Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Krauspe

Charakterisierung des Kollagens im Ligamentum deltoideum beim kongenitalen Klumpfuß und beim gesunden Fuß

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Kai-Michael Wess

(2009)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Krauspe Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf meiner Familie Dir, Finnja

Inhaltsverzeichnis

			Seite
1.	Einleitu	ng	1
	1.1. Der k	ongenitale Klumpfuß	3
	1.1.1.	Definition	3
	1.1.2.	Epidemiologie	4
	1.1.3.	Genetik	4
	1.1.4.	Ätiologie	5
	1.1.5.	Pathoanatomie	11
	1.1.6.	Diagnose	13
	1.1.7.	Klassifikation	14
	1.1.8.	Therapie	15
	1.2. Kolla	gen	16
	1.2.1.	Einteilung	17
	1.2.2.	Die fibrillenbildenden Kollagentypen I, III und V	18
	1.2.3.	Die Synthese von Kollagenfibrillen	20
	1.2.4.	Quervernetzungen	29
	1.3. Frage	stellung	34
2.	Materia	l und Methode	36
	2.1. Mater	rialien	36
	2.1.1.	Patienten und Kontrollen	36
	2.1.2.	Entnahme der Ligamente	39
	2.1.3.	Chemikalien	42
	2.2. Histol	logie und Elektronenmikroskopie	43
	2.2.1.	Histologie	43
	2.2.2.	Elektronenmikroskopie	44

		Seite
	2.3. Aufbereitung der Bänder	44
	2.3.1. Vorbereitung der biochemischen Analysen	44
	2.3.2. Isolierung des Kollagens	44
	2.3.3. Hydrolysen	45
	2.3.4. Reduktion	46
	2.4. Darstellung der Kollagenketten	47
	2.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
	2.4.2. Ionenaustauschchromatographie	49
	2.5. Quantitative Analysen	50
	2.5.1. Kollagenquantifizierung mittels Ehrlichs Reagenz	50
	2.5.2. Aminosäureanalyse	51
	2.5.3. Analyse der Glykosylierung	52
	2.5.4. Analyse der lysinoxidase-abhängigen Quervernetzungen	54
	2.5.4.1. Di- und Trifunktionelle Quervernetzungen	54
	2.5.4.2. Analyse von Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP)	
	und Lysyl-Pyridinolin (LP) via Fluoreszenz	56
	2.6. Statistik	57
3.	Ergebnisse	58
	3.1. Histologie	58
	3.2. Elektronenmikroskopische Charakterisierung des Kollagens	60
	3.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
	3.4. Relativer Kollagengehalt gemessen mit Ehrlichs Reagenz	66
	3.5. Aminosäureanalyse	68
	3.5.1. Messung von Hydroxyprolin	68
	3.5.2. Messung von Hydroxylysin	71

		Seite
	3.6. Analyse der Glykosylierung	75
	3.6.1. Messung des Monosaccharides Galaktose	76
	3.6.2. Messung des Disaccharides Glykosyl-Galaktose	78
	3.7. Analyse der Quervernetzungen	81
	3.7.1. Quantifizierung der Quervernetzung des Hydroxylysinpfades	81
	3.7.1.1. Messung von Hydroxalysyl-Pyridinolin (HP)	81
	3.7.1.2. Messung von Lysyl-Pyridinolin (LP)	83
3.7.1.3. Messung von Dehydro-Hydroxylysinohydroxynorleucin		
	(deH-DHLNL)	86
	3.7.2. Quantifizierung der Quervernetzungen des Lysinaldehdpfades	86
	3.7.2.1. Messung von Histidinohydroxylysinonorleucin (HHL)	86
	3.7.2.2. Messung von Dehydro-Hydroxylysinonorleucin (deH-	
	HLNL)	88
	3.7.2.3. Messung von Dehydro-Hydrohydroxymerodesmosin (deH-	
	HHMD)	
4.	Diskussion	92
5.	Zusammenfassung	110
6.	Literaturnachweis	112
7.	Anhang	123
	7.1. Patientenliste	123
	7.2. Chemikalienliste	125
	7.3. Geräte	128
	7.4. Chromatogramme	129
	7.5. Statistik	139
	Danksagung	140

1. Einleitung

Der Begriff Klumpfuß umschreibt eine komplexe Fußdeformität, die gekennzeichnet ist durch eine passiv nicht ausgleichbare Fehlstellung von Knochen und Gelenken. Als charakteristische Komponenten dieser kombinierten Deformität finden sich Spitzfuß, Fersenvarus, Mittelfußsupination und Adduktion sowie Pronation des Vorfußes. Der idiopathische oder auch kongenitale Klumpfuß ist die am häufigsten auftretende Form. Er betrifft ansonsten gesunde Kinder und ist per Definition nicht mit Syndromen oder neurologischen Krankheitsbildern vergesellschaftet (46).

Die Ätiologie des kongenitalen Klumpfußes ist unbekannt. Zahlreiche pathogenetische Faktoren sprechen für ein multifaktorielles Geschehen. Unterschiedliche, kontrovers diskutierte Erklärungsmodelle basieren auf primären Keimzelldefekten, embryonalen Störungen, fetalen Entwicklungsstörungen (128), intrauterinen Enterovirusinfektionen (112) oder mechanischen Faktoren sowie lokalen Knochen- und Gelenkdysplasien. Ferner werden vaskuläre, neuromuskuläre und bindegewebliche Ursachen diskutiert (128).

Es wurden zahlreiche Studien über die Vererblichkeit des kongenitalen Klumpfußes in verschiedenen ethnischen Gruppen durchgeführt. Sie weisen darauf hin, dass genetische Defekte eine Rolle spielen könnten. Neuere Stammbaumanalysen lassen vermuten, dass eine multifaktorielle Vererbung vorliegen könnte (111).

Aufgrund aktueller klinischer und experimenteller Untersuchungen sind pathologische Alterationen des Bindegewebes als ätiologischer Faktor anzunehmen. Beim kongenitalen Klumpfuß finden sich im medialen und dorsalen Bereich stark verkürzte und kontrakte Bindegewebsstrukturen. Diese erscheinen in ihrer Mikroskopie gegenüber normalen anatomischen Bändern und Gelenkkapseln fibrotisch verändert und fixieren den Fuß in seiner typischen Fehlstellung. Als eine Ursache der unter dem Schlagwort "retracting fibrosis" (102) bekannten Bindegewebsproliferation wurde neben einer Zunahme von Kollagenfasern (57) eine von Myofibroblasten induzierte Fibromatose postuliert (38).

Es existieren bis heute keine Arbeiten mit systematischer Analyse und einem Vergleich zu altersentsprechenden Gesunden, die dieses fibrotisch veränderte Gewebe beim Klumpfuß untersuchen, obwohl gerade im Bereich des Ligamentum deltoideum Bindegewebestrukturen zu finden sind, die am stärksten verkürzt sind (106).

Histologische Untersuchungen an Feten ergaben Hinweise auf eine myofibroblasteninduzierte Fibrose in dieser Region und weisen auf eine genetisch determinierte Fibrose hin (38). Die Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an Operationsresektaten kongenitaler Klumpfüße bestätigt. Elektronenmikroskopisch konnten in diesen Proben keine zellulären Veränderungen festgestellt werden (118).

Die Hypothese einer "retracting fibrosis" als ein pathogenetischer Mechanismus beim Klumpfuß verlangt geradezu eine Beschreibung der extrazellulären Matrix des fibrösen medialen Kapsel-Band-Komplexes zwischen Innenknöchel, Sprungbein und Kahnbein. Hier ist insbesondere das Strukturprotein Kollagen als Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von Interesse (142).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Bindegewebe, insbesondere das Kollagen im Bereich des Ligamentum deltoideum beim kongenitalen Klumpfuß zu charakterisieren, um neue Erkenntnisse zum Phänotyp dieser noch unklaren Fußdeformität zu erhalten.

Die durch immunhistochemische, elektronenmikroskopische und molekularbiologische Methoden erhobenen Daten werden mit Analysen von Proben gleicher Lokalisation gesunder Füße gleichen Alters verglichen, um so Aussagen zu der Pathomorphologie treffen zu können. Durch diese Untersuchungen können neue Aspekte zur Rolle des Bindegewebsfaktors gewonnen werden, die ggf. therapeutisch nutzbar wären. Neben Gewebeproben von Residualklumpfüßen werden zudem Biopsien eines unbehandelten Klumpfußes ("neglected clubfoot"), neurogener Klumpfüße sowie eines Plattfuß analysiert und diskutiert, um den kongenitalen Klumpfuß von diesen Fußdeformitäten abgrenzen zu können.

1.1. Der kongenitale Klumpfuß

1.1.2. Definition

Der kongenitale oder auch idiopathische Klumpfuß ist eine komplexe, passiv nicht ausgleichbare, kontrakte Fußdeformität, die den peritalaren Gelenkkomplex in Equinusund Inversionsstellung fixiert und dadurch zum konsekutiven Fehlwachstum der Gelenkflächen und der Knochen führt. Er betrifft ansonsten gesunde Kinder und ist vom Klumpfuß abzugrenzen, der bei Syndromen (Arthrogrypose, Freeman-Sheldon-Syndrom u.a.) oder neurogenen/neuromuskulären Erkrankungen (Spina bifida, kongenitale Myopathien, Zerebralparesen, Diastematomyelie u.a.) auftritt. Auch postinfektiöse Veränderungen Poliomyelitis, (z.B. Meningitis) sowie Stoffwechselerkrankungen können Ursache eines erworbenen Klumpfußes sein. Ferner können posttraumatische Komplikationen (z.B. ein Kompartmentsyndrom) zu einem sekundären Klumpfuß führen. Die Diagnose des kongenitalen Klumpfußes ist somit eine Ausschlussdiagnose (41;46;88).



Abb. 1.01: Klinisches Bild der Fehlstellung bei beidseitigem Klumpfuß von dorsal betrachtet

1.1.2. Epidemiologie

Die Inzidenz des idiopathischen Klumpfußes ist in Deutschland weitgehend konstant und wird mit 2:1000 Geburten angegeben (41). Es bestehen jedoch deutliche regionale und ethnische Unterschiede. So beträgt die Häufigkeit bei Polynesiern etwa 7:1000 Geburten (20), im chinesischen Genom nur 0,6:1000.

Bezüglich des Geschlechterverhältnisses lässt sich mit etwa 2,5:1 eine Knabenwendigkeit feststellen. Bei etwas mehr als der Hälfte der Patienten ist ein beidseitiger Klumpfuß ausgebildet (41).

1.1.3. Genetik

Der idiopathische Klumpfuß wird nach neuen Erkenntnissen wahrscheinlich multifaktoriell vererbt. Es gibt einige Hinweise darauf, dass mehrere Gene bzw. Genloci für das Auftreten eines kongenitalen Klumpfußes verantwortlich sind (111). Diese pathogenetischen Mechanismen der Mutationen werden durch exogene Faktoren ergänzt. Sie ergeben so als Summe von intrinsischen und extrinsischen Faktoren den Phänotyp, den idiopathischen Klumpfuß (145).

Die syndromalen Klumpfüße sind dagegen ein Symptom der Grunderkrankung.

1.1.4. Ätiologie

Die Ätiologie des kongenitalen Klumpfußes ist unbekannt. Betrachtet man die pathologischen Veränderungen des kongenitalen Klumpfußes, so können unterschiedliche Mechanismen bei der Ausprägung dieser Fehlstellung gefunden werden. Die Gewichtung und damit die Identifizierung einzelner Faktoren als "klumpfußbildend" ist Gegenstand teils kontrovers geführter Diskussionen, da es schwer fällt, bei dieser komplexen Deformität einfache Kausalzusammenhänge zu differenzieren.

Pathologische Muskulatur:

Der kongenitale Klumpfuß ist lange in Verbindung mit neuromuskulären Erkrankungen und Syndromen gesehen worden, da diese bekannte Ursachen einer sekundären Klumpfußdeformität sind. So werden Muskelabnormalitäten als ursächlicher Faktor für die Entstehung des Klumpfußes diskutiert. Bei einer Fallstudie an einem drei Monate alten Feten mit kongenitalem Klumpfuß konnten Anomalien in der Entwicklung der Skelettmuskulatur in Form von verkürzten und scheinbar degenerierten Muskelfasern beobachtet werden (8). Andere Autoren sehen eine Muskelimbalance als ursächlichen Faktor (54). Diese entstehe zum Einen durch ein Überwiegen des Musculus tibialis posterior (139) oder zum Anderen durch eine Schwäche bzw. verminderte Aktivität der Peronealmuskulatur und der Fußextensoren (2;104). Auch das Auftreten akzessorischer Muskeln wird als ein Faktor für das Erscheinungsbild des Klumpfußes vermutet. Die Fehlstellung sei jedoch entscheidend abhängig von Insertion und dynamischer Aktivität dieser Muskeln (131).

Pathologische Nerven:

Histologische und elektronenmikroskopische Studien der Unterschenkelmuskulatur des Klumpfußes finden eine Verschiebung des Verhältnisses von Typ I (slow-twitch Fasern) und Typ II Muskelfasern (fast-twitch Fasern). Dies wird mit einer temporären frühen Denervierung dieser Muskeln erklärt (59). Die Theorie einer Denervierung, mit dem Einfluss defekter peripherer Nerven auf die Entwicklung von idiopathischen Klumpfüßen, wird durch Studien an einem Rattenmodell gestützt. Diese zeigen, dass periphere Nerven für ein reguliertes Wachstum von Extremitäten nötig sind und dieses Wachstum stimulieren. Eine Störung führe zur Missbildung der betroffenen Extremität (25). Nicht wenige Arbeiten stellen heraus, dass Patienten mit einer pathologischen Muskelfasermorphologie neurogener Ursache ein größeres Risiko für ein Klumpfußrezidiv nach durchgeführten Operationen haben (44;79;99). Andere Autoren merken an, dass sich die beim Klumpfuß gefundenen Veränderungen aufgrund des mosaikartigen Verteilungsmusters nicht einem Muskel oder einer motorischen Einheit zuordnen lassen. Darüber hinaus konnten nur wenige Arbeitsgruppen überhaupt signifikante Veränderungen der Muskelfasertypen feststellen (81) und es existieren mehrere Untersuchungen, in denen Muskelbiopsien in der histologischen Begutachtung als nicht pathologisch verändert bewertet werden (45;58). Andere sehen die Verschiebung der Typ I : Typ II Relation als Folge extrinsischer Faktoren (55). Jedoch konnte tierexperimentell nachgewiesen werden, dass die Gipsimmobilisation und redression keine histochemischen oder elektronenmikroskopischen Veränderungen an der Muskulatur hervorruft (119).

