
Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig- Maximilians- Universität München

Vorstand: Univ. Professor Dr. med. Dr. h.c. Reinhard Putz

„Molekulare Zusammensetzung der extrazellulären
Matrix im Tarsus superior des Menschen“

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von
Jörg Neufang
aus
Holzheim/Neuss
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Stefan Milz

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. Christoph Hintschich
Priv.- Doz. Dr. med. Iris Bittmann

Dekan: Professor Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09. November 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Anatomische Verhältnisse	5
1.2. Molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Bindegewebe.....	7
1.3. Fragestellung	10
2. Material und Methode	11
2.1. Material	11
2.2.1. Entnahme, Präparation und Zwischenlagerung.....	12
2.2.2. Feinpräparation und Gefrierschnittanfertigung.....	12
2.2.3. Immunhistochemische Markierung.....	13
2.2.4. Mikroskopische Auswertung	16
3. Ergebnisse	17
3.1. Verteilung der Kollagene	17
3.1.1. Kollagen I.....	17
3.1.2. Kollagen II	18
3.1.3. Kollagen III	19
3.1.4. Kollagen VI.....	20
3.2. Verteilung der Glycosaminoglykane.....	21
3.2.1. Chondroitin- 4- sulfat	21
3.2.2. Chondroitin- 4- sulfat und Dermatansulfat	23
3.2.3. Chondroitin- 6- sulfat.....	24
3.2.4. Chondroitin- 6- sulfat (natives Epitop)	25
3.2.5. Chondroitin- 6- sulfat (oversulphated).....	26
3.2.6. Keratansulfat	27
3.3. Verteilung der Proteoglykane und der Glykoproteine	28
3.3.1. Aggrecan	28
3.3.2. Link Protein.....	29
3.3.4. Tenascin	31
3.3.5. Cartilage- Oligometric- Matrix- Protein	32
3.3.6. Kontrolle	34
4. Diskussion	35

4.1. Wertigkeit der Methode	35
4.2. Interpretation der Untersuchungsergebnisse	37
4.2.1. Kollagene	37
4.2.2. Glycosaminoglykane.....	38
4.2.3. Proteoglykane und Glykoproteine.....	39
4.3. Klinisch- funktionelle Relevanz.....	42
5. Zusammenfassung	44
6. Literatur	45
7. Lebenslauf.....	54

1. Einleitung

1.1. Anatomische Verhältnisse

Die Augenlider – Palpebrae – bedecken den Bulbus oculi und werden auf ihrer Vorderseite von verhorntem Plattenepithel überzogen, während ihre Rückseite mit einem schleimhautähnlichen Überzug, der Tunica conjunctiva palpebralis, bedeckt ist. Diese verbindet das Augenlid auch mit dem Bulbus oculi. Um den Augenlidern eine gewisse Festigkeit zu verleihen, schließt sich das Bindegewebe der Tunica conjunctiva dem Tarsus (Williams 1995 et al.) des Augenlides an: „einer dicken und sehr festen Bindegewebsplatte“ (Wallraff 1960), welcher früher auch als Lidknorpel (Böhm & von Davidoff 1895) oder als knorpelig bzw. als faserknorpelig (Szymonowicz 1924) beschrieben wurde. Tarsus superior (Abb.1) und Tarsus inferior sind jeweils über das Ligamentum palpebrale mediale und Ligamentum palpebrale laterale mit der medialen und lateralen Wand der knöchernen Orbita verbunden (Frick et al. 1992).

Im Tarsus liegen die sehr großen, modifizierten Glandulae tarsales (Meibom'sche Drüsen), deren Ausführungsgänge auf der hinteren Lidkante münden. Sie fetten den Lidrand ein und verhindern, dass dieser von Tränenflüssigkeit überschritten wird (Wallraff 1960). Das lipophile Sekret der Gl. tarsales trägt außerdem wesentlich zur Funktion des Tränenfilms bei (Williams et al. 1995, Lozato et al. 2001). Das ölige Sekret dieser Drüsen verteilt sich mit dem Tränenfilm über den Bulbus und trägt zur Stabilität der wässrigen Barriere bei, die das Auge vor Austrocknung bewahrt (McCulley & Shine 2004).

Im subkutanen Gewebe des Oberlides liegt die Pars palpebralis des M. orbicularis oculi, die Sehne des M. levator palpebrae superior breitet sich darunter flächig aus und setzt hauptsächlich am Tarsus superior an. Der Tarsus superior dient als Anheftungszone für diesen Muskel und trägt wesentlich dazu bei, dass das Oberlid dem Bulbus formschlüssig anliegt. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, benötigt der Tarsus superior eine gewisse mechanische Festigkeit, um den auf ihn einwirkenden Kräften zu widerstehen. Schließlich enthalten beide Lider noch glattes Muskelgewebe – M. tarsalis superior und inferior – welches dazu beiträgt, die Lidspalte offen zu halten (Wallraff 1960).

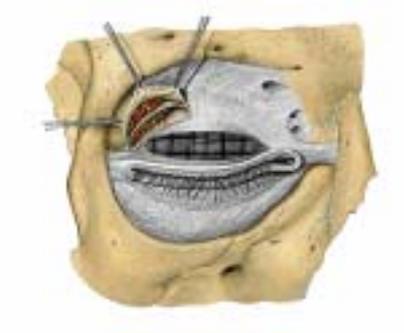


Abbildung 1: Aditus orbitalis mit Tarsus superior (grau gemustert). Skizze nach Sobotta (Putz & Pabst 2000)

1.2. Molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Bindegewebe

Bestandteile des Bindegewebes sind die hinsichtlich Gestalt und Funktion sehr unterschiedlich auftretenden Zellen sowie große Mengen von Interzellulärsustanzen, die unter dem Oberbegriff der extrazellulären Matrix zusammengefasst werden (Drenckhan & Kugler 2003).

Bei den Zellen unterscheidet man die spezifischen Bindegewebszellen wie die Fibroblasten, (aber auch Chondrozyten, Osteozyten) die alle Komponenten der Fasern und der Grundsubstanz synthetisieren, und die eingewanderten Zellen, die der unspezifischen und spezifischen Abwehr dienen.

Die extrazelluläre Matrix wiederum hat einen relativ ungeformten Anteil, die Grundsubstanz (bestehend aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen) und einen geformten Faseranteil, der sich aus den verschiedenen Kollagentypen zusammensetzt. Die mechanische Belastbarkeit eines Gewebes wird durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Fasern und der Polysacharide bestimmt: Je höher die mechanische Beanspruchung, desto größer der Reiz für die Synthese und den Umsatz von Kollagenfasern und Grundsubstanz (Benjamin & Evans 1990, Drenckhan & Kugler 2003, Abb. 2). Die Hauptform der Kollagenfasern des faserreichen Bindegewebes (nicht jedoch des Knorpelgewebes) besteht aus Kollagen Typ I, welche dem Bindegewebe aufgrund ihrer Zugfestigkeit eine hohe mechanische Widerstandskraft verleiht.

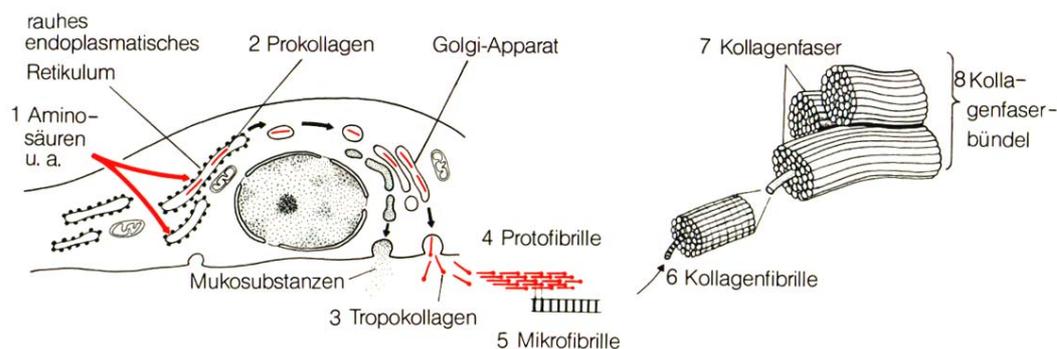


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kollagenfaserbildung. Wasserlösliche Vorstufen werden intrazellulär gebildet, in den Extrazellulärraum sezerniert und dort zu wasserunlöslichen Makromolekülen zusammengefügt. Skizze nach Schmidt & Schiebeler (2005)

Zwischen den Kollagenfasern befinden sich verschiedene Moleküle der Grundsubstanz, welche mit den Kollagenfasern interagieren und unterschiedlich große Mengen von Wasser binden können.

Je nach Gewebetypus gibt es Proteoglykane, welche charakteristisch für Knorpelgewebe oder für faserreiches Bindegewebe sind. Einer der Hauptvertreter der knorpeltypischen Proteoglykane ist Aggrecan. Das Aggrecanmolekül besteht aus einem Kernprotein, an welches verschiedene Glykosaminoglykanketten gebunden sind (Abb. 3). Über ein Verbindungsprotein (link protein) kann es mit Hyaluronsäure große, stark hydratisierte Aggregate bilden und trägt somit wesentlich zur Resistenz eines Gewebes gegen Kompression bei.

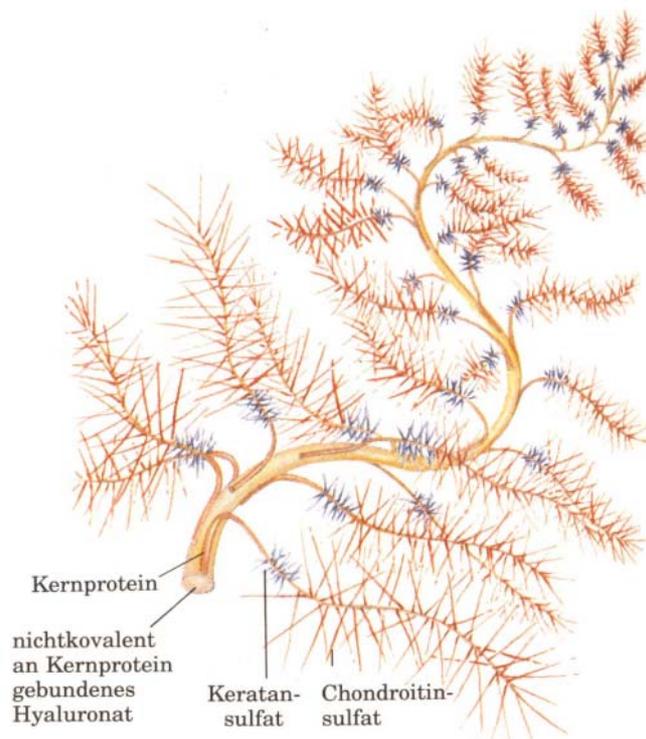


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Struktur des Aggrecans und seiner Interaktion mit Hyaluronsäure. Durch Anlagerung der hydratisierten Aggrecanmoleküle an Hyaluronsäure entstehen gelartige Komplexe, welche durch das Kollagenfasergerüst des Gewebes am Ort gehalten werden und so zur Druckresistenz beitragen

Skizze aus Prinzipien der Biochemie (Lehninger et al. 2001)

Neben den isolierten Gewebetypen gilt das gemeinsame Auftreten von Kollagen I und II (Benjamin et al. 1991) als Nachweis faserknorpeltypischer Grundsubstanz. Außerdem lassen sich zumeist verschiedene sulfatierte Glykosaminoglykane, in der Regel in Kombination mit Aggrecan nachweisen (Vogel & Koob 1995).

Bisherige Untersuchungen der extrazellulären Matrix wurden häufig an Tieren durchgeführt (v.a. an Ratten und Kaninchen). Dabei ließen sich beispielsweise im Bereich der Anheftung der Achillessehne der Ratte Kollagen II, Chondroitin-6-sulfat und wenig Keratansulfat (Rufai et al. 1992) nachweisen. Keratansulfat lässt sich im Gegensatz dazu im

Quadricepsansatz der Ratte nicht nachweisen, während Chondroitinsulfat und Kollagen II positiv markiert sind. Es wird dementsprechend vermutet, dass Keratansulfat, anders als beim Menschen, in der extrazellulären Matrix der Ratte eher spärlich vorkommt (Benjamin et al. 1991, Ralphs et al. 1991). Die detaillierte Aufschlüsselung der Matrix eines menschlichen Faserknorpels erfolgt im Ansatz der Ligamenta transversa acetabuli und atlantis (Milz et al. 2001). Hier wurden die Glykosaminoglykane Chondroitin- 4- und 6- sulfat, sowie Dermatan- und Keratansulfat nachgewiesen. Die Anheftung der Bänder ist positiv für Kollagen I und II. Aufgrund der in der älteren Literatur beschriebenen Ähnlichkeit des Tarsus superior mit Geweben vom faserreichen und/oder knorpeligen Typus stellt sich die Frage, ob auch hier ein Zusammenhang zwischen der molekularen Zusammensetzung und der lokalen mechanischen Beanspruchung besteht.

1.3. Fragestellung

Ziel der Untersuchung ist es, die Verteilung von Kollagenen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix des Tarsus superior zu bestimmen und diese Befunde mit Ergebnissen aus anderen menschlichen Bindegeweben zu vergleichen.

Im Einzelnen werden folgende Punkte untersucht:

1. Verteilung der Kollagene
Typ I, II, III und VI

2. Verteilung der Glycosaminoglykane
Dermatansulfat, Keratansulfat, Chondroitin- 4- sulfat und Chondroitin- 6- sulfat

3. Verteilung der Proteoglykane und der Glykoproteine
Aggrecan, Link Protein, Versican, Tenascin und Cartilage Oligomeric Matrix Protein

4. Klinisch- funktionelle Relevanz der nachgewiesenen Matrixbestandteile

2. Material und Methode

2.1. Material

Für die vorliegende Untersuchung werden bei 14 verschiedenen menschlichen Spendern jeweils der Tarsus superior als auch der Tarsus inferior eines Auges entnommen (Tab. 1). Die Donatoren sind beiderlei Geschlechtes, wobei etwas mehr männliche ($n = 8$) als weibliche ($n = 6$) Augenlider untersucht werden. Das Alter der Verstorbenen liegt zum Zeitpunkt des Todes zwischen 58- und 87 Jahren, die Entnahme der für die Untersuchung benötigten Tarsi erfolgt nicht später als 48 Stunden post mortem vom noch unfixierten Leichnam über einen Zeitraum von insgesamt 6 Wochen. Es werden nur Präparate untersucht, bei denen makroskopisch keine pathologischen Veränderungen am Lid festgestellt werden können. Auch aus der jeweiligen Todesbescheinigung kann in keinem der Fälle auf eine für die Untersuchung beeinträchtigende Augenerkrankung geschlossen werden.

Donatoren Nummer	Leichennummer Anatomie	Alter in Jahren	Geschlecht	Körpergröße in cm	Körpergewicht in kg
1	73/2003	58	Männlich	160	48
2	74/2003	84	Männlich	172	66
3	75/2003	55	Männlich	172	57
4	76/2003	81	Weiblich	154	42
5	77/2003	79	Männlich	172	58
6	78/2003	82	Männlich	167	48
7	80/2003	81	Männlich	180	51
8	81/2003	86	Weiblich	154	41
9	82/2003	78	Männlich	176	75
10	83/2003	77	Weiblich	163	45
11	84/2003	84	Weiblich	158	37
12	85/2003	87	Weiblich	156	38
13	86/2003	76	Männlich	165	55
14	96/2003	84	Weiblich	159	66

Tabelle 1: Übersicht der Donatoren

2.2. Methode

2.2.1. Entnahme, Präparation und Zwischenlagerung

Die Entnahme erfolgt primär durch eine präzise Inzision unterhalb des Ober- bzw. Unterlides, zwischen dem Limbus anterior palpebrae und dem Limbus posterior palpebrae (Abb. 4), um dann anschließend im bindegewebigen Raum stumpf den Tarsus gegen das Lid ab zu präparieren, wobei die Conjunctiva jeweils am entsprechenden Tarsus fixiert bleibt. Final wird der so gewonnene Tarsus kaudal vom Lid abgetrennt, wobei das Lid mit der auf ihrer Außenseite überzogenen Haut möglichst nicht in Mitleidenschaft gezogen wird, um auf diese Weise die anatomische Situation wieder optimal zu rekonstruieren.

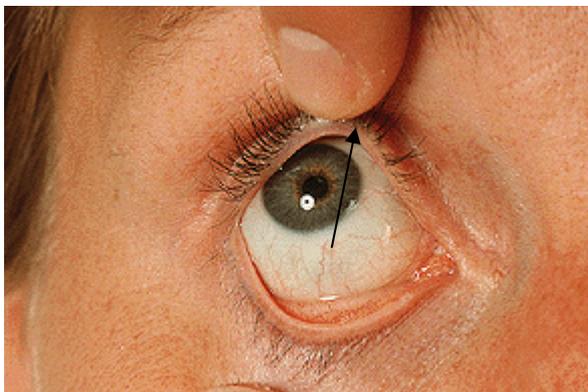


Abbildung 4: Augenlider mit Limbus anterior- und posterior palpebrae. Der Pfeil kennzeichnet die Inzision zur Entnahme des Tarsus superior. Abbildung aus Sobotta (Putz & Pabst 2000)

Die auf diese Weise gewonnenen Präparate werden direkt nach Entnahme in 100% Methanol fixiert und bei 4 Grad Celsius für mindestens 3 Tage im Kühlschrank aufbewahrt, um eine optimale Durchdringung mit Fixierungsmedium zu gewährleisten. Danach erfolgt eine Lagerung bei minus 20 Grad Celsius bis zur Anfertigung der Schnitte mit dem Kryomikrotom.

2.2.2. Feinpräparation und Gefrierschnittanfertigung

Zur Anfertigung der für die immunhistochemische Markierung benötigten Präparate, werden die Proben zunächst 24 Stunden vor Anfertigung der Kryoschnitte aus dem Methanol entnommen und in einer 5% Saccharoselösung (in PBS) bei 4 Grad Celsius infiltriert. Diese Behandlung soll ein möglichst gleichmäßiges Einfrieren des Gewebes gewährleisten sowie die Bildung größerer Eiskristalle verhindern, die beim Schneiden zu Artefakten führen

würden. Anschließend werden an den Präparaten sorgfältig Reste von Fett- und Bindegewebe entfernt, so dass lediglich der Tarsus superior und umgebendes Gewebe übrig bleibt. Der Tarsus superior wird dann mit Gefriermedium (Tissue freezing medium[®] der Firma Jung) auf einem runden Präparathalter aufgefroren. Das Schneiden der Präparate erfolgt mit Hilfe des Kryomikrotoms HM 500 OMV der Firma Microm. Nach Justierung der Präparate erfolgen zunächst einige Trimmschnitte mit 40 µm bis eine für die Untersuchung korrekte Schnittebene erreicht wird. Danach werden je 2 Schnitte (Dicke 12 µm) auf einen Objektträger aufgebracht, insgesamt erfolgt eine Serie mit jeweils 50 Schnitten pro Tarsus superior.

2.2.3. Immunhistochemische Markierung

Die angefertigten Gefrierschnitte werden in aufsteigender Probenreihenfolge auf ihren Objektträgern mit einem Dako-Pen umrandet, um ein Verlaufen der aufzutragenden Reagenzien zu verhindern. Da in der Regel jeder Objektträger mit jeweils zwei Schnitten versehen ist, die im Färbeverlauf mit unterschiedlichen Markierungen versehen werden, ist dieser Teilschritt eine unabdingbare Voraussetzung zum Gelingen der immunhistochemischen Markierung. Die Proben werden anschließend 5 Minuten in einer PBS + Tween 20 (0,1%)- Lösung rehydriert, um sie für die Enzymbehandlung vorzubereiten. Dieser Schritt wird benötigt, um die verschiedenen Epitope der Gefrierschnitte zu demaskieren, damit zu einem späteren Zeitpunkt die Primärantikörper erfolgreich am entsprechenden Antigen binden können. Die verwendeten Enzyme sind Chondroitinase ACII (0,25 U/ml), Chondroitinase ABC (0,25 U/ml) sowie ein Komplex aus Hyaluronidase (1,5 U/ml). Alle spezifischen Inkubationsschritte erfolgen unter Verwendung einer feuchten Kammer, um die Präparate vor Austrocknung zu schützen. Nach einer Enzymbehandlung der Proben für 30 Minuten bei 37 Celsius im Brutschrank werden die Proben 3 Waschsritten in PBS + Tween 20 (0,1%) unterzogen. Jeder der Waschsritte dauert 5 Minuten. Um unspezifische Proteinbindungen am Präparat zu reduzieren, werden die Proben anschließend mit konzentriertem Pferdeserum (Verdünnung 1:20) abgesättigt, welches für eine Zeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur appliziert wird. Nach anschließendem Abklopfen des Serums wird die immunhistochemische Markierung mit den entsprechenden primären Antikörpern durchgeführt.

Nachweis	AK	Enzym	Wirt	Quelle	Referenz
Kollagen I	Col 1 (1:2000)	Hyal. (1,5 U/ml) Ch. ABC (0,25U/ml)	Maus	Sigma	Mayne 1988
Kollagen II	CIICI (1:6)	Hyal. (1,5 U/ml) Ch. ABC (0,25 U/ml)	Maus	DSHB	Holmdahl et al., 1986
Kollagen III	FH-7A (1:4000)	Hyal. (1,5 U/ml) Ch. ABC (0,25 U/ml)	Maus	Sigma	Olsen & Ninomiya 1993
Kollagen VI	5C6 (1:10)	Hyal. (1,5 U/ml) Ch. ABC (0,25 U/ml)	Maus	DSHB	Hessle & Engvall 1984
Dermatan- sulfat	2B6 (1:1500)	Ch. ABC (0,25 U/ml)	Maus	B. Caterson	Caterson et. al., 1985
Chondroitin- 4- sulfat	2B6 (1:1500)	Ch. ACII (0,25 U/ml)	Maus	B. Caterson	Caterson et. al., 1985
Chondroitin- 6- sulfat	3B3 (1:150)	Ch. ABC (0,25 U/ml)	Maus	B. Caterson	Caterson et. al., 1985
Chondroitin- 6- sulfat	3B3 (1:150)	PBS	Maus	B. Caterson	Caterson et. al., 1990
Chondroitin- 6- sulfat	7D4 (1:350)	PBS	Maus	B. Caterson	Caterson et. al., 1985
Keratan- sulfat	5D4 (1:1500)	PBS	Maus	B. Caterson	Caterson et. al., 1983
Aggrecan	1C6 (1:5)	Ch. ACII (0,25 U/ml)	Maus	B. Caterson	Calabro et. al., 1992
Link- Protein	8A4 (1:5)	Ch. ACII (0,25 U/ml)	Maus	B. Caterson	Calabro et. al., 1992
Versican	12C5 (1:5)	Ch. ACII (0,25 U/ml)	Maus	DSHB	Asher et al., 1991, 1995
Tenascin	T2H5 (1:100)	Ch. ACII (0,25 U/ml)	Maus	Seratec	Verstraeten et al., 1992
Cartilage Oligometric	Comp (1:20)	PBS	Maus	keine	keine

Tabelle 2: Aufstellung der zur immunhistochemischen Markierung verwendeten Primärantikörper
 Legende: Ch. ACII: Chondroitinase ACII; Ch. ABC: Chondroitinase ABC;
 Hyal. Hyaluronidase; DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit den oben beschriebenen Primärantikörpern erfolgen wiederum 3 Waschvorgänge mit der PBS + Tween 20 (0,1%)-Lösung. Bevor der Sekundärantikörper aufgetragen wird, empfiehlt sich die Zubereitung eines Avidin- Biotin- Peroxidase- Komplexes, welcher in einem späteren Schritt für die eigentliche Farbreaktion verantwortlich ist. Alle Reagenzien dafür finden sich im Vectstain Elite ABC- Kit der Firma Vector Laboratories (Burlingame CA 94010, USA) und werden bis zum Auftragen im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach Beendigung dieses zwischengeschalteten Arbeitsschrittes werden die Sekundärantikörper aufgetragen und wiederum für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den Proben inkubiert. Die Sekundärantikörper aus dem Pferd sind gegen Maus IgG gerichtet, biotinyliert und werden in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Es folgen wiederum 3 Waschvorgänge in der PBS + Tween 20 (0,1%)- Lösung für jeweils 5 Minuten.

Erst jetzt erfolgt die Auftragung des zuvor angesetzten Peroxidase- Avidin- Biotin- Komplexes für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließender Waschung in PBS + Tween 20 (0,1%)- Lösung. Zur Färbung kommt nun der DAB- Komplex zum Einsatz, der mit 2,5 ml Aqua dest., 2 Tropfen Pufferkonzentrat, 2 Tropfen DAB-Lösung sowie mit einem Tropfen H₂O₂ und einem Tropfen Nickellösung angesetzt wird. Unter Lichtausschluss werden die Schnitte 4 Minuten lang entwickelt, der Überstand wird mit Leitungswasser abgespült. Eine Kernfärbung erfolgt mit Meyer's Hämatoxylin.

Nach Differenzierung in Leitungswasser werden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, beginnend mit 70% über 80% und 90% bis hin zu zwei Fraktionen mit jeweils 100%. Die Schnitte verweilen jeweils 5 Minuten in der entsprechenden Fraktion, bevor sie am Ende weitere 5 Minuten mit je zwei Xylolfraktionen zu 100% behandelt werden. Zum Schluss erfolgt das Eindecken mit DPX (Fluka). Die eingedeckten Präparate werden 3- 5 Tage flach gelagert, bis das Xylol weitgehend verdunstet und die DPX- Eindeck- Lösung getrocknet ist. Erst zu diesem Zeitpunkt kann mit der mikroskopischen Auswertung begonnen werden.

2.2.4. Mikroskopische Auswertung

Für die mikroskopische Auswertung werden die in Sagittalebene geschnittenen Tarsi superiores in fünf Sektoren unterteilt. Dabei werden drei Zonen und zusätzlich die Glandulae tarsales sowie die Lamina propria getrennt von einander beurteilt. Zone 1 steht für das distale Lidrandende, in der über wiegend apo- und holokrine Drüsen zu finden sind, in der Zone 2 befindet sich der eigentliche Tarsus, der hier klar abgegrenzt werden kann und in welchem sich die Gl. tarsales (Meibom'sche- Drüsen) mit ihren Ausführungsgängen befinden. Zone 3 beschreibt den proximalen Anteil der Lidränder. Besonderes Augenmerk wird außerdem auf die Lamina propria der Tunica conjunctivalis gerichtet, bei der es bei bestimmten AK-Nachweisen zu einer deutlichen Markierung kommt. Jeder dieser fünf Sektoren wird für sich gesondert untersucht und nach folgendem Schema bewertet:

0 = keine Markierung

+ = positive Markierung

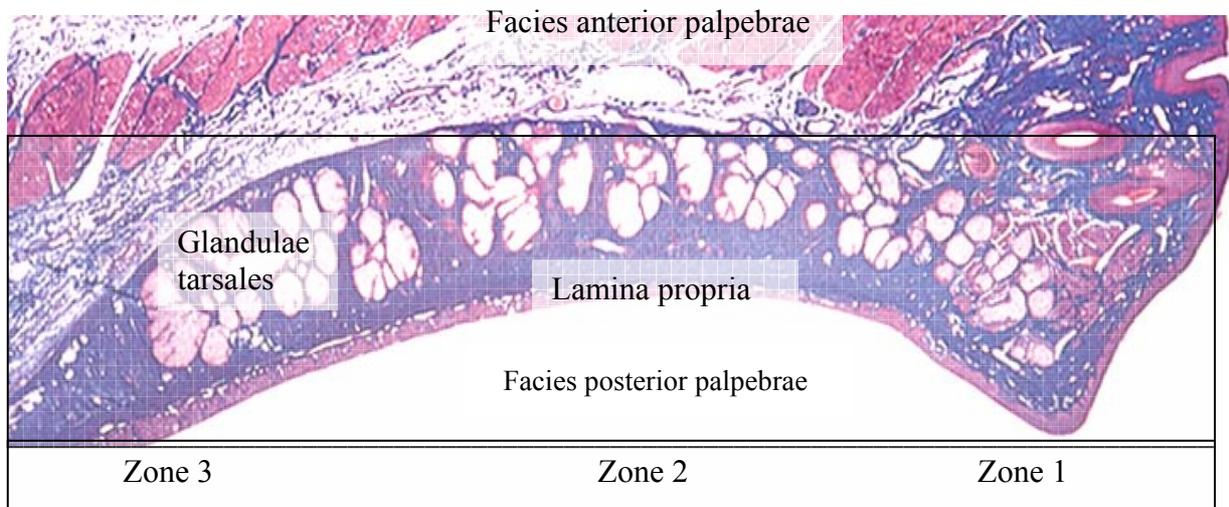


Abbildung 5: Palpebra superior mit zonaler Gliederung in verschiedene Sektoren. Skizze nach Sobotta (Putz & Pabst 2000)

3. Ergebnisse

3.1. Verteilung der Kollagene

3.1.1. Kollagen I

Für Kollagen I zeigt sich stets eine gleichmäßige Markierung in allen fünf untersuchten Sektoren der Präparate. Dabei färbt sich insbesondere die Lamina propria genauso wie die periglandulären Bereiche der Glandulae tarsales. Auch die distalen- und proximalen Zonen 1 und 2 weisen ein nahezu identisches Markierungsfeld auf.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	+	+	+	+	+

Tabelle 3: Markierung für Kollagen I [Col 1 + Hyal. (1,5 U/ml) & Ch. ABC (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

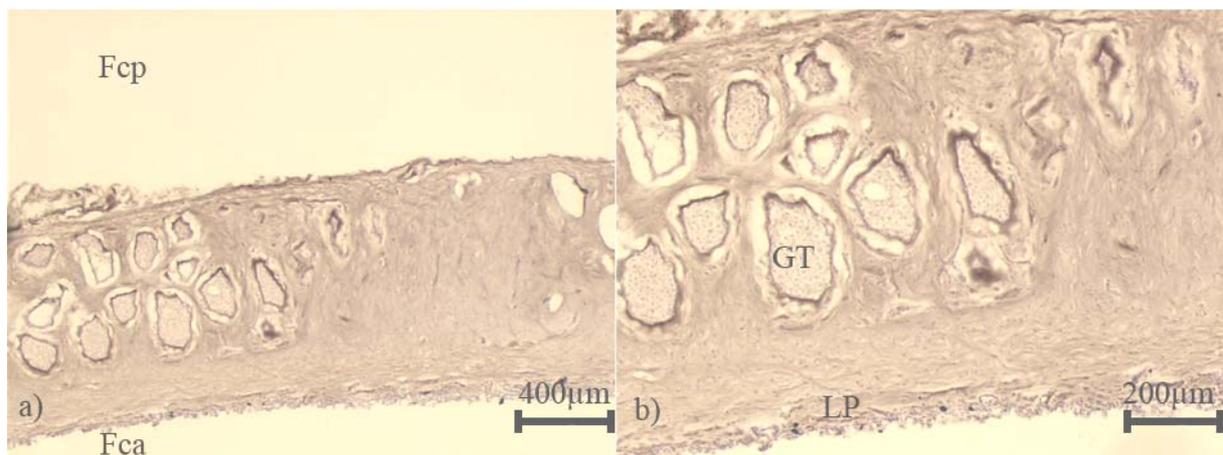


Abbildung 6: Markierung mit Col 1 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
FcP = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.1.2. Kollagen II

In keinem der fünf untersuchten Sektoren ist bei den vorliegenden Präparaten eine Markierung für Kollagen II nachweisbar.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	0	0	0	0	0

Tabelle 4: Markierung für Kollagen II [CIICI + Hyal. (1,5 U/ml) & Ch. ABC (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

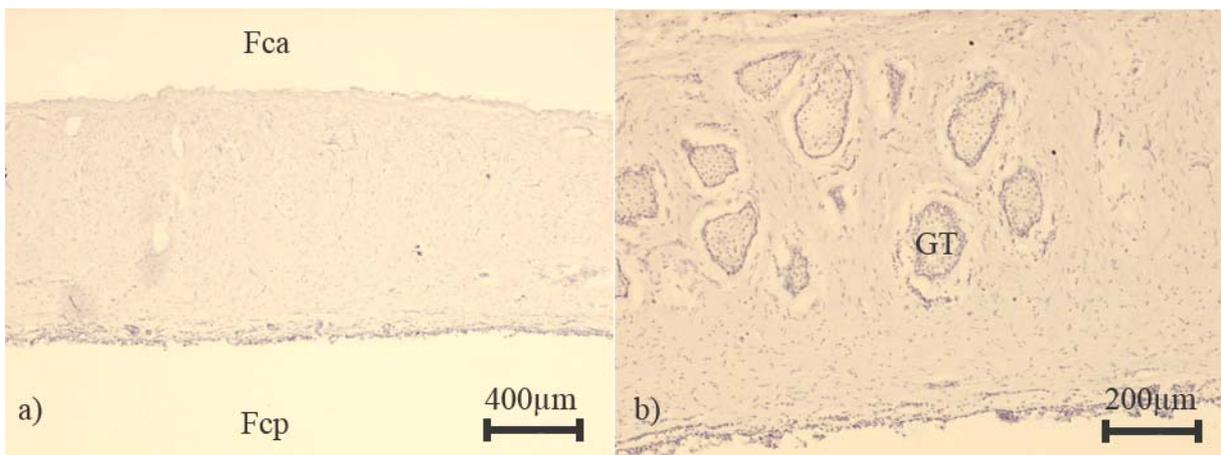


Abbildung 7: Markierung mit CIICI in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.1.3. Kollagen III

Alle untersuchten Präparate zeigen wie beim Kollagen I ein einheitliches positives Markierungsfeld. Sowohl der proximale als auch der distale Abschnitt der Präparate ist markiert, deutliche Intensivierung allerdings in der Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis. Nur in einer Untersuchung zeigt sich im periglandulären Bereich eine unzureichende Markierung.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	+	+	+	+	+

Tabelle 5: Markierung für Kollagen III [FH-7A + Hyal. (1,5 U/ml) & Ch. ABC (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

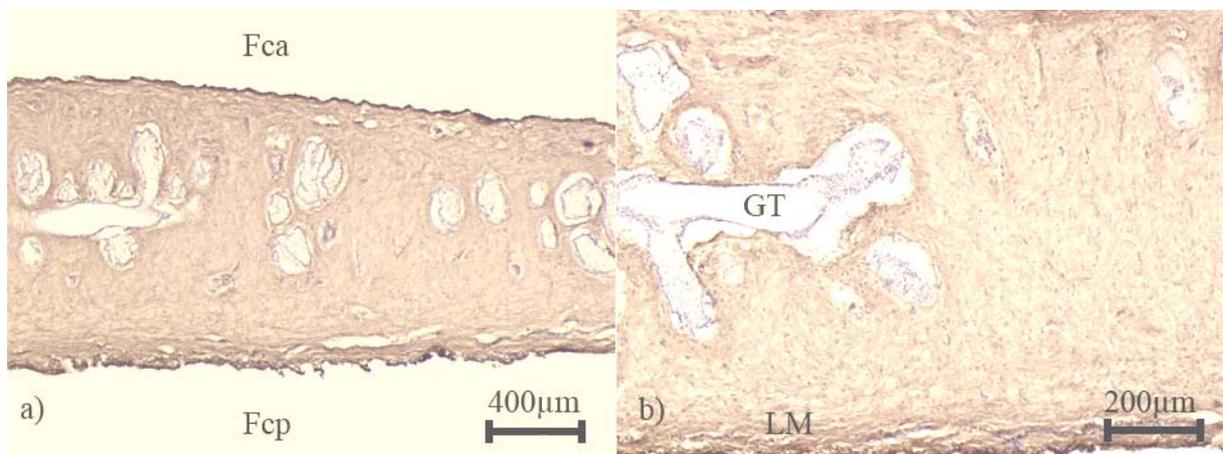


Abbildung 8: Markierung mit FH7A in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung

FcP = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.1.4. Kollagen VI

Es kann eine durchgehende positive Markierung in allen fünf Sektoren der untersuchten Präparate gezeigt werden. Ähnlich dem Färbeverhalten der Kollagene vom Typ I- und III zeigt sich insbesondere eine homogene Färbung in der Tarsalzone, auch periglandulär ist eine positive Markierung sichtbar.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	+	+	+	+	+

Tabelle 6: Markierung für Kollagen VI [5C6 + Hyal. (1,5 U/ml) & Ch. ABC (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

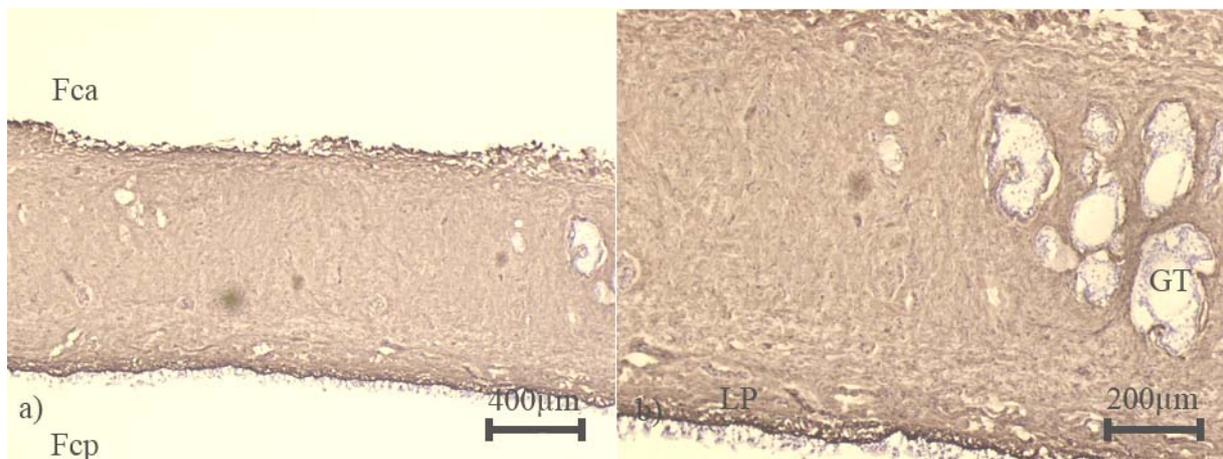


Abbildung 9: Markierung mit 5C6 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
FcP = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.2. Verteilung der Glycosaminoglykane

3.2.1. Chondroitin- 4- sulfat

Die Intensität der Glycosaminoglykanmarkierungen weist eine gewisse Variabilität im Vergleich zu der der Kollagene auf. Während die Tarsalzone als einzige ein sehr einheitliches Färbeverhalten aufweist, unterliegt das Markierungsbild der übrigen Sektoren in den untersuchten Präparaten größeren Schwankungen.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	+	+	0	+	0
2	+	+	+	+	+
3	+	+	0	+	+
4	+	+	0	+	0
5	+	+	0	+	0
6	+	+	+	+	0
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	0	+	+	+	0
12	0	+	+	0	0
13	+	+	+	0	0
14	0	+	0	+	0

Tabelle 7: Markierung für Chondroitin- 4- sulfat [2B6 + Ch. ACII (0,25 U/ml)]
 0 = kein Nachweis, + = Nachweis

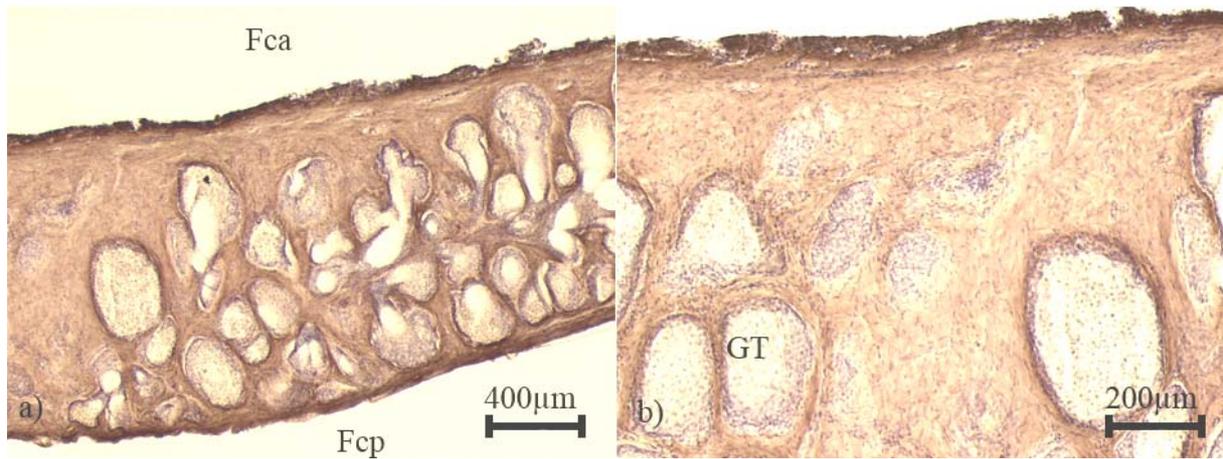


Abbildung 10: Markierung mit 2B6 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-
Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.2.2. Chondroitin- 4- sulfat und Dermatansulfat

Die Zonen 1 und 2 sowie die Glandulae tarsales weisen ein einheitlich positives Markierungsbild auf, lediglich in dem proximalen Abschnitt der Zone 3 sowie in der Lamina propria zeigen sich in den Serien 1 und 5 kein positiver Farbnachweis.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	+	+	0	+	0
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	0	+	0
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+

Tabelle 8: Markierung für Chondroitin-4-sulfat & Dermatansulfat [2B6 + Ch. ABC (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

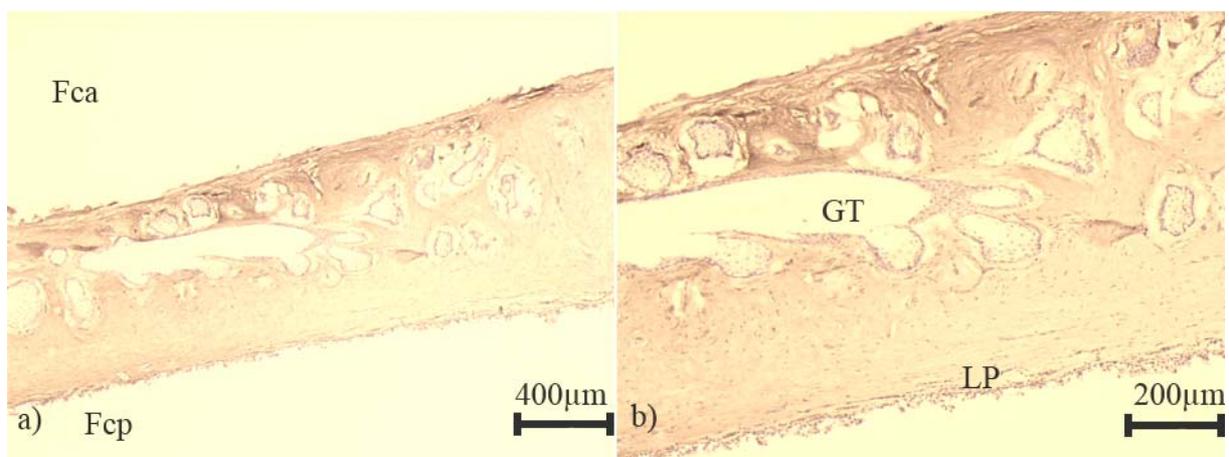


Abbildung 11: Markierung mit 2B6 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
FcP = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.2.3. Chondroitin- 6- sulfat

Es finden sich in allen Präparaten und deren Sektoren positive Markierungen mit Zunahme der Farbintensität im Bereich der Lamina propria.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	+	+	+	+	+

Tabelle 9: Markierung für Chondroitin- 6- Sulfat [3B3 + Ch. ABC (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

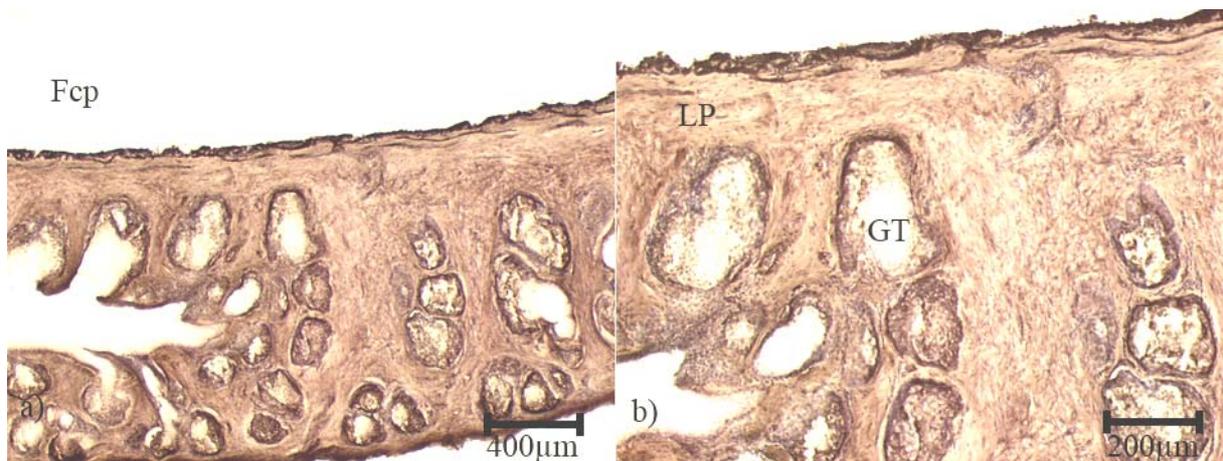


Abbildung 12: Markierung mit 3B3 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.2.4. Chondroitin- 6- sulfat (natives Epitop)

Das Markierungsbild zeigt sich im Bereich der Glandulae tarsales überwiegend positiv, während sich ansonsten nahezu alle Präparate einheitlich negativ darstellen. Lediglich in den Zonen 1- 3 von zwei Serien ist eine nur schwach positive Markierung feststellbar.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	+	0
3	0	0	0	+	0
4	0	0	0	+	0
5	0	0	0	+	0
6	0	0	0	+	0
7	+	+	+	+	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	+	0
10	0	0	0	+	0
11	+	+	+	0	0
12	0	0	0	+	0
13	0	0	0	+	0
14	0	0	0	+	0

Tabelle 10: Markierung für Chondroitin- 6- Sulfat „natives Epitop“ [3B3 + PBS]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

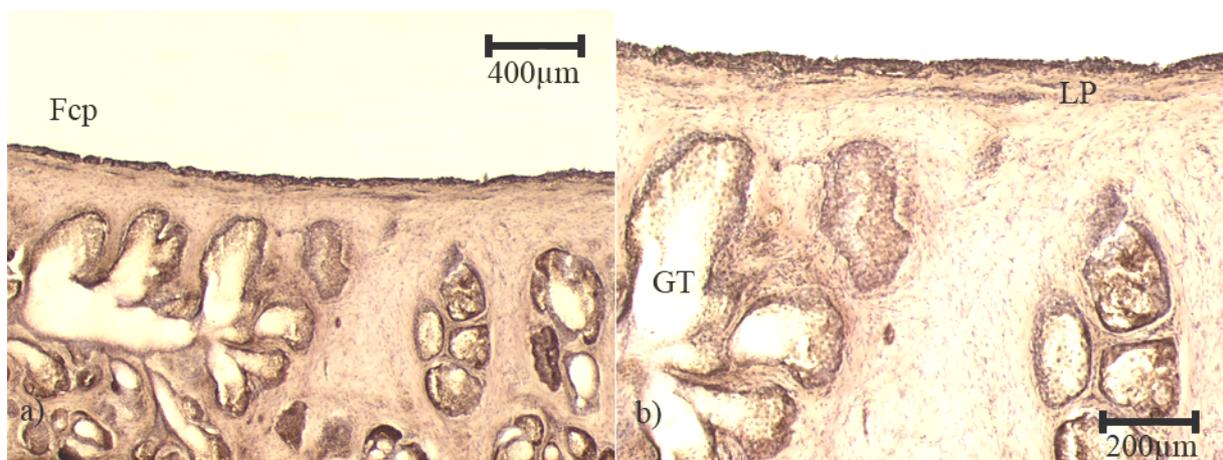


Abbildung 13: Markierung mit 3B3 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
FcP = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.2.5. Chondroitin- 6- sulfat (oversulphated)

Die “oversulphated”- Variante des Chondroitin- 6- sulfats zeigt wie das native Epitop eine weitgehende Markierung im Bereich der Glandula tarsales. Alle anderen Sektoren der untersuchten Präparate zeigen kein Färbeverhalten.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	0	0	0	9	0

Tabelle 11: Markierung für Chondroitin- 6- Sulfat „oversulphated“ [7D4 + PBS]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

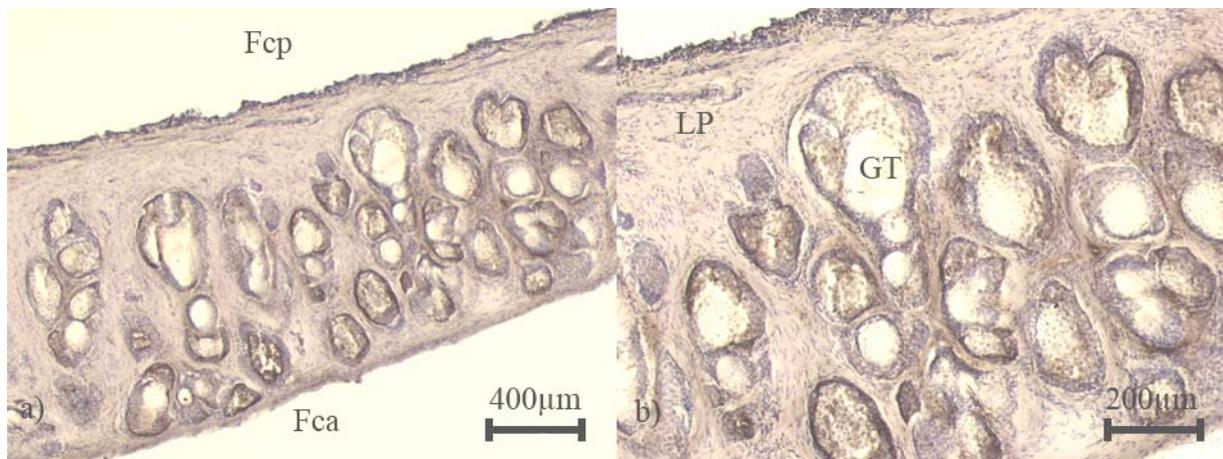


Abbildung 14: Markierung mit 7D4 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.2.6. Keratansulfat

Die Markierung von Keratansulfat zeigt in den meisten Präparaten eine positive Färbung, lediglich in 4 der untersuchten Präparate fehlt eine positive Markierung um die Glandulae tarsales sowie in der Lamina propria.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	0	0
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	0	0
5	+	+	+	0	0
6	+	+	+	0	0
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+

Tabelle 12: Markierung für Keratansulfat [5D4 + PBS]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

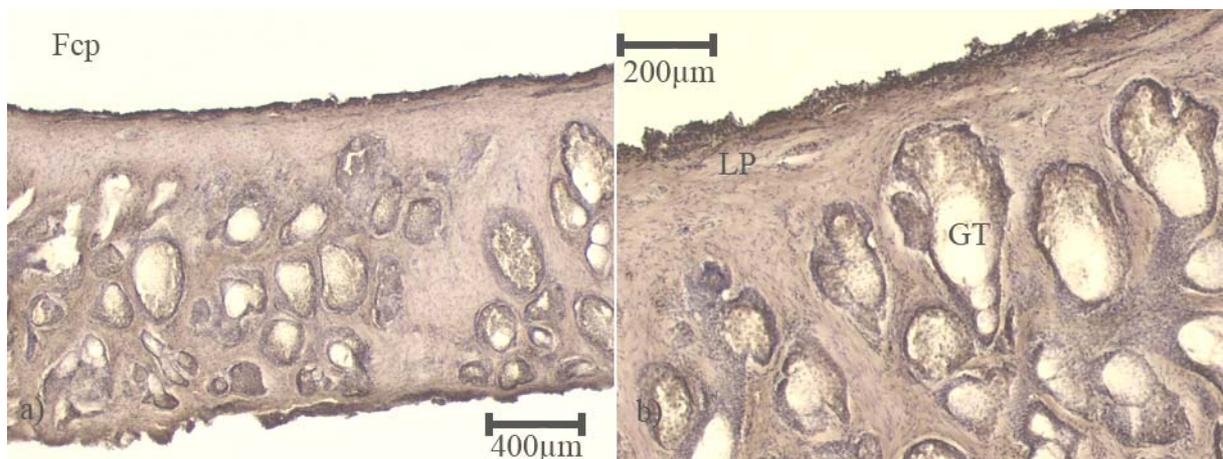


Abbildung 15: Markierung mit 5D4 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.3. Verteilung der Proteoglykane und der Glykoproteine

3.3.1. Aggrecan

Für Aggrecan kann in allen Abschnitten eine durchweg positive Färbung festgestellt werden. Insbesondere zeigt sich eine starke Markierung in der Zone 2 sowie um die Glandulae tarsales.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	+	+	+	+	+

Tabelle 13: Markierung für Aggrecan [1C6 + Ch. ACII (0,25 U/ml)]

0 = kein Nachweis, + = Nachweis

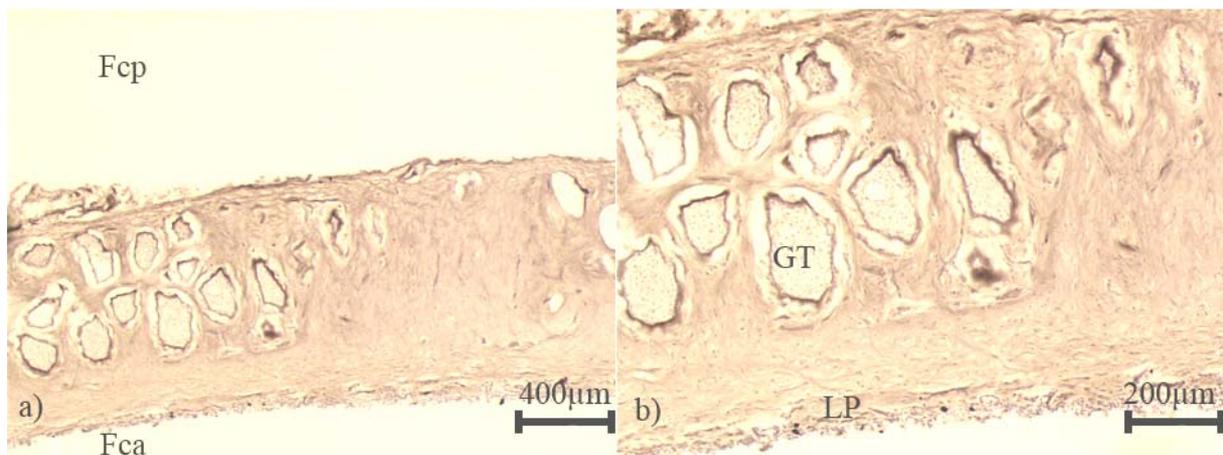


Abbildung 16: Markierung mit 1C6 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung.

Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.3.2. Link Protein

Es zeigt sich eine fast durchweg fehlende Markierung in allen Präparaten, lediglich das periglanduläre Areal in 2 Proben zeigte einen positiven Nachweis für das Vorliegen von Link-Protein.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	0	0	0	2	0

Tabelle 14: Markierung für Link- Protein [8A4 + Ch. ACII (0,25 U/ml)]
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

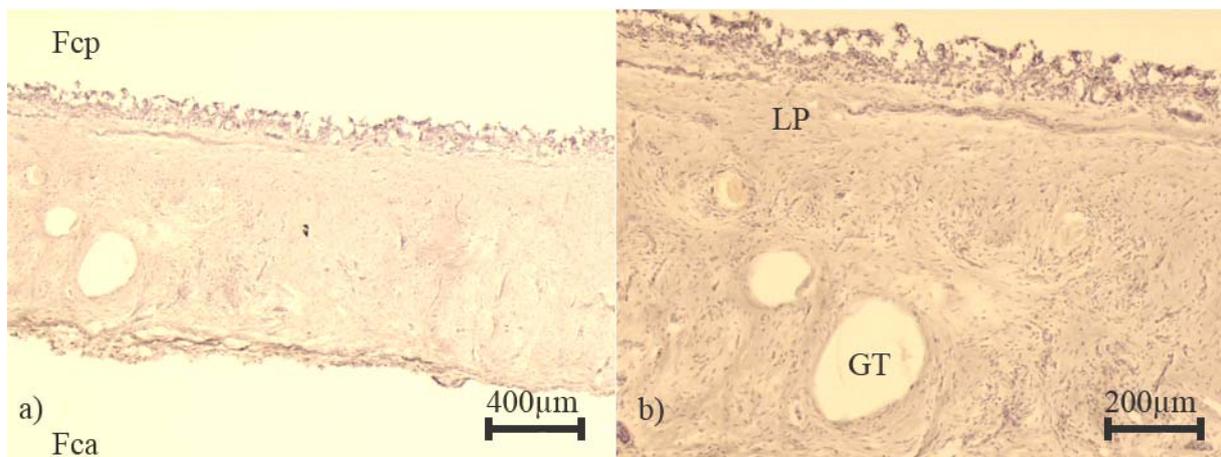


Abbildung 17: Markierung mit 8A4 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.3.3. Versican

Die Markierung für Versican zeigt ein heterogenes Bild. Überwiegend ist in allen Präparaten die periglanduläre Zone gefärbt, während die post- conjunctivale Zone in 10 von 14 Präparaten nicht gefärbt ist. In 9 Präparaten sind die Zonen 1- 3 einheitlich markiert, in 5 Präparaten hingegen lässt sich eine Aussparung der Färbung erkennen.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	+	+	+	+	0
2	+	+	+	+	0
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	0
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	0
7	+	+	+	+	0
8	0	0	0	+	0
9	0	0	0	+	0
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	0
12	0	+	0	+	+
13	0	0	0	0	0
14	0	+	0	+	0

Tabelle 15: Markierung für Versican [12C5 + Ch. ACII (0,25 U/ml)]
 0 = kein Nachweis, + = Nachweis

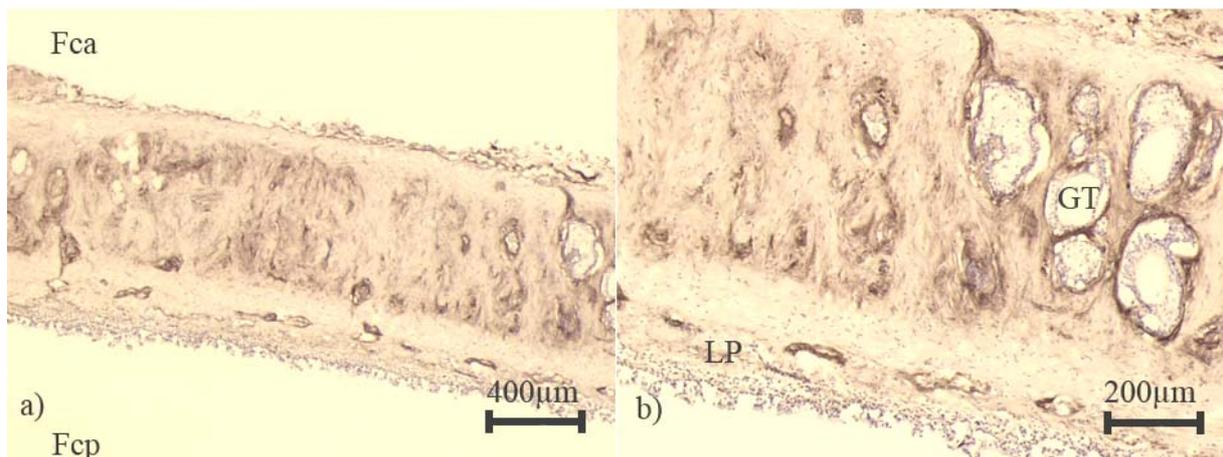


Abbildung 18: Markierung mit 12C5 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
 Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.3.4. Tenascin

Eine positive Färbung für Tenascin findet sich in nahezu allen Präparaten. Lediglich in 3 Präparaten ist eine verminderte Markierung im Bereich der Glandulae tarsales registrierbar, bei einer Serie fehlt zudem in der proximalen Zone des Tarsus eine Farbintensität.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	+	+	+	0	0
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	0	0	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	0	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+

Tabelle 16: Markierung für Tenascin [T2H5 + Ch. ACII (0,25 U/ml)]
 0 = kein Nachweis, + = Nachweis

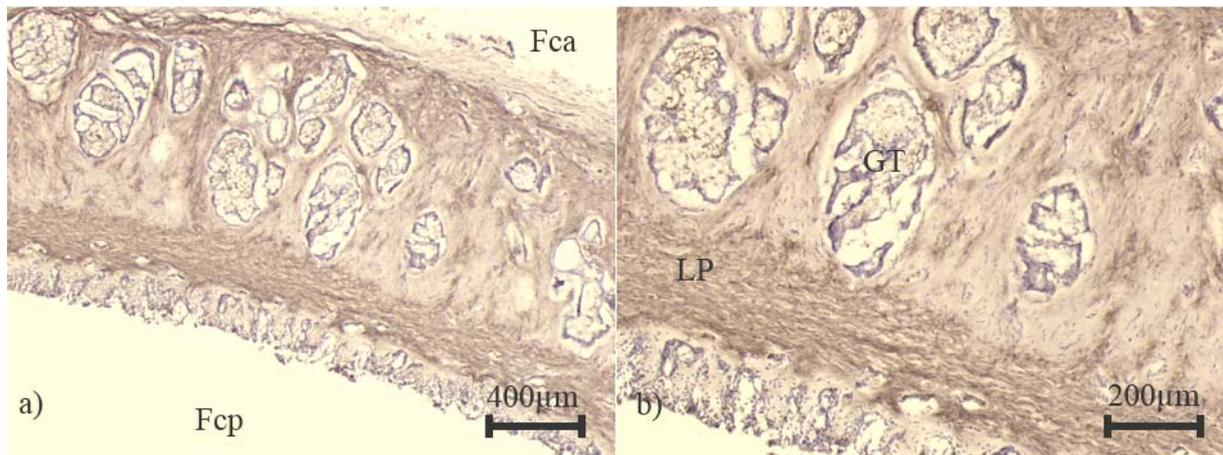


Abbildung 19: Markierung mit T2H5 in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.3.5. Cartilage- Oligometric- Matrix- Protein

Die Untersuchung der Verteilung von Cartilage- Oligometric- Matrix Protein (COMP) zeigt ein sehr heterogenes Erscheinungsbild. Es finden sich insbesondere kräftige Markierungen im Bereich der Tarsalzone, aber auch das Areal um die Glandulae tarsales erscheint positiv markiert.

In den übrigen Zonen hingegen zeigt sich ein heterogenes Verteilungsmuster mit diffusen positiven Markierungen.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	+	+	+	+
4	0	+	0	+	0
5	+	+	0	+	0
6	+	+	0	+	0
7	0	+	0	+	+
8	0	0	0	+	0
9	+	+	+	+	+
10	0	0	0	0	0
11	0	+	0	0	0
12	+	+	0	+	+
13	+	+	+	+	0
14	0	+	0	+	0

Tabelle 17: Markierung für COMP [Comp + PBS]
 0 = kein Nachweis, + = Nachweis

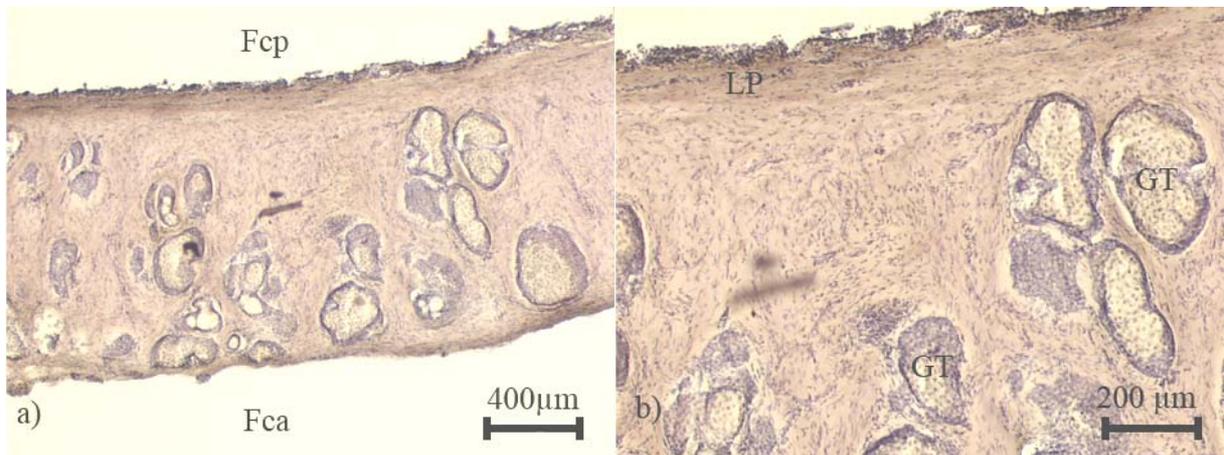


Abbildung 20: Markierung mit COMP in a) 2,5- und b) 5- facher Vergrößerung
 Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

3.3.6. Kontrolle

In keinem der untersuchten Kontrollpräparate (Weglassen des Primärantikörpers, Ersatz durch PBS) kann eine Markierung festgestellt werden.

Donor	Zone 1 (distal)	Zone 2	Zone 3 (prox.)	Gl. tarsales	L. propria
1 – 14	0	0	0	0	0

Tabelle 18: Markierung für NK
0 = kein Nachweis, + = Nachweis

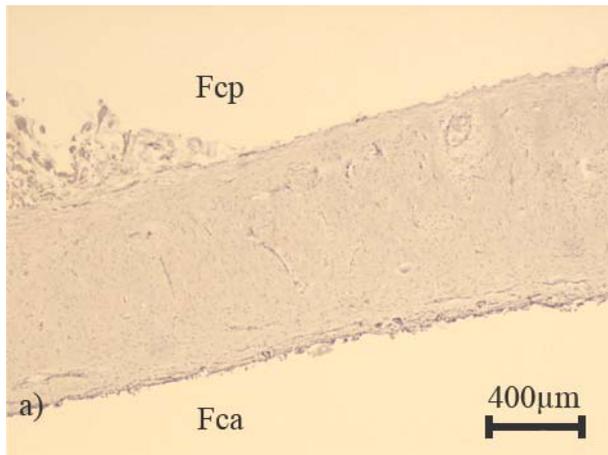


Abbildung 21: Nullkontrolle in a) 2,5- facher Vergrößerung
Fcp = Facies conjunctivalis posterior; Fca = Facies conjunctivalis anterior; GT = Glandulae tarsales (Meibom-Drüsen); LP = Lamina propria der Tunica conjunctivalis palpebralis

4. Diskussion

4.1. Wertigkeit der Methode

Um eine Gewebeprobe für eine immunhistochemische Untersuchung verwenden zu können, muss diese bestimmten Voraussetzungen gerecht werden. Zunächst sollte das Gewebe nicht später als 48 Stunden post mortem gewonnen werden. Ein möglichst früher Entnahmezeitpunkt gewährleistet, dass autolytische Prozesse noch wenig fortgeschritten sind und alle Feinstrukturen noch einen bestmöglichen Erhaltungszustand aufweisen. Im vorliegenden Fall darf die Fixierung des Materials nicht auf herkömmliche Weise mit Formalin erfolgen, da die zu untersuchenden Antigene dann nur eingeschränkt nachgewiesen werden können. Die Fixierung mit Methanol bietet hier den Vorteil, dass es zwar zu einer milden Fixierung des Gewebes kommt, aber die Denaturierung der Epitope nicht soweit fortschreitet, dass es zu Behinderung der Antikörperbindung kommt. Außerdem wird durch Methanol die endogene Peroxidaseaktivität unterbunden, die sonst zu einer falsch positiven Markierung führen könnte, da die spezifische Nachweisreaktion ebenfalls auf einer Peroxidasereaktion beruht.

Immunhistochemische Nachweismethoden beruhen auf der besonderen Affinität von Antikörper und Antigen. Unter Affinität ist dabei die Anziehungskraft zwischen den beiden Makromolekülen, Antikörper und Antigen zu verstehen, welche für die Bindung und die Aufrechterhaltung derselben verantwortlich ist. Ihrer Natur nach sind diese Bindungen weder kovalent noch rein elektrostatisch (Kiernan 1999), sondern beruhen auf einem komplexen, dreidimensionalen Schlüssel-Schloss-Prinzip. Insgesamt beruht die Antigen-Antikörper-Bindung auf einer Mischung aus Anziehungskräften auf Ionenbasis, Wasserstoffbrückenbildung und hydrophoben Wechselwirkungen (Kiernan 1999). Aufgrund der sehr hohen Spezifität, mit der das Antigen durch einen entsprechenden Antikörper erkannt wird (Kiernan 1999, Lehninger et al. 1994), eignen sich immunhistochemische Nachweismethoden hervorragend zur Markierung von bestimmten antigenen Determinanten (Epitopen), und hier insbesondere von Proteinepitopen sowie zur Untersuchung von deren Verteilung im Gewebe. Entsprechend ihrer Herkunft, bzw. der Art ihrer Gewinnung unterscheidet man als die zwei wesentlichen Gruppen monoklonale und polyklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum einer immunisierten Tierart gewonnen und sind typischerweise gegen verschiedene Epitope desselben Makromoleküls gerichtet. Im Gegensatz dazu binden monoklonale Antikörper nur an ein bestimmtes Epitop, da sie alle von demselben,

hybridisierten B-Zellklon abstammen. Die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers übertrifft daher in der Regel die eines polyklonalen Antikörpers. Im vorliegenden Fall wurde ausschließlich mit monoklonalen Antikörpern aus der Maus gearbeitet.

Antikörpermoleküle bestehen aus verschiedenen, funktionell sehr unterschiedlichen Untereinheiten. Man unterscheidet je Immunglobulin-G-Molekül zwei kurze und zwei lange Molekülketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Dadurch entsteht ein Y-förmiges Molekül, welches an seinen Enden eine variable Region aufweist, die für die Antigen-Antikörper-Reaktion verantwortlich ist. Demzufolge handelt es sich um ein bivalentes Molekül. Der Rest des Moleküls ist weitgehend konstant aufgebaut und erlaubt in der Praxis eine Unterscheidung von IgG- Molekülen, welche von verschiedenen Spezies stammen. Durch enzymatische Spaltung lassen sich weitere Untereinheiten erzeugen. Ist ein Antikörper gegen ein relativ kleines Molekül gerichtet, so besteht die Möglichkeit, dass die variablen Regionen auch andere ähnliche Moleküle erkennen. Man spricht in diesem Fall von Kreuzreaktivität. Ein Auftreten dieses Phänomens beeinträchtigt die Spezifität erheblich. Die genaue biochemische Charakterisierung eines Antikörpers ist daher unerlässlich, bevor dieser zur immunhistochemischen Markierung verwendet wird. Bei den im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Antikörpern wurde besonderer Wert auf das Vorliegen von solchen Charakterisierungen gelegt. Dies gilt vor allem für die Antikörper gegen die verschiedenen Glykosaminoglykane, welche vom Connective Tissue Laboratory der School of Biosciences der University of Wales (Prof. Dr. C. Caterson) zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Detektion der gebundenen Primärantikörper sind verschiedene Verfahren möglich, deren gemeinsames Ziel die Erzeugung einer lichtmikroskopisch erkennbaren Markierung ist. Im vorliegenden Fall wurde die ABC-Peroxidase-Methode gewählt, da diese bei den Geweben des Bewegungsapparates die besten Ergebnisse liefert und demzufolge auch weltweit für diese Fragestellungen sehr häufig eingesetzt wird. Nach Ansicht verschiedener Autoren (Kiernan 1999) erzielt man mit dieser Methode die saubersten Präparationen, d.h. es ergeben sich die geringsten unspezifischen Hintergrundmarkierungen. Durch die Verwendung spezieller, optimierter Detektionssysteme (Vector Elite ABC-Peroxidase Kit) wird eine zuverlässige, spezifische und sensitive Detektion des jeweiligen Primärantikörpers gewährleistet.

Das im Rahmen dieser Untersuchung verwendete Nachweissystem arbeitet nach folgendem Prinzip: ein biotinylierter Sekundärantikörper – im vorliegenden Fall aus dem Pferd

gewonnen – bindet an den Primärantikörper und reagiert in einem zweiten Schritt mit einem zuvor angesetzten Avidin- Biotin- Peroxidase Komplex. Nach Zugabe eines geeigneten Chromogens (hier DAB) kommt es zu einem lösungsmittelresistenten Farbstoffniederschlag. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Detektions- Kits kommt eine bestimmte Avidin-Subpopulation (Avidin- D) zum Einsatz, welche nach Firmenangaben (Vector Laboratories, Burlingame, Ca., USA) etwa 10-100-mal sensitiver mit Biotin reagiert, als das gewöhnlich verwendete Avidinmisch. Durch die Bildung von Komplexen, welche mehrere Peroxidase-Moleküle enthalten, kommt es außerdem am Bindungsort zu einer Amplifizierung des Farbsignals. Die Peroxidase-Nachweisreaktion erlaubt keine quantitative Abschätzung, da die Menge an gebildetem Chromogenniederschlag nicht stöchiometrisch mit der Menge von vorhandenem Antigen korreliert.

4.2. Interpretation der Untersuchungsergebnisse

4.2.1. Kollagene

Das Muster der Kollagenverteilung in den untersuchten Präparaten entspricht denen anderer straffer Bindegewebe. Es findet sich in allen Bereichen des Tarsus, einzig die epithelialen Gewebe der Drüsen sind ausgespart. Die Abwesenheit von Kollagen 2 erlaubt es, den Tarsus in die Gruppe der dichteren faserreichen Bindegewebe einzuordnen, da zumindest in der Kollagenzusammensetzung kein Anhalt für einen knorpeligen Phänotyp besteht.

Kollagen I ist mit 90% des Gesamtkollagens im menschlichen Körper vertreten. Es kommt typischerweise in Sehnen, Faszien und Knochen vor. Die Anordnung der Fibrillen gewährleistet die Widerstandsfähigkeit gegen Zugbelastungen (Kielty & Shuttleworth 1993). In unseren Untersuchungen fand es sich in allen Bereichen des Tarsus verteilt.

Kollagen II ist ein Charakteristikum von hyalinem und faserknorpeligem Gewebe. Es ist bevorzugt an den Stellen anzutreffen, an denen eine lokale Kompression auftritt. Dieses ist speziell im Bereich von Gelenkflächen, Umlenkungen von Sehnen und Bändern sowie an deren Ansatzstellen der Fall. (Benjamin et al. 1995, Milz et al. 1998, 1999, 2001). Im vorliegenden Fall ist offensichtlich die Druckbeanspruchung des Tarsus so gering, dass es nicht zu einer Bildung von Kollagen II kommt.

Kollagen III kommt häufig zusammen mit Kollagen I im Gewebe vor. Die Kollagen III Fibrillen haben einen geringeren Faserdurchmesser als die des Kollagen I (Silver 1983). Das gemeinsame Vorkommen beider Kollagentypen ist typisch für alle faserreichen Bindegewebe (Gelbermann et al. 1988). Höhere Konzentrationen von Kollagen III finden sich vor allem in Geweben mit höheren Elastizitätsanforderungen wie der Aorta oder der Haut. In unseren Untersuchungen war das Verteilungsmuster vergleichbar dem von Kollagen I.

Kollagen VI ermöglicht die Interaktion der Zellen mit dem kollagenen Netzwerk der extrazellulären Matrix. (Burgeson & Nimni 1992). Es bildet zusammen mit anderen Matrix-Komponenten Komplexe aus Hyaluronsäure, Chondroitinsulfaten und Kollagen- I- Fibrillen. Hier ermöglicht Kollagen VI die Bildung eines stark hydratisierten Saums der den Flüssigkeitstransport zwischen den Fibrillen erleichtert (Bray et al. 1993).

Ähnlich wie bei Kollagen I und III fand sich eine homogene Verteilung in der Matrix des Tarsus superior.

4.2.2. Glycosaminoglykane

Glykosaminoglykane bestehen aus Disaccharideinheiten, die jeweils ein Derivat eines Aminozuckers, Glukosamin oder Galaktosamin enthalten. Die aufgrund einer negativen Carboxylat- oder Sulfatgruppe erzeugte hohe negative Ladungsdichte führt dazu, dass Kationen und große Mengen Wasser gebunden werden können (Stryer 1994).

Somit entsteht ein Zusammenhalt in der Grundsubstanz, der gemeinsam mit den Kollagenfibrillen eine Permeabilitätsbarriere bildet und für die Druckresistenz des Gewebes mit verantwortlich ist. In Abhängigkeit von der mechanischen und/oder chemischen Beanspruchung ist die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane in den verschiedenen Geweben variabel (Gillard et al. 1977, Gelbermann et al. 1988, Flint et al. 1984, Watanabe et al. 1994, Vogel & Koob 1995). Unter lokaler Druckbeanspruchung in Sehnen ergibt sich eine bestimmte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Dabei bilden sich Dermatan- und Keratansulfat bereits unter Zugbeanspruchung aus, während Chondroitin-4-sulfat erst mit zusätzlicher geringfügiger Druckbeanspruchung folgt. Bei deutlicher Kompression findet sich schließlich Chondroitin-6-sulfat (Milz et al. 2002). Die Glykosaminoglykane ihrerseits sind

Bestandteile verschieden größerer Proteoglykane. So kommt Chondroitin-4-sulfat in kleineren und größeren Proteoglykanen wie Versican oder Aggrecan vor (Vogel & Koob 1995).

In unseren Untersuchungen zeigt das Verteilungsmuster der Markierung für Chondroitin-4-sulfat) eine relative Ungleichmäßigkeit auf. Lediglich in der Zone 2 ist eine einheitliche Markierung erkennbar. Ganz anderes verhält sich das Färbeverhalten von Dermatansulfat, welches in den untersuchten Proben überwiegend eine einheitlich positive Markierung aufweist.

Gemeinsam mit Keratansulfat ist das Vorkommen typisch für faserreiches Gewebe (Gelbermann et al. 1988). Dermatansulfat kommt vermehrt in Haut, Lungen und Sehnen vor (Leonhardt 1990). Hohe Konzentrationen von Dermatansulfat werden als ein Zeichen für ausgereiftes Gewebe beschrieben (Flint et al. 1984).

Chondroitin-6-sulfat kommt vermehrt in Geweben vom knorpeligen Phänotyp vor (Milz 2005) und ist in Verbindung mit Kollagen II ein charakteristischer Marker für Knorpelgewebe (Benjamin et al. 1995). Bei unserer Untersuchung findet sich Chondroitin- 6- sulfat bevorzugt in der Lamina propria der Drüsenzellen sowie in lockerer Verteilung in der Matrix des Tarsus superior. Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass das Gewebe des Tarsus superior doch einige Merkmale des knorpeligen Gewebsphänotyps aufweist.

Keratansulfat ist in verschiedenen Geweben wie Kornea, Nucleus pulposus und Knorpel nachweisbar (Leonhardt 1990). Darüber hinaus wird Keratansulfat mit der Fähigkeit zum Widerstand gegen Zugbelastung in Verbindung gebracht (Flint et al. 1984). Vermehrtes Vorkommen im Alter und bei degenerativen Prozessen sowie bei Veränderungen der knorpeligen Endplatten der Wirbelkörper wird ebenfalls beschrieben (Bishop & Pearce 1993). In unseren Präparaten zeigt sich nur vereinzelt in der Lamina propria der Glandulae tarsales kein Nachweis des Glycosaminoglykans, ansonsten findet sich eine einheitliche Markierung.

4.2.3. Proteoglykane und Glykoproteine

Proteoglykane gewährleisten die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes bei mechanischer Deformation aufgrund ihrer Fähigkeit, Wasser und Kationen an sich zu binden. Sie bestehen zu rund 95% aus Polysacchariden und zu rund 5% aus Proteinen. Die Verteilung und die Häufigkeit der Proteoglykane sind wiederum abhängig von der mechanischen Beanspruchung (Milz 2002). Versican und Tenascin sind charakteristische Marker des

kollagenfaserreichen, straffen Bindegewebes. In Sehnen nehmen sie unter Druckbeanspruchung mit zunehmendem faserknorpeligen Umbau ab, während die Expression von Aggrecan und Link Protein verstärkt wird (Milz 2002).

Aggrecan findet sich in allen Abschnitten des Tarsus, was in sofern erstaunt, da es ein typischer Bestandteil von hyalinem Gelenkknorpel ist (Heinegard & Oldberg 1993). Es ist ein Strukturmolekül, das durch hohe Konzentrationen von elektrischen Ladungen hyperosmotische Bedingungen im extrazellulären Raum schafft und somit ein festes, reversibel verformbares Medium ermöglicht, welches Druckkräften widerstehen kann (Doege et al. 1986). Somit verleiht Aggrecan vermutlich auch dem Tarsus seine charakteristische Steifigkeit. Weiterhin beschreiben Jackson et al. (1991) die Widerstandsfähigkeit gegen Druckbeanspruchung aufgrund der Interaktion mit Kollagen II. Da wir kein Kollagen II nachweisen konnten, muss in unserem Fall die Interaktion von Aggrecan mit anderen Kollagenen (vermutlich Kollagen I) erfolgen. Der Aggrecanbefund deckt sich mit dem Befund von Chondroitin-6-sulfat, was sehr plausibel ist, da letzteres ein Bestandteil des Aggrecanmoleküls ist.

Link Protein, ein extrazelluläres Glykoprotein, stabilisiert die Interaktion zwischen Aggrecan und Hyaluronsäure. Die beiden Epitope, die vom Antikörper 8A4 erkannt werden, liegen im Bereich der zweimal wiederholten, funktionell aktiven Domäne („tandem-repeat-domain“) des Link Proteins und gehören damit zu dem Teil des Moleküls, welches an der Interaktion mit Hyaluronsäure beteiligt ist (Doege et al 1986, Goetnik 1993). Link Protein ist notwendig zum Wachstum embryonaler Knorpelanlagen und zur Bildung und Erhaltung der juvenilen und adulten Knorpelmatrix (Watanabe et al. 1994). Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass im Tarsus die Bindung des Aggrecan an Hyaluronsäurekomplexe nicht so stark ausgeprägt ist wie in knorpeligeren Geweben (z.B. wie im hyalinen Knorpel). Damit ließe sich die Modulation der mechanischen Eigenschaften (Tarsusgewebe ist nicht so steif wie hyalines Knorpelgewebe) erklären.

Versican und Tenascin sind regelmäßig in Sehnen und deren Ansatzzonen nachweisbar. Versican ist ein großes chondroitinsulfathaltiges Proteoglykan, das von Fibroblasten gebildet wird und für die Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix und den Oberflächen-Glykoproteinen der Zellen verantwortlich ist (Zimmermann 1993).

Im Tarsus kommen beide Glykosaminoglykane vor, ihre Verteilung ist jedoch heterogen. Beide Moleküle sind charakteristisch für den faserigen Gewebephänotyp. Das gemeinsame Vorkommen mit Aggrecan legt den Schluss nahe, dass sich das Tarsusgewebe am Übergang vom faserigen zum (faser-)knorpeligen Gewebstyp befindet.

Cartilage- Oligometric- Matrix Protein ist ein grosses extrazelluläres Matrixprotein, welches im Knorpel aber auch in anderen Geweben vorkommt und dessen Funktion weitgehend unbekannt ist. Mutationen des Proteins verursachen Pseudoachondroplasie und multiple epiphysäre Dysplasie. Beide Erkrankungen sind durch intrazelluläre Retentionen des Moleküls in Chondrozyten gekennzeichnet (Posey et al. 2005). Ähnlich wie Aggrecan oder Link- Protein ist COMP als autogenes AG bei rheumatischer Arthritis beschrieben worden (Krenn et al. 2000, Li 2000). Im Tarsus findet sich COMP praktisch in allen Zonen, in relativ homogener Markierung. Wir interpretieren diesen Befund als Anpassung an relativ ausgeprägte dynamische mechanische Beanspruchung (Piscoya et al. 2005).

4.3. Klinisch- funktionelle Relevanz

Die extrazelluläre Matrix des Tarsus superior zeigt für die Kollagene (Typ I, III und VI), für die Proteoglykane (Aggrecan, Link- Protein, Versican, Tenascin) sowie für verschiedene Glykosaminoglykane (besonders Chondroitin-6-sulfat) eine positive Markierung. Ebenso lässt sich Cartilage Oligometric Matrix Protein nachweisen. Diese Zusammensetzung legt den Schluss nahe, dass es sich um einen Typ von Bindegewebe handelt, welcher weder als rein faserig noch als rein knorpelig zu klassifizieren ist. Am ehesten ist das Gewebe als Übergangsgewebe („transitional tissue“, Milz et al. 2005, Benjamin & Ralphs 2004) zwischen fasereichem Bindegewebe und (Faser-)knorpel zu bezeichnen. Bei einem Spektrum von möglichen Bindegewebsphänotypen befindet sich der Tarsus superior dabei näher am fasertypischen Ende des Spektrums als am knorpeltypischen.

Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass Bestandteile des Knorpelgewebes bei Krankheiten aus dem rheumatischen Formenkreis (insbesondere der rheumatoiden Arthritis) als Autoantigene wirken können. Auch die extrazelluläre Matrix des Tarsus superior ist aufgrund ihrer molekularen Zusammensetzung ein mögliches Ziel autoimmunologischer Prozesse. Zwar wird bisher nicht von einer Tarsitis berichtet, jedoch sind Störungen der Funktion des Tränenfilmes bei rheumatoider Arthritis bekannt. Aufgrund der Zusammensetzung der periglandulären Matrix des Tarsus (bedingt durch das Vorkommen von Aggrecan, Link-Protein und COMP) sind entzündliche Prozesse hier sehr wahrscheinlich. Diese beeinflussen das Bindegewebe an den Drüsen, was indirekt zu einer Beeinflussung des Tränenfilmes führen kann. Es ist bekannt, dass die Aktivität aller sich im Körper befindlichen exokrinen Drüsen durch das begleitende Bindegewebe beeinflusst werden kann. (Bissell 1998, Hagios et al. 1998, Goicovich et al. 2003). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass das Sicca-Syndrom mit Keratokonjunktivits bis hin zu Cornea- Ulcerationen als Komplikation bei rheumatoider Arthritis beschrieben ist (Shimazaki et al. 1998, Jain et al. 2001). Patienten mit rheumatoider Arthritis berichten häufig über die Verringerung des Tränenfilmes mit der Folge der Austrocknung des Auges (Uhlig et al. 1999, Jain et al. 2001, Ausayakhun et al. 2002, Shaw et al. 2003).

In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam sich zu vergegenwärtigen, dass Aggrecan, Link-Protein und COMP als Autoantigene bei rheumatoider Arthritis wirken können (Guerassimov et al. 1997, 1998, Zhang et al. 1998, Krenn 2000, Li 2000). Eine Immunreaktion dieser Moleküle kann die Funktion der Glandulae tarsales über deren Interaktion mit der betroffenen

extrazellulären Matrix beeinträchtigen und so zu den oben beschriebenen Symptomen der rheumatischen Krankheitsbilder führen.

Da die rheumatoide Arthritis eine Systemerkrankung darstellt, die hauptsächlich Gewebe mit knorpelähnlichem Phänomen befällt, ist zu erwarten, dass Gewebe mit entsprechender molekularer Zusammensetzung Manifestationen dieser Erkrankung zeigen.

Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits im Zusammenhang mit der Manifestation der rheumatoiden Arthritis an den Ligg. alaria sowie an der Sehne des M. obliquus superior beschrieben (Boszczyk et al. 2003, Milz et al. 2002).

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix im Hinblick auf ihre Form/Stabilität und Funktion ist insbesondere in der chirurgischen Rekonstruktion des Oberlides zu berücksichtigen, da das Ersatzgewebe eine ähnliche Konsistenz wie der Tarsus superior aufweisen soll (Jordan 1990, Jordan & Anderson 1997, Yaqub & Leatherbarrow 1997, Mullner & Langmann 1999, Kamiya & Kitajima 2003). Dies gilt besonders auch, weil hier die Anheftung des M. levator palpebrae superioris erfolgt (Landolt 1985).

Die molekulare Zusammensetzung des Tarsus superior ist für seine Steifigkeit verantwortlich und erlaubt es dem Augenlid dadurch, sich dem Augapfel anzulegen. Sollte es zu einer Funktionsstörung in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und damit zu einem Verlust der Steifigkeit kommen, besteht die Gefahr der Entwicklung eines Entropions (Bashour & Harvey 2000) oder Ektropions (Bashour & Harvey 2000). In einem solchen Fall korrespondiert die mechanische Steifigkeit der Tarsalzone nicht mehr mit dem Tonus des M. orbicularis oculi.

Die bisher am meisten verwendeten Ersatzimplantate sind verschiedene Knorpelvarianten. Insbesondere Knorpel der Ohrmuschel sowie der des Nasenseptums kommen zum Einsatz (Jordan et al. 1990, Kamiya & Kitajima 2003). Ebenso wird zur Rekonstruktion Periost des harten Gaumens sowie Aortenwand (Jordan & Anderson 1997) verwendet, auch kommt bestrahlter Rinderknorpel zum Einsatz (Mullner & Langmann 1999). Nach der Studie von Ito et al. (2001) ist jedoch der Knorpel der Ohrmuschel zu hart, die Faszia lata hingegen zu weich. Unsere Ergebnisse erklären den Umstand, dass bis heute kein passendes Ersatzgewebe mit geeigneten mechanischen Eigenschaften gefunden werden konnte. Solange das Ersatzgewebe nicht die entsprechende Matrixzusammensetzung aufweist, bleibt die Rekonstruktion des Tarsus des Oberlids eine Herausforderung.

5. Zusammenfassung

Der Tarsus superior ist eine bindegewebige Platte, welche dem Oberlid seine charakteristische Form und Festigkeit verleiht (Wallraff 1960). Zudem liegen im Tarsus die Glandulae tarsales (Meibom'sche Drüsen), welche den Lidrand einfetten und verhindern, dass dieser von Tränenflüssigkeit überschritten wird. Das lipophile Sekret der Gl. tarsales trägt darüber hinaus wesentlich zur Funktion des Tränenfilms bei (Williams et al. 1995, Lozato et al. 2001).

In der Literatur wurde dem Gewebe des Tarsus im Verlauf der letzten hundertzehn Jahre ein unterschiedlicher Gewebetypus zugewiesen. Dieser schwankte von rein knorpelig zu rein faserig. In der modernen Literatur wird heute die Ansicht vertreten, dass es sich um ein Gewebe vom faserigen Gewebetypus handelt.

Absicht dieser Studie war es, die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Tarsus superior zu bestimmen und sie in Bezug zu den mechanischen Eigenschaften des Gewebes zu setzen. Es zeigt sich, dass das Gewebe des Tarsus superior einen einzigartigen Gewebetypus darstellt, welcher zwar dem vom rein faserigen Bindegewebe sehr nahe kommt, aber dennoch einige spezielle molekulare Charakteristika vom Knorpelgewebe aufweist.

Dazu gehört das Vorkommen von Aggrecan, Link und Cartilage Oligometric Matrix Protein in spezieller regionaler Verteilung. Auffällig ist vor allen das Vorkommen in der territorialen Matrix der Meibom'schen Drüsen.

Hier kann es dazu beitragen, die Ätiologie der Veränderung der Drüsenaktivität bei rheumatoider Arthritis zu klären. Aufgrund der molekularen Befunde ist es nahe liegend, dass Autoimmunprozesse gegen Matrixbestandteile des Tarsus superior Einfluss auf die Aktivität der Glandulae tarsales (Meibom'sche Drüsen) nehmen.

Die damit verbundene Änderung der Sekretion beeinträchtigt die Beschaffenheit des Tränenfilmes, was zum Sicca- Syndrom mit Keratokonjunktivits bis hin zu Cornea-Ulcerationen führen kann (Shimazaki et al. 1998, Jain et al. 2001).

Die besondere molekulare Beschaffenheit erklärt auch die Schwierigkeiten im Hinblick auf die Ersatzgewebegewinnung bei chirurgischen Rekonstruktionen des Oberlides. Da es kein geeignetes Ersatzgewebe mit gleicher molekularer Zusammensetzung gibt, sind die verwendeten Transplantatgewebe (Knorpel und/oder Faszie) entweder zu hart oder zu weich.

6. Literatur

- Asher RA, Perides G, Vanderhaeghen J-J, Bignami (1991)
Extracellular matrix of central nervous system white matter: demonstration of an hyalurate- protein complex
J. Neurosci. Res., 28: 410-421
- Asher RA, Scheibe RJ, Keiser HD, Bignami A (1995)
On the existence of a cartilage- like proteoglycan and link proteins in the central nervous system
Glia, 13: 294-308
- Ausayakhun S, Louthrenoo W, Aupapong S (2002)
Ocular diseases in patients with rheumatic diseases
J. Med. Assoc. Thai., 85: 855-862
- Bashour M, Harvey J (2000)
Causes of involuntional ectropion and entropion – age- related tarsal changes are the key
Ophthal. Plast. Reconstr. Surg., 16: 131-141
- Benjamin M., Evans EJ (1990)
Fibrocartilage
J.Anat., 171: 1-15
- Benjamin M, Qin S, Ralphs JR (1995)
Fibrocartilage associated with human tendons and their pulleys
J. Anat., 187: 625-33
- Benjamin M, Ralphs JR (2004)
Biology of fibrocartilage cells
Int. Rev. Cytol. 233: 1-45
- Benjamin M, Tyers RNS, Ralphs JR (1991)
Age-related changes in tendon fibrocartilage
J. Anat., 179: 127-136
- Bishop PB, Pearce RH (1993)
The proteoglycans of the cartilaginous end-plate of the human intervertebral disc change after maturity
J. Orthop. Res., 11: 324-331

Bissel MJ (1998)

Glandular structure and gene expression: lessons from the mammary gland
Ann. NY Acad. Sci., 842: 1-6

Boszczyk AA, Boszczyk MM, Putz R, Benjamin M, Milz S (2003)

Expression of a wide range of fibrocartilage molecules at the enthesis of alar ligaments
– possible antigenic targets for rheumatoid arthritis?
J. Rheumatol., 30: 1420-1425

Böhm AA, von Davidoff M (1895)

Lehrbuch der Histologie des Menschen
Bergmann Verlag, Wiesbaden

Burgeson RE, Nimni ME (1992)

Collagentypes. Molecular structure and tissue distribution
Clin. Orthop., 282: 250-272

Bray DF, Bray RC, Frank CB (1993)

Ultrastructural immunolocalization of type-VI collagen and chondroitin sulphate in
ligament
J. Orthop. Res., 11: 677-85

Calabro A, Hascall VC, Caterson B (1992)

Monoclonal antibodies directed against epitopes within the core protein structure of
the large aggregating proteoglycan (aggrecan) from the swarm rat chondrosarcoma
Arch. Biochem. Biophys., 298: 349-360

Caterson B, Christner JE, Baker JR (1983)

Identification of a monoclonal antibody that specifically recognizes corneal and
skeletal keratan sulphate. Monoclonal antibodies to cartilage proteoglycan.
J. Biol. Chem., 258: 8848-8854

Caterson B, Christner JE, Baker JR, Couchman JR (1985)

Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective
tissue proteoglycans
Fed. Proc., 44: 386-393

Caterson B, Mahmoodian F, Sorrell JM, Hardingham TE, Bayliss MT, Carney SL, Ratcliffe
A, Muir H (1990)

Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in
disease
J. Cell. Sci., 97: 411-417

- Doerge K, Hassell JR, Caterson B, Yamada Y (1986)
Link protein cDNA sequence reveals a tandemly repeated protein structure
Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 3761-3765
- Drenckhan D, Kugler P (2003)
Anatomie Benninghoff Band 1
Urban & Fischer Verlag, München – Jena, 108- 133
- Flint MH, Craig AS, Reilly HC, Gillard GC, Parry DA (1984)
Collagen fibril diameters and glycosaminoglycan content of skins – indices of tissue maturity and function
Connect. Tissue Res., 13: 69-81
- Frick H, Leonhardt H, Starck D (1992)
Spezielle Anatomie II
Thieme Verlag, 403-405
- Gelberman R, Goldberg V, An K-N, Banes A (1988)
Tendon.
In: Woo SL-Y “Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues
Park Ridge, American Academy of Orthopaedic Surgeons: 5-40
- Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, Flint MH (1977)
A comparison of the glycosaminoglycans of weight-bearing and non-weight-bearing human dermis
J. Invest. Dermatol., 69: 257-261
- Goetnik PF (1993)
Link Protein
In: Kreis T, Vale R “Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins”
Oxford University Press 68-72
- Goicovich E, Molina C, Perez P, et al. (2003)
Enhanced degradation of proteins of the basal lamina and stroma by matrix metalloproteinases from the salivary glands of Sjogren’s syndrome patients: correlation with reduced structural integrity of acini and ducts
Arthritis. Rheum., 48: 2573-2584
- Guerassimov A, Duffy C, Zhang Y, Banerjee S, Leroux JY, Reimann A, Webber C, Delaunay N, Vipparthi V, Ronbeck L, Cartman A, Arenault L, Rosenberg LC, Poole AR (1997)
Immunity to cartilage link protein in patients with juvenile rheumatoid arthritis
J. Rheumatol., 24: 959-64

Guerrassimov A, Zhang Y, Banarjee S, Cartman A, Webber C, Esdaile J, Fitzcharles MA, Poole AR (1998)

Autoimmunity to cartilage link protein in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis
J. Rheumatol., 25: 1480-1484

Hagios C, Lochter A, Bissell MJ (1998)

Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function?
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 353: 857-870

Heinegard D, Oldberg O. (1993)

Glycosylated matrix proteins
In: Royce PM, Steinmann B., Connective Tissue and its Heritable Disorders
New York: Wiley & Liss: 189-209

Hessle H, Engvall E (1984)

Type VI collagen. Studies on its localization, structure, and biosynthetic form with monoclonal antibodies
J. Biol. Chem., 259: 3955-3961

Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E, Wigzell H (1986)

Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis using monoclonal anti-type II collagen antibodies
Arth. Rheum., 29: 400-410

Ito O, Suzuki S, Park S, et al. (2001)

Eyelid reconstruction using a hard palate mucoperiosteal graft combined with a V-Y subcutaneously pedicled flap
Br. J. Plast. Surg., 54: 106-111

Jain V, Singh S, Sharma A (2001)

Keratoconjunctivitis sicca is not uncommon in children with juvenile rheumatoid arthritis
Rheumatol. Int., 20: 159-162

Jackson RL, Bush SJ, Cardin AD (1991)

Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and role in physiological processes
Physiol. Rev., 71: 481-539

Jordan DR, Tse DT, Anderson RL, Hansen SO (1990)

Irradiated homologous tarsal plate banking: a new alternative in eyelid reconstruction. Part I. Technique and animal research
Ophthal. Plast. Reconstr. Surg., 6: 158-167

- Jordan DR, Anderson RL (1997)
Eyelid reconstruction with irradiated human tarsal plate and aorta
Int. Surg., 82: 350-358
- Kamiya H, Kitajima Y (2003)
Successful use of preserved sclera of eyelid reconstruction
Eur. J. Dermatol., 13: 267-271
- Kielty CM, Shuttleworth CA (1993)
Synthesis and assembly of fibrillin by fibroblasts and smooth muscle cells
J. Cell. Sci., 106: 167-173
- Kiernan JA (1999)
Histological und histochemical methods: theory and practice
Butterworth-Heinemann, Oxford, Auckland, Boston; 390-418
- Krenn V, Souto- Carneiro MM, Kim HJ, et al. (2000)
Histopathology and molecular pathology of synovial B- lymphocytes in rheumatoid arthritis
Histol. Histopathol., 15: 791-798
- Landolt E (1985)
A contribution to the histological and topographical anatomy of the aponeurosis of the levator palpebrae superioris and of the tarsal muscle in the normal lid and in blepharoptosis
Int. Ophthalmol., 7: 249-253
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM (1994)
Prinzipien der Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford, 345-363
- Leonhardt H. (1990)
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen
Thieme Verlag, Stuttgart
- Li NL, Zhang DQ, Zhou KY, et al. (2000)
Isolation and characteristics of autoreactive T cells specific to aggrecan G1 domain from rheumatoid arthritis patients
Cell Res., 10: 39-49
- Lozato PA, Pisella PJ, Baudouin C (2001)
Phase lipidique du film lacrymal: physiologie et pathologie
J. Fr. Ophtalmol., 24: 643-658

Mayne R (1988)

Preparation and applications of monoclonal antibodies to different collagen types
Clin. Biochem., 21: 111-115

McCulley JP, Shine WE (2004)

The lipid layer of tears: dependent on meibomian gland function
Exp. Eye Res., 78: 361-365

Milz S, McNeilly C, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M (1998)

Fibrocartilages in the extensor tendons of the Interphalangeal Joints of Human Toes
Anat. Rec., 252: 264-70

Milz S, Putz R, Ralphs JR, Benjamin M (1999)

Fibrocartilage in the extensor tendons of the human metacarpophalangeal joints
Anat. Rec., 256: 139-145

Milz S, Schlüter T, Putz R, Morrigl B, Ralphs JR, Benjamin M (2001)

Fibrocartilage in the transverse ligament of the human atlas
Spine, 26: 1765-1771

Milz S (2002)

Molekulare Parameter der mechanischen Beanspruchung des faserreichen
Bindegewebes
Habilitationsschrift, München

Milz S, Regner F, Putz R, Benjamin M (2002)

Expression of a wide range of extracellular matrix molecules in the tendon and
trochlea of the human superior oblique muscle
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 43: 1330-1334

Milz S, Boszczyk BM, Putz R, Benjamin M (2005)

Die Enthesis – Physiologische Morphologie, molekulare Zusammensetzung und
pathoanatomische Veränderungen
Orthopäde, 34: 526-532

Milz S, Neufang J, Higashiyama I, Putz R, Benjamin M (2005)

An immunohistochemical study of the extracellular matrix of the tarsal plate in the
upper eyelid in human beings
J. Anat., 206: 37-45

Mullner K, Langmann G (1999)

Chondroplast: a new material for eyelid reconstruction
Ophthalmologica, 213: 189-193

Olsen BJ, Ninomiya Y (1993)

Collagens

In: Kreis T, Vale R "Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins"
Oxford: Oxford University Press, 32-44

Piscoya JL, Fermor B, Kraus VB, Stabler TV, Guilak (2005)

The influence of mechanical compression on the induction of osteoarthritis-related biomarkers in articular cartilage explants
Osteoarthritis Cartilage

Posey KL, Davies S, Bales ES, Haynes R, Sandell LJ, Hecht JT (2005)

In vivo human cartilage Oligometric Matrix Protein (COMP) promoter activity
Matrix. Biol.

Putz R, Pabst R (2000)

Sobotta- Atlas der Anatomie des Menschen
Urban & Schwarzenberg Verlag, München – Jena, Abb. 613,615

Ralphs JR, Benjamin M, Thornett A (1991)

Cell and Matrix Biology of the Suprapatella in the Rat: A Structural and Immunocytochemical Study of Fibrocartilage in a Tendon Subject to compression
The Anatomical Record, 231: 167-177

Rufai A, Benjamin M, Ralphs JR (1992)

Development and ageing of phenotypically distinct fibrocartilages associated with the rat Achilles tendon
Anat. Embryol., 186: 611-618

Schmidt W, Schiebler TH (2005)

Anatomie
Springer Verlag

Shaw C, Banik S, Islam MN, Biswas MC, Biswas G, Biswas S (2003)

Rheumatoid arthritis and ocular involvement
J. Indian Med. Assoc., 101: 537-538

Shimazaki J, Goto E, Ono M, Shimmura S, Tsubota K (1998)

Meibomian gland dysfunction in patients with Sjogren syndrome
Ophthalmology, 105: 1485-1488

Silver FH (1983)

A two step model for lateral growth of collagen fibrils
Coll. Rel. Res., 3: 167-79

Stryer L (1994)

Biochemie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford

Szymonowicz L (1924)

Lehrbuch der Histologie und Mikroskopischen Anatomie

Leipzig, Kabitzsch Verlag

Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Axell T (1999)

Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis

Ann. Rheum. Dis., 58: 415-422

Verstraeten AA, Mackie EJ, Hageman PC, Hilgers J, Schol DJ, De Jongh GJ, Schalkwijk J (1992)

Tenascin expression in basal cell carcinoma

Br. J. Dermatol., 127: 571-574

Vogel KG, Koob TJ (1995)

Structural specialisation in tendons under compression

International Review of Cytology, 115: 267-293

Wallraff J (1960)

Leitfaden der Histologie des Menschen

Urban & Schwarzenberg Verlag, München – Jena, 147- 154

Watanabe M, Nojima M, Shibata T, Hamada M. (1994)

Maturation-related biochemical changes in swine anterior cruciate ligament and tibialis posterior tendon

J. Orthop. Res., 12: 672-82

Williams PL, Bannister LH, Berry MM, et al. (1995)

Gray's Anatomy

Edinburgh, Churchill Livingstone, 1361- 1363

Yaqub A, Leatherbarrow B (1997)

The use of autogenous auricular cartilage in the management of upper eyelid entropion

Eye, 11: 801-805

Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg LC, Poole AR (1998)

Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes
Am. J. Pathol., 153: 1283- 91

Zimmermann DR. (1993)

Versican

In: Kreis T, Vale R „Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins”
Oxford: Oxford University Press, 100-101

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum/Ort	28.06.1972 in Holzheim (Neuss)
Familienstand	verheiratet
Konfession	evangelisch
Nationalität	deutsch

Schulausbildung:

1979 – 1983	Grundschule, Bad Neuenahr
1983 – 1992	staatl. ARE Gymnasium, Bad Neuenahr
Schuljahr 1989	Schulaustauschprogramm, Latrobe Area Highschool, Pennsylvania, USA
Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife
August – Oktober 1992	Ökumenisches Institut, Chateau de Bossey, Genf

Studium:

Mai 1995 – April 2002	Studium Humanmedizin, Ludwig- Maximilians Universität, München
August 1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001 – März 2002	Praktisches Jahr: PJ- Tertial Chirurgie Universidad Miguel- Hernandez, Alicante PJ- Tertial Innere Medizin Hospital General Universitario, Alicante PJ- Tertial Innere Medizin Klinikum Innenstadt, LMU- München PJ- Tertial Orthopädie Sportorthopädische Klinik Permanence, Universität Bern
April 2002	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004	Erteilung der Approbation

Tätigkeit als Arzt im Praktikum:

Oktober 2002 – März 2004

Anatomische Anstalt,
Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt
Ludwig- Maximilians Universität, München

Tätigkeit als Assistenzarzt:

April 2004 – Juli 2004

Anatomische Anstalt,
Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt
Ludwig- Maximilians Universität, München

Ab August 2004

Abteilung für Unfall- und
Wiederherstellungschirurgie,
Klinikum Garmisch- Partenkirchen

Publikation/Lehrtätigkeiten:

Milz S, Neufang J, Higashiyama I, Putz R, Benjamin M (2005)
An immunohistochemical study of the extracellular matrix of the tarsal plate in the
upper eyelid in human beings
J. Anat., 206: 37-45

Dozent des Präparierkurses für Humanmediziner als Apsisleiter im WS 2002/03 und
2003/04 sowie während des Ferialkurses im September/Oktober 2003 und nach dem
neuen Studiensystem mecum im WS 2003/04 sowie im SS 2004
Anatomische Anstalt, Ludwig- Maximilians Universität, München

Vorlesungsassistent funktionelle Anatomie des Bewegungsapparates sowie der
begleitenden Vorlesung für den Ferialkurs im September/Oktober 2003

Instruktor des Muskuloskelettalen Systems WS 2002/03 und SS 2003,
„Alliance for Medical Education“, Ludwig- Maximilians Universität, München