Familie extrazellulärer Matrixproteine, die sich mit den Proteoglykanen Aggrekan und Versikan (OLIN et al., 2001) sowie Fibronektin und Kollagenen (TIMPL et al., 2003) verbinden können. Fibulin-1 und -2 sind besonders während der Knorpelentwicklung anzutreffen, während im reifen Gelenkknorpel bisher nur geringe Mengen von Fibulin-1 festgestellt werden konnten. Sie bestehen aus den beiden globulären Domänen I und III sowie der dazwischenliegenden stabförmigen Domäne II. Fibulin-2 besitzt zusätzlich noch eine stabähnliche aminoternale Domäne. Während Fibulin-2 als Dimer vorkommt, ist Fibulin-1 hauptsächlich als Monomer anzutreffen, obwohl es auch Dimere bilden kann (OLIN et al., 2001).

Die stabförmige Domäne II setzt sich aus EGF-ähnlichen Wiederholungen zusammen und ist für die Verbindung mit der C-Typ-Lectin-like Domäne (CLD) der G3-Region von Aggrekan und Versikan verantwortlich (OLIN et al., 2001; TIMPL et al., 2003). Da durch diese Kalzium-abhängigen Verbindungen multimere Komplexe gebildet werden können, dienen sie der supramolekularen Zusammensetzung der Knorpelmatrix. Die zunehmende Abspaltung der G3-Domänen des Aggrekans mit steigendem Alter sowie der höhere Gehalt an Fibulinen in fetalem und juvenilem Knorpel deuten darauf hin, dass die Verbindung zwischen Aggrekanen und Fibulinen besonders während der Knorpelentwicklung und bei der Zusammensetzung neu synthetisierter Matrix eine Rolle spielt (OLIN et al., 2001).

Das **Protein Del1** wurde 2001 von PFISTER et al. in Gelenkknorpel ausgewachsener Rinder entdeckt und damit erstmals in einem nicht-endothelialen, nicht-fetalen Gewebe beschrieben. Es befindet sich in der Zell-assoziierten Matrix der Chondrozyten der Oberflächenzone und nur in äußerst geringen Mengen assoziiert mit den Knorpelzellen der tiefen Knorpelzone. Del1 hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Im Knorpel befinden sich jedoch auch 43 kDa schwere Molekülfragmente, die das C-terminale Ende des Proteins beinhalten. Seine

unmittelbare Zellnähe erreicht das Protein wahrscheinlich durch Wechselwirkungen zwischen einem Arg-Gly-Asp-Motiv, genannt RGD-Sequenz, und den Chondrozyten. Die Zell-assoziierte Matrix und damit auch Del1 fungiert möglicherweise als chondroprotektives Element, das die oberflächlichen Chondrozyten umgibt und Chondron-ähnliche Strukturen in der Oberflächenzone bildet (PFISTER et al., 2001).



**Abbildung 34:** Die Zusammensetzung der Aggregate und Wechselwirkungen mit extrazellulären Matrixkomponenten. Die territoriale Matrix ist reich an Kollagen VI. Zu Beginn der Aggrekanzusammensetzung können Verbindungen mit anderen Proteinen wie Fibulin und Tenascin-R, je nach ihrer räumlichen und zeitlichen Expressierung, den Vorgang unterstützen. Die langgestreckte Anordnung der Aggrekanmoleküle am Hyaluronsäure-Faden bildet eine Art molekularen Kanal, der die Bewegung von Proteinen wie Kollagen II ermöglicht. Kollagen II kann an die KS-Region der Aggrekane binden und so von der Zelle zur entfernt gelegenen Matrix wandern. Multimolekulare Brücken können Aggrekan mit dem Kollagen-VI-Netzwerk verbinden. Die im Kollagen-II-Netzwerk der interterritorialen Matrix verwobenen Aggregate sind sehr heterogen. Einige sind frei und können in die Synovialflüssigkeit diffundieren, andere bleiben über Wechselwirkungen mit Proteinen wie Matrilin verankert. Die Struktur der Kollagenfasern wird durch Kollagen-bindende Proteine wie Decorin, Fibromodulin, Kollagen IX und indirekt auch über COMP unterstützt. Aus DUDHIA (2005)

Das Protein **PRELEP** (prolin- and arginin-rich end leucin-rich repeat protein) kann ebenfalls zu dieser Proteingruppe gezählt werden. Seine Proteinstruktur ist eng mit der von Fibromodulin verwandt, allerdings besitzt es keine KS-Ketten. In fetalem und

frühem juvenilen humanen Knorpel ist es nicht anzutreffen. Die aminoterminalen Region des PRELEP erleichtert wahrscheinlich Wechselwirkungen mit HS-Proteoglykanen an Zellmembranen (ROUGHLEY, 2001b).

Außerdem ist noch das zur Familie der leucin-rich-repeat-Proteinen gehörende **Chondroadherin** zu erwähnen (ROUGHLEY, 2001b; WIBERG et al., 2003). Es besitzt weder GAG-Ketten noch N-gebundene Oligosaccharide und kann sich an den C- und N-terminalen Enden des Kollagen VI anlagern (WIBERG et al., 2003). Wahrscheinlich spielt es auch bei der Übermittlung von Zell-Matrix-Wechselwirkungen eine Rolle (ROUGHLEY, 2001b).

Darüber hinaus gibt es noch ein 21 kDa schweres Protein, das von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert wird und mit Kollagenen vom Typ X interagiert. Es hat eventuell eine Funktion in der Tidemark (KUETTNER, 1992).

## 2 Struktur des Gelenkknorpels

Je nach Gelenk, Knorpellokalisation, Knorpelzone und Matrixregion existieren Unterschiede in Aufbau, Organisation und mechanischen Eigenschaften der Matrix. Auch Zellmorphologie, Zelldichte, Stoffwechselaktivität und wahrscheinlich Zellfunktion variieren je nach Knorpeltiefe (AYDELOTTE et al., 1996; BUCKWALTER und MANKIN, 1997; QUINN et al., 2005). Die regionalen Unterschiede der Matrix sind schon im Kapitel 1.2.2 Matrixregionen und Chondrone beschrieben.

### 2.1 Unterschiede der Matrixstruktur verschiedener Gelenke

MODIS et al. (1996) untersuchten die strukturellen Unterschiede der extrazellulären Matrix von Femur- und Tibiakondylen adulter Beagles mit Hilfe polarisationsmikroskopischer Analyse.

Die Matrixregionen beider Gelenkknorpel zeigten Gemeinsamkeiten in der Anordnung ihrer GAGs und Kollagenfibrillen, sowie eine höhere Kollagendichte in der territorialen Matrix verglichen mit der interterritorialen Matrix. Es existieren jedoch auch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Knorpeln. So weist der Femurknorpel verglichen mit dem Tibiaknorpel mit Ausnahme der kalzifizierten Knorpelzone einen höheren molekularen Orientierungsgrad sowohl der GAGs der gesamten Matrix als auch des Kollagens der territorialen Matrix auf. Außerdem ist die Lagerung der Kollagenfibrillen der interterritorialen Matrix in der oberflächlichen und kalzifizierten Zone des Femurs dichter.

Diese Befunde sowie biochemische und biomechanische Daten bestätigen, dass der Knorpel der Tibiakondylen zum einen dicker und weicher als der Femurknorpel ist und somit einen geringeren Widerstand gegenüber sofortigen Gestaltveränderungen durch plötzliche Belastung aufweist. Zum anderen enthält er auch einen höheren Gehalt an Proteoglykanen, die jedoch lockerer strukturiert sind als in der dichteren Knorpelstruktur der Femurkondylen. Ursache für die lockere Struktur könnte der geringere Orientierungsgrad der Kollagene sowie deren geringerer Gehalt sein (MODIS et al., 1996).

Auch GURR et al. (1985) untersuchten die Matrixunterschiede verschiedener Gelenke und konzentrierten sich hierbei auf die Proteoglykanmonomere des menschlichen Gelenkknorpels von Hüfte, Knie und Schulter. Sie stellten fest, dass die Proteoglykanmonomere der stark gewichtsbelasteten Knie- und Hüftgelenke

kleiner sind als die der weniger belasteten Schultergelenke. Dies führten sie auf die Verkürzung der CS-reichen Region in stärker belasteten Gelenken zurück. Aus diesem Grund weisen die Proteoglykane des Kniegelenks auch den geringsten Anteil an Chondroitin-4-Sulfat auf und die des Schultergelenks den höchsten (GURR et al. (1985). Die Unterschiede in Kettenlänge und Sulfatierungsmuster der CS-Ketten im Knorpel verschiedener Gelenke hängen zum einen von der Aktivität der zur Synthese genutzten Glykosyl- und Sulfotransferase, und zum anderen auch von der Verfügbarkeit ihrer Vorläufer ab (ROUGHLEY und LEE, 1994).

Die CS-reichen Regionen zeigen jedoch auch altersabhängige Unterschiede und werden mit zunehmendem Alter kleiner (Tab. 8). Im Knorpel stärker belasteter Gelenke sind diese Unterschiede markanter als im geringer belasteten Schulterknorpel. Möglicherweise erfolgt in den stärker belasteten Gelenkknorpeln infolge der höheren Gewichtsbelastung zusätzlich eine schnellere Alterung des Knorpels. Auch ein Zusammenhang mit einem höheren Körpergewicht der älteren untersuchten Individuen ist denkbar.

**Tab. 8:** Verteilungsmuster der GAGs von Proteoglykanmonomeren in mol% des gesamten GAG-Gehalts in Gelenken von 21-, 26- und 45-jährigen Menschen. Aus GURR et al. (1985).

<b>Gelenk- lokation</b>	<b>GAG-Bestandteil (mol%)</b>					
	<b>Ch</b>	<b>CS6</b>	<b>CS4</b>	<b>DS6</b>	<b>DS4</b>	<b>KS</b>
Schulter 21	3,3	65,4	5,0	4,2	3,4	18,6
Hüfte 21	3,5	67,2	5,4	1,1	1,0	21,8
Knie 21	3,0	67,1	3,6	1,2	0,8	24,6
Schulter 26	3,7	71,3	5,3	0,4	0,6	18,6
Hüfte 26	4,8	65,5	5,1	1,2	0,7	22,7
Knie 26	4,8	67,2	3,9	0,4	0,3	23,4
Schulter 45	4,2	62,1	3,0	0,4	0,5	29,7
Hüfte 45	4,4	57,6	3,6	0,4	1,9	32,2
Knie 45	3,4	59,8	2,8	0,1	0,2	33,6

Ch = Chondroitin; CS6,CS4 = Chondroitin-6- bzw. -4-Sulfat; DS6, DS4 = Dermatan-6- bzw. -4-Sulfat; KS = Keratansulfat.

Diese gelenkspezifischen Unterschiede werden jedoch anscheinend erst im Erwachsenenalter deutlich. So konnten ROUGHLEY et al. (1981) bei 0 bis 15 Jahre

alten Individuen keine signifikanten Unterschiede in Molekülgröße und Struktur der Proteoglykanmonomere zwischen Schulter- und Kniegelenkknorpel feststellen.

TAMMI et al. (1983) untersuchten belastungsabhängige Unterschiede in der Proteoglykanstruktur am Kniegelenkknorpel von Kaninchen. Dabei wurden immobilisierte und die kontralateral übermäßig, sowie normal belastete Gelenke untersucht. Die Proteoglykane der stärker belasteten Gelenke zeigten dabei einen höheren Anteil an GAGs mit einer größeren KS-Region.

Insgesamt ist also festzustellen, dass in stärker belasteten Gelenkknorpeln die Proteoglykanmonomere aufgrund ihrer kürzeren CS-reichen Regionen kleiner sind, während ihr Gehalt an GAGs, sowie die Größe der KS-reichen Region größer als in den weniger stark belasteten Knorpeln ist.

Beim Vergleich von humanen Knie- und Sprunggelenkknorpeln ist eine vermehrte synthetische Aktivität der Chondrozyten und besonders eine höhere Proteoglykansynthese, sowie ein höherer Proteoglykangehalt im Sprunggelenk festzustellen. Zusammen mit dem geringeren Wassergehalt führt dies zu besseren biomechanischen Eigenschaften, inklusive verstärkter dynamischer Steifigkeit und geringerer hydraulischer Permeabilität (AURICH et al., 2006; EGER et al., 2002; TREPPO et al., 2000).

Außerdem ist der Kniegelenkknorpel auch sensitiver gegenüber katabolen Zytokinen, wie zum Beispiel IL-1 $\beta$ , und erholt sich nach einer Zytokin-Behandlung langsamer als der Sprunggelenkknorpel (AURICH et al., 2006; EGER et al., 2002). Der Grund dafür liegt in der höheren Resistenz der Sprunggelenkchondrozyten gegenüber IL-1. Letzteres bewirkt im Gelenkknorpel eine Abnahme des Proteoglykangehalts durch Hemmung der Proteoglykansynthese und erhöhten Proteoglykanabbau. Um die Proteoglykansynthese um 50% zu reduzieren ist im Sprunggelenkknorpel eine 5-fach höhere IL-1-Konzentration nötig. Anders ausgedrückt ist bei maximaler Inhibition der Proteoglykansynthese im Knie noch eine Restsyntheseleistung im Sprunggelenkknorpel von 23,06% vorhanden (AURICH et al., 2006).

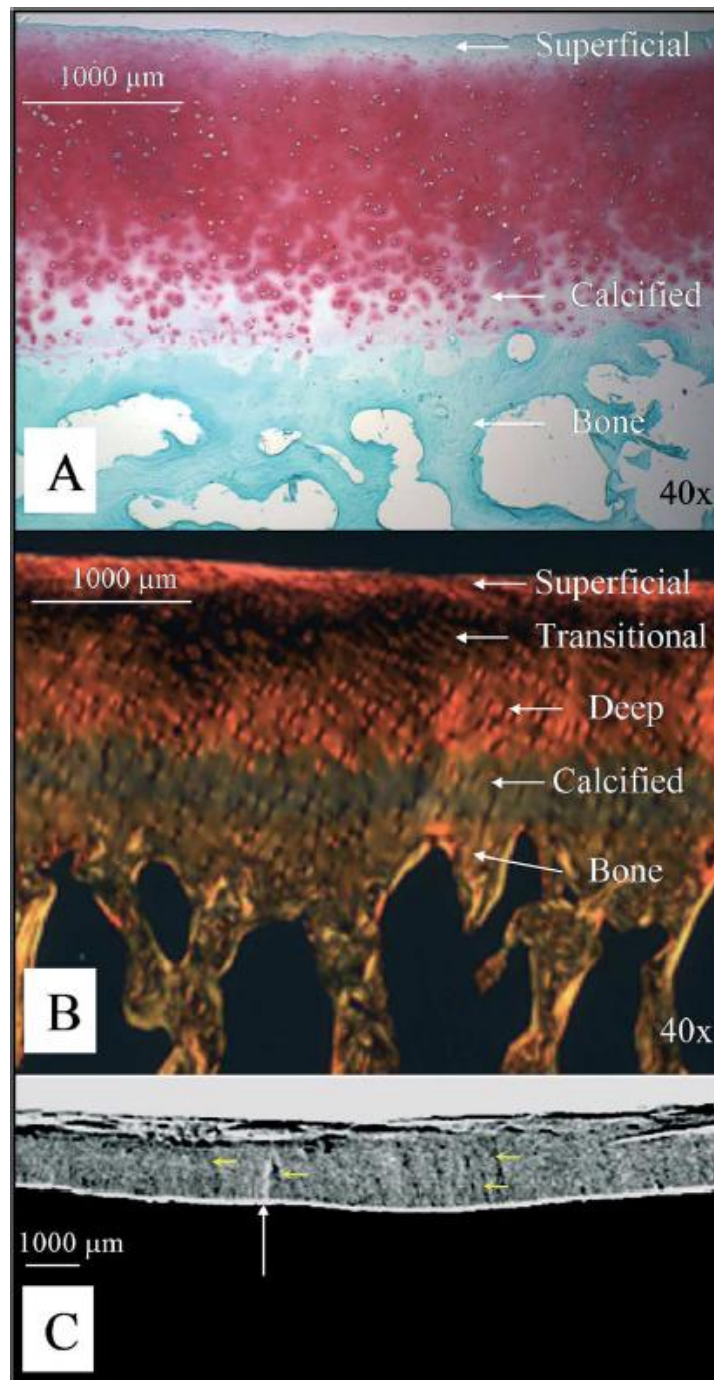
Auch gegenüber Fibronektinfragmenten, die direkt und indirekt zu einer Abnahme der Proteoglykankonzentration führen, ist der Kniegelenkknorpel wesentlich sensibler als der Sprunggelenkknorpel (AURICH et al., 2006; EGER et al., 2002).

## 2.2 Zonale Unterschiede des Gelenkknorpels

Ultrastruktur und Zusammensetzung des Gelenkknorpels variieren auch abhängig von ihrer Distanz zur Gelenkoberfläche. Dabei zeigen nicht nur die Chondrozyten zonale Unterschiede in Form, Anordnungsrichtung (POOLE et al., 1987), Zellmorphologie, –dichte und metabolischer Aktivität. Abhängig von der jeweiligen Knorpelzone variieren auch biochemische Zusammensetzung (CHEN et al., 2001; HUNZIKER et al., 2002) und physikalische Eigenschaften der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Orientierung der Kollagenfasern, Größe und Menge der Proteoglykane, GAG-Zusammensetzung und Aggregationseigenschaften (SICZKOWSKI und WATT, 1990).

Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede kann man den Gelenkknorpel in vier Zonen unterteilen, nämlich in Oberflächenzone, Übergangszone, mittlere radiäre Zone und kalzifizierte Zone (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; WONG und CARTER, 2003). Da die einzelnen Knorpelzonen unterschiedlich auf mechanische Belastung reagieren, wird deutlich, dass die zonale Anordnung der Knorpelbestandteile auch für die Knorpelfunktion von großer Bedeutung ist. Größe und Aussehen der einzelnen Zonen sind je nach Spezies und Gelenk verschieden. (BUCKWALTER et al., 1990).

Obwohl die Bezeichnungen der einzelnen Knorpelzonen in der Literatur sehr unterschiedlich sind, stimmen sie jedoch bezüglich ihrer strukturellen Merkmale überein. Da auch über die Knorpeloberfläche oberhalb der Oberflächenzone in der Literatur sehr unterschiedliche Beschreibungen existieren, wird in dieser Arbeit die Knorpeloberfläche gesondert besprochen.



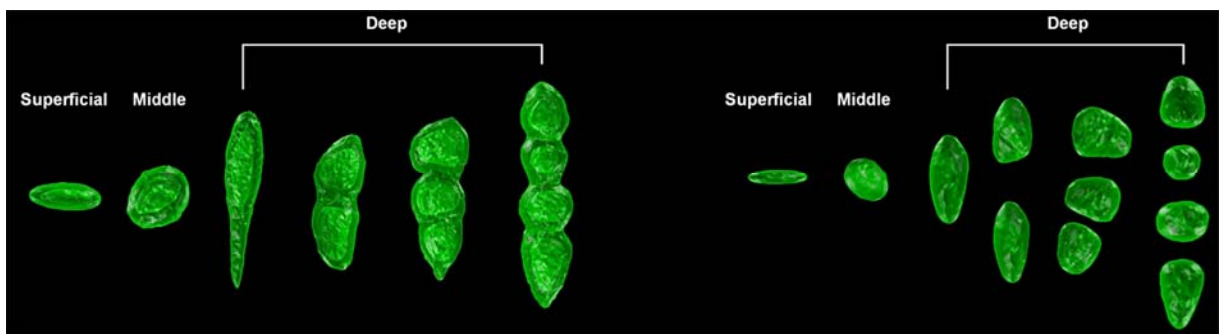
**Abbildung 35:** **A.** Safranin-O-gefärbter Schnitt von Knorpel und Knochen einer Trochlea tali. **B.** Polarisations-Mikrofotografie eines Picosirius-Rot gefärbten Schnitts von Knorpel und subchondralem Knochen einer Trochlea tali. **C.** DEI-Absorptionsbild einer 5 mm dicken Probe, von welcher der Schnitt in B stammt. Überall im Knorpel sind schwache vertikale Streifen erkennbar (kleine Pfeile). Die Knorpel/Knochen-Grenze ist durch den großen weißen Pfeil bezeichnet. Aus MUEHLEMAN et al. (2003).

### 2.2.1 Zonale Unterschiede der Chondrozyten

Die Chondrozyten der verschiedenen Knorpelzonen unterscheiden sich in Zelldichte (JADIN et al., 2005), Form, Größe, Anordnung und Stoffwechselaktivität

(AYDELOTTE et al., 1991; QUINN et al., 2005). Allerdings entwickeln sich viele dieser Unterschiede erst im Rahmen der Knorpelreifung, in deren Verlauf auch die Zelldichte abnimmt. So ist beispielsweise in unreifem Knorpelgewebe die Zellorganisation relativ homogen und es fehlen die strukturellen Kriterien der tiefen Knorpelzone (JADIN et al., 2005).

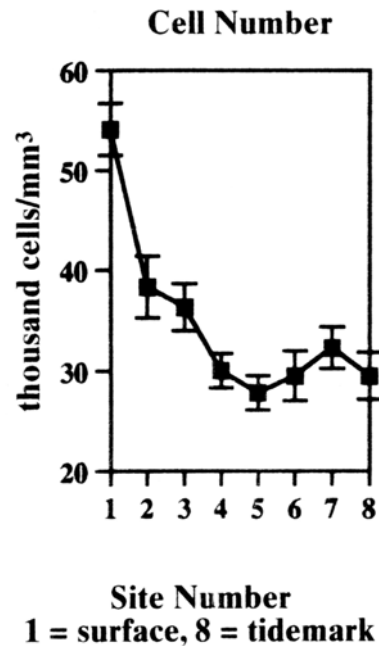
Auch Form, Größe und Anordnung der Chondrone zeigt den Chondrozyten entsprechende zonenspezifische Änderungen, wobei Form und Orientierung der Chondrone die lokale Kollagenarchitektur der interterritorialen Matrix der verschiedenen Knorpelzonen zu reflektieren scheint, die eine ähnliche zonale Anordnung ihrer Kollagenfasern aufweisen (YOUN et al., 2006).



**Abbildung 36:** Anordnung und Form von Chondronen und Chondrozyten der verschiedenen Knorpelzonen des medialen Femurknorpels von Schweinen. Aus YOUN et al. (2006).

Die Chondrozyten und Chondrone der Oberflächenzone sind scheibenförmig parallel zur Knorpeloberfläche abgeflacht (JADIN et al., 2005; POOLE et al., 1987; VANWANSEEELE et al., 2002; YOUN et al., 2006), die der Übergangszone hingegen oval (POOLE et al., 1987) oder halbkugelförmig (ERRINGTON et al., 1997) und die der mittleren Knorpelzone rund. In der tiefen Zone sind sie zu perpendikulären, multi-zellulären Säulen angeordnet (FEDERICO et al., 2005; JADIN et al., 2005; YOUN et al., 2006).

In der Oberflächenzone des Knorpels sind die dicht gelagerten Zellen eher gruppenförmig und parallel zur Gelenkoberfläche angeordnet (SCHUMACHER et al., 2002), während sie in der tiefen Zone säulenförmig und weniger dicht angeordnet sind (HUNZIKER et al., 2002; JADIN et al., 2005). In der mittleren Knorpelzone sind schräg angeordnete Zellgruppen anzutreffen (JADIN et al., 2005).



**Abbildung 37:** Numerische Zelldichte (Zellen/mm<sup>3</sup>) bovinen Gelenkknorpels. Die Stellen 1-8 ergeben sich aus der Unterteilung des bovinen Knorpels von der Oberfläche (1) bis zur Tidemark (8) in acht gleich dicke Knorpelregionen. Aus WONG et al. (1996).

Bezüglich der Stoffwechselaktivität ist festzustellen, dass mit zunehmender Knorpeltiefe der Anteil an Zellorganellen wie Ribosomen, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Golgi-Apparat als Zeichen erhöhter Proteinbiosynthese und Stoffwechselaktivität zunimmt (WEISS et al., 1968). Allerdings enthalten die Chondrozyten der kalzifizierten Knorpelzone nur geringe Mengen an endoplasmatischem Retikulum und kleine Golgi-Apparate (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983). Sie besitzen vermutlich nur eine geringe Stoffwechselaktivität (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Da Stoffwechselaktivität und Zellgröße zueinander in Relation stehen, ist von der Oberflächennzone zur kalzifizierten Knorpelzone eine näherungsweise Verdoppelung des mittleren Matrixvolumen pro Zelle zu verzeichnen (WONG et al., 1996). Das mittlere Zellvolumen verdreifacht sich annähernd (ERRINGTON et al., 1997; WONG et al., 1996), die mittlere Zelloberfläche verdoppelt sich fast (HUNZIKER et al., 2002; WONG et al., 1996). Allerdings nimmt die Zelldichte mit zunehmender Knorpeltiefe ab, was wiederum den Stoffwechsel der Matrix negativ beeinflusst (JADIN et al., 2005). Die Zelldichte ist nämlich in der Oberflächennzone fast doppelt so hoch wie in der unteren radiären Zone (HUNZIKER et al., 2002; WONG et al., 1996). Auf diese

Weise steigt auch der Abstand zwischen den einzelnen Zellen mit zunehmender Knorpeltiefe (JADIN et al., 2005).

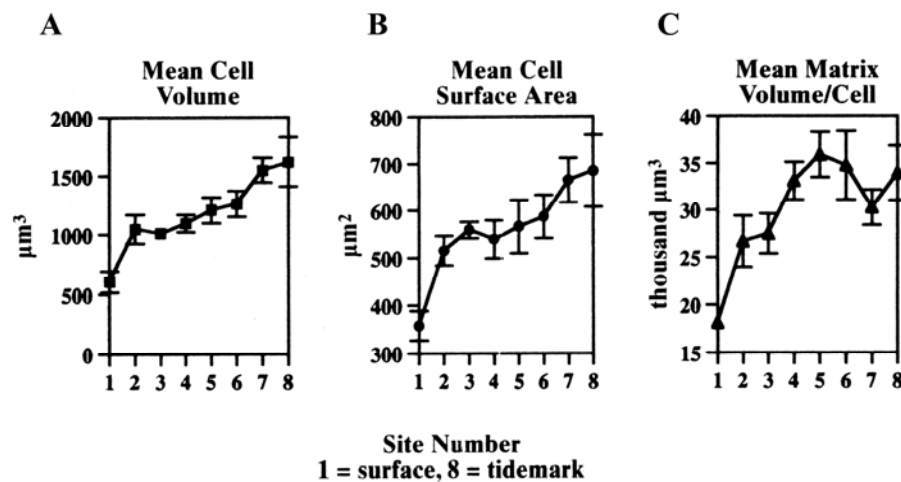
**Tab. 9:** Zusammenfassung der morphometrischen und biosynthetischen Parameter der vier Zonen des bovinen Gelenkknorpels. Aus WONG et al. (1996).

Parameter	Total (Stelle 1-8)	Oberflächenzone (Stelle 1)	Übergangszone (Stelle 2)	obere radiäre Zone (Stelle 3-5)	untere radiäre Zone (Stelle 6-8)
Zelldichte (Zellen/mm <sup>3</sup> )	35.000 (4,7)	54.000 (4,8)	38.000 (8,0)	31.000 (5,7)	30.000 (6,4)
Zellvolumendichte (%)	3,8 (2,7)	3,2 (12,0)	3,8 (6,2)	3,4 (3,8)	4,4 (3,8)
Oberflächendichte (1/cm)	180 (2,4)	190 (6,4)	190 (5,7)	170 (4,5)	190 (4,2)
mittleres Zellvolumen (µm <sup>3</sup> )	1.180 (5,1)	600 (14,5)	1.050 (11,6)	1.110 (3,7)	1.480 (7,2)
mittleres Oberflächenareal (µm <sup>2</sup> )	560 (4,4)	360 (8,6)	520 (6,1)	550 (4,1)	650 (6,8)
mittleres Matrixvolumen/ Zelle (µm <sup>3</sup> )	30.000 (6,4)	18.000 (4,1)	27.000 (10,2)	32.000 (6,5)	33.000 (7,4)
biosynthetische Aktivität (Körner/Zelle)	2.500 (7,1)	500 (18,0)	1.400 (12,6)	2.000 (7,3)	4.000 (11,2)

Die Werte repräsentieren den Durchschnitt der acht Knorpelproben (vgl. Abbildung 37) mit dem Fehlerkoeffizienten (%) in Klammern. Die Spalte „Gesamt“ repräsentiert den Durchschnitt aller acht Lokalisationen der Knorpelproben.

SICZKOWSKI und WATT stellten bereits 1990 bei den Chondrozyten von Mastschweinen einen Anstieg des mittleren Zelldurchmessers vom oberen Knorpeldrittel (10 µm, bei einer Spanne von 8-12 µm) bis hin zum unteren Drittel fest. In diesem unteren Drittel sind zwar auch Chondrozyten desselben mittleren Durchmesser anzutreffen, zusätzlich gibt es jedoch noch eine Größenklasse mit einem mittleren Durchmesser von 15 µm und außerdem noch einige große Zellen von 17-20 µm (SICZKOWSKI und WATT, 1990). YOUN et al. (2006) bestätigen den Anstieg von Zell- und Chondronvolumen mit zunehmender Knorpeltiefe. Das Zellvolumen in maturem porcinem Femurknorpel (Schweine älter als 2-3 Jahre) beträgt in der oberflächlichen Knorpelzone  $416 \pm 121 \mu\text{m}^3$ , im mittleren

Knorpelbereich  $729 \pm 165 \mu\text{m}^3$  und in der tiefen Knorpelzone  $1117 \pm 287 \mu\text{m}^3$  (YOUNG et al., 2006).



**Abbildung 38:** A. Mittleres Zellvolumen ( $\mu\text{m}^3$ ), B. Mittlere Zelloberfläche ( $\mu\text{m}^2$ ) und C. Mittleres Matrixvolumen/Zelle ( $\mu\text{m}^3$ ) bovinen Gelenkknorpels (Zahlen 1-8 vgl. **Abbildung 37**). Fehlerbalken repräsentieren SE, n = 8. Aus WONG et al. (1996).

Auch die Antwort der Chondrozyten auf natürliche Modulatoren wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren und Zytokine variiert abhängig von der jeweiligen Knorpelzone. Während alle Subpopulationen der Knorpelzellen auf Interleukin1 mit verringertem Anabolismus und beschleunigtem Katabolismus der Proteoglykane antworten, reagieren die Zellen der Oberflächenzone beispielsweise sensibler auf Zytokine als die Zellen nahe der kalzifizierten Knorpelzone (KUETTNER, 1992).

### 2.2.2 Zonale Unterschiede der Matrix

Aus den zonalen metabolischen Unterschieden der Chondrozyten resultieren auch die zonalen Unterschiede der Matrix (KUETTNER, 1992). Die Matrix der verschiedenen Knorpelzonen unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Konzentrationen von Wasser, Proteoglykanen und Kollagenen sowie der Größe ihrer Proteoglykanaggregate (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Während die hydrierten Proteoglykane in den oberflächlichen Schichten fast völlig fehlen, steigt ihr Gehalt mit zunehmender Knorpeltiefe an (BROOM und POOLE, 1983; VANWANSEEELE et al., 2002). Allerdings befindet sich das Maximum der Proteoglykankonzentration in der mittleren Knorpelzone und nimmt zum subchondralen Knochen hin wieder ab (HLAVACEK, 2000). Der Anteil an KS-enhaltenden Zellen sowie der KS-Gehalt der synthetisierten Proteoglykane steigt mit

zunehmender Knorpeltiefe. Die Ursache für Letzteres liegt entweder in einer Zunahme der Anzahl von KS-Ketten, Kettenlänge oder Sulfatierung. Allein der Anteil nicht-aggregierender Proteoglykane ist in den oberen Knorpelzonen höher (SICZKOWSKI und WATT, 1990).

Einige der beschriebenen Unterschiede spiegeln wahrscheinlich intrinsische Zellvariationen wider. Andere hingegen stellen eher eine Zellantwort auf extrinsische Regulationen dar, die durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen hervorgerufen werden (QUINN et al., 2005; SICZKOWSKI und WATT, 1990). So steigt zum Beispiel in Zellkulturen nach einiger Zeit der KS-Anteil in den Zellen der oberen Knorpelzone so an, dass sie diesbezüglich nicht mehr von den Zellen der unteren Knorpelzone zu unterscheiden sind. Dies lässt vermuten, dass die Expression von KS durch die Umgebung moduliert werden kann (ZANETTI et al., 1985). Auch bezüglich der zonalen Größenunterschiede der Chondrozyten erfolgt in Zellkulturen eine Anpassung. Nach 32 Tagen können hier die Zellen der verschiedenen Knorpelzonen aufgrund ihrer Größe nicht mehr voneinander unterschieden werden, da der mittlere Durchmesser aller Populationen nun 17 µm beträgt (SICZKOWSKI und WATT, 1990).

Andere zonale Unterschiede wie zum Beispiel KS-Gehalt der Proteoglykane, Anteil abgelagerter Proteoglykane in der Zellschicht und Anteil synthetisierter, nicht aggregierender Proteoglykane hingegen persistieren auch nach mehreren Wochen in der Zellkultur (SICZKOWSKI und WATT, 1990). Ebenso behalten die Chondrozyten den ihrem ursprünglichen anatomischen Platz entsprechenden Stoffwechsel bei. Zum Beispiel synthetisieren die Knorpelzellen der mittleren radiären Zone weiterhin eine gut strukturierte Matrix mit vielen KS-reichen Proteoglykanen, während die Zellen der Oberflächenschicht weniger Proteoglykane mit nur geringen Spuren an KS produzieren. Die Zellen der oberflächlichsten Schicht produzieren im Vergleich zu den Zellen der tieferen Schichten auch andere Mengen an Aggrekanen und DS-enhaltenden Proteoglykanen (KUETTNER, 1992). Die Persistenz dieser zonalen Unterschiede in Zellkulturen deutet darauf hin, dass zwischen den Chondrozyten verschiedener Knorpelzonen auch intrinsische Unterschiede existieren (SICZKOWSKI und WATT, 1990).

### 2.2.3 Zonenspezifischer Verlauf der Kollagenfibrillen

Die Verteilung der Kollagene im Gelenkknorpel ist relativ einheitlich, wobei der Kollagengehalt in der oberflächlichen Zone höher als in den übrigen Knorpelzonen ist (DIJKGRAAF et al., 1995; VANWANSEELE et al., 2002). Um die Belastung des Knorpels zu absorbieren, erstrecken sich die Kollagenfibrillen in alle Richtungen (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994). Der Großteil der Kollagenfasern weist allerdings eine zonenspezifische Vorzugsrichtung auf.

Im allgemeinen gleicht der Verlauf der Kollagenfibrillen durch die gesamte Knorpeldicke hindurch der Form von Arkaden, die in den tieferen Knorpelzonen senkrecht zum subchondralen Knochen angeordnet sind und sich in Richtung Knorpeloberfläche zu einem Bogen verbinden (AP GWYNN et al., 2002; BENNINGHOFF, 1925; EYRE, 2002; FEDERICO et al., 2005; HALL et al., 2003; KÄÄB et al., 1998a und 2000; KUETTNER, 1992). Manche der Kollagenfasern beginnen schon bei einer Knorpeltiefe von etwa 40% mit der Bogenbildung, was etwa dem unteren Rand der Übergangszone entspricht. Die Bögen befinden sich jedoch alle innerhalb des oberflächlichsten Knorpelviertels (MUEHLEMAN et al., 2003).

Diese zonale Einteilung des Gelenkknorpels aufgrund der Kollagenfaseranordnung ist bei allen Spezies zu erkennen, wobei die relative Dicke (Dicke in % zur Gesamtdicke des Knorpels) der verschiedenen Zonen Unterschiede aufweist (CLARK, 1991; KÄÄB et al., 1998a). Die relative Dicke zwischen subchondralem Knochen und Übergangszone beträgt im medialen Tibiaplateau zwar bei allen Spezies 60-80% und die der Übergangszone 10-15%, jedoch unterscheidet sie sich bezüglich der Zone mit den parallel zur Knorpeloberfläche verlaufenden Fasern. Diese macht beim Menschen fast 10% (250 µm) aus, während sie bei den anderen Spezies wie zum Beispiel dem Kaninchen mit nur 3-4% (10 µm) wesentlich dünner ist (KÄÄB et al., 1998a).

Untersuchungen von KÄÄB et al. (1998a) zur Anordnung der Kollagenfasern im medialen Tibiaplateau bei Menschen, Rindern, Schweinen, Hunden, Schafen, Kaninchen und Ratten ergaben für den Knorpel von Schwein und Mensch die größte Ähnlichkeit. Allerdings zeigen auch die Knorpel von Mensch, Hund und Kaninchen ähnliche Anordnungsmuster der Kollagenfasern. So sind bei allen drei Spezies die Kollagenfasern in der Peripherie des Tibiaplateaus dichter gelagert als im Zentrum, das im Vergleich zur Peripherie auch insgesamt weniger Kollagen und mehr

Proteoglykane enthält. Die radiären Kollagenfasern des Zentrums verlaufen bei allen untersuchten Spezies gerade und vertikal bis sie dicht unterhalb der Gelenkoberfläche scharf umbiegen. Bei den Fasern der Knorpelperipherie hingegen beginnt die Biegung bereits in der Knorpeltiefe. Da die verschiedenen Knorpelzonen auch durch den spezifischen Faserverlauf definiert sind, dominiert daher im zentralen Bereich die radiäre Knorpelzone, während Oberflächen- und Übergangszone zusammen nur 5% der Knorpeltiefe betragen. In der Peripherie hingegen machen diese beiden Zonen zusammen bis zu 50% aus (CLARK, 1991).

Bei Mensch (KÄÄB et al., 1998a; TESHIMA et al., 1995), Schwein, Hund (KÄÄB et al., 1998a) und Rindern (JEFFERY et al., 1991) sind die Kollagenfaserbündel blattähnlich, bei Schaf, Kaninchen und Ratte hingegen säulenförmig angeordnet (KÄÄB et al., 1998a). Die menschlichen Kollagenfasern sind breit und erscheinen als riesige Bündel, während die der anderen Spezies die Form dünner Bündel oder Säulen aufweisen. Der Durchmesser der einzelnen Kollagensäulen beträgt beim Rind 8-30 µm, beim Schaf 5-15 µm, beim Kaninchen 5-15 µm und bei der Ratte 4-8 µm. Die Ursache für die strukturellen Unterschiede ist noch unklar (KÄÄB et al., 1998a).

An der Knorpeloberfläche verlaufen die Kollagenfasern bei den Spezies mit blattähnlicher Faseranordnung in drei bis vier horizontalen Schichten (JEFFERY et al., 1991) hauptsächlich parallel zur Gelenkfläche (JEFFERY et al., 1991; VANWANSEELE et al., 2002). Jede dieser Schichten besteht aus einem Netz feiner Kollagenfibrillen, das mit den benachbarten verschmolzen oder durch überbrückende Fibrillen eng verbunden ist (JEFFERY et al., 1991). Durch ihre spezielle Anordnung kommt es zwischen benachbarten Kollagenschichten zum Auftreten von Spaltlinien (JEFFERY et al., 1991; VANWANSEELE et al., 2002). Diese engen, keilförmigen Spalten spiegeln die Winkelhalbierende des Kreuzungswinkels der Kollagenfasern wider. Sie kommen typischerweise innerhalb der Oberflächen- und Übergangszone von konkaven Gelenkkörpern vor, da hier vorzugsweise Dehnungsspannungen auftreten, welche für die Anordnung der Kollagenfasern verantwortlich sind. Damit demonstrieren die Spaltlinien bereits makroskopisch die zweidimensionale Anordnung der Kollagenfasern und durchqueren in der oberflächlichen Knorpelschicht die horizontal angeordneten Blätter, während sie in der Übergangszone vertikal zwischen den benachbarten Blättern verlaufen. Wird eine Knorpelprobe parallel zu den Spaltlinien belastet, so ist ihre Steifigkeit doppelt bis

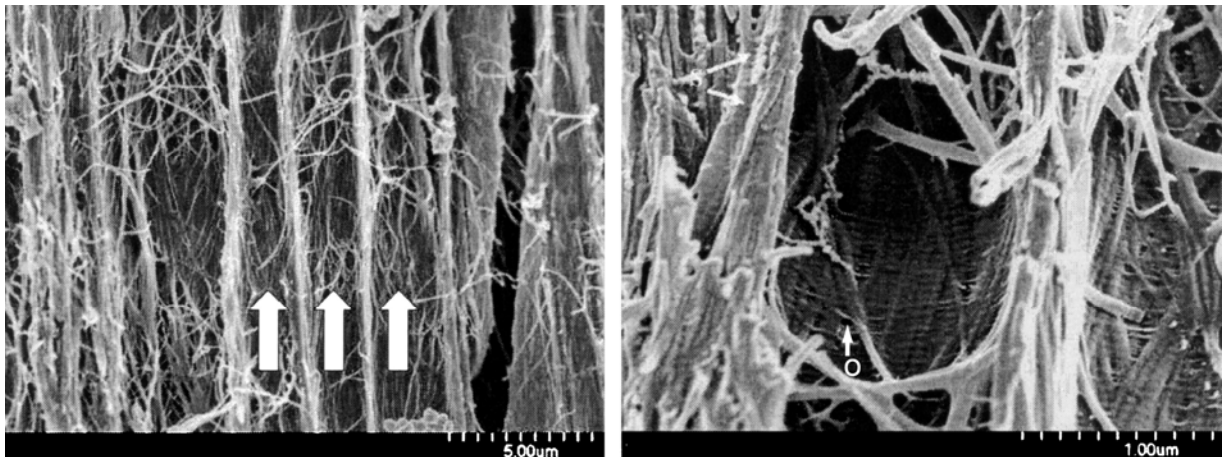
dreimal so groß wie bei derselben Belastung im rechten Winkel zu den Spaltlinien (JEFFERY et al., 1991).

HWANG et al. (1992) beschreiben den Verlauf der Kollagenfibrillen in der Oberflächenzone als wellenförmige breite Bänder aus aggregierten Fibrillen, meist parallel zur Gelenkoberfläche. Die Wellenform kann mit der biochemischen Funktion der Kollagenfibrillen zusammenhängen, oder es handelt sich um Artefakte (HWANG et al., 1992). Sowohl die einzelnen Fibrillen, als auch ihr Netzwerk sind in der Oberflächenzone feiner als in der darunterliegenden Übergangszone, in der die Kollagenfibrillen schräg verlaufende (JEFFREY et al., 1991; VANWANSEELE et al., 2002), lose, arkadenförmige Bündel formen (HWANG et al., 1992).

In der mittleren radiären Zone sind die Knorpelfibrillen bei den entsprechenden Spezies ebenfalls in blattähnlicher Weise organisiert und verlaufen hauptsächlich senkrecht zur Gelenkoberfläche (JEFFERY et al., 1991; VANWANSEELE et al., 2002). Dieser vertikale Verlauf setzt sich in der kalzifizierten Knorpelzone fort (BRUCKNER und VAN DER REST, 1994; HWANG et al., 1992), in der die Kollagenfibrillen auch verankert sind (VANWANSEELE et al., 2002).

In allen Knorpelzonen sind zusätzlich schräg verlaufende Fasern und viele verbindende Fibrillen zwischen den benachbarten Bündeln anzutreffen (JEFFERY et al., 1991).

AP GWYNN et al. (2002) entdeckten im Tibiaknorpel von Kaninchen mit Hilfe modifizierter neuer Techniken eine bislang noch nicht beschriebene tubuläre Kollagenanordnung. Aufgrund der äußerst geringen Unterschiede zwischen der fundamentalen Knorpelstruktur verschiedener Spezies (ZAMBRANO et al., 1982) ist anzunehmen, dass ähnliche tubuläre Strukturen bei allen Säugern anzutreffen sind (AP GWYNN et al., 2002). In dem von ihnen als radiale Zone beschriebenen Knorpelbereich zwischen oberflächlicher und kalzifizierter Knorpelzone befinden sich zwischen den senkrecht angeordneten Chondronen Regionen mit ebenfalls senkrecht ausgerichteten Tubuli, deren Wände aus dicht gepackten Kollagenfibrillen bestehen (AP GWYNN et al., 2000).

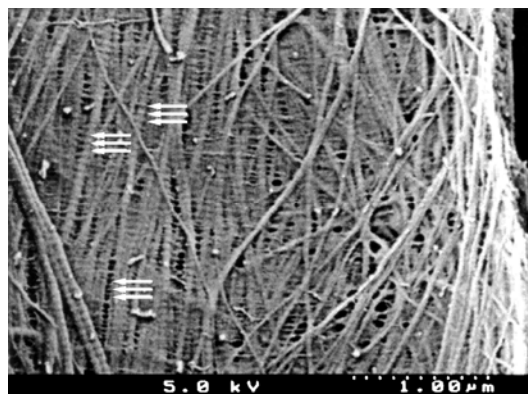


**Abbildung 39:** Aus AP GWYNN et al. (2002).

Mittlere Vergrößerung der Tubuli in der radialen Knorpelzone (longitudinaler Schnitt, FESEM). Viele der Tubuli (Pfeile) verlaufen kontinuierlich von der kalzifizierten bis zur oberflächlichen Knorpelzone.

Stark vergrößertes FESEM-Bild eines einzelnen Tubulus. Es zeigt die orthogonale Anordnung der 10 nm dicken Fibrillen, die in regelmäßigem Abstand zueinander (O) über den radialen 30-nm-Fibrillen liegen.

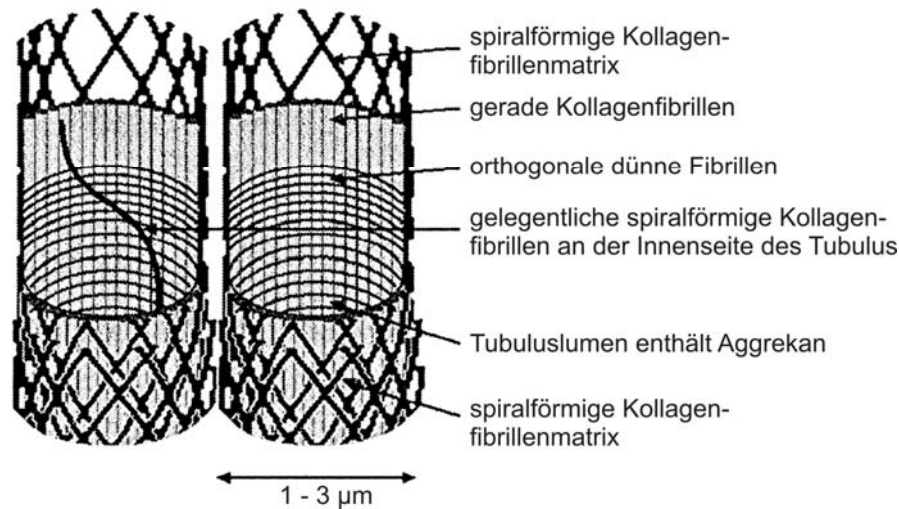
In den Tubuli mit einem Durchmesser von 1-3 µm befindet sich kein Kollagen, dafür jedoch Aggrekan. Viele dieser Tubuli verlaufen kontinuierlich zwischen oberflächlicher und kalzifizierter Knorpelzone. In der tieferen radiären Zone scheinen die Wände der Tubuli am dicksten und besten organisiert zu sein. Diese Beobachtung korreliert mit der Proteoglykankonzentration, die in dieser Region ebenfalls am höchsten ist (AP GWYNN et al., 2002).



**Abbildung 40:** High power FESEM-Bild zeigt die orthogonale Anordnung der Fibrillen eines Tubulus der radiären Knorpelzone. Diese 10 nm dicken Fibrillen liegen in regelmäßigem Abstand zueinander (Pfeile). Aus AP GWYNN et al. (2002).

Im Inneren der Tubuluswand befinden sich orthogonal zu den 30 nm dicken radial verlaufenden Kollagenfibrillen dünnere Fibrillen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm. Ihr Abstand zueinander ist gleichmäßig und beträgt 60-70 nm. Vereinzelt verlaufen im Inneren des Tubulus auch spiralförmige Kollagenfibrillen. Außerhalb der radialen Kollagenfibrillen überspannen hingegen viele Kollagenfibrillen die

Tubuluswand spiralförmig sowohl nach rechts, als auch nach links gewunden und wahrscheinlich mit denen benachbarter Tubuli verstrickt (AP GWYNN et al., 2002).



**Abbildung 41:** Diagramm der strukturellen Anordnung von Kollagen und Proteoglykanen in der radiären Zone des Tiabiaknorpels von Kaninchen. Aus AP GWYNN et al. (2002).

## 2.3 Knorpeloberfläche

Die Gelenkknorpeloberfläche ist sowohl für die Ernährung als auch für den Verschleiß und die Schmierfähigkeit des Knorpels von großer Bedeutung. Daher ist eine genaue Kenntnis der Oberflächenzusammensetzung von äußerster Wichtigkeit für das Verständnis der Knorpel- und Gelenkfunktion.

Da die Knorpeloberfläche bei verschiedenen Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel Phasenkontrastmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie sehr unterschiedliche Erscheinungsformen zeigt, existieren in der Literatur bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Beschreibung relativ große Unstimmigkeiten. Die Knorpeloberfläche wurde erstmals von MAC CONAIL (1951) per Phasenkontrastmikroskopie als Lamina splendens beschrieben. Da diese sehr dünne oberste, kollagenfreie Knorpelschicht wegen ihrer Zartheit auch bei guter Erhaltung unter dem Rasterelektronenmikroskop nicht als einzelne Lage erscheint (NISHIDA et al., 1995), beschrieben zum Beispiel CLARK (1990) die unter der Lamina splendens liegende, aus dicht gepackten ineinandergreifenden Kollagenfasern bestehende Schicht als oberste Knorpelschicht und bezeichneten diese als Lamina splendens. Die oberste Schicht des Knorpels ist jedoch amorph

und frei von Kollagenfasern (GRAINDORGE et al., 2005; JEFFREY et al., 1991; NISHIDA et al., 1995).

ORFORD und GARDNER (1985) berichten von einer zweischichtigen zellfreien Lamina an der Knorpeloberfläche noch oberhalb der Oberflächenzone. Im Gegensatz dazu handelt es sich nach TESHIMA et al. (1995) bei der obersten Knorpelschicht um die Oberflächenzone, bestehend aus der zellfreien kollagenhaltigen Lamina splendens und einer tieferen zellhaltigen Schicht. Von der Zusammensetzung her entspricht die von ihnen als Lamina splendens bezeichnete Schicht der von ORFORD und GARDNER (1985) als tiefere der zweischichtigen Lamina beschriebenen Schicht oberhalb der Oberflächenzone.

**Tab. 10:** Übersicht über die unterschiedlichen Beschreibungen der oberflächlichsten Knorpellagen von verschiedenen Autoren.

Autor	Untersuchungs-Methode, Spezies	Charakteristika			Bezeichnung
		oberste Schicht	zweite Schicht	dritte Schicht	
<b>Teshima et al. 1995</b>	PM, SEM, IH; humaner Gelenkknorpel		4-8 µm, azellulär, Kollagen I, III	zellhaltig	Lamina splendens; Oberflächenzone
<b>Nishida et al. 1995</b>	EM, IH; Kaninchen	50 nm, azellulär, kollagenfrei	200 nm, azellulär, feine Kollagenfibrillen		Oberflächliche und tiefere Lamina
<b>Graindorge et al. 2005</b>	CEM Rind ; Literaturrecherche	amorph, kollagenfrei			
<b>Jurvelin et al. 1996</b>	Atomic force TEM	azellulär, kollagenfrei			
<b>Orford u. Gardner 1985</b>	TEM; Polyanionen-Färbung; Hund	50 nm, kollagenfrei	400 nm, azellulär, mit Kollagenen und PG-Partikel		Oberflächliche und tiefe Lamina splendens
<b>Kumar et al. 2001</b>	Atomic force TEM; Schwein	azellulär, kollagenfrei			Lamina splendens
<b>Jeffrey et al. 1991</b>	SEM ; Rind	kollagenfrei			Lamina splendens

PM - Polarisationsmikroskopie; SEM – Scanning-Elektronenmikroskopie; IH -immunhistochemische Verfahren ; EM - Elektronenmikroskopie; CEM – Cryo- Rasterelektronenmikroskopie; TEM – Transmissionselektronenmikroskopie

In jedem Fall existieren oberhalb der Übergangszone des Knorpels drei Schichten, von denen die zwei obersten zellfrei sind und die untere der beiden autorenabhängig noch nicht, oder bereits schon zur Oberflächenzone gezählt wird. Im folgenden Text wird die Einteilung der zwei obersten Knorpelschichten bezüglich ihrer anatomischen Merkmale vorgenommen und auf explizite Bezeichnungen verzichtet.

Die Knorpeloberfläche selbst ist charakterisiert durch Vertiefungen, die gewöhnlich weniger als 0,3 µm, manchmal jedoch auch bis zu 1,5 µm tief sind (WEISS et al.,

1968). Diese Profile werden allerdings erst nach Entfernung der obersten lipidhaltigen Lamina sichtbar, die dem Gelenkknorpel seine glatte Oberfläche verleiht (KIRK et al., 1993).

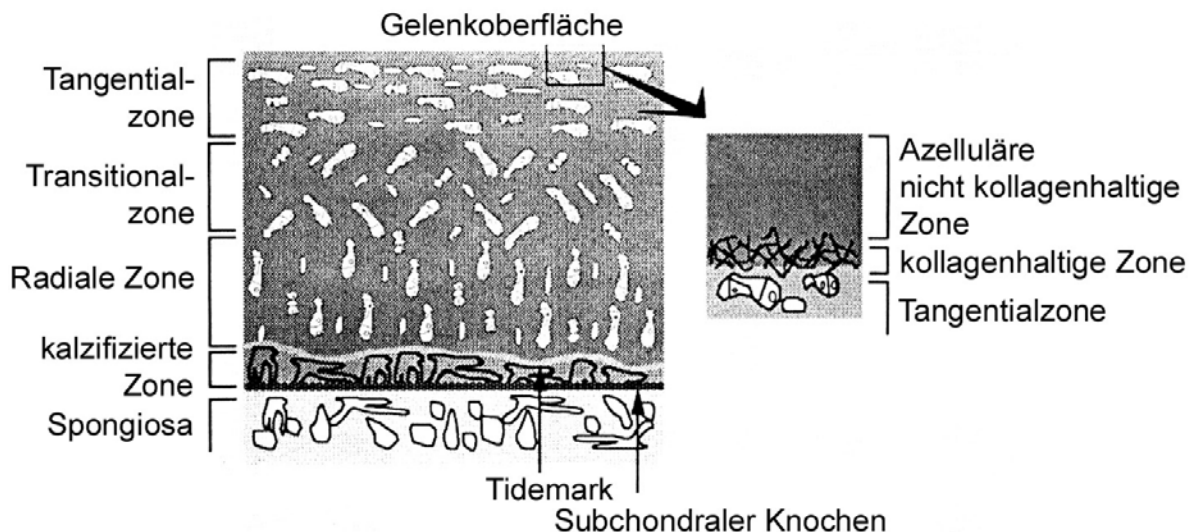
An der Knorpeloberfläche oberhalb der später als Oberflächenzone bezeichneten Knorpelschicht befindet sich eine zweischichtige zellfreie Lamina, die beim Hund insgesamt bis zu 450 nm (ORFORD und GARDNER, 1985), beim Schwein 800 nm – 2 µm (KUMAR et al., 2001) und beim Kaninchen 200-300 nm dick ist. Die oberste dieser beiden Schichten wird zusätzlich von einer etwa 10 nm dicken Fibronektinschicht gesäumt (NISHIDA et al., 1995).

Die oberflächlichste Lamina besteht aus amorphen Substanzen wie zum Beispiel möglicherweise Proteinen, Glykoproteinen und Lipiden (KUMAR et al., 2001; TESHIMA et al., 2004). Sie ist beim Hund etwa 50 nm dick, elektronendicht und besitzt weder Kollagenfasern noch Hyaluronsäure. Ihre Matrix ist von anionischer Natur, wobei dies nicht von sulfatierten GAGs herrührt, da diese hier fehlen. Die Polyanionen erscheinen als elektronendichte Filamente in der interfibrillären Matrix (ORFORD und GARDNER, 1985). GRAINDORGE et al. (2005) hingegen berichten von einer allgemeinen Annahme, dass die oberflächlichste Knorpellage Proteoglykane, CS, KS und/oder Hyaluronsäure-Protein-Komplexe enthält. Auch KUMAR et al. (2001) berichten von einem starken Anstieg der Reibungskoeffizienten nach der Zugabe von Chondroitinase ABC zu Knorpelproben. Da dieses Enzym selektiv GAGs verdaut, deutet diese Tatsache auf ein Vorkommen von GAGs an der Knorpeloberfläche hin.

KIRK et al. (1993) untersuchten die Oberflächenzone des Gelenkknorpels mit Hilfe einer Kombination aus Lichtmikroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und energiedispersiver Spektroskopie. Wie schon andere Autoren vor ihnen fanden sie an der äußersten Knorpeloberfläche eine 0,1-0,4 µm dicke Lamina aus dicht gepackten Phospholipiden, denen eine wichtige Rolle als effektives Schmiermittel in den synovialen Gelenken zugeschrieben wird. Durch ihre osmiophilen und hydrophoben Eigenschaften können sie zudem als wasserdichtes Agens die Schmierflüssigkeit in der Kontaktzone der Gelenkflächen zurückhalten (KIRK et al., 1993; SARMA et al., 2001).

Da die amorphe oberflächlichste Schicht weicher als der darunterliegende Knorpel ist, kann sie die einwirkende Kraft effektiver auf die flüssige Phase des Knorpels übertragen und somit die Reibung reduzieren und den Knorpel besonders während

Schockbelastung und anderen vorübergehenden Belastungen schützen (GRAINDORGE et al., 2005). Außerdem stellt sie sowohl eine mechanische als auch ladungsdichte Barriere dar, die eine Penetration großer Moleküle durch den Gelenkknorpel verhindert. Als mechanische Barriere geringer Permeabilität hilft sie möglicherweise auch mit, die unter ihr liegenden GAGs im Knorpelgewebe zurückzuhalten (ORFORD und GARDNER, 1985).



**Abbildung 42:** Schema der zonalen Struktur reifen Gelenkknorpels. Die oberflächlichste Knorpelschicht besteht aus einer azellulären, kollagenfreien Zone, einer fibrillären Zone und der darunterliegenden Tangentialzone. Aus KUMAR et al. (2001).

Die tiefere der beiden zellfreien Schichten ist im caninen Femur bis zu 400 nm (ORFORD und GARDNER, 1985) dick und besteht hauptsächlich aus parallel zur Gelenkoberfläche verlaufenden dünnen Kollagenfibrillen (NISHIDA et al., 1995). In humanen Femurköpfen ist diese Schicht 4-8 µm dick (TESHIMA et al., 2004) und besteht aus Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser zwischen 75 und 100 nm, während er in der nachfolgenden Knorpelzone zwischen 125 und 150 nm beträgt und die Kollagenfibrillen hier anhaftende granuläre Substanzen aufweisen (TESHIMA et al., 1995).

Diese kollagenhaltige Schicht ist von der darunterliegenden unabhängig und daher abziehbar, ohne dass Kollagenfibrillen verletzt werden. Da sie jedoch mechanisch kontinuierlich in die Synovia übergeht, ist anzunehmen, dass die biochemischen Eigenschaften dieser Kollagenfibrillen der Synovia sehr ähnlich sind und sich aber von denen der darunterliegenden Knorpelschichten unterscheiden (TESHIMA et al., 1995 und 2004). Tatsächlich konnten TESHIMA et al. (2004) immunohistochemisch

Kollagen I und III, jedoch kein Kollagen II in dieser zellfreien tieferen Schicht der Lamina splendens nachweisen. Während sich Kollagen I ausschließlich in dieser Schicht befand, waren Spuren von Kollagen III auch in der extrazellulären Matrix der Oberflächenzone sowie in der perizellulären Matrix der Übergangszone des Knorpels zu entdecken. Auch in der interzellulären Matrix des gesamten Synovialgewebes war immunohistochemisch Kollagen I und III nachzuweisen, nicht aber Kollagen II. Die Kontinuität und die gleiche Kollagenzusammensetzung von Synovialgewebe und tieferer Schicht der Lamina splendens lassen vermuten, dass Letztere einen Rest des Bindegewebes darstellt, das vom synovialen Mesenchym des pränatalen Stadiums abstammt (TESHIMA et al., 2004).

Diese Knorpelschicht enthält außerdem auch Proteoglykane und ist reich an CS. Letzteres fungiert wahrscheinlich als Ladungsbarriere in enger Beziehung mit den als mechanische Barriere dienenden Kollagenfibrillen (NISHIDA et al., 1995). Da man annimmt, dass die Permeabilität der Matrix in umgekehrter Relation zum GAG-Gehalt steht, setzt diese Schicht zudem auch durch ihren hohen Gehalt an GAGs die Permeabilität für große Moleküle herab (ORFORD und GARDNER, 1985). Auf diese Weise wird sowohl der Austritt großer Moleküle, wie zum Beispiel Proteoglykane, sowie der Eintritt großer Moleküle, wie zum Beispiel Antikörper oder andere Proteine, in den Knorpel eingeschränkt und der Gelenkknorpel vom Immunsystem isoliert. Bei Störungen dieser Barriere kommt es zum Durchtritt großer Moleküle über die Knorpel-Synovialflüssigkeits-Grenze und zur Stimulierung immuner oder entzündlicher Reaktionen. Wahrscheinlich besteht hier auch der Zusammenhang mit dem Verlust von Proteoglykanen aus der Knorpelmatrix bei Osteoarthritis und der Penetration von Enzymen und Immunkomplexen in den Knorpel bei rheumatoider Arthritis (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Die GAGs dieser Knorpelschicht stellen außerdem einen Kompressionsschutz für die unter ihnen in der GAG-ärmeren Zone liegenden Kollagenfibrillen dar (ORFORD und GARDNER, 1985). Weiterhin können Veränderungen dieser Lamina und ihrer Funktionen durch Verletzung oder Alterung aber auch eine Erhöhung der Reibungswirkung auf die Gelenkoberfläche hervorrufen. Ein Reibungsanstieg wiederum beeinträchtigt die normale Gelenkdynamik und führt zu einem abnormen mechanischen Druck auf den Knorpel. Hierdurch werden die Chondrozyten zu einem Reparationsversuch in Form von überschießender Fibronektinsynthese veranlasst.

Der Verlust oder die Beschädigung der oberflächlichen Lamina führt somit zur Verschlechterung des Gesamtgefüges „Gelenkknorpel“ (NISHIDA et al., 1995).

## **2.4 Knorpelzonen**

### **2.4.1 Oberflächenzone**

Die Oberflächenzone ist die dünnste der vier Knorpelzonen. Durch ihre einzigartige Struktur und Zusammensetzung erlangt sie spezielle mechanische und wahrscheinlich auch biologische Eigenschaften. Es handelt sich hierbei um eine bei Hunden etwa 20 µm dicke Schicht (DUNHAM et al., 1988) mit flachen, ellipsoidalen, parallel zur Gelenkoberfläche angeordneten Chondrozyten. Ihre Zelldichte ist höher als in den tieferen Knorpelzonen (SICZKOWSKI und WATT, 1990). Der Gehalt an Fibronektin und Wasser ist in dieser Knorpelzone am höchsten (BUCKWALTER und MANKIN, 1997), während im Vergleich zu anderen Zonen der Anteil der Matrix relativ gering ist. Dieser nimmt allerdings mit zunehmender Knorpeltiefe zu (WEISS et al., 1968). Die Matrix weist außerdem eine hohe Kollagen- und niedrige Proteoglykankonzentration auf (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Die dicht und parallel zur Oberfläche gelagerten Kollagenfibrillen (AP GWYNN et al., 2002; BUCKWALTER et al., 1988) bestimmen die mechanischen Eigenschaften des gesamten Knorpels mit, indem sie dieser Zone große Zugfestigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Scherkräften verleihen, die während der Gelenkbewegung auftreten (BUCKWALTER et al., 1988; HLAVACEK, 2000; MOW und ROSENWASSER, 1988). Die Kollagenfibrillen der Oberflächenzone sind dünn und ihr Durchmesser variiert im Gegensatz zu den tieferen Knorpelzonen kaum (EYRE, 2002).

Wegen ihres äußerst geringen Proteoglykangehalts (MUEHLEMAN et al., 2003; ORFORD und GARDNER, 1985) ist diese Knorpelzone zwar nicht annähernd so druckresistent wie die tieferen proteoglykanreichen Zonen (ORFORD und GARDNER, 1985), trotzdem liefert sie einen wichtigen Beitrag bezüglich des Verhaltens von Knorpel auf Druckkräfte. Durch Entfernung dieser Zone wird nämlich die Permeabilität des Gewebes und die Belastung des makromolekularen Gerüsts während Kompression erhöht und damit das mechanische Verhalten des Gelenkknorpels verändert (GUILAK et al., 1994a).

### 2.4.2 Übergangszone

Wie der Name bereits andeutet, ist diese Zone bezüglich ihrer Morphologie und Matrixzusammensetzung ein Übergang von oberflächlicher zu radiärer Knorpelzone. Ihr Volumen beträgt ein Vielfaches der oberflächlichen Zone (BUCKWALTER und MANKIN, 1997), ist aber geringer als das der radiären (DUNHAM et al., 1988). Da der Matrixanteil einschließlich des Proteoglykangehalts höher als in der oberflächlichen Zone ist, liegen die mit zunehmender Knorpeltiefe dicker werdenden Kollagenfasern weiter auseinander. Die Faseranordnung erscheint zudem ohne Vorzugsrichtung zufällig orientiert. Darüber hinaus ist auch der Wassergehalt in dieser Zone geringer als in der oberflächlichen Zone (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Sowohl Zellgröße als auch Zellkonzentration sind in der Übergangszone größer als in der radiären Knorpelzone (DUNHAM et al., 1988). Die ovalen (POOLE et al., 1987; WEISS et al., 1968) beziehungsweise halbkugelförmigen (ERRINGTON et al., 1997) Chondrozyten sind meist in Paaren oder Gruppen ohne bestimmte Orientierung angeordnet (POOLE et al., 1987). Im Vergleich zu den Zellen der Oberflächenzone haben sie einen höheren Gehalt an Mitochondrien und rauem endoplasmatischem Retikulum, das viele konzentrische Lamellen bildet, sowie einen umfangreicheren Golgi-Apparat mit vielen Vesikeln und Vakuolen. Sie besitzen kleine Zellfortsätze und ihre Zellkerne sind gut entwickelt (WEISS et al., 1968; POOLE et al., 1987). In manchen Zellen sind außerdem große Glykogenmengen enthalten (WEISS et al., 1968).

### 2.4.3 Radiäre Zone

In der radiären Zone sind die dicksten Kollagenfasern, die höchste Konzentration von Proteoglykanen und der niedrigste Gehalt an Wasser anzutreffen (WEISS et al., 1968).

Die Kollagenfasern sind ebenso wie die Chondrozytensäulen senkrecht zur Gelenkoberfläche und parallel zu diesen angeordnet (EYRE, 2002; POOLE et al., 1984). Sie reichen bis in die Tidemark, einer dünnen basophilen Grenzlinie zwischen hyalinem und kalzifiziertem Knorpel (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Die radiäre Vorzugsrichtung der Kollagenfasern ist erst im Gelenkknorpel skelettreicher Schweine anzutreffen, nicht jedoch bei Schweinen mit unreifem Knorpel (CLARK, 1990; PUTZ und FISCHER, 1993).

Die Zellen der radiären Zone sind, verglichen mit den anderen Knorpelzonen, am größten, rund bis spheroidal und ordnen sich normalerweise in Gruppen aus sechs bis neun Zellen säulenförmig, senkrecht zur Gelenkoberfläche an (BUCKWALTER und MANKIN, 1997; ERRINGTON et al., 1997; POOLE et al., 1987; QUINN et al., 2005). Ihre Volumendichte beträgt nur 1800 Zellen pro mm<sup>3</sup> und ist damit ziemlich gering (KUETTNER, 1992). Sie enthalten viel endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Glykogen, große Golgi-Apparate und besonders stark ausgeprägte intrazelluläre zytoplasmatische Filamente (WEISS et al., 1968). Außerdem weisen sie eine Vielzahl an Zellfortsätzen auf (POOLE et al., 1987).

Die Hauptfunktion der Radiärzone liegt in der Verankerung des nicht-kalzifizierten im kalzifizierten Knorpel (EYRE, 2002; POOLE et al., 1987). Allerdings trägt diese Zone durch ihren hohen GAG-Gehalt und dem daraus resultierenden Quellungsdruck auch zur Spannung des Kollagenfasernetzes bei. Aufgrund des Faserverlaufes richtet sich diese Spannung senkrecht von der Oberfläche des Knochens bzw. des verkalkten Knorpels weg.

#### **2.4.4 Kalzifizierte Knorpelzone**

Der Gelenkknorpel ist mit der rauen Oberfläche des darunterliegenden subchondralen Knochens durch eine dünne Schicht kalzifizierten Knorpels verzahnt. Trotzdem bleiben Knorpel und Knochen getrennt (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983). Die kalzifizierte Knorpelzone stellt also den Übergang zwischen Knorpel und Knochen dar (VANWANSEELE et al., 2002). Der Anteil dieser Zone an der gesamten Knorpeldicke beträgt bei menschlichen Femurköpfen zwischen 3 und 9%. Die Höhe des kalzifizierten Knorpels wird als Parameter für seine Anpassung an Langzeitbeanspruchungen gesehen. Sie unterliegt jedoch lokalen Schwankungen, da die Verzahnungen des subchondralen Knochens in bis zu 50% der Dicke der kalzifizierten Knorpelzone hineinragen (MÜLLER-GERBL et al., 1987).

Die Dicke des kalzifizierten Knorpels bleibt während des gesamten Lebens etwa gleich, da auch während der enchondralen Ossifikation das Voranschreiten der Kalzifizierungsfront in den nicht-kalzifizierten Knorpel mit der Absorptionsgeschwindigkeit des kalzifizierten Knorpels durch die enchondrale Ossifikation im Gleichgewicht steht (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983).

Die Chondrozyten der kalzifizierten Knorpelzone sind relativ klein und enthalten nur geringe Mengen an endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparaten. Sie sind in

die Oberfläche der Kalzifizierungsfront eingebettet und jede Zelle ist von etwas kalzifiziertem Gewebe umgeben (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983). In einigen Regionen sind die Chondrozyten sogar völlig von kalzifiziertem Knorpel umgeben, so dass anzunehmen ist, dass sie nur eine sehr geringe Stoffwechselaktivität besitzen (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Trotzdem ist auch diese Zone metabolisch aktiv und scheint relativ konstant Typ-X-Kollagene zu bilden. Wenn diese kalzifizierte Zone zum Beispiel durch ein Trauma aktiviert wird, kann sie als eine Art Mini-Wachstumsplatte agieren. Allerdings hat dies eine Dickenabnahme des darüberliegenden Knorpels zur Folge (GANNON et al., 1991).

Als Grenze zwischen dem kalzifizierten und nicht-kalzifizierten Knorpel liegt eine histologisch deutliche Linie, bezeichnet als Tidemark (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983; VANWANSEELE et al., 2002). Diese Kalzifizierungsfront enthält sowohl Kalzium-Phospholipid-Komplex-haltige Lipide, die denen des Knochens ähneln, als auch die Enzyme ATPase und alkalische Phosphatase. Dies und die Tatsache, dass sich der Proteoglykangehalt dieser Zone verändert, deuten auf eine spezifische zelluläre Aktivität nahe der Tidemark hin und lassen auf einen dort stattfindenden Regulierungsprozess schließen (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983).

#### Die physiologische Kalzifizierung des Gelenkknorpels

Die Kalzifizierung des Gelenkknorpels und die darauffolgende enchondrale Ossifikation sind vermutlich für die Gelenkform und somit für die Verteilung der Last von Bedeutung. Der genaue rückwirkende Mechanismus, der die Formation und das Voranschreiten der Kalzifizierungsfront kontrolliert, ist noch ungeklärt, scheint aber mit der Belastung der Gelenkoberfläche in Zusammenhang zu stehen. Veränderungen dieses Mechanismus haben jedenfalls Auswirkungen auf die Gelenkform und damit auch auf die Belastungsverteilung (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983).

Bei der Kalzifizierung in der Tidemark handelt es sich um einen aktiven Prozess lebender Zellen und nicht um eine dystrophische Kalzifikation infolge von Zelltod. Die Chondrozyten in der Nähe der Kalzifizierungsfront synthetisieren Substanzen, die die Mineralisierung fördern: extrazelluläre Matrixvesikel, die für die Ablagerung von Hydroxyapatiten sorgen, Enzyme, die zum Anstieg der lokalen Kalzium- und Phosphatkonzentration führen, sowie Phosphoproteine, Glykoproteine, Proteolipide

und Kalzium-Phospholipid-Komplexe, die alle möglicherweise in die initiale Mineralablagerung involviert sind. Zusätzlich sind noch andere, die Größe und Orientierung der Mineralkristalle mitbestimmende Faktoren beteiligt. Da sich die Kalzifizierungsfront in einem dynamischen Gleichgewicht befindet, wirken hemmende oder limitierende Substanzen wie Proteoglykane, Nukleotidtriphosphate und Pyrophosphate den genannten Faktoren, die eine Kalzifizierung vorantreiben, entgegen (BULLOUGH und JAGANNATH, 1983).

## 2.5 Knorpeldicke

Die Knorpeldicke trägt maßgeblich zur biochemischen Funktion des Gelenkknorpels bei und kann innerhalb eines Gelenks beträchtlich variieren (ECKSTEIN et al., 2002; FRANZ et al., 2001).

KÄÄB et al. (1998a) untersuchten die Knorpeldicke des medialen Tibiaplateaus bei verschiedenen Spezies und fanden dabei eine Abhängigkeit zum Körpergewicht: Boviner Knorpel ist mit 4,4 mm ( $\pm 0,22$ ) der dickste bei einem Körpergewicht von 550 kg ( $\pm 24$ ), menschlicher Knorpel liegt mit 3,6 mm ( $\pm 0,34$ ) bei einem Körpergewicht von 78 kg ( $\pm 4,2$ ) an zweiter Stelle und bei allen anderen Spezies (Hund, Schaf, Schwein, Kaninchen und Ratte) ist der Knorpel dünner als 2 mm.

Im Bezug auf das Körpergewicht ist der Knorpel von Mensch und Kaninchen im Vergleich zu den anderen relativ dick. Der Grund dafür mag in der Belastung liegen. So ist der Mensch als einzige der untersuchten Spezies ein Zweibeiner, und auch das Kaninchen trägt im Unterschied zu den Übrigen einen Großteil der Last auf den Hintergliedmaßen. Diese beiden sind also höheren statischen Spitzenbelastungen ausgesetzt (KÄÄB et al., 1998a).

# Physiologie des Gelenkknorpels

## 3 Stoffwechsel des Gelenkknorpels

Jede Knorpelzelle kann sämtliche im Knorpel vorkommende Matrixbestandteile synthetisieren und abbauen. Sie ist somit für Aufrechterhaltung und Stoffwechsel der extrazellulären Matrix in ihrer Umgebung verantwortlich (DIJKGRAAF et al., 1995; KUETTNER, 1992; SZAFRANSKI et al., 2004). Die verschiedenen Matrixkomponenten des Knorpels unterliegen nämlich zeitlebens einem permanenten Stoffwechsel, wobei unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau durch die Chondrozyten herrscht (AIGNER und STÖVE, 2003; LOHMANDER, 1988; LOTZ et al., 1995; TRIPPEL, 1995). Jeder Verlust von Matrixkomponenten wird durch eine erneute Synthese von korrekter Qualität und Quantität kompensiert und somit eine konstante Konzentration der Matrixbestandteile aufrechterhalten. Die neu synthetisierten Makromoleküle werden dann in das hochorganisierte Matrixgerüst eingefügt (DIJKGRAAF et al., 1995; VAN DER KRAAN et al., 2002).

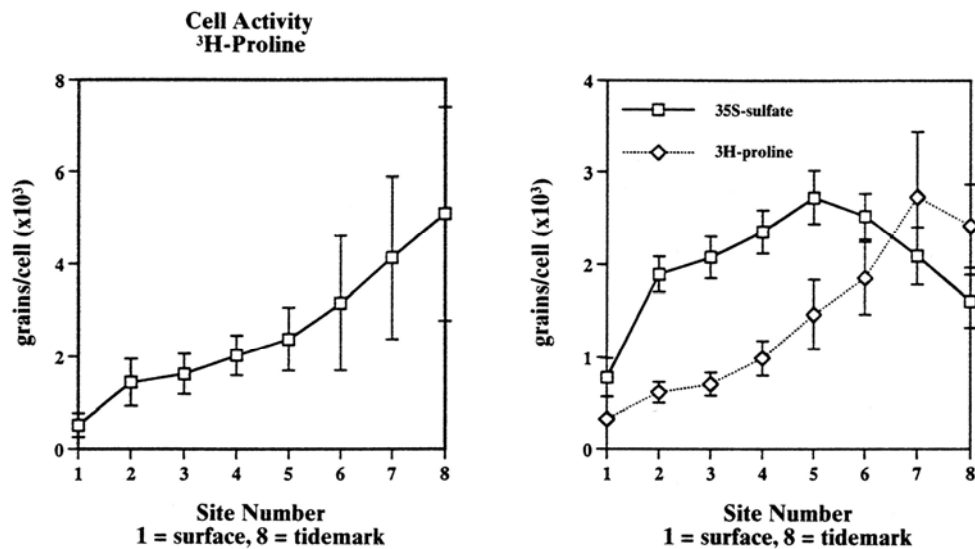
Allerdings wurde festgestellt, dass der Großteil des Stoffwechsels und der Ablagerung der Proteoglykane innerhalb der unmittelbaren Umgebung der Zellen stattfindet. Bei bovinen Zellen mit einem Durchmesser von 10 µm gilt dies für eine Entfernung von bis zu etwa 13 µm vom Zellzentrum. Da jedoch in reifem Knorpelgewebe die Abstände zwischen den einzelnen Zellen deutlich größer sind als in unreifem Knorpel, liegt ein Großteil des reifen (hier bovinen) Knorpelgewebes außerhalb dieses Bereichs. Bei Defekten in reifem Gelenkknorpel wird daher die effektive Heilung durch den unzureichenden Matrixstoffwechsel beeinträchtigt. In unreifem Knorpel hingegen liegen etwa 85% des Gewebevolumens der oberflächlichen und mittleren Knorpelzone innerhalb des Bereiches größerer Stoffwechselaktivität. Diese Tatsache erklärt die Fähigkeit unreifen Knorpels zur Heilung von partiellen und sogar von durch die gesamte Knorpeldicke reichenden Knorpeldefekten (JADIN et al., 2005).

Unter normalen Bedingungen ist die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten eher gering (AYDELOTTE et al., 1991). Bei mechanischer Stimulation des Knorpels kann die synthetische Aktivität jedoch allgemein gesteigert werden (LOESER, 2003). Die

Stoffwechselaktivität zeigt allerdings lokale Unterschiede in Abhängigkeit von Knorpelzone (AYDELOTTE et al., 1991) und Matrixregion, wobei die perizelluläre Matrix einen besonders aktiven Stoffwechsel aufweist (LOESER, 2003).

Bezüglich der verschiedenen Knorpelzonen ist festzustellen, dass sich die Chondrozyten nicht nur hinsichtlich ihrer Struktur, sondern auch in ihrer biosynthetischen Aktivität unterscheiden (AYDELOTTE et al., 1991; DUDHIA, 2005; KORVER et al., 1992; PARKKINEN et al., 1990). So berichten WEISS et al. bereits 1968, dass in der Oberflächengzone des Knorpels verglichen mit den tieferen Knorpelzonen ein wesentlich geringerer Gehalt an Zellorganellen zu beobachten ist. Dies gilt als deutliches Zeichen geringerer Stoffwechselaktivität. Die in der Oberflächengzone in relativ geringen Mengen anzutreffenden Mitochondrien sind ebenso wie der Golgi-Apparat eher klein. Auch das raue endoplasmatische Retikulum ist weitaus weniger ausgeprägt als in den tieferen Knorpelzonen (WONG et al., 1996).

Aufgrund fehlender Blutkapillaren herrscht im Gelenkknorpel eine geringe Sauerstoffspannung. Sie beträgt an der Knorpeloberfläche etwa 10% (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003) und sinkt mit zunehmender Knorpeltiefe auf bis zu 2-5% in der tiefen Knorpelschicht ab (KELLNER et al., 2002; ZHOU et al., 2004). Aus diesem Grund beziehen die Chondrozyten ihre Stoffwechselenergie zu etwa 90% aus anaerober Glykolyse, mit Milchsäure als Endprodukt (HALL et al., 2003). Außerdem enthalten die Knorpelzellen relativ wenige Mitochondrien (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003). Die Anpassung der Chondrozyten an die geringe Sauerstoffspannung konnte auch in Chondrozytenkulturen bei verschiedenen hohen Sauerstoffspannungen (<0,1-20%) nachgewiesen werden. Bei geringeren Sauerstoffspannungen wurde hier ein Anstieg wichtiger anabolischer Gene wie zum Beispiel TGFβ und dem Bindegewebswachstumsfaktor (connective tissue growth factor) verzeichnet (GRIMSHAW und MASON, 2001).



**Abbildung 43:** Die Stellen 1-8 ergeben sich aus der Unterteilung des bovinen Gelenkknorpels von der Oberfläche (1) bis zur Tidemark (8) in acht gleich dicke Knorpelbereiche. Aus WONG et al. (1997).

**Abb. links:** Zellaktivität gemessen anhand von  $^3\text{H}$ -Prolin-Körnern pro Zelle aus 8 Knorpelproben verschiedener Knorpeltiefen. Dieser Parameter wurde durch Teilung des Wertes der Körnerdichte durch den Wert der Zelldichte derselben Probe ermittelt. Fehlerbalken repräsentieren SE. N = 8.

**Abb. rechts:** Vergleich von  $^{35}\text{S}$ -Sulfat- und  $^3\text{H}$ -Prolin-Inkorporationsraten von 8 Knorpelproben verschiedener Knorpeltiefen.  $^{35}\text{S}$ -Sulfat-Inkorporation ist in der oberen radiären Zone (Stelle 5) und  $^3\text{H}$ -Prolin-Inkorporation in der unteren radiären Zone (Stelle 7) am höchsten.

Auch Untersuchungen der zonalen Unterschiede von Proteoglykansynthese (Bestimmung durch Messen der Sulfatinkorporation) und Proteinsynthese (als Maß gilt die Prolininkorporation) zeigten, dass beide in der Oberflächenzone in geringstem Umfang stattfinden (WONG et al., 1996). Bei der Proteoglykansynthese kommt es zu einem steilen Anstieg in der Übergangszone und einem Peak in der oberen radiären Zone. Die Proteinsynthese steigt mit zunehmender Knorpeltiefe linear bis zu einem Peak in der unteren radiären Zone. Somit sind in beiden Fällen die Knorpelzellen der radiären Zone synthetisch besonders aktiv (WONG et al., 1996). Während sich die mit Sulfat markierten Körner hauptsächlich perizellulär befinden, sind die Körner mit Prolininkorporation gleichmäßig in der Matrix verteilt. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass neu synthetisierte Proteoglykanmoleküle möglicherweise aufgrund ihrer Größe oder Ladung effektiver von ihrer Diffusion in die interterritoriale Matrix abgehalten werden als frisch synthetisierte Proteinmoleküle (WONG et al., 1996). Die uneinheitliche Syntheseleistung der Chondrozyten der oberen und unteren Knorpelzonen beruht nicht nur auf ihren Unterschieden in Zellvolumen und -oberfläche, die nämlich nur um den Faktor zwei variieren. Die Chondrozyten der radiären Zone aber sind beispielsweise doppelt so groß wie die Zellen der oberflächlichen Knorpelschicht (GUILAK, 1994; GUILAK et al., 1995), zeigen in

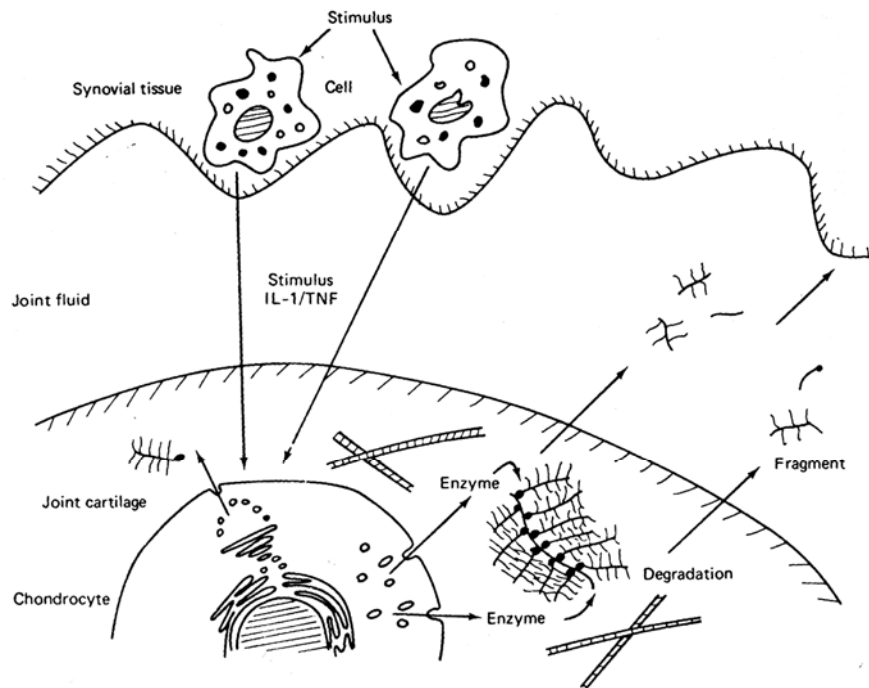
unbelastetem Zustand jedoch eine 10-fach höhere Aktivität. Da also die Größe der Knorpelzellen nicht in direkter Korrelation mit ihrer Zellaktivität steht, scheinen noch weitere Regulationen eine Rolle zu spielen. Möglicherweise reflektiert zum Beispiel der Proteoglykangehalt die vorhergehende mechanische Belastung des Knorpels. Die allgemeine Proteinsynthese hingegen ist wahrscheinlich weniger sensitiv für Veränderungen der funktionellen Beanspruchung (WONG et al., 1996).

Das Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -abbau ist für die Integrität der Matrix und somit auch für die biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels von größter Bedeutung (DEAN et al., 2003; KUETTNER, 1992; LOHMANDER, 1988). Unter physiologischen Bedingungen regulieren die Chondrozyten selbst dieses Gleichgewicht. Der genaue kontrollierende Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Anabole und katabole Zytokine, sowie Wachstumsfaktoren scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen (AIGNER und STÖVE, 2003; LOESER, 2003; LOTZ et al., 1995). Aber auch andere Mechanismen, wie zum Beispiel Häufigkeit und Intensität der Gelenkbelastung beeinflussen das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau. So überwiegt bei Immobilisierung oder verminderter Gelenkbelastung der Abbau der Proteoglykane durch Veränderung der Chondrozytenaktivität (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Sobald die Kompensation versagt und Konzentration oder Qualität der Proteoglykane sinken, nimmt jedoch auch die Resistenz des Gewebes gegenüber Belastung ab. Dies ist beispielsweise bei Arthritis oder Arthrose der Fall (LOHMANDER, 1988).

Für den Abbau der Matrix synthetisieren die Knorpelzellen selbst einen Großteil der Matrix-abbauenden Enzyme, wie zum Beispiel die zu den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) gehörenden Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Stromelysine (hauptsächlich MMP-3), Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und auch Aggrekanasen (AIGNER und STÖVE, 2003; VANWANSEELE et al., 2002). Die katabolen Effekte der MMPs werden durch die sogenannten Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs) gehemmt. Vermutlich wird das Verhältnis von MMPs zu TIMPs durch die Chondrozyten selbst genau reguliert, um die Homöostase des Knorpelgewebes aufrechtzuerhalten (VANWANSEELE et al., 2002).

Die beim Abbau entstehenden Fragmente, wie zum Beispiel Peptidfragmente der Bindungsproteine (LIU et al., 2000), G3-Domänen der Aggrekane (CHEN et al., 2001; HANYECZ et al., 2003) und Oligosaccharide der Hyaluronsäure (KNUDSON et

al., 2000; KNUDSON und KNUDSON, 2004; OHNO et al., 2005), bewirken in den Chondrozyten wiederum einen Syntheseanstieg der entsprechenden Molekültypen und -mengen (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Die Abbauprodukte der Kollagene, Proteoglykane und anderer Proteine werden in die Synovialflüssigkeit des Gelenks entlassen (LOHMANDER, 1988).



**Abbildung 44:** Die aktive Rolle der Chondrozyten im Proteoglykanturnover. Aus LOHMANDER et al. (1988).

Die Knorpelzellen können sowohl Veränderungen der Matrixzusammensetzung im Zuge des physiologischen Umsatzes von Makromolekülen an der Knorpeloberfläche als auch Veränderungen des makromolekularen Gerüsts je nach Beanspruchung des Gelenks erkennen und schnell entsprechend reagieren (DIJKGRAAF et al., 1995). Dazu treten die Chondrozyten über eine Vielzahl von Zellmembranrezeptoren mit ihrer perizellulären Umgebung in Verbindung. Auf diesem Weg können sie auch gezielt Matrixkomponenten in ihrer Nachbarschaft lokalisieren (WONG und CARTER, 2003). Neben den Rezeptor-übermittelten Mechanismen spielen jedoch auch gedehnte aktivierte und inaktivierte Ionenkanäle, veränderter pH-Wert, elektrische Strömungspotentiale, Beteiligung des Zytoskeletts und die Aktivierung von Second-Messenger-Systemen bei der Signalübermittlung eine Rolle (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005).

Bei den Rezeptoren handelt es sich entweder um Integrine oder integrale Membranproteine. Beide sind in Mengen zwischen 500 und 100.000 pro Zelle

anzutreffen (WONG und CARTER, 2003), wobei sich die Integrine im Knorpel zusätzlich auch in der extrazellulären Matrix befinden (SHAKIBAEI und MERKER, 1999). Die Rezeptoren binden sowohl an lösliche Faktoren (Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie zum Beispiel Insulin-like Growth Factor (IGF), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Parathyroid hormone-related protein (PTHrp), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Interleukine), als auch an unlösliche Liganden (extrazelluläre Matrixproteine) (WONG und CARTER, 2003).

Die meisten der Wechselwirkungen zwischen Knorpelzellen und Matrix werden durch Integrine vermittelt. Diese überall an der Zelloberfläche vorkommenden Adhäsionsrezeptoren interagieren mit der spezifischen Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparagin von Proteinen (DIJKGRAAF et al., 1995) und binden auf diese Weise an viele Matrixkomponenten, inklusive Fibronektin und Kollagen (LOESER, 2000). Diese wiederum binden an andere Liganden und vergrößern somit die Verbindung zwischen Zellmembran und perizellulärer Matrix (DIJKGRAAF et al., 1995).

Die Integrine bestehen aus den beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ . Bislang wurden 17  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert (WONG und CARTER, 2003), die sich in einer Vielzahl von Variationen paaren und somit eine große Anzahl unterschiedlicher Integrine hervorbringen. Einige sind spezifisch für bestimmte Matrixmoleküle, andere hingegen binden an mehrere verschiedene Matrixproteine (VAN DER KRAAN et al., 2002). Durch Veränderung von Anzahl und Typen dieser Rezeptoren kann die Zelle ihre Wechselwirkungen mit den verschiedenen Matrixkomponenten regulieren (WONG und CARTER, 2003).

Die intrazellulären Teile der Rezeptoren interagieren mit zytoplasmatischen Strukturen und sorgen so für die direkte physikalische und funktionelle Verbindung zwischen intra- und extrazellulären Vorgängen (DIJKGRAAF et al., 1995; LEISNER et al., 1999). Die Signale der Integrin-Rezeptoren können in zwei Richtungen übermittelt werden: Von innen nach außen, indem die extrazelluläre Domäne für ihre Liganden adhäsiver wird, und von außen nach innen, indem die Bindung von Liganden an Integrine eine zelluläre Aktivierung bewirkt (LEISNER et al., 1999) und intrazellulär zur Bildung fokaler Adhäsionsplaques führt. Diese Bildung ist wiederum Voraussetzung für die Empfänglichkeit der Chondrozyten für Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel IGF-I. Außerdem reguliert die Zelladhäsion via Integrine auch die Aktivierung der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Diese Tatsachen zeigen die

gegenseitige Abhängigkeit zwischen Chondrozytenadhäsion an die Matrix und Regulation des Zellverhaltens durch Wachstumsfaktoren (MARTIN und BUCKWALTER, 1998; VAN DER KRAAN et al., 2002).

Die Knorpelzellen können einige der Integrine exprimieren. Bislang wurden Rezeptoren für Kollagen II und VI ( $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 11\beta 1$ ), Osteopontin ( $\alpha V\beta 3$ ) und hauptsächlich für Fibronektin ( $\alpha 5\beta 1$ ) entdeckt. Letzterer ist der am häufigsten an den Chondrozyten vorkommende Integrin-Rezeptor (DÜRR et al., 1993; ENOMOTO et al., 1993; LOESER et al., 2000; SALTER et al., 1992) und fungiert in humanen artikulären Chondrozyten als Mechanorezeptor: Mechanische Stimulation der Chondrozyten setzt eine Signalkaskade in Gang, die unter anderem dehnungsaktivierte Ionenkanäle und  $\alpha 5\beta 1$  Integrin beinhaltet, und zu Membranhyperpolarisierung, Erhöhung des Aggrekan RNS-Levels und niedrigerem MMP-3-Level führt (CHEN et al., 2005).

Bezüglich der Rezeptoren für die Kollagene wurde herausgefunden, dass die Bindung der Chondrozyten an Kollagen für das Überleben der Zellen sogar essentiell ist (CAMPER et al., 1998; CAO et al., 1999). Wechselwirkungen der Knorpelzellen mit Osteopontin wiederum schützen den Knorpel vor Schädigung durch Interleukin-1 (MOLLENHAUER et al., 1999).

$\beta 1$ -Integrin vermittelt mechanische Kräfte über die Zellmembran und ruft Antworten des Zytoskeletts hervor (BENJAMIN et al., 1994). Bei Druckeinwirkung auf die Zelle ist es an der Freisetzung von IL-4 beteiligt, wohingegen es bei uneingeschränkter zyklischer Kompression einen Anstieg von COMP bewirkt (GIANNONI et al., 2003). Diese Interaktionen müssen aufgrund des Fehlens eines direkten Kontakts zwischen den verschiedenen Knorpelzellen eine zentrale Rolle bei der Regulation im Gelenkknorpel spielen (BENJAMIN et al., 1994).

Bei den integralen Membranproteinen handelt es sich um Rezeptoren, die aus Matrixkomponenten bestehen und in die Zellmembran integriert sind. Zu ihnen gehören zum Beispiel Syndekan und HS-Proteoglykane. Die extrazelluläre Domäne dieser Proteoglykane beinhaltet GAG-Ketten, die andere Liganden einschließlich Matrixkomponenten und Wachstumsfaktoren binden können (DIJKAFF et al., 1995).

Außerdem werden von den Chondrozyten noch andere transmembrane Moleküle exprimiert, die ebenfalls als Rezeptoren für Matrixmoleküle fungieren, wie zum

Beispiel das an Typ-II-Kollagene bindende Annexin (AMIN et al., 2001; MOLLENHAUER et al., 1999; REID et al., 2000). Ein weiterer Membranrezeptor, der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44, beeinflusst durch seine Bindung die Funktion der Chondrozyten und die Homöostase des Knorpels (WONG und CARTER, 2003; KNUDSON et al., 2000). Dieser Rezeptor besitzt eine Domäne, die strukturell der Hyaluronsäure-bindenden Stelle der Aggrecane und Knorpelbindungsproteine ähnelt (KNUDSON et al., 2000).

Es erfolgt jedoch nicht nur eine Beeinflussung der Matrix durch die Chondrozyten, sondern auch umgekehrt. Zum Beispiel kontrolliert die Knorpelmatrix die Passage von Metaboliten und Nährstoffen zu und von den Zellen und reguliert deren Stoffwechselaktivitäten mit (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988; QUINN et al., 2005). Außerdem schützt sie die Zellen vor mechanischer Schädigung während des normalen Gelenkgebrauchs, indem sie ihnen hilft, Form und Phänotyp beizubehalten. Durch Übermittlung der bei mechanischer Belastung der Gelenkoberfläche entstehenden mechanischen, elektrischen und chemischen Signale, beeinflusst die Knorpelmatrix zudem die Zellfunktion (BUCKWALTER und ROSENBERG, 1988; BUCKWALTER und LANE, 1996). Die Matrixmoleküle regulieren das Zellverhalten jedoch nicht nur über Integrin- und Matrixrezeptoren-vermittelte Signale, sondern auch durch die Bindung, Speicherung und Freisetzung löslicher Mediatoren, wie zum Beispiel dem Transforming Growth Factor $\beta$  (TGF $\beta$ ) (BUCKWALTER und LANE, 1996; GELSE et al., 2003).

Weiterhin wird die synthetische Aktivität der Chondrozyten auch über die Bioelektrizität der Zelle beeinflusst. Diese wird durch eine Mischung aus transmembranen Transportsystemen und dehnungsbedingt aktivierten oder inaktivierten Ionenkanälen reguliert. Mechanische Spannungen an der Zellmembran können nämlich dehnungsaktivierte Ionenkanäle öffnen und einen sofortigen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels verursachen. Das als Second Messenger dienende  $\text{Ca}^{2+}$  wiederum kann die Sekretion der intrazellulär gespeicherten Wachstumsfaktoren und Zytokine auslösen, die dann autokrin oder parakrin an ihre Rezeptoren binden (WONG und CARTER, 2003).

### 3.1 Stoffwechsel der Proteoglykane

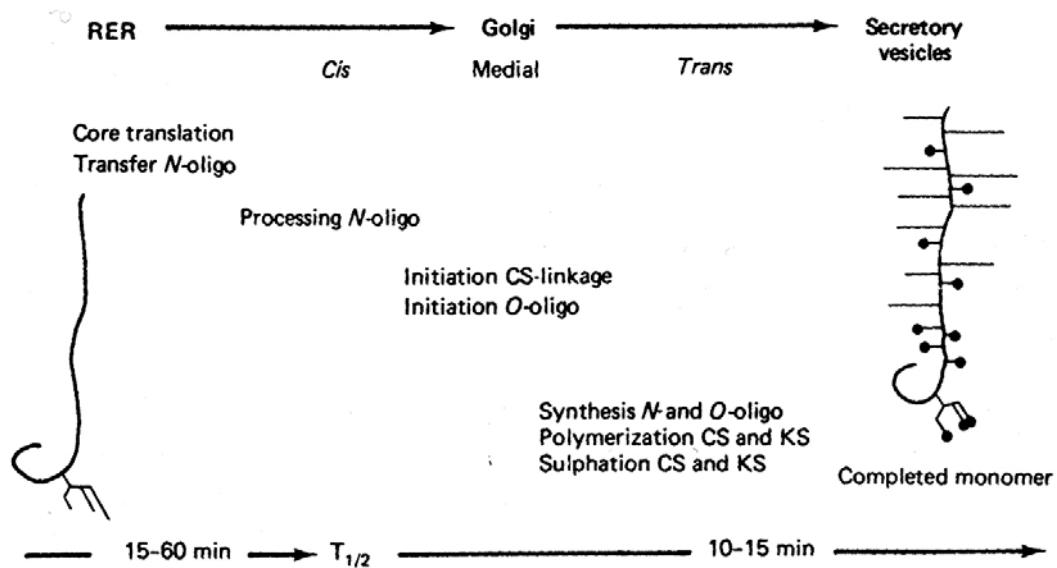
Der Stoffwechsel der Proteoglykane, also Synthese, Aggregation und Abbau, wird durch die Chondrozyten geregelt. Die Knorpelzellen reagieren auf eine Abnahme von Komponenten der Knorpelmatrix mit Synthesesteigerung und ersetzen so die verlorenen Komponenten. Experimente zeigen jedoch, dass die Proteoglykane verschiedener Subpopulationen und Matrixregionen unterschiedlichen Stoffwechselraten unterliegen. Ursache dafür sind vermutlich die bereits erwähnten katabolen Aktivitätsunterschiede der Knorpelzellen verschiedener Matrixgebiete, wie zum Beispiel Gebiete unterschiedlicher Belastung, Knorpeltiefe (AYDELOTTE et al., 1991; LOHMANDER, 1988) oder Matrixregionen (LOESER, 2003). Auch die Halbwertszeit der Aggrekanmonomere und Aggregate hängt sehr stark vom jeweiligen Matrixkompartiment ab und reicht von einigen Tagen bis hin zu Monaten (AIGNER und STÖVE, 2003) und Jahren. DUDHIA (2005) berichtet von einer Halbwertszeit der Aggrekane von 3,5 Jahren und MAROUDAS et al. (1998) ermittelten in Versuchen mit menschlichem Gelenkknorpel sogar eine Halbwertszeit von 25 Jahren, während AIGNER und STÖVE (2003) schreiben, dass nur Subdomänen der Kernproteine über Jahre persistieren. Die proteolytisch abgespaltene freie G1-Domäne und die Bindungsproteine beispielsweise befinden sich in der Matrix noch nach 19 bis 25 Jahren (VERZIJL et al., 2001)

#### 3.1.1 Biosynthese der Proteoglykane

Die Biosynthese der Knorpelproteoglykane unterscheidet sich prinzipiell nicht von der anderer Glykoproteine, die zur Sekretion aus der Zelle bestimmt sind. Da es sich bei den Proteoglykanen jedoch um bemerkenswert komplexe Moleküle handelt, sind wesentlich umfangreichere und komplexere posttranslationale Modifikationen des Kernproteins vor der Sekretion aus der Zelle erforderlich (LOHMANDER, 1988).

Ein durchschnittlich großes Knorpelproteoglykan enthält pro Molekül etwa 10.000 Kohlenhydratbindungen in verschiedenen Konformationen. Da ein Chondrozyt etwa 17.000 Proteoglykanmoleküle pro Minute synthetisieren kann, bildet jede Zelle also  $150\text{-}200 \times 10^6$  Glykosidbindungen pro Minute in korrekter Konformation. Struktur und Größe der unterschiedlichen Kohlenhydratketten weisen eine bestimmte Variabilität auf. Sie werden nämlich nicht direkt durch genetische Informationen in der mRNA bestimmt, wie es bei der Aminosäuresequenz des Kernproteins der Fall ist, sondern

durch enzymatische Spezifität und Aktivität sowie durch die Konzentration ihrer Vorläufermoleküle (LOHMANDER, 1988).

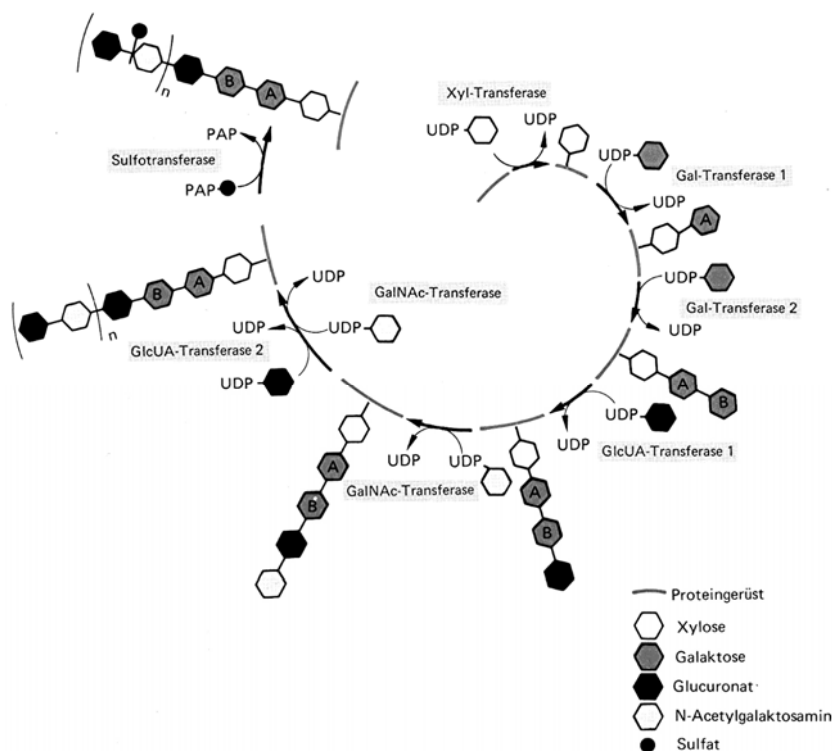


**Abbildung 45:** Posttranslationale Schritte der Proteoglykansynthese im Knorpel. RER – Raues Endoplasmatisches Retikulum. Aus LOHMANDER et al. (1988).

Zur Biosynthese der Proteoglykane werden Aminosäuren als Proteinbausteine und als Aminogruppendonatoren für die Biosynthese der Aminozucker, D-Glukose als Vorstufe der beteiligten Zucker sowie aktiviertes Sulfat benötigt (LÖFFLER, 1990). Die Synthese beginnt mit der Translation des Kernproteins durch die mRNS im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) der Chondrozyten. Die Vorstufe der Kernproteine wird im frühen Stadium der Synthese mit N-gebundenen Oligosacchariden substituiert. Während die Größe der Kernproteinvorstufen großer Proteoglykane relativ einheitlich ist, ist die der fertigen extrazellulären Proteoglykane sehr unterschiedlich. Die Ursache für diese Größenvariation liegt hauptsächlich in der variablen Länge ihrer CS-Ketten, allerdings tragen mit zunehmender Zeit in der Matrix auch proteolytische Vorgänge an den Kernproteinen dazu bei (LOHMANDER, 1988). Die Verbindung der GAG-Ketten mit dem Protein erfolgt O-glykosidisch zwischen einem Trisaccharid aus zwei Galaktosemolekülen und einem Xylosemolekül der GAG-Kette und der Hydroxylgruppe eines Seryl- oder Threonylrests des Proteins (LÖFFLER, 1990).

Die Synthese der CS-Ketten, hier stellvertretend für alle Knorpel-GAGs, beginnt, sobald der Kernproteinvorläufer von der Stelle seiner Translation im rER zu den proximalen Zisternen des Golgi-Apparats verlagert wird. Der erste und kritische

Schritt ist der Transfer der Xylose durch die Xylose-Transferase von der UDP-Xylose an spezifische Serinreste, die in der carboxyterminalen Hälfte des Proteins gruppenförmig als Serin–Glycin-Dipeptide verteilt liegen. Dieser Anfangsschritt scheint eine explosionsartige Steigerung der synthetischen Aktivität zu bewirken. Binnen 10-15 Minuten werden nämlich die GAG-Ketten polymerisiert und sulfatiert, sowie das komplette Proteoglykanmolekül sezerniert. Die schnelle Polymerisierung und Sulfatierung der CS-Ketten erfolgt durch schrittweise wechselnde Addition von UDP-Zuckern an das Kettenende sowie durch die Anlagerung der Sulfatgruppen an die Galaktosamine. Dies findet unter Beteiligung von fünf weiteren Glykosyltransferasen und zwei Sulfotransferasen an den Polyribosomen der distalen Zisternen des Golgi-Apparats statt. Da die Proteoglykane über 100 dicht gelagerte CS-Ketten tragen können und viele, wenn nicht sogar alle diese Ketten, wahrscheinlich jederzeit polymerisierbar sind, wird angenommen, dass die Glykosyltransferasen in membrangebundenen Multienzymkomplexen organisiert sind (LOHMANDER, 1988).



**Abbildung 46:** Biosynthese der Chondroitin-4-(6-)Sulfatkette. Die Anheftung der Saccharidreste erfordert die nachfolgende Wirkung von 6 verschiedenen Glykosyltransferasen. Eine Sulfotransferase katalysiert die Übertragung von aktivem Sulfat auf die C<sub>4</sub>-Position von N-Acetylgalaktosaminresten. Eine weitere Sulfotransferase ist für die Sulfatierung der C<sub>6</sub>-Position bei der Chondroitin-6-Sulfatbildung verantwortlich. Aus LÖFFLER und PETRIDES (1990).

Die Reihenfolge der anzulagernden Reste wird durch die Spezifität der beteiligten Enzyme bestimmt. Wodurch die Kettenlänge bestimmt wird, ist hingegen unbekannt. Womöglich sind aber die weitere subzelluläre Translokation der Proteoglykanvorstufe und Konzentrationsänderungen der UDP-Zucker in den Vorstufen mitbestimmend (LOHMANDER, 1988).

Das fertige Molekül wird durch die Zisternen des endoplasmatischen Retikulums und die Vesikel des Golgi-Apparats transportiert und in den Extrazellulärraum sezerniert (LÖFFLER, 1990). Die Sekretion der Proteoglykane und Bindungsproteine erfolgt durch Exozytose. Dabei fusionieren die sekretorischen Membranvesikel mit der Plasmamembran der Zelle. Die Inhalte werden dann in die extrazelluläre Matrix entlassen. Aggregierende Proteoglykane bilden sofort nach der Sekretion Aggregate durch hochspezifische Wechselwirkungen zwischen Hyaluronsäure, Proteoglykan und Bindungsprotein (siehe Abbildung 47) (LOHMANDER, 1988).

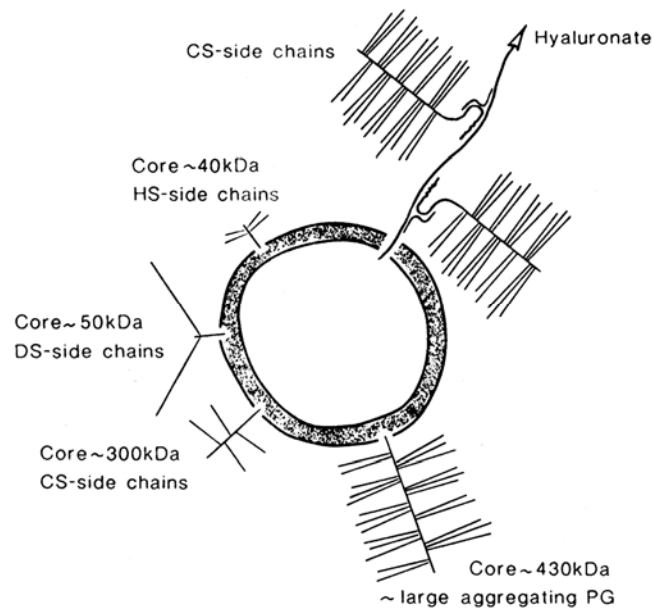
Bei der Biosynthese der Aggrekane werden neben dem Kernprotein je zwei Typen von GAG-Ketten und Oligosacchariden synthetisiert. Zusätzlich erfolgt, ebenfalls in der Knorpelzelle, die Synthese von Bindungsprotein und Hyaluronsäure in passendem Verhältnis, um die Proteoglykankomponenten der Matrix korrekt zusammenzusetzen (LOHMANDER, 1988).

Bei der Synthese der N-gebundenen Oligosaccharide wird ein großes Primer-Oligosaccharid an einem sehr langen Lipidcarriermolekül synthetisiert und dann zur Kernproteinvorstufe transferiert. Dies erfolgt in Verbindung mit der Peptidsynthese im endoplasmatischen Retikulum. Nach dem Transfer wird der Primer durch Glykosidasen gekürzt und im Golgi-Apparat zu N-gebundenen Oligosacchariden des komplexen Typs umgewandelt. Dies erfolgt durch die Hinzufügung von N-Acetylglukosamin, Galaktose, Fucose und Sialinsäure (LOHMANDER, 1988).

Die Biosynthese der O-gebundenen Oligosaccharide hingegen ist weniger erforscht, findet aber wahrscheinlich ausschließlich im Golgi-Apparat statt. Die Basisstruktur ist der Proteinbindungsregion der Keratansulfate sowohl in Größe, als auch Struktur sehr ähnlich. Möglicherweise dient also die Struktur der O-gebundenen Oligosaccharide als Primer für die KS-Synthese oder es findet zumindest die Synthese beider im selben subzellulären Bereich statt (LOHMANDER, 1988).

Das Bindungsprotein wird von den Chondrozyten auf dieselbe Weise synthetisiert wie andere sekretorische Glykoproteine. Möglicherweise teilt es daher subzelluläre Bereiche mit Proteoglykanmonomeren, die für die Sekretion bestimmt sind, und

reagiert mit diesen, bevor es in den extrazellulären Raum austritt (LOHMANDER, 1988).

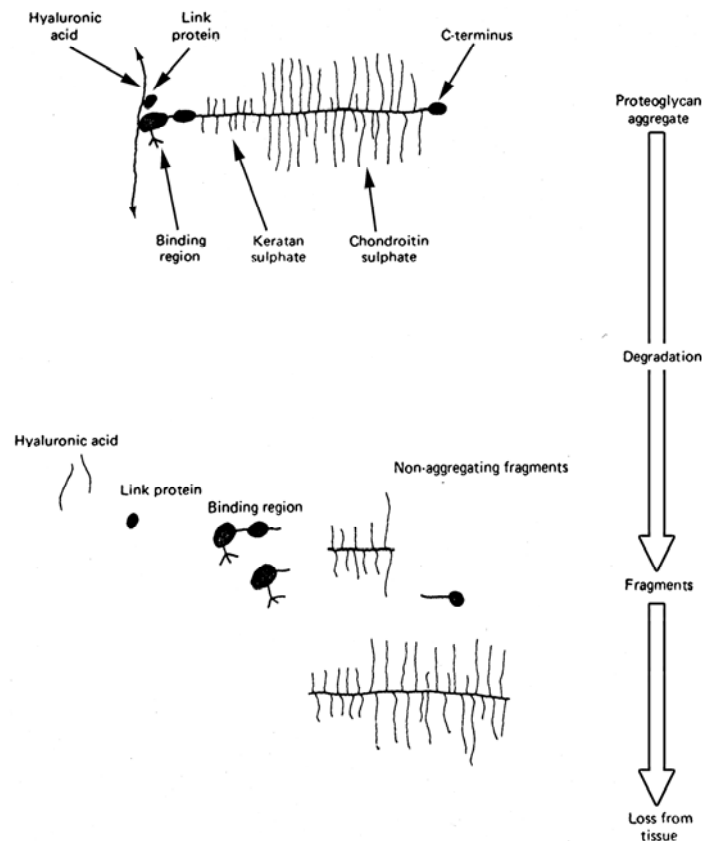


**Abbildung 47:** Proteoglykane an der Chondrozytenoberfläche. Aus HEINEGARD et al. (1986).

Die Synthese der Hyaluronsäure findet im Gegensatz zu den anderen GAGs nicht im Golgi-Apparat, sondern in der Plasmamembran der Chondrozyten statt. Sie erfolgt hier durch Aneinanderreihung von Glukuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin (KNUDSON, 1993; LOHMANDER, 1988). Die Vorstufen werden an der inneren Oberfläche der Zellmembran aneinandergesetzt und die wachsende Polysaccharidkette direkt in den extrazellulären Raum ausgeschleust. Unklar ist jedoch noch die Beendigung der Synthese und die Art und Weise, wie die vervollständigte Kette aus der Zelle entlassen wird, um an ihren in der extrazellulären Matrix entfernt liegenden Funktionsort zu gelangen (ROUGHLEY und LEE, 1994).

### 3.1.2 Abbau der Proteoglykane

Die eigentlich in der Matrix immobilisierten Proteoglykane müssen im Zuge ihres Abbaus mobilisiert werden. Untersuchungen zeigen, dass stetig große, nicht-aggregierte Proteoglykanfragmente, also GAGs, Bindungsregionen und Bindungsproteine aus der Matrix entlassen werden (HARDINGHAM et al., 1986).



**Abbildung 48:** Vermutlicher Ablauf des Proteoglykanabbaus in der Knorpelmatrix. Aus LOHMANDER et al. (1988).

Der Abbau der Aggrekane beginnt durch proteolytische Spaltung des Kernproteins unter Beteiligung von Proteasen (DUDHIA, 2005; LOHMANDER, 1988). Dabei ist der Abbau zumindest teilweise auf die Aktivität der von den Chondrozyten sezernierten Metalloproteinasen zurückzuführen (GUILAK et al., 1994). Bei jungen Individuen scheint die Proteinase Stromelysin für den Großteil der stattfindenden Proteolyse verantwortlich zu sein. Wie die Analyse der Spaltungsstellen in den Aggrekanen ergab (FOSANG et al., 1992), sind jedoch mit zunehmendem Alter noch andere proteolytische Agentien beteiligt (HUGHES et al., 1992; NGUYEN et al., 1991). Diese Beobachtung ist insofern überraschend, als die Expression der Prostromelysin-mRNS in adultem humanem Gelenkknorpel höher ist als in dem Neugeborenen (NGUYEN et al., 1991).

Die Stimulierung der Chondrozyten zur Synthese von Proteasen erfolgt durch Zytokine, die durch vermehrten Abbau der umliegenden Matrix eine Verringerung des Proteoglykangehalts hervorrufen (DIJKGRAAF et al., 1995; LOHMANDER, 1988). Die Zytokine Interleukin-1 und TNF beispielsweise bewirken durch proteolytische Spaltung des Kernproteins an bestimmten Spaltungsstellen einen

gezielten Abbau der Aggrekane (DUDHIA 2005). Gleichzeitig haben Zytokine auch eine deutlich hemmende Wirkung auf die Bildung neuer Proteoglykane und anderer Matrixkomponenten (DIJKGRAAF et al., 1995; LOHMANDER, 1988). Der Peptidfaktor Katabolin, der dem Interleukin-1 gleicht, zeigt dieselben Effekte wie die Zytokine. Er wird durch Synovialzellen sezerniert und kann die Chondrozyten ebenfalls zum Proteoglykanabbau stimulieren sowie die Synthese neuer Proteoglykane deutlich hemmen (LOHMANDER, 1988).

MARTEL-PELLETIER et al. (1984) berichten außerdem von den lysosomalen Proteasen Kathepsin B und D, die Proteoglykane nur in Zellnähe und bei saurem pH abbauen können, sowie von neutralen Proteasen wie zum Beispiel Metalloproteinasen und Serinproteasen, die höchstwahrscheinlich für den Abbau extrazellulärer Proteoglykane in den von der Knorpelzelle entfernter liegenden Matrixregionen verantwortlich sind.

Zu Beginn des vermutlichen Abbaumechanismus der Aggrekane steht ein proteolytischer Angriff am Kernprotein innerhalb der IGD-Region (DUDHIA, 2005) nahe der aminoterminalen G1-Domäne (HARDINGHAM et al., 1986; GUILAK et al., 1994) und/oder, laut LOHMANDER (1988), an der carboxyterminalen G3-Region. In der IGD-Region existieren zwei Hauptspaltungsstellen. Während an der einen eine Reihe von Metalloproteinasen angreifen, wie zum Beispiel MMP und ADAMTS-4/5, setzen an der anderen die Aggrekanasen an (DUDHIA, 2005).

Diese Spaltung stellt den entscheidenden Schritt für den gesamten Aggrekanabbau dar. Zum einen reguliert sie die proteolytische Aktivität und damit den Abbau der Aggrekane im Rahmen des normalen Stoffwechsels (DUDHIA, 2005). Zum anderen wird hierbei die für die Immobilisierung der Aggrekane innerhalb der Matrix verantwortliche Hyaluronsäure-bindende G1-Domäne von der GAG-tragenden Region abgetrennt (HARDINGHAM et al., 1986). Letztere kann daraufhin keine Aggregate mehr bilden und somit im Knorpel diffundieren. Die Fragmente werden aus dem Gewebe eliminiert, indem sie entweder an die Gelenkflüssigkeit verloren gehen (DUDHIA, 2005; LOHMANDER, 1988) oder in die Chondrozyten aufgenommen werden, wo sie in den Lysosomen durch Proteasen (Kathepsine) und Glykosidasen weiter abgebaut werden (LOHMANDER, 1988).

Das G1-Fragment des Kernproteins bleibt mit der Hyaluronsäure verbunden und akkumuliert in der Matrix bis es ebenso wie das Bindungsprotein durch weitere

proteolytische Schritte abgebaut wird. Die Hyaluronsäure wird durch Hyaluronidasen zerkleinert (DUDHIA, 2005). Da die Stoffwechselrate von Aggrekanen und Hyaluronsäure gleich ist, wird vermutet, dass es sich beim Abbau der Hyaluronsäure um einen Bestandteil des Proteoglykan-Stoffwechselmechanismus handelt (LOHMANDER, 1988).

### **3.1.3 Altersbedingte Veränderungen der Proteoglykane**

Die Proteoglykanzusammensetzung des Gelenkknorpels variiert nicht nur zwischen den verschiedenen Knorpelzonen und -regionen, sondern verändert sich auch im Laufe des Lebens (DUDHIA, 2005). Es sind zwar auch bei den nicht-aggregierenden Proteoglykanen altersbedingte proteolytische Veränderungen ihrer Kernproteine festzustellen (WITSCH-PREHM et al., 1992), die Aggrekane weisen jedoch im Rahmen des Reifungs- und Alterungsprozesses eine deutlich stärkere Heterogenität sowohl in ihrer molekularen Größe, Struktur und chemischen Modifikation als auch in der Zusammensetzung, Stöchiometrie und Stabilität ihrer multimolekularen Aggregate auf (DUDHIA, 2005). So sind die Aggregate in unreifem Gelenkknorpel deutlich größer und bestehen verglichen mit den Aggregaten des reifen Knorpels aus mindestens doppelt so vielen Aggrekanmolekülen (VERBRUGGEN et al., 2000). Die Ursache dafür liegt zum einen in Veränderungen der Aggrekanmoleküle, zum anderen aber auch in altersbedingten Veränderungen der Bindungsproteine und der Hyaluronsäure. Bei Letzterer ist ebenfalls eine altersbedingte Größenabnahme festzustellen (WELLS et al., 2003).

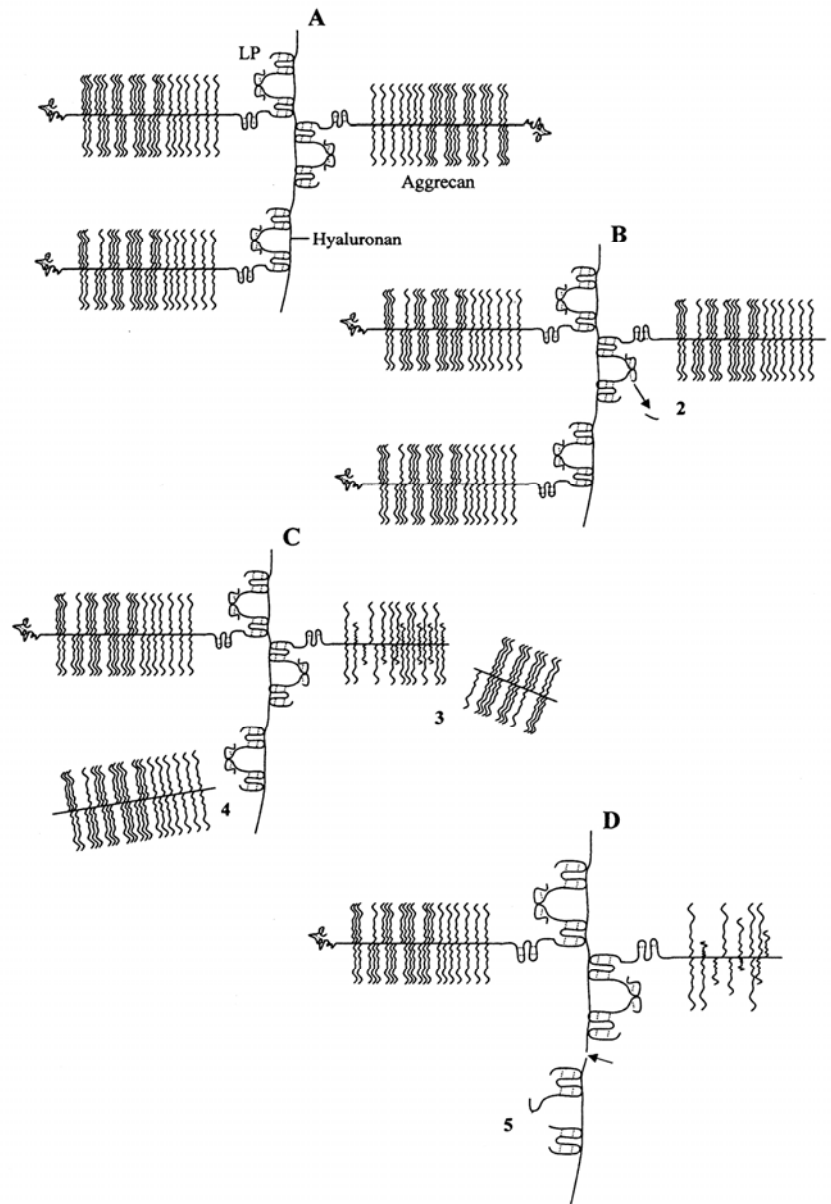
Die altersbedingten Veränderungen finden auf der Ebene der Genexpression, in der Struktur der substituierten GAG-Ketten und durch proteolytische Prozesse der Kernproteine innerhalb der extrazellulären Matrix statt (ROUGHLEY und LEE, 1994). Sie beruhen zum einen auf nicht-enzymatischen Modifikationen (DeGROOT, 2004) und zum anderen auf molekularen biosynthetischen und katabolen Prozessen, die wiederum durch viele zelluläre und extrazelluläre Mechanismen reguliert werden. Allerdings sind diese Veränderungen nicht einheitlich, sondern werden von verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel Spezies, Gelenk, Knorpelzone, Matrixregion und topographischer Region der Gelenkoberfläche, beeinflusst (DUDHIA, 2005).

Aus der veränderten Genexpression resultiert ein Absinken der Aggrekan- und Biglykansynthese (ROUGHLEY und LEE, 1994). Die Biosynthese des Dekorins

hingegen steigt im Alter an. Der Grund hierfür liegt eventuell im höheren Bedarf an stabilisierendem Dekorin, sobald das interstitielle Wachstum der Knorpelmatrix stoppt (ROUGHLEY und LEE, 1994).

Bereits die Grundrate der Aggrekansynthese ist im Gelenkknorpel nach Beendigung der Skelettreife deutlich reduziert. So ist sie bei maximal drei Jahre alten Pferden etwa fünfmal höher als bei älteren (DEAN et al., 2003). Bei den Bindungsproteinen kommt es sogar zu einem noch deutlicheren Absinken ihrer Synthese, sowie zur altersbedingten Fragmentierung. Während das molare Verhältnis von Aggrecan zum Bindungsprotein bei Neugeborenen und bis 5 Jahre alten Individuen etwa 1:1 ist, beträgt es in reifem Gelenkknorpel 4:1. Auf diese Weise kommt es in reifem Knorpel zu einem relativen Mangel an Bindungsproteinen innerhalb der Aggregate und somit zu einer geringeren Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen Hyaluronsäure und Aggregaten (WELLS et al., 2003). Auch die Steigerung der Proteoglykansynthese in Anwesenheit von BPs ist bei jüngeren Pferden ebenfalls stärker ausgeprägt: Sie beträgt bei 12-jährigen beispielsweise nur 60% von der bei 7-jährigen Pferden (DEAN et al., 2003). Weiterhin durchlaufen die Bindungsproteine auch eine altersbedingte Reifung, bei der ihre Affinität für Hyaluronsäure sinkt (WELLS et al., 2003).

Die mit zunehmendem Alter abnehmende Molekülgröße der Aggrekane beruht auf proteolytischen Spaltungen ihres Kernproteins. Bereits relativ bald nach der Knorpelreifung wird bei einem Großteil der Aggrecanmoleküle die G3-Region abgespalten (FOSANG et al., 1992; ILIC et al., 1992; SANDY et al., 1991; WELLS et al., 2003). Diese Region kann an andere Matrixkomponenten binden. Da sie jedoch nur kurze Zeit an den Aggrecanmolekülen vorhanden ist, scheint sie besonders während der Knorpelentwicklung für die extrazelluläre Matrixgestaltung essentielle Verbindungen einzugehen. Weiterhin wird die G3-Domäne zusammen mit der CS-reichen Region für die effektive Sekretion der Aggrekane aus den Chondrozyten benötigt. Die G2-Domäne hingegen hemmt die Sekretion und sorgt somit dafür, dass nur vollständig glykosylierte Aggrecanmoleküle die Zelle verlassen (WELLS et al., 2003).



**Abbildung 49:** Schematische Darstellung der Prozesse, die zur altersbedingt zunehmenden Variabilität der Aggrekanpopulation im Gelenkknorpel führen.

**A.** Aggrekanaggregat. Mehr als jeweils 100 Aggrekan- und Bindungsproteinmoleküle können an ein einzelnes Hyaluronsäuremolekül binden.

**B.** Ein früh stattfindender Prozess ist die proteolytische Abspaltung der G3-Domäne (1) und des Aminoendes des Bindungsproteins (2).

**C.** Kürzung der CS-Region durch proteolytische Spaltung, sowie potentielle Kürzung einiger CS-Ketten (3). Da die IGD-Region für proteolytische Spaltungen besonders empfänglich ist, erfolgt hier eine Abspaltung der CS-Region. Diese kann von der extrazellulären Matrix in die Synovialflüssigkeit diffundieren (4).

**D.** Weitere proteolytische Prozesse können G1 und Bindungsprotein abspalten (5). Die Molekülgröße der Hyaluronsäure wird durch katalytische Hyaluronidasen (Pfeil) verkürzt.

Bei den Aggrekanen kommt es außerdem mit zunehmendem Alter zu proteolytischen Spaltungen innerhalb ihrer GAG-Bindungsregion (DUDHIA, 2005; FOSANG et al., 1992; ILIC et al., 1992; SANDY et al., 1991; SUGAHARA und KITAGAWA, 2000;

SUGAHARA et al., 2003; KUSCHE-GULLBERG, 2003). Gleichzeitig und davon unabhängig finden Modifikationen der Glykosylierungs- und Sulfatierungsmuster ihrer GAG-Ketten unter Beteiligung verschiedener Glykosyl- und Sulfotransferasen statt. In humanem Gelenkknorpel ist ein Anstieg von KS-Gehalt und –Kettenlänge bei gleichzeitigem Absinken von CS-Gehalt und –Kettenlänge mit zunehmendem Alter festzustellen. Außerdem steigt der bereits im frühen Leben überwiegende Gehalt an 6-Sulfat-Disacchariden im Laufe der Knorpelreifung stetig an, bis das Verhältnis von Chondroitin-6-Sulfat zu Chondroitin-4-Sulfat im reifen Knorpel den Wert 9:1 erreicht. Die Sulfatierung der Position 6 findet hauptsächlich an den Disacchariden im Ketteninneren statt. Trotzdem sind auch etliche der terminalen GalNAc-Reste disulfatiert (4- und 6-Sulfatierung). Der raschen Disulfatierung dieser terminalen Reste wird eine Kontrolle der Kettenlänge durch Beendigung der biosynthetischen Aktivität zugeschrieben (DUDHIA, 2005). Weiterhin ist innerhalb der IGD-Region der Aggrekane eine Veränderung des Glykosylierungsmusters festzustellen, wodurch die Empfindlichkeit dieser Region gegenüber proteolytischer Spaltung verändert wird (PRATTA et al., 2000).

Die durch proteolytische Abspaltung in der GAG-Bindungsregion entstehenden großen CS-tragenden Fragmente können nicht mit Hyaluronsäure interagieren und daher aus dem Knorpelgewebe heraustreten (WELLS et al., 2003). Trotzdem kommt es mit zunehmendem Alter in der extrazellulären Matrix zu einer Anhäufung partiell abgebauter Aggrekanprodukte (DUDHIA, 2005; WELLS et al., 2003). Die Anreicherung dieser abgebauten Komponenten wiederum stört möglicherweise die Zusammensetzung der Aggregate und damit ihre Stabilität im Alter (WELLS et al., 2003).

Weiterhin führen proteolytische Spaltungen innerhalb der IGD-Region (DUDHIA, 2005; FOSANG et al., 1992; ILIC et al., 1992; SANDY et al., 1991) zu einem Anstieg von freien G1-Domänen mit zunehmendem Alter. Diese behalten ihre Fähigkeit an Hyaluronsäure zu binden bei und akkumulieren daher während der normalen Alterung im Knorpelgewebe. Da jedoch nicht alle mit Hyaluronsäure verbunden sind, kann ein Teil auch den Knorpel verlassen (WELLS et al., 2003).

### **3.2 Stoffwechsel der Kollagene**

Die Kollagene stellen das funktionelle Rückgrat des Knorpels dar. Abgesehen von ihren biomechanischen Aspekten sind sie noch an weiteren Funktionen mitbeteiligt.

So können sie beispielsweise an Wachstumsfaktoren und Zytokine binden und deren lokale Speicherung und Freisetzung beeinflussen. Über spezifische Rezeptoren, wie zum Beispiel Integrine oder spezialisierte Proteoglykan-Rezeptoren, gehen sie außerdem mit ihrer Umgebung Wechselwirkungen ein. Kollagen VI ist zudem an der Bildung einer bestimmten perizellulären Mikroumgebung beteiligt, die für die zelluläre Integrität von äußerster Bedeutung ist (GELSE et al., 2003).

Eine besondere Eigenschaft der Kollagene ist ihre normalerweise extreme Langlebigkeit (MAROUDAS et al., 1992). Zwar verändert sich Kollagen im Laufe der Zeit durch nicht-enzymatische Modifikationen (DeGROOT, 2004) und verliert im Alter an Spannkraft (KEMPSON, 1991), seine Halbwertszeit im Gelenkknorpel beträgt jedoch Jahrzehnte und mehr (AIGNER und STÖVE, 2003). Für Kollagen II wird sogar eine Halbwertszeit von mehr als 100 Jahren angegeben (VERZIJL et al., 2000). Der Grund dafür sind die sehr stabilen Tripelhelices, die durch eine hohe Zahl an Querverbindungen noch weiter stabilisiert werden und deren Anzahl mit zunehmendem Alter stetig steigt (BANK et al., 1997). Eine Destabilisierung der Fasern kann nur durch Spaltung der Tripelhelix mit Kollagenasen erfolgen. Die hauptsächlich für die Spaltung von Kollagen II verantwortlichen Matrix-Metalloproteinasen (MMP-1 und besonders MMP-13) (CAWSTON et al., 1999) werden in normalem Gelenkknorpel anscheinend nicht signifikant gebildet (AIGNER et al., 2001; BAU et al., 2002).

### **3.2.1 Biosynthese der Kollagene**

Die Kollagenbiosynthese endet nicht mit der Knorpelreifung, sondern findet auch danach noch im Rahmen des physiologischen Knorpelstoffwechsels statt (REPO und MITCHELL, 1971), allerdings sehr langsam. Die Kollagenstoffwechselrate ist bei Neugeborenen noch relativ hoch (BANK et al., 1997; BRAMA et al., 2000b), da in dieser frühen Wachstumsphase die funktionelle Anpassung der Knorpelkollagene an die lokal innerhalb eines Gelenks variierenden biomechanischen Anforderungen stattfindet. Hierbei entstehen die typischen lokalen Unterschiede der Kollagene innerhalb des Knorpels eines Gelenks.

Nach Beendigung des Skelettwachstums nimmt der Kollagenstoffwechsel rapide ab (EYRE, 2002). Das kollagene Netzwerk ist dann durch äußere Faktoren kaum mehr veränderbar (BANK et al., 1997; BRAMA et al., 2000b). Dieser extrem langsame Stoffwechsel ist auch der Grund für die äußerst geringe Kapazität der Kollagene zu

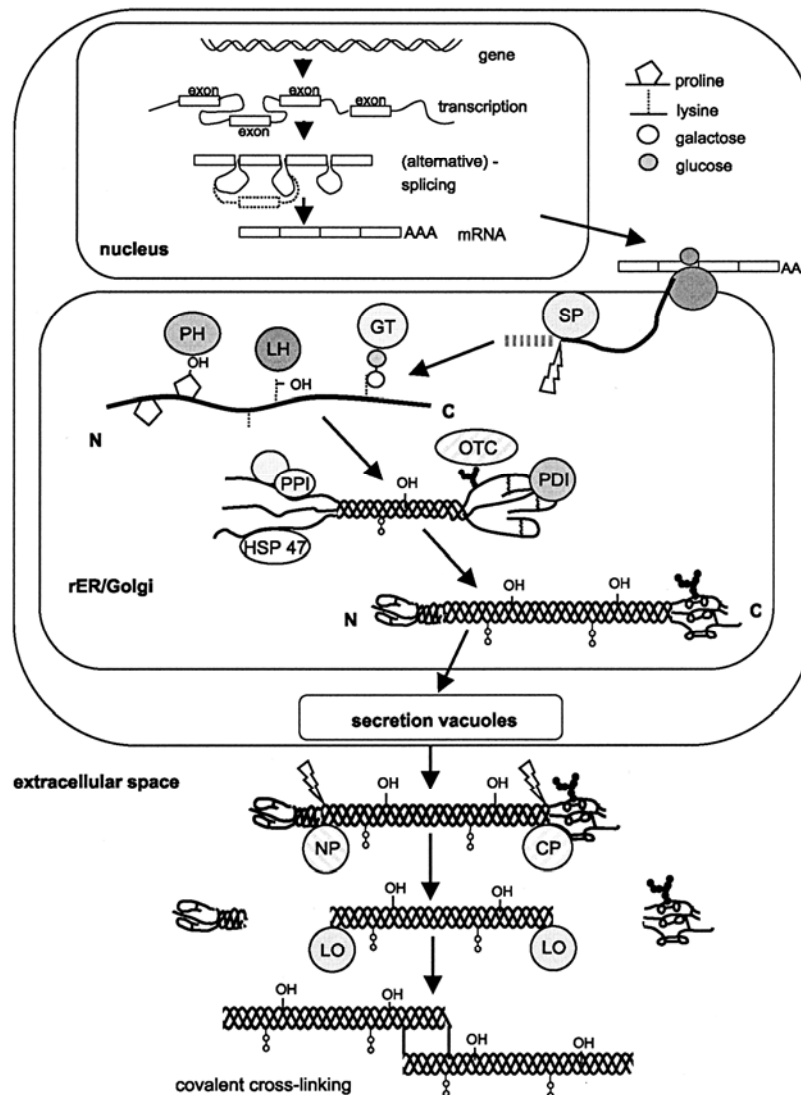
Reparatur und Wiederherstellung nach Schädigungen (BRAMA et al., 2000c). Dennoch kann die Kollagensynthese zum Beispiel nach einer Gelenkverletzung innerhalb von zwei Wochen um das zehnfache beschleunigt werden (EYRE, 2002). Trotz dieses langsamen Stoffwechsels nimmt der Durchmesser der Kollagenfibrillen mit steigendem Alter zu. Möglicherweise ist dafür ein Teil der kollagenen Matrix, zum Beispiel Fibrillenoberflächenmoleküle und perizelluläre Domänen, mit einem schnelleren turnover verantwortlich, die von den Chondrozyten schneller als Antwort auf mechanische und molekulare Signale gebildet werden können (EYRE, 2002).

Die Kollagenbiosynthese besteht aus mehreren Schritten und kann in eine intra- und eine extrazelluläre Phase unterteilt werden. Sie ist ein sehr komplexer und aus vielen Einzelschritten bestehender Prozess, beginnend mit der Gentranskription innerhalb des Nukleus und endend mit der Aggregation der Kollagenheterotrimere zu langen Fibrillen (GELSE et al., 2003).

In den ersten etwa 6 Minuten erfolgt an den Polyribosomen die Translation mit Bildung einer Polypeptidvorstufe, genannt Prä-Prokollagen. Das nach der Abspaltung eines Signalpeptids durch eine Peptidase entstehende Prokollagen wird dann zahlreichen Schritten posttranslationaler Modifikationen unterzogen (GELSE et al., 2003; LÖFFLER, 1990 und 1998). Die Synthese der Pro- $\alpha_1$ - und - $\alpha_2$ -Kette erfolgt gleichzeitig. Bereits während ihrer Biosynthese bilden die Ketten jeweils eine linksgewundene Schraube aus.

Das Prokollagenmolekül enthält im Unterschied zum fertigen Kollagenmolekül an den Enden zusätzlich sogenannte Registerpeptide. Diese bestehen aus etwa 150 Aminosäuren, besitzen Cysteinyreste und werden im weiteren Verlauf der Kollagenbiosynthese abgespalten. Sie sind an der Verdrillung der Ketten zur rechtsgewundenen Tripelhelix entscheidend beteiligt, da durch sie Disulfidbrücken mit Cysteinyresten anderer Registerpeptide und hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden können. Der Rest der Tripelhelix wird hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten (LÖFFLER, 1990 und 1998). An der assoziierten Tripelhelix erfolgt nun die Hydroxylierung von 50% der Prolyl- und 10-80% der Lysylreste (LÖFFLER, 1990). Das Ausmaß der Lysin-Hydroxylierung variiert unter den verschiedenen Kollagentypen. Die Hydroxylierung erfolgt mit Hilfe der Prolyl-3- und Prolyl-4-Hydroxylase bzw. der Lysylhydroxylase (GELSE et al.,

2003) und findet nur in Anwesenheit von Ascorbinsäure, molekularem Sauerstoff, Eisen und  $\alpha$ -Ketoglutarat statt (GELSE et al., 2003; LÖFFLER, 1990).



**Abbildung 50:** Schema der Kollagensynthese, startend bei der nuklearen Transkription der Kollagengene, gefolgt von der ribosomalen Proteinsynthese (Translation) und post-translationalen Modifikationen sowie Sekretion und der finalen Fibrillenbildung. SP – Signal Peptidase; GT – Hydroxylysyl Galaktosyltransferase und Galaktosylhydroxylysyl Glukosyltransferase; LH – Lysyl Hydroxylase; PH – Prolyl Hydroxylase; OTC – Oligosaccharyl Transferase Complex; PDI – Protein Disulfid Isomerase; PPI – Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomerase; NP – Prokollagen N-Proteinase; CP – Prokollagen C-Proteinase; LO – Lysyl Oxidase; HSP47 – Heat Shock Protein 47, Colligin1. Aus GELSE et al. (2003).

Bei den fibrillenbildenden Kollagenen enthalten fast 50% der Prolinreste eine Hydroxylgruppe an der Position 4. Dieses 4-Hydroxyprolin ist für die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen und damit auch für die thermale Stabilisierung der Tripelhelix von großer Bedeutung. So beträgt die Schmelztemperatur nicht-

hydroxylierter Proteinketten 25°C, während sie nach der Hydroxylierung auf 37°C, also Körpertemperatur, ansteigt (GELSE et al., 2003; LÖFFLER, 1990).

Die Hydroxylsylreste bilden stabile intermolekulare Querverbindungen zwischen den Kollagenmolekülen innerhalb der Fibrillen. Außerdem dienen sie auch als Anlagerungsstellen für Kohlenhydrate. Als nächster Schritt der Kollagensynthese folgt nämlich eine O-glykosidische Anheftung zuerst von Galaktosyl- und dann von Glukosylresten an die Hydroxylgruppen einzelner Hydroxylsylreste. Die Glykosylierung wird durch zwei Hydroxylsins-spezifische Enzyme (Hydroxylsins-Galaktosyltransferase und Galaktosylhydroxylsins-Glukosyltransferase) (GELSE et al., 2003) katalysiert, die dazu Mangan benötigen. Die  $\beta$ -glykosidische Bindung der Galaktose an Hydroxylsin ist dann aufgrund ihrer Nähe zur  $\epsilon$ -Aminogruppe des Hydroxylsins durch die meisten Glukosidasen nicht mehr angreifbar (LÖFFLER, 1990 und 1998).

Nach der Gruppierung der C-terminalen Domänen von drei  $\alpha$ -Ketten erfolgt die Bildung der Tripelhelix in Richtung des N-Endes hin. Die C-Propeptide haben bei dieser Zusammenlagerung der drei  $\alpha$ -Ketten zu trimeren Kollagenmonomeren eine tragende Funktion. Zur Bildung und Faltung der Prokollagenketten sind weitere Enzyme, wie zum Beispiel die PPI (Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomerase), notwendig. Außerdem ist das Enzym PDI (Protein Disulfid Isomerase), das der  $\beta$ -Untereinheit der Propyl-4-Hydroxylase identisch ist, an der Bildung von Disulfidbrücken innerhalb und zwischen den Ketten der Prokollagenmoleküle involviert (GELSE et al., 2003).

Bis zu diesem Schritt erfolgt die Biosynthese intrazellulär. Das fertige Prokollagenmolekül wird dann innerhalb des Golgi-Apparates in sekretorische Vesikel verpackt und in den Extrazellulärraum entlassen (GELSE et al., 2003). Dazu müssen die Knorpelzellen erkennen können, welche Moleküle ausgeschieden werden sollen. Wie Versuche zeigen, ist hierfür wahrscheinlich besonders die Hydroxylierung der Prolylreste verantwortlich (LÖFFLER, 1990 und 1998). Im Extrazellulärraum erfolgt dann die Abspaltung der Registerpeptide durch zwei jeweils für das N- und C-terminale Ende spezifische Prokollagenpeptidasen (Prokollagen-N- bzw. -C-Proteinase) (GELSE et al., 2003).

### 3.2.2 Entstehung der Kollagenfibrillen

Der genaue Prozess der Fibrillenbildung ist noch nicht vollständig erforscht. Auf alle Fälle spielen jedoch eine Reihe intra- und extrazellulärer posttranslatiionaler Modifikationen unter Beteiligung mehrerer spezifischer und nicht-spezifischer Enzyme eine entscheidende Rolle (MUIR, 1995). Außerdem wird die Formation der Kollagenfibrillen durch die Propeptide der Prokollagene beeinflusst (GELSE et al., 2003). Durch die Bildung der Kollagenfibrillen wird eine erhöhte Stabilität der Tripelhelices erreicht (PETRIDES, 1990 und 1998), die noch zusätzlich durch kovalente Querverbindungen verstärkt wird. Auf diese Weise erhalten die Kollagenfibrillen ihre charakteristische mechanische Elastizität.

Jeweils fünf der von den Chondrozyten in den extrazellulären Raum sezernierten Kollagenmoleküle lagern sich entweder versetzt parallel zu Mikrofibrillen zusammen oder an die Oberfläche bereits bestehender Mikrofibrillen an (CURTIN und REVILLE, 1995; PETRIDES, 1998). Die fibrillenbildenden Kollagentypen II und XI aggregieren aufgrund ihrer Struktur spontan. Diese Kollagenmoleküle besitzen durch die Verteilung ihrer hydrophoben und hydrophilen Sequenzregionen ein charakteristisches Ladungsmuster mit abwechselnd positiven und negativen Ladungsschwerpunkten, wodurch die Zusammenlagerung der Moleküle zu pentameren Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 4 nm reguliert wird. Sie lagern sich dabei so aneinander, dass sich die negativen und positiven Ladungsschwerpunkte gegenseitig neutralisieren. Dadurch kommt auch die Viertelversetzung der parallel liegenden Kollagenmoleküle zustande. Auf diese Weise können aus den kleinen Kollagenmolekülen praktisch unendlich lange Mikrofibrillen gebildet werden (GELSE et al., 2003; LÖFFLER, 1990 und 1998).

Die durch Parallelaggregation entstehende Mikrofibrille wird durch die Ausbildung kovalenter Querverbindungen stabilisiert. Dabei werden in den Telopeptiden bestimmte Lysyl- und Hydroxyllysylreste durch eine kupferabhängige Lysyloxidase desaminiert (PETRIDES, 1990). Für die Querverbindungen ist der Hydroxylierungsgrad der Lysylreste innerhalb der C- und N-terminalen Telopeptide entscheidend. Dieser variiert zwar zwischen den unterschiedlichen Körpergeweben, im Knorpel sind jedoch alle Lysinreste komplett hydroxyliert (GELSE et al., 2003).

Die aus den Hydroxylysinresten der Telopeptide entstehenden Aldehyde bilden Querverbindungen mit anderen Aldehyden oder mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen von (Hydroxy-) Lysylresten anderer  $\alpha$ -Ketten (PETRIDES, 1990). Die meisten

Querverbindungen sind an der überlappenden Position lokalisiert, die die N- oder C-Telo peptide mit spezifischen Resten innerhalb des helikalen Teils benachbarter Moleküle verbindet (GELSE et al., 2003). Aufgrund der Länge der Telo peptide sind Quervernetzungen nicht nur mit benachbarten, sondern auch mit entfernten, zueinander versetzten Tripelhelices möglich (PETRIDES, 1990). Das lineare Wachstum der Fibrillen erfolgt durch die Addition von Tropokollagen-Molekülen. Appositionales Wachstum hingegen führt zur Bildung von Kollagenfibrillen großen Kalibers durch die Aggregation benachbarter Mikrofibrillen (CURTIN und REVILLE, 1995).

### 3.2.3 Kollagenolyse

Der klassische Kollagenabbau erfolgt durch Kollagenasen, die für die einzelnen Kollagentypen spezifisch sind. Die Chondrozyten können diese Kollagenasen selbst synthetisieren, inklusive der Kollagenase-3 (MMP-13), die für die Spaltung der Typ-II-Kollagene hauptverantwortlich ist. Allerdings weisen die Kollagenasen eine geringere Aktivität gegenüber querverbundenen nativen Fibrillen auf. Hier kommen die in großen Mengen von den Chondrozyten synthetisierten Matrix- und membran-assoziierten Proteasen zum Zuge. Sie ermöglichen eine hohe Substratspezifität und genaue Kontrolle der zeitlichen Sequenz der Kollagendepolymerisation. Wahrscheinlich kommen die Kollagenasen nur ins Spiel, wenn schneller Abbau und effizientere Beseitigung freier Fibrillenmonomere notwendig sind (EYRE, 2002).

Zu Beginn der Fibrillendepolymerisation stehen die Spaltungen der Telo peptide. Theoretisch sind diese Spaltungen der Telo peptide zur Depolymerisation der Fibrillen ausreichend, wenn sie innerhalb der querverbindenden Reste stattfinden. In Anbetracht der Komplexität der Kollagen-II-, -IX- und -XI-Heteromere und der Notwendigkeit einer selektiven Entfernung von Kollagen IX und eventuell XI zur Ermöglichung eines lateralen Wachstums junger Fibrillen, stellen Spaltungen neben den Telo peptid-Querverbindungen jedoch einen Mechanismus für zelluläre Kontrolle des Stoffwechsels dar (EYRE, 2002).

Die Kollagenasen spalten die Kollagenmoleküle an Gly-Leu- oder Gly-Ile-Bindungen in zwei Fragmente. Die Tripelhelix dieser Fragmente hat eine erniedrigte Schmelztemperatur (29-32°C), so dass sie bei Körpertemperatur wahrscheinlich in ihre einzelnen Peptidketten zerfällt. Diese werden dann von proteolytischen

Enzymen abgebaut. Die Sekretion dieser Enzyme aus den Knorpelzellen, in denen sie auch gebildet werden, erfolgt wahrscheinlich entweder in Form inaktiver Prokollagenasen, die im Extrazellulärraum erst aktiviert werden müssen, oder in Form von Kollagenasen, die durch Proteaseinhibitoren gehemmt werden, bis ihre Hemmung bei Bedarf aufgehoben wird (PETRIDES, 1990 und 1998).

### **3.3 Beeinflussung des Knorpelstoffwechsels**

Während des gesamten Lebens werden Matrixmoleküle von den Chondrozyten synthetisiert und abgebaut. Wie bereits erwähnt, ist der Kontrollmechanismus für dieses Gleichgewicht zwar noch nicht vollständig geklärt, aber Zytokine und Wachstumsfaktoren scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen (AIGNER und STÖVE, 2003; LOESER, 2003; LOTZ et al., 1995; TRIPPEL, 1995). Während die Wachstumsfaktoren (Insulin-like Growth Factor (IGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor (TGF) (DIJKGRAAF et al., 1995) und Bone Morphogenetic Protein (BMP)) (LOESER, 2003) am Gelenkknorpel einen anabolen Effekt aufweisen, ist der von den Zytokinen, zu denen Interleukin I-XII, Tumor-Nekrosefaktor (TNF) und Interferon gehören, gewöhnlich katabol (DIJKGRAAF et al., 1995). In gesundem Gewebe scheint jedoch die anabole Aktivität der Wachstumsfaktoren deutlich zu dominieren, während die Aktivität der Zytokine, wenn überhaupt, nur gering ist (LOESER, 2003).

Eine so klare Einteilung der Wirkung ist in vivo allerdings wegen der Wechselwirkungen untereinander und der dadurch bedingten unterschiedlichen zellulären Antworten nicht möglich (TRIPPEL, 1990). BUNNING und RUSSEL (1989) beispielsweise untersuchten die Wirkung von  $\text{TNF}\alpha$  und Interferon  $\gamma$  (IF $\gamma$ ) auf Chondrozytenkulturen. Sie fanden heraus, dass die Aktivität der Kaseinase und damit auch die Produktion von Stromelysin durch  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert wird, während IF $\gamma$  sie hemmt. Interessanterweise interagieren diese beiden jedoch auch untereinander. So wurde bei der Zugabe steigender IF $\gamma$ -Konzentrationen zu mit  $\text{TNF}\alpha$  versetzten Chondrozyten die durch  $\text{TNF}\alpha$  stimulierte Kaseinaseaktivität zunehmend blockiert. Auch die  $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Knorpelresorption in Organkulturen wird durch IF $\gamma$  gehemmt. Die Limitierung des  $\text{TNF}\alpha$ -Effektes durch IF $\gamma$  und der damit möglicherweise verbundene protektive Einfluss auf den Knorpel ist von großem klinischem Interesse (TRIPPEL, 1990).

**Tab. 11:** Die Wirkung der verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokine auf den Zellstoffwechsel in adultem Gelenkknorpel.

<b>Protein</b>	<b>Wirkung</b>
IGF-1	fördert Matrixsynthese; antikatabol
Osteogenetisches Protein-1	potenter Stimulator der Matrixproduktion
TGF $\beta$	fördert Matrixproduktion
FGF-2	stimuliert Matrixsynthese und MMP-Produktion; mitogen
FGF-18	stimuliert Matrixproduktion
Cartilage-derived Morphogenetic Protein	stimuliert Matrixproduktion
BMP-2	stimuliert Matrixproduktion
Leptin	stimuliert Matrixproduktion und Proliferation
IL-1	stimuliert katabole Aktivität, z.B. Matrix-Abbau; antianabol; hemmt GAG-Synthese
TNF $\alpha$	fördert katabole Aktivität; hemmt GAG-Synthese; stimuliert Kollagenase-Produktion
IL-4	hemmt antianabole Effekte von IL-1
IL-6	fördert katabole Aktivität; antianabol
Monocyte chemoattractant Protein-1	fördert katabole Aktivität; evtl. antianabol
RANTES	fördert katabole Aktivität

Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Synthese von Proteasen in den Chondrozyten positiv beziehungsweise negativ. Bei den Proteasen handelt es sich um Matrix abbauende Enzyme, die unter anderem zur Verringerung des Proteoglykangehalts führen. Sie werden in Aspartat-, Cystein-, Serin- und Metalloproteasen eingeteilt (DIJKGRAAF et al., 1995). Die Chondrozyten bilden sie als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli in Form von inaktiven Vorstufen, die später dann aktiviert und in die Matrix entlassen werden (TYLER et al., 1992). Dort binden sie entweder an Rezeptoren der Zelloberfläche und stimulieren dadurch autokrin oder parakrin die Zellaktivität oder sie werden in der Matrix gefangen. Die Enzyme können durch Proteaseinhibitoren, ebenfalls von den Chondrozyten gebildet,

gehemmt werden (HOWELL et al., 1992). Gesunder Gelenkknorpel enthält große Mengen an Proteaseinhibitoren, zu denen unter anderem der Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) und der Tissue-Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) gehören. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proteasen und ihren Inhibitoren ist möglicherweise an der Pathogenese der Osteoarthritis mitbeteiligt (DEAN et al., 1989).

Zytokine aktivieren außerdem die Chondrozyten zu Synthese und Sekretion der Metalloproteinase Stromelysin. Diese kann Proteoglykane abbauen, an nicht-helikale Regionen von Kollagen II binden und als Telozeptidase an Kollagenen wirken (KUETTNER, 1992). Kollagen XI zum Beispiel wird an Stellen zwischen den N-Telozeptid-Verbindungen und der Haupttripelhelix gespalten. Stromelysin kann aber auch Typ-IX-Kollagene und Telozeptid-Domänen von Typ-II-Kollagenen abbauen. Man geht deshalb von einem Chondrozyten medierten Mechanismus bei der Umgestaltung der kollagenen Matrix aus. Durch diese selektive Proteolyse von Kollagenen könnte die fibrilläre Architektur verändert werden, ohne einen Großteil des Gefüges entfernen zu müssen (WU und EYRE, 1995). Möglicherweise ist Stromelysin außerdem auch an der Kontrolle des Kollagenfibrillendurchmessers beteiligt (TRIPPEL, 1990).

### 3.3.1 Einfluss der Zytokine

Wie bereits erwähnt bewirken Zytokine durch die Synthese von Proteasen einen vermehrten Abbau der Matrix und damit eine Verringerung des Proteoglykangehalts. Gleichzeitig reduzieren sie aber auch die Synthese von Proteoglykanen und anderen Matrixkomponenten (DANG et al., 2003; DEAN et al., 2003; FRISBIE et al., 2000; PELLETIER et al., 1993). Zytokine wirken hauptsächlich über Rezeptoren der Zelloberfläche. Das dadurch ausgelöste Signal wird durch Onkoproteine des Zellkerns weitergegeben, die zur Aktivierung der Gentranskription mit entsprechenden spezifischen Zellaktivitäten führen (PELLETIER et al., 1993).

Die Produktion der Zytokine Interleukin-1, Interleukin-6 und des Tumor Nekrosis Factor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) wird unter anderem durch Fibronectinfragmente induziert (HOMANDBERG et al., 1994; HOMANDBERG und HUI, 1996) (s. Kapitel 1.2.4.2.3.1 Fibronectin). Das Zytokin Interleukin-1 (IL-1) stört die Proteoglykansynthese auf der Stufe der Transkription und induziert die Expression einer Matrix-Metalloprotease, die Matrixmoleküle abbaut (DIJKGRAAF et al., 1995). TNF $\alpha$  hemmt die

Proteoglykansynthese und stimuliert die Kollagenaseproduktion sowie die Resorption des Gelenkknorpels. IF $\gamma$  hingegen hemmt die Kollagensynthese (TRIPPEL, 1990). Auch Untersuchungen von YARON et al. (1989) über den Einfluss von Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  auf menschliche Gelenkknorpelkulturen ergaben für alle drei Faktoren eine hemmende Wirkung auf die Bildung sulfatierter GAGs. IF $\gamma$  hingegen zeigte keinen nennenswerten Effekt.

IL-1 $\beta$  regt die Chondrozyten einerseits zu vermehrtem Matrixabbau durch Stimulierung der MMP-Produktion an. Dies erfolgt über einen Anstieg der mRNS der MMPs. Andererseits wird die GAG-Syntheserate durch eine Abnahme der mRNS von Aggrecan verringert. Dasselbe gilt für Kollagen II (FRISBIE et al., 2000; RICHARDSON und DODGE, 2000). Außerdem wirkt IL-1 $\beta$ , wie die anderen Zytokine auch, der anabolen Wirkung der Wachstumsfaktoren entgegen (DAVENPORT-GOODALL et al., 2004; FRISBIE et al., 2000) und führt in Chondrozytenkulturen zudem zu einer verringerten Akkumulierung von Kollagen VI in der perizellulären Matrix (HORIKAWA et al., 2004).

Der genaue Wirkungsmechanismus von IL-1 $\beta$  ist jedoch unklar. Die Effekte von IL-1 $\beta$  auf die Chondrozyten können zum einen durch Glukosamin gehemmt werden, das dazu in der Lage ist, sowohl direkt am IL-1 Rezeptor als auch danach den Grad der Signalübermittlung zu verändern (FENTON et al., 2000; GOUZE et al., 2001 und 2002; SHIKHMAN et al., 2001). Zum anderen wird der Effekt der Zytokine durch Rezeptor-Antagonisten (z.B. IL-1ra), sogenannte lösliche Bindungsproteine (z.B. TNF-BP) (PELLETIER et al., 1991) und Wachstumsfaktoren antagonisiert. Letztere stimulieren sowohl die Synthese von Matrixkomponenten und dem Proteaseinhibitor TIMP, als auch die Zellproliferation (TYLER et al., 1992; GÜNTHER et al., 1994).

### **3.3.2 Einfluss der Wachstumsfaktoren**

Für die Beeinflussung des nicht-reproduktiven Stoffwechsels der Chondrozyten durch die Wachstumsfaktoren gibt es drei Hypothesen:

Entweder wirken die Wachstumsfaktoren direkt an der zellulären Maschinerie der Proteoglykanproduktion oder sie interagieren stufenweise mit anderen Komponenten auf unterschiedlichen Wegen. Die dritte Möglichkeit ist, dass sie die Chondrozyten in die S-Phase des Zellzyklus leiten, wodurch für die Bildung von Matrixprodukten keine Zeit bleibt. Einige der Wachstumsfaktoren ermöglichen den Zellen in die S-Phase

einzutreten, reichen aber selbst nicht dazu aus, in dieser Phase fortzuschreiten. Dazu werden Insulin-ähnliche Somatomedine benötigt, die ihre wachstumsfördernde und stoffwechselstimulierende Wirkung über verschiedene Rezeptoren erlangen (PRINS et al., 1982).

### **3.3.2.1 IGF**

Die IGFs sind für die Aufrechterhaltung des Matrixgleichgewichts von großer Bedeutung (GARCIA et al., 2003). Mit ihrer differenzierenden und die Matrix anabol beeinflussenden Aktivität scheinen diese Wachstumsfaktoren den katabol wirkenden Zytokinen, Serinproteasen und Metalloproteasen teilweise entgegenzuwirken (DAVENPORT-GOODALL et al., 2004).

Unter normalen homöostatischen Bedingungen ist für die Aufrechterhaltung des Knorpelgewebes, wenn überhaupt, nur eine geringe Neusynthese der Wachstumsfaktoren nötig, da die Zellen auf die bereits in der Matrix gebundenen und gelagerten Wachstumsfaktoren reagieren können (LOESER, 2003). Die Penetration von Serum-IGF in den Knorpel ist wahrscheinlich aufgrund der Größe der IGF-Proteinkomplexe beschränkt. Bei Belastung wird jedoch die Verteilung großer Makromoleküle durch den entstehenden Pumpmechanismus verstärkt. Da die Oberflächenzone des Knorpels bei Belastung am stärksten deformiert wird, werden die oberflächlichen Chondrozyten vermutlich besser mit diesen Wachstumsfaktoren versorgt als die Knorpelzellen tieferer Zonen (PARKKINEN et al., 1992).

IGF-I und -II besitzen einen gemeinsamen Ursprung und sind strukturell weitgehend homolog. Sie unterscheiden sich allerdings in ihrem Regulierungsmuster und ihrer biologischen Rolle durch Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Rezeptoruntergruppen. Auch das Ausmaß ihrer Stimulierung der GAG-Synthese ist unterschiedlich und erfolgt durch IGF-I wesentlich stärker als durch IGF-II. Verglichen mit dem Anstieg der GAG-Synthese, der durch eine Konzentration von 5 ng IGF-I/ml hervorgerufen wurde, betrug der durch 100 ng IGF-II/ml verursachte Anstieg in Versuchen mit bovinen Knorpelproben nur 60%. Hinsichtlich der Stimulierung der DNS-Synthese herrschte kein so deutlicher Unterschied (DAVENPORT-GOODALL et al., 2004).

Als weiterer Unterschied ist festzustellen, dass die pränatalen IGF-II-Konzentrationen höher sind als die postnatalen, während die IGF-I-Konzentrationen in der Gravidität stetig zunehmen und einen postnatalen Peak zeigen (DAVENPORT-GOODALL et

al., 2004). Die genaue Rolle von IGF-I und -II in fetalem und postnatalem Wachstum ist jedoch noch unklar.

Da IGF-I einen bemerkenswerten Anstieg der Proteoglykansynthese bewirkt, scheint es bei der Beeinflussung des Chondrozytenstoffwechsels eine der Hauptrollen zu spielen (LOHMANDER, 1988; SCHALKWIJK et al., 1989; VAN SUSANTE et al., 2000). SCHALKWIJK et al., (1989) testeten den Effekt von IGF-I auf den Knorpelstoffwechsel. Dazu inkubierten sie Gelenkknorpel in einer Organkultur mit Synovialflüssigkeit und einem anti-IGF-I-Antikörper. Bei Messung der Proteoglykansynthese stellte sich heraus, dass durch den Antikörper ein Großteil der anabolen Aktivität der Synovialflüssigkeit ausgelöscht wird. Das zeigt, dass der stimulierende Effekt der Synovialflüssigkeit auf die Proteoglykansynthese durch IGF „angekurbelt“ wird (TRIPPEL, 1990).

IGF-II stimuliert besonders die DNS- und GAG-Synthese. Im Gegensatz zur GAG-Synthese erfolgt die Stimulierung der DNS-Synthese jedoch dosisabhängig (DAVENPORT-GOODALL et al., 2004; KIEPE et al., 2002). So konnte der in Versuchen von DAVENPORT-GOODALL et al. (2004) bei einer IGF-II Konzentration von 50 ng/ml beobachtete Anstieg der GAG-Synthese durch höhere IGF-II Konzentrationen nicht weiter gesteigert werden. IGF-II spielt vermutlich bei der Kontrolle des Chondrozytenwachstums eine Rolle (DAVENPORT-GOODALL et al., 2004).

Die Bindung der IGFs an die Knorpelmatrix wird durch spezifische Interaktionen mit IGF-bindenden Proteinen (IGFBPs) mediiert. Bei den IGFBPs handelt es sich um äußerst vielseitige Proteine hoher Affinität, die Signale der IGFs verstärken oder abschwächen können (GARCIA et al., 2003). Letzteres scheint jedoch zu überwiegen, da IGF-Analoga ohne Affinität für diese Bindungsproteine potenter sind als die natürlichen IGFs (MARTIN und BUCKWALTER, 2000). Auch die biologischen Funktionen wie Verfügbarkeit und Transport von IGF-I zu den Chondrozyten werden durch die Wechselwirkungen mit den IGFBPs reguliert. Die Diffusion von IGF im Knorpel wird beispielsweise durch dessen reversible Bindung an die IGFBPs gehemmt (BHAKTA et al., 2000). Dieser Immobilisierung kann jedoch der durch mechanische Belastung induzierte konvektive Flüssigkeitsfluss entgegenwirken, der den IGF-Transport innerhalb des Knorpelgewebes verstärkt. Unter Belastung und verstärktem Flüssigkeitsfluss dissoziieren die IGFs von den IGF-IGFBP-Komplexen,

werden schnell mobilisiert und können somit leichter signalisierende Zellrezeptoren erreichen und aktivieren (GARCIA et al., 2003). Diese Beobachtung korreliert mit Untersuchungen von KIM et al., (1994), die den größten Anstieg der Matrixbiosynthese in Knorpelregionen mit dem stärksten Flüssigkeitsfluss beschreiben, verglichen mit den benachbarten Knorpelregionen, wo der hydrostatische Druck am stärksten und der Flüssigkeitsfluss am geringsten war.

Von den bisher sechs bekannten IGFBPs wurden bislang IGFBP-2, -3 und -6 im Knorpel identifiziert. In bovinem Gelenkknorpel stellt IGFBP-6 den Hauptanteil der IGFBPs dar und ist damit auch hauptsächlich für die Veränderungen der Transportkinetik von IGF verantwortlich (GARCIA et al., 2003; MORALES, 1997). Einige der IGFBPs, besonders IGFBP-3, -5 und -6 können spezifische Wechselwirkungen mit Heparan- und Dermatansulfaten über gemeinsame carboxyterminale Motive eingehen (MORALES und HUNZIKER, 2003). IGFBP-2, das den geringsten Anteil der IGFBPs in bovinem Gelenkknorpel aufweist (MORALES, 1997), ist vor allem an den Chondrozyten lokalisiert und kann nur in Anwesenheit von IGF-I an Heparansulfat binden (MORALES und HUNZIKER, 2003). IGFBP-3 reichert sich mit zunehmendem Alter in der territorialen Matrix an und lagert sich dort mit Fibronektin zusammen, wodurch die hemmende Wirkung von IGFBP-3 verstärkt wird (MARTIN und BUCKWALTER, 2000). Außerdem scheint auch IGF-I durch die Bindung an IGFBP-3 in der territorialen Matrix gespeichert zu werden (BHAKTA et al., 2000).

### **3.3.2.2 TGF**

Der im Gelenkknorpel reichlich vorkommende Transforming Growth Factor $\beta$  (TGF $\beta$ ) hat ein hohes Molekulargewicht. Er wird von den Chondrozyten durch Verbindung eines latenten Peptid-Homodimers mit dem latenten TGF $\beta$  bindenden Protein (LTBP) synthetisiert (PEDROZO et al., 1999). Seine Wirkung wird durch die kleinen Proteoglykane Dekorin, Biglykan und Fibromodulin reguliert. So konnte nach Bindung dieser Proteoglykane an TGF $\beta$  sowohl eine Stimulierung als auch eine Hemmung der Chondrozytenaktivität beobachtet werden (BURTON-WURSTER et al., 2003). Im Gegenzug erhöht TGF $\beta$  die Synthese der kleinen Proteoglykane in isolierten Chondrozytenkulturen. Dabei kommt es im Fall von Fibromodulin im Vergleich mit den beiden anderen kleinen Proteoglykanen zu einem deutlich stärkeren Anstieg seiner Synthese (BURTON-WURSTER et al., 2003). Trotzdem

handelt es sich bei Dekorin um das am meisten im Knorpel vorkommende kleine Proteoglykan (ROUGHLEY, 2001a).

Zusätzlich zum Syntheseanstieg ist in Kulturen mit TGF $\beta$  innerhalb von 14 Tagen bei Dekorin ein erhöhtes Molekulargewicht festzustellen. Dies ist bedingt durch eine Verlängerung der GAG-Ketten um das 1,5-fache (BURTON-WURSTER et al., 2003). Auch CHAN und ANASTASSIADES (1998) beschreiben eine Verlängerung der CS-Ketten in bovinen Chondrozytenkulturen unter dem Einfluss von TGF $\beta$ . Die Größe der Kernproteine hingegen bleibt unverändert (BURTON-WURSTER et al., 2003).

Die Wechselwirkungen zwischen den kleinen Proteoglykanen und TGF $\beta$  1, 2 und 3 erfolgen über Bindungen mit dem Kernprotein der Proteoglykane (BURTON-WURSTER et al., 2003; MARKMANN et al., 2000). Diese Bindung wird anscheinend durch die CS-/DS-Ketten von Dekorin und Biglykan behindert, wodurch die Bindung an Fibromodulin im Vergleich effektiver zu sein scheint (BURTON-WURSTER et al., 2003).

TGF $\beta$  verstärkt nicht nur die Synthese der Proteoglykane (VAN SUSANTE et al., 2000), sondern auch der übrigen Matrixkomponenten einschließlich Kollagen und Fibronectin (BURTON-WURSTER et al., 2003), bei welchem eine bemerkenswerte Steigerung der Gentranskription hervorgerufen wird (MORALES und ROBERTS, 1988). In Chondrozytenkulturen auf Agarosegel konnte beispielsweise durch die Zugabe von TGF $\beta$  eine Anhäufung von Kollagen VI um die einzelnen Knorpelzellen beobachtet werden (HORIKAWA et al., 2004). Andererseits wird TGF $\beta$  aber auch von Kollagen II beeinflusst. So wurden in Versuchen sowohl die Expression von TGF $\beta$  als auch die Antwort der Chondrozyten auf dieses durch intaktes Kollagen II verstärkt, während durch Hitze inaktiviertes Kollagen II keinen Einfluss hatte (QI und SCULLY, 1998 und 2000).

Neben der dosisabhängigen Stimulierung der Proteoglykansynthese senkt TGF $\beta$  aber auch die Rate des Proteoglykankatabolismus. Außerdem kann es die Aktivität verschiedener extrazellulärer Proteinasen inklusive Kollagenase und Stromelysin senken. Da kein Anstieg von Zellgehalt und Nettokollagengehalt in Organkulturen bovinen Gelenkknorpels festgestellt wurde, scheint der Syntheseanstieg nicht auf einer erhöhten biosynthetischen Aktivität der einzelnen Zellen zu beruhen. TGF $\beta$  ist also dazu in der Lage, Biosynthese und Katabolismus ohne Veränderung des DNS-Gehalts so zu beeinflussen, dass in vitro eine hohe Proteoglykankonzentration für

mindestens drei Wochen aufrechterhalten werden kann (MORALES und ROBERTS, 1988).

TGF $\beta$  scheint auch in der Zelldifferenzierung, einschließlich Knorpelformation, während der ersten Schritte der enchondralen Ossifikation eine Rolle zu spielen (MORALES und ROBERTS, 1988). Weiterhin fällt auf, dass der Gelenkknorpel jüngerer Individuen eine höhere Sensitivität gegenüber TGF $\beta$  aufweist als der älterer Tiere. So betrug die Steigerung der Proteoglykansyntheserate in Anwesenheit von TGF $\beta$  im Gelenkknorpel eines 6-jährigen Pferdes 300% im Vergleich zu 160% bei einem 20-jährigen (DEAN et al., 2003).

### **3.3.2.3 Andere Wachstumsfaktoren und Einflüsse**

Auch andere Wachstumsfaktoren der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel das Bone Morphogenetic Protein (BMP), sind für die Homöostase des Knorpels von Bedeutung. Während BMP-2 nur die Proteoglykansynthese stimuliert (VAN SUSANTE et al., 2000), stimuliert BMP-7 zusätzlich auch die Synthese von Hyaluronsäure und CD-44 (NISHIDA et al., 2000).

PRINS et al. (1982) untersuchten den Effekt von verschiedenen gereinigten Wachstumsfaktoren, Insulin und Ascorbinsäure auf Chondrozyten von Kaninchen in Monolayerkulturen. Sowohl die Wachstumsfaktoren als auch die Ascorbinsäure bewirkten einen ähnlich hohen Anstieg der DNS-Synthese, wobei die Ascorbinsäure in Knorpelproben älterer Tiere weniger effektiv war als in denen junger Tiere. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in den Matrixunterschieden. Insulin hingegen zeigte nur einen geringen wachstumsfördernden Effekt, wirkte jedoch synergistisch mit einigen der Wachstumsfaktoren.

Auch die GAG-Synthese wurde von Insulin, Ascorbinsäure und den verschiedenen Wachstumsfaktoren stimuliert. Insulin verstärkt dabei besonders die Synthese aggregationsfähiger Proteoglykane. Die Stimulierung der GAG-Synthese durch Ascorbinsäure wird von einem starken Anstieg der Zellproliferation begleitet (PRINS et al., 1982).

Die Bindungspeptide, die essentielle Bestandteile der Proteoglykanaggregate darstellen, gehören ebenfalls zu den Wachstumsfaktoren. Sie können schnell durch Serin- und Metalloproteinasen der Zelloberflächenmembran abgebaut werden. Die dabei entstehenden Protein- oder Peptidfragmente sind ebenfalls zur Regulierung

der katabolen und anabolen Aktivität der Chondrozyten fähig. Auf diese Weise kann bei erhöhtem Knorpelabbau, der mit einem Anstieg der freien Bindungsproteine einhergeht, die Synthese neuer Matrixmoleküle durch die Chondrozyten hochreguliert werden. Auch synthetische Bindungspeptide, die der N-terminalen Sequenz der Bindungsproteine (BP) der Aggrekane identisch sind, stimulieren die Proteoglykansynthese in Gelenkknorpelkulturen. Der Syntheseanstieg erfolgt dabei konzentrationsabhängig und wird begleitet von einer zunehmenden Fähigkeit der Aggrekanmonomere, mit Hyaluronsäure zu aggregieren (DEAN et al., 2003).

Zusätzlich verursachen BPs auch einen Syntheseanstieg der mRNS von Aggrekan und BP, sowie eine verringerte Sekretion und damit reduzierte Aktivität von IL-1. Diese Wirkungen könnten den Mechanismus darstellen, durch den die BPs eine Zunahme der Proteoglykansynthese bewirken (DEAN et al., 2003).

Auch Vitamin D beeinflusst die Knorpelstruktur. Infolge chronischen Vitamin D Mangels treten im Gelenkknorpel schwere morphologische Schädigungen mit beginnender Degeneration auf, die zonalen Unterschiede des Gelenkknorpels verschwinden und die Knorpeldicke nimmt ab. Die Chondrozyten zeigen degenerative Veränderungen und die Matrix erscheint reduziert und äußerst faserreich, mit ungeordneter Faserstruktur. Auch die Orientierung der CS- und KS-Ketten nimmt ab. Durch diese beträchtlichen strukturellen Veränderungen der Grundsubstanz wird die Tragfähigkeit des Gelenkknorpels so weit herabgesetzt, dass bereits normale Belastung zu einer Knorpelschädigung führen kann und der Degenerationsprozess voranschreitet (GYARMATI et al., 1984).

## **4 Ernährung des Knorpels**

### **4.1 Allgemeines**

Da der Gelenkknorpel teilweise starken Belastungen und Deformierungen ausgesetzt ist, besitzt er keine verletzbaren Strukturen wie Lymph- und Blutgefäße. Diese Avaskularität wird durch eine große Menge endogener Angiogenese-Inhibitoren erreicht, zu denen unter anderem Inhibitoren von Endothelzell-Wachstumsfaktoren, Proteaseinhibitoren (DIJKGRAAF et al., 1995) wie beispielsweise Tissue Inhibitor der Metalloproteinase-1 (TIMP-1) und verwandte Moleküle sowie das kontraktile Protein Troponin I (MOSES et al., 1999) und das glykosylierte Protein Chondromodulin I (HIRAKI et al., 1997) gehören. Außerdem zeigen in vitro Experimente, dass

Thrombospondin1 eine stark angiostatische Wirkung aufweist und somit möglicherweise eine Rolle bei der Vermeidung der Knorpelsvaskularisation spielt (DI CESARE et al., 1994).

Das intrazellulär gelegene Troponin I wird von den Chondrozyten in die angrenzende extrazelluläre Matrix freigesetzt, wo es die Proliferation kapillärer Endothelzellen und damit die Angiogenese hemmt. Die Hemmung erfolgt möglicherweise über einen endothelialen Troponin-I-Rezeptor und die damit verbundene Abflachung der Endothelzellen, die wiederum eine Wachstumshemmung bewirkt (MOSES et al., 1999).

Bei Chondromodulin I handelt es sich eigentlich um ein das Wachstum beeinflussendes knorpelspezifisches Protein, das eine Stimulierung von DNS- und PG- Synthese bewirkt. Es fungiert jedoch auch als spezifischer Elastase-Inhibitor und hemmt sowohl die DNS-Synthese und Proliferation vaskulärer Endothelzellen als auch deren Gefäßmorphogenese. Chondromodulin befindet sich hauptsächlich in der interterritorialen Knorpelmatrix, räumlich getrennt von dem perizellulär und an der Chondrozytenoberfläche vorkommenden Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2). Die FGFs, die eine Stimulierung der Angiogenese bewirken, werden somit von einer Chondromodulin-I-Barriere umgeben, wodurch die angiostatische Eigenschaft des Knorpels erhalten bleibt (HIRAKI et al., 1997).

Während der enchondralen Ossifikation ist der Gehalt an Chondromodulin I in der kalzifizierten und unteren hypertrophischen Knorpelzone geringer und ermöglicht dadurch die vaskuläre Invasion dieser Bereiche. In der proliferierenden und oberen hypertrophischen Knorpelzone hingegen ist der Gehalt an Chondromodulin-I-mRNS während der embryonalen Entwicklungsphase deutlich erhöht und somit keine Gefäßeinsprossung zu beobachten (HIRAKI et al., 1997).

Aufgrund der Avaskularität des Knorpels gibt es für seine Ernährung nur zwei mögliche Wege: Die Nährstoffe müssen entweder von der Gelenkoberfläche über die Synovialflüssigkeit in den Gelenkknorpel gelangen (ARCHER und FRANCIS-WEST, 2003; DUDHIA 2005; MAUCK et al., 2003a) oder aus dem darunter liegenden subchondralen Knochen (DUDHIA, 2005; MOW et al., 1999). Die relative Wichtigkeit dieser beiden Wege wird schon seit langem kontrovers diskutiert.

Inzwischen ist die schon länger bekannte Ernährung über die Synovialflüssigkeit vielfach belegt, da gesunder Gelenkknorpel ohne diese nicht überleben kann.

Außerdem fehlt bei diesem Weg eine anatomische Barriere, die den Nährstofftransport verhindern könnte (DUDHIA, 2005; MAUCK et al., 2003a). Die Ernährung reifen Knorpels durch den subchondralen Knochen als weiteren Nahrungsweg ist jedoch umstritten. Einerseits stellen die dichten Verkalkungen der kalzifizierten Knorpelzone für Nährstoff- und Flüssigkeitsdiffusion ein unüberwindbares Hindernis dar (TORZILLI et al., 1983). Andererseits fehlen im reifen Gelenkknorpel laut vorherrschender Meinung Gefäßkanäle, die im unreifen Knorpel die kalzifizierte Knorpelzone durchziehen und der Knorpelernährung dienen (BUSCHMANN et al., 1995). Allerdings konnten durch mehrere Autoren Gefäßkanäle auch in einigen reifen Gelenkknorpeln nachgewiesen werden (CLARK, 1990; MALININ und OUELLETTE, 2000). Auch MOW et al. (1999) konnten mit Hilfe markierter Substanzen eine Penetration des Knorpels auf diesem Weg nachweisen. Inzwischen wird allgemein die Existenz dieses zweiten Ernährungsweges akzeptiert. Er scheint jedoch nicht von großer Wichtigkeit zu sein (CLARK, 1990; MULLER-GERBL, 1998), da der Knorpel einiger Gelenke bei Tieren und in kleineren humanen Gelenken bei einem Infarkt des darunter liegenden Knochens trotzdem überlebt. In großen Gelenken findet jedoch auch eine subchondrale Ernährung des Knorpels statt. So konnten MALININ und OUELLETTE (2000) in einem drei Jahre dauernden Versuch am Kniegelenkknorpel von Pavianen nachweisen, dass die Unterbrechung des Kontakts zwischen Knorpel und subchondralem Knochen sowohl zur Degeneration des Knorpels als auch zum Absterben des subchondralen Knochens führt. Sie platzierten dazu autologe Knorpeltransplantate in vaskularisierte, lebensfähige Knochenaushöhlungen. Bei einem Teil der Proben wurde durch Methylmethacrylat der direkte Kontakt der Knorpeltransplantate mit dem Knochen verhindert. Bei letzterer Gruppe waren innerhalb des ersten Jahres noch keine degenerativen Veränderungen festzustellen und selbst nach drei Jahren waren die Veränderungen nicht extrem. Eine weitere Beobachtung war das Auftreten von Gefäßkanälen zwischen den tiefen Knorpelschichten und dem subchondralen Knochen nach einem Jahr, die in gesundem Knorpel nicht nachgewiesen werden konnten. Die Autoren vermuten daher, dass diese neugebildeten Kanäle einen Versuch des Knorpels darstellen, den normalen Ernährungsweg wiederherzustellen. Da die größten Veränderungen an den Chondrozyten der kalzifizierten Zone zu erkennen waren, wird auch angenommen, dass die subchondrale Ernährung für diese Knorpelzone am wichtigsten ist (MALININ und OUELLETTE, 2000).

Die Mobilität von Nährstoffen, Zellprodukten, Enzymen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren mit der Interstitialflüssigkeit ist nicht nur für die Lebensfähigkeit der Chondrozyten, sondern auch für die strukturelle Integrität des Knorpelgewebes essentiell (KUETTNER, 1992; TORZILLI et al., 1997; SÄÄMANAN et al., 1990).

Die Ernährung des Gelenkknorpels und die kontinuierliche Entfernung seiner Abfallprodukte erfolgt hauptsächlich durch molekularen Transport per Diffusion zwischen Knorpelmatrix und Synovialflüssigkeit (DIJKGRAAF et al., 1995; MAUCK et al., 2003), aber auch durch die mechanische, kompressionsinduzierte Konvektion der Interstitialflüssigkeit (TORZILLI et al., 1987). Physiologische Knorpelbelastung ist jedoch nicht nur für die Konvektion, sondern auch für die Synovialflüssigkeit von großer Bedeutung. Sowohl ihre Produktion als auch Verteilung entlang der Gelenkoberfläche wird durch die Knorpelkompression unterstützt (O'HARA et al., 1990). Außerdem kommt es bei Bewegungs- und Belastungsmangel in den Teilen stagnierender Synovialflüssigkeit zum Verbrauch der Nährstoffvorräte und eventuell zur Ansammlung saurer Abfallprodukte, wie zum Beispiel Laktat und CO<sub>2</sub>. Auf diese Weise zieht mangelnde Bewegung möglicherweise eine inadäquate Ernährung des Knorpels nach sich (O'HARA et al., 1990). Bei einer Immobilisierung des Gelenks kann es sogar bis zum völligen Stillstand der Knorpelernährung kommen (DIJKGRAAF et al., 1995). AFOKE et al. (1984) erwähnen neben der Diffusion und Konvektion noch einen aktiven Nährstofftransport durch die Chondrozyten (AFOKE et al., 1984).

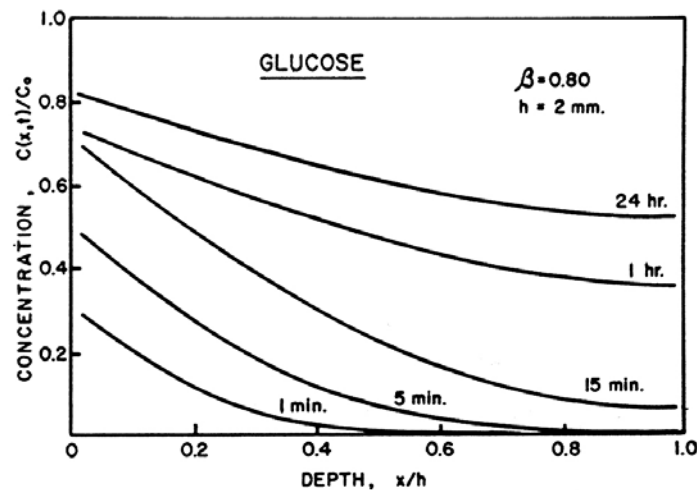
Sowohl bei der Diffusion, als auch bei der Konvektion müssen zwei Barrieren überwunden werden: das Synovialgewebe und die Knorpelmatrix (FISCHER et al., 1995). Ein Großteil des interstitiellen Wassers ist frei mit der Synovialflüssigkeit austauschbar (TORZILLI et al., 1983). Der Transport gelöster Stoffe durch die selektiv permeable Matrix hingegen ist einerseits abhängig von Zusammensetzung und Organisation der Matrix und hier hauptsächlich von den großen Proteoglykanen und deren Konzentration (BUCKWALTER und MANKIN, 1997). Andererseits sind auch Molekülgröße, -ladung, -typ und andere Charakteristika der Solute, wie zum Beispiel Molekularkonfiguration, ausschlaggebend für das Ausmaß ihres Transports (FISCHER et al., 1995). Dieser kann außerdem auch durch Mechanismen, wie zum Beispiel die Bindung an Makromoleküle der Matrix oder elektrische Wechselwirkungen, gehemmt oder gefördert werden (TORZILLI et al., 1987).

Während der Belastung eines Gelenkknorpels verlaufen Konvektion und Diffusion in entgegengesetzter Richtung. Da der Ausstrom von Flüssigkeit aus dem Knorpel durch Konvektion jedoch größer ist als der Einstrom durch Diffusion, kann zu dieser Zeit nur eine geringe Flüssigkeitsmenge mit den darin enthaltenen Nährstoffen in den Knorpel eintreten (TORZILLI et al., 1983).

## 4.2 Diffusion

Bei Soluten mit geringem Molekulargewicht, wie zum Beispiel Glukose, Sauerstoff, Laktat, Aminosäuren und anorganischen Ionen, stellt die belastungsunabhängige Diffusion den Hauptmechanismus des Nährstofftransports im Knorpel dar (MAUCK et al., 2003a; O'HARA et al., 1990), während die Konvektion nur einen zusätzlichen beschleunigenden Effekt ausübt (GARCIA et al., 1996). Versuche mit belasteten und unbelasteten Knorpelproben zeigen daher keine signifikanten Unterschiede in der Aufnahme von Harnstoff, der stellvertretend für kleinmolekulare Substanzen verwendet wurde (O'HARA et al., 1990). Auch PARKKINEN et al. (1992) beobachteten, dass die Diffusion von radioaktivem Sulfat in Knorpelproben relativ schnell erfolgt und zwar unabhängig davon, ob es sich um belastete oder unbelastete Proben handelt. 70-80% der Gleichgewichtskonzentration wurde bereits innerhalb von 5 Minuten erreicht.

Rate, Tiefe und Menge der Knorpelpenetration hängen bei der molekularen Diffusion hauptsächlich von absoluter Konzentration, Konzentrationsgradienten und struktureller Konfiguration der Solute und des Knorpelgewebes ab (TORZILLI et al., 1987), also auch von Zusammensetzung und Dichte der Matrix (BURSTEIN et al., 1993). Darüber hinaus spielen auch die Temperatur (TORZILLI et al., 1993) und die Diffusionszeit (BURSTEIN et al., 1993) eine wesentliche Rolle. Der Diffusionskoeffizient ( $D$ ), der die Proportionalität zwischen der Transferrate der diffundierenden Solute und dem Konzentrationsgradienten repräsentiert, ist daher für kleinmolekulare Stoffe im Knorpel mit  $2\text{-}6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  um das 10- bis 100-fache größer als der Flüssigkeitstransportkoeffizient mit  $0,2\text{-}2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ , der das Ausmaß des Flüssigkeitsflusses im Knorpel beschreibt (O'HARA et al., 1990).

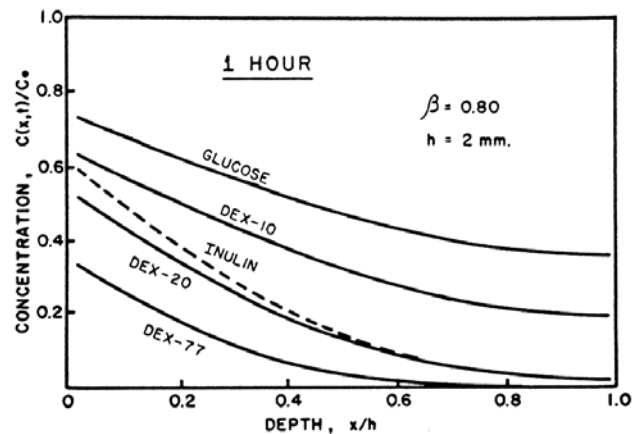


**Abbildung 51:** Charakteristische Konzentration-Knorpeltiefe-Profile für die Diffusion von Glukose aus einer externen Lösung in eine 2 mm dicke Knorpelschicht ( $h$ ) mit 80% Gewebeflüssigkeit ( $\beta$ ). Aus TORZILLI et al. (1987).

Die Diffusion von Molekülen aus der Synovialflüssigkeit durch den gesamten Gelenkknorpel hindurch bis zu seiner Grenze am subchondralen Knochen ist insgesamt gesehen ein relativ langsamer Prozess. Während kleine Solute dazu oft nur wenige Minuten brauchen, kann es bei sehr großen bis zu einigen Tagen dauern (TORZILLI et al., 1987). Für das extrem kleine Glukosemolekül (Molekulargewicht 180) ist zum Beispiel mehr als eine Stunde Diffusionszeit nötig, um innerhalb der gesamten Dicke einer 2 mm starken Knorpelprobe eine relative Konzentration von mehr als 50% zu erreichen (TORZILLI et al., 1987). Die Diffusionszeit verschiedener kleiner Substanzen, wie zum Beispiel Wasser,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$ , beträgt im Knorpel mit 13 ms gleichbleibend 60% ihres Diffusionsvermögens in freier Lösung (BURSTEIN et al., 1993). Erstaunlich ist, dass selbst bei den kleinsten Molekülen auch nach sehr langen Zeiträumen kein Gleichgewicht erreicht wird. Das hat nicht nur signifikante Auswirkungen auf die Knorpelernährung und die morphologische Entwicklung, sondern auch auf den Transport Matrix-abbauender Enzyme in den Knorpel, wie zum Beispiel Kollagenase oder Hyaluronidase (TORZILLI et al., 1987).

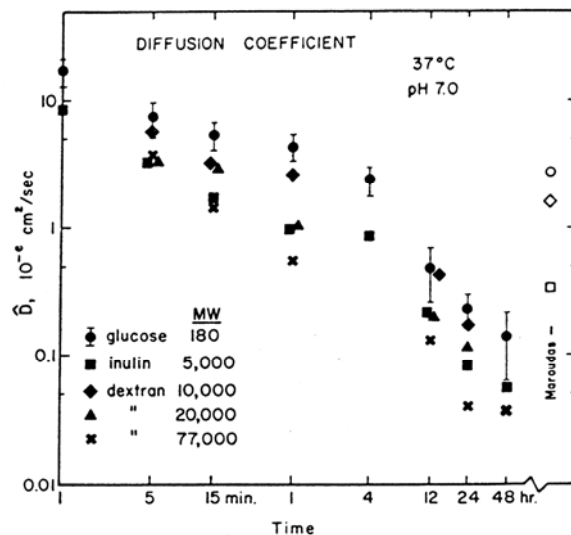
#### 4.2.1 Einfluss der Solute auf die Diffusion

Die Diffusion im Gelenkknorpel wird durch Größe, Ladung und auch Form der diffundierenden Substanzen beeinflusst (TORZILLI et al., 1987), wobei die Diffusionsrate umgekehrt proportional zu Größe und Ladung ist (TORZILLI et al., 1997). Mit zunehmender Größe nimmt daher die diffusionsbedingte Transportrate in unbelastetem Knorpelgewebe ab.



**Abbildung 52:** Charakteristische Konzentration–Knorpeltiefe-Profile nach 1 Std. für die Diffusion von Glukose, Inulin und Dextran (Dex-Zahl; Zahl = Molekulargewicht in kDa) aus externer Lösung in eine 2 mm dicke Knorpelprobe (h) mit 80% Gewebeflüssigkeit ( $\beta$ ). Aus TORZILLI et al. (1987).

Sowohl der Diffusionskoeffizient (D) als auch der Grenzflächenteilungskoeffizient (K), der den Konzentrationsunterschied der jeweiligen Stoffe zwischen externer Lösungskonzentration und Knorpelgewebe an der Gelenkoberfläche repräsentiert, sinken bei steigender hydrodynamischer Größe (TORZILLI et al., 1993). Moleküle ab einer Größe des Hämoglobins (Molekulargewicht 69.000) können den Knorpel nicht mehr penetrieren (TORZILLI et al., 1983).



**Abbildung 53:** Unterschiede des Diffusionskoeffizienten als Funktion der Diffusionszeit für die fünf getesteten Solute in bovinem Kniegelenkknorpel bei 37° und pH 7,0. Rechts im Bild (schwarz umrandet) zum Vergleich die Diffusionskoeffizienten für Glukose, Inulin und Dextran (MG 10 kDa) aus MAROUDAS et al. (1975) in humanem Knorpelgewebe. Aus TORZILLI et al. (1987).

Die Diffusion großer Substanzen ist auch abhängig von deren Ladung (BURSTEIN et al., 1993). Bei kleinen Soluten hingegen ist sie kaum von Bedeutung. So bleibt die

Diffusion von Wasser und  $\text{Na}^+$  auch bei unterschiedlichen pH-Werten unverändert, und der Diffusionskoeffizient von Wasser, Anionen und Kationen ist sowohl im Knorpel als auch in freier Lösung sehr ähnlich (BURSTEIN et al., 1993).

Untersuchungen über Retention und Penetration von großmolekularem, geladenem bovinen Serumalbumin (BSA) im Patellaknorpel von Mäusen, Ratten, Kaninchen und Menschen hingegen ergaben, dass die dichte Matrix des hyalinen Knorpels eine Barriere für große anionische Proteine darstellt. Sobald diese ein Molekulargewicht (MG) von 67 kDa überschreiten, können sie den Knorpel nicht mehr penetrieren. Kationische Proteine hingegen können bis zu einem MG von 240 kDa in den Knorpel eindringen (VAN LENT et al., 1988). Auch die Retention stark positiv geladenen BSAs ist 200-500 mal höher als die von anionischem BSA. Kationisches BSA penetriert tief in die Matrix aller untersuchten Knorpelproben und verteilt sich diffus im ganzen Knorpelgewebe. Es erreicht in dickeren Knorpelproben, wie zum Beispiel Kaninchenknorpel, nach 8 Stunden die kalzifizierte Knorpelzone, in dünneren Proben, wie zum Beispiel der Patella von Mäusen, bereits nach 2 Stunden (VAN LENT et al., 1988). Bei der Bindung von kationischem BSA an Proteoglykane handelt es sich anscheinend um eine dynamische Gleichgewichtsreaktion. Bereits penetrierte kationische BSA-Moleküle können sich lösen und an neue Proteoglykane tiefer in der Matrix binden (VAN LENT et al., 1988).

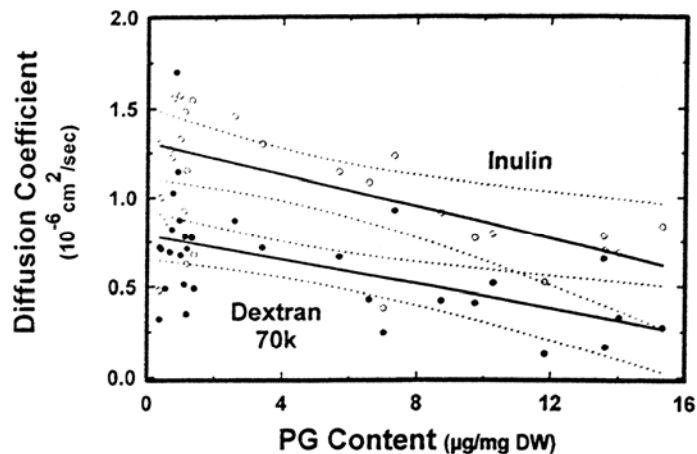
#### **4.2.2 Einfluss der Knorpelstruktur auf die Diffusion**

Wie bereits angedeutet, nimmt auch die Knorpelstruktur Einfluss auf die Diffusion von Wasser und Soluten. Für die Einschränkung der Molekülbeweglichkeit sind sowohl die strukturellen Barrieren der Knorpelmatrix als auch elektrische Wechselwirkungen mit der Matrix von Bedeutung (BURSTEIN et al., 1993; VAN LENT et al., 1988). Bezüglich der Knorpelstruktur stellen besonders die GAG-Ketten mit Zwischenräumen von 3-4 nm, aber auch die Kollagenfibrillen mit Zwischenräumen von 40-400 nm (BURSTEIN et al., 1993) und der Raum zwischen den Proteoglykanmonomeren und -aggregaten potentielle Diffusionsbarrieren im Knorpel dar (TORZILLI et al., 1997). Für die elektrischen Wechselwirkungen sind die stark negativ geladenen GAGs der Proteoglykane verantwortlich (KUETTNER, 1992; VAN LENT et al., 1988).

#### 4.2.2.1 Einfluss der Proteoglykane

Die Einschränkung der Solutmobilität erfolgt also hauptsächlich durch die Proteoglykane (TORZILLI et al., 1997). Basierend auf der Struktur der Proteoglykanaggregate, gibt es zwei verschiedene extrazelluläre Kompartimente für die Diffusion. Im intermolekularen Kompartiment zwischen benachbarten Proteoglykanen und Kollagenfibrillen sind kleine Teilchen wie Glukose und mittelgroße wie Inulin (MG 5.000) frei beweglich. Die Mobilität großer Moleküle wie Dextran (MG 70.000) ist jedoch eingeschränkt. Das intramolekulare Kompartiment hingegen schließt große Moleküle vollständig aus und schränkt bereits den Transport mittelgroßer Substanzen ein (TORZILLI et al., 1997).

Bei Entfernung der Proteoglykane aus Knorpelproben bleibt die Diffusion kleiner ungeladener Moleküle, wie zum Beispiel Glukose, im Vergleich zu intakten Knorpelproben unverändert (TORZILLI et al., 1987). Auch GARCIA et al. (1996) stellten eine Unabhängigkeit der Diffusion kleiner Solute von GAG-Gehalt und Knorpelhydratation fest. Für große ungeladene Moleküle wie Inulin und Dextran hingegen führt die Entfernung der Proteoglykane zu einem signifikanten Diffusionsanstieg. Während bei Dextran bereits nach Entfernung von 71% der Proteoglykane ein 1,7-facher und nach Entfernung von 93% der Proteoglykane ein doppelter Anstieg der Diffusion festzustellen ist, kommt es bei Inulin erst nach Entfernung von 93% der Proteoglykane zu einem 1,6-fachen Anstieg. Dies deutet darauf hin, dass die größeren Moleküle im Vergleich zu den kleineren nicht nur durch den intra- und intermolekularen Raum der Proteoglykane, sondern möglicherweise auch durch das Netzwerk der Kollagenfibrillen in höherem Ausmaß behindert werden (TORZILLI et al., 1997).



**Abbildung 54:** Korrelation zwischen der Diffusionsrate von Inulin und Dextran und dem Proteoglykangehalt in bovinem Femurknorpelgewebe. Die durchgezogenen Linien zeigen die lineare Regression (nach dem Prinzip des kleinsten quadratischen Abstands), die gestrichelten Linien repräsentieren das 95% Konfidenz-Intervall zur Regression (○ Inulin; ● Dextran). Aus TORZILLI et al. (1997).

Die Entfernung der Proteoglykane lässt jedoch nicht nur den Einstrom, sondern wahrscheinlich auch den Ausstrom großer Moleküle ansteigen. Der drastische Verlust von aggregierten und neu synthetisierten Proteoglykanmonomeren aus der Matrix von osteoarthritischem Knorpelgewebe ist damit wahrscheinlich das direkte Ergebnis erhöhter Mobilität dieser Makromoleküle bei fortschreitendem Abbau der Matrixkomponenten (TORZILLI et al., 1997).

#### 4.2.2.2 Einfluss der Knorpeloberfläche

Neben den Proteoglykanen hat auch die Knorpeloberfläche Einfluss auf die Diffusion im Knorpel. Nach Entfernung der obersten 50 oder 100 µm des Gelenkknorpels kommt es im gesamten Knorpelgewebe zum Absinken der Konzentration aller getesteten löslichen Moleküle. Die Dicke der entfernten Oberflächenstruktur (50 oder 100 µm) zieht dabei keine unterschiedlichen Auswirkungen nach sich. Die Integrität der Gelenkoberfläche stellt jedoch nicht nur einen Hauptkontrollmechanismus für den molekularen Transport in den Knorpel dar. Die Entfernung der Knorpeloberfläche hat zusätzlich auch eine Erhöhung von Knorpeldeformation und Flüssigkeitstransport sowie eine verringerte Knorpelsteifigkeit zur Folge (TORZILLI et al., 1993).

Die Ursachen für die abnehmende Diffusion nach Entfernung der Gelenkoberfläche sind jedoch noch unklar. Da aber sowohl in der Lamina splendens als auch in der tangentialen Oberflächenzone der Wasser- und Kollagengehalt höher und der Proteoglykangehalt geringer ist als in den darunter liegenden Knorpelregionen, wären Wechselwirkungen zwischen den diffundierenden Substanzen und den

Proteoglykanen eine mögliche Erklärung dafür. Zudem fungieren diese obersten Knorpelregionen wahrscheinlich auch als dehnungsfähige Oberflächenmembran, um die Expansion des Gewebes aufgrund der Schwellungstendenz der Proteoglykane im Zaum zu halten. Nach Entfernung der Oberfläche könnten sich also die Proteoglykane ausbreiten, mit den diffundierenden Molekülen interagieren und so deren Transport durch die Oberfläche hindurch behindern. Welche Mechanismen auch immer dafür verantwortlich sein mögen - die Tatsache, dass eine Beschädigung der Knorpeloberfläche dramatische Konsequenzen bezüglich des Nähr- und Flüssigkeitstransportes im Knorpel zur Folge hat, ist für die Klinik von äußerster Relevanz (TORZILLI et al., 1993).

#### **4.2.3 Einfluss des Konzentrationsgradienten auf die Diffusion**

Der Konzentrationsgradient ist für die Diffusion nicht von entscheidender Bedeutung. So führte ein Anstieg des Konzentrationsgradienten entlang der Gelenkoberfläche durch Erhöhung der externen Solutkonzentration um das 100-fache von 0,25 mM auf 25 mM zu keinen signifikanten Veränderungen in Transportrate, K oder den charakteristischen Konzentrationstiefenprofilen (TORZILLI et al., 1993).

#### **4.2.4 Einfluss der Zeit auf die Diffusion**

Der Diffusionskoeffizient des Wassers ist auch von der Diffusionszeit abhängig. Er nimmt mit zunehmender Diffusionszeit (zwischen 25 ms und 2 s) ab und beträgt nach etwa 1s nur noch 40% der Diffusionsfähigkeit in freier Lösung. Allerdings hat eine Diffusionszeit von mehr als 1s keine Auswirkungen auf die Diffusionsfähigkeit mehr (BURSTEIN et al., 1993). K hingegen steigt innerhalb eines Zeitraums von vier Stunden an und bleibt dann ungefähr konstant. Zwischen D und der Transportzeit herrscht eine deutlich lineare log-log Beziehung, während zwischen K und der Diffusionszeit keine signifikante kontinuierliche funktionelle Beziehung festzustellen ist (TORZILLI et al., 1987).

#### **4.2.5 Einfluss der Temperatur auf die Diffusion**

In Versuchen von TORZILLI et al. (1993) führte eine Temperaturerhöhung von 10°C auf 37°C im gesamten Knorpelgewebe zu einem Anstieg der Solutkonzentration um mehr als das Doppelte. Sowohl D als auch K stiegen mit zunehmender Temperatur deutlich an. Dies ist wahrscheinlich auf die wärme- bzw. energiebedingte erhöhte

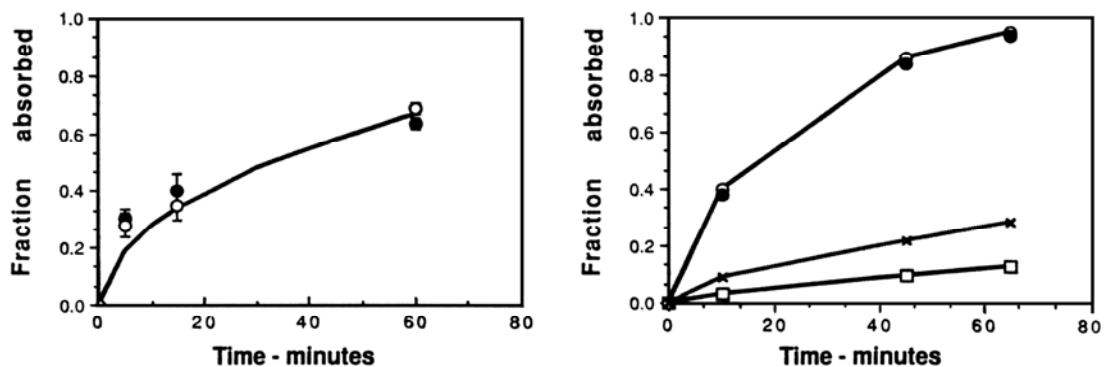
Molekularaktivität zurückzuführen. Die Unterschiede von  $D$  korrelieren mit der Stokes-Einstein Beziehung (TORZILLI et al., 1993):

$$D' = D \times T'\eta / T\eta,$$

wobei  $T$  die absolute Temperatur ist und  $\eta$  die Viskosität des interstitiellen Wassers. Der genaue Mechanismus für den Anstieg von  $K$  bei steigender Temperatur ist noch unbekannt. Eventuell ist jedoch eine erhöhte Oberflächenporosität durch wärmebedingte Gewebsexpansion oder ein schnelleres Erreichen des Gleichgewichts der Grund dafür (TORZILLI et al., 1993).

### 4.3 Konvektion

Die Konvektion stellt eine belastungsabhängige Transportform dar, bei der Flüssigkeit zusammen mit den enthaltenen Molekülen bewegt wird. Der Molekültransport erfolgt hierbei also durch Mitführung. Da die Konvektion aus den Druckgradienten innerhalb des Gewebes (osmotisch oder hydraulisch) und der mechanischen Belastung der Matrix resultiert, wird sie sehr stark durch die Pumpvorgänge im Zuge der Knorpelbelastung beeinflusst (TORZILLI et al., 1987). TORZILLI et al. (1983) fanden jedoch heraus, dass erst ab einer Knorpelbelastung von mindestens 98.1 N der Flüssigkeitseinstrom in den Knorpel größer ist, als durch alleinige Diffusion. Diese Belastung entspricht bezüglich der Dimension der verwendeten Proben dem einfachen Körpergewicht eines Menschen (TORZILLI et al., 1983).



Effekt zyklischer Belastung auf die Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]Harnstoff in Knorpelproben. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert und Standardabweichung von 6 unabhängigen Tests.

● - belastete Probe;  
○ - unbelastete Probe;  
Linie – die kalkulierte Aufnahme des Harnstoff in die 1,6 mm dicke Knorpelprobe.

Effekt zyklischer Belastung auf die Aufnahme von freiem  $^{125}\text{I}$  und mit  $^{125}\text{I}$  markiertem humanem Serumalbumin (HSA) in Proben aus humanem Femurknorpel.

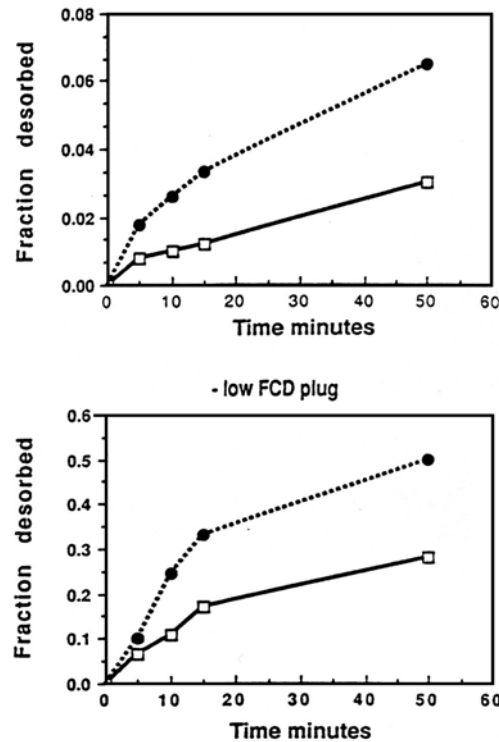
● – freies  $^{125}\text{I}$ , belastete Proben;  
○ - freies  $^{125}\text{I}$ , unbelastete Proben;  
X – HSA belastete Probe;  
□ – HSA Kontrollprobe.

**Abbildung 55:** Aus O'HARA et al. (1990).

In Knorpelregionen mit der größten Fließgeschwindigkeit ist ein deutlicher Anstieg der Matrixbiosynthese festzustellen im Vergleich zu den benachbarten Regionen mit größtem hydrostatischen Druck und geringstem Flüssigkeitsfluss. Obwohl diese Beobachtung den Mechanismus der Stimulierung der Chondrozytenbiosynthese durch den Flüssigkeitsfluss nicht erklärt, zeigt sie jedoch dessen Relevanz für den Zellstoffwechsel (KIM et al., 1994). Unabhängig davon, ob die Moleküle in den Chondrozyten oder an anderen Lokalisationen im Körper synthetisiert werden, ist der Transport an ihre Wirkungsorte im Knorpel von größter Wichtigkeit für Funktion und Gesunderhaltung des Knorpelgewebes (GARCIA et al., 1996). Auch die für Zellstoffwechsel und Matrixsynthese ebenfalls wichtige Eliminierung der Abfallprodukte aus dem Knorpel wird wahrscheinlich durch die Konvektion beschleunigt (MAUCK et al., 2003a).

Mit zunehmendem Molekulargewicht sinkt der Diffusionskoeffizient der Solute und der Einfluss der belastungsabhängigen Konvektion wird größer. Der Transport größerer Moleküle, wie zum Beispiel Serumalbumin, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, Enzyme und deren Inhibitoren, erfolgt also hauptsächlich durch Konvektion (MAUCK et al., 2003a; O'HARA et al., 1990). Dennoch wird die Konvektion auch durch die Molekülgröße beeinflusst. Steigt diese an, kommt es zum Absinken des effektiven Flüssigkeitstransportkoeffizienten aufgrund von Viskosität und Reibungseffekten (O'HARA et al., 1990).

Ebenso wie die Diffusion ist auch die Konvektion großer Moleküle unter anderem von der Knorpelzusammensetzung abhängig. In Knorpelproben mit geringer fixierter Ladungsdichte erfolgt die Resorptionsrate im allgemeinen schneller als in Proben hoher fixierter Ladungsdichte. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der höheren Flüssigkeitspermeabilität und Diffusionsfähigkeit in weniger ladungsdichten Proben und damit in einer Erhöhung des Flüssigkeitstransportkoeffizienten. Dieser ist dann am größten, das heißt der Flüssigkeitsfluss ist am stärksten, wenn der Druckgradient hoch und die Knorpelproben degenerativ verändert sind, also einen Verlust von Proteoglykanen aufweisen. Unabhängig von der Ladungsdichte verläuft die Resorptionsrate jedoch in belasteten Knorpelproben wesentlich schneller als in unbelasteten (O'HARA et al., 1990).



**Abbildung 56:** Effekt zyklischer Belastung auf die Aufnahme von mit  $^{125}\text{I}$  markiertem humanem Serumalbumin für eine Knorpelprobe mit hoher fixierter Ladungsdichte (FCD) (0,17 mEq/g) und eine mit geringer fixierter Ladungsdichte (0,09 mEq/g). • –belastete Knorpelprobe; □ – Kontrollknorpelprobe. Aus O'HARA et al. (1990).

#### 4.4 Glukosetransport

Die Versorgung der Chondrozyten mit Glukose ist für die Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels essentiell. Außerdem dient Glukose auch als Vorläufer für die intrazelluläre Synthese von Matrixmakromolekülen. Aufgrund der Avaskularität des Knorpels sind die Diffusionswege zwischen Kapillaren und Knorpelzellen aber sehr lang und Glukosegehalt und partieller Sauerstoffdruck innerhalb der Matrix damit extrem gering. Sowohl der geringe Sauerstoffverbrauch als auch die schnelle anaerobe Laktatsynthese der Chondrozyten deuten darauf hin, dass ATP hauptsächlich auf glykolytischem Weg erzeugt wird (WINDHABER et al., 2003). Das in den Chondrozyten produzierte Laktat verlässt die Zellen auf Isoformen von Monocarboxylat-Transportern (MCT), hauptsächlich MCT 4 (MEREDITH et al., 2002).

Da die Lipiddoppelschichten der Zellmembranen für Glukose relativ impermeabel sind, wird auch Glukose durch Proteincarrier-Moleküle in die Zellen transportiert. Mehrere  $\text{Na}^+$ -unabhängige Isoformen erleichternder Glukosetransporter (GLUT) wurden bisher in humanen Knorpelzellen entdeckt (konstitutiver GLUT 3 und GLUT 8, induzierbarer GLUT 1 und GLUT 9 (SHIKHMAN, 2001), konstitutiver GLUT 1, GLUT 3, GLUT 6 und GLUT 8-12 (MOBASHERI et al., 2002; RICHARDSON et al.,

2003)). GLUT 3 zeigt von den bislang charakterisierten GLUTs die höchste Affinität für Glukose und ist daher möglicherweise für deren Aufnahme zumindest in bovine Knorpelzellen hauptverantwortlich (WINDHABER et al., 2003).

Die Aufnahme von Glukose in die Chondrozyten wird außerdem noch durch weitere Faktoren beeinflusst. So wird bei Belastung des Knorpels die Glukoseaufnahme durch den erhöhten Druck reduziert. Möglicherweise ist eine Abnahme des Molekularvolumens des Carrierproteins die Ursache dafür, da hierdurch das Ausmaß von Konformationsveränderungen reduziert wird, die mit dem Substrattransport einhergehen (WINDHABER et al., 2003). Auch IL-1 $\beta$  verringert die Aufnahme von Glukose in die Chondrozyten durch geringere Transporteraffinität (WINDHABER et al., 2003). Der Grund dafür ist wahrscheinlich eine Veränderung der relativen Anzahl der verschiedenen synthetisierten GLUT-Isoformen (RICHARDSON et al., 2003) und die Induzierung der Bildung von GLUT 1 und 9 durch IL-1 $\beta$  in humanen Chondrozyten (SHIKHMAN et al., 2001). Bei GLUT 1 handelt es sich um eine Isoform mit geringer Affinität, GLUT 9 ist derzeit noch nicht vollständig charakterisiert (WINDHABER et al., 2003).

Glukosamine hemmen ebenfalls die Glukoseaufnahme in die Zellen durch kompetetive Inhibition, da sie ebenfalls ein gutes Substrat für eine Reihe von GLUT Isoformen darstellen. Ihre Affinität für GLUT 2 ist über 20 mal höher als die von Glukose (ULDRY et al., 2002), während die Affinität der beiden Substrate für GLUT 1 und GLUT 4 ähnlich ist (WINDHABER et al., 2003).

Durch den pH-Wert bleibt die Glukoseaufnahme in die Chondrozyten hingegen unbeeinflusst. Sogar ein steigender Säuregehalt (= sinkender pH-Wert) hat keinerlei Auswirkung (WINDHABER et al., 2003), da die extrazelluläre Matrix selbst relativ sauer ist. Der Grund dafür liegt zum einen in der hohen fixierten negativen Ladungsdichte, die freie Kationen (inklusive H<sup>+</sup>) anzieht, und zum anderen in der hohen Laktatproduktion durch die Chondrozyten (WILKINS et al., 2000).

## **5 Flüssigkeitshaushalt des Gelenkknorpels**

### **5.1 Flüssigkeitsfluss**

Wie bereits erwähnt, besteht Gelenkknorpel aus Gewebeflüssigkeit (hauptsächlich Wasser) und einer festen porig-permeablen Matrix (URBAN, 1994). Der hohe Flüssigkeitsgehalt des Knorpels resultiert aus der hydrophilen Natur seiner

Proteoglykane, die gleichzeitig auch für das Schwellungsverhalten des Knorpels aufgrund des hohen inneren osmotischen Drucks verantwortlich ist (TORZILLI et al., 1983).

Die biphasische Natur des Knorpels, einschließlich der Wechselwirkungen seiner Bestandteile Wasser, Elektrolyte und Matrix, ist also für seine mechanischen Eigenschaften und damit auch für seine Belastbarkeit von großer Bedeutung (MOW et al., 1984; URBAN, 1994), da sie bei Belastung des Knorpels den Druck auf die Matrix reduziert und somit die Matrix schützt. Der Kompressionsdruck, der auf die feste Matrix infolge einer Druckverteilung  $P_A$  an der Oberfläche einwirkt, hängt von der Festigkeit des Gewebes (das Verhältnis des Volumens der soliden Matrix  $V_S$  zum Gesamtvolumen des Gewebes  $V_T$ ) im Verhältnis  $(V_S/V_T)P_A$  ab (HOU et al., 1992). Da die Wasserkonzentration an der Oberfläche des Gelenkknorpels bis zu 85% beträgt, wirken nur 15% des Belastungsdrucks auf die solide Matrix. Der Druck auf die Knorpelflächen beträgt normalerweise nicht mehr als 3-10 MPa und der Kompressionsdruck auf die Proteoglykan-Kollagen-Matrix somit nicht mehr als 0,45-1,5 MPa (ATESHIAN et al., 1994). Die Belastung an der Knorpeloberfläche ist selbst bei unterschiedlich großen Tierarten relativ konstant (PARKKINEN et al., 1992).

Jeder hydraulische oder osmotische Druckgradient, der auf den Knorpel einwirkt, verursacht einen Fluss von Flüssigkeit und Ionen durch die Matrix (COHEN et al., 1998). Die Flüssigkeitsbewegung spielt grundsätzlich eine Rolle in:

- biologischen Prozessen aufgrund der Steigerung des Transports von Nährstoffen und Abfallprodukten in und aus dem Knorpel
- Deformierungsprozessen durch Kontrolle der Flüssigkeitstransportrate durch das deformierte Gewebe hindurch mit Hilfe nicht-linearer Wechselwirkungen und
- funktionellen Prozessen durch Versorgung der Gelenkoberflächen mit Gleitmittel durch Exsudation und Imbibition bei Knorpeldeformation (MOW et al., 1984).

Der Flüssigkeitsfluss ist abhängig von Knorpeldicke, -steifigkeit, -konfiguration, Oberflächenporosität, Permeabilität und Poissonzahl, sowie von der charakteristischen Belastungsfrequenz (TORZILLI und MOW, 1976), jedoch auch von der Zusammensetzung der Flüssigkeit selbst. So üben die in der Interstitialflüssigkeit enthaltenen Gegenionen mit ihren physikalisch-chemischen Merkmalen, zu denen unter anderem Wertigkeit und Konzentration gehören, einen

signifikanten Effekt auf die Antwort des Knorpels bei Druck und Zug aus. Ein Anstieg der interstitiellen Natriumkonzentration verursacht beispielsweise einen ladungsabschirmenden Effekt auf die dicht gelagerten anionischen Gruppen der GAGs. Dieser kann wiederum die Proteoglykane dazu veranlassen, ihr ausgedehntes Lösungsvolumen zusammenzuziehen. Makroskopisch führt dies zur Abnahme von Gewebegröße und -masse, verursacht durch das Absinken der Gewebehydratation (MOW et al., 1984).

Experimente zeigen auch, dass sowohl die Modulation intra- und intermolekularer Abstoßungskräfte zwischen den Ladungsgruppen der Proteoglykane als auch die Unterbrechung elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Kollagen und Proteoglykanen durch Veränderungen der Gegenionen-Umgebung die Kompressions-, Spannungs- und Schereigenschaften des Gewebes beeinflussen können. Aus diesen Studien geht auch hervor, dass sowohl die Bewegung der Interstitialflüssigkeit als auch die Rate des Ionentransports von herausragender Wichtigkeit für die Knorpelfunktion sind (MOW et al., 1984).

Eine Verringerung der Matrixsteife führt aufgrund stärkerer Deformation der Knorpeloberfläche zur Bildung eines dickeren Flüssigkeitsfilms. Knorpel mit einer Steifigkeit von 0,5 MPa bildet daher einen dickeren Flüssigkeitsfilm mit geringerem Spitzendruck als Knorpel mit einer Steifigkeit von 2,5 MPa (HOU et al., 1992).

Die Poissonzahl ist das negative Verhältnis der relativen lateralen Dickenänderung zur relativen axialen Längenänderung. Eine höhere Poissonzahl führt zur Vergrößerung von Knorpeldeformation und belasteter Region. Die Ausbreitung der Belastung verhindert den schnellen Lateralfloss des Schmiermittels und verlängert somit die Zeit des Schmierfilms an der belasteten Stelle (HOU et al., 1992).

Bezüglich des Einflusses der Knorpelgewebskonfiguration auf den Flüssigkeitstransport ist besonders die Konformation der Proteoglykane und Kollagene, sowie die Integrität der Gelenkoberfläche von Bedeutung (TORZILLI et al., 1993). Aus den strukturellen Unterschieden der verschiedenen Knorpelzonen resultiert auch deren unterschiedlicher Wassergehalt. So beträgt der Wassergehalt in der oberflächlichsten Knorpelschicht mehr als 85% (ATHESIAN et al., 1994; TORZILLI et al., 1983) und sinkt gleichmäßig mit zunehmender Knorpeltiefe auf fast 70% an der Grenze zwischen Knorpel und subchondralem Knochen (TORZILLI et al., 1983). Außerdem unterliegt der Wasserhaushalt des Gelenkknorpels weiteren Schwankungen. Knorpelgebiete, die hauptsächlich durch Druck beansprucht werden,

wie zum Beispiel die vom Meniskus bedeckten Anteile des Tibiakopfes, besitzen einen geringeren Wassergehalt und eine größere Wasseraufnahmekapazität als Knorpelflächen, die eher durch gleitende Reibung in Anspruch genommen werden (PUHL, 1974).

Der bei der Knorpeldeformation entstehende Quetschfilm (squeeze-film) ist das direkte Ergebnis des Druckgradienten und das indirekte Ergebnis der Matrixverdichtung.

Die Bewegung des Schmierfilms kann durch Darcy's Gesetz und dessen Modifikationen beschrieben werden:

$$Q = k\Delta p/\Delta h,$$

wobei  $Q$  die Volumenflussrate pro Knorpelquerschniteinheit,  $\Delta p$  der Druckabfall pro Einheit der Knorpelproben Dicke  $\Delta h$  und  $k$  der Permeabilitätskoeffizient ist. Darcy's Gesetz ist von der Matrixdeformation unabhängig und nur der Druckgradient der Flüssigkeit ist von Bedeutung. Es hängt also von der Oberflächenporosität und der Matrixpermeabilität ab (TORZILLI und MOW, 1976).

Beim Flüssigkeitsfluss aufgrund einer Verdichtung der soliden Matrix hingegen ist der direkte Druck vernachlässigbar. Die Flüssigkeitsbewegung erfolgt hier aufgrund der Volumenänderung der soliden Matrix, wodurch ein Druckgradient innerhalb der Interstitialflüssigkeit hervorgerufen wird. In gesundem Gelenkknorpel, in dem die Permeabilität sehr gering ist, dominiert die Flüssigkeitsbewegung aufgrund des Verdichtungseffekts. So ist der Anteil dieses mechanischen Pumpeffekts beim tangentialen Fluss 785 mal und beim Fluss durch die Knorpeloberfläche über 48.000 mal größer, als der Fluss aufgrund des direkten Druckgradienten. Nur in der Übergangsphase der Fließumkehr stellt der direkte Druckeffekt den entscheidenden Mechanismus des Flüssigkeitstransportes dar (TORZILLI und MOW, 1976) (Genauerer s. Kapitel 6 Einfluss der Knorpeldeformation auf den Flüssigkeits- und Soluttransport).

In degenerativ verändertem Knorpel, der durch erhöhte Oberflächenporosität und Permeabilität sowie verminderte Knorpelsteifigkeit gekennzeichnet ist, ist der Einfluss des direkten Druckeffektes mit dem der Konsolidierung vergleichbar. Bei Belastung findet eine erhöhte Exsudation von Flüssigkeit und während der Übergangs- und unbelasteten Phase eine verstärkte Imbibition von Flüssigkeit in der Kontaktregion statt, sowie vermehrte Exsudation außerhalb dieser Region. Dies führt zu einer sehr

starken zirkulatorischen Flüssigkeitsbewegung im Knorpel und seiner Oberfläche (TORZILLI und MOW, 1976).

AP GWYNN et al. (2002) entwickelten nach ihrer Entdeckung der durch Kollagenfibrillen begrenzten und perpendicular zur Knorpeloberfläche angeordneten Tubuli in der radiären Knorpelzone eine weitere Theorie über die Reaktion des Knorpelgewebes auf mechanische Belastung:

Bei Belastung des Gelenkknorpels wird zunächst die Oberflächenzone, in der die Kollagentubuli fehlen, direkt unter dem Kontaktbereich stark komprimiert. Mit der Zeit breitet sich die Flüssigkeit strahlenförmig aus und verteilt somit den Druck gleichmäßig. Auf diese Weise nimmt die Belastung in der Oberflächenzone ab und in den tieferen Knorpelschichten zu. Da die kollagenen Tubuli einen lateralen Flüssigkeitsfluss parallel zur Oberfläche verhindern, wird dieser senkrecht zur Oberfläche in die tieferen Schichten gezwungen. Ohne lateral in eine permeablere Knorpelregion vorzudringen zu können, muss die Flüssigkeit also innerhalb der Tubuli durch die weniger permeablen komprimierten Proteoglykane und die stark zusammengepresste dichte Kollagenfibrillenschicht der Oberflächenzone fließen. Dieser Mechanismus wäre optimal für den Knorpel, um größeren Belastungen über einen längeren Zeitraum ohne starke, eventuell schädigende Deformation seiner soliden Matrix standhalten zu können.

Die Theorie von AP GWYNN et al. (2002) wird unterstützt durch Untersuchungen von KÄÄB et al. (1999) am Tibiaknorpel von Kaninchen unter Belastung. Sogar bei Belastungen mit einem 3-fachen des Körpergewichts wird die kollagene Matrix neben der direkt belasteten Region kaum deformiert und auch nicht lateral hervorgewölbt. Den Grund dafür könnten die Tubuli darstellen. Auch die Beobachtungen von MACIROWSKI et al. (1994), dass der Widerstand gegenüber dem Flüssigkeitsfluss parallel zur Knorpeloberfläche wesentlich stärker ist als perpendicular, unterstützen diese Theorie.

## 5.2 Permeabilität

Die Permeabilität eines Gewebes ist das makroskopische Maß für die Fähigkeit einer Flüssigkeit, die porig-permeable Matrix durchfließen zu können. Sie ist umgekehrt proportional zur Reibung, die durch die Flüssigkeit auf die Matrix ausgeübt wird (COHEN et al., 1998). Obwohl die Porosität des Knorpelgewebes mit etwa 80% sehr

groß ist, ist seine Permeabilität aufgrund der geringen Porengröße relativ gering (HLAVACEK, 1993), wodurch bereits bei sehr geringer Fließgeschwindigkeit große Reibungskräfte auf die Matrix einwirken. Dieser Reibungswiderstand scheint zusammen mit dem Fluss der Interstitialflüssigkeit den Hauptmechanismus für die Lastunterstützung in den Gelenken darzustellen (COHEN et al., 1998).

Die Permeabilität ist unter anderem abhängig von der jeweiligen Knorpelzone, dem Ionengehalt der Flüssigkeit, der Knorpelkompression, sowie dem Wasser- und Uronsäuregehalt. TORZILLI und MOW (1976) berichten über eine Zunahme der Permeabilität von den oberflächlichen zu den tieferen Knorpelschichten. Die durch die Oberflächenschicht gezwungene Flüssigkeit kann somit leichter in die tiefen Knorpelschichten vordringen und innerhalb des Gewebes zirkulieren. Auf diese Weise haben die Chondrozyten genug Zeit, die von ihnen benötigte Menge an Nährstoffen aufzunehmen (TORZILLI und MOW, 1976). Diese Tatsache scheint auch die von AP GWYNN et al. (2002) beschriebene tubuläre Anordnung der Kollagene in den tieferen Knorpelschichten zu bestätigen.

Die Abhängigkeit der Permeabilität vom Ionengehalt der Lösungsflüssigkeit wurde erstmals von EDWARDS (1967) am Hüftknorpel von Hunden untersucht. Dabei wurde bei zunehmender Ionenkonzentration auch ein Anstieg der Permeabilität festgestellt.

Bei Kompression nimmt die Permeabilität des Gelenkknorpels ab. Dabei sinkt die Permeabilitätsrate bei starker Belastung langsamer als bei geringerer Belastung (MANSOUR und MOW, 1976). Der Grund hierfür liegt sowohl in der Verkleinerung der Matrixporen durch Kompression und dem dadurch erhöhten Reibungswiderstand (COHEN et al., 1998), als auch in einer Zunahme der fixierten Ladungsdichte aufgrund der Verdichtung der Proteoglykane (MOW et al., 1984; MOW und MANSOUR, 1977). Diese mechanische Rückkopplung stärkt und schützt den Knorpel durch Limitierung der Fließgeschwindigkeit (COHEN et al., 1998). Da zu Beginn die Belastung und damit auch der Druck geringer sind, ist die Permeabilität des Knorpels hoch und eine große Flüssigkeitsmenge kann in das Gelenk austreten. Die Zunahme von Belastung und Druck führt dann zur Verringerung der Knorpelpermeabilität. Die Flüssigkeit kann nicht mehr so leicht aus dem Gelenkspalt in den Knorpel zurückströmen und der Schmierfilm zwischen den artikulierenden Gelenkflächen bleibt erhalten. Bei Entfernung der Belastung erreicht das Knorpelgewebe wieder seinen ursprünglichen Zustand und die erhöhte Permeabilität

erleichtert das Wiederanschwellen des Knorpels in seinen ursprünglichen Hydrationszustand (MANSOUR und MOW, 1976).

### 5.3 Viskoelastizität

Viskoelastizität ist definiert als die zeitabhängige Antwort eines Materials, das einer konstanten Belastung oder Deformation ausgesetzt wird (COHEN et al., 1998). Solange die Belastungsdauer ausreichend kürzer als die Erholungszeit ist, verhalten sich viskoelastische Materialien elastisch (MOW et al., 1974), da hier die Deformation aufgrund des Flüssigkeitsflusses vernachlässigbar ist (TORZILLI und MOW, 1976). Beim Gelenkknorpel handelt es sich um ein viskoelastisches Material, das aus zwei getrennten Phasen besteht: der festen (organische extrazelluläre Matrix) und der flüssigen Phase (interstitielles Wasser mit den darin gelösten anorganischen Salzen) (VANWANSEELE et al., 2002). Die bei der Kompression des Gelenkknorpels entstehende Druckveränderung hat einen Fluss der Interstitialflüssigkeit durch die feste porig-permeable extrazelluläre Knorpelmatrix zur Folge. Dieser Fluss erzeugt einen erheblichen Reibungswiderstand, der hauptsächlich für die viskoelastische Eigenschaft des Knorpels bei Kompression verantwortlich ist (MOW et al., 1992; HLAVACEK, 1993; VANWANSEELE et al., 2002). Allerdings beeinflussen auch fließunabhängige viskoelastische Mechanismen sowie die viskoelastischen Eigenschaften der Matrix selbst die Deformation des Gelenkknorpels (MOW et al., 1984; SETTON et al., 1994; VANWANSEELE et al., 2002; ZHU et al., 1993).

Es agieren also drei Hauptkräfte um die Belastung auszugleichen: die Kräfte, die durch den Druck entstehen, der sich jeweils in der festen und flüssigen Phase entwickelt und die Reibungskraft, die durch den Flüssigkeitsfluss durch die feste Phase hindurch verursacht wird (COHEN et al., 1998).

Wenn die Belastungsdauer länger als die Erholungszeit oder die Kompression konstant ist, wird der Flüssigkeitsfluss stark erhöht (TORZILLI und MOW, 1976) und der Gelenkknorpel reagiert als viskoelastisches Material mit den zwei charakteristischen Antworten Kriechverformung („creep“) und Spannungsrelaxation (COHEN et al., 1998).

Die Kriechverformung findet bei konstanter Belastung statt. Typischerweise antwortet viskoelastisches Material auf diese Art der Belastung mit dem Herausfließen von Interstitialflüssigkeit (MOW et al., 1984), sowohl von der komprimierten Knorpelregion in die nicht komprimierten Matrixgebiete als auch über die Gelenkoberfläche in den

Gelenkspalt. Der Knorpel wird erst schnell und dann langsamer deformiert, bis ein Gleichgewicht erreicht ist, bei dem das osmotische Potential des Proteoglykangels einen zur Belastung vergleichbaren Druck erreicht und die Deformation des Knorpels stoppt (COHEN et al., 1998; POOLE et al., 1984). Es laufen also zwei unterschiedliche Reaktionsmechanismen nacheinander ab. Innerhalb von 500 msec nach Belastungsbeginn erfolgt eine elastische Sofortantwort, die in der direkten Kompression und dem leichten Auseinanderweichen der Matrix besteht. Wie bereits erwähnt, stellen hierbei die Kollagenfasern den begrenzenden und somit formwahrenden Faktor dar. Die zweite, bis zu mehrere Stunden dauernde Reaktion stellt die eigentliche Kriechverformung dar. Hierbei fließt solange Wasser aus dem belasteten Knorpelgebiet, bis der auf diese Weise steigende osmotische Druck mit dem äußeren Druck im Gleichgewicht ist (MADOURAS, 1979 und 1976; JURVELIN et al., 1990). 10% der Kriechverformung finden bereits in der ersten Sekunde (SETTON et al., 1993), 25% in den ersten 20 Sekunden der Belastung statt (ATHANASIOU et al., 1991). Die Kompressionssteife des Knorpels nimmt dabei mit der Geschwindigkeit der Deformation zu (KIM et al., 1995).

Konstante Deformation bewirkt im Knorpel anfangs eine hohe Spannung, die mit der Zeit progressiv sinkt, bis ein Gleichgewicht zwischen Spannung und Deformationskraft erreicht ist. Diese zeitabhängige Spannung des Gewebes wird als Spannungsrelaxation bezeichnet (COHEN et al., 1998).

## **5.4 Das Schwellungsverhalten des Gelenkknorpels**

Seine einzigartigen biomechanischen Eigenschaften mit der Kombination aus Elastizität und Steifigkeit erhält der Gelenkknorpel vor allem durch das Gleichgewicht zwischen osmotischem Schwellungsdruck der polyanionischen GAG-Ketten und den Zugkräften, die sich im umliegenden Kollagennetz dadurch entwickeln (ACKERMANN und STEINMEYER, 2005; BRAMA et al., 2000a und 2002; LAI et al., 1991; MOW et al., 1992; WILSON et al., 2005; ZHU et al., 1996). Dieses Kräftegleichgewicht ermöglicht der Knorpelmatrix, dem Druck mechanischer Belastung standzuhalten und diesen über den gesamten Gelenkknorpel zu verteilen (HALL et al., 2003; MODIS et al., 1996; MUIR et al., 1995; ROUGHLEY und LEE, 1994).

Lange Zeit wurde vermutet, dass das Schwellungsverhalten des Gelenkknorpels ausschließlich mit dem Donnan'schen Druck zusammenhänge. Der „Donnan Effekt“

wird dadurch erreicht, dass der Anstieg der Gesamtkonzentration anorganischer Ionen auch zum Anstieg der Osmolarität des Knorpels führt (BUCKWALTER und MANKIN, 1997).

Die idealisierte Form des Donnan'schen Gesetzes über das Gleichgewicht der Ionenverteilung im Knorpel lautet:

$$c(c + c^F) = c^{*2},$$

wobei  $c$  die Konzentration eines Ions im Knorpel ist,  $c^F$  die fixe Ladungsdichte der extrazellulären Matrix und  $c^*$  die Konzentration eines neutralen Salzes, wie zum Beispiel NaCl in der Flüssigkeit außerhalb des Knorpels (COHEN et al., 1998).

Da die daraus resultierende Ionenkonzentration im Knorpel höher als in der umliegenden Synovialflüssigkeit ist, wird in der Matrix ein Druck aufgebaut, der als Donnan'scher osmotischer Druck bezeichnet wird. Der dadurch hervorgerufene Flüssigkeitsfluss in das Knorpelgewebe erfolgt mit dem Ziel des osmotischen Gleichgewichts (COHEN et al., 1998; WILSON et al., 2005). Um die fixierten negativen Ladungen zu neutralisieren, bilden sich immer Wolken von im interstitiellen Wasser gelösten Gegenionen (zum Beispiel  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Na}^+$ ) und Co-Ionen (z.B.  $\text{Cl}^-$ ) um diese Ladungen herum. Diese Ionen sind durch Konvektion und Diffusion mit der Interstitialflüssigkeit frei beweglich. Die fixierten Ladungen können also nicht nur die Gewebehydratation beeinflussen, sondern auch den Flüssigkeits- und Ionen transport durch die Matrix kontrollieren (SUN et al., 2004).

Untersuchungen ergaben jedoch, dass eine weiterer Grund für die Schwellungstendenz des Knorpels in der gegenseitigen Abstoßung der dicht aneinanderliegenden negativ geladenen Sulfat- und Carboxylgruppen liegt, die entlang der CS- und KS-Ketten sowie der Hyaluronsäuremoleküle fixiert sind (LAI et al., 1991; SUN et al., 2004). Auf diese Weise tendieren die Proteoglykane zur Expansion, ziehen Wasser in das Gewebe und halten es darin fest (HARDINGHAM et al., 1986).

Die Proteoglykane sind aber aufgrund ihrer Größe und Aggregationsfähigkeit sowie durch die parallel zur Längsachse der Kollagenfibrillen verlaufenden GAG-Ketten der Aggrekane im kollagenen Netzwerk verstrickt und somit immobilisiert (MODIS et al., 1996). Daher können sie ihr vollständiges Lösungsvolumen nicht erreichen (das Anschwellen der Aggrekane wird auf 20% ihres maximal möglichen Schwellungsvolumens eingeschränkt) und befinden sich auch ohne äußere Belastung unter Spannung (MOW et al., 1984; SETTON et al., 1993). Außerdem sind

auf diese Weise hohe Aggrecankonzentrationen von bis zu 30–50 mg/ml erreichbar (KUETTNER, 1992).

Dieser auch als „chemischer Expansionsdruck“ bezeichnete Effekt hängt zusätzlich auch von der inneren Ionenkonzentration der Lösung ab, die um die Proteoglykane fließt. Diese Ionen halten nämlich die geladenen Gruppen davon ab, miteinander zu interagieren.

Der chemische Expansionsdruck  $\sigma^c$  kann berechnet werden über

$$\sigma^c = a_o c^F \exp(-\kappa c^*),$$

wobei es sich bei  $a_o$  und  $\kappa$  um Materialkoeffizienten handelt;  $c^F$  ist die fixe Ladungsdichte der extrazellulären Matrix und  $c^*$  die Konzentration eines neutralen Salzes in der Flüssigkeit außerhalb des Knorpels (LAI et al., 1991).

Der totale Schwellungsdruck des Knorpels ist also gleich der Summe des chemischen Expansionsdruckes  $\sigma^c$  und des Donnan'schen osmotischen Druckes  $\Pi$ . In einer physiologischen NaCl-Lösung leisten der chemische Expansionsdruck und der Donnan'sche osmotische Druck fast denselben Beitrag zum totalen Schwellungsdruck wie im Gelenkknorpel. Der Schwellungsdruck trägt insgesamt jedoch nur minimal zur Knorpelsteifigkeit bei, die ja hauptsächlich durch den Druck in der fest elastischen Matrix erreicht wird (MOW et al., 1994).

## 5.5 Schmierfilm der Gelenkflächen

Das Synovialgelenk wird einer Vielzahl verschiedener Belastungsbedingungen mit einer weiten Spanne unterschiedlicher Geschwindigkeiten ausgesetzt, alle begleitet von bemerkenswert geringen Reibungskräften. Diese Reibungsreduzierung erfolgt durch die Schmierung des Gelenkknorpels und dient dem Schutz des Knorpels vor Verschleiß und mechanischen Schäden (KIRK et al., 1993; TORZILLI und MOW, 1976). Gesunde Gelenke besitzen einen sehr geringen Reibungskoeffizienten, der zwischen 0,002 und 0,02 liegt und bei mehrstündiger konstanter Belastung auf 0,2–0,4 ansteigt (KRISHNAN et al., 2004a).

Die Gelenkschmierung erfolgt einerseits durch eine 0,1–0,4  $\mu\text{m}$  dicke Schicht hochkonzentrierter Phospholipide, die sich an der äußersten Knorpeloberfläche befindet (KIRK et al., 1993), und andererseits durch die Synovialflüssigkeit, die gleichzeitig auch der Ernährung des Knorpels dient (HLAVACEK, 1993). Bei den Phospholipiden handelt es sich zu 41% um Phosphatidylcholin, 32% Sphingomyelin und 27% Phosphatidylethanolamin. In allen drei Phospholipidklassen ist die Ölsäure

die am häufigsten anzutreffende Fettsäure. Es befinden sich jedoch sowohl gesättigte (43%) als auch ungesättigte (57%) Fettsäuren in jeder Klasse. Je länger die Ketten sind und je höher der Anteil an ungesättigten Fettsäuren, desto mehr wird der Reibungskoeffizient gesenkt (SARMA et al., 2001).

Da die Phospholipide hydrophob sind, können sie den Austausch wässriger Solute durch die Knorpeloberfläche hindurch verhindern und als wasserdichtes Agens die Schmierflüssigkeit in der Kontaktzone der Gelenkflächen zurückhalten. Diese Eigenschaft wird durch die dichte Natur der Gelenkoberfläche unterstützt (KIRK et al., 1993). Die Phospholipidschicht ist besonders bei hoher Belastung und gleichzeitig geringer Geschwindigkeit zum Schutz des Knorpels von Bedeutung, da hier hydrodynamische Prozesse nicht mehr wirken (KIRK et al., 1993).

Die Synovialflüssigkeit, die von der Synovialmembran der Gelenke sezerniert wird, bildet auf dem Gelenkknorpel eine Grenzschicht. Ihr Volumen variiert je nach Gelenk und beträgt im Knie, dem größten Synovialgelenk des Menschen, etwa 1 ml (TORZILLI und MOW, 1976). Bei der Synovialflüssigkeit handelt es sich um ein Dialysat aus Blutplasma, zu dem während der Diffusion durch die Synovialmembran kleine Mengen eines Hyaluronsäure-Protein-Makromolekül-Komplexes hinzugefügt werden. Diese Komplexe bilden ein kurzlebiges makromolekulares Netzwerk, das der Synovialflüssigkeit ihre viskoelastische Eigenschaft verleiht (HLAVACEK, 1993). Die hohe Viskosität der Synovialflüssigkeit sinkt mit steigender Scherkräfteinwirkung und zeigt damit ein nicht-Newton'sches Verhalten (RUDRAIAH et al., 1991).

Bezüglich der Gelenkschmierung gibt es mehrere Theorien, die abhängig von den jeweiligen Belastungsarten in unterschiedlichen Kombinationen fungieren (SARMA et al., 2001):

CHARNLEY postulierte bereits 1959 die Grenzflächenschmierung als verantwortlichen Mechanismus für die Schmierung des Gelenkknorpels. Bei dieser Theorie ist der Reibungskoeffizient unabhängig von der Viskosität des Schmiermittels und nur die Qualität des Schmiermittels ist entscheidend. Es besteht aus Molekülen mit einem hohen Molekulargewicht, wie zum Beispiel Hyaluronsäure und Proteinen (KUMAR et al., 2001) beziehungsweise aus einem Glykoprotein (CHARNLEY, 1959; DIJKGRAAF et al., 1995). Das Glykoprotein Lubricin

beispielsweise ist für die schmierenden Eigenschaften der Synovialflüssigkeit, in der es sich befindet, mitverantwortlich (JAY et al., 2001; SARMA et al., 2001; SCHWARZ und HILLS, 1998). Es besteht hauptsächlich aus Protein und Kohlenhydraten, aber auch aus einem geringen Anteil an Phospholipiden. Seine Fähigkeit, die Oberflächen des Gelenkknorpels zu ummanteln, erlangt es wahrscheinlich sowohl durch hydrophoben Charakter als auch durch die Aggregatbildung der einzelnen Lubricinpolymere (JAY et al., 2001). Außerdem ist auch die mehrlagige Phospholipidschicht an der Oberfläche des Gelenkknorpels an der Grenzflächenschmierung beteiligt (SCHWARZ und HILLS, 1998).

Grenzflächenschmiermittel können die physikalisch-chemischen Eigenschaften einer Oberfläche verändern. Sie binden an belastete Oberflächen und erzeugen eine gegenseitige Abstoßung (JAY et al., 2001). Die Knorpeloberflächen gleiten über diese Moleküle wie über die Borsten eines Teppichs, die einen direkten Kontakt zwischen den artikulierenden Knorpelflächen verhindern (CHARNLEY, 1959; DIJKGRAAF et al., 1995; SARMA et al., 2001). Laut CHARNLEY (1959) und DIJKGRAAF et al. (1995) tritt die Grenzflächenschmierung vor allem bei geringer Belastung in Funktion, während sie laut SARMA et al. (2001) bei schwerer Belastung stattfindet.

Die „weeping“-Theorie hingegen besagt, dass es bei der Belastung des Knorpels zu einem Anstieg des inneren hydrostatischen Drucks kommt. Sobald dieser den osmotischen Druck übersteigt, wird Interstitialflüssigkeit aus der komprimierten Knorpelregion über die Knorpeloberfläche in den Gelenkspalt gepresst. Die exsudierte Interstitialflüssigkeit bildet dort einen Schmierfilm, der durch einen Selbstdruckmechanismus, genannt weeping lubrication, aufrechterhalten wird. Außerhalb der belasteten Region erfolgt die Flüssigkeitsresorption. Dieser Mechanismus tritt vor allem bei schwerer Knorpelbelastung in Kraft (DIJKGRAAF et al., 1995).

Eine weitere Theorie zur Schmierung der Knorpeloberfläche, die sogenannte „boosted lubrication“, geht davon aus, dass die löslichen Komponenten der Synovialflüssigkeit zwischen den artikulierenden Oberflächen eingeschlossen sind und bei Kompression langsam über die Kontaktregion in die darunter liegenden Knorpelbereiche hineingepresst werden. Aufgrund der extrem kleinen Porengröße

des Knorpels hinterlässt dieser Filtrationsprozess zusammen mit der Rauigkeit der Gelenkoberfläche einen konzentrierten Schmierfilm, der besonders reich an Hyaluronsäure-Protein-Komplexen ist. Dieser Film kann den Knorpel nicht penetrieren und bleibt daher auf der Gelenkfläche (WALKER et al., 1968). Das Ausmaß der Gelformation hängt sowohl von der Ausgangskonzentration der Makromoleküle in der Synovialflüssigkeit als auch von den Filtrationseigenschaften der Gelenkoberfläche ab. Diese Hypothese basiert auf der Annahme, dass bei abnehmender Dicke des Flüssigkeitsfilms der visköse Widerstand des lateralen Flusses aufgrund der Bewegung des Schmierfilms größer wird als der Widerstand gegenüber dem Fluss in den Knorpel (MOW et al., 1984).

Bei dieser Theorie wird jedoch fälschlicherweise von einer unregelmäßigen und nicht von einer glatten Gelenkfläche ausgegangen. KIRK et al. (1993) konnten aber in Versuchen mit Gelenkknorpelproben nachweisen, dass die Knorpeloberfläche in unbelastetem, hydriertem Zustand extrem glatt ist. Bei den an der Knorpeloberfläche unter anderem von WALKER et al. (1968) beschriebenen Vertiefungen, Wellen und Erhebungen von Größen zwischen 1 und 500 µm handelt es sich wahrscheinlich um luftkontaktbedingte Dehydratationserscheinungen der Knorpeloberfläche. Die Exposition des Gelenkknorpels mit Luft, wie zum Beispiel bei chirurgischen Eingriffen, führt bereits nach 6 bis 48 Minuten zu irreversiblen Dehydratationsartefakten des Knorpels in Form von Unregelmäßigkeiten der Knorpeloberfläche. Je länger Knorpel der Luft ausgesetzt ist, desto progressiver werden diese Veränderungen. Auch der Kontakt mit Synovialflüssigkeit reicht bereits nach kurzer Zeit nicht mehr aus, um das dehydrierte Knorpelgewebe zu reparieren. Die Schäden können Anomalitäten in Verschleiß und Schmierprozessen nach sich ziehen und so womöglich zu degenerativen Gelenkbedingungen führen (KIRK et al., 1993).

Auch HLAVACEK (1993 und 2000) geht davon aus, dass die Synovialflüssigkeit aus einer biphasischen Mischung zweier nicht miteinander mischbarer, unkomprimierbarer Flüssigkeiten besteht, der viskösen Newton'schen und der idealen Phase. Die ideale Phase setzt sich aus Wasser und allen Substanzen mit geringem Molekulargewicht zusammen. Bei Belastung des Gelenks kann nur diese Phase den Knorpel aufgrund des entstehenden Druckgradienten penetrieren, nicht jedoch die visköse Phase. Der Fluss der idealen Phase ist direkt nach Belastungsbeginn hoch, nimmt mit der Zeit ab und tendiert theoretisch auf Dauer zu

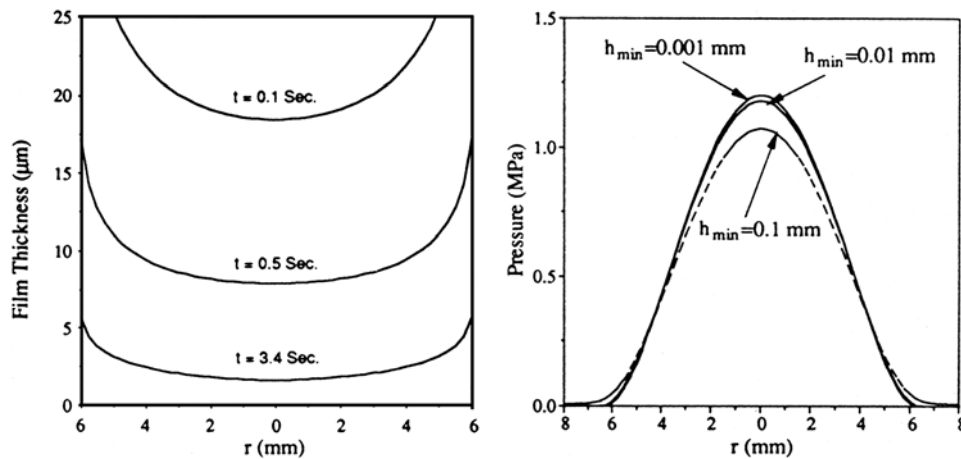
einem konstanten Fluss in der Knorpelmatrix. Auch der Seitwärtsfluss der Synovialflüssigkeit ist anfangs hoch, fällt dann jedoch schnell ab.

Die visköse Phase wird durch den Hyaluronsäure-Protein-Komplex gebildet, wobei die Viskosität der Synovialflüssigkeit eher von der Hyaluronsäure als vom Proteingehalt herrührt. Bei Zusammenbruch des Hyaluronsäuregehalts sinkt nämlich die Viskosität fast bis auf das Niveau von Wasser. Die Komplexe der viskösen Phase sind für eine Penetration in den Knorpel zu groß. Somit kommt es zur Konzentrierung im Synovialsalt und zum Viskositätsanstieg der Synovialflüssigkeit, die innerhalb einer halben Sekunde zu einem wenige Mikrometer dicken druckresistenten synovialen Gel umgewandelt wird. Zusätzlich kommt es aber auch zu einer Zunahme der Verbindungen benachbarter Makromoleküle miteinander und somit zu einer weiteren Erhöhung der Flüssigkeitsviskosität. Unabhängig von der Belastungsstärke gibt es jedoch eine maximale makromolekulare Konzentration für das synoviale Gel im Gleichgewicht (HLAVACEK, 1993 und 2000). Im Gelenk dient dieses stabile Gel als Grenzflächenschmiermittel für den Fall, dass auf statische Belastung eine gleitende Bewegung folgt, bevor die Schmierung durch den Flüssigkeitsfilm wiederhergestellt ist (HLAVACEK, 1993).

Bei Ende der Belastung wird der Druck in der Synovialflüssigkeit entfernt und nur der Druck an der Grenzfläche zwischen Synovialgel und Knorpel bleibt bestehen. Die ideale Flüssigkeit fließt aus dem Knorpel in den Gelenksalt zurück. Dieser Pumpeffekt ist auch bei pulsierender kontinuierlicher Belastung zu beobachten (HLAVACEK, 1993).

Eine weitere Theorie bezüglich der Gelenkschmierung lautet folgendermaßen:

Bei relativ tangentialer Bewegung zwischen den belasteten artikulierenden Gelenkflächen wird vor und unter der sich voranbewegenden Hälfte der Kontaktfläche Interstitialflüssigkeit aus dem Knorpel herausgepresst. Direkt unter und hinter der anderen Hälfte hingegen wird die Flüssigkeit durch den Knorpel infolge der elastischen Erholung des Gewebes wieder aufgenommen. Auf diese Weise kann Knorpel seine eigene Schmierfilmflüssigkeit durch Exsudation und Imbibition von Interstitialflüssigkeit bilden (MOW und MANSOUR, 1977).



Quetschfilm Profil bei  $t=0.1$ ,  $0.5$  und  $3.4$ s nach stufenförmiger Belastung. Der Film ist bemerkenswert uniform.

Druckverteilung entsprechend 3 minimalen Filmdicken  $h_{\min} = h(0,t) = 0.1$ ,  $0.01$  und  $0.001 \text{ mm}$ . Der Spitzendruck bleibt bei allen Filmdicken relativ gleich, da die Knorpeloberfläche deformiert wird.

**Abbildung 57:** Aus HOU et al. (1992).

HOU et al. (1992) beschreiben die Schmierung bei Gelenkbelastung als Quetschfilm-Schmierung (squeeze-film lubrication). Zu Belastungsbeginn entsteht aufgrund der Unkomprimierbarkeit des Flüssigkeitsfilms ein Druck in der belasteten Knorpelregion. Die dann stattfindende Deformation des Gelenkknorpels führt zu Vergrößerung der gewichttragenden Region sowie zur Verringerung der lateralen Fließgeschwindigkeit der Schmierflüssigkeit, wodurch die Schmierfilmzeit verlängert wird. Außerdem wird die Flüssigkeit im Gelenkspalt von der zentralen, stark druckbelasteten Region in den Knorpel gepresst. Der Schmierfilm hingegen gelangt in die weniger belastete Peripherie, wo gleichzeitig Flüssigkeit aus dem Knorpel in den Gelenkspalt fließt. Dieser natürliche Zirkulationsprozess dient auch dem Transport von Nährstoffen und Abfallprodukten (HOU et al., 1992). Die Schmierfilmdicke wird innerhalb einer Sekunde von einem relativ dicken Film ( $100 \text{ µm}$ ) auf eine Dicke von wenigen Mikron reduziert. Danach erfolgt die gegenseitige Annäherung der Gelenkflächen wesentlich langsamer (HOU et al., 1992).

## 6 Einfluss der Knorpeldeformation auf den Flüssigkeits- und Soluttransport

Mechanische Belastung des Gelenkknorpels induziert eine Deformation von Matrix und Chondrozyten verbunden mit Flüssigkeitsfluss, hydrostatischem Druckgradienten, Strömungspotentialen und anderen physikalisch-chemischen

Veränderungen, wie zum Beispiel von fixierter Ladungsdichte, osmotischem Druck und interstitieller Ionenkonzentration (inklusive pH-Wert) (GARCIA et al., 1996 und 2003; GUILAK et al., 1994; HALL et al., 1991 und 2003; KUETTNER, 1992; LAI et al., 1991; URBAN et al., 1993 und 1994; SÄÄMÄNEN et al., 1990; WONG et al., 1997). Die Deformation ist nicht nur für den Transport von Wasser und Soluten und damit für die Ernährung des Knorpels von entscheidender Bedeutung, sondern auch für seine Widerstandsfähigkeit gegenüber normaler mechanischer Belastung (BURSTEIN et al., 1993). Bei fehlender regelmäßiger Belastung zeigt der Gelenkknorpel daher Anzeichen von Degeneration (MOW et al., 1984).

Der Gelenkknorpel reagiert allerdings nicht vollkommen einheitlich auf die einwirkende Kompression, sondern zeigt zonale Unterschiede. Während die Dicke der Oberflächenzone durch Kompressionsbelastung bei Versuchen von WONG und CARTER (2003) mit Knorpelproben um über 50 % reduziert wurde, nahm die Dicke der Übergangszone nur um 10-20% ab und die der radiären Zone sogar nur um 0 bis 5%. Da WONG und CARTER (2003) die Druckbelastung von der Knorpeldickenveränderung ableiten, gelten diese genannten Werte somit auch für den Belastungsdruck. Es nehmen also nicht nur der kompressionsbedingte Flüssigkeitsaustritt und die daraus resultierende Knorpelverdichtung mit fortschreitender Knorpeltiefe ab, sondern auch die Druckbelastung selbst. Auf diese Weise minimiert das Knorpelgewebe die Druckbelastung des subchondralen Knochens. Ein Grund für den geringen bis vernachlässigbaren Flüssigkeitsfluss von der radiären Knorpelzone abwärts ist dessen Einschränkung durch den darunter liegenden flüssigkeitsundurchlässigen subchondralen Knochen und das benachbarte Knorpelgewebe, dessen Flüssigkeit ebenfalls unter Druck steht, und damit so gut wie kein Druckgradient vorhanden ist (WONG und CARTER, 2003).

Bei der Belastung des Knorpels kommt es zur Ladungsübertragung zwischen flüssiger und fester Phase und zum Druck auf die Interstitialflüssigkeit (COHEN et al., 1998). Da jedoch weder die solide Matrix noch die Interstitialflüssigkeit komprimierbar sind, muss die Deformation der Knorpeloberfläche mit dem Ausfluss von Interstitialflüssigkeit aus den belasteten Regionen zusammenhängen (HOU et al., 1992). Während Belastungszunahme fließt die Interstitialflüssigkeit sowohl tangential vom Belastungszentrum weg, als auch zur freien Gelenkfläche hin und durch sie

hindurch. Nach Entfernung der Belastung erfolgt der Fluss in entgegengesetzter Richtung (TORZILLI und MOW, 1976).

Menge und Rate der herausgepressten Flüssigkeit steigen mit zunehmendem angewandtem Druck. Eine Kompression des Knorpels um 35% seiner Dicke beispielsweise führt durch den Verlust von Interstitialflüssigkeit zur Abnahme des Knorpelfeuchtgewichts um 28% und somit zur Zunahme des festen Volumenanteils. Die Folge ist das Absinken der Diffusionsfähigkeit von Wasser um 19% (BURSTEIN et al., 1993).

Bei normaler physiologischer Belastung variiert die ausgepresste Flüssigkeit zwischen 20 und 60% des Gesamtgehaltes (TORZILLI und MOW, 1976). Die anfängliche Deformationsrate aufgrund des Flüssigkeitsausflusses beträgt etwa 2% der Gesamtknorpeldicke pro Minute. Daher ist während des normalen Gehzyklus, bei dem die Belastungsdauer weniger als eine Sekunde beträgt, die Deformation aufgrund des Flüssigkeitsflusses vernachlässigbar. Während verlängerter Kompression gesunden Knorpels beziehungsweise normaler intermittierender Bewegung degenerativen Knorpels hingegen wird der Flüssigkeitsfluss stark erhöht (TORZILLI und MOW, 1976).

Die Wechselwirkungen zwischen Deformation der Knorpelultrastruktur und Flüssigkeitsbewegung scheinen der kontrollierende Hauptfaktor für das Ausmaß der Knorpeldeformation zu sein (TORZILLI et al., 1983). Begrenzte Kompression führt zunächst zu schneller Flüssigkeitsexsudation und Knorpeldeformation, gefolgt von einer allmählichen Verringerung. Anfangs wird die Belastung nur durch den Kompressionsdruck der festen Matrix und die Reibung der Exsudationsflüssigkeit ausgeglichen. Bei zunehmender Kompression und Deformation kommt es jedoch zu einem matrixbedingten Druckanstieg (COHEN et al., 1998). Der ohnehin schon hohe Widerstand des Knorpelgewebes gegenüber dem Flüssigkeitsfluss steigt exponentiell mit zunehmender Kompression bis zu einem limitierenden Gleichgewicht, an dem sowohl Deformation, als auch der Flüssigkeitsfluss enden (ECKSTEIN et al., 2000; TORZILLI et al., 1983) und sich osmotischer Druck, eingeschlossenes Wasser und Kollagenspannung die Waage halten. Sobald die Verdichtung des Knorpels soweit fortgeschritten ist, dass der Flüssigkeitsfluss stoppt, muss eine weitere Knorpeldeformation aus der intrinsischen viskoelastischen Natur

der Matrix selbst resultieren, inklusive Veränderungen der Proteoglykankonformation und interner Wasserbewegung (TORZILLI et al., 1983).

Der verantwortliche Mechanismus für das Stoppen weiteren Flüssigkeitsflusses und weiterer Matrixkonsolidierung kann mehreren Faktoren zugeschrieben werden:

- osmotischen/elektromechanischen Effekten,
- zunehmendem Fließwiderstand,
- internem Einschluss von Interstitialflüssigkeit
- Verschluss der Gelenkoberfläche gegenüber Flüssigkeitstransport (TORZILLI et al., 1983).

Zu den elektromechanischen Effekten gehört die bei Knorpeldeformation zunehmende Abstoßungskraft der Proteoglykane durch das engere Zusammendrücken ihrer Seitenketten. Die erhöhte negative Ladungsdichte führt zu steigendem Widerstand gegenüber dem Flüssigkeitsfluss, bis ein Gleichgewicht zwischen Belastung und Schwellungsdruck erreicht ist (BUSCHMANN, 1992; BUSCHMANN und GRODZINSKY, 1995; KUETTNER, 1992; SZAFRANSKI et al., 2004). Dieser Prozess bestimmt nicht nur die mechanische Antwort des Knorpelgewebes auf Deformation, sondern auch dessen schmierende Eigenschaften und die Kapazität für den Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselabfallprodukten mit (TORZILLI et al., 1983).

Die Effekte der fixierten negativen Ladungen der Proteoglykane des Knorpels untersuchten auch SUN et al. (2004) und kamen zu folgenden Ergebnissen:

Ein geladenes Gewebe hält immer einer größeren Belastung stand als ein ungeladenes Gewebe mit vergleichbaren intrinsischen elastischen Moduli. Die Belastbarkeit beruht auf intrinsischer Matrixsteife, hydraulischem und osmotischem Druck.

Der Young's Modulus (das Verhältnis zwischen axialer Stauchung und axialem Gleichgewichtsdruck) ist immer größer, als der intrinsische Young's Modulus eines ungeladenen Gewebes. Dieser apparent Young's Modulus ist nämlich nicht nur vom intrinsischen Young's Modulus der soliden Matrix abhängig, sondern auch von der fixierten Ladungsdichte und der intrinsischen Poissonzahl.

Die Poissonzahl (das negative Verhältnis zwischen Querdehnung und axialer Stauchung) ist immer größer, als die intrinsische Poissonzahl der Matrix eines

unbelasteten Gewebes. Der Grund dafür liegt im Schwellungseffekt durch die fixierten Ladungen.

Der Verschluss der Gelenkoberfläche gegenüber dem Flüssigkeitsaustritt erfolgt auf folgende Weise: Zu Beginn der Knorpelbelastung wird aufgrund des plötzlichen Anstiegs des Flüssigkeitsdrucks die gesamte Interstitialflüssigkeit der obersten Knorpelschicht sofort über die Knorpeloberfläche in das Gelenk aus der Matrix herausgepresst (WONG und CARTER 2003). Der Grund dafür liegt zum einen im geringen Proteoglykangehalt dieser Knorpelschicht und dem damit nur relativ geringen Widerstand gegenüber der austretenden Flüssigkeit. Zum anderen sind die oberflächlichsten Knorpellagen auch in nicht komprimiertem Zustand permeabler als die tieferen (TORZILLI et al., 1983).

Dem raschen Austritt der Interstitialflüssigkeit aus der porösen Matrix wirken dann mehrere Faktoren entgegen: Innerhalb der ersten Sekunde der Belastung folgt der Zusammenbruch des kollagenen Gefüges. Zugleich kommt es zu einer plötzlichen Abnahme der Porosität der oberflächlichen Knorpelschicht aufgrund ihrer Verdichtung. Auf diese Weise wird dem Flüssigkeitsfluss aus den tieferen Schichten entgegengewirkt. Die Oberflächenschicht des Knorpels ist also wahrscheinlich für die Kontrolle des Flüssigkeitstransports und die mechanische Antwort des Gewebes verantwortlich (TORZILLI et al., 1983; WONG und CARTER, 2003).

## **7 Einfluss der Biomechanik auf den Knorpel**

Wie bereits erwähnt, gedeiht der Gelenkknorpel unter dem variierenden Druck und Zug der alltäglichen Gelenkbelastung. Er benötigt diese Belastung zu seiner Gesunderhaltung (COHEN et al., 1998), da der Knorpelstoffwechsel durch die mechanische Stimulierung positiv beeinflusst wird (GARCIA et al., 1996; SAH et al., 1990). Der Gelenkknorpel passt sich der Belastung an, so dass beispielsweise die belastungstragenden Knorpelareale gesunder Gelenke mechanisch belastbarer sind, da ihre Matrix dicker und die Proteoglykankonzentration höher ist als in Regionen desselben Gelenks, die keine Last tragen (MAC DONALD et al., 2002).

Die Toleranz des Knorpels gegenüber Immobilisierung ist wegen des engen Zusammenhangs zwischen biomechanischen Stimuli und zellulären Reaktionen nur sehr gering (TRIPPEL, 1990). So kommt es bei Ruhigstellung eines Gelenks zum Absinken von Proteoglykansynthese und -konzentration sowie des

Aggregationsgrades (BUCKWALTER, 1995; GARCIA et al., 2003; VANWANSEELE et al., 2002) und zum Anstieg des Wassergehalts (VANWANSEELE et al., 2002). Gemäßigte dynamische Knorpelbelastung hingegen führt zu einem Anstieg der Proteoglykane und kann den Syntheseabfall aufgrund der Immobilisierung wieder rückgängig machen (GARCIA et al., 1996). Auch bei geringer Bewegung erfolgt die Genesung des Knorpels nach Wiederbelastung deutlich schneller als nach totaler Immobilisierung (VANWANSEELE et al., 2002).

Zahlreiche Tierversuche ergaben auch, dass die Immobilisierung eines Gelenks zu Knorpeldegeneration führen kann (COHEN et al., 1998). Zum Beispiel führten Versuche bei Hunden mit immobilisierten Gelenken zur Abnahme der Knorpeldicke und zu Veränderungen von mechanischen Eigenschaften und Zusammensetzung des Knorpels. Der Proteoglykangehalt sinkt, während der Wassergehalt des Knorpels steigt. Die daraus höchstwahrscheinlich resultierende Verminderung der Knorpelsteife reduziert die Fähigkeit des Knorpels, normaler Belastung standhalten zu können. Durch Remobilisierung innerhalb einer bestimmten Zeit kann der Knorpel seine ursprüngliche Zusammensetzung und Funktion wieder erreichen. Bei längerer Immobilisierung hingegen sind die Veränderungen irreversibel (COHEN et al., 1998). Auch Versuche von JAHN und SCHRAMM (1984) an Ratten ergaben Unterschiede in GAG-Gehalt und Knorpeldichte in Abhängigkeit von der Belastungsintensität. Bei drei Gruppen von Ratten gleichen Alters und gleicher Geschlechtsverteilung erfolgte bei sonst identischen Lebensbedingungen eine abgestufte Laufbelastung. Gruppe I nutzte das Laufrad oft, Gruppe II bestand aus Tieren mit frakturiertem rechtem Unterschenkel und Gruppe III lebte in Gitterschalen mit verringerter Bewegungsmöglichkeit. Die Untersuchungen von Hüftkopf und Kniegelenken nach vier Wochen Versuchsdauer ergaben sowohl einen höheren GAG-Gehalt in Gruppe I, als auch eine vom Druck abhängige Verteilung der GAGs. Im Bereich der Zugbelastung durch das Ligamentum capitis femoris des Kniegelenks waren keine GAGs zu finden, während sie in der Hauptbelastungszone vermehrt anzutreffen waren. Außerdem war die Knorpelbedeckung der Tibia bei Tieren der Gruppe I besonders stark. Die Knorpeldicke überstieg hier deutlich die der Femurkondylen, während bei den Ratten mit reduzierter Bewegungsmöglichkeit kein bzw. nur ein geringer Unterschied der Knorpeldicke festzustellen war.

In einem Versuch von SAH et al. (1989) wurden Gelenkknorpelscheiben bestimmter dynamischer Belastung ausgesetzt. Bei einer regelmäßig wiederkehrenden

Belastung von nur 1-5% kam es zum Anstieg von GAG-Synthese und Aminosäureaufnahme um 20-40%, wobei eine Abhängigkeit von der Belastungsfrequenz festzustellen war und im Bereich zwischen 0,01-1 Hz stattfand. Bei niedrigeren Frequenzen war kein Anstieg zu beobachten und die Flüssigkeit wurde hier lediglich aus dem Knorpel herausgepresst. Bei höheren Frequenzen erhöhte die Belastung jedoch den hydrostatischen Druck innerhalb der Knorpelscheiben (POOLE et al., 1984).

Die Kräfte, die durch ein synoviales Gelenk übertragen werden, variieren zwischen fast null und mehr als dem 3-fachen Körpergewicht während normaler Artikulation. Laut TORZILLI und MOW (1976) kann die Belastung zum Beispiel des Femurkopfes sogar das 6-fache des Körpergewicht betragen. Der Grund dafür liegt in der gesamtanatomischen Form und der Muskelkontraktion während Gewichtsbelastung und Bewegungsdynamik (TORZILLI und MOW, 1976). Messungen von MUIR (1995) ergaben, dass der Druck innerhalb des Gelenkknorpels im unbelasteten Zustand 10-20 kPa, im Stand 1-2 MPa und beim Gehen 0,4-0,5 MPa beträgt.

## **7.1 Einfluss der Biomechanik auf die Chondrozyten**

Die normale metabolische Aktivität der Knorpelzellen wird sowohl durch genetische und Umweltfaktoren, wie zum Beispiel lösliche Mediatoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren) und Matrixzusammensetzung, als auch durch mechanische Faktoren im Rahmen der funktionellen Gelenkbelastung reguliert (GUILAK et al., 1994). Als Antwort auf mechanische Belastung des Knorpelgewebes werden Gentranskription (BLAIN et al., 2003; FEHRENBACHER et al., 2003), Zellsignalisierung und Biosynthese der Chondrozyten entsprechend verändert (JIN et al., 2001; LI et al., 2003). Bei der Biosynthese sind mehrere Schritte, einschließlich Transkription, Translation und posttranslationale Vorgänge, betroffen sowie viele Organellen und Zytoskelettstrukturen (SZAFRANSKI et al., 2004).

Im Allgemeinen ruft mechanische Belastung des Gelenkknorpels eine sofortige und über mehrere Stunden anhaltende Aktivierung der Chondrozyten hervor (MUIR, 1995). Die Antwort der Chondrozyten auf physikalische Kräfte erfolgt dabei schnell. Da die Synthese großer Proteoglykane im Durchschnitt 70-90 Minuten dauert, wobei die letzten 10-15 Minuten für Glykosylierung, Sulfatierung und Sekretion in den Extrazellulärraum benötigt werden, ist die kompressionsbedingte Stimulierung der Proteoglykansynthese wahrscheinlich nicht auf eine de novo Synthese des

Kernproteins zurückzuführen (PARKKINEN et al., 1992). Sie beruht vielmehr auf einer Zunahme von Anzahl, Länge oder Sulfatierung der GAG-Ketten (SZAFRANSKI et al., 2004), auf der beschleunigten Glykosylierung oder Sulfatierung des Kernproteins sowie auf einer Beschleunigung posttranslationaler Prozesse (PARKKINEN et al., 1992). Allerdings besteht auch ein Zusammenhang zwischen Belastungsart und deren Wirkung auf den Knorpelstoffwechsel. So führt statische Belastung, sowie dynamische Belastung mit einer Frequenz von weniger als 0,001 Hz zur Hemmung der PG-Biosynthese (MAUCK et al., 2003) (Genauerer s. 7.2 Auswirkungen unterschiedlicher Kompression auf den Knorpelstoffwechsel).

Aus Tierversuchen und klinischen Studien geht hervor, dass Immobilisierung oder reduzierte dynamische Belastung eines Gelenks zum Absinken von Synthese und Gesamtgehalt der Proteoglykane im Knorpel führen (GARCIA et al., 2003). SÄÄMÄNEN et al. (1989) zum Beispiel testeten den Einfluss von Bewegung auf die Chondrozytenaktivität bei Hunden in vivo. Junge Beagles liefen dazu 15 Wochen lang jeweils fünf Tage pro Woche eine Stunde mit einer Geschwindigkeit von 4 km/h. Ihr Kniegelenkknorpel wurde dann mit dem gleichaltriger, im Käfig gehaltener Beagles verglichen. An der Kontaktseite des Knorpels war ein Anstieg des Gesamtproteoglykangehalts um 23-48%, des Chondroitin-6-Sulfat-Gehalts um 15-59% und des Verhältnisses von Chondroitin-6-Sulfat zu Chondroitin-4-Sulfat um 14-40% zu verzeichnen. An den kontaktlosen Stellen hingegen sank das Verhältnis oder blieb unverändert. Der Anstieg des Gesamtproteoglykangehalts betraf jedoch nicht den Gehalt aggregierter Proteoglykane, da die Proteoglykane keine Aggregate mit Hyaluronsäure bildeten. Im Gegensatz zu den Proteoglykanen blieben sowohl die Kollagene als auch die Hyaluronsäure durch die Bewegung unbeeinflusst (SÄÄMÄNEN et al., 1989). Obwohl die Kollagene scheinbar relativ resistent gegenüber reduzierter Gelenkbelastung sind und keine Veränderungen bezüglich ihrer Konzentration festzustellen ist, reduziert sich ihre Anzahl an Kollagen-Querverbindungen bei Immobilisierung. Bei Remobilisierung erfolgt jedoch wieder eine Herstellung des ursprünglichen Zustands (VANWANSEEELE et al., 2002).

Sämtliche aus der Knorpelkompression resultierenden mechanischen, physiochemischen und elektrischen Effekte, einschließlich Deformation und Volumenänderung der Chondrozyten, dienen den Knorpelzellen als Signale für die

Regulierung ihrer biosynthetischen Aktivität (HALL et al., 1991 und 2003; GARCIA et al., 1996 und 2003; GUILAK und MOW, 1992; GUILAK und BACHRACH, 1993; GUILAK et al., 1994; LAI et al., 1991; URBAN et al., 1993 und 1994; WILKINS und HALL, 1995; WONG et al., 1997). Da die Intensität der Antwort der Chondrozyten auf dynamische und statische Kompression in Zellkulturen im Laufe der Zeit und damit auch mit zunehmender Matrixentwicklung ansteigt, wird auch der extrazellulären Matrix eine fundamentale Rolle in der Signalübermittlung zugeschrieben (BUSCHMANN et al., 1995). Die Zelle reagiert auf eine Menge einwirkender Signale und leitet die Informationen sowohl von der Zellmembran in Richtung Zellkern als auch umgekehrt weiter (WONG und CARTER, 2003).

Der bei Knorpelkompression hervorgerufene Flüssigkeitsfluss bewirkt eine Komprimierung der stark geladenen Aggrekan-reichen extrazellulären Matrix. Auf diese Weise kommt es zum Anstieg der fixierten Ladungsdichte der Matrix und somit auch des lokalen Donnan'schen osmotischen Drucks der komprimierten Knorpelregion. Die dort lokalisierten Knorpelzellen werden also von einer hypertonen Matrix umgeben und können daher intrazelluläres Wasser in die Matrix abgeben (BUSH und HALL, 2001). Der endgültige Gleichgewichtszustand zwischen extrazellulärer Matrix und Zellen spiegelt das Gleichgewicht zwischen lokalen mechanischen und osmotischen Kräften wieder. Dasselbe gilt für die kompressionsbedingten Veränderungen der intrazellulären Organellenmorphologie. Die Kompression des Knorpels verursacht nämlich nicht nur eine zueinander im Verhältnis stehende Volumenreduktion von extrazellulärer Matrix und Chondrozyten, sondern auch von deren intrazellulären Strukturen wie Zellkern, rER und Mitochondrien. Der Volumenverlust dieser Zellorganellen sowie der Zelle selbst findet dabei in gleichen Proportionen statt und erfolgt durch den Verlust von Wasser durch die permeable Zellmembran (SZAFRANSKI et al., 2004).

Wahrscheinlich wird der Transfer der Deformation vom Knorpelgewebe auf die Zellorganellen durch mechanische und osmotische Gradienten geregelt, die zueinander im Gleichgewicht stehen. Dabei scheinen die osmotischen Wechselwirkungen hauptsächlich für die Volumenänderungen der Organellen zuständig zu sein, während ihre Formveränderungen durch strukturelle Faktoren, wie zum Beispiel das Zytoskelett, vermittelt werden (SZAFRANSKI et al., 2004).

Während die Deformation des Zellkerns solche Prozesse wie Genaktivierung und Transkription verändert, bewirkt die Verformung der anderen Zellorganellen eine

Veränderung des nachfolgenden Zellstoffwechsels. Veränderungen in Volumen und Morphologie des rERs beispielsweise beeinflussen möglicherweise die Verfügbarkeit von Ribosomen für mRNA und tRNA sowie den Transport von Nuklein- und Aminosäuren zu den Orten der Translation (SZAFRANSKI et al., 2004).

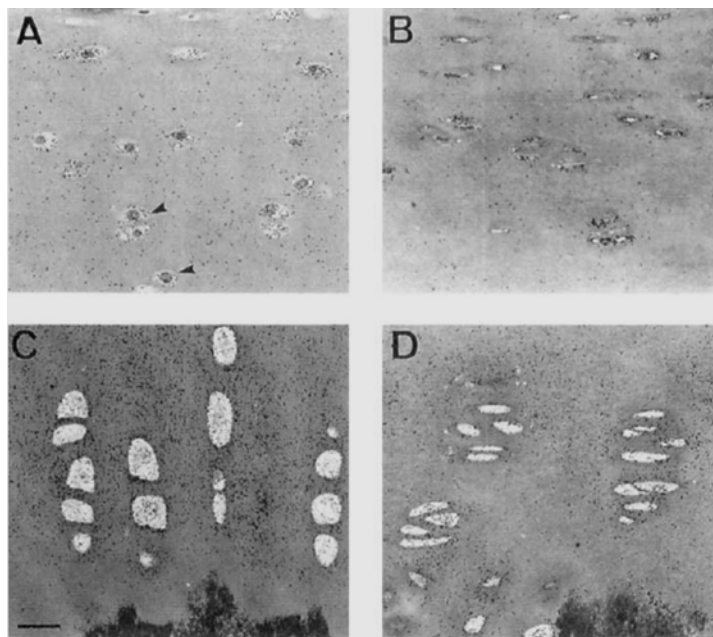
Der Golgi-Apparat hingegen verliert kein Wasser innerhalb seiner Hohlräume und behält daher im Unterschied zu den anderen Zellorganellen sein Volumen bei. Dasselbe gilt für intrazelluläres Fett und Glykogen, welches die Hauptform des zellulären Energiespeichers darstellt. Der Grund dafür, dass der Golgi-Apparat bei Knorpelkompression sein Volumen beibehält, liegt wahrscheinlich in seiner hohen Ladungsdichte. Diese erhält er durch die in ihm befindlichen GAGs, die im Rahmen der Proteoglykansynthese in ihm glykosyliert und sulfatiert werden. Auf diese Weise steigt der Donnan'sche osmotische Druck innerhalb des Golgi-Apparates und hält somit das Wasser in ihm zurück, selbst wenn die Zelle aufgrund von Knorpelkompression Wasser an das umliegende Gewebe abgibt (SZAFRANSKI et al., 2004).

Die Reaktion von Chondrozyten auf Veränderungen des interstitiellen osmotischen Drucks in situ testeten ERRINGTON et al. (1997) an Gewebescheiben verschiedener Tiergelenke. Durch unterschiedlich osmolare Lösungen kam es zu Änderungen des Chondrozytenvolumens. Abnehmender osmotischer Druck führte zu schneller Zellanschwellung, während in hypertonischer Lösung alle Chondrozyten schnell auf genau koordinierte Weise auf ihr ursprüngliches Volumen zurückschrumpften. Dies erfolgt anscheinend, wie in anderen Zellen auch, durch die Aktivität des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporters (ERRINGTON et al., 1997). Das Zellvolumen stieg im ersten Versuch um durchschnittlich  $20 \pm 9\%$  bzw. schrumpfte im zweiten um  $29 \pm 10\%$ . Die entsprechende durchschnittliche Erholungsrate betrug  $4,1 \pm 1,8\%/min$  für ein mittleres relatives Volumen von  $94,6 \pm 11\%$  (ERRINGTON et al., 1997). Veränderungen des Zellvolumens können beispielsweise den Transport innerhalb der Zelle beeinflussen (z. B. zwischen ER und Golgi-Apparat oder zwischen Golgi-Apparat und extrazellulärer Matrix) (SZAFRANSKI et al., 2004).

Dass neben dem Zellvolumen aber auch die Veränderung der Zellform bei mechanischer Knorpelbelastung einen wichtigen Mechanotransducer darstellt, ist in reinen Zellkulturen zu beobachten. In Gelen oder Kulturen mit hoher Zelldichte haben Knorpelzellen eine runde Form und synthetisieren hauptsächlich Typ-II-Kollagene

sowie knorpelspezifische Proteoglykane. Bei Kultivierung in Monolayern hingegen sind sie flach und beginnen Typ-I-Kollagene zu synthetisieren (WONG et al., 1996). Bei dieser matrixunabhängigen zellulären Deformation kommen verschiedene Mechanismen (BEN-ZEÉV, 1991; WATSON, 1991), wie zum Beispiel dehnungsaktivierte Ionenkanäle (SACHS, 1991) und die durch das Zytoskelett ausgelöste Deformation intrazellulärer Organellen, in Frage (INGBER, 1992).

Im Unterschied zur Zellkultur ist im Knorpelgewebe die extrazelluläre Matrix an der Deformation der Chondrozyten mitbeteiligt. Da sie deutlich steifer als die Chondrozyten ist, kann sie die Zellen leicht deformieren (SZAFRANSKI et al., 2004). Der Zellkern ist jedoch 3-4 mal steifer als das Zytoplasma der Knorpelzellen. Daher ist der Mechanismus der Formveränderung des Nukleus noch nicht eindeutig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass das Zytoskelett, und hierbei besonders das Aktin, eventuell aber auch die Mikrotubuli, eine Rolle spielt (GUILAK et al., 2000).



**Abbildung 58:** Autoradiographie einer unbelasteten Probe (A und C) und einer 52% komprimierten (B und D) Probe zeigt die Oberflächenzone/Übergangszonen (A und B) und die untere radiäre Zone (C und D). Die Kompression ist assoziiert mit einer deutlichen Reduktion der Körneranzahl. Pfeile bezeichnen die runde Form unbelasteter Chondrozyten. Balken = 20 µm. Aus WONG et al. (1997).

Bei Knorpelkompression breiten sich die Chondrozyten der Oberflächenschicht zwischen den tangential angeordneten Kollagenfasern lateral aus, wodurch ihre für diese Zone abgeflachte Form verstärkt wird. Ihre in die perizelluläre Matrix ragenden Zellfortsätze flachen ebenso ab wie die perizellulär gelegenen Matrixvesikel (POOLE et al., 1984). Die typisch kugelförmigen Chondrozyten der mittleren Knorpelschichten

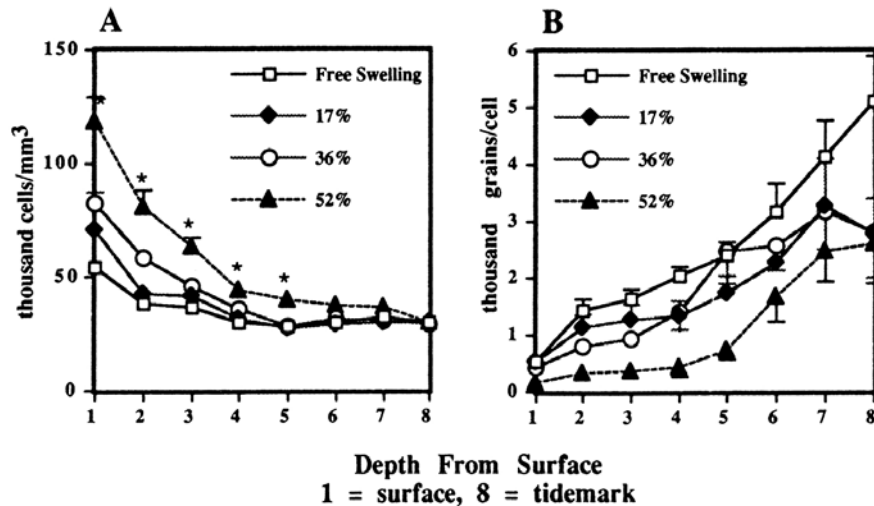
werden einschließlich ihrer perizellulären Matrix und Kapsel vertikal komprimiert und breiten sich ebenfalls nach lateral aus. In der tiefen Schicht werden die Chondrozyten und –säulen ebenfalls vertikal zusammengedrückt und etwas lateral deformiert, was oft eine Verschiebung und Verzerrung von Chondrozyt und Kapsel zur Folge hat (POOLE et al., 1984). Allerdings führt die laterale Deformation des Chondrons hier nur zu geringen Veränderungen im Bereich der perizellulären Kapsel. Durch das reduzierte Chondronvolumen kann es aber zu hydrostatischen Wechselwirkungen zwischen der unelastischen Kapsel und den hydrierten Proteoglykanen der perizellulären Matrix kommen. Dies führt neben der Mikrozirkulation des Wassers in der Matrix auch zum Herauspressen von Matrixvesikeln aus den Poren und Kanälen der Kapsel (POOLE et al., 1988). Die entstehenden Strömungen haben genug Kraft, um Matrixvesikel an ihren von der Zelle entfernt liegenden Wirkungsort zu befördern (POOLE et al., 1987).

Die Kompression des Knorpels scheint auf die Häufigkeit der Kanäle keinen Einfluss zu haben. Die feinen, die perizellulären Kanäle umgebenden Fibrillen werden jedoch unter Belastung begradigt, wodurch die Kanäle geöffnet werden. Bei Kompression kommt es daher sofort zur Ansammlung kleiner Gruppen elektronendichter Matrixvesikel außerhalb der perizellulären Kanäle. Neben den Matrixvesikeln werden auch Flüssigkeit und Partikel durch die Kanäle von der perizellulären in die territoriale Matrix gepresst. Die hierzu eigentlich nötigen Druckgradienten zwischen den heterogenen Teilen der Matrix konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden, obwohl Ultrastruktur und Morphologie des Knorpels darauf hindeuten (POOLE et al., 1984).

Zonale Unterschiede der Chondrozytenaktivität bei mechanischer Belastung:

Aufgrund seiner strukturellen und biochemischen zonalen Unterschiede (biochemischer Gehalt, Wassergehalt, Zellmorphologie, Gefüge der Ultrastruktur) (HUNZIKER et al., 1996) zeigt der Gelenkknorpel auch unter mechanischer Belastung zonenspezifische Veränderungen in seiner biosynthetischen Aktivität (GUILAK et al., 1994; KORVER et al., 1992).

Diese zonalen Veränderungen korrelieren mit den Änderungen von Zelldichte und axialer Knorpelbelastung, was darauf hindeutet, dass die Belastung und der damit verbundene Flüssigkeitsverlust aus der Matrix wichtig für die Regulierung des Zellstoffwechsels während statischer Kompression ist (WONG et al., 1997).



**Abbildung 59:** Räumliche Profile von Zelldichte (Zellen/ $\text{mm}^3$ )(A) und Biosynthese pro Zelle (Körner/Zelle) (B) im Zentrum von Knorpelscheiben adulten bovinen Humerusknorpels. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt von 8 Knorpelproben aus verschiedenen Knorpeltiefen  $\pm$  SE. Alle Proben wurden bei freier Schwellung, 17, 36 und 52% Kompression getestet. Aus WONG et al. (1997).

Im Unterschied zum Gelenkknorpel adulter Tiere korrelieren bei Untersuchungen mit Gelenkknorpeln von 4 bis 5 Monate alten Rindern die zonalen Unterschiede in Zusammensetzung und Biosyntheserate des unbelasteten Knorpels nicht mit dem Suppressionsmuster der Proteoglykansyntheserate im belasteten Knorpelgewebe. Außerdem bleibt unter statischer Kompression die mechanische Umgebung der Zellen in den verschiedenen Zonen anscheinend relativ unverändert (GUILAK et al., 1994). Diese Unterschiede zwischen reifem und juvenilem Gelenkknorpel beruhen wahrscheinlich auf der größeren Heterogenität des reifen Knorpels oder seiner Chondrozyten (GUILAK et al., 1994; JADIN et al., 2005).

In Studien am Gelenkknorpel adulter Tiere zeigt sich hingegen, dass die Reaktion der Chondrozyten auf Kompression in den mittleren Knorpelzonen, in denen auch die fixierte Ladungsdichte am höchsten ist, deutlich stärker ausfällt als in den übrigen Zonen (SAH et al., 1991). Bei regelmäßiger physikalischer Belastung ist auch besonders in den Chondrozyten der mittleren und tiefen Knorpelzone eine Zunahme sowohl des rER (WONG und CARTER, 2003), als auch eine Verdopplung des Zellvolumens im Vergleich zu den Zellen weniger belasteter Regionen festzustellen. Dieser Volumenanstieg beruht hauptsächlich auf einer Zunahme von intermediären Filamenten und Glykogenpartikeln (EGGLI et al., 1988). Außerdem reagieren die Chondrozyten der mittleren Knorpelzone auch besonders sensitiv auf Wasserverlust und zeigen während statischer Kompression die größte Reduzierung der

Sulfatinkorporation und damit der Proteoglykansynthese (SCHNEIDERMAN et al., 1986).

## **7.2 Auswirkungen unterschiedlicher Kompression auf den Knorpelstoffwechsel**

Die Deformation des Gelenkknorpels ist ein sehr komplexer Vorgang, der durch mehrere Faktoren beeinflusst wird, zu denen unter anderem auch die Art der Kompression gehört. So ist der Einfluss der Knorpelbelastung auf die Biosynthese unter anderem abhängig von Stärke, Dauer (bei konstanter Belastung) (BRAMA et al., 2000c; SAH et al., 1991) bzw. Frequenz der Belastung (bei intermittierender Belastung) (SAH et al., 1991) sowie von der durch sie hervorgerufenen Deformation (LEE et al., 1995). Generell nimmt die Synthese von Proteoglykanen und Proteinen bei statischer Kompression ab, während sie bei dynamischer Belastung zunimmt (JIN et al., 2001; KORVER et al., 1992; KURZ et al., 2001; MURATA et al., 2003; PARKKINEN et al., 1992; SAH et al., 1989). Die Stimulation bei dynamischer Kompression ist wiederum abhängig von deren Frequenz, Amplitude und Wellenform (SAH et al., 1989; HALL et al., 1991) und ist in den belasteten Knorpelregionen am stärksten ausgeprägt (PARKKINEN et al., 1992).

Da der Metabolismus bestimmter Matrixkomponenten durch die Art des angewandten mechanischen Drucks unterschiedlich beeinflusst wird, können die Chondrozyten eine extrazelluläre Matrix bilden, die mit den physiologischen Bedürfnissen des Körpers übereinstimmt (STEINMEYER und ACKERMANN, 1999). In Versuchen an Proben bovinen Femurknorpels erfolgt eine optimale Stimulierung der Matrixsynthese bei einer intermittierenden Kompression von etwa 15%, gemessen anhand der lastbedingten Veränderung der Knorpelhöhe. Inadäquate Zelldeformation über einen längeren Zeitraum hingegen kann zu einer Reduzierung der Matrixsynthese führen (GLASER, 1998).

Die verschiedenen Knorpelareale eines Gelenkknorpels sind unterschiedlichen Belastungstypen ausgesetzt, wie zum Beispiel geringerer konstanter Belastung durch das Körpergewicht, intermittierender Belastung während der Bewegung und sehr starker plötzlicher Belastung bei heftigen Bewegungen oder Leistungssport. Um auf diese unterschiedlichen Herausforderungen angemessen reagieren zu können, besteht der Gelenkknorpel aus biochemisch heterogenen Gebieten (BRAMA et al.,

2000a und 2002). So haben Regionen, die intermittierenden hohen Belastungen ausgesetzt werden, einen höheren Kollagen-, Wasser- und Hydroxylsilylpyridinolin-(HP-)Querverbindungsgehalt sowie einen geringeren GAG-Gehalt. Konstant belastete Gelenkregionen hingegen, wie zum Beispiel die zentrale Gelenkflächenregion der Phalanx proximalis beim Pferd, weisen den höchsten GAG-Gehalt auf und sind damit auch elastischer (BRAMA et al., 2000a und 2001). Außerdem ist der Zellgehalt gewichtstragender Regionen geringer (JADIN et al., 2005).

Die biochemische Heterogenität des Gelenkknorpels bezüglich Proteoglykan- und Kollagengehalt sowie posttranslationaler Modifikationen des Kollagennetzes, wie zum Beispiel Querverbindungen, besteht jedoch noch nicht zum Zeitpunkt der Geburt, sondern entwickelt sich erst in den ersten Lebensmonaten im Rahmen der folgenden Gewichtsbelastung und Artikulation (BRAMA et al., 2000b und c). So konnte beispielsweise im Gelenkknorpel neugeborener Lämmer im Gegensatz zum reifen Gelenkknorpel keine Heterogenität von Proteoglykanen oder Chondrozytenstoffwechsel festgestellt werden (LITTLE und GHOSH, 1997).

Den Einfluss unterschiedlich starker Belastungen auf die Entstehung der biochemisch heterogenen Knorpelareale untersuchten auch BRAMA et al. (2002) an 5 und 11 Monate alten Fohlen, die unterschiedlich starker Belastung ausgesetzt wurden. 14 Fohlen wurden dazu bis zum Alter von 5 Monaten in einer 3 x 3,5 m großen Box gehalten. 14 andere Fohlen wurden ebenfalls in solchen Boxen gehalten, aber täglich einem Galopp-Sprinttraining mit steigender Anzahl von Sprints (bis maximal 32) unterzogen. Die letzte Gruppe bestand aus 15 Fohlen mit ganztägigem Weidegang und freier Bewegung. Nach den 5 Monaten wurden aus jeder Gruppe 8 Fohlen euthanasiert und die restlichen zusammen in einem Stall mit Paddockboxen gehalten und alle gleicher moderater Bewegung ausgesetzt.

Sowohl Wassergehalt als auch Kollagenquerverbindungen zeigten bei den 11 Monate alten Fohlen noch keine biochemische Heterogenität des Knorpels und unterschieden sich auch nicht zwischen den verschieden belasteten Gruppen. GAG, DNS, Kollagen und Hydroxylysin hingegen zeigten bereits mit 5 Monaten deutliche lokale Unterschiede. Diese traten bezüglich GAGs und DNS unabhängig der Belastungsstärke auf, während sie bezüglich Kollagenen und Hydroxylysin bei den 5 Monate alten Fohlen mit extrem geringer Bewegung fehlten und auch nach einer folgenden 6-monatigen moderaten Bewegung nicht beobachtet werden konnte. Eine Kompensierung fehlender funktionaler Anpassung scheint bei Hydroxylysin und den

Kollagenen mit ihrem langsamen und wenig aktiven Stoffwechsel zumindest innerhalb eines Zeitraums von 6 Monaten also nicht möglich zu sein (BRAMA et al., 2002).

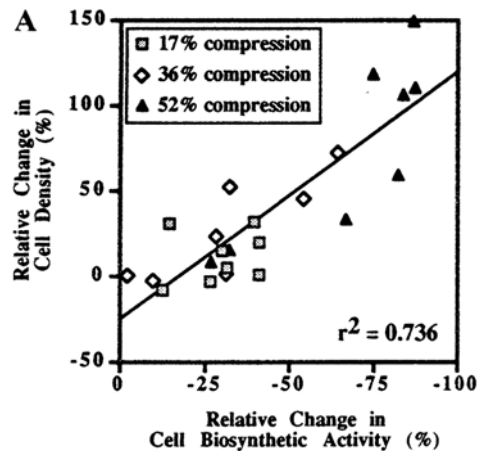
Der Versuch zeigt auch, dass bereits 5 Monate ausreichen um die lokalen Unterschiede der biochemischen Parameter zu induzieren, da im Vergleich zu den Gelenkknorpeln der 11 Monate alten Fohlen keine Unterschiede festzustellen waren. Es wird aber auch deutlich, dass eine vollständige Kompensation nach extrem geringer Bewegung kaum mehr möglich ist (BRAMA et al., 2002).

Untersuchungen an trainierten und untrainierten 2-jährigen Vollblütern zeigen, dass die spezifischen lokalen Unterschiede der Kollagene bei den stark trainierten Pferden im Gegensatz zu den anderen fehlen. Außerdem ist bei ihnen eine Erhöhung des Wassergehalts und eine Verringerung der HP-Querverbindungen festzustellen. Dies führt zu Mikroschäden und Lockerung des kollagenen Netzwerks, da kovalente Querverbindungen, wie die HP-Verbindungen, stabile Brücken zwischen den verschiedenen Kollagenfasern ausbilden. Eine Zunahme dieser Querverbindungen, die postnatal während der Reifung stattfindet, erhöht die Stärke und Widerstandsfähigkeit des Knorpelgewebes gegenüber starker Belastung. Bei Ruptur der Querverbindungen hingegen kommt es zu Schädigung des Kollagennetzes, Verlust der inneren Gewebespannung und erhöhter Empfindlichkeit gegenüber weiterer Schädigung (BRAMA et al., 2000b und c).

### **7.2.1 Statische Kompression**

Statische Belastung führt im Gegensatz zu dynamisch kompressiver Belastung zu einem allgemeinen dosisabhängigen Absinken der biosynthetischen Aktivität (SAH et al., 1989; WONG et al., 1997). So ist in den Knorpelregionen mit der größten statischen Belastung auch die Hemmung der biosynthetischen Aktivität am höchsten (WONG et al., 1997). Dabei erweist sich die Proteinsynthese im Vergleich zur Proteoglykansynthese als sensitiver (SAH et al., 1989). Bei starker statischer Knorpelkompression sinken daher die perizellulär lokalisierten sulfathaltigen Körnchen nicht so stark ab wie die in der Matrix lokalisierten prolinhaltigen Körnchen. Erstere gelten als Maß für die Proteoglykansynthese, während die prolinhaltigen Körnchen als Maß für die Proteinsynthese gelten. Durch die Kompression des Knorpels scheint daher zusätzlich zur allgemeinen Hemmung der Proteinbiosynthese auch deren Sekretion in die extrazelluläre Matrix sowie ihre Synthese aus Vorstufen

verändert zu werden (WONG et al., 1997). Die Synthese der Bindungsproteine hingegen wird weniger stark beeinflusst als die der Proteoglykane (KIM et al., 1996).



**Abbildung 60:** Korrelation zwischen prozentualer Änderung der Zelldichte im Verhältnis zur prozentualen Änderung der Biosynthese pro Zelle (Körner/Zelle) bei statischer Kompression an 8 verschiedenen Stellen und bei 3 verschiedenen Kompressionsstärken. Aus WONG et al. (1997).

Bei statischer Kompression des Knorpelvolumens um 17% und 36% wird die biosynthetische Aktivität leicht, bei Kompression um 52% stark gehemmt (WONG et al., 1997). GUILAK et al. (1994) stellten fest, dass bei statischer Kompression mit Belastungen geringer als 0,057 MPa im Vergleich zu unbelasteten Knorpelproben kein Unterschied in der Proteoglykansyntheserate festzustellen ist. Bei 0,057, 0,1 und 0,5 MPa hingegen reduziert sich die Syntheserate auf fast 60% des Wertes der Kontrollproben und bei 1,0 MPa sogar auf bis zu 20% der Kontrollen (GUILAK et al., 1994).

KIM et al. (1996) fanden heraus, dass statische Kompression über Veränderung spezifischer posttranslationaler Modifikationen bei Aggrekanen zu einer Abnahme der GAG-Kettenzahl pro Kernprotein führt sowie zu einer Zunahme des CS-Kettenlänge (KIM et al., 1994; LAMMI et al., 1994).

Ein kontinuierlicher Druck von 2,9 MPa reduziert in Knorpelproben von Kälbern und Menschen jedoch nicht nur die Synthese der Proteoglykane um etwa die Hälfte, sondern auch deren Abbau. Ein Druckanstieg auf ca. 1,0 MPa führt zu einer proportionalen Abnahme des Proteoglykanabbaus, wobei die Antwort des Knorpelgewebes auf die Belastung dabei schnell erfolgt (JONES et al., 1982). Da statische Kompression sowohl zu einer Abnahme der Gewebehydratation als auch zu einer Verkleinerung der effektiven Matrixporengröße führt (SAH et al., 1989), liegt die Reduktion des Abbaus wahrscheinlich teilweise an der Retention der

Abbauprodukte in der Matrix sowie an der reduzierten Syntheserate aufgrund der niedrigeren Diffusionsrate in den Knorpel hinein. Außerdem ist mit einer kompressionsbedingten Herabsetzung der Oberflächendurchlässigkeit für Diffusion zu rechnen (JONES et al., 1982; MAUCK et al., 2003a).

Als weitere Möglichkeit für die Reduktion des Proteoglykanabbaus kommt eine indirekte Beeinflussung der Metalloproteinasen durch Kompression in Frage. So könnte eine Kompression mittlerer Belastungsstärke eine Reduzierung von Synthese oder Aktivierung der Metalloproteinasen durch die Zellen bewirken. Bei höheren Belastungen (1,0 MPa) hingegen kommt es wahrscheinlich zu einer Schädigung der Zellen und somit zur Freisetzung der Proteinasen in die Matrix. Obwohl der Proteoglykanabbau bei 1,0 MPa eingeschränkt ist, wird diese Tatsache möglicherweise durch erhöhte Freisetzung der Proteasen aus den zerstörten Zellen verdeckt (GUILAK et al., 1994).

Als mögliche Mechanismen, die an der Umformung statischer Kompression in von Chondrozyten wahrnehmbare Signale beteiligt sind, kommen in Frage:

- Zelldeformation
- Wechselwirkungen zwischen Chondrozyten und Matrix (mechanische und/oder Rezeptor-medierte) (BUSCHMANN et al., 1995; BUSCHMANN et al., 1996; GUILAK et al., 1995)
- extrazelluläre physikalisch-chemische Effekte
- Hemmung des Transports von Nährstoffen aufgrund der kompressionsbedingt geringeren Matrixporengröße (BUSCHMANN et al., 1995) und
- Veränderungen des Wassergehaltes und die damit verbundenen Auswirkungen auf perizellulären pH-Wert, Ionenkonzentration, osmotischen Druck, Proteoglykangehalt, sowie fixierte Ladungsdichte (BOUSTANY et al., 1995, URBAN et al., 1993; URBAN, 1994).

Die Hemmung der Biosynthese von Proteoglykanen und Proteinen durch statische Kompression hängt *in vitro* stark vom Tag der Kultur und damit von ihrem Matrixgehalt ab. Zu Beginn der Zellkultur, also bei fehlender Matrix, ist - wenn überhaupt - nur eine gering veränderte Antwort auf Kompression feststellbar. Mit zunehmender Matrixentwicklung nimmt die Hemmung der Biosynthese zu (BUSCHMANN et al., 1995). Da die Antwort der Chondrozyten auf statische Kompression also deutlich durch die An- oder Abwesenheit der Matrix beeinflusst wird, scheint die matrixunabhängige Zelldeformation eine untergeordnete Rolle zu

spielen, wohingegen die Wechselwirkungen zwischen Chondrozyten und Matrix von größerer Bedeutung sind. Auch die Limitierung des Nährstofftransports durch die kompressionsbedingte Reduzierung der Matrixporengröße kann nicht alleine für die Hemmung der Biosynthese verantwortlich sein (BUSCHMANN et al., 1995; KIM et al., 1994).

Zu den physikalisch-chemischen Mechanismen gehören die kompressionsbedingte Hydrationsabnahme (bei einer mechanischen Belastung von 2,9 MPa reduziert sich der Wassergehalt des Gewebes um 20-40%) und der daraus resultierende Konzentrationsanstieg von Makromolekülen und fixierter negativer Ladungsdichte. Der Konzentrationsanstieg führt zur Reduktion sowohl der Proteoglykansynthese als auch des Diffusionskoeffizienten der Solute in und aus dem Knorpel. Durch die Zunahme der Ladungsdichte steigt in der Kultur die Kationenkonzentration zum Beispiel von  $\text{Na}^+$  und  $\text{H}^+$ , gefolgt von einer Zunahme des osmotischen Drucks und einer Abnahme des pH-Werts. Die Reduktion des pH-Werts wiederum lässt die zelluläre Biosyntheserate sinken (JONES et al., 1982).

Für die zelluläre Antwort auf mechanische Stimuli werden eventuell spezifische Verbindungen zwischen Chondrozyten und perizellulärer Matrix benötigt. Die im Laufe der Zeit zunehmende Ansprechbarkeit der Chondrozytenkulturen auf mechanische Stimuli könnte zumindest teilweise auf die Entwicklung der benötigten Übermittlungsmaschinerie zurückzuführen sein (BUSCHMANN et al., 1995).

An der Hemmung der Biosynthese durch statische Kompression sind weiterhin auch transmembraner Druck und extrazelluläres Ionenmilieu beteiligt (GRAY et al., 1988; SCHNEIDERMAN et al., 1986). Außerdem wird durch die Komprimierung des Knorpels nicht nur die Matrixsynthese, sondern auch der Transport von Zytokinen wie beispielsweise IGF-1 gehemmt (BONASSAR et al., 2000).

#### **7.2.1.1 Dynamische Kompression**

Dynamische Kompression kann abhängig von Frequenz und Amplitude die Biosynthese im Knorpel stimulieren oder hemmen und ein unterschiedliches Fließ- und Kompressionsverhalten induzieren (SAH et al., 1989).

Bei dynamischer Kompression aller Frequenzen ist eine Deformation von Matrix und Chondrozyten festzustellen. Kompressionen niedriger Frequenzen (maximal 0,001 Hz) führen im Gegensatz zu hohen Frequenzen jedoch eher zur Hemmung der Biosynthese (SAH et al., 1989). So ist auch in Versuchen an Kulturen bovinen Gelenkknorpels zwar ein signifikanter Anstieg der Proteoglykansynthese bei Kompression in Intervallen von 4 und 2 Sekunden (0,25-0,5 Hz), nicht jedoch bei Intervallen von 20 und 60 Sekunden (0,05-0,017 Hz) festzustellen (PARKKINEN et al., 1992). Niederfrequente Kompression hat langsame Flüssigkeitsexsudation und ein Minimum an innergeweblichem Druck, Fließgeschwindigkeit, Strömungspotentialen und radialer Belastung zur Folge. Es ist ausreichend Zeit für Veränderungen physikalisch-chemischer Parameter, wie zum Beispiel Absinken des pH-Werts, vorhanden (SAH et al., 1989).

Im Gegensatz dazu erfolgt bei höheren Frequenzen zwischen 0,01 und 1 Hz eine schwellenabhängige Stimulation der Biosynthese. Die Zeit für Flüssigkeitsbewegung ist hier wesentlich geringer (SAH et al., 1989). Es werden relativ hohe radial ausgerichtete Druckgradienten mit entsprechend hohen Fließgeschwindigkeiten, Strömungspotentialen und Strömungen induziert (FRANK und GRODZINSKY, 1987).

Während geringe Kompressionsamplituden (ca. 10% der Knorpelprobenhöhe) keine Auswirkung auf die Biosynthese haben, stimulieren Amplituden mittlerer Größe (20 bis 30% der Knorpelhöhe) sowohl die Aminosäureaufnahme, als auch die GAG-Synthese, diese jedoch in geringerem Ausmaß. Hohe Amplituden (50 bis 60% der Knorpelhöhe) führen verglichen mit der Steigerung der Aminosäureaufnahme zu einem gemäßigten und verzögerten Anstieg der GAG-Synthese (SAH et al., 1989). Zusätzlich zum Anstieg von Proteoglykan- und Proteinbiosynthese wird auch der Transport von IGF-I verstärkt (BONASSAR et al., 2001). Bei dynamischer Kompression wird außerdem das Sulfatierungsmuster der CS-Ketten an ihren Enden verändert, unter Beteiligung einer terminal aktiven GalNAc-4,6-S-Disulfotransferase. Weiterhin werden die Chondrozyten zur Produktion längerer CS-Ketten stimuliert (SAUERLAND et al., 2003).

Die Antwort der Chondrozyten auf physikalische Kräfte erfolgt schnell. So steigt zum Beispiel der Gehalt von cAMP bei Zugspannung innerhalb von drei Minuten auf ein Maximum. Auch die Proteinsynthese steigt bereits nach 1-3 Kompressions-Entlastungs-Zyklen deutlich um 37,8% bis 51,4% an. Die GAG-Synthese hingegen steigt erst allmählich mit sukzessiven Kompressions-Entlastungs-Zyklen um bis zu  $18,2 \pm 9,1\%$  nach 3 Zyklen an. Dieser geringere und verzögerte Anstieg ist Ausdruck von der Abhängigkeit und Limitierung der GAG-Synthese vom Kernprotein (SAH et al., 1989).

An der Transduktion der dynamischen Kompression in eine zelluläre Antwort sind möglicherweise folgende Mechanismen beteiligt (BUSCHMANN et al., 1995):

- veränderter Flüssigkeitsdruck
- verstärkter Flüssigkeitsfluss (Transport)
- induzierte Strömungspotentiale
- Wechselwirkungen zwischen Zellen und Matrix
- Freisetzung der Wachstumsfaktoren aus Matrixbindungsstellen oder Zellen.

Für die dynamische Kompression scheinen Flüssigkeitsfluss, Strömungspotentiale und Wechselwirkungen zwischen Zellen und Matrix als Stimuli wichtiger zu sein als geringer Anstieg des Flüssigkeitsdrucks, veränderter Molekulartransport und matrixunabhängige Zelldeformation (MAUCK et al., 2003a).

Ebenso wie bei der statischen Kompression wird in Chondrozytenkulturen der Effekt der Kompression mit fortschreitender Matrixentwicklung verstärkt. Im Gegensatz zur statischen Kompression, bei der eine zunehmende Hemmung der Biosynthese erfolgt, wird bei der dynamischen Kompression jedoch die Biosynthese im Laufe der Zeit aufgrund der vermehrten Matrixentwicklung immer stärker stimuliert (BUSCHMANN et al., 1995).

Die Strömungspotentiale, die durch den Fluss von Flüssigkeit und mobilen Gegenionen entlang der ionisierten Ladungsgruppen der immobilisierten Makromoleküle entstehen, sind proportional zu Fließgeschwindigkeit und fixierter Ladungsdichte der Matrix. Die stetig zunehmende Stimulierung der Biosynthese steht also im Zusammenhang mit der größeren Ladungsdichte der Matrix, auch wenn die Gesamtfließgeschwindigkeit nicht deutlich ansteigt (BUSCHMANN et al., 1995).

Der durch zyklische Kompression gesteigerte Transport der Makromoleküle via Konvektion erhöht die Erreichbarkeit der Chondrozyten für stimulierende Faktoren (SAH et al., 1989).

#### 7.2.1.1.1 Zonale Unterschiede bei dynamischer Kompression

Der Großteil der Gelenkknorpeldeformation findet in der Oberflächenzone des Knorpels statt. So erfolgt in Knorpelproben mit einem Durchmesser von 8 mm die Kompression auf einem Gebiet von 4 mm Durchmesser und die Deformierung der oberflächlichen Chondrozyten im Gegensatz zu den tiefer liegenden durch direkte Kompression. Der Grund dafür, dass die Kompression hauptsächlich in den obersten Knorpellagen stattfindet, liegt zum einen wahrscheinlich in der hier herrschenden geringeren Proteoglykankonzentration (PARKKINEN et al., 1992). Zum anderen ist die oberflächlichste amorphe Knorpelschicht weicher als der darunter liegende Großteil des Knorpels. Auf diese Weise kann sie die einwirkende Kompressionskraft effektiver auf die flüssige Phase des Knorpels übertragen und die Flüssigkeit zwingen, in die tiefer liegenden Knorpelschichten zu fließen. Dadurch wird sowohl der Reibungswiderstand als auch die Reibung in der Kontaktzone reduziert. Fehlt diese oberste Schicht, sind Flüssigkeitsfluss und Flüssigkeitsdruck im Knorpel wesentlich geringer (GRAINDORGE et al., 2005).

Der protektive Effekt dieser obersten Knorpellage ist in dieser selbst und in den oberflächennahen Knorpelschichten am stärksten. So wird in diesen Regionen bis zu 90% der einwirkenden Kompression durch die flüssige Phase des Knorpels getragen, wodurch der Knorpel besonders während Schockbelastung und anderen vorübergehenden Belastungen geschützt wird (GRAINDORGE et al., 2005).

In ein und demselben Gelenkknorpel entstehen direkt komprimierte und nicht-komprimierte Areale. Die direkt komprimierten zentralen Areale werden bei 4 Sekunden Intervallen deutlich stimuliert, die nicht-komprimierten Grenzareale hingegen erst bei kürzeren Intervallen von 2 Sekunden. In der zentralen Region erfolgt die Stimulierung bei 0,5 MPa und alle 4 Sek. durch die gesamte Knorpeltiefe hindurch, während bei einem Druck von 1 MPa oder einem Intervall von 2 Sekunden die Stimulation besonders im oberflächlichen Knorpel nur reduziert erfolgt. In der Grenzregion ist eine Stimulierung bei 0,5 MPa und alle 2 Sekunden nur in der Oberflächenzone feststellbar. Die im Versuch verwendeten Druckstärken von 0,5 und 1,0 MPa repräsentieren die unteren physiologischen Werte im humanen Kniegelenk während des Laufens (PARKKINEN et al., 1992).

Auch Untersuchungen an caninem Gelenkknorpel zeigen einen Anstieg des Proteoglykangehalts nach gemäßigttem Renntraining in der Übergangszone, während schnelleres Rennen in dieser Zone keine Stimulierung hervorruft und einen

erhöhten Proteoglykanverbrauch in der Oberflächenzone bewirkt (PARKKINEN et al., 1992).

#### 7.2.1.1.2 Der Effekt dynamischer Belastung auf den Fibronektinstoffwechsel

Die Biosynthese und Freisetzung von Fibronektin wird, abgesehen von einer Reihe anderer Faktoren, wie zum Beispiel TGF $\beta$ , auch stark durch die mechanische Belastung des Gelenkknorpels beeinflusst. Dabei ist jedoch wieder die Art der Belastung von Bedeutung. Durch statische (WOLF et al., 2003) und kontinuierlich zyklische Belastung ohne Erholungsphasen (STEINMEYER und ACKERMANN, 1999; STEINMEYER und KNUE, 1997) wird sowohl die Fibronektin- als auch Proteinsynthese gehemmt, während intermittierende Belastung die Fibronektinsynthese selektiv stimuliert, die Proteinsynthese aber oft unbeeinflusst läßt. Somit scheint Fibronektin sensibler auf Kompression zu reagieren, als die allgemeine Proteinsynthese (WOLF et al., 2003).

Mit zunehmender Stärke und Dauer zyklischer Belastung wird einerseits die Synthese von Fibronektin, Proteinen und Proteoglykanen gehemmt, andererseits sinkt auch der Fibronektin Gehalt selbst in steigendem Maß. Im Gegensatz dazu beeinflussen Frequenz und Kompressionsgrad zyklischer Belastung die Synthese von Proteinen und Fibronektin weniger. Bei den Proteoglykanen hingegen nimmt durch Reduzierung der Frequenz bei unveränderter Belastungsstärke die Hemmung der Proteoglykansynthese ab (STEINMEYER und ACKERMANN, 1999; STEINMEYER und KNUE, 1997).

Generell gesehen ist die Abgabe von endogenem Fibronektin und neu synthetisierten Proteinen aus belastetem Knorpel deutlich geringer als aus unbelastetem Knorpel. Dabei ist die mechanisch induzierte Veränderung des physiologischen Transports ebenso wie die erhöhte, wenn auch limitierte, Fibronektinbindungskapazität mechanisch belasteten Knorpels von der Belastungsdauer unabhängig (STEINMEYER und ACKERMANN, 1999; WOLF et al., 2003).

Bei zunehmender Knorpeldeformation hingegen nimmt die Freisetzung von neu-synthetisiertem Fibronektin zu (STEINMEYER und ACKERMANN, 1999; WOLF et al., 2003). Zum einen ist nämlich frisch synthetisiertes Fibronektin noch nicht fest mit der Matrix verbunden, da ihm seine bindenden Eigenschaften noch fehlen (WOLF et al., 2003). Zum anderen wird mit zunehmender Knorpelkompression der

Flüssigkeitsfluss durch Konvektion verstärkt und damit vermehrt Fibronektin transportiert und aus dem Knorpel befördert (STEINMEYER und ACKERMANN, 1999; WOLF et al., 2003). Der Verlust des neu-synthetisierten Fibronektins findet wahrscheinlich in der Anfangsphase jeder Belastungsperiode statt, da hier die Diffusivität dieses Moleküls noch nicht durch die Verdichtung der Matrix behindert wird (WOLF et al., 2003).

Im Gegensatz zur statischen Belastung des Knorpels führt intermittierende Belastung zu einer Erhöhung der Fibronektinsynthese und demnach auch des Fibronektinsgehalts (STEINMEYER et al., 1997; FARQUHAR et al., 1996). Die Fibronektinsynthese wird hierbei besonders durch die Frequenz der intermittierenden Belastung (bestehend aus der Frequenz der angewandten Kraft, Dauer des Belastungszyklus und Dauer der belastungsfreien Periode zwischen den einzelnen Belastungszyklen) stimuliert. Allerdings besteht keine statistische Korrelation zwischen Frequenz oder Kompressionsgrad und der resultierenden Expressionsrate des Fibronektins. So steigt die Fibronektinsynthese sowohl bei Reduzierung als auch bei Verlängerung der Gesamtzeit aktiver Knorpelbelastung in Versuchen von WOLF et al. (2003) an bovinen Gelenkknorpelproben an. Auch die Belastungsstärke (im Rahmen physiologischer Belastung) scheint sowohl die Synthese als auch die Freisetzung des Fibronektins deutlich weniger zu stimulieren als die Dauer der belastungsfreien Zeit (WOLF et al., 2003).

### **7.2.2 Effekte der Belastungsentfernung auf das Knorpelgewebe**

#### **Auswirkungen auf den Stoffwechsel**

Die Entfernung der Kompression führt bezüglich der Stoffwechselaktivität nicht einfach zur Rückkehr zu den Ausgangswerten. Während in den ersten 4 bis 5 Stunden nach Belastungsentfernung die Syntheserate im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollproben noch gehemmt ist, erfolgt nach 8 bis 48 Stunden ein Anstieg der Proteoglykansynthese (GUILAK et al., 1994; JONES et al., 1982). Da bei kontinuierlicher Kompression des Knorpelgewebes keine ausreichende Erholung erfolgen kann, muss die Druckentfernung als positiver Stimulus für die Chondrozyten angesehen werden (JONES et al., 1982; SAH et al., 1989). Neben der erhöhten Synthese der Proteoglykane ist in den ersten 24 Stunden nach Kompressionsentfernung auch die Eliminierung ihrer Abbauprodukte höher als in den

unbelasteten Kontrollproben. Danach gleicht sich das Niveau an (JONES et al., 1982).

Die Proteinsynthese zeigt im Gegensatz zu den Proteoglykanen innerhalb von 1,5-2,5 Stunden nach Belastungsentfernung einen deutlichen Erholungseffekt. Sie steigt auf über 90% im Vergleich zu den noch belasteten Kontrollproben. Nach etwa 6 Stunden liegt der Unterschied nur noch bei durchschnittlich 16%. Dieser Effekt beruht möglicherweise auf einer kompressionsbedingten Veränderung der Transportrate der Proteinbestandteile in die Zellen (SAH et al., 1989).

#### Biomechanischer Ablauf der Erholungsphase

Die Erholung des Knorpelgewebes von der Deformierung erfolgt zum einen durch den hohen osmotischen Schwellungsdruck innerhalb des Proteoglykangels, und zum anderen durch die freie Expansion der obersten Knorpelschicht:

Sobald die Belastung endet, strömen aufgrund des erhöhten osmotischen Potentials der Proteoglykane Wasser und die darin enthaltenen Nährstoffe in den Knorpel zurück, bis der Schwellungsdruck der Proteoglykane wieder mit dem Widerstand des kollagenen Netzwerks im Gleichgewicht steht (AP GWYNN et al., 2002; DIJKGRAAF et al., 1997; HASCALL, 1988; HARDINGHAM, 1990; KUETTNER, 1992; MUEHLEMAN et al., 2003; POOLE et al., 1984; SUH et al., 1995; WINDHABER et al., 2003). Außerdem kann sich die oberflächlichste Knorpelschicht durch die Belastungsentfernung wieder frei entfalten, was zur Öffnung der Passagen oder Poren für den Flüssigkeitsrückstrom führt. Der Flüssigkeitseinstrom in den Knorpel erfolgt während dieser Erholungsphase sowohl durch Konvektion als auch durch Diffusion, wobei erst der Einstrom durch Konvektion dominiert, bis ein Limit erreicht ist, ab dem die Diffusion wieder vorrangig ist (TORZILLI et al., 1983; SUN et al., 2004).

Das allmähliche Wiederanschwellen des Knorpels ist wahrscheinlich mengenlimitiert, da nach einer anfänglichen, etwa fünf-Minuten-dauernden Erholungsphase, während der noch eine Einschränkung des Flüssigkeitsrückstroms festzustellen ist, ein verstärkter Einstrom erfolgt. Diese Zeit benötigt die Oberflächenschicht anscheinend bis zu ihrer vollständigen Öffnung (TORZILLI et al., 1983). Die Erholung des gesamten Knorpelgewebes erfolgt nach relativ geringer Belastung in weniger als 60 Minuten (GUILAK et al., 1994). Nach 50 Kniebeugen dauert es bereits länger als 90 Minuten, bis der Patella- und Femurknorpel die gesamte herausgepresste Flüssigkeit

wieder langsam aufgenommen hat (ECKSTEIN et al., 1999). Bei Belastung ab 1,0 MPa erfolgt die Erholung des Knorpels innerhalb der ersten 24 Stunden nicht mehr vollständig. Grund dafür ist möglicherweise eine Schädigung der Ultrastruktur von extrazellulärer Matrix und/oder Chondrozyten bei stärkerer Belastung (GUILAK et al., 1994).

Bereits relativ geringe Restbelastungen verursachen eine Verdichtung der Oberflächenzone und somit eine Einschränkung des Flüssigkeitsrücktritts in den Knorpel. Der Grund dafür liegt in der geringeren Steifigkeit der oberflächlichsten Knorpelzone gegenüber Kompression, verglichen mit den darunter liegenden proteoglykanreichen Knorpelschichten. Trotz der Addition von Konvektion und Diffusion erfolgt bei Restbelastung der Rückstrom ins Knorpelgewebe aufgrund der reduzierten Oberflächenporosität und des erschwerten Transportwegs nur wie bei alleiniger Diffusion oder sogar in noch geringerem Umfang (TORZILLI et al., 1983).

Der Einfluss von statischer Kompression und anschließender Entlastung des Knorpels auf Synthese und Freisetzung der Proteoglykane zeigt große Abhängigkeit von der Kompressionsamplitude (SAH et al., 1989). Unbelastete und mit 0,057 MPa belastete Knorpelproben setzen Proteoglykane in das umliegende Medium frei, während eine Kompression ab 0,1 MPa diese belastungsabhängig einschränkt. Bei 0,1 MPa erfolgt eine Hemmung um 41%, bei 0,5 MPa um 54% und bei 1,0 MPa um 61%. In der Erholungsphase ist nach einem Druck von über 0,1 MPa eine Hemmung der Proteoglykanfreisetzung zu beobachten (GUILAK et al., 1994). Als möglicher Mechanismus dafür kommt eine Diffusionsbehinderung von Soluten und Proteoglykanen im komprimierten Knorpel in Frage, da der Diffusionskoeffizient der kleinmolekularen Substanzen in der Matrix von der interstitiellen Ionenkonzentration und der Matrixporosität abhängt (GUILAK et al., 1994).

## Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Fülle der wissenschaftlichen Einzelpublikationen der letzten Jahrzehnte zum Thema Gelenkknorpel in einer Arbeit als gegenwärtigen Stand der Kenntnisse zusammenzufassen.

Der hyaline Gelenkknorpel überzieht sämtliche Gelenkenden der artikulierenden Knochen und stellt damit einen außerordentlich wichtigen Bestandteil des Bewegungsapparates dar. Obwohl er nur wenige Millimeter dick ist, kann er neben der normalen Beanspruchung durch Körpergewicht und Fortbewegung auch extremen Belastungen, wie sie beispielsweise im Hochleistungssport vorkommen, standhalten. Außerdem trägt er zur Schmierung der Gelenkoberfläche bei und ermöglicht somit eine nahezu reibungslose Bewegung der Gelenkkörper.

Diese enorme Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit erlangt der Gelenkknorpel durch seine äußerst komplexe Struktur und die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen seinen verschiedenen Komponenten. Der Gelenkknorpel besteht aus 70–80% Gewebeflüssigkeit, bis zu 30% extrazellulärer Matrix und 3% Knorpelzellen (Chondrozyten). Die Chondrozyten sind die einzigen im Gelenkknorpel vorkommenden Zellen. Sie stellen die funktionelle Einheit des Knorpels dar, da sie zeitlebens für Synthese, Aufrechterhaltung und Abbau der Knorpelgrundsubstanz (Matrix) in ihrer direkten Umgebung verantwortlich sind. Trotz ihrer relativ hohen Stoffwechselaktivität ist das Knorpelgewebe insgesamt jedoch aufgrund seiner geringen Zelldichte eher stoffwechselträge. Der Zellstoffwechsel wird von verschiedenen äußeren Faktoren, wie zum Beispiel mechanischer Belastung, und von inneren Faktoren beeinflusst. Bei Letzteren spielen besonders die Zytokine und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Während die Wachstumsfaktoren einen anabolen Effekt aufweisen, wirken die Zytokine gewöhnlich katabol, wobei der Einfluss der Wachstumsfaktoren deutlich dominiert.

Bei den Makromolekülen der Matrix handelt es sich um Kollagene verschiedener Typen (I, II, III, VI, IX, X, XI, XII, XIV und XVI) sowie Proteoglykane, nicht-kollagene Proteine und Glykoproteine. Das Hauptkollagen des Gelenkknorpels ist das Kollagen II. Gemeinsam mit den Kollagenen IX und XI bildet es Kollagenfibrillen, die sich durch Querverbindungen zu einem Netzwerk verbinden, das die Matrix durchzieht und eine enorme Dehnungsfestigkeit besitzt. Dieses Netzwerk ist zusammen mit den großen aggregierenden Proteoglykanen, den sogenannten Aggrekanen, für die

biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels ausschlaggebend. Aufgrund ihrer vielen sulfatierten Glykosaminoglykan-Ketten sind die Aggrekane polyanionisch und ziehen Kationen und Wasser an. Daraus resultiert ein Schwellungsdruck der Aggrekane, dem das umliegende Kollagennetz entgegenwirkt. Auf diese Weise erlangt der Gelenkknorpel seine Viskoelastizität und kann sich nach kompressionsbedingter Deformierung relativ rasch erholen.

Während das Proteoglykan Versikan ebenfalls Aggregate bilden kann, fehlt den kleinen Proteoglykanen Dekorin, Biglykan, Fibromodulin, SZP und Perlekan diese Eigenschaft. Sie können sich jedoch an Kollagene binden und Wechselwirkungen innerhalb der Matrix beeinflussen. Auch die in ihrer Struktur und Funktion sehr unterschiedlichen nicht-kollagenen Proteine und Glykoproteine beeinflussen die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Matrixkomponenten sowie zwischen Zellen und Matrix. Zu diesen Proteinen gehören Fibronectin, Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), Thrombospondine, Annexin V, Matrilin, Fibulin und andere, die zum Teil noch nicht vollständig identifiziert sind.

Sowohl Zellmorphologie als auch biochemische und strukturelle Zusammensetzung der extrazellulären Matrix variieren je nach Spezies, Alter, Gelenk, Knorpeltiefe, Matrixregion und Knorpelbelastung. Die Chondrozyten innerhalb des Gelenkknorpels sind also nicht einheitlich, sondern weisen, je nach Abstand zur Gelenkoberfläche, deutliche Unterschiede in Form, Größe, Anordnung und Stoffwechselaktivität auf. Zusammen mit den daraus resultierenden zonalen Unterschieden in Zusammensetzung und Anordnung der Matrixkomponenten führt dies zu einer Einteilung des Knorpels in vier verschiedene Knorpelzonen, bezeichnet als Oberflächenzone, Übergangszone, radiäre und kalzifizierte Knorpelzone. Diese strukturellen Unterschiede ziehen auch zonale Unterschiede im biomechanischen Verhalten sowie im Flüssigkeits- und Soluttransport des Gelenkknorpels nach sich.

Da im Gelenkknorpel keine Blut- oder Lymphgefäße vorhanden sind, findet seine Ernährung hauptsächlich über die Synovialflüssigkeit von der Knorpeloberfläche her statt, jedoch auch über den subchondralen Knochen. Die Ernährung erfolgt größtenteils über belastungsunabhängige Diffusion, wird aber durch kompressionsinduzierte, mechanische Konvektion unterstützt.

Der Turnover des Gelenkknorpels wird ebenfalls durch mechanische Stimulierung beeinflusst, wobei verschiedene Kompressionsarten auch unterschiedliche Reaktionen der Chondrozyten hervorrufen. Im Allgemeinen führt statische Belastung

zu einer Abnahme der Proteoglykan- und Proteinsynthese, dynamische Belastung hingegen zu einer Zunahme, allerdings jeweils abhängig von Belastungsstärke, -dauer oder -frequenz. Gegenüber Immobilisierung zeigt der Gelenkknorpel eine relativ geringe Toleranz. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Matrix und somit zu pathologischen Veränderungen des Gelenkknorpels. Reparaturen sind aber nur in sehr beschränktem Umfang möglich und eine vollständige Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands ist sogar oft unmöglich. Daher sind genaue funktionelle Kenntnisse der Knorpelstrukturen von großer Bedeutung für das Verständnis von Ätiologie, Pathogenese und Prophylaxe sowie die Therapie von Erkrankungen des Gelenkknorpels, einschließlich der Entwicklung von Arthroplastiken.



## Summary

### The functional anatomy of articular cartilage

The aim of this study was to summarize the vast number of individual scientific publications about articular cartilage throughout the last decades.

Articular cartilage coats the ends of all articulating bones. For this reason it is an enormously important tissue within the locomotor system. Despite its thickness of only a few millimetres it is able to withstand not only normal loading due to body weight and locomotion but even peak loads as occurring in competitive sports. Due to its viscoelasticity it can minimize compression even for the other tissues involved in load transmission, such as the subchondral bone. Besides articular cartilage contributes to the lubrication of the articular surface and thus allows for an almost frictionless movement between the articulating structures.

The articular cartilage obtains its enormous potential in loadbearing and resistance to wear by its extremely complex structure and the numerous interactions between its different components. It consists of 70-80% interstitial water, 30% extracellular matrix and 3% chondrocytes. The chondrocytes are the only cells occurring in articular cartilage. Each of these cells can be seen as a functional unit of the cartilage because it is responsible for the synthesis, maintenance and degradation of the extracellular matrix in its immediate environment. In spite of the relatively high metabolism of the cartilage cells, the overall metabolic activity of cartilage tissue itself is quite low because of its low cell density. The cellular turnover is influenced by various external factors, e.g. mechanical load, but also by many internal factors, e.g. growth factors and cytokines. Most important in this respect are the generally anabolic growth factors, whereas the influence of the typically catabolic cytokines is minor.

The macromolecules of the matrix are composed of collagens (type I, II, III, VI, IX, X, XI, XII, XIV, XVI), proteoglycans, non-collagenous proteins and glycoproteins. The main collagen of cartilage is collagen II. Together with collagen type IX and XI it forms fibrils building up a collagenous network throughout the matrix reinforced by many cross links. This network is of extreme tensile strength. Together with the large aggregating proteoglycan aggrecan it is responsible for the viscoelasticity and biomechanical properties of the tissue. Because of their vast content of sulphated

glycosaminoglycans the aggrecans display a high number of anionic charges attracting many cations and water. The resulting swelling behaviour is limited by the surrounding collagenous network. This is the reason for the viscoelasticity of articular cartilage which allows for a quick recovery after a compressively induced deformation.

The proteoglycan Versican is also able to form aggregates whereas the small proteoglycans decorin, biglycan, fibromodulin, SZP and Perlecan lack this ability. However they can bind to collagens and influence interactions within the extracellular matrix. The non-collagenous proteins and glycoproteins, which differ enormously in structure and function, also influence matrix-matrix and cell-matrix interactions. This group of cartilage proteins includes fibronectin, Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), thrombospondins, annexin V, matrilins, fibulins and others, which still have to be completely identified.

Cell morphology as well as biochemical matrix composition and structural assembly vary in species, age, joint, cartilage depth, matrix region and cartilage loading. Therefore the articular chondrocytes of the same joint are not uniform cells but show clear differences in form, size, arrangement and metabolic activity depending on their distance from the articular surface. In combination with the resulting zonal differences in composition and arrangement of the matrix components the articular cartilage can be divided into four different zones, called superficial, transitional, radial and calcified zone. These structural differences also cause zonal differences in biomechanical properties as well as fluid and solute transport.

Due to the lack of lymphatic and blood vessels, the nutrition of articular cartilage is effected mainly by the synovia via the cartilage surface and to a lower extent via the subchondral bone. Most of the nutrition happens by diffusion but is supported by the compressively induced fluid convection. The turnover of articular cartilage is also influenced by mechanical stimulation with the chondrocyte's reaction depending on the type of compression. In general, static compression causes a decrease of proteoglycan and protein synthesis whereas dynamic compression causes an increase. In addition to the type of compression, also its strength, duration and frequency are of importance for its effects on the turnover. The articular cartilage shows only little tolerance towards immobilisation. Disturbances of the equilibrium state between matrix synthesis and degradation cause pathologic changes in the articular cartilage. Cartilage repair is possible only to a very low extent and very often

---

a complete restoration of the former state is impossible. Therefore an exact functional knowledge of cartilage structures is very important for the understanding of the aetiology, the pathogenesis and the prophylaxis as well as the therapy of articular cartilage diseases including the development of arthroplasties.



## Literaturverzeichnis

1. Ackermann, B., Steinmeyer, J. (2005): Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. *Osteoarthr Cart* 13, 906-14.
2. Afoke, A., Hutton, W. C., Byers, P. D. (1984): Synovial fluid circulation in the hip joint. *Med Hypotheses* 15, 81-6.
3. Aguirre, K.M., McCormick, R. J., Schwarzbauer, J. E. (1994): Fibronectin self-association is mediated by complementary sites within the amino-terminal one-third of the molecule. *J Biol Chem* 269, 27863-8.
4. Aigner, T., Bertling, W., Stöss, H. (1993): Independent expression of fibril-forming collagens I, II and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 91, 829-37.
5. Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P. M., McKenna, L. A. (2001): Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 44, 2777-89.
6. Aigner, T., Stöve, J. (2003): Collagens- major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1569-93.
7. Aletras, A. J., Tsiganos, C. P. (1985): In situ interaction of cartilage proteoglycans with matrix proteins. *Biochim Biophys Acta* 840, 170-9.
8. Allen, J. M., Bateman, J. F., Hansen, U., Wilson, R., Bruckner, P., Owens, R. T., et al. (2006): WARP is a novel multimeric component of the chondrocyte pericellular matrix, that interacts with perlecan. *J Biol Chem* 281, 7341-9.
9. Amin, A., Dave, M., Attur, M., Stuchin, S., Abramson, S., Kowalski, A., et al. (2001): Osteopontin: An innate inhibitor of inflammation activating via  $\alpha V\beta 3$  integrin in human osteoarthritis. *Trans Ann Meeting ORS* 267.
10. Ap Gwynn, I., Wade, S., Kääb, M. J., Owen, G. R.H., Richards, R. G. (2000): Freeze-substitution of rabbit tibial articular cartilage reveals that radial zone collagen fibres are tubules. *J Microsc* 197, 159-72.
11. Ap Gwynn, I., Wade, S., Ito, K., Richards, R. G. (2002): Novel aspects to the structure of rabbit articular cartilage. *Europ Cells Materials* 4, 18-29.
12. Archer, C. W., Francis-West, P. (2003): The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35 (4), 401-4.
13. Arokoski, J., Kiviranta, I., Jurvelin, J. S., Tammi, M., Helminen, H. J. (1993): Long-distance running causes side-dependent decrease of cartilage glycosaminoglycan content in the knee joints of young beagle dogs. *Arthritis Rheum.* 36, 1451-9.
14. Arsenault, A. L., Kohler, D. M. (1994): Image analysis of the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique* 28, 400-421.
15. Aspden, R. M., Hukins, D. W. (1989): Stress in collagen fibrils of articular cartilage calculated from their measured orientations. *Matrix* 9, 486-8.
16. Ateshian, G. A., Lai, W. M., Zhu, W. B., Mow, V. C. (1994): An asymptotic solution for two contact biphasic cartilage layers. *J Biomech* 27, 1347-60.
17. Athanasiou, K. A., Rosenwasser, M. P., Buckwalter, J. A., Malinin, T. I., Mow, V. C. (1991): Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 9, 330-340.
18. Aurich, M., Eger, W., Rolaufts, B., Margulis, A., Kuettner, K. E., Mollenhauer, J. A., Cole, A. A. (2006): Ankle chondrocytes are most resistant to Interleukin-1 than chondrocytes derived from the knee. *Orthopäde* 35, 784-90.
19. Ayad, S., Marriott, A., Brierley, V. H., Grant, M. E. (1991): Mammalian cartilage synthesizes both proteoglycan and non-proteoglycan forms of type IX collagen. *Biochem J* 278, 441-5.
20. Aydelotte, M. B., Schmid, T. M., Greenhill, R. R., Luchene, L., Schumacher, B. L., Kuettner, K. E.

- (1991): Synthesis of collagen by cultured bovine chondrocytes derived from different depths of articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 16, 26.
21. Bank, R. A., Bayliss, M. T., Lafeber, F. P., Maroudas, A., Tekoppele, J. M. (1998): Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. *Biochem J* 330, 345-51.
  22. Barkalow, F. J., Schwarzbauer, J. E. (1994): Interactions between fibronectin and chondroitin sulfate are modulated by molecular context. *J Biol Chem* 269, 3957-62.
  23. Bartolazzi, A., Nocks, A., Aruffo, A., Spring, F., Stamencovic, I. (1996): Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol* 132, 1199-1208.
  24. Bau, B., Gebhard, P. M., Haag, J., Knorr, T., Bartnik, E., Aigner, T. (2002): Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 46, 2648-57.
  25. Bayliss, M. T., Howat, S., Davidson, C., Dudhia, J. (2000): The organisation of aggrecan in human articular cartilage. Evidence for age-related changes in the rate of aggregation of newly synthesized molecules. *J. Biol. Chem.* 275, 6321-7.
  26. Ben-Zeév, A. (1991): Animal cell shape changes and gene expression. *Bioessays* 13, 207-12.
  27. Benjamin, M., Archer, C. W., Ralphs, J. R. (1994): Cytoskeleton of cartilage cells. *Mycroscopy Research and Technique* 28, 372-77
  28. Benninghoff, A. (1925): Form und Bau der Gelenkknorpel in ihren Beziehungen zur Funktion. Zweiter Teil: Der Aufbau des Gelenkknorpels in seinen Beziehungen zur Funktion. *Zeitschr. F. Zellforsch. U.Mikroskop. Anat.* 2, 783.
  29. Bhakta, N. R., Garcia, A. M., Frank, E. H., Grodzinsky, A. J., Morales, T. I. (2000): The insulin-like growth factors (IGFs) I and II bind to articular cartilage via the IGF-binding proteins. *J Biol Chem* 275, 5860-6.
  30. Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D., Gehron Robey, P. (1990): Expression and localisation of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38, 1549-63.
  31. Bidanset, D. J., Lebaron, R., Rosenberg, L., Murphy-Ullrich, J. E., Hook, M. (1992): Regulation of cell substrate adhesion effects of small galactosaminoglycan-containing proteoglycans. *J Cell Biol* 118, 1523-31.
  32. Blain, E. J., Mason, D. J., Duance, V. C. (2003): The effect of cyclic compressive loading on gene expression in articular cartilage. *Biorheology* 40, 111-7.
  33. Bonassar, L. J., Grodzinsky, A. J., Srinivasan, A., Davila, S. G., Trippel, S. B. (2000): Mechanical and physiochemical regulation of the action of insulin-like growth factor-I on articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 379, 57-63.
  34. Bonassar, L. J., Grodzinski, A. J., Frank, E. H., Davila, S. G., Bhakta, N. R., Trippel, S. B. (2001): The effect of dynamic compression on the response of articular cartilage to insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res* 19, 11-7.
  35. Boustany, N. N., Gray, M. L., Black, A. C., Hunziker, E. B. (1995): Correlation between synthetic activity and glycosaminoglycan concentration in epiphyseal cartilage raises questions about the regulatory role of interstitial pH. *J Orthop Res* 13, 733-9.
  36. Brama, P. A. J., TeKoppele, J. M., Bank, R. A., Barneveld, A., van Weeren, P. R. (2000a): Topographical mapping of the biochemical properties of articular cartilage in the equine fetlock joint. *Equine Vet J* 32, 19-26.
  37. Brama, P. A. J., TeKoppele, J. M., Bank, R. A., Barneveld, A., van Weeren, P. R. (2000b): Functional adaption of articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics during the first year of life in the horse. *Equine Vet J* 32, 217-21.
  38. Brama, P. A. J., Tekoppele, J. M., Bank, R. A., Barneveld, A., Firth, E. C., van Weeren, P. R. (2000c): The influence of strenuous exercise on collagen characteristics of articular cartilage in Thoroughbreds age 2 years. *Equine Vet J* 32, 551-4.

39. Brama, P. A. J., Karssenbergh, D., Barneveld, A., van Weeren, P. R. (2001): Contact areas and pressure distribution on the proximal articular surface of the proximal phalanx under sagittal loading. *Equine Vet J* 33, 26-32.
40. Brama, P. A. J., TeKoppele, J. M., Bank, R. A., Barneveld, A., van Weeren, P. R. (2002): Development of biochemical heterogeneity of articular cartilage: influences of age and exercise. *Equine Vet J* 34, 265-9.
41. Brandt, K. D., Palmoski, M. (1976): Organization of ground substance proteoglycans in normal and osteoarthritic knee cartilage. *Arthritis Rheum* 19, 209-15.
42. Broom, N. D., Poole, C. A. (1983): Articular cartilage collagen and proteoglycans. Their functional interdependency. *Arthritis Rheum* 26, 1111-9.
43. Broom, N. D., Marra, D. L. (1986): Ultrastructural evidence for fibril-to-fibril associations in articular cartilage and their functional implication. *J Anat* 146, 185-200.
44. Broom, N. D., Silyn-Roberts, H. (1990): Collagen-collagen versus collagen-proteoglycan interactions in the determination of cartilage strength. *Arthritis Rheum* 33, 1512-7.
45. Brown, R. A., Jones, K. L. (1992): Fibronectin synthesis and release in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Eur. J. Exp. Musculoskel. Res.* 1, 25-32.
46. Bruckner, P., van der Rest, M. (1994): Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* 28, 378-84.
47. Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C. (1982): Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfat-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J. Biol. Chem.* 257, 9830-9.
48. Buckwalter, J. A., Hunziker, E. B., Rosenberg, L. C., Coutts, R. D., Adams, M. E., Eyre, D. R. (1988): Articular cartilage. Composition and structure. In *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*, 405-425. Edited by S. L.-Y. Woo and J. A. Buckwalter. Park Ridge, Illinois, The American Academy of Orthopaedic Surgeons.
49. Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C. (1988): Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev* 1, 87-112.
50. Buckwalter, J. A., Rosenberg, L. C., Hunziker, E. B. (1990): Articular cartilage: composition, structure, response to injury and methods of facilitation repair. In *articular cartilage and knee joint function. Basic Science and Arthroscopy*, Bristol-Myers/Zimmer Orthopaedic Symposium, 19-56. Edited by J. W. Ewing. New York, Raven Press.
51. Buckwalter, J. A., Mow, V. C. (1992): Cartilage repair in osteoarthritis. In *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 71-107. Edited by R. W. Moskowitz, D. S. Howell, V. M. Goldberg and H. J. Mankin. Edition 2. Philadelphia. W. B. Saunders.
52. Buckwalter, J. A., Pita, J. C., Muller, F. J., Nessler, J. (1994): Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 12, 144-148.
53. Buckwalter, J. A., Roughley, P. J., Rosenberg, L. C. (1994): Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech* 28, 398-408.
54. Buckwalter, J. A. (1995): Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse and abuse: experimental studies. *J. Rheumatol., Supplement* 43, 13-15.
55. Buckwalter, J. A., Lane, N. E. (1996): Aging, sports and osteoarthritis. *Sports Med. and Arthrosc. Rev.* 4, 276-87.
56. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. (1997): Articular cartilage. Part I: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J BONE JOINT SURG SER A. Journal of Bone and Joint Surgery Series A* 79, 600-611.
57. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. (1997): Articular cartilage. Part II: Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg* 79A, 612-32.
58. Budde, B., Blumbach, K., Ylöstalo, J., Zaucke, F., Ehlen, H. W. A., Wagener, R., Ala-Kokko, L., Paulsson, M., Bruckner, P., Grässel, S. (2005): Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol Cell Biol* 25, 10465-78.

59. Bullough, P. G., Jagannath, A. (1983): The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. *J Bone Joint Surg Br* 65, 72-8.
60. Bunning RAD, Russel RGG (1989): The effect of tumor necrosis factor  $\alpha$  and  $\gamma$ -interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 32, 780-4.
61. Burstein, D., Gray, M. L., Hartman, A. L., Gipe, R., Foy, B. D. (1993): Diffusion of small solutes in cartilage as measured by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and imaging. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 11, 465-478.
62. Burton-Wurster, N., Lust, G. (1984): Synthesis of fibronectin in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Biochimica and Biophysica Acta* 800, 52-58.
63. Burton-Wurster, N., Lust, G., MacLeod, J. N. (1997a): Dimers of the cartilage specific (V+C)<sup>-</sup> fibronectin isoform exist primarily as homodimers. *Trans 43<sup>rd</sup> Ann Mtg Orthop Res Soc* 22, 471.
64. Burton-Wurster, N., Liu, M. D., Matthews, G. L., Lust, G., Roughley, P. J., Glant, T. T., Cs-Szabo, G. (2003): TGF beta 1 and biglycan, decorin, and fibromodulin metabolism in canine cartilage. *Osteoarthr Cart* 11, 167-76.
65. Burton-Wurster, N., Lust, G., MacLeod, J. N. (1997b): Cartilage fibronectin isoforms: In search of functions for a special population of matrix glycoproteins. *MATRIX BIOL. Matrix Biology* 15, 441-454.
66. Buschmann, M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J., Kimura, J. H., Hunziker, E. B. (1992): Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 10, 745-758.
67. Buschmann, M. D., Grodzinsky, A. J. (1995): A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *J Biomech Eng* 117, 179-92.
68. Buschmann, M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J., Hunziker, E. B. (1995): Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci* 108, 1497-508.
69. Buschmann, M., Hunziker, E. B., Kim, Y.J., Grodzinsky, A. J., (1996): Altered aggrecan synthesis correlates with cell and nucleus structure in statically compressed cartilage. *J Cell Sci* 109, 499-508.
70. Bush, P. G., Hall, A. C. (2001): The osmotic sensitivity of isolated and in situ bovine articular chondrocytes. *J Orthop Res* 19, 768-78.
71. Camper, L. Hellman, U., Lundgren-Akerlund, E. (1998): Isolation, cloning and sequence analysis of the integrin subunit  $\alpha 10 \beta 1$  associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *J Biol Chem* 273, 20383-9.
72. Cao, L., Lee, V., Adams, M. E., Kiani, C., Zhang, Y., Hu, W., et al. (1999): Beta-integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. *Matrix Biol* 18, 343-55.
73. Carlson, C. S., Loeser, R. F., Tulli, H. M., Johnstone, B., Paulsson, M. (1994): Cartilage matrix markers of osteoarthritis in cynomolgus monkeys. *Orthop Trans* 17, 852.
74. Cawston, T., Billington, C., Cleaver, C., Elliott, S., Hui, W., Koshy, P., Shingleton, B., Rowan, A. (1999): The regulation of MMPs and TIMPs in cartilage turnover. *Ann N Y Acad Sci* 878, 120-9.
75. Chan, C. K., Anastassiades, T. P. (1998): Anionic glycoconjugates from differentiated and dedifferentiated cultures of bovine articular chondrocytes: modulation by TGF $\beta$ . *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34, 492-8.
76. Charnley, J. (1959): The lubrication of animal joints. *New Scientist* 6, 60.
77. Chen, S.S., Falcovitz, Y.H., Schneiderman, R., Maroudas, A., Sah, R.L. (2001): Depth-dependent compressive properties of normal aged human femoral head articular cartilage: relationship to fixed charged density. *Osteoarthr Cart* 9 (6), 561-9.
78. Chen, L., Wu, Y., Lee, V., Kiani, C., Adams, M. E., Yao, Y. et al. (2002): The folded modules of aggrecan G3 domain exert two separable functions in glycosaminoglycan modification and product secretion. *J. Biol. Chem.* 277, 2657-65.
79. Chen, F. H., Thomas, A. O., Hecht, J. T., Goldring, M. B., Lawler, J. (2005): Cartilage Oligomeric

- Matrix Protein/Thrombospondin 5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem* 280 (38), 32655-61.
80. Chu, M.-L., Pan, T. C., Conway, D., Saitta, B., Stokes, D., Kuo, H.-J., Glanville, R. W., Timpl, R., Mann, K., Deutzmann, R. (1990): The structure of typ VI collagen. *Ann N Y Acad Sci* 580, 55-63.
  81. Clark, J. M. (1990): The organisation of collagen fibrils in the superficial zones of articular cartilage. *J ANAT. Journal of Anatomy* 171, 117-130.
  82. Clark, J. M. (1990): The structure of vascular channels in the subchondral plate. *J Anat* 171, 105-15.
  83. Clark, M. C. (1991): Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: A scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit and man. *J Orthop Res* 9, 246-57.
  84. Clark, A. L., Barclay, L. D., Matyas, J. R., Herzog, W. (2003): In situ chondrocyte deformation with physiological compression of the feline patellofemoral joint. *J Biomech* 36, 553-68.
  85. Cohen, N. P., Foster, R. J., Mow, V. C. (1998): Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state. *J ORTHOP SPORTS PHYS THER. Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy* 28, 203-215.
  86. Cs-Szabo, G., Melching, L. I., Roughley, P. J., Glant, T. T. (1997): Changes in messenger RNA and protein levels of proteoglycans and link protein in human osteoarthritic cartilage samples. *Arthritis Rheum* 40, 1037-45.
  87. Curtin, W. A., Reville, W. J. (1995): Ultrastructural observations on fibril profiles in normal and degenerative human articular cartilage. *CLIN ORTHOP RELAT RES. Clinical Orthopaedics and Related Research* 313, 224-230.
  88. D'Angelo, M., Billings, P. C., Pacifici, M., Leboy, P. S., Kirsch, T. (2001): Authentic matrix vesicles contain active Metalloproteases (MMP). *J Biol Chem* 276, 11347-53.
  89. Dang, Y., Cole, A. A., Homandberg, G. A. (2003): Comparison of the catabolic effects of fibronectin fragments in human knee and ankle cartilages. *Osteoarthritis Cart* 11, 538-47.
  90. Davenport-Goodall, C. L. M., Boston, R. C., Richardson, D. W. (2004): Effects of insulin-like growth factor-II on the mitogenic and metabolic activities of equine articular cartilage with and without interleukin 1- $\beta$ . *Am J Vet Res* 65, 238-44.
  91. Dean, D. D., Martell-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Howell, D. S., Woessner Jr., J. F. (1989): Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor (TIMP) imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84, 678-85.
  92. Dean, M. F., Lee, Y. W., Dastjerdi, A. M., Lees, P. (2003): The effect of link peptide on proteoglycan synthesis in equine articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1622, 161-8.
  93. DeGroot, J. (2004): The AGE of the matrix: chemistry, consequence and cure. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 301-5.
  94. Diab, M., Wu, J. J., Eyre, D.R. (1996): Collagen type Ix from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem. J.* 314, 327-32.
  95. DiCesare, P. E., Mörgelin, M., Mann, K., Paulsson, M. (1994): Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur J Biochem* 223, 927-37.
  96. DiCesare, P. E., Mörgelin, M., Carlson, C. S., Pasumarti, S., Paulsson, M. (1995): Cartilage oligomeric matrix protein: Isolation and characterization from human articular cartilage. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 13, 422-428.
  97. DiCesare, Chen, F. S., Mörgelin, M., Carlson, C. S., Leslie, M. P., Perris, R., Fang, C. (2002): Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biology* 21, 461-70.
  98. Dickinson, S. C., Vankemmelbeke, M. N., Buttle, D. J., Rosenberg, K., Heinegard, D., Hollander, A. P. (2003): Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biology* 22, 276-78.
  99. Dijkgraaf, L. C., de Bont, L. G., Boering, G., Liem, R. S. (1995): Normal cartilage structure,

- biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 53, 924-9.
100. Doege, K., Sasaki, M., Kimura, T., Yamada, Y. (1991): Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 266, 894-902.
  101. Doege, K. J., Garrison, K., Coulter, S. N., Yamada, Y. (1994): The structure of rat aggrecan gene and preliminary characterisation of its promoter. *J Biol Chem* 269, 29232-40.
  102. Dudhia, J., Hardingham, T. E. (1990): The primary structure of human cartilage link protein. *Nucleic Acids Res* 18, 1292.
  103. Dudhia, J., Davidson, C. M., Wells, T. M., Vynios, D. H., Hardingham, T. E., Bayliss, M. T. (1996): Age-related changes in the content of the C-terminal region of aggrecan in human articular cartilage. *Biochem J* 313, 933-40.
  104. Dudhia, J. (2005): Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2241-56.
  105. Dürr, J., Goodman, S., Potocnik, A., von der Mark, H., von der Mark, K. (1993): Localisation of  $\beta 1$  integrins in human cartilage and their role in chondrocyte adhesion to collagen and fibronectin. *Exp Cell Res* 207, 235-44.
  106. Dunham, J., Shackleton, D. R., Billingham, M. E., Bitensky, L., Chayen, J., Muir, I. H. (1988): A reappraisal of the structure of normal canine articular cartilage. *J Anat* 157, 89-99.
  107. Durrant, L. A., Archer, C. W., Benjamin, M., Ralphs, J. R. (1999): Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. *J Anat* 194, 343-53.
  108. Eckstein, F., Tieschky, M., Faber, S., Englmeier, K. H., Reiser, M. (1999): Functional analysis of articular cartilage deformation, recovery, and fluid flow following dynamic exercise in vivo. *Anat Embryol Berl* 200, 419-24.
  109. Eckstein, F., Lemberger, B., Stammberger, T., Engelmeier, K. H., Reiser, M. (2000): Patellar cartilage deformation in vivo after static versus dynamic loading. *J Biomech* 33, 819-25.
  110. Eckstein, F., Faber, S., Muhlbauer, R., Hohe, J., Englmeier, K. H., Reiser, M., et al. (2002): Functional adaptation of human joints to mechanical stimuli. *Osteoarthritis Cartilage* 10 (1), 44-50.
  111. Eger, W., Schumacher, B. L., Mollenhauer, J., Kuettner, K. E., Cole, A. A. (2002): Human knee and ankle cartilage explants: catabolic differences. *J Orthop Res* 20, 24-32.
  112. Eggli, P. S., Hunziker, E. B., Schenk, R. K. (1988): Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat Rec* 222, 217-27.
  113. Eikenberry, E. F., Mendler, M., Bürgin, R., Winterhalter, K. H., Bruckner, P. (1992): Fibrillar organisation in cartilage. In *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner, K. E., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., Hascall, V. C. (eds). Raven Press, New York. 133-49.
  114. Enomoto, M., Leboy, P. S., Menko, A. S., Boettinger, D. (1993):  $\beta 1$  integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen and fibronectin. *Exp Cell Res* 205, 276-85.
  115. Errington, R. J., Fricker, M. D., Wood, J. L., Hall, A. C., White, N. S. (1997): Four-dimensional imaging of living chondrocytes in cartilage using confocal microscopy: A pragmatic approach. *AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL*. American Journal of Physiology Cell Physiology 272, 41-3.
  116. Eyre, D. R. (1991): The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum* 21, 2.
  117. Eyre, D. R. (2002): Articular cartilage and changes in arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4, 30-5.
  118. Eyre, D. R., Wu, J. J., Fernandes, R. J., Pietka, T. A., Weis, M. A. (2002): Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans* 30, 893-9.
  119. Farquhar, T., Xia, Y., Mann, K., Bertram, J., Burton-Wurster, N., Jelinski, L., Lust, G. (1996): Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact. *J Orthop Res* 14, 417-23.

120. Federico, S., Grillo, A., La Rosa, G., Giaquinta, G., Herzog, W. (2005): A transversely isotropic, transversely homogeneous microstructural-statistical model of articular cartilage. *J Biomech* 38, 2008-18.
121. Fehrenbacher, A., Steck, E., Rickert, M., Roth, W., Richter, W. (2003): Rapid regulation of collagen but not metalloproteinase 1, 3, 13, 14 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1, 2, 3 expression in response to mechanical loading of cartilage explants in vitro. *Arch Biochem Biophys* 410 (1), 39-47.
122. Fenton, J. I., Chlebik-Brown, K. A., Peters, T. L., Caron, J. P., Orth, M. W. (2000): Glucosamine HCl reduces equine articular cartilage degradation in explant culture. *Osteoarthritis Cart* 8, 258-65.
123. French-Constant, C. (1995): Alternative splicing of fibronectin – many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res* 221, 261-71.
124. Fischer, A. E., Carpenter, T. A., Tyler, J. A., Hall, L. D. (1995): Visualisation of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. *MAGN RESON IMAGING. Magnetic Resonance Imaging* 13, 819-826.
125. Flannery, C., Stanescu, V., Mörgelin, M., Boynton, R., Gordy, J., Sandy, J. (1992): Variability in the G3 domain content of bovine aggrecan from cartilage extracts and chondrocyte cultures. *Arch Biochem Biophys* 297, 52-60.
126. Flannery, C. R., Hughes, C. E., Schumacher, B. L., Tudor, D., Aydelotte, M. B., Kuettner, K. E., Caterson, B. (1999): Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 535-41.
127. Fleischmajer, R., Fisher, L. W., MacDonald, E. D., Jacobs, L., Perlsh, J. S., Termine, J. D. (1991): Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J Struct Biol* 106, 82-90.
128. Forsyth, C. B., Pulai, J., Loeser, R. F. (2002): Fibronectin fragments and blocking antibodies to  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 46, 2368-76.
129. Fosang, A. J., Hardingham, T. E. (1991): 1-C-6 epitope in cartilage proteoglycan G2 domain is masked by keratan sulphate. *Biochem J* 273, 369-73.
130. Fosang, A. J., Neame, P. J., Last, K., Hardingham, T. E., Murphy, G., Hamilton, J. A. (1992): The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases and cathepsin B. *J Biol Chem* 267, 19470-4.
131. Frank, E. H., Grodzinsky, A. J. (1987): Cartilage electromechanics- I. Electrokinetic transduction and the effects of electrolyte pH and ionic strength. *J Biomechanics* 20, 615-27.
132. Frank, E. H., Grodzinsky, A. J. (1987): Cartilage electromechanics- II. A continuum model of cartilage electrokinetics and correlations with experiments. *J Biomechanics* 20, 629-39.
133. Franz, T., Hasler, E. M., Hagg, R., Weiler, C., Jakob, R. P., Mainil-Varlet, P. (2001): In situ compressive stiffness, biochemical composition, and structural integrity of articular cartilage of the human knee joint. *Osteoarthritis Cart* 9 (6), 582-92.
134. Frazier, W. A. (1991): Thrombospondins. *Curr Opin Cell Biol* 3, 792-9.
135. Frisbie, D. D., Sandler, E. A., Trotter, G. W., et al. (2000): Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-I in interleukin-1-conditioned equine cartilage. *Am J Vet Res* 61, 436-41.
136. Fukai, F., Ohtaki, M., Fujii, N., Yajima, H., Ishii, T., Nishizawa, Y., Miyazaki, K., Katayama, T. (1995): Release of biological activities from quiescent fibronectin by a conformational change and limited proteolysis by matrix metalloproteinases. *Biochemistry* 34, 11453-9.
137. Fulop, C., Walcz, E., Valyon, M., Glant, T. T. (1993): Expression of alternatively spliced epidermal growth factor-like domains in aggrecans of different species. Evidence for a novel module. *J Biol Chem* 268, 17377-83.
138. Fulop, C., Cs-Szabo, G., Glant, T. T. (1996): Species-specific alternative splicing of the epidermal

- growth factor-like domains in aggrecans of different species. *Biochem J* 319, 935-40.
139. Gannon, J. M., Walker, G., Fischer, M., Carpenter, R., Thompson, R. C., Jr., Oegema, T. R., Jr. (1991): Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. *J Orthop Res* 9, 485-94.
140. Garcia, A. M., Frank, E. H., Grimshaw, P. E., Grodzinsky, A. J. (1996): Contributions of fluid convection and electrical migration to transport in cartilage: relevance to loading. *Arch Biochem Biophys* 333, 317-25.
141. Garcia, A. M., Szasz, N., Trippel, S. B., Morales, T. I., Grodzinski, A. J., Frank, E. H. (2003): Transport and binding of insulin-like growth factor I through articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 415, 69-79.
142. Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. (2003): Collagens- structure, function and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-46.
143. Glaser, C. (1998): Kollagenfaserarchitektur des Gelenkknorpels unter verschiedenen Belastungssituationen. Quantitative Beschreibung, funktionelle Deutung und Modellbildung. Diss. med., München.
144. Giannoni, P., Siegrist, M., Hunziker, E. B., Wong, M. (2003): The mechanosensitivity of cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *Biorheology* 40, 101-9.
145. Gouze, J. N., Bordji, K., Gulberti, S., Terlain, B., M., Netter, P., Magdalou, J., Fournel-Gigleux, S., Ouzzine, M. (2001): IL-1 $\beta$  down-regulates the expression of glucuronosyltransferase I, a key enzyme priming glycosaminoglycan biosynthesis: influence of glycosamine on IL-1 $\beta$ -mediated effects in rat chondrocytes. *Arthritis Rheum* 4, 351-60.
146. Gouze, J. N., Bianchi, A., Becuwe, P., Dauca, M., Netter, P., Magdalou, J., Terlain, B., Bordji, K. (2002): Glucosamine modulates IL-1-induced activation of rat chondrocytes at a receptor level, and by inhibiting the NF-kappa B pathway. *FEBS Lett* 510, 166-170.
147. Govindraj, P., West, L., Koob, T. J., Neame, P., Doege, K., Hassell, J. R. (2002): Isolation and identification of the major heparan sulfate proteoglycans in the developing bovine rib growth plate. *J Biol Chem* 277, 19461-9.
148. Graindorge, S., Ferrandez, W., Jin, Z., Ingham, E., Grant, C., Twigg, P., Fisher, J. (2005): Biphasic surface amorphous layer lubrication of articular cartilage. *Medical Engineering and Physics* 27, 836-44.
149. Gregory, K. E., Oxford, J. T., Chen, Y., Gambee, J. E., Gygi, S. P., Aebbersold, R., Neame, P. J., Mechling, D. E., Bachinger, H. P., Morris, N. P. (2000): Structural organization of distinct domains within the non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. *J Biol Chem* 275, 11498-506.
150. Gregory, K. E., Keene, D. R., Tufa, S. F., Lunstrum, G. P., Morris, N. P. (2001): Developmental distribution of collagen type XII in cartilage: Association with articular cartilage and the growth plate. *J Bone Min Res* 16, 2005-16.
151. Grimshaw, M. J., Mason, R. M. (2001): Modulation of bovine articular chondrocyte gene expression in vitro by oxygen tension. *Osteoarthritis and Cartilage* 9, 357-64.
152. Grover, J., Roughley, P. G. (1993): Versican gene expression in human articular cartilage and comparison of mRNA splicing variation. *Biochem J* 291, 361-7.
153. Günther, M., Haubeck, H.-D., van de Leur, E., et al. (1994): Transforming growth factor  $\beta$ 1 regulates tissue inhibitors of metalloproteinases-1 expression in differentiated human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 37, 395.
154. Guilak, F., Mow, V. C. (1992): Determination of the mechanical response of the chondrocyte in situ using confocal microscopy and finite element analysis. *Advances in Bioengineering, ASME* 22, 21-3.
155. Guilak, F., Bachrach, N. B. (1993): Compression-induced changes in chondrocyte shape and volume determined in situ using confocal microscopy (abstract). *Trans Orthop Res Soc* 18, 619.
156. Guilak, F. (1994): Volume and surface area measurement of viable chondrocytes in situ using geometric modelling of serial confocal sections. *J Microsc* 173, 245-56.
157. Guilak, F., Meyer, B. C., Ratcliffe, A., Mow, V. C. (1994): The effects of matrix compression on

- proteoglycan metabolism in articular cartilage explants. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE*. Osteoarthritis and Cartilage 2, 91-101.
158. Guilak, F., Ratcliffe, A., Lane, N., Rosenwasser, M. P., Mow, V. C. (1994a): Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 12, 474-84.
159. Guilak, F., Ratcliffe, A., Mow, V. C. (1995): Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: A confocal microscopy study. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 13, 410-421.
160. Guilak, F., Mow, V. C. (2000): The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J Biomech* 33, 1663-73.
161. Gurr, E., Mohr, W., Pallasch, G. (1985): Proteoglycans from human articular cartilage: the effect of joint location on the structure. *J Clin Chem Clin Biochem* 23, 811-9.
162. Gyarmati, J., Jr., Foldes, I., Varga, S., Kiss, I., Kern, M., Gyarmati, J. (1984): [Effect of chronic vitamin D deficiency on joint cartilage]. *Z Orthop* 122, 863-8.
163. Hagg, R., Bruckner, P., Hedbom, E. (1998): Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J Cell Biol* 142, 285-94.
164. Hagiwara, H., Schroter Kermani, C., Merker, H. J. (1993): Localization of collagen type VI in articular cartilage of young and adult mice. *CELL TISSUE RES. Cell and Tissue Research* 272, 155-160.
165. Hall, A., Urban, J. P. G., Gehl, K. (1991): The effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in articular cartilage. *J Orthop Res* 9, 1-10.
166. Hall, A. C., Horwitz, E. R., Wilkins, R. J. (1996): The cellular physiology of articular cartilage. *Expt Physiol* 81, 535-45.
167. Hall, A. C., Bush, P. G., Davidson, M. E. B., Kempson, S. A. (2003): Equine articular cartilage chondrocytes: opening a black box. *Equine Vet J* 35 (5), 425-28.
168. Hanyecz, A., Bardos, T., Berlo, S. E., Buzas, E., Nesterovich, A. B., Mikecz, K. Et al. (2003): Induction of arthritis in SCID mice by T cells specific for the "shared epitope" sequence in the G3 domain of human cartilage proteoglycan. *Arthritis Rheum* 48, 2959-73.
169. Hardingham, T. E., Beardmore Gray, M., Dunham, D. G., Ratcliffe, A. (1986): Cartilage proteoglycans. *Ciba Found Symp* 124, 30-46.
170. Hardingham, T., Bayliss, M. (1990): Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 20, 12-33.
171. Hardingham, T. E., Fosang, A. J. (1992): Proteoglycans, many forms and many functions. *FASEB J* 6, 861-70.
172. Hardingham, T. E., Fosang, A. J. (1995): The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43, 86-90.
173. Hardingham, T. (1995): Changes in chondroitin sulphate structure induced by joint disease. *ACTA ORTHOP SCAND SUPPL. Acta Orthopaedica Scandinavica, Supplement* 66, 107-110.
174. Harris, E. D., Parker, H. G., Radin, E. L., Krane, S. M. (1972): Effects of proteolytic enzymes on structural and mechanical properties of cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 15, No.5.
175. Hascall, V. C. (1988): Proteoglycans: the chondroitin sulfate/keratan sulfate proteoglycan of cartilage. *ISI Atlas of Science. Biochemistry* 1, 189-98.
176. Hassell, J., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E. (2003): Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconjugate J* 19, 263-7.
177. Hayashi, T., Abe, E., Jasin, H. E. (1996): Fibronectin synthesis in superficial and deep layers of normal articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 39, 567-73.
178. Hedbom, E., Heinegard, D. (1989): Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II. *J Biol Chem* 264, 6898-6905.
179. 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. Journal of Biological Chemistry* 267, 6132-6136.
180. Hedbom, E., Heinegard, D. (1993): Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 268, 27307-12.
181. Hedlund, H., Mengarelli Widholm, S., Reinholt, F. P., Svensson, O. (1993): Stereologic studies on collagen in bovine articular cartilage [published erratum appears in *APMIS* 1994 Dec;102(12):960]. *APMIS* 101, 133-40.
182. Hedlund, H., Mengarelli Widholm, S., Heinegard, D., Reinholt, F. P., Svensson, O. (1994): Fibromodulin distribution and association with collagen. *Matrix Biol* 14, 227-32.
183. Hedlund, H., Hedbom, E., Heinegard, D., Mengarelli Widholm, S., Reinholt, F. P., Svensson, O. (1999): Association of the aggrecan keratan sulfate-rich region with collagen in bovine articular cartilage. *J BIOL CHEM. Journal of Biological Chemistry* 274, 5777-5781.
184. Heinegard, D., Franzen, A., Hedbom, E., Sommarin, Y. (1986): Common structure of the core proteins of interstitial proteoglycans. In Evered D & Whelan J (eds) *Functions of the Proteoglycans*. Ciba Foundation Symposium 124, 69-82. Chichester: Wiley, J..
185. Hiraki, Y., Inoue, H., Iyama, K., Kamizono, A., Ochiai, M., Shukunami, C., Iijima, S., Suzuki, F., Kondo, J. (1997): Identification of Chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. *J Biol Chem* 272, 32419-26.
186. Hlavacek, M. (1993): The role of synovial fluid filtration by cartilage in lubrication of synovial joints--I. Mixture model of synovial fluid. *J Biomech* 26, 1145-50.
187. Hlavacek, M. (1993): The role of synovial fluid filtration by cartilage in lubrication of synovial joints--II. Squeeze-film lubrication: homogeneous filtration. *J Biomech* 26, 1151-60.
188. Hlavacek, M.(2000): Squeeze-film lubrication of the ankle joint with synovial fluid filtrated by articular cartilage with the superficial zone worn out. *J Biomech*33, 1415-22.
189. Hochmuth, R. M. (2000): Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech* 33, 15-22.
190. Hocking, D. C., Sottile, J., McKeown-Long, P. J. (1994): Fibronectin's III-1 module contains a conformation-dependent binding site for the amino-terminal region of fibronectin. *J Biol Chem* 269, 19183-91.
191. Holden, P., Meadows, R. S., Chapman, K. L., Grant, M. E., Kadler, K. E., Briggs, M. D. (2001): Cartilage Oligomeric Matrix Protein interacts with type IX collagen, and disruptions to these interactions identify a pathogenic mechanism in a bone dysplasia family. *J Biol Chem* 276, 6046-55.
192. Holmes, D. F., Graham, H. K., Trotter, J. A., Kadler, K. E. (2001): STEM/TEM studies of collagen fibril assembly. *Micron* 32, 273-85.
193. Homandberg, G. A., Meyers, R., Xie, D. L. (1992): Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem* 267, 3597-604.
194. Homandberg, G. A., Meyers, R., Williams, J. M. (1993): Intra-articular injection of fibronectin fragments causes severe depletion of cartilage proteoglycans in vivo. *J Rheumatol* 20, 1378-82.
195. Homandberg, G. A., Hui, F. (1994): High concentrations of fibronectin fragments cause short-term catabolic effects in cartilage tissue while lower concentrations cause continuous anabolic effects. *Arch Biochem Biophys* 311, 213-8.
196. Homandberg, G. A., Hui, F., Purple, C., Haris, A., Bewsey, K. (1994): Fibronectin fragments may act through cytokines in causing cartilage tissue damage and attempted repair. *Osteoarthritis and Cartilage* 2, 50ff.
197. Homandberg, G. A., Hui, F. (1996): Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys* 334, 325-31.
198. Homandberg, G. A., Kang, Y., Zhang, J., Cole, A. A., Williams, J. F. (2001): A single injection of fibronectin fragments into rabbit knee joints enhances catabolism in the articular cartilage followed by reparative responses but also induces systemic effects in the non-injected knee joints. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 673-83.

199. Horikawa, O., Nakajima, H., Kikuchi, T., Ichimura, S., Yamada, H., Fujikawa, K., Toyama, Y. (2004): Distribution of type VI collagen in chondrocyte microenvironment: study of chondrons isolated from human normal and degenerative articular cartilage and cultured chondrocytes. *J Orthop Sci* 9, 29-36.
200. Horita, D. A., Hajduk, P. J., Goetinck, P. F., Lerner, L. E. (1994): NMR studies of peptides derived from the putative binding regions of cartilage proteins. No evidence for binding to hyaluronan. *J Biol Chem* 269, 1699-1704.
201. Hou, J. S., Mow, V. C., Lai, W. M., Holmes, M. H. (1992): An analysis of the squeeze-film lubrication mechanism for articular cartilage. *J Biomechanics* 25, 247-59.
202. Howell, D. S., Treadwell, B. V., Trippel, S. B. (1992): Etiopathogenesis of osteoarthritis. In Moskowitz, R. W., Howell, D. S., Goldberg, V. M., et al. (eds): *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management* (ed. 2). Philadelphia, PA, Saunders, 233-252.
203. Hughes, C. E., Caterson, B., White, R. J., Roughley, P. J., Mort, J. S. (1992): Monoclonal antibodies recognizing protease-generated neopeptides from cartilage proteoglycan degradation. Application to studies of human link protein cleavage by stromelysin. *J Biol Chem* 267, 16011-4.
204. Hunziker, E. B., Wagner, J., Studer, D. (1996): Vitified articular cartilage reveals novel ultra-structural features respecting extracellular matrix architecture. *HISTOCHEM CELL BIOL. Histochemistry and Cell Biology* 106, 375-382.
205. Hunziker, E. B., Quinn, T. M., Hauselmann, H.-J. (2002): Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 10 (7), 564-72.
206. Hwang, W. S., Li, B., Jin, L. H., Ngo, K., Schachar, N. S., Hughes, G. N. (1992): Collagen fibril structure of normal, aging, and osteoarthritic cartilage. *J Pathol* 167, 425-33.
207. Ichihara-Tanaka, K., Titani, K., Sekiguchi, K. (1995): Role of the carboxyl-terminal Fib2 domain in fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci* 108, 907-15.
208. Ichimura, S., Wu, J. J., Eyre, D. R. (2000): Two-dimensional peptide-mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage. *Arch Biochem Biophys* 378, 33-9.
209. Ilic, M. Z., Handley, C. J., Robinson, H. C., Mok, M. T. (1992): Mechanism of catabolism of aggrecan by articular cartilage. 294, 115-22.
210. Ingber, D. E. (1992): Mechanochemical switching between growth and differentiation by extracellular matrix: possible use of a cellular tensegrity mechanism. *J Cell Biochem Suppl* 16F, 120.
211. Iozzo, R. V., Cohen, I. R., Grassel, S., Murdoch, A. D. (1994): The biology of perlecan: The multifaceted heparan sulfate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 302, 625-39.
212. Iozzo, R. V. (1997): The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Bio* 32;141-174.
213. Jackson, R. L., Busch, S. J., Cardin, A. D. (1991): Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 71, 481-539.
214. Jadin, K. D., Wong, B. J., Bae, W. C., Li, K. W., Williamson, A. K., Schumacher, B. L., Price, J. H., Sah, R. L. (2005): Depth-varying density and organisation of chondrocytes in immature and mature bovine cartilage assessed by 3D imaging and analysis. *J Histochem Cytochem* 53, 1109-19.
215. Jahn, K., Schramm, G. (1984): Morphologie des Gelenkknorpels bei unterschiedlicher Funktion. *Beitr Orthop u Traumatol* 31, 197-8.
216. Jay, G. D., Tantravahi, U., Britt, D. E., Barraci, H. J., Cha, C.-J. (2001): Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megacaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25. *J Orthop Res* 19 (4), 677-87.
217. Jeffery, A. K., Blunn, G. W., Archer, C. W., Bentley, G. (1991): Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *J BONE JOINT SURG BR* 73, 795-801.

218. Jin, M., Frank, E. H., Quinn, T. M., Hunziker, E. B., Grodzinsky, A. J. (2001): Tissue shear deformation stimulates proteoglycan and protein biosynthesis in bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 395, 41-8.
219. Jones, I. A., Klämfeldt, A., Sandström, T. (1982): The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans in vitro. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 165, 283-9.
220. Jones, K. L., Brown, M., Ali, S. Y., Brown, R. A. (1987): An immunohistochemical study of fibronectin in human osteoarthritic and disease free articular cartilage. *Annals of the Rheumatic Diseases* 46, 809-815.
221. Jurvelin, J., Kiviranta, I., Saamanen, A. M., Tammi, M., Helminen, H. J. (1990): Indentation stiffness of young canine knee articular cartilage - Influence of strenuous joint loading. *J BIOMECH. Journal of Biomechanics* 23, 1239-1246.
222. Kääb, M. J., Gwynn, I. A. P., Nötzli, H. P. (1998): Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J ANAT. Journal of Anatomy* 193, 23-34.
223. Kääb, M. J., Ito, K., Clark, J. M., Nötzli, H. P. (1999): Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading. *J Orthop Res* 16, 743-51.
224. Kääb, M. J., Ito, K., Rahn, B., Clark, J. M., Nötzli, H. P. (2000): Effect of mechanical load on articular cartilage collagen structure: a scanning electron-microscopic study. *Cells Tissues Organs* 167, 106-20.
225. Kähäri, V. M., Larjava, H., Uitto, J. (1991): Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. *J Biol Chem* 266, 10608-15.
226. Kassner, A., Hansen, U., Miosge, N., Reinhardt, D. P., Aigner, T., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., Grässel, S. (2003): Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biology* 22, 131-43.
227. Kassner, A., Tiedemann, K., Notbohm, H., Ludwig, T., Mörgelin, M., Reinhardt, D. P., Chu, M.-L., Bruckner, P., Grässel, S. (2004): Molecular structure and interaction of recombinant human type XVI collagen. *J Mol Biol* 339, 835-53.
228. Kellner, K., Liebsch, G., Klimant, I., Wolfbeis, O. S., Blunk, T., Schulz, M. B. et al. (2002): Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 73-83.
229. Kempson, G. E. (1991): Age-related changes in tensile properties of human articular cartilage; comparative study between femoral head of hip joint and talus of the ankle joint. *Biochim Biophys Acta* 1075, 223-30.
230. Kiani, C., Lee, V., Cao, L., Chen, L., Wu, Y., Zhang, Y. et al. (2001): Roles of aggrecan domains in biosynthesis, modification by glycosaminoglycans and product secretion. *Biochem. J.* 354, 199-207.
231. Kiepe, D., Ulinski, T., Powell, D. R., et al. (2002): Differential effects of insulin-like growth factor binding proteins-1, -2, -3, and -6 on cultured growth plate chondrocytes. *Kidney Int* 62, 1591-600.
232. Kim, Y.-J., Sah, R. L. Y., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H. K., Sandy, J. D. (1994): Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 1-12.
233. Kim, Y.-J., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H. K. (1996): Compression of cartilage results in differential effects on biosynthetic pathways for aggrecan, link protein and hyaluronan. *Arch Biochem Biophys* 328, 331-40.
234. Kim, A. C., Spector, M. (2000): Distribution of chondrocytes containing alpha-smooth muscle actin in human articular cartilage. *J Orthop Res* 18, 749-55.
235. Kinner, B., Spector, M. (2001): Smooth muscle actin expression by human articular chondrocytes and their contraction of a collagen-glycosaminoglycan matrix in vitro. *J Orthop Res* 19, 233-241.
236. Kirk, T. B., Wilson, A. S., Stachowiak, G. W. (1993): The effects of dehydration on the surface morphology of articular cartilage. *J ORTHOP RHEUMATOL. Journal of Orthopaedic Rheumatology* 6, 2-3.
237. Kirk, T. B., Wilson, A. S., Stachowiak, G. W. (1993): The morphology and composition of the

- superficial zone of mammalian articular cartilage. *J ORTHOP RHEUMATOL. Journal of Orthopaedic Rheumatology* 6, 21-28.
238. Kiviranta, I., Tammi, M., Jurvelin, J., Arokoski, J., Saamanen, A. M., Helminen, H. J. (1992): Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the canine knee joint after strenuous running exercise. *Clin Orthop* 283,302-8.
239. Knudson, C. B. (1993): Hyaluronan receptor directed assembly chondrocyte pericellular matrix. *J Biol Chem* 120, 825-34.
240. Knudson, W., Casey, B., Nishida, Y., Eyre, W., Kuettner, K. E., Knudson, C. H. (2000): Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis. *Arthritis Rheum* 43, 1165-74.
241. Knudson, C. B., Knudson, W. (2001): Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 69-78.
242. Knudson, C. B., Knudson, W. (2004): Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 121, 152-62.
243. Knupp, C., Squire, J. M. (2001): A new twist in the collagen story: the type VI segmented super coil. *EMBO J* 20, 372-6.
244. Koay, E. J., Shieh, A. C., Athanasiou, K. A. (2001): Development of a novel method for creep indentation of single chondrocytes. *Ann Biomed Eng* 29, 22.
245. Korver, T. H. J., van de Stadt, R. J., Kiljan, E., van Kampen, G. P. J., van der Korst, J. K. (1992): Effects of loading on the sythesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage in vitro. *J Rheumatol* 19, 905-12.
246. Krishnan, R., Caligaris, M., Mauck, L. R., Hung, C. T., Costa, K. D., Ateshian, G. A. (2004): Removal of the superficial zone of bovine articular cartilage does not increase its frictional coefficient. *Osteoarthritis Cart* 12, 947-55.
247. Krishnan, R., Kopacz, M., Ateshian, G. A(2004a): Experimental verificationof the role of interstitial fluid pressurization in cartilage lubrication. *J Orthop Res* 22, 565-70.
248. Kuettner, K. E., Pauli, B. U., Gall, G., Memoli, V. A., Schenk, R. K. (1982): Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol* 93, 743-50.
249. Kuettner, K. E. (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155-63.
250. Kumar, P., Oka, M., Toguchida, J., Kobayashi, M., Uchida, E., Nakamura, T., Tanaka, K. (2001): Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. *J Anat* 199, 241-50.
251. Kurz, B., Jin, M., Patwari, P., Cheng, D. M., Lark, M. W., Grodzinski, A. J. (2001): Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J Orthop Res* 19, 1140-6.
252. Kusche-Gullberg, M., Kjellen, L. (2003): Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 605-11.
253. Lai, W. M., Hou, J. S., Mow, V. C. (1991): A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng* 113, 245-58.
254. Lai, C. H., Chu, M. L. (1996): Tissue distribution and developmental expression of type XVI collagen in the mouse. *Tissue Cell* 28, 155-64.
255. Lammi, M. J., Inkinen, R., Parkkinen, J. J., Hakkinen, T., Jortikka, M., Nelimarkka, L. O., et al. (1994): Expression of reduced amounts of structurally altered aggrecan in articular cartilage chondrocytes exposed to high hydrostatic pressure. *Biochem J* 304, 723-30.
256. Langelier, E., Suetterlin, R., Aebi, U., Buschmann, M. D. (1999): Zonal dependence of the chondrocyte cytoskeleton and in vitro response to load. *Trans Orthop Res Soc* 24, 631.
257. Lark, M. W., Bayne, E. K., Flanagan, J., Harper, C. F., Hoerner, L. A., Hutchinson, N. I., Singer, I. I., Donatelli, S. A., Weidner, J. R., Williams, H. R., Mumford, R. A., Lohmander, L. S. (1997): Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic and rheumatoid joints. *J Clin Invest.* 100, 93-106.

258. Laurent, T. C., Fraser, J. R. E. (1992): Hyaluronan. *FASEB J* 6, 2397-2404.
259. Lee, T. H., Wisniewski, H. G., Vicek, J. (1992): A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J Cell Biol* 116, 545-57.
260. Lee, D. A., Bader, D. L. (1995): The development and characterisation of an in-vitro system to study strain-induced cell deformation in isolated chondrocytes. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31 (11), 828-35.
261. Lee, D. A., Knight, M. M., Bolton, J. F., Idowu, B. D., Kayser, M. V., Bader, D. L. (2000): Chondrocyte deformation within compressed agarose constructs at the cellular and sub-cellular levels. *J Biomech* 33, 81-95.
262. Leipold, H. R., Burton-Wurster, N., Steinmeyer, J., Vernier-Singer, M. S., Lust, G. (1992): Fibronectin and keratan sulfate synthesis by canine articular chondrocytes in culture is modulated by dibutyl cyclic adenosine monophosphate. *J Orthop Res* 10, 33-48.
263. Leisner, T. M., Wencel-Drake, J. D., Wang, W., Lam, S. C. (1999): Bidirectional transmembrane modulation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 conformations. *J Biol Chem* 274, 12945-9.
264. Li, H., Schwartz, N. B. (1995): Gene structure of chick cartilage chondroitin sulphate proteoglycan (aggrecan) core protein. *J Mol Evol* 41, 878-85.
265. Li, K. W., Wang, A. S., Sah, R. L. (2003): Microenvironment regulation of extracellular signal-regulated kinase activity in chondrocytes: effects of culture configuration, interleukin-1 and compressive stress. *Arthritis Rheum* 48, 689-99.
266. Little, C. B., Ghosh, P. (1997): Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 49-62.
267. Liu, H., McKenna, L. A., Dean, M. F. (2000): An N-terminal peptide from link protein can stimulate biosynthesis of collagen by human articular cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 116-22.
268. Löffler, G. (1990): Kohlenhydrate. In: Löffler, G., Petrides, P. E., *Physiologische Chemie*, 4. Auflage, S. 39-54. Springer-Verlag, Berlin.
269. Löffler, G. (1998): Kohlenhydrate. In: Löffler, G., Petrides, P. E., *Physiologische Chemie*, 6. Auflage, S. 129ff. Springer-Verlag, Berlin.
270. Loeser, R. F. (1993): Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins. *Arthritis Rheum* 36, 1103-10.
271. Loeser, R. F., Carlson, C. S., McGee, M. P. (1995): Expression of  $\beta$ 1 integrins by cultured articular chondrocytes and in osteoarthritic cartilage. *Exp Cell Res* 217, 248-57.
272. Loeser, R. F. (2000): Chondrocyte integrin expression and function. *Biorheology* 37, 109-16.
273. Loeser, R. F., Sadiev, S., Tan, L., Goldring, M. B. (2000): Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for  $\alpha$ 1  $\beta$ 1 and  $\alpha$ 2  $\beta$ 1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen. *Osteoarthritis Cart* 8, 96-105.
274. Loeser, R. F. (2003): Systemic and local regulation of articular cartilage metabolism: Where does Leptin fit in the puzzle? *Arthritis Rheum* 48, 3009-12.
275. Lohmander, S. (1988): Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin Rheumatol* 2, 37-62.
276. Lotz, M., Blanco, F. J., von Kempis, J., Dudler, J., Maier, L., Villinger, P. M., Geng, Y. (1995): Cytokine regulation of chondrocyte functions. *J. Rheumatol., Supplement* 43, 104-8.
277. Lundell, A., Olin, A. I., Morgelin, M., al Karadaghi, S., Aspberg, A., Logan, D. T. (2004): Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure* 12, 1495-506.
278. MacConail, M. A., (1951): The movements of bones and joints. IV. The mechanical structure of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 33, 251-7.
279. MacDonald, M. H., Tesch, A. M., Benton, H. P., Willits, N. H. (2002): Characterisation of age- and

- location-associated variations in the composition of articular cartilage from the equine metacarpophalangeal joint. *J Equine Vet Sci* 22, 25-32.
280. Macirowski, T., Tepic, S., Mann, R. W. (1994): Cartilage stresses in the human hip joint. *J Biomech Eng* 116, 10-8.
281. MacLeod, J. N., Burton-Wurster, N., Gu, D. N., Lust, G. (1996): Fibronectin mRNA splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the V, III-15 and I-10 protein segments. *J Biol Chem* 271, 18954-60.
282. Malinin, T., Ouellette, E. A. (2000): Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 483-91.
283. Mansour, J. M., Mow, V. C. (1976): The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. *J Bone Joint Surg Am* 58, 509-16.
284. Marcelino, J., McDevitt, C. A. (1995): Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochim. Biophys. Acta* 1249, 180-8.
285. Margolis, R. U., Margolis, R. K. (1994): Aggrecan-versican-neurocan family proteoglycans. *Methods Enzymol* 245, 105-26.
286. Markmann, A., Hausser, H., Schonherr, E., Kresse, H. (2000): Influence of decorin on transforming growth factor  $\beta$ -mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol* 19, 631-6.
287. Maroudas, A., Palla, G., Gilav, E. (1992): Racemization of aspartic acid in human articular cartilage. *Connect Tiss Res* 28, 161-9.
288. Maroudas, A., Bayliss, M. T., Uchitel-Kaushansky, N., Schneiderman, R., Gilav, E. (1998): Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys* 350, 61-71.
289. Martell-Pelletier, J., Pelletier, J.-P., Cloutier, J.-M., Howell, D. S., Ghandur-Mnaymneh, L., Woessner, J. F. (1984): neutral proteases capable of proteoglycan digesting activity in osteoarthritic and normal human articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism* 27, 305-12.
290. Martin, J. A., Buckwalter, J. A. (1998): Effects of fibronectin on articular cartilage chondrocyte proteoglycan synthesis and response to insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res* 16, 752-7.
291. Martin, J. A., Buckwalter, J. A. (2000): The role of chondrocyte matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 37, 129-40.
292. Matsumoto, K., Kamiya, N., Suwan, K., Atsumi, F., Shimizu, K., Shinomura, T., Yamada, Y., Kimata, K., Watanabe, H. (2006): Versican/PDGF-M aggregates in cartilage: identification and characterisation. *J Biol Chem*, Papers in press.
293. Mauck, R. L., Wang, C. C.-B., Oswald, E. S., Ateshian, G. A., Hung, C. T. (2003): The role of cell seeding density and nutrient supply for articular cartilage tissue engineering with deformational loading. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 879-90.
294. Mauck, R. L., Hung, C. T., Ateshian, G. A. (2003a): Modeling of neutral solute transport in a dynamically loaded porous permeable gel: implications for articular cartilage biosynthesis and tissue engineering. *J Biomech Eng* 125, 602-14.
295. Mayne, R. (1989): Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis and Rheumatism* 32, No.3, 241-6.
296. Melching, L. I., Roughley, P. J. (1990): Studies on the interaction of newly secreted proteoglycan subunits with hyaluronate in human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1035, 20-8.
297. Melrose, J., Smith, S., Cake, M., Read, R., Whitelock, J. (2005): Perlecan displays variable spatial and temporal immunolocalisation patterns in the articular and growth plate cartilages of the ovine stifle joint. *Histochem Cell Biol* 123, 561-71.
298. Meredith, D., Bell, P., McClure, B., Wilkins, R. J. (2002): Functional and molecular characterization of lactic acid transport in bovine articular chondrocytes. *Cell Physiol Biochem* 12, 227-34.
299. Misenheimer, T. M., Hahr, A. J., Harms, A. C., Annis, D. S., Mosher, D. F. (2001): Disulfide connectivity of recombinant C-terminal region of human Thrombospondin 2. *J Biol Chem* 276,

- 45882-7.
300. Miosge, N., Flachsbarth, K., Goetz, W., Schultz, W., Kresse, H., Herken, R. (1994): Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *HISTOCHEM J. Histochemical Journal* 26, 939-945.
  301. Mobasheri, A., Neama, G., Bell, S., Richardson, S., Carter, S. D. (2002): Human articular chondrocytes express three facilitative glucose transporter isoforms: GLUT1, GLUT3 and GLUT9. *Cell Biol Int* 26, 297-300.
  302. Modis, L., Botos, A., Kiviranta, I., Lukacsko, L., Helminen, H. J. (1996): Differences in submicroscopic structure of the extracellular matrix of canine femoral and tibial condylar articular cartilages as revealed by polarization microscopical analysis. *Acta Biol Hung* 47, 341-53.
  303. Mörgelin, M., Heinegard, D., Engel, J., Paulsson, M. (1992): Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. *J Biol Chem* 267, 6137-41.
  304. Mollenhauer, J., Mok, M. T., King, K. B., Gupta, M., Chubinskaya, S., Koepp, H., et al. (1999): Expression of Anchorin CII (cartilage annexin V) in human young, normal adult, and osteoarthritic cartilage. *J Histochem Cytochem* 47, 209-20.
  305. Morales, T. I., Roberts, A. B. (1988): Transforming growth factor  $\beta$  regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. *Journal of Biological Chemistry* 263, 12828-31.
  306. Morales, T. I. (1997): The role and content of endogenous insulin-like growth factor binding proteins in bovine articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 343, 164-72.
  307. Morales, T. I., Hunziker, E. B. (2003): Localization of insulin-like growth factor binding protein-2 in chondrocytes of bovine articular cartilage. *J Orthop Res* 21, 290-5.
  308. Moses, M. A., Wiederschain, D., Wu, I., Fernandez, C. A., Ghazizadeh, V., Lane, W. S., Flynn, E., Sytkowski, A., Tao, T., Langer, R. (1999): Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2645-50.
  309. Mow, V. C., Mansour, J. M. (1977): The nonlinear interaction between cartilage deformation and interstitial fluid flow. *J Biomech* 10, 31-9.
  310. Mow, V. C., Holmes, M. H., Lai, W. M. (1984): Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 17, 377-94.
  311. Mow, V. C., Rosenwasser, M. P. (1988): Articular cartilage. *Biomechanics*. In *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*, 427-463. Edited by S. L.-Y. Woo and J. A. Buckwalter. Park Ridge, Illinois, The American Academy of Orthopaedic Surgeons.
  312. Mow, V. C., Ratcliffe, A., Poole, A. R. (1992): Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13, 67-97.
  313. Mow, V. C., Tohyama, H., Grelsamer, R. P. (1994): Structure-function of knee articular cartilage. *Sports Med Arthroscopy Rev* 2, 189-202.
  314. Mow, V. C., Wang, C. C., Hung, C. T. (1999): The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE. Osteoarthritis and Cartilage* 7, 41-58.
  315. Muehleman, C., Majumdar, S., Issever, A. S., Arfelli, F., Menk, R.-H., Rigon, L., Heitner, G., Reime, B., Metge, J., Wagner, A., Kuettner, K. E., Mollenhauer, J. (2003): X-ray detection of structural orientation in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cart* 12, 97-105.
  316. Müller-Gerbl, M., Schulte, E., Putz, R. (1987): The thickness of the calcified layer of articular cartilage: a function of the load supported? *J Anat* 154, 103-11.
  317. Müller-Gerbl, M. (1998): The subchondral bone plate. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 141, 1-134.
  318. Muir, H. (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays* 17, 1039-48.
  319. Murata, M., Bonassar, L. J., Wright, M., Mankin, H. J., Towle, C. A. (2003): A role for the interleukin-1 receptor in the pathway linking static mechanical compression to decreased proteoglycan synthesis in surface articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 413, 229-35.

320. Murray, R. C., Birch, H.L., Lakhani, K.H., Goodship, A. E. (2001): Biochemical composition of equine carpal articular cartilage is influenced by short-term exercise in a site-specific manner. *Osteoarthr Cart* 9, 625-32.
321. Neumann, T., Kirschstein, S. O., Camacho Gomez, J. A., Kittler, L., Unger, E. (2001): Determination of the net exchange rate of tubulin dimer in steady-state microtubules by fluorescence correlation spectroscopy. *Biol Chem* 382, 387-91.
322. Nguyen, Q., Liu, J., ROUGHLEY, P. J., Mort, J. S. (1991): Link protein as a monitor in situ of endogenous proteolysis in adult human articular cartilage. *Biochem J* 278, 143-7.
323. Nishida, K., Inoue, H., Murakami, T. (1995): Immunohistochemical demonstration of fibronectin in the most superficial layer of normal rabbit articular cartilage. *ANN RHEUM DIS. Annals of the Rheumatic Diseases* 54, 995-998.
324. Nishida, Y., Knudson, C. B., Kuettner, K. E., Knudson, W. (2000): Osteogenic protein-1 promotes the synthesis and retention of extracellular matrix within bovine articular cartilage and chondrocyte cultures. *Osteoarthritis Cart* 8, 127-36.
325. Noyori, K., Jasin, H. E. (1994): Inhibition of human fibroblast adhesion by cartilage surface proteoglycans. *Arthritis Rheum.* 37, 1656-63.
326. O'Hara, B. P., Urban, J. P., Maroudas, A. (1990): Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 49, 536-9.
327. Ohno, S., Im, H. J., Knudson, C. B., Knudson, W. (2005): Hyaluronan oligosaccharide-induced activation of transcription factors in bovine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 52, 800-9.
328. Oldberg, A., Antonsson, P., Hedbom, E., Heinegard, D. (1990): Structure and function of extracellular matrix proteoglycans. *Biochem Soc Trans* 18, 789-92.
329. Olin, A. I., Mörgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegard, D., Aspberg, A. (2001): The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J. Biol. Chem.* 276, 1253-61.
330. Olsen, B. R. (1995): New insights into the function of collagens from genetic analysis. *Curr Opin Cell Biol* 7, 720-7.
331. Olsen, B. R., Winterhalter, K. H., Gordon, M. K. (1995): FACIT collagens and their biological roles. *Trends Glycos. Glycotech* 7, 115-27.
332. Olsen, B. R. (1997): Collagen IX. *INT J BIOCHEM CELL BIOL. International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 29, 555-558.
333. Orford, C. R., Gardner, D. L. (1985): Ultrastructural histochemistry of the surface lamina of normal articular cartilage. *Histochem J* 17, 223-33.
334. Parkkinen, J. J., Paukkonen, K., Pesonen, E., Lammi, M. J., Markkanen, S., Helminen, H. J., Tammi, M. (1990): Quantitation of autoradiographic grains in different zones of articular cartilage with image analyzer. *Histochemistry* 93, 241-45.
335. Parkkinen, J. J., Lammi, M. J., Helminen, H. J., Tammi, M. (1992): Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression in vitro. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 10, 610-620.
336. Pedrozo, H. A., Schwartz, Z., Mokeyev, T., Ornoy, A., Sheng, W.X., Bonewld, L. F., et al. (1999): Vitamin D3 metabolites regulate LTBP-1 and latent TGF- $\beta$ 1 expression and latent TGF- $\beta$ 1 incorporation in the extracellular matrix of chondrocytes. *J Cell Biochem* 72, 151-65.
337. Pelletier, J.-P., Roughley, P. J., DiBattista, J. A., et al. (1991): Are cytokines involved in osteoarthritic pathogenesis? *Semin Arthritis Rheum* 20, 12.
338. Pelletier, J.-P., Faure, M. P., DiBattista, J. A., et al. (1993): Coordinate synthesis of stromelysin, interleukin-I and oncogene proteins in experimental osteoarthritis: An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 142, 95ff.
339. Petit, B., Freyria, A.-M., van der Rest, M., Herbage, D. (1992): Cartilage collagens. In *Biological regulation of the chondrocytes*. Adolphe, M. (ed) CRC Press, Boca Raton, 33-84.
340. Petrides, P. E. (1990): Binde- und Stützgewebe. In: Löffler, G., Petrides, P. E.; *Physiologische Chemie*, 4. Auflage, S. 894-9. Springer-Verlag, Berlin.

341. Petrides, P. E. (1998): Binde- und Stützgewebe. In: Löffler, G., Petrides, P. E.; Physiologische Chemie, 6. Auflage. Springer-Verlag, Berlin.
342. Pfaffle, M., Borchers, M., Deutzmann, R., von der Mark, K., Fernandez, M. P., Selmin, O., Yamada, Y., Martin, G., Ruggiero, F., Garrone, R. (1990): Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family. *Prog. Clin. and Biol. Res.* 349, 147-57.
343. Pfister, B. E., Aydelotte, M. B., Burkhart, W., Kuettner, K. E., Schmid, T. M. (2001): Del1: A new protein in the superficial layer of articular cartilage. *Biochem Biophys Res Comm* 286, 268-73.
344. Pihlajamaa, T., Lankinen, H., Ylöstalo, J., Valmu, L., Jäälinoja, J., Zaucke, F., Spitznagel, L., Gösling, S., Puustinen, A., Mörgelin, M., et al. (2004): Characterization of recombinant amino-terminal NC4 domain of human collagen IX. *J Biol Chem* 279, 24265-73.
345. Pita, J. C., Manicourt, D. H., Müller, F. J. (1990): Centrifugal and biochemical comparison of two populations of proteoglycan aggregates from articular cartilage of immobilized dog joints. *Trans Orthop Res Soc* 15, 17.
346. Plaas, A. H. K., Neame, P. J., Nivens, C. M., Reiss, L. (1990): Identification of the keratan sulphate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem* 265, 20634-40.
347. Plaas, A. H., Wong-Palms, S., Roughley, P. J., Midura, R. J., Hascall, V. C. (1997): Chemical and immunological assay of the nonreducing terminal residues of chondroitin sulfate from human aggrecan. *J Biol Chem* 272, 20603-10.
348. Poole, C. A., Flint, M. H., Beaumont, B. W. (1984): Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat* 138, 113-38.
349. Poole, C. A., Flint, M. H., Beaumont, B. W. (1987): Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* 5, 509-22.
350. Poole, C. A., Flint, M. H., Beaumont, B. W. (1988): Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure. *J Orthop Res* 6, 408-19.
351. Poole, C. A., Glant, T. T., Schofield, J. R. (1991): Chondrons from articular cartilage. (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons. *J Histochem Cytochem* 39, 1175-87.
352. Poole, A. R., Rosenberg, L. C., Reiner, A., Ionescu, M., Bogoch, E., Roughley, P. J. (1996): Contents and distributions of the proteoglycans decorin and biglycan in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *J. Orthop. Res* 14, 681-9.
353. Pratta, M. A., Tortorella, M. D., Arner, E. C. (2000): Age-related changes in aggrecan glycosylation affect cleavage by aggrecanases. *J. Biol. Chem.* 275, 39096-102.
354. Prins, A. P. A., Lipman, J. M., Sokoloff, L. (1982): Effect of purified growth factors on rabbit articular chondrocytes in monolayer culture. I. DNA Synthesis. *Arthritis and Rheumatism* 25, 1217-27.
355. Prins, A. P. A., Lipman, J. M., McDevitt, C. A., Sokoloff, L. (1982): Effect of purified growth factors on rabbit articular chondrocytes in monolayer culture. II. Sulfated proteoglycan synthesis. *Arthritis and Rheumatism* 25, 1228-38.
356. Puhl, W. (1974): [Micromorphology of the surface of normal articular cartilage (author's transl)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 112, 262-72.
357. Putz, R., Fischer, H. (1993): Altersunterschiede der Anordnung der kollagenen Fasern im Gelenkknorpel. *Osteologie Aktuell* VII, 42-4.
358. Qi, W. N., Scully, S. P. (1998): Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF- $\beta$  regulation. *Exp Cell Res* 241, 142-50.
359. Qi, W. N., Scully, S. P. (2000): Extracellular collagen regulates expression of TGF- $\beta$ 1 gene. *J Orthop Res* 18, 928-32.
360. Quinn, T.M., Hunziker, E.B., Häuselmann, H.-J. (2005): Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthr Cart* 13, 672-8.
361. Rabenstein, D. L. (2002): Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 19, 312-31.

362. Ramamurthy, P., Hocking, A. M., McQuillan, D. J. (1996): Recombinant decorin glycoforms. Purification and structure. *J BIOL CHEM. Journal of Biological Chemistry* 271, 19578-19584.
363. Rediske, J., Koehne, C., Melton, R., Ganu, V. (1995): The cell-attachment fragment of fibronectin induces nitric oxide (no) production by bovine articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 38 (Suppl. 9), S155.
364. Reid, D. L., Aydelotte, M. B., Mollenhauer, J. (2000): Cell attachment, collagen binding, and receptor analysis on bovine articular chondrocytes. *J Orthop Res* 18, 364-73.
365. Reinboth, B., Thomas, J., Hanssen, E., Gibson, M. A. (2006):  $\beta$ ig-h3 interacts directly with biglycan and decorin, promotes collagen VI aggregation, and participates in ternary complexing with these macromolecules. *J Biolog Chem, Papers in Press*
366. Rencic, A., Lewis, S. D., Gehris, A. L., Bennet, V. D. (1995): Splicing patterns of fibronectin mRNAs from normal and osteoarthritic human cartilages. *Osteoarthr Cart* 3, 1-10.
367. Repo, R. U., Mitchell, N. (1971): collagen synthesis in mature articular cartilage of the rabbit. *Journal of Bone and Joint Surgery* 53 B, 541-8.
368. Richardson, D. W., Clark, C. C. (1991): Proteoglycan synthesis and content in articular cartilage and cartilage repair tissue in horses. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1004-9.
369. Richardson, D. W., Dodge, G. R. (2000): Effects of interleukin 1- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on the expression of matrix-related genes by cultured equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* 61, 624-30.
370. Richardson, S., Neama, G., Phillips, T., Bell, S., Carter, S. D., Moley, K. H., Moley, J. F., Vannucci, S. J., Mobasheri, A. (2003): Molecular characterisation and partial cDNA cloning of facilitative glucose transporters expressed in human articular chondrocytes: stimulation of 2-deoxyglucose uptake by IGF-1 and elevated MMP-2 secretion by glucose deprivation. *Osteoarthritis Cart* 11, 92-101.
371. Rosenberg, L., Hellmann, W., Kleinschmidt, A. K. (1975): Electron microscopic studies of proteoglycan aggregates from bovine articular cartilage. *Journal of Biological Chemistry.* 250, No.5, 1877-1880.
372. Roughley, P.J., White, R.J. und Santer, V. (1981) *Journal of Biological Chemistry* 256, 12699-12704.
373. Roughley, P. J., Lee, E. R. (1994): Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 28, 385-97.
374. Roughley, P. J. (2001a): Age-associated changes in cartilage matrix. *Clin Orthop* 391S, 153-60.
375. Roughley, P. J. (2001b): Articular cartilage and changes in arthritis. Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res* 3, 342-7.
376. Rudraiah, N., Kasiviswanathan, S. R., Kaloni, P. N. (1991): Generalized dispersion in a synovial fluid of human joints. *Biorheology* 28, 207-19.
377. Ruggiero, F., Petit, B., Ronziere, M. C., Farjanel, J., Hartmann, D. J., Herbage, D. (1993): Composition and organization of the collagen network produced by fetal bovine chondrocytes cultured at high density. *J HISTOCHEM CYTOCHEM. Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 41, 867-875.
378. Sachs, F. (1991): Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. *Mol Cell Biochem* 104, 57-60.
379. Säämänen, A.-M., Tammi, M., Kiviranta, I., Jurvelin, J., Helminen, H. J. (1989): Levels of chondroitin-6-sulfate and nonaggregating proteoglycans at articular cartilage contact sites in the knees of young dogs subjected to moderate running exercise. *Arthritis Rheum.* 32, 1282-92.
380. Säämänen, A.-M., Tammi, M., Jurvelin, J., Kiviranta, I., Helminen, H. J. (1990): Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in the articular cartilage of young canine knee (stifle) joint. *J Orthop Res* 8, 863-73.
381. Sah, R. L., Kim, Y. J., Doong, J.-Y.H., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H., Sandy, J. D. (1989): Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J Orthop Res* 7, 619-36.
382. Sah, R. L., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H.K., Sandy, J. D. (1990): Effects of tissue compression

- on the hyaluronate-binding properties of newly synthesized proteoglycans in cartilage explants. *Biochem J* 267, 803-8.
383. Sah, R. L., Doong, J.-Y.H., Grodzinsky, A. J., Plaas, A. H., Sandy, J. D. (1991): Effects of compression on the loss of newly synthesized proteoglycans and proteins from cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 286, 20-9.
384. Saitta, B., Stekes, D. G., Vissing, H., Timpl, R., Chu, M.-L. (1990): Alternative splicing of the human  $\alpha 2(\text{VI})$  collagen gene generates multiple mRNA transcripts which predict three protein variants with distinct carboxyl termini. *J Biol Chem* 265, 6473-80.
385. Salter, D. M., Hughes, D.E., Simpson, R. and Gardner, D.L. (1992): Integrin expression by human articular chondrocytes. *British J. Rheumatol.*, 31, 231-234
386. Salter, D. M. (1993): Tenascin is increased in cartilage and synovium from arthritic knees. *British J. Rheumatol.* 32, 780-6.
387. Salter, D. M., Godolphin, J. L., Gourlay, M. S. (1995): Chondrocyte heterogeneity: Immunohistologically defined variation of integrin expression at different sites in human fetal knees. *J Histochem Cytochem* 43, 447-57.
388. Sandy, J. D., Boynton, R. E., Flannery, C. R. (1991): Analysis of the catabolism of aggrecan in cartilage explants by quantitation of peptides from the three globular domains. *J Biol Chem* 266, 8198-8205.
389. Sandy, J. D., Plaas, A. H., Koob, T. J. (1995): Pathways of aggrecan processing in joint tissues. Implication for disease mechanism and monitoring. *Acta Orthop Scand Suppl* 266, 26-32.
390. Sarma, A. V., Powell, G. L., LaBerge, M. (2001): Phospholipid composition of articular cartilage boundary lubricant. *J Orthop Res* 19, 671-6.
391. Sauerland, K., Plaas, A. H., Raiss, R. X., Steinmeyer, J. (2003): The sulfation pattern of chondroitin sulfate from articular cartilage explants in response to mechanical loading. *Biochim Biophys Acta* 1638, 241-8.
392. Schalkwijk J, Joosten LAB, van den Berg WB, van Wyk JJ, van den Putte LBA (1989): Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid. *Arthritis Rheum*, 32:1197-1201.
393. Schneidermann, R., Keret, D., Maroudas, A. (1986): Effects of mechanical and osmotic pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study. *J. Orthop. Res.* 4, 393-408.
394. Schumacher, B. L., Hughes, C. E., Kuettner, K. E., Caterson, B., Aydelotte, M. B. (1999): Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J Orthop Res* 17, 110-20.
395. Schumacher, B. L., Su, J.-L., Lindley, K. M., Kuettner, K. E., Cole, A.-A. (2002) : Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in a superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage. *Anat Rec* 266, 241-8.
396. Schwarz, I. M., Hills, B. A. (1998): Surface-active phospholipid as the lubricating component of lubricin. *Br J Rheumatol* 37, 21-6.
397. Schwarzbauer, J. E. (1991): Alternative splicing of fibronectin: three variants, three functions. *BioEssays* 13, 527-33.
398. Sechler, J. L., Takada, Y., Schwarzbauer, J. E. (1996): Altered rate of fibronectin matrix assembly by deletion of the first type III repeats. *J Cell Biol* 134, 573-83.
399. Setton, L. A., Zhu, W., Mow, V. C. (1993): The biphasic poroviscoelastic behavior of articular cartilage: role of the surface zone in governing the compressive behavior. *J Biomech* 26, 581-92.
400. Setton, L. A., Muller, F. J., Pita, J. C., Howell, D. S., Mow, C. (1994): Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 12, 451-63.
401. Shakibaei, M., Merker, H. J. (1999): beta 1-Integrins in the cartilage matrix. *CELL TISSUE RES. Cell and Tissue Research* 296, 565-573.
402. Shaw, L. M., Olsen, B. R. (1991): FACIT collagens: Diverse molecular bridges in extracellular

- matrices. *Trends Biochem Sci* 16, 191-4.
403. Shikhman, A. R., Brinson, D. C., Valbracht, J., Lotz, M. K. (2001): Cytokine regulation of facilitated glucose transport in human articular chondrocytes. *J Immunol* 167, 7001-8.
404. Siczkowski, M., Watt, F. M. (1990): Subpopulations of chondrocytes from different zones of pig articular cartilage. Isolation, growth and proteoglycan synthesis in culture. *Journal of Cell Science* 97, 349-360.
405. Skaggs, D. L., Bachrach, N. M., Cohen, B., Haven-Weiss, L., Chorney, G. S., Mow, V. C. (1993): Differential change in volume of chondrocytes through the depth of the bovine growth plate during compression: A confocal microscopy study. *Trans Orthop Res Soc* 18, 93.
406. Smith, G. N., Jr., Brandt, K. D. (1992): Hypothesis: Can type IX collagen "glue" together intersecting type II fibers in articular cartilage matrix? A proposed mechanism. *J Rheumatol* 19, 14-7.
407. Söder, S., Hambach, L., Lissner, R., Kirchner, T., Aigner, T. (2002): Ultrastructural localisation of type VI collagen in normal adult und osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthr Cart* 10, 464-70.
408. Sottile, J., Mosher, D. F. (1993): Assembly of fibronectin molecules with mutations or deletions of the carboxyl-terminal type I modules. *Biochemistry* 32, 1641-7.
409. Sottile, J., Wiley, S. (1994): Assembly of amino-terminal fibronectin dimers in the extracellular matrix. *J Biol Chem* 269, 17192-8.
410. Steinmeyer, J., Knue, S. (1997): The proteoglycan metabolism of mature bovine articular cartilage explants superimposed to continuously applied cyclic mechanical loading. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 216-21.
411. Steinmeyer, J., Ackermann, B., Raiss, R. X. (1997): Intermittent cyclic loading of cartilage explants modulates the fibronectin metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 331-41.
412. Steinmeyer, J., Ackermann, B. (1999): The effect of continuously applied cyclic mechanical loading on the fibronectin metabolism of articular cartilage explants. *Res Exp Med Berl* 198, 247-60.
413. Sugahara, K., Kitagawa, H. (2000): Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulphated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 518-27.
414. Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., Kitagawa, H. (2003): Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 612-20.
415. Suh, J. K., Li, Z., Woo, S. L. (1995): Dynamic behavior of a biphasic cartilage model under cyclic compressive loading. *J Biomech* 28, 357-64.
416. Sun, D. D., Guo, X. E., Likhitepanichkul, M., Lai, W. M., Mow, V. C. (2004): The influence of the fixed negative charges on mechanical and electrical behaviors of articular cartilage under unconfined compression. *J Biomech Eng* 126, 6-16.
417. Szafranski, J. D., Grodzinski, A. J., Burger, E., Gaschen, V., Hung, H.-H., Hunziker, E. B. (2004): Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. *Osteoarthr Cart* 12, 937-46.
418. Tammi, M., Saamanen, A.M., Jauiluainen, A., Malminen, O., Kiviranta, I., Helminen, H. (1983): Proteoglycan alteration in rabbit knee articular cartilage following physical exercise and immobilisation. *Connective Tissue Research* 11, 45-55.
419. Tesche, F., Miosge, N. (2004): Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. *Osteoarthritis Cart* 12, 852-62.
420. Teshima, R., Otsuka, T., Takasu, N., Yamagata, N., Yamamoto, K. (1995): Structure of the most superficial layer of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 77, 460-4.
421. Teshima, R., Ono, M., Yamashita, Y., Hirakawa, H., Nawata, K., Morio, Y. (2004): Immunohistochemical collagen analysis of the most superficial layer in adult articular cartilage. *J Orthop Sci* 9 (3), 270-3.
422. Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G., Chu, M. I. (2003): Fibulins: A versatile family of extracellular

- matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 479-89.
423. Torzilli, P. A., Mow, V. C. (1976): On the fundamental fluid transport mechanisms through normal and pathological articular cartilage during function - II. The analysis, solution and conclusions. *J Biomech* 9, 587-606.
424. Torzilli, P. A., Mow, V. C. (1976): On the fundamental fluid transport mechanisms through normal and pathological articular cartilage during function--I. The formulation. *J Biomech* 9, 541-52.
425. Torzilli, P. A., Dethmers, D. A., Rose, D. E., Schryuer, H. F. (1983): Movement of interstitial water through loaded articular cartilage. *J Biomech* 16, 169-79.
426. Torzilli, P. A., Adams, T. C., Mis, R. J. (1987): Transient solute diffusion in articular cartilage. *J Biomech* 20, 203-14.
427. Torzilli, P. A. (1993): Effects of temperature, concentration and articular surface removal on transient solute diffusion in articular cartilage. *Med Biol Eng Comput* 31 Suppl, S93-8.
428. Torzilli, P. A., Arduino, J. M., Gregory, J. D., Bansal, M. (1997): Effect of proteoglycan removal on solute mobility in articular cartilage. *J BIOMECH. Journal of Biomechanics* 30, 895-902.
429. Treppo, S., Koepp, H., Quan, E. C., Cole, A. A., Kuettner, K. E., Grodzinsky, A. J. (2000): Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res* 18, 739-48.
430. Trickey, W. R., Lee, M., Guilak, F. (2000): Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage. *J Orthop Res* 18, 891-8.
431. Trickey, W. R., Vail, T. P., Guilak, F. (2004): The role of the cytoskeleton in the viscoelastic properties of human articular chondrocytes. *J Orthop Res* 22, 131-9.
432. Trippel, S. B. (1990): Articular cartilage research. *Curr Opin Rheumatol* 2, 777-82.
433. Trippel, S. B. (1995): Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 43, 129-32.
434. Trippel, S.B., Ehrlich, M. G., Lippiello, L., Mankin, H. J. (1980): Characterization of chondrocytes from bovine articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery Vol. 62-A*, No. 5
435. Tyler, J. A., Bolis, S., Dingle, J. T., et al. (1992): Mediators of matrix metabolism. In Kuettner, K. E., Schleyerbach, R., Peyron, J. G., et al. (eds): *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York, NY, Raven Press, 251-64.
436. Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M., Thorens, B. (2002): GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524, 199-203.
437. Urban, J. P. G., Hall, A. C., Gehl, K. (1993): Regulation of matrix synthesis rates by the ionic and osmotic environment of articular chondrocytes. *J Cell Physiol* 154, 262-70.
438. Urban, J. P. G. (1994): The chondrocyte: a cell under pressure. *Br J Rheumatol* 33, 901-8.
439. Valhmu, W. B., Palmer, G. D., Rivers, P. A., Ebara, S. Cheng, J. F., Fischer, S., Ratcliffe, A. (1995): Structure of the human aggrecan gene: exon-intron organization and association with the protein domains. *Biochem J* 309, 535-42.
440. van der Kraan, P. M., Buma, P., van Kuppevelt, T., van den Berg, W. B. (2002): Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthr Cart* 10, 631-7.
441. van der Rest, M., Garrone, R. (1991): Collagen family of proteins. *FASEB J* 5, 2814-23.
442. van Lent, P. L., van den Berg, W. B., van de Putte, L. B., van den Bersselaar, L. (1988): Electrical charge of a protein determines penetration and localization in hyaline articular cartilage. Quantitative and autoradiographic studies on cartilage of different species, including man. *Rheumatol Int* 8, 145-52.
443. van Susante, J. L., Buma, P., van Beuningen, H. M., van den Berg, W. B., Veth, R. (2000): Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. *J Orthop Res* 18, 68-77.
444. Vanwanseele, B., Lucchinetti, E., Stüssi, E. (2002): The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthr Cart* 10, 408-19.

445. Vaughan-Thomas, A., Young, R. D., Phillips, A. C., Duance, V. C. (2001): Characterization of type XI collagen-proteoglycan interactions. *J Biol Chem* 276, 5303-9.
446. Verbruggen, G., Cornelissen, M., Almqvist, K. F., Wang, L., Elewaut, D., Broddelez, C. et al. (2000): Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthr. Cart.* 8, 170-9.
447. Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S. R., Bank, R. A., Shaw, J. N., Lyons, T. J. et al. (2000): Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation endproducts. *J Biol Chem* 275, 39027-31.
448. Verzijl, N., DeGroot, J., Bank, R. A., Bayliss, M. T., Bijlsma, J. W., Lafeber, F. P. et al. (2001): Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol.* 20, 409-17.
449. Wachsmuth, L., Söder, S., Fan, Z., Finger, F., Aigner, T. (2006): Immunolocalisation of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol*, 21, 477-85.
450. Walker, P. S., Dowson, D., Longfield, M. D., Wright, V. (1968): Boosted lubrication: In synovial joints by fluid entrapment and enrichment. *Ann. Rheum. Dis.* 27, 512-20.
451. Wang, Q., Breinan, H. A., Hsu, H. P., Spector, M. (2000): Healing of defects in canine articular cartilage: distribution of nonvascular alpha smooth muscle actin-containing cells. *Wound Repair Regen* 8, 145-58.
452. Watanabe, H., Gao, L., Sugiyama, S., Doege, K., Kimata, K., Yamada, Y. (1995): Mouse aggrecan, a large cartilage proteoglycan: protein sequence, gene structure and promoter sequence. *Biochem J* 308, 433-40.
453. Watanabe, H., Cheung, S. C., Itano, N., Kimata, K., Yamada, Y. (1997): Identification of hyaluronan-binding domains of aggrecan. *J Biol Chem* 272, 28057-65.
454. Watanabe, H., Yamada, Y., Kimata, K. (1998): Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem Tokyo* 124, 687-93.
455. Watson, P. A. (1991): Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB J* 5, 1013-19.
456. Watt, S. L., Lunstrum, G. P., McDonough, A. M., Keene, D. R., Burgeson, R. E., Morris, N. P. (1992): Characterisation of collagen types XII and XIV from fetal bovine cartilage. *J. Biol. Chem.* 267, 20093-99.
457. Weber, I. T., Harrison, R. W., Iozzo, R. V. (1996): Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 271, 31767-70.
458. Weigel, P. H. (2002): Functional characteristics and catalytic mechanisms of the bacterial hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 54, 201-11.
459. Weiss, A., Livne, E., Bernheim, J., Silbermann, M. (1968): An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 50, 663-73.
460. Welgus, H. G., Fliszar, C. J., Seltzre, J. L., Schmid, T. M., Jeffrey, J. J. (1990): Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase. *J Biol Chem* 265, 13521-7.
461. Wells, T., Davidson, C., Morgelin, M., Bird, J. L., Bayliss, M. T., Dudhia, J. (2003): Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. *Biochem. J.* 370, 69-79.
462. Wiberg, C., Klatt, A. R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J. F., Heinegard, D. et al. (2003): Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J. Biol. Chem.* 278, 37698-704.
463. Wilkins, R. J., Hall, A. C. (1995): Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. *J Cell Physiol* 164, 474-81.
464. Wilkins, R. J., Browning, J. A., Ellory, J. C. (2000): Surviving in a matrix: membrane transport in articular chondrocytes. *J Membr Biol* 177, 95-108.
465. Williamson, A. K., Chen, A. C., Sah, R. L. (2001): Compressive properties and function-

- composition relationships of developing bovine articular cartilage. *J Orthop Res* 19, 1113-21.
466. Wilson, W., van Donkelaar, C. C., van Rietbergen, B., Huiskes, R. (2005): A fibril-reinforced poroviscoelastic swelling model for articular cartilage. *J Biomech* 38, 1195-204.
467. Windhaber, R. A. J., Wilkins, R. J., Meredith, D. (2003): Functional characterisation of glucose transport in bovine articular chondrocytes. *Pflugers Arch* 446, 572-7.
468. Witsch-Prehm, P., Miehke, R., Kresse, H. (1992): Presence of small proteoglycan fragments in normal and arthritic human cartilage. *Arthritis Rheum* 35, 1042-52.
469. Wolf, A., Raiss, R. X., Steinmeyer, J. (2003): Fibronectin metabolism of cartilage explants in response to the frequency of intermittent loading. *J Orthop Res* 21, 1081-9.
470. Wong, M., Wuethrich, P., Eggli, P., Hunziker, E. (1996): Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res* 14, 424-32.
471. Wong, M., Wuethrich, P., Buschmann, M. D., Eggli, P., Hunziker, E. (1997): Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage. *J ORTHOP RES. Journal of Orthopaedic Research* 15, 189-196.
472. Wong, M., Carter, D. R. (2003): Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 33, 1-13.
473. Wu, J. J., Eyre, D. R. (1984): Cartilage type IX collagen is cross-linked by hydroxypyridinium residues. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 1033-9.
474. Wu, J. J., Woods, P. E., Eyre, D. R. (1992): Identification of crosslinking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* 267, 23007-14.
475. Wu, J. J., Eyre, D. R. (1995): Structural analysis of cross-linking domains in cartilage type XI collagen. Insights on polymeric assembly. *J Biol Chem* 270, 18865-70.
476. Xie, D. L., Hui, F., Homandberg, G. A. (1993): Fibronectin fragments alter matrix protein synthesis in cartilage tissue cultured in vitro. *Arch Biochem Biophys* 307, 110-8.
477. Yang, B. L., Cao, L., Kiani, C., Lee, V., Zhang, Y., Adams, M. E. et al. (2000): Tandem repeats are involved in G1 domain inhibition of versican expression and secretion and the G3 domain enhances glycosaminoglycan modification and product secretion via the complement-binding protein-like motif. *J. Biol. Chem.* 275, 21255-61.
478. Yaron, I., Meyer, F. A., Dayer, J.-M., Bleiberg, I., Yaron, M. (1989): Some recombinant human cytokines stimulate glycosaminoglycan synthesis in human synovial fibroblast cultures and inhibit it in human articular cartilage cultures. *Arthritis Rheum.* 32, 173-80.
479. Yasuda, T., Poole, A. R. (2002): A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. *Arthritis Rheum* 46, 138-48.
480. Yonezawa, I., Kato, K., Yagita, H., Yamauchi, Y., Okumura, K. (1996): VLA-5 mediated interaction with fibronectin induces cytokine production by human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 219, 261-5.
481. Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A., Guilak, F. (2006): Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis Cart* 14, 889-97.
482. Young, R. D., Lawrence, P. A., Duance, V. C., Aigner, T., Monaghan, P. (2000): Immunolocalization of collagen types II and III in single fibrils of human articular cartilage. *J Histochem Cytochem* 48, 423-32.
483. Young, A. A., Smith, M. M., Smith, S. M., Cake, M. A., Gosh, P., Read, R. A., Melroes, J., Sonnabend, D. A., Roughley, P. J., Little, C. B. (2005): Regional assessment of articular cartilage gene expression and small proteoglycan metabolism in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy* 7, R852-61.
484. Yu, Q., Toole, B. R. (1995): Biotinylated hyaluronan as a probe for detection of binding proteins in cells and tissues. *Biotechniques* 19, 122-8.
485. Zambrano, N. Z., Montes, G. S., Shigihara, K. M., Sanchez, E. M., Junqueira, L. C. U. (1982):

- Collagen arrangement in cartilage. *Acta Anat.* 113, 26-38.
486. Zanetti, M., Ratcliffe, A., Watt, F. M. (1985): Two subpopulations of differentiated chondrocytes identified with a monoclonal antibody to keratan sulfate. *J Cell Biol* 101, 53-9.
487. Zhang, D, Burton-Wurster, N., Lust, G. (1995): Alternative splicing of ED-A and ED-B sequences of fibronectin pre-mRNA differs in chondrocytes from different cartilaginous tissues and can be modulated by biological factors. *J Biol Chem* 270, 1817-22.
488. Zhou, S., Cui, Z., Urban, J. P. (2004): Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum.* 50, 3915-24.
489. Zhu, W., Mow, V. C., Koob, T. J., Eyre, D. R. (1993): Viscoelastic shear properties of articular cartilage and the effects of glycosidase treatment. *J Orthop Res* 11, 771-81.
490. Zhu, W., Iatridis, J. C., Hlibczuk, V., Ratcliffe, A., Mow, V. C. (1996): Determination of collagen-proteoglycan interactions in vitro. *J BIOMECH. Journal of Biomechanics* 29, 773-783.