Zur Klärung neurogener Faktoren wurden ferner an idiopathischen Klumpfüßen zahlreiche elektromyographische Untersuchungen durchgeführt. Es konnten hierbei keine Hinweise für eine neuronal bedingte Schädigung der Muskulatur oder eine Muskelerkrankung gefunden werden (10;138). Elektrophysiologische Untersuchungen des Nervus peroneus bzw. des Nervus tibialis zeigen pathologische Veränderungen an Füßen mit mäßigem und schlechtem postoperativem Ergebnis im Sinne einer abnormalen Innervation (32;80).

Es existiert zudem der Ansatz, dass ein neurogener Defekt durch eine Läsion von Vorderhornzellen durch Enteroviren ursächlich für den Klumpfuß sei. Dies wird gestützt durch eine saisonale Häufung der Inzidenz von Klumpfüßen, die mit der Prävalenz von Enterovirusinfektionen in der Zeit der Konzeption korreliert (112).

Pathologische Gefäße:

Eine postulierte vasale Theorie, nach der eine Unterentwicklung der Arteria tibialis anterior gehäuft bei Klumpfüßen auftrete, (1;51;89) konnte in weiterführenden Untersuchungen nicht mehr aufrechterhalten werden (131;143).

Chromosomaler Defekt:

Untersuchungen der Pathomorphologie an fetalen Klumpfüßen führten zur These eines chromosomalen Defektes, der sich in einer knorpeligen Fehlanlage des Talus zeigt (121;130). Diese Theorie kann jedoch aufgrund der Erkenntnis, dass die Deformität des Talus sekundärer Natur ist, nicht aufrechterhalten werden (38). Die embryonale Theorie dagegen postuliert, dass der Defekt auf einer Schädigung zwischen Konzeption und der zwölften Schwangerschaftswoche beruht (58). In der normalen Entwicklung der unteren Extremität findet man zwischen der sechsten und achten Woche eine Fußstellung des Embryos, die der des Klumpfußes ähnelt, welche sich aber bis zur 12.-14. Woche

wieder normalisiert. Die osteogenetische Theorie des Klumpfußes besagt, dass es in dieser Zeit zu einer Pause oder einem Stillstand der Entwicklung kommt und die Fußstellung in pathologischer Form fortbesteht (63).

Pathologische Exposition in utero:

Die wohl älteste Theorie, die bis ins frühe 20. Jahrhundert Bestand hatte, führt die Verformung auf eine mechanische Kompression im Uterus bei Erstgeburten, Oligohydramnion oder Zwillingsschwangerschaften zurück (16).

Die Rolle von pharmakologischen und toxischen Substanzen ist noch nicht endgültig geklärt. In zahlreichen Tiermodellen mit chemisch-toxischer Exposition (24;39) aber auch nach Abtreibungsversuchen (122) und Behandlung einer Schwangeren mit D-Tubocuranin (60) können Klumpfüße entstehen. Zudem kommt es gehäuft nach Amniozentese in bestimmten Phasen der Schwangerschaft zu Klumpfußfehlbildungen.

Pathologisches Bindegewebe - "retracting fibrosis":

Im makroskopischen Befund des medioplantaren Bindegewebes des kongenitalen Klumpfußes findet sich eine indurierte fibröse Masse, die den Talus medial umgibt (35). Diese Masse imponiert als ein diskusähnliches fibröses Gewebe im Bereich des Ligamentum deltoideum (47). Die fibrotische Fixierung des Klumpfußes wird in der elektronenmikroskopischen und histologischen Erstbeschreibung mit einer durch Histamin induzierten Kontraktion von Myofibroblasten der medialen Ligamente erklärt (149). Dieser makroskopisch fibröse Bindegewebskomplex der medialen Fußseite zeigt histologisch einen vollständigen Verlust der räumlichen Ordnung. Immunhistochemische Färbungen zeigen lokal vermehrt Kollagen Typ III sowie Desmin und Vimentin als Produkte von Myofibroblasten als Hinweise auf die Potenz dieses pathologischen Gewebes zur Kontraktion (38). Weitere mikroskopische

Untersuchungen postulieren eine Zunahme von Kollagenfasern und Fibroblasten in den Ligamenten und Sehnen des Klumpfußes (57). Die fibrotische Fixierung etablierte Ponseti dem Schlagwort "retracting fibrosis" (102).Histologische unter Untersuchungen von fetalen Klumpfüßen zeigen neben einer starken Verkürzung eine Verdickung des medialen Bindegewebes. Es finden sich Hinweise auf Myofibroblasten diesem Anteil des Klumpfußes. Ferner können Vimentin-positive Zellen in nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass es zu einer unterschiedlich starken Proliferation des Gewebes intrauterin bzw. postnatal mit Fixierung der Gelenke in Fehlstellung kommt. Die Veränderung der Knochen selbst werden als sekundär erachtet. Diese Arbeit unterstützt die Hypothese einer genetisch determinierten Fibrose. (56). Uhthoff et al. sahen in immunhistologischen Untersuchungen beim fetalen Klumpfuß Veränderungen in der Verteilung der Kollagentypen (118). In der gleichen Arbeit sind elektronenmikroskopisch dagegen keine zellulären Unterschiede zu normalen Füßen zu erkennen (118).

Khan et al. können demgegenüber anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen das Vorhandensein von Myofibroblasten nicht nachvollziehen. Die Theorie der "retracting fibrosis" wird von diesen Autoren kritisch gesehen (64).

Ein dreidimensionales Computermodell bestätigt, gestützt auf MRT Studien anderer Arbeitsgruppen (48), eine extrem starke Verkürzung des medialen Bindegewebes (106). Schnitte plastinierter Präparate von fetalen Klumpfüßen, die eine Störung der endochondralen Ossifikation des Calcaneus zeigen, weisen auf eine Störung der Extrazellulärmatrix hin und zeigen neben einer starken Verkürzung eine Verdickung des medialen Bindegewebes (36).



Abb.1.02: Plastiniertes Präparat eines Klumpfußes mit Volumenzunahme des medialseitigen Gewebes zwischen Innenknöchel, Talus und Os naviculare. Beachte die eingeblendete Rekonstruktion des Präparates. *

biochemischen Untersuchungen der extrazellulären Matrix In der hinteren Sprunggelenkkapsel finden sich in Hinblick auf den Anteil des Kollagens am Nassgewicht, der Hydroxylierung des Lysins und des Grades an Pyridinolinquervernetzungen im Vergleich zu gesunden Erwachsenen Normwerte (142). Untersuchungen des kontrakten medialseitigen Gewebes des Klumpfußes in der Zellkultur konnten zeigen, dass fibrozytenähnliche Zellen Mikrofilamente beinhalten, wie sie auch beim Morbus Dupuytren (Palmarfibromatose) vorkommen. Eine Blockade der Wachstumsfaktoren TGF-B (Transforming Growth Factor-B) und PDGF (Platelet Derived Growth Factor), welche als vermehrt beschrieben wurden, konnte "in vitro" die Zellproliferation verhindern. Es wird spekuliert, dass auf diese Weise Kontrakturen beim Klumpfuß vermindert werden könnten (78).

*Die Aufnahmen wurden freundlicherweise durch Frau Prof. Fritsch (Anatomie; Innsbruck) zur Verfügung gestellt (36)

1.1.5. Pathoanatomie

Beschreibungen über die Pathoanatomie des kongenitalen Klumpfußes sind schon in frühen orthopädischen Schriften vermerkt und gelten in ihrem Grundsatz auch heute noch. Sie beschreiben die mediale und plantare Fehlstellung des Os naviculare, des Os cuboideum und des Calcaneus um den Talus herum. Hieraus resultiert die dreidimensionale Fehlstellung, bestehend aus den vier charakteristischen Komponenten: Equinusstellung in der Sagittalebene mit plantar-medialer Dislokationstendenz des Talus,

Varusdeviation des Rückfußes in der Frontalebene,

Adduktionsstellung des Vorfußes relativ zum Rückfuß in der Horizontalebene,

Innenrotation des subtalaren Komplexes im Verhältnis zum Talus in der Horizontalebene.

Der Talus und das Talo-Navikulargelenk sind als zentrale Strukturen des Fußes zugleich auch Schlüssel zum Verständnis dieser Fehlstellung. Der gesamte Talus ist beim idiopathischen Klumpfuß kleiner als normal (52;53). Der Talushals ist verkürzt und der Taluskopf nach medial-plantar nah zum Taluskörper hin abgewinkelt (121). Ein wahrer Talushals ist kaum zu erkennen (82). Dementsprechend ist die knorpelige Gelenkfläche des Taluskopfes in dieselbe medial-plantare Richtung verschoben. Die mediale und anteriore Gelenkfläche des Talus sind plantarseitig fehlgebildet und es zeigt sich eine Kuppelform der Talusrolle (56). Die Deformität des Talus wird als Folge der fixierten Fehlstellung des peritalaren Gelenkkomplexes gesehen. Kalkaneus und Kuboid sind sehr viel weniger fehlgebildet. Der Talus ist in der Sprunggelenksgabel, die in Neutralstellung steht, nach ventral subluxiert. CT-Untersuchungen, bei denen die typischen Fehlbildungen des Talus zur Darstellung kommen, zeigen, dass die typische Innenrotationsfehlstellung des kongenitalen Klumpfußes im wesentlichen durch eine Fehlstellung im subtalaren Gelenkkomplex charakterisiert ist (48). Dieses wird vom talonavikularen, kalkaneokuboidalen sowie vom talokalkanealen Gelenk gebildet. Von zentraler Bedeutung ist hier die talonavikulare Fehlstellung. Das Navikulare ist neben einer extremen Inversion stark medialisiert und nähert sich dem Innenknöchel bis zur Falschgelenkbildung an (126;127). Man spricht umgekehrt auch von einer Luxation des Taluskopfes aus seiner Pfanne ("Acetabulum pedis"), die vom Os naviculare und durch die kalkaneale Gelenkfläche gebildet wird (28). Nach der Säulentheorie (40), die den Fuß in einen medialen und lateralen Strahl unterteilt, führt eine Deviation des Navikulare (medialer Strahl) konsekutiv zu einer Deviation des Kuboids (lateraler Strahl). Das Os cuboideum wird mit dem Navikulare "mitgezogen" und folglich subluxiert das Kalkaneokuboidgelenk nach medioplantar. Das talokalkaneare Gelenk ist in sagittaler, koronarer und vor allem horizontaler Ebene rotiert (82). Hier findet sich der Kalkaneus invertiert und supiniert. Eine Verkürzung der plantaren Ligamente führt zu einer Flexionsdeformität mit Adduktion der tarsometatarsalen Gelenke, und es wird eine Hohlfußstellung ausgebildet.

Die Klumpfußdeformität wird verstärkt durch eine sekundäre Muskelimbalance zugunsten der plantarflektierenden supinierenden Muskeln (18). Hier ist vor allem der Musculus tibialis posterior zu nennen, der u.a. am Os naviculare ansetzt. Im Gegensatz dazu sind die Peronealmuskeln überdehnt und atrophisch verändert. Der Musculus triceps surae zeigt neben einer Atrophie zusätzlich eine Fibrosierung, was zur typischen schmächtigen Klumpfußwade führt.

Die Bindegewebsstrukturen sind am deutlichsten zwischen Innenknöchel und Kahnbein verkürzt (47). Dies gilt insbesondere für das Ligamentum deltoideum, das mit seinen tibiokalkanealen, tibiotalaren und tibionavikularen Anteilen den Klumpfuß in seiner typischen Stellung fixiert. Auch die Gelenkkapseln sind verdickt und es können intraartikuläre Adhäsionen zu finden sein (49).

12

Der Klumpfuß stellt sich also als komplexe Fehlstellung mit knöchernen Fehlbildungen, Gelenkfehlstellungen und -abnormitäten, Imbalance der ansetzenden Muskulatur und vor allem pathologischen Kapsel-Band-Kontrakturen dar.

1.1.6. Diagnose

Die Diagnose des kongenitalen Klumpfußes ist eine klinische und erfolgt durch Inspektion sowie eine manuelle Untersuchung unmittelbar nach der Geburt. Die Füße der kleinen Patienten werden in Rückenlage und 90° Knie– und Hüftbeugung untersucht. Es werden die Spontanhaltung, die passive Korrigierbarkeit und Beweglichkeit der Füße begutachtet. Insbesondere werden die vier Komponenten der Klumpfußfehlstellung Equinusstellung, Varusdeviation, Adduktionsstellung und Innenrotation geprüft.

Nach Jahss (61) ergeben sich zwei Kategorien: In Kategorie I werden die lagerungsbedingten, positionalen Klumpfüße zusammengefasst, die leicht passiv korrigierbar sind und stets auf eine konservative Therapie ansprechen. Die Klumpfüße der Kategorie II sind die steifen und kontrakten Klumpfüße, die passiv nicht redressierbar sind.

Neben den typischen Komponenten finden sich bei Inspektion auch eine medioplantare Mittelfußhautfalte und/oder eine oberhalb des Tuber calcanei verlaufende quere Falte. Des Weiteren sind eine Fußlängendifferenz beim unilateralen Klumpfuß, die Relation zwischen Unterschenkel bzw. Außenknöchel und Rückfuß in Bezug auf Rotation und das Ausmaß der Hohlfußstellung zu dokumentieren.

Zur apparativen Diagnostik nach dem dritten Lebensmonat zählt als wichtige Untersuchung das standardisierte Röntgen nach Simons (124;125). Es werden hierbei Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen (anterior-posterior und lateral) angefertigt. Dabei wird das Fußskelett unter Belastung in maximaler Korrekturstellung unter standardisierten Bedingungen dargestellt. Ziel ist es, die pathologischen Achsfehlstellungen, vor allem von Talus und Calcaneus, sowohl in der lateralen, als auch in der anteroposterioren Projektion einschätzen zu können, um so ein Maß für die vorhandene Fehlstellung zu erhalten.

1.1.7. Klassifikation

Um eine Aussage zum Schweregrad einer Klumpfußdeformität und somit über das Ausmaß der notwendigen Therapie zu erhalten, werden die Klumpfüße in den ersten Lebenswochen anhand klinischer Parameter klassifiziert.

Diméglio etablierte auf der Basis einer 20 Punkteskala eine Einteilung der Klumpfüße in vier Grade. In die Bewertung geht das Ausmaß der Redressierbarkeit der für die Fehlstellung typischen vier charakteristischen Komponenten (Equinusstellung, Varusdeviation, Adduktionsstellung, Innenrotation) ein. Diese werden je nach Ausmaß mit 0 bis 4 Punkten bewertet. Im schlechtesten Fall erhält ein steifer Fuß demnach 16 Punkte. Hinzu kommen je ein Zusatzpunkt für eine deutliche mediale und für eine tiefe dorsale Falte. für eine Hohlfußkomponente und für eine schlechte Muskelbeschaffenheit.

Grad I (0-5 Punkte; 20% der Klumpfüße): die Füße sind benigne, positionale oder posturale Klumpfüße und werden auch als soft-soft bezeichnet. Die Korrigierbarkeit beträgt > 90% und die Füße sprechen sehr gut auf eine konservative Behandlung an.

Grad II (5-10 Punkte; 33% der Klumpfüße): die Füße werden als moderate Klumpfüße oder soft-stiff Füße bezeichnet. Diese Füße können durch konservative Methoden stark verbessert werden. Der Prozentsatz exzellenter Ergebnisse bei einer evtl. Operation liegt bei 95%.

Grad III (10-15 Punkte; 35% der Klumpfüße): diese schweren Klumpfüße werden auch stiff-soft Füße genannt. Dieser rigide Fuß ist nur noch wenig redressierbar. Die konservativen Erfolgsaussichten liegen unter 50%. Nach initialer Gips- und Physiotherapie ist eine operative Therapie Mittel der Wahl.

Grad IV (15-20 Punkte; 12% der Klumpfüße): diese sehr schweren Klumpfüße (stiffstiff) sind nur um etwa 20% redressierbar und werden auch als pseudoarthrogrypotisch bezeichnet. Diese Füße sollten früh operiert werden und zeigen mit einer Reoperationsrate von 40% die schlechtesten Ergebnisse (26).

1.1.8. Therapie

Die Therapie des kongenitalen Klumpfußes ist zunächst eine konservative. Mittels schonender manueller Redression und Etappengipsbehandlung kann vor allem die Varuskomponente verringert werden. Bei weniger schwer ausgeprägten Klumpfüßen können so Erfolgsquoten von 35% erreicht werden (140). Wird keine ausreichende Korrektur vor allem des Spitzfußes erzielt, so wird nach Ponseti eine perkutane Durchtrennung der Achillessehne im Alter von 4-6 Wochen durchgeführt. Diese erfolgt in Verbindung mit einer subtalaren Derotation und Überkorrektur des subtalaren Drehfehlers mit einer manuellen Überdehnung der medialen Weichgewebsstrukturen und einer konsequenten Schienentherapie (103). Die Indikation zur operativen Therapie unzureichenden Korrektur ergibt sich aus einer durch die konservative Primärbehandlung. Als Operationsprinzip soll hier nur unter vielen anderen die peritalare Arthrolyse via Cincinnati-Zugang (21;75) genannt werden. Dieser operative Zugang erlaubt den medialen, dorsalen und lateralen Zugang zum Rück- und Mittelfuß. Von hier kann die bestehende Fehlstellung im Talokalkanealen-, Talonavikularen- und Kalkaneokuboid-Gelenk derotiert und reponiert werden. Eine zusätzliche temporäre

Kirschner-Draht-Fixation des Talonavikulargelenkes und des Talokalkanealgelenkes sowie ein Oberschenkelgips sichern die Korrekturstellung (75).



Abb. 1.03: Intraoperativer Befund eines beidseitigen Klumpfußes mit Ansicht von plantar: links vor und rechts nach peritalarer Arthrolyse

1.2. Kollagen

Das Wort Kollagen leitet sich aus dem griechischen κολλα (Kolla) ab und bedeutet "Leim" und "ist der Bestandteil des Bindegewebes, der beim Erhitzen Gelatine ergibt" (Oxford Dictionary 1893).

Die kollagenen Moleküle sind in der extrazellulären Matrix des Bindegewebes lokalisiert. Sie gehören mit dem weniger häufig vorkommenden Elastin zu den wichtigen unlöslichen Proteinen des Extrazellularraumes. Das Kollagen verleiht dem Gewebe eine hohe Zugfestigkeit. Die physiologischen und biochemischen Eigenschaften des Bindegewebes werden entscheidend von der Struktur und Modifikation der Peptidketten und der Art und dem Grad der intermolekularen Quervernetzung des Kollagens beeinflusst. Die räumliche Ausrichtung der unterschiedlichen Kollagenfibrillen und die im Gewebe vorkommenden Kollagentypen sind weitere Faktoren. Das extrazelluläre Kollagengerüst ist zudem der Ort der Zellhaftung und Verankerung von Makromolekülen (62).

1.2.1. Einteilung

Die Familie der Kollagene besteht aus verschiedenen Kollagentypen. Bis heute wurden 27 unterschiedliche Typen, die auf über 40 Genorten codiert sind, identifiziert und charakterisiert. Allen diesen extrazellulären Proteinen ist gemeinsam, dass sie aus drei Polypeptidketten bestehen und eine tripelhelikale Domäne ausbilden können. In den Polypeptidketten dieser tripelhelikalen Regionen findet sich ein wiederkehrendes Aminosäuretriplet in dem an erster Position ein Glycin, an Position zwei (X) häufig Prolin und an Position drei (Y) häufig Hydroxyprolin zu finden ist (Gly-X-Y) (13;34). Die Einteilung der Kollagentypen in Klassen beruht auf ihrer Lokalisation und Anordnung im Gewebe und auf Strukturmerkmalen der Moleküle, wie beispielsweise die Länge der tripelhelikalen Region (6;65;105):

•	Fibrillen-bildende Kollagentypen	I, II, III, V, XI, XXIV,
		XXVII
•	FACIT-Kollagene (fibril-associated	
	collagens with interrupted triple helices)	IX,XII,XIV, XVI, XIX, XX,
		XXI, XXII
•	Netzwerk-bildene Kollagentypen	IV, VI *, VIII, X
•	Ankerfibrillen-bildendes Kollagen	VII

17

•	membran-assoziiertes Kollagen	XIII, XVII, XXIII, XXV
•	MULTIPLEXIN ** (homologe Kollagene)	XV, XVIII

- * VI auch Mikrofibrillen-bildendes Kollagen
- ** = multiple triple helix and interruped triplehelices

1.2.2. Die fibrillenbildenden Kollagentypen I, III und V

Eine wesentliche Leistung der Bindegewebszellen besteht in der Synthese von fibrillenbildenden Kollagenen. Die Typen I, III und V sind die im ligamentären Gewebe am häufigsten vorkommenden Kollagene. Sie gehören zusammen mit den Kollagentypen II, XI, XXIV und XXVII der Gruppe der fibrillenbildenden Kollagene an. Ihre Kollagenmoleküle bestehen aus drei etwa 1000 Aminosäuren langen Peptidketten, den sogenannten α -Ketten. Das Molekulargewicht einer α -Kette beträgt etwa 95 kD. Mit Ausnahme weniger Reste am N- und C-terminalen Ende wiederholt sich in dieser Kollagenfamilie nahezu über das gesamte Peptid hinweg ein Aminosäuretriplet. An erster Position findet sich hierbei ein Glycin. Die zweite Position (X) ist häufig mit Prolin und die dritte (Position Y) häufig Hydroxyprolin besetzt (Gly-X-Y). (13;34). Nach Translation und posttranslationalen Modifikationen von Vorläuferpeptiden, den sogenannten Propeptiden, wird das helikale Kollagenmolekül im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gebildet. Das repetitive Aminosäuretriplet ist hierbei Voraussetzung für die für fibrillenbildende Kollagene typische stabile, rechtsgewundene Helix aus drei Polypeptidketten. Die Ganghöhe beträgt drei Aminosäuren.

Die Stabilität der Tripelhelix ist Folge von intra- und intermolekularen van der Waals Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Interaktionen mit anderen Kollagenmolekülen und elektrostatischen Eigenschaften des Moleküls, sowie sterische Einschränkungen des Prolinrings im Molekül. (27).

Am N- und C-terminalen Ende des Moleküls liegen keine Glycin-X-Y Triplets vor, sodass hier keine Helix sondern Telopeptide zu finden sind. Die Aminosäuresequenzen unterscheiden sich erheblich von der regelmäßigen Sequenz im helikalen Teil.

Nach der Sekretion kommt es extrazellulär zur Anlagerung der Kollagenfibrillen mit einer für die fibrillenbildenden Kollagene typischen Anlagerung mit einer Periode D von 67 nm. Die Lysinreste des nicht-helikalen Telopeptides sind hier wichtige Stellen zur Quervernetzung und tragen so erheblich zur Stabilisierung der Kollagenfibrillen bei (65).

Die Telopeptide werden beim limitierten Pepsinabbau (siehe 2.3.2.) an der Stelle Leu95 vom helikalen Teil abgetrennt und die gegen proteolytische Enzyme sonst inerte native Tripelhelix geht in Lösung (62).

Das Kollagen Typ I ist der quantitativ dominierende Kollagentyp und ist ganz wesentlich für die mechanische Belastbarkeit von Haut, Sehnen, Ligamenten, Knochen, Dentin u.a. verantwortlich. Das Molekül ist etwa 290 nm lang und 1,5 nm hoch. Es ist ein Heterotrimer und wird aus drei Ketten gebildet: zwei identischen α 1(I)- und einer α 2(I)-Kette (101).

Bei der Osteogenesis imperfecta liegen bei Typ I-IV dieser Erkrankung Mutationen im Bereich der α -Kette des Kollagen I vor.



Abb. 1.04: Das Kollagen I Molekül (vgl. (66) S.112)

Kollagen Typ III ist ein Homotrimer und besteht aus drei identischen α 1(III)-Ketten. Es ist vor allem in Sehnen, Bändern, dem Uterus und fetaler Haut zu finden (86). Mutationen der α 1(III)-Kette können zum familiären Aortenaneurysma führen. Der vaskuläre Typ des Ehlers-Danlos Syndroms sind Folge einer Veränderung der Kollagen III Kette.

Das Kollagen V Molekül besteht im Wesentlichen aus zwei gleichen $\alpha 1(V)$ -Ketten und einer $\alpha 2(V)$ -Kette. Es ist in geringen Mengen u.a. in Haut, Sehnen, Ligamenten und Knochen zu finden (6;94). Mutationen der α Ketten des Kollagen V führen zum klassische Typ des Ehlers-Danlos Syndroms.

1.2.3. Die Synthese von Kollagenfibrillen

Die Biosynthese von fibrillenbildenden Kollagenen ist ein komplexer Prozess von cound posttranslationalen Modifikationen, an dem unterschiedliche Enzyme beteiligt sind. Diese sind sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert. Intrazellulär erfolgen im rauen Endoplasmatischen Retikulum die Translation und die posttranslationale Modifikation von löslichen Pro-Kollagenketten. Im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums kommt dann es zur Anlagerung von korrespondierenden Kollagenketten eines Kollagentyps. Hier erfolgt die Bildung von tripelhelikalen Pro-Kollagenmolekülen. Diese werden zum Golgi-Apparat transportiert und von dort sezerniert. Extrazellulär erfolgt nach enzymatischer Spaltung der für die Löslichkeit verantwortlichen pN- und pC-terminalen pro-Reste die Formation zu Fibrillenmonomeren (Tropokollagen). Diese bilden Fibrillen, die im Anschluss durch Quervernetzungen stabilisiert werden (65). So entsteht eine übergeordnete Fibrillenstruktur, bei der die Regulation des seitlichen und axialen Wachstums sehr komplex ist und von spezifischen Faktoren beeinflusst wird (144). Die Anordnung im Bindegewebe gestaltet sich daher sehr verschieden und reicht von dicken, parallelen Faserbündeln in der Sehne bis zu einem dreidimensionalen Fasergeflecht der Haut.

Intrazelluläre Modifizierung

Biosynthese:

Nach der Transkription des genetischen Codes im Zellkern folgt die Translation der m-RNA an Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums. Hier kommt es zur Bildung der prä-pro α -Ketten. Die prä-pro α -Kette als Translationsprodukt geht in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, wobei ein kurzer N-terminaler Rest, die Signalsequenz, abgespalten wird (68) und die pro α -Kette entsteht. Am N- und Cterminalen Ende der pro α -Kette befindet sich eine Region langer, nicht-helikaler pNund pC-Propeptide. Das pC-Propeptid ist für die Wasserlöslichkeit der pro α -Kette unter physiologischen Bedingungen verantwortlich und verhindert eine intrazelluläre Aggregation (65). Das pN-Propeptid hat einen regulatorischen Effekt auf die mRNA-Translation (6).

posttranslationale Modifikationen:

Die pro α -Kette wird am rauen Endoplasmatischen Retikulum während des Wachstums der Pro- α -Kette weiter modifiziert. Hier kommt es zunächst zur enzymatischen Hydroxylierung von bestimmten Prolyl- und Lysylresten. Die Enzyme Prolyl-4-Hydroxylase und Prolyl-3-Hydroxylase hydroxylieren Prolin zu 4-Hydroxyprolin und 3-Hydroxyprolin. Die Aminosäure Lysin (Lys) wird durch die Lysylhydroxylase zum Hydroxylysin (Hyl) katalysiert (71). Das Hyl ist der Bindungspunkt der folgenden enzymatischen Glykosylierung und eine initiale Aminosäure für die Bildung von Quervernetzungen (69). Darüber hinaus sind diese polaren Reste für die Ladungsverteilung und somit für die Ausbildung hydrophiler Bereiche der Kette verantwortlich. Diese sind später bei der Anlagerung der α -Ketten in der Fibrillenbildung beteiligt (15).

Im Gegensatz zum Hydroxylysin ist die Aminosäure Hydroxyprolin als Produkt der posttranslationalen Modifikation im Ligament kollagenspezifisch. Der Gehalt an Hydroxyprolin (Hyp) ist im Gegensatz zum Hydroxylysin konstant. Die konstante Menge an Hydroxyprolin im Peptid ist für die Stabilität der Tripelhelix eine unbedingte Voraussetzung. Die Messung von Hydroxyprolin kann so zur Quantifizierung der Kollagenmenge herangezogen werden (9;84;96;109;115;117).



Abb. 1.05: Die kollagenspezifischen Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin (vgl. (66) S.113)

Ebenfalls am rauen Endoplasmatischen Retikulum kommt es zur enzymatischen Glykosylierung von Hydroxylysinresten der pro α-Ketten. Die Zucker Galactose und Glykosyl-Galactose werden mit Hilfe der Enzyme Hydroxylysyl-Galactosyl-Transferase und Galactosyl-Hydroxylysyl-Glucosyl-Transferase O-glykosidisch gebunden (67;116). Diese Bindung ist im alkalischen Milieu sehr stabil. Die exakte biologische Rolle dieser Zucker ist nicht endgültig geklärt. Eine starke Glykosylierung verändert jedoch die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Kollagenmoleküls. Dies beinhaltet Hydrophobizität, die Anfälligkeit für Proteolyse und Ordnung der Aggregate (85). Es wird zudem vermutet, dass eine starke Glykosylierung zur Interaktion mit anderen Matrixmolekülen führt (135) und eine enge Staffelung der Moleküle behindern kann (42). Zudem beeinflusst die Glykosylierung den Durchmesser der Kollagenfibrille. Das Ausmaß der Glykosylierung ist beeinflusst durch die Temperatur (136), die Aktivität der modifizierenden Moleküle oder durch Mutationen, die eine rasche Fibrillenbildung verhindern, so dass eine Übermodifizierung entsteht.

Diese Mutationen und die Übermodifizierung führen zu einer Co-Polimerisation mit anderen Molekülen und somit zu einer gestörten Organisation der Fibrillen (11).



 $\texttt{2-O-}\alpha-\texttt{D-}Glykopyranosyl-O-}\beta-\texttt{D-}Galactopyranosylhydroxylysine}$

Abb. 1.06: Die Struktur des O-glykosidisch gebundenen Disaccharides Glykosyl-Galaktose (vgl. (66) S.115)

Bildung und Sekretion der Tripelhelix

Nach Abschluss der Translation lagern sich drei korrespondierende pro- α -Ketten eines Kollagentyps im Bereich der C-Peptid Domäne an. Diese nicht-helikale C-Peptid Domäne ist ein wichtiger Ort zur Erkennung und Selektion der zur Bildung des Moleküls benötigten pro-a-Ketten Diese sogenannte Nukleation wird durch Disulfidbrücken in der gleichen C-Peptid Region stabilisiert. Die Bildung der Tripelhelix erfolgt nach dem Reißverschlussprinzip vom C- zum N-Peptid. Dieser Vorgang wird von Chaperonen des Endoplasmatischen Retikulums unterstützt. Als eines der wichtigsten sei hier das kollagenspezifische Hsp47 genannt, dessen Rolle bei der Bildung des Kollagenmoleküls noch nicht endgültig geklärt ist, das aber (thermo)stabilisierende und kontrollierende Aufgaben während der Synthese im Endoplasmatischen Retikulums zu haben scheint. So fand sich u.a. in Geweben mit einer pathologisch erhöhten Kollagensynthese oder einer gestörten Kollagenakkumulation eine dramatische Hochregulation der Hsp47 Expression (73). Eine weitere entscheidende Rolle für die Stabilität besteht in einer sterischen Einschränkung des Prolinringes im Molekül durch eine Blockade der Rotation des Ringes (27). Ein Faktor für die Stabilität der helikalen Domäne ist der hohe Gehalt an Glycin, das als Aminosäure ohne Seitenkette an jeder dritten Stelle des Polypeptides zu finden ist und im Molekül dicht gepackt die innere Position in der Helixwindung einnehmen kann. Der hohe Anteil und die Lokalisation von Prolin (120 Reste pro α 1-Kette des Kollagen Typ I) und Hydroxyprolin (100 Reste pro al-Kette des Kollagen TypI) im Triplet tragen ebenso zur hohen Stabilität des Moleküls bei. So ist beispielsweise einer der wichtigsten Stabilitätsfaktoren der Helix eine Wasserstoffbrückenbindung des Glycins mit der in X Position befindlichen Aminosäure der benachbarten Kollagenkette. Hydroxyprolin ist zudem aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften ein wichtiger Faktor für die (thermische) Stabilität der fibrillenbildenden Kollagenmoleküle (43;84;108;110).

Die Reste der an X und Y Position befindlichen Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin liegen an der Oberfläche der Helix und sind somit nach außen gerichtet. Diese Tatsache spielt eine wesentliche Rolle in der Fibrillenformation, da an diesen Orten des Moleküls Möglichkeiten zur Interaktion mit anderen Molekülen gegeben sind. So spielen verschieden geladene Aminosäurereste an der Helixoberfläche und hydrophobe Interaktionen benachbarter Kollagenmoleküle eine entscheidende Rolle bei der späteren Fibrillenbildung.

Weitere Faktoren für eine stabile Tripelhelix sind Disulfidbindungen (insbesondere beim Typ III Kollagen) und Paarbildungen durch Seitenketten des Moleküls (100).

Bei einer Verzögerung der Tripelhelixbildung, wie es z.B. bei der Osteogenesis imperfecta durch eine Punktmutation einer der Kollagen I Kette der Fall ist, kommt es

25

zu einer Übermodifikation der kollagenen Domäne durch die Enzyme der posttranslationalen Modifikation mit einem Anstieg des Hydroxylysinanteils und der Glykosylierung (107).

Die Enzyme der posttranslationalen Modifikation können nach der Bildung des helikalen Moleküls nicht mehr angreifen (66;70) und das pro-Kollagenmolekül wird nun zum Golgi-Apparat transportiert.

Die Sekretion des pro-Kollagenmoleküls folgt dem klassischen Weg der extrazellulären Moleküle über den Golgi-Apparat mittels Exozytose (6).

Fibrillenbildung

Im Extrazellulärraum werden die wasserlöslichen pro-Kollagenmoleküle durch Abspaltung von N- und C-terminalen Resten des nicht-helikalen Teils durch spezifische Proteinasen zu unlöslichen Fibrillenmonomeren. Diese sogenannten Tropokollagenmoleküle ordnen sich dann automatisch mit einer Staffelung von etwa ¹/₄ ihrer Länge zu einer Fibrille.

Als Faktoren für diesen "self-assembly" Prozess wirken elektrostatische Interaktionen benachbarter Kollagenmoleküle durch unterschiedliche Regionen von hydrophoben und geladenen Bereichen (62;65). Es wird diskutiert, dass im Rahmen dieses selbstregulatorischen Prozesses der Fibrillenbildung gewebespezifische Faktoren eine Rolle spielen, die noch nicht im einzelnen bekannt sind. So sollen der Zelltyp, Bestandteile der extrazellulären Matrix oder eine zellvermittelte Regulation das laterale und axiale Wachstum der Kollagenfibrillen, die Architektur und den Durchmesser der Fibrillen beeinflussen(62;65). Ein regulierender Faktor sind hier die spezifischen Proteinasen, welche die N- und C-terminalen Propeptide der pro-Kollagenmoleküle spalten. Die genaue Rolle der Proteasen in der Fibrillenformation und beim Fibrillendurchmesser ist jedoch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass die in Mastzellen vorkommende Chymase am C-terminalen Ende des pro-Kollagenmoleküls ebenfalls Propeptide abspalten kann, was zu einem 20 Aminosäuren längeren Telopeptid führt (72). Auf diese Weise könnten Mastzellen eine Rolle bei der Ausbildung einer Fibrose spielen.

Der Durchmesser einer Fibrille kann in einer Sehne 50-500 µm betragen (65). Dabei hat eine stärkere mechanische Beanspruchung einen größeren Durchmesser der Fibrille zur Folge. Durch Überlappungsphänomene der Fibrillenmonomere kommt es im elektronenmikroskopischen Bild zur typischen periodischen Streifung einer Kollagenfibrille. Dabei hat eine Periode D bestehend aus einer Lücken- und Überlappungszone ("gab/overlap-zone") den Abstand von 67 nm (100).

Ein Modell zum Fibrillenwachstum geht von einem strukturellen Kern aus, von dem sich das Wachstum durch Anlagerung in beide Richtungen, also longitudinal und axial, entwickelt (50;62;105;123;144). Die Zuwachsrate ist dabei umso schneller, je kleiner der Durchmesser der Fibrille ist (144). Dieser Mechanismus umfasst ausgedehnte Bereiche, die Millionen von Kollagenmoleküle einschließen können (62;65).

Unmittelbar nach der Bildung der Kollagenfibrille kommt es zur Ausbildung von Ouervernetzungen (cross-links)



Abb. 1.07: Schema zur intra- und extrazellulären Modifikation von Kollagen (vgl.

(66) S.113)

1.2.4. Quervernetzungen

Die biomechanische Stabilität der Kollagenfibrille v.a. in Bezug auf ihre Dehnbarkeit und damit auch die für das Gewebe erforderlichen mechanischen Eigenschaften hängen unmittelbar mit der Art und dem Grad der kovalenten intermolekularen Quervernetzung Verhältnis zusammen (70). Anzahl, Art und das der unterschiedlichen Quervernetzungen zueinander, also das Quervernetzungsmuster, variiert innerhalb eines Kollagentyps und steht in direkter Beziehung zu der physiologischen Funktion des Bindegewebes (113). Eine feine Störung dieses Musters hat geänderte mechanische Eigenschaften des Gewebes zur Folge und kann damit Ursache einer Störung der physiologischen Funktion sein.

Bildung kovalenter Quervernetzungen

Der initiale Schritt zur Bildung von Quervernetzungen ist abhängig vom Enzym Lysyloxidase, dem einzigen bekannten Enzym, das zur Entstehung von Quervernetzungen benötigt wird. Es befindet sich extrazellulär und bindet während des "self-assembly" Prozesses an der Fibrillenoberfläche. Die Aktivität der Lysyloxidase ist u.a. abhängig vom Gewebetyp (6;66). Sie katalysiert die Spaltung der ε-Aminogruppe der Lysinreste (Lys) bzw. Hydroxylysinreste (Hyl) im Telopeptid und die Oxidation zu Lysinaldehyden (Allysinen) und Hydroxylysinaldehyden (Hydroxyallysinen). Diese Aldehyde sind Ausgangspunkt des Lysinaldehydpfades der Quervernetzung, der z.B. in der Haut dominierend vorkommt (soft-tissue) und des Hydroxylysinpfades, der vor allem in Knorpel und Knochen vorherrscht (hard-tissue) (23;83).

Difunktionale Quervernetzungen

Die intermolekulare Quervernetzung des Kollagens beginnt mit der Bindung eines Allysins oder Hydroxyallysins an einen helikalen Lysin- oder Hydroxylysinrest oder an ein weiteres Aldehyd eines benachbarten Kollagenmoleküls der Fibrille. Diese Kondensationsreaktion führt zur Bildung von difunktionalen, reduzierbaren Quervernetzungen (6;66). Diese intermolekularen Quervernetzungen werden für die primäre Stabilisierung der Fibrillen verantwortlich gemacht. Die physiologische Bedeutung dieser Quervernetzungen ist noch nicht bekannt (6;66).

Zu den divalenten Quervernetzungen zählt im Lysinaldehyd-Pfad das Aldolkondensationsprodukt (ACP) als Reaktion zweier Allysine (66;146). Ebenfalls im Lysinaldehyd-Pfad entsteht aus der Reaktion eines Allysins mit einem helikalen Hydroxylysin eines benachbarten Kollagenmoleküls das Aldiminderivat deH-HLNL (Dehydro-Hydroxylysinonorleucin) (146).

Auf dem Hydroxylysinaldehyd-Pfad entstehen zum einen aus der Reaktion eines Hydroxyallysins mit einem helikalen Hydroxylysin das deH-DHLNL (Dehydro-Dihydroxylysinonorleucin), zum anderen wird aus der Reaktion eines Hydroxyallysins mit einem Lysin das deH-LHNL (66;146). Diese sind divalente Quervernetzungen und kommen beispielsweise in Knochen und in Dentin vor.

Die divalenten Quervernetzungen werden im Zuge des Reifungsprozesses des Gewebes durch multivalente Quervernetzungen ersetzt. Hierbei kommt es u.a. entscheidend auf den Hydroxylierungsgrad der Lysinreste während der intrazellulären posttranslationalen Modifikation an (6;66). Die Regulation des Quervernetzungsmusters als wichtiger Parameter der physiologischen Funktion des Gewebes erfolgt somit über eine auf verschiedenen Ebenen stattfindenden, extra- und intrazellulären, gewebespezifischen Kontrolle (146).

30


deH-LHNL - Dehydro-Lysinohydroxynorleucin

deH-DHLNL - Dehydro-Dihydroxylysinohydroxynorleucin

HP – Hydroxylysylpyridinolin LP – Lysylpyridinolin

Abb. 1.08: Schema der Quervernetzungspfade des Lysinaldehydpfades und des

Hydroxylysinaldehydpfades (33;66;146)

Multivalente Quervernetzungen

Die multivalenten oder reifen Quervernetzungen sind durch Bildung von intermolekularen Quervernetzungen verantwortlich für die biomechanische Stabilität und Funktion des Bindegewebes (66) und nehmen mit dem Alter eines Gewebes zu (147).

Auf dem Lysinaldehyd-Pfad entsteht das tetravalente deH-HHMD (Dehydro-Histidinohydroxylysinomerodesmosin) durch Bindung von Histidin und Hydroxylysin an das divalente ACP (Aldolkondensationsprodukt) (146). DeH-HHMD kommt vornehmlich in Weichgeweben wie Ligamenten und Haut vor. Der Gehalt dieser Quervernetzung nimmt mit zunehmendem Alter zu, um später wieder geringer zu werden. Dies wird auf die Bildung stabilerer Quervernetzungen zurückgeführt (146).

Als ein weiteres Produkt dieses Allysinpfades kommt es über die Quervernetzung deH-HLNL (Hydroxylysinonorleucin) durch Bindung an einen helikalen Histidinrest zur Bildung trifunktionellem HHL (Histidinohydroxylysinonorleucin) von der Hauptquervernetzung des Weichgewebes (146). HHL verbindet als intermolekulare Quervernetzung drei Kollagenmoleküle (146). HHL ist die Hauptquervernetzungskomponente der Haut und nimmt mit dem Alter zu (146). Eine Erhöhung der HHL Quervernetzung in der Sehne scheint Folge einer Erhöhung der Glykosylierung des Moleküls zu sein.



Histidinohydroxylysinonorleucin

Abb. 1.10: Struktur des HHL (vgl.(74))

Als wichtigste Produkte des Hydroxylysin-Pfades sind die Quervernetzungen Hydroxylysyl-Pyridinoline (HP) und Lysyl-Pyridinoline (LP) identifiziert worden. Sie sind Hauptkomponenten des Hartgewebes wie Knochen und Dentin (30). Aber auch in der Haut können Pyridinoline in geringeren Mengen nachgewiesen werden (14). Die Pyridinoline HP und LP sind nicht reduzierbar, säurestabil, UV-sensitiv und lassen sich zur Fluoreszenz anregen (Exitationswellenlänge: 297nm, Emissionswellenlänge: 397nm) (37). Ein genauer chemischer Reaktionsmechanismus für ihre Bildung konnte bis jetzt nicht gefunden werden. Als gesichert gilt, dass HP aus deH-DHLNL und LP aus deH-LHLNL durch Bindung eines Hydroxylysin (Hyl) entsteht (146) (4).



Abb. 1.09: Die Pyridinolinquervernetzungen HP und LP (vgl. (30))

Nichtenzymatische Quervernetzungen

Prinzipiell können enzymatische Quervernetzungswege über die Lysyloxidase und nichtenzymatische Quervernetzungen unterschieden werden. Neben der beschriebenen intrazellulären enzymatischen Glykosylierung (siehe 1.2.3) existiert zudem eine nichtenzymatische. Hier binden Zuckeraldehyde oder Zuckerketone an die freie Aminogruppe entweder eines Lysins oder eines Hydroxylysins (Maillard Reaktion). Das entstandene Ketoamin wiederum kann mit anderen freien Aminogruppen Crosslinks ausbilden (17). Diese glykosidischen Quervernetzungen steigen mit zunehmendem Alter an und vermindern wahrscheinlich die Proteolyse des Kollagens und somit dessen Remodeling (66). Zudem werden späteren Reaktionsprodukten eine pathologische Bedeutung der nichtenzymatischen Glykosylierung zugeschrieben (4).

1.3. Fragestellung

Zahlreiche Untersuchungen sind vorgenommen worden, um das Erscheinungsbild und die Ätiologie des kongenitalen Klumpfußes zu ergründen. Neben anderen scheint der Bindegewebsfaktor ("retracting fibrosis") eine Erklärungsmöglichkeit zu bieten. Bis heute ist jedoch der fibröse mediale Bindegewebskomplex nicht ausreichend biochemisch charakterisiert worden. Ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix des medialen Kapsel-Band-Komplexes stellt das Kollagen dar.

Es ergeben sich im Hinblick auf eine Charakterisierung des Kollagens folgende Fragen:

- Wie stellt sich das Verteilungsmuster der im Binde- und Stützgewebe hauptsächlich vertretenen Kollagentypen I, III und V im immunhistochemisch gefärbten Präparat dar?
- Ergeben sich im Hinblick auf Fibrillenbildung und Fibrillendurchmesser anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen Hinweise auf eine Pathologie der Kollagenfibrillen?
- Wie ist das Verteilungsmuster der Banden in der SDS-PAGE beim Klumpfuß und ergeben sich beim Klumpfuß Hinweise auf eine Verschiebung der Kollagentypen sowie auf Mutationen der Kollagenkette?

- Wie ist die quantitative Verteilung der Kollagentypen I, III und V?
- Wie hoch ist der Anteil des Kollagens am Trockengewicht des Ligamentum deltoideum beim Klumpfuß und bei Kontrollen?
- Wie hoch ist der Grad der Hydroxylierung und Glykosylierung (posttranslationale Modifikationen) im Kollagenmolekül?
 - Mit welchen Komponenten und wie stark ist das Kollagen im Vergleich zum gesunden Fuß quervernetzt?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Patienten und Kontrollen

In dieser Arbeit wird das Kollagen von insgesamt 47 Gewebeproben biochemisch charakterisiert. Diese Proben bestehen aus Anteilen des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes des Ligamentum deltoideum.

Die Gruppe der idiopathischen Klumpfüße stellt dabei mit 24 Fällen (9 weibl., 15 männl.) die größte Kohorte dar. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 9,2 Monate (4 – 15 Monate). Die kongenitalen Klumpfüße wurden auf der Grundlage der Diméglio-Klassifikation (26) in drei Gruppen eingeteilt (siehe Tab 2.01). Die Gruppe der Typ II Klumpfüße besteht dabei aus fünf Patienten (3 weibl., 2 männl.) mit einem durchschnittlichen Alter von 7,6 Monaten (6 – 9 Monate). Bei den Klumpfüßen Typ III nach Diméglio umfasst die Gruppe acht männliche und vier weibliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 7,4 Monaten (4 - 15 Monate). In die Gruppe der schwersten Klumpfüße mit dem Grad vier werden sieben Patienten (5 männl., 2 weibl.)

Alle Patienten, waren nach dem standardisierten Therapieprotokoll mit manueller Redression, Gipsverbänden und Krankengymnastik behandelt. Es besteht bei keinem Patienten ein bekannter systemischer Kollagendefekt oder ein Hinweis auf eine Störung, die eine sekundäre Veränderung des Kollagenstoffwechsels zur Folge haben könnte. Die untersuchten Gewebeproben konnten intraoperativ im Zuge einer peritalaren Arthrolyse gewonnen werden, ohne das die Operation zu Gewebeentnahme erweitert oder modifiziert werden musste.

Die Kontrollen wurden freundlicherweise vom Institut für Rechtsmedizin in Erlangen zur Verfügung gestellt. Auch bei diesen 14 Referenzen konnte gewährleistet werden, dass, nach Durchsicht der Obduktionsprotokolle, keine wesentlichen Grunderkrankungen oder Nebenleiden vorliegen, die von Relevanz für Untersuchungen des Kollagens sein könnten.

Eine weitere Gruppe bilden fünf Rezidivklumpfüße. Diese wurden nach Durchsicht der Krankenakten ohne Ausnahme dorsal bzw. dorsolateral voroperiert. Die Gewebeproben wurden in gleicher Weise wie die der idiopathischen Klumpfüße intraoperativ gewonnen und gelagert. Als Fallstudien werden ferner Proben zweier neurogener Klumpfüße bei Patienten mit einer Spina bifida sowie ein unbehandelter Klumpfüß eines älteren Patienten ("neglected clubfood"(98)) in die Studie mit einbezogen.

Gruppe	Anzahl	Alter von	bis	durchschnittl. Alter
Kontrollen	14	14 Tage	2 8/12 Jahre	8,9 Monate
Klumpfuß Typ II Klumpfuß Typ III	5 8	6 Monate 4 Monate	9 Monate 9 Monate	7,6 Monate 6,3 Monate
mannlicn Klumpfuß Typ III weiblich	4	8 Monate	15 Monate	9,5 Monate
Klumpfuß Typ IV männlich	5	6 Monate	8 Monate	6,8 Monate
Klumpfuß Typ IV weiblich	2	7 Monate	7 Monate	7 Monate
Rezidivklumpfüße	5	2 6/12 Jahre	5 6/12 Jahre	4 6/12 Jahre
unbehandelter Klumpfuß	1			7 6/12 Jahre
neurogener Klumpfuß	2	2 3/12 Jahre	2 3/12 Jahre	2 3/12 Jahre

Tab 2.01.: Gruppeneinteilung der untersuchten Proben. Die Klassifikation der Klumpfüße wurde nach Diméglio (26) durchgeführt. Eine ausführliche Liste der Patienten befindet sich im Anhang.

2.1.2. Entnahme der Ligamente

Sämtliche Proben der Klumpfußpatienten (idiopathisch, rezidiviert, unbehandelt, neurogen) wurden vom Operateur entnommen. Es handelte sich bei den Gewebeproben um das Ligamentum deltoideum zwischen Innenknöchel, Talus und Os naviculare. Das Plattfußpräparat konnte während des Transfers der Tibialis posterior Sehne ohne Erweiterung oder Modifikation der Operation gewonnen werden. Unmittelbar nach Entnahme wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf eine Bestimmung des Nassgewichtes musste aufgrund der intraoperativen Spülungen sowie Verwendung von feuchten Kompressen etc. verzichtet werden. Das Deltaband wurde dann in PBS-Puffer ("Phosphate Buffered Salin"-Puffer) gegeben, der es vollständig bedeckte, um ein Gefriertrocknen während der Lagerung zu verhindern. Die endgültige Lagerung erfolgte dann nach Katalogisierung bei –80°C.



I = Innenknöchel, G = med. Gefäß-Nerven-Bündel, t.p. = Sehnenscheide des M. tibiales post, T = Talus, P = Präparat, N = Os naviculare

Abb 2.01: Intraoperative Entnahme des Gewebes zwischen Innenknöchel, Talus und Os naviculare



Abb 2.02: Entnommenes medialseitiges Weichgewebe des kongenitalen Klumpfußes

Die Kontrollen wurden sofort nach Entnahme des unteren Sprunggelenkes durch das Institut für Rechtsmedizin in Erlangen in PBS-Puffer ("Phosphate Buffered Salin"-Puffer) gegeben und auf Eis gelegt. Der Transport in das Labor der orthopädischen Klinik erfolgte ohne Unterbrechung der Kühlkette. Das Ligamentum deltoideum als Referenzgewebe wurde im Labor vom Operateur präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in PBS-Puffer bei –80°C gelagert.



N = Os naviculare, P = Präparat, T = Talus, t.p. = Sehne d. M. tibiales post., d.l. = Sehne d. Flexor digitorum longus

Abb. 2.03.: Aufblick auf die mediale Seite des Referenzpräparates



Abb. 2.04.: Entnommenes Ligamentum deltoideum als Referenz

2.1.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien besaßen die Reinheitsstufe pro analysi. Eine Liste der verwendeten Chemikalien findet sich im Anhang. Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, wurde entionisiertes und pyrogenfreies Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Purelab Plus, UFS Seral, Ransbach-Baumbach) verwendet.

2.2. Histologie und Elektronenmikroskopie

2.2.1. Histologie

Es wurden 19 native Präparate der unter 2.1.1. beschriebenen kongenitalen Klumpfüße, sowie vier Referenzen gleichen Alters histologisch untersucht. Eine genaue Liste der Präparate findet sich im Anhang.

Durchführung:

Von den Präparaten wurden zunächst mittels Kyrostat Gefrierschnitte von 5 µm angefertigt. Dann folgte eine Fixierung über 10 Minuten in Aceton, die durch dreimaliges Waschen mit PBS beendet wurde. Zur Übersicht wurde anschließend bei einigen Schnitten eine Azan-Färbung durchgeführt. Die anderen Schnitte dienten der immunhistologischen Untersuchung der Ligamente auf Kollagentypen I, III und V.

Immunhistologie:

Die primären polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen humanes Kollagen I, III und V wurden freundlicherweise durch das Institut für Molekularbiologie (Direktor: Prof. Dr. Müller) der Medizinischen Universität zu Lübeck zur Verfügung gestellt.

Die durch Aceton fixierten Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C mit den Kollagenantikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS Puffer wurde der sekundäre anti-Kaninchen Antikörper zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Präparate unter dem Axioskop (Fa. Zeiss) ausgewertet.

2.2.2. Elektronenmikroskopie

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden vier Klumpfußpräparate (zwei Klumpfüße Grad III und zwei Klumpfüße Grad IV nach Diméglio), zwei Rezidivklumpfüße, sowie zwei Kontrollen untersucht.

Durchführung:

Die nativen Proben wurden mit der Kugelmühle pulverisiert und in Baker-Wasser aufgenommen. Einer Homogenisierung im Ultraschallbad für 2 Minuten folgte eine Zentrifugation mit 13000g für 6 min. Das entstandene Pellet wurde in Baker-Wasser resuspendiert und erneut für 5 sec mit 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein carbonüberzogenes Kupfernetz aufgetragen, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Grids wurden mit einem JEOL 1200 EX bei einer Spannung von 100 kV elektronenmikroskopisch untersucht. Die Proben wurden mit einer 35000-fachen Vergrößerung analysiert und dokumentiert (22).

2.3. Aufbereitung der Bänder

2.3.1. Vorbereitung der biochemischen Analysen

Die Aufbereitung der Ligamente wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Proben der unter 2.1.1. beschriebenen kongenitalen Klumpfüße wurden zunächst von –80°C auf 4°C aufgetaut und mehrere Male in Wasser gereinigt und gespült. Die Bänder wurden dann in einer aufsteigenden Ethanolkonzentrationsreihe (30%, 50%, 70%) jeweils einen Tag unter leichtem Schütteln entfettet. Anschließend wurden sie in einer absteigenden Ethanolreihe wieder vom Alkohol gereinigt. Die Bänder wurden nun in einer Kugelmühle (Typ MM2, Fa. Retsch) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff pulverisiert, anschließend lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Alpha I/6, Christ, Osterode). Schließlich konnte durch Auswiegen (Mikrowaage, Fa. Sartorius) das Trockengewicht der Ligamente bestimmt werden.

2.3.2. Isolierung des Kollagens

Säurelösliches Kollagen:

Bekannte Mengen der lyophilisierten Ligamente wurden in 0,5 M Essigsäure (pH 2) gegeben und bei 4°C unter ständigem sanftem Rühren 24 h belassen. Anschließend erfolgte die Trennung des säurelöslichen Kollagens durch Zentrifugieren (L8-55 Ultrazentrifuge; Rotor R45 Ti, Fa. Beckmann, München) für 1 h bei 4°C mit 40000 UpM (Umdrehungen pro Minute). Der Überstand wurde dekantiert und die Kollagenmenge durch das Anfertigen einer SDS-PAGE (siehe 2.4.1.) bestimmt (85). Das entstandene Pellet wurde erneut in 0,5 M Essigsäure resuspendiert und über 24 h unter ständigem sanftem Rühren bei 4°C belassen. Nach erneutem Zentrifugieren zeigte die Überprüfung mittels SDS-PAGE kein weiteres Kollagen im Überstand, so dass sämtliches säurelösliches Kollagen aus dem Band bereits im ersten Versuchsdurchgang gewonnen werden konnte.

Pepsinlösliches Kollagen:

Das nach der Isolierung des säurelöslichen Kollagens entstandene Pellet wurde nun in 0,5 M Essigsäure aufgenommen. Der limitierte Pepsinabbau (85) wurde nach Zugabe von Pepsin in einer Konzentration von 5% bei 4°C gestartet. Nach 24 h ständigem sanften Rührens wurde die Suspension bei 40000 UpM zentrifugiert (L8-55 Ultrazentrifuge; Rotor R45 Ti, Fa. Beckmann, München). Der Überstand wurde dekantiert und mit Ammoniak neutralisiert und die Extraktionsausbeute via SDS-PAGE (siehe 2.4.1.) überprüft. Dieser Vorgang wurde fünf Mal wiederholt. Der Überstand des fünften limitierten Pepsinabbaus war frei von Kollagen.

Das gewonnene pepsinlösliche Kollagen wurde gepoolt und bei –18°C zur weiteren Verwendung gelagert. Das Pellet, das weiterhin säure- und pepsinunlösliche Proteine enthielt, wurde ebenfalls gefroren gelagert.

2.3.3. Hydrolysen

Saure Hydrolyse:

Eine über die Mikrowaage bestimmte Menge der pulverisierten, gefriergetrockneten Bänder, sowie die durch den limitierten Pepsinabbau (siehe 2.3.2.) entstandenen Pellets wurden mit 6N HCl (1ml pro mg Trockengewicht) für 24 h bei 110°C hydrolysiert (29). Als Reaktionsgefäße dienten Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht). Anschließend wurden die Proben in einer Speedvac (SpeedVac plusSC 110 AR; Universal Vakuum System Plus UVS 400 A; Fa. Savant, New York, USA) getrocknet und in 1 ml Baker-Wasser aufgenommen.

Alkalische Hydrolyse:

Die definierten, lyophilisierten Probenmengen wurden in 500 µl 2N KOH gegeben und in einem Kryoröhrchen (Fa. Corning, Cambridge, UK) 24 h bei 110°C hydrolysiert. Anschließend wurde das Hydrolysat bei Zimmertemperatur mit Baker-Wasser verdünnt, in ein 50 ml Falkon-Röhrchen gegeben und mit 5M Essigsäure neutralisiert. Die Proben wurden dann mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 2,0-2,5 eingestellt (114;137)

2.3.4. Reduktion

Die für die Reduktion vorgesehenen lyophilisierten Proben wurden in Reduktionspuffer (siehe Anhang) resuspendiert und in Eis gekühlt. Dazu wurden dann 40µl einer Lösung aus 5mg NaBH₄ in 200µl Reduktionspuffer gegeben. Diese Reaktion wurde 2 h auf Eis belassen, um bei Raumtemperatur über Nacht abzuklingen (129). Anschließend wurden die reduzierten Proben gefriergetrocknet und sauer hydrolysiert. Sie wurden dann im Zuge der Quervernetzungsanalysen weiterverarbeitet (siehe 2.5.4.).

2.4. Darstellung der Kollagenketten

2.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die bei der Gelelektrophorese benutzten Aufbauten waren Eigenbau der Werkstatt der Medizinischen Universität zu Lübeck. Zwischen die 10 cm x 10 cm großen Glasplatten wurden 1 mm dicke und 6 mm breite Spacer geklemmt und mit 15% Agarose abgedichtet. Das 6% ige Trenngel wurde ca. 6,5 cm hoch gegossen und wie im Anhang beschrieben frisch angesetzt. Die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das 4% ige Sammelgel zugegeben. Unmittelbar nach Eingießen des Sammelgels, wurde ein Kamm mit 10 Zähnen für Slots à 30 µl zum Auftragen der Proben eingesteckt. Nach Abschluss der Polymerisation wurden die Gele in die Apparatur gespannt und Laufpuffer (siehe Anhang) dazugegeben.

Probenvorbereitung:

Die elektrophoretische Trennung der Kollagenfraktionen wurde entsprechend der Methode nach Laemmli (76) durchgeführt. Ein Aliquot der in Lösung gegangenen Kollagenketten jeder Probe sowie ein Kollagenstandard (Kollagentyp I, III und V aus fetaler Kalbshaut; P.P. Fietzek, Lübeck) wurde gefriergetrocknet und in 15 µl Auftragspuffer (siehe Anhang) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend 2 min bei 96°C denaturiert. Nach Abkühlung wurden die Proben in die Slots pipettiert.

Durchführung:

Beim Start der Elektrophorese floss zunächst eine konstante Stromstärke von 15 mA (2301 Power Supply; Macrodrive 1; Fa. Bromma). Erreichte die Lauffront das Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht.

Delayed Reduction:

Bei der verspäteten Reduktion ("delayed reduction") (133) der Proben wurde der oben beschriebene Versuchsablauf unterbrochen, wenn sich die Lauffront 1,5 cm im Trenngel befand. Zu diesem Zeitpunkt wurden 15 μ l Auftragspuffer mit 1% β -Mercaptoethanol in die Slots zupipettiert. Anschließend wurde der Lauf mit den üblichen 25 mA fortgesetzt.

Coomassie-Färbung:

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufes wurden die Gele mit Coomassie gefärbt. Die Färbelösung bestand aus 0,125% Coomassie (w/v) in 40 ml Methanol gelöst und mit 20% TCA auf 1 Liter aufgefüllt. Diese Lösung wurde dann nach Filtration verwendet. Nach 10 min Färbung unter ständigem Schwenken wurde das Gel mit 7% Essigsäure entfärbt. Sämtliche Gele der SDS-PAGE wurden dann mit Hilfe des Gelair Drying Systems (Fa.Bio-Rad, München) mit Folie beschichtet und haltbar gemacht.

2.4.2. Ionenaustauschchromatographie

Probenvorbereitung:

Das für die Trennung vorgesehene pepsinlösliche Kollagen lag in lyophilisierter Form vor. Es wurde in 20 ml 0,5 M Essigsäure aufgenommen und in Dialyseschläuche (Fa. Roth, Karlsruhe) gegeben. Es folgte eine zweitägige Dialyse gegen 0,05% Essigsäure mit insgesamt viermaligem Wechsel der Lösung. Anschließend wurden die Proben gefriergetrocknet und ausgewogen. 1,5 mg Kollagen wurden in Startpuffer (0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,6; 0,2 M NaCl; 2 M Harnstoff) aufgelöst und für 10 min bei 56°C denaturiert.

Durchführung:

Die in Startpuffer gelösten, denaturierten Proben wurden bei Raumtemperatur auf eine Anionenaustauschersäule (Bio-Scale DEAE 20, Bio-Rad, München) (87) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit dem 5-fachen Säulenvolumen und einer Flussgeschwindigkeit von 2ml/min mit Startpuffer gewaschen. Als nächster Schritt wurde die Säule bei gleichbleibender Flussgeschwindigkeit mit Hilfe eines über 20 min von 0,2 M bis 2 M linear steigenden NaCl-Gradienten eluiert. Die Trennung wurde mit Hilfe eines Fast-Performance-Liquid-Chromatography (FPLC) Systems (FPLC-Pumpe P-500, Gradientprogrammierer GP-250 Plus, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) gesteuert. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Photometer (LKB Uvicord SD, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei einer Wellenlänge von 226 nm. Die Fraktionen wurden gesammelt und die Trennschärfe mittels SDS-PAGE überprüft (siehe 2.4.1.).

49

2.5. Quantitative Analysen

2.5.1. Kollagenquantifizierung mittels Ehrlichs Reagenz

Das Kollagen wurde durch das Messen des Hydroxyprolingehaltes der Probe nach den Verfahren von Bannister (5) quantifiziert. Die alleinige Bestimmung der Hydroxyprolinmenge reicht zur Quantifizierung des Gesamtkollagens aus, da das gemessene Hydroxyprolin eines Bandes ausschließlich kollagenen Ursprungs ist. Die Umrechnung erfolgte dann durch die Tatsache, dass in 100 mg Kollagen immer konstant 14 mg Hydroxyprolin vorhanden sind (137). Die in der Probe detektierte Kollagenmenge wird in Relation zum eingesetzten Trockengewicht des Gesamtbandes angegeben. Die erhaltenen Daten basieren auf Mehrfachbestimmungen.

Probenvorbereitung:

Jeweils ein Aliquot der mit 6N HCl hydrolysierten Bänder wurden mittels Speedvac (Fa. Savant) getrocknet und in 120µl Baker-Wasser (Fa. Baker) aufgenommen.

Durchführung:

Zu den vorbereiteten Proben wurde je 276 µl Propanol/Wasser-Gemisch und 192 µl Chloramin T Lösung gegeben. Nach ausreichendem Schütteln (Vortex-Genie K 550-GE, Fa. Medica, Lausanne, Schweiz) und 10 min Standzeit bei Raumtemperatur wurden 500 µl Ehrlichs Reagenz hinzupipettiert. Sämtliche Lösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt. Die Probe wurde nun erneut geschüttelt und 20 min bei 70°C belassen. Ebenso wurde mit den Hydroxyprolinstandards (Fa. Aldrich, Steinheim) verfahren. Die Auswertung erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 550 nm.

2.5.2. Aminosäureanalyse

Die Analysen wurden mit dem Aminosäurenanalyzer Beckmann 6300 Amino Acid Analyzer (Fa. Beckmann, München) durchgeführt. Als Aminosäurenfarbstoff zur Nachsäulenderivatisierung wurde Ninhydrin verwendet. Die Kalibrierung erfolgte über Aminosäurestandards (siehe Abb. 2.05) (7).

Durchführung:

80 μg der sauer hydrolysierten Proben bzw. Pellets wurden in Auftragspuffer aufgenommen und auf die Säule aufgetragen.

Die Aminosäuren Hydroxyprolin (Hyp) und Hydroxylysin (Hyl) sind bei dieser Analyse als Produkte der posttranslationalen Modifikation des Kollagens und als wichtiger Parameter für die Stabilität eines Moleküls (Hyp) sowie als Ausgang für die Bildung von Quervernetzungen (Hyl) von besonderem Interesse. Die gefundenen relativen Mengen Hydroxyprolin pro 1000 Aminosäuren werden aufgrund der absoluten Konstanz dieser Aminosäure (9;84;115) als Maß für den Gehalt an Kollagen am Gesamtprotein des Gewebes herangezogen. Die Hydroxylierung der Aminosäure Lysin wurde analog hierzu, da die Untersuchung nicht mit gereinigtem Kollagen durchgeführt wurde, auf die konstante Menge an Hydroxyprolin bezogen. Bei der Aminosäureuntersuchung des pepsinunlöslichen Pellets war, abgesehen von Elastin, durch den Verdau der vorhandenen nichtkollagenen Proteine eine Beschreibung der Hydroxylierung durch den Quotienten Hyl/(Hyl+Lys), der die Hydroxylierung des Lysins absolut beschreibt, möglich.



Abb. 2.05: Beispiel eines Chromatogrammes der Aminosäureuntersuchung eines kongenitalen Klumpfußes (Beckmann 6300 Amino Acid Analyzer)

2.5.3. Analyse der Glykosylierung

Zur Aufreinigung des Hydroxylysins und der Mono- bzw. Disaccharide der alkalisch hydrolysierten Probe wurde eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50 W-X8, Fa. BioRad, Richmond CA, USA) verwendet (134;148). Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels Aminosäureanalyzer (Fa. Beckmann, München) quantifiziert. Als Aminosäurenfarbstoff wurde Ninhydrin verwendet. Die Kalibrierung erfolgte über eine definierte Menge Leucin als Bezugspunkt der Mengenberechnung, sowie über Zuckerstandards aus Schwämmen zur Bestimmung der Retentionszeit (P.P. Fietzek, Lübeck; siehe Abb. 2.06). Durchführung:

Die gesamte Probe der alkalisch hydrolysierten Ligamente wurde zunächst zur Separation der zu untersuchenden Parameter vom Rest der Probe auf die oben beschriebene Säule (Fa. BioRad) aufgetragen. Die getrennten Fraktionen wurden lyophilisiert und in Auftragspuffer (Na-S Puffer, Fa Beckmann, München) resuspendiert. Anschließend wurden die Proben im Analyser quantitativ untersucht. Als Elutionspuffer wurde Na-D Puffer (Fa. Beckmann, München) verwendet. Die Flussrate des Puffers betrug konstant 20 ml/h bei einer Säulentemperatur von 77°C (134;148).



Abb. 2.06: Beispiel eines Chromatogrammes zur Analyse der Glykosylierung des Hydroxylysins (Hyl) eines kongenitalen Klumpfußes (Beckmann 6300 Amino Acid Analyzer)

2.5.4. Analyse der Lysyloxidase-abhängigen Quervernetzungen

Probenvorbereitung:

Die für die Quantifizierung der Lysyloxidase-abhängigen Quervernetzungen bestimmten Proben wurden zunächst nach der von Black (12) veröffentlichten Methode mittels CF1-Adsorptionschromatographie aufgereinigt.

Die Proben wurden in 1 ml Eisessig, 2 ml vorbehandeltes 10% iges CF1 (Fa. Whatman, Springfield Mill Maidstone, England) sowie 2 ml n-Butanol gegeben. Eine Econo-Säule (Polyprop, 4 x 0,8 mm, Fa. BioRad, München) wurde mit 5 ml 10% igem aufgeschlämmtem CF1 gefüllt und mit 3 ml Elutionspuffer bestehend aus Eisessig/Wasser/n-Butanol im Verhältnis 1:1:4 gewaschen. Die Probe wurde dann auf die Säule aufgetragen und mit 3 x 5 ml Elutionspuffer gereinigt. Das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde dann mit 3 x 2 ml H₂O gesäubert. Der Butanol-Rest wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das entstandene Eluat lyophilisiert.

2.5.4.1. Di- und trifunktionelle Quervernetzungen

Die Analyse der di- und trifunktionellen Quervernetzungen wurde mit einem Aminosäurenanalyzer der Fa. Beckmann (Beckmann 6300 Amino Acid Analyzer) durchgeführt. Die Kalibrierung der Mengenberechnung erfolgte über die Detektion einer definierten Menge Leucin als bekannter Ausgangswert, sowie über Standards der Quervernetzungen (Laborstandard P.P. Fietzek, Medizinische Molekularbiologie Lübeck) zur Bestimmung der Retentionszeit. Als Aminosäurenfarbstoff wurde Ninhydrin in der Nachsäulenderivatisierung verwendet (siehe Abb. 2.07). Durchführung:

Die vorbehandelten reduzierten Proben und Aliquots der nicht-reduzierten sauren Hydrolysen wurden in Auftragspuffer gelöst und analysiert.



Abb. 2.07: Beispiel eines Chromatogrammes zur Analyse der di- und trifunktionellen Quervernetzungen des Kollagens (mit abgebildet sind hier die Elastinquervernetzungen Desmosin und Isodesmosin).

2.5.4.2. Analyse von Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP) und Lysyl-Pyridinolin (LP) via Fluoreszenz

Die Trennung der Quervernetzungen Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP) und Lysyl-Pyridinolin (LP) erfolgte über eine reverse-phase HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatographie) nach der Methode von Fietzek (141)

.Die Proben wurden auf eine Säule (Inerstil ODS-2; 125 x 4,6 mm; 5 µm Partikelgröße; VDS Optilab, Montabaur) aufgetragen. Die Steuerung der Analyse erfolgte durch eine HPLC-Pumpe (Modell 480, Fa. Gynkotek, Germering). Die Fluoreszenzdetektion (Fluorescence HPLC-Monitor RF 1002, Gynkotek, Ismaningen) fand bei einer Exitation von 297 nm und einer Emission von 397 nm statt. Als Bezug für die Quantifizierung diente ein laborinterner HP-Standard (Institut für Medizinische Molekularbiologie, Med. Universität Lübeck)

Durchführung:

Eine definierte Menge der über CF 1 gereinigten, lyophilisierten, nicht-reduzierten sauren Hydrolyse wurde in 0,01 M Heptafluorbuttersäure (HBFA) gelöst und anschließend 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Die Probe wurde dann mittels HPLC getrennt. Die Steuereinheit des Systems (Chromatographie Datensystem Version 5.30, Fa. Gynkotek, Germing) regelte über zwei Pumpen (Modell 480, Modell 300; Fa.Gynkotek, Germing) wie im Anhang beschrieben die Gradienten der Puffer A (0,22% HBFA in Baker-Wasser) und B (80% Acetonitril; 0,22% HBFA). Die Flussrate lag während des gesamten Laufes bei 0,8 ml/min. Die Temperatur betrug 20°C (141).



Abb. 2.08: Chromatogramm zur Analyse der Pyridinolinquervernetzungen HP und LP (Fluorescence HPLC-Monitor RF 1002, Gynkotek)

2.6. Statistik

Die Auswertung der Daten wurde mit SPSS 10.0 unter Windows NT durchgeführt. Für die Auswertung wurde alpha auf 0,05 und beta auf 0,8 justiert.

Da nicht normalverteilte Daten aus experimentellen Untersuchungen vorlagen, wurde die statistische Auswertung zum Aufdecken von Unterschieden als zwei Gruppenvergleich mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Zur Aufdeckung weiterer Unterschiede wurde ein Mehrgruppenvergleich nach Kruskall-Wallis berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Histomorphologische Charakterisierung des Kollagens

Zur histologischen Darstellung des entnommenen Gewebes werden zunächst Übersichtsfärbungen mit Azan durchgeführt. Diese zeigen in allen Proben ligamentöses Bindegewebe ohne Fett- oder Knorpelsubstanz. In den Bändern der Referenzproben findet sich ein streng gerichteter und paralleler Verlauf der Fasern. Im Gegensatz dazu erkennt man bei den Klumpfüßen einen ungeordneten, ungerichteten Faserverlauf. Die Klumpfußpräparate erscheinen in der Übersichtsvergrößerung zellreicher als die gesunden Kontrollen. Es finden sich bei den Klumpfüßen Zonen die sich kompakt und zell- bzw. kernreich darstellen. Die Form der Zellkerne der Klumpfußpräparate zeigen eine größere morphologische Varianz, von spindelförmig bis nahezu rund, mit unregelmäßigen Einkerbungen. Die Kontrollen dagegen zeigen spindelförmige, selten ovale Zellkerne.

Die Anfärbungen mit den Kollagenantikörpern I, III und V zeigen in allen Schnittebenen eine gleichförmige Verteilung dieser Kollagentypen. Es können keine Bereiche mit vermehrtem Vorkommen eines Kollagentyps herausgearbeitet werden. Eine semiquantitative Beurteilung der prozentualen Verteilung ist immunhistochemisch nicht möglich. Es bestehen zwischen Referenzen und Klumpfüßen keine erkennbaren Unterschiede in der Kollagenverteilung.



Abb. 3.01: Azanfärbung (a) (Vergr.: 200fach) und immunhistochemische

Fluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Kollagen-Typ I (b), Typ III

(c) und Typ V (d) an Gewebeschnitten im Bereich des Ligamentum deltoideum eines Klumpfußpräparates (Vergr.: 315fach)

3.2. Elektronenmikroskopische Charakterisierung des Kollagens

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des nativen Kollagens aus kongenitalen Klumpfüßen zeigt eine intakte Fibrillenbildung des Kollagens (siehe Abb. 3.02). Wie im histologischen Bild ist auch hier im Vergleich zum Referenzgewebe eine ungeordnete Ausrichtung der Kollagenfibrillen zu erkennen (siehe Abb. 3.05). Es kommen in der Fibrille helle Lücken- ("gap") und dunkle Überlappungs- ("overlap") Zonen zwischen den Tropokollagenmolekülen zur Darstellung. Die Periodenlänge D beträgt etwa 67 nm.

Die Kollagenfibrille des normalen Fußes unterscheidet sich nicht von der des Klumpfußes. Auch hier sind bei einer Periodenlänge von etwa 67 nm Lückenzonen und Überlappungszonen zu erkennen. Die Fibrillendicke erscheint beim normalen Fuß gleich der des Klumpfußes (siehe Abb. 3.02).

Der Rezidivklumpfuß imponiert wie auch der kongenitale Klumpfuß durch seinen ungeordneten Fibrillenverlauf. Die Fibrillenbildung ist auch hier intakt. Gap und Overlap-Zonen finden sich in einer Periodizität von etwa 67 nm. Beim Rezidivklumpfuß ist jedoch eine Zunahme der Fibrillendicke im Vergleich zum Normalfuß zu erkennen (siehe Abb. 3.03).



Abb. 3.02: Elektronenmikroskopische Darstellung des Kollagens aus dem Ligamentum deltoideum des Referenzgewebes im Gewebeverband (a) und nach Isolierung der Fibrillen (b).



Abb. 3.03: Elektronenmikroskopische Darstellung des Gewebes aus dem Ligamentum deltoideum eines Klumpfußpräparates (a+b) und eines Rezidivklumpfußes (c+d)

3.3. Kollagenanalyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der pepsinlöslichen Kollagenfraktionen mittels SDS-PAGE zeigt, dass es beim Klumpfuß zu einer intakten Fibrillenbildung und zu einer Bildung von Kollagenketten sowie Polymeren kommt (siehe Abb. 3.04). Sämtliche Banden der Klumpfüße und der Referenzen verlaufen auf dem Niveau des Standards für Kollagen. Die in den Klumpfußproben vorkommenden Kollagentypen sind Typ I, Typ III und Typ V Kollagen, wobei semiquantitativ Kollagen I den bei weitem größten Anteil ausmacht. Ferner sind etwas Kollagen III und in geringen Mengen Kollagentyp V vorhanden. Die relativen Mengen der Kollagentypen I, III und V weichen nicht von denen der untersuchten Referenzen ab.



Abb. 3.04: SDS-PAGE des pepsinlöslichen Kollagens mit delayed reduction.



Abb. 3.05: SDS-PAGE des pepsinlöslichen Kollagens mit Darstellung des relativen Anteils der Fraktionen via FPLC (siehe 2.4.2.) bei Klumpfüßen und bei Referenzen

Betrachtet man die Trennung des Kollagens von Klumpfüßen und Kontrollen mittels SDS-PAGE, so sind drei Fraktionen (α , β , γ) und eine Polymerfraktion zu erkennen (siehe Abb. 3.07). Die größte Gruppe mit einem Anteil von 59% bilden dabei die Polymere mit der γ -Fraktion. Die β -Fraktion bildet einen Anteil von 13% und die α -Fraktion von 28%, ohne signifikanten Unterschied zwischen Klumpfuß und Referenz.



Abb. 3.06: SDS-PAGE des pepsinlöslichen Kollagenanteils von Klumpfüßen und Rezidivklumpfüßen

Vergleicht man nun die Kollagenbanden der Ligamente mit dem Standard, bestehend aus pepsinlöslichem Kollagen der Haut, so erkennt man zwischen Haut und Ligament gewebespezifische Unterschiede (siehe Abb.3.08). Das Verhältnis der α_1 (I) zur α_2 (I)-Bande beträgt in der Haut etwa 2:1. In Ligamenten beträgt das Verhältnis von α_1 (I) zu α_2 (I) 4:1. Auch das Verhältnis von β_{11} (I) zu β_{12} (I) verschiebt sich im Band gegenüber dem Standard aus der Haut zugunsten der β_{11} (I)-Bande mit einem Verhältnis von 1:1 in den Bändern.

Die untersuchten Rezidivklumpfüße zeigen in der Trennung der Ketten durch die SDS-PAGE weder eine Störung der Fibrillenbildung, noch ein pathologisches Bandenmuster oder eine abnorme Verteilung im Vergleich zu den normalen Füßen.

3.4. Relativer Kollagengehalt gemessen mit Ehrlichs Reagenz

Der Anteil an Kollagen am Trockengewicht des entnommenen Gewebes der Klumpfüße beträgt, gemessen mit Ehrlichs Reagenz (siehe 2.5.1.), im Mittel 59,9±8,0 % (g/g). Innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs kann kein signifikanter Zusammenhang zwischen Schweregrad des Klumpfußes nach Diméglio und dem Kollagenanteil gefunden werden. So liegt der Mittelwert der Typ II Klumpfüße bei 62,3±5,6 % (g/g), der des Typ III bei 59,9±9,3 % (g/g) und der Mittelwert der Typ IV Klumpfüße beträgt 58,3±10,6 % (g/g).

Die untersuchten Referenzproben weisen mit einem Mittelwert von 74,7 \pm 6,3 % (g/g) einen deutlich höheren Anteil an Kollagen auf. Die statistische Auswertung zeigt im Mehrgruppenvergleich (Referenzen, Klumpfuß Typ II, III, IV) einen mit p<0,0001 signifikanten Unterschied. Der Unterschied in der Gegenüberstellung der Referenzen und der gesamten Gruppe der Klumpfüße mittels Mann-Whitney Test ist mit p<0,0001 hoch signifikant (siehe Graphik 3.01).


Graphik 3.01: Anteil des Kollagens am Trockengewicht (TG) in % mit Median und Interquartilabständen bei Referenzen und Klumpfuß Typ II, III und IV

Der Anteil des Kollagens der Klumpfußrezidive liegt im Mittel bei $64,1\pm10,3$ % (g/g) und somit im Bereich der kongenitalen Klumpfüße. Der "neglected clubfoot" ist mit 78,6% (g/g) demgegenüber im Wertebereich der jüngeren Referenzen zu finden. Dies gilt auch für die neurogenen Klumpfüße mit einem Anteil von 71,3% (g/g) am Trockengewicht und dem mituntersuchten Plattfuß mit einem Mittelwert von 80.5% (g/g) (siehe Graphik 3.01).



Graphik 3.02: Durchschnittswerte mit Standardabweichung des Anteils an Kollagen am Trockengewicht (TG) in % (g/g) der untersuchten Gruppen

3.5. Aminosäureanalyse

3.5.1. Messung von Hydroxyprolin

Der relative Anteil des Kollagens am Gesamtprotein wird über die konstante, kollagenspezifische Aminosäure Hydroxyprolin bestimmt (siehe 2.5.2.). Bei den kongenitalen Klumpfüßen kann dabei im Mittel eine Menge von 75,1±3,0 Aminosäuren Hydroxyprolin pro 1000 Aminosäuren gemessen werden. Der Median der Werte innerhalb der Klumpfußtypen ist hierbei nahezu gleich. Der Mittelwert der Klumpfüße Typ II beträgt 74,5 \pm 3,3, der von Typ III Klumpfüßen 75,7 \pm 3,5 (m: 76,9; w: 73,8), sowie 74,3 \pm 2,2 (m: 74,9; w: 72,5) bei Klumpfußtyp IV. Ein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen ist nicht festzustellen.

Die Referenzen haben durchschnittlich 81,9±0,5 Hydroxyprolin pro 1000 Aminosäuren. Die kongenitalen Klumpfüße zeigen somit einen hoch signifikant niedrigeren Anteil von Hydroxyprolin pro 1000 Aminosäuren mit p<0,0001 (Mann-Whitney Test).



Graphik 3.03: Anteil der Aminosäure Hydroxyprolin (Hypro) pro 1000 Aminosäuren (As) mit Median und Interquartilabständen bei Referenzen und Klumpfuß Typ II, III und IV

Die Klumpfußrezidive haben im Mittel 79,3±2,5 Hydroxyprolinreste pro 1000 Aminosäuren und liegen im Bereich der jüngeren Referenzen. Beim "neglected clubfoot" kommen auf 1000 Aminosäuren 82,7 Hydroxyproline. Die beiden neurogenen Klumpfüße sind mit Werten von 81,5 sowie 82,2 und der Plattfuß mit 81,7 ebenfalls im Bereich der Referenzproben (siehe Graphik 3.04).



Graphik 3.04: Anteil der Aminosäure Hydroxyprolin (Hypro) der untersuchten Gruppen bezogen auf 1000 Aminosäuren (As) im Durchschnitt mit Standardabweichung

3.5.2. Messung von Hydroxylysin

Die Aminosäure Hydroxylysin entsteht durch die Hydroxylierung des Lysins und ist ein Index für das Ausmaß der posttranslationalen Modifizierung der Kollagenkette und eine der wichtigen Aminosäuren der Quervernetzung des Kollagens. Hydroxylysin ist jedoch nicht kollagenspezifisch und wird, da es sich bei den analysierten Proben nicht um gereinigtes Kollagen handelt, über die Relation zum, im Kollagenmolekül konstant vorkommenden Hydroxyprolin (Hyp), dargestellt.

Messung am Gesamtband:

Die Gruppe der kongenitalen Klumpfüße hat einen Mittelwert des Verhältnisses von Hyl zu Hyp von 0,118±0,008, bei einem Median von 0,12. Es zeigen sich im Vergleich der Schweregrade der Klumpfüße keine signifikanten Unterschiede. Bei einem Median von 0,12 in allen Gruppen sind auch die Mittelwerte aller Schweregrade mit 0,118 gleich (siehe Graphik 3.05).

Die Relation Hydroxylysin zu Hydroxyprolin ist in den Präparaten der kongenitalen Klumpfüße deutlich höher als bei den Referenzgeweben. Bei einem Median von 0,11 beträgt der Quotient bei den Kontrollen im Mittel 0,108±0,008. Der Unterschied erzielt mit p<0,001 Signifikanzniveau.





Der Quotient Hyl/Hyp kommt bei den fünf untersuchten Rezidivklumpfüßen auf einen Mittelwert von 0,112±0,008 und liegt im Werteniveau zwischen Referenzen und kongenitalen Klumpfüßen. Der unbehandelte Klumpfuß zeigt mit einem Quotienten von 0,135 den bei weitem höchsten Wert. Demgegenüber sind die beiden neurogenen Klumpfüße mit einem Mittel von 0,100 und die Probe des Plattfußes mit 0,101 im Bereich der Referenzen (siehe Graphik 3.06).



Graphik 3.06: Mittelwerte mit Standardabweichung des Hydroxylierungsgrades des

Lysins der untersuchten Gruppen

Messung im Pellet:

Das am stärksten quervernetzte Kollagen findet sich im säure- und pepsinunlöslichen Pellet des limitierten Pepsinabbaus. Die detektierten Lysin und Hydroxylysin sind hier durch den Verdau der übrigen Proteine des Bandes durch das Pepsin kollagenen Ursprungs. Als nicht-kollagenes Protein findet sich lediglich Elastin in den Pellets. Die Hydroxylierung des Lysins (Lys) zum Hydroxylysin (Hyl) kann deshalb in der mathematisch Form Hyl/(Lys+Hyl) dargestellt werden.

In den Pellets der Gewebeproben von Patienten mit kongenitalen Klumpfüßen nach limitiertem Pepsinabbau findet sich im Mittel ein Quotient Hyl/(Hyl+Lys) von 0,34±0,02 mit einem Median von 0,34. Betrachtet man den Mittelwert des Quotienten in den verschiedenen Schweregraden, so beträgt dieser beim Typ II 0,34 \pm 0,02 (Median: 0,35), beim Schweregrad III ebenfalls 0,34 \pm 0,03 mit einem Median von 0,35. Bei Typ IV Klumpfüßen findet sich bei einem Mittelwert des Quotienten Hyl/(Hyl+Lys) von 0,33 \pm 0,01 ein Median von 0,34 (siehe Graphik 3.07).

Der Quotient Hyl/(Hyl+Lys) der Referenzgewebe liegt im Durchschnitt bei $0,25\pm0,02$. Der Median hat einen Wert von 0,26. Die Werte von kongenitalen Klumpfüßen liegen bei dieser Messung mit p < 0,0001 hoch signifikant oberhalb der Referenzen (Mann-Whitney Test).



Graphik 3.07: Boxplots des Quotienten Hyl/(Hyl+Lys) mit Median und

Interquartilabstände bei Referenzen und Klumpfuß Typ II, III und IV als Ausdruck der Hydroxylierung des Lysins im Pellet Bei den Klumpfußrezidiven liegt der Durchschnitt des Quotienten Hyl/(Hyl+Lys) bei 0,27±0,01 mit einem Median von 0,28. Die Klumpfußrezidive liegen somit im Wertebereich zwischen Referenzen und kongenitalen Klumpfüßen (siehe Graphik 3.08).



Graphik 3.08: Durchschnittswerte des Quotienten Hyl/(Hyl+Lys) mit Standardabweichung als Ausdruck der Hydroxylierung des Lysins im Pellet aus Referenzgewebe sowie von Klumpfüßen und Rezidiven

3.6. Analyse der Glykosylierung

Die Glykosylierung der pro-α-Kollagenkette, durch Bindung der Galaktose (Monosaccharid) und der Glykosyl-Galaktose (Disaccharid) an das Hydroxylysin im Zuge der posttranslationalen Modifikation, wird auf 1000 Aminosäuren Hydroxylysin bezogen.

3.6.1. Messung des Monosaccharids Galaktose

Die kongenitalen Klumpfüße zeigen im Durchschnitt 59,3 \pm 8,0 Monosaccharide (Galaktose) pro 1000 Aminosäuren Hydroxylysin (Hyl), ohne signifikante Unterschiede in Bezug auf die Schweregrade der Klumpfüße. So haben Typ II Klumpfüße im Mittel 59,9 \pm 7,4 und Typ III Klumpfüße durchschnittlich 58,9 \pm 9,0 Monosaccharide pro 1000 Hyl. In Typ IV Klumpfüße findet sich einen Durchschnittswert von 59,4 \pm 7,7 (m=56,5; w=60,0).

Die Kontrollen zeigen bei diesen Analysen im Mittel 54,2 Galaktose pro 1000 Hyl-Reste. Der erhöhte Wert der Klumpfüße ist mit p < 0,231 (Mann-Whitney Test) nicht signifikant.



Graphik 3.09: Boxplots der Anzahl des Monosaccharids (Galaktose) pro 1000 Aminosäuren (AS), Hydroxylysin (Hyl) mit Median und Interquartilabständen.

Die fünf Rezidivklumpfüße haben im Durchschnitt einen Wert von 50,3±14,2 bei einem Median von 44,3. Beim unbehandelten Klumpfuß ("neglected clubfoot") finden sich 104,8 Reste des gebundenen Monosaccharids Galaktose pro 1000 Aminosäuren Hydroxylysin. Die beiden neurogenen Klumpfüße haben 66,4 bzw. 66,1 Monosaccharide pro 1000 Hyl. Beim Plattfuß detektiert man einen Wert von 69,5 (siehe Graphik 3.10).



Graphik 3.10: Mittelwerte mit Standardabweichung des Monosaccharids (Galaktose) auf 1000 Aminosäuren (AS) Hydroxylysin (Hyl) der untersuchten Gruppen

3.6.2. Messung des Disaccharids Glykosyl-Galaktose

Die Anzahl des gebundenen Disaccharids Glykosyl-Galaktose unterscheidet sich in Bezug auf die Schweregrade der Klumpfüße nicht signifikant. Typ II Klumpfüße haben im Mittel 93,7±15,3 Disaccharide pro 1000 Hydroxylysin. Typ III Klumpfüße zeigen einen Durchschnittswert von 110,8±18,5. Typ IV Klumpfüße haben im Mittel 97,6±9,1 Reste des Disaccharids Glykosyl-Galaktose pro 1000 Hyl gebunden (w:105,4; m:99,5). Insgesamt sind bei den kongenitalen Klumpfüßen im Durchschnitt 102,2 \pm 16,3 Disaccharide pro 1000 Aminosäuren Hydroxylysin zu detektieren (siehe Graphik 3.11). Die Referenzproben haben im Durchschnitt 79,9 \pm 15,4 Moleküle des Disaccharids Glykosyl-Galaktose an 1000 Aminosäuren Hydroxylysin gebunden. Die kongenitalen Klumpfüße haben somit signifikant mehr Disaccharide gebunden als die gesunden Kontrollen (Mann-Whitney Test: p < 0,006).



Graphik 3.11: Boxplots der Anzahl des Disaccharids Glykosyl-Galaktose pro 1000 Aminosäuren (As) Hydroxylysin (Hyl) mit Median und Interquartilabständen.

Die fünf Rezidivklumpfüße haben im Durchschnitt 69,4±12,2 Disaccharide pro 1000 Aminosäuren Hyl. Damit ist der Mittelwert etwas niedriger als jener der Referenzen. Der "neglected clubfoot" hat 128,4 Moleküle des Disaccharids und zeigt somit den Maximalwert. Die neurogenen Klumpfüße mit 86,8 und 75,1 Resten des Disaccharides liegen im Bereich der Referenzen. Der Plattfuß zeigt bei dieser Messung einen Wert von 52,9 pro 1000 Aminosäuren Hydroxylysin (siehe Graphik 3.12).



Graphik 3.12: Mittelwerte mit Standardabweichung der Disaccharide (Glykosyl-Galaktose) auf 1000 Aminosäuren (AS) Hydroxylysin (Hyl) der untersuchten Gruppen

3.7. Analyse der Quervernetzungen

3.7.1. Quantifizierung der Quervernetzung des Hydroxylysinpfades

3.7.1.1. Messung von Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP)

Die kongenitalen Klumpfüße haben im Mittel eine Anzahl HP-Quervernetzungen von 446±108 mmol HP pro Mol Kollagen, bei einem Median von 470 mmol/mol. Die unterschiedlichen Schweregrade des Klumpfußes zeigen, mit Mittelwerten von 505±138 mmol/mol (Typ II), 435±99 mmol/mol (Typ III) und 430±112 mmol HP pro Mol Kollagenmoleküle, keine signifikanten Unterschiede.

Die Referenzproben weisen durchschnittlich 433 ± 142 mmol HP pro Mol Kollagen auf. Der Median liegt hier bei einem Wert von 450 mmol/mol. Ein signifikanter Unterschied zu den kongenitalen Klumpfüßen liegt nicht vor (Mann-Whitney Test; p < 0,907).



Graphik 3.13: Boxplots der Anzahl der HP-Quervernetzungen in mmol/mol Kollagenmoleküle mit Median und Interquartilabständen bei Referenzen und Klumpfuß Typ II, III und IV

In den untersuchten Gewebeproben von Rezidivklumpfüßen findet man, mit einem Durchschnitt von 806±108 mmol HP-Quervernetzungen pro mol Kollagenmoleküle, bei einem Median von 800, einen beachtlich höheren Wert als bei den Proben der Kontrollen. Beim unbehandelten Klumpfuß erhält man einen Wert von 1000 mmol (= 1 mol) der Quervernetzung HP in einem Mol Kollagenmoleküle. Die neurogenen Klumpfüße haben mit Messwerten von 250 und 260 mmol HP deutlich weniger dieser Quervernetzungen als etwa die kongenitalen Klumpfüße. Der Plattfuß befindet sich mit 430 mmol HP pro mol Kollagenmoleküle im Referenzniveau (siehe Graphik 3.14).



Graphik 3.14: Durchschnittliche Anzahl von Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP) in mmol pro Mol Kollagenmoleküle mit Standardabweichung

3.7.1.2. Messung von Lysyl-Pyridinolin (LP)

Die Pyridinolinquervernetzung Lysyl-Pyridinolin (LP) ist verglichen mit dem Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP) in den Gewebeproben im Allgemeinen in geringerer Quantität vorhanden.

Die Analysen aller Klumpfußproben erbringen einen Mittelwert für LP von 9,0±3,7 mmol/mol Kollagen bei einem Median von 8,1. Im Einzelnen haben Proben der Klumpfußtypen II im Mittel 8,4±2,7 mmol LP pro Mol Kollagenmoleküle (Median:7,7), die des Schweregrades III 8,7±3,8 mmol (Median: 7,6). Bei Typ IV Klumpfüßen sind im Schnitt 9,9±4,5 mmol (Median: 11,0) LP pro Mol Kollagen zu finden.

Die gesunden Referenzproben haben im Mittel 7,8 mmol LP pro Mol Kollagen. Der Median der Messwerte liegt bei 7,7 mmol. Der Unterschied zur Gruppe der kongenitalen Klumpfüße ist mit p < 0,538 nicht signifikant (Mann-Whitney Test) (siehe Graphik 3 .15).



Graphik 3.15: Boxplots der Anzahl der LP-Quervernetzungen in mmol/mol Kollagenmoleküle mit Median und Interquartilabständen bei Referenzen und Klumpfuß Typ II, III und IV

Die Proben der Klumpfußrezidive haben im Schnitt 22,1±9,6 mmol LP pro Mol Kollagenmoleküle. Der Median liegt hier bei 25,0 mmol. Gegenüber den Referenzgeweben ist eine Verdopplung zu erkennen. Der unbehandelte Klumpfuß "neglected clubfoot" ist mit 20,4 mmol/mol Kollagen auf dem Niveau der Klumpfußrezidive. Der Plattfuß hat einen Wert von 10,0 mmol/mol (siehe Graphik 3.16).



Graphik 3.16: Durchschnittliche Anzahl von Lysyl-Pyridinolin (LP) in mmol pro Mol Kollagenmoleküle mit Standardabweichung

3.7.1.3. Messung von Dehydro-Hydroxylysinohydroxynorleucin (deH-DHLNL)

Die reduzierbare Quervernetzung deH-DHLNL als Vorstufe der Pyridinolinquervernetzungen HP und LP ist bei den kongenitalen Klumpfüßen, ermittelt durch die Proben der Patienten mit den Nummern 31 und 35 (siehe Anhang 8.1.), in einer Größenordnung von etwa 150 mmol pro Mol Kollagenmoleküle vorhanden. Die analysierten Referenzen (Probennummern 5 und 12) liegen im Bereich von etwa 100 mmol/mol Kollagen.

Der als Fallbeispiel herangezogene Rezidivklumpfuß (Probennummer 43) ist mit 107 mmol deH-DHLNL pro Mol Kollagenmoleküle im Wertebereich der Referenzen und der kongenitalen Klumpfüße zu finden.

3.7.2. Quantifizierung der Quervernetzungen des Lysinaldehydpfades

3.7.2.1. Messung von Histidinohydroxylysinonorleucin (HHL)

Die trifunktionelle Quervernetzung HHL ist in der Gruppe der Klumpfüße im Mittel $53,3\pm12,8$ mmol pro Mol Kollagenmoleküle mit einem Median von 51,7 mmol vorhanden. In der Gruppe der Typ II Klumpfüße findet sich ein Durchschnittswert von $51,7\pm10,2$ mmol pro Mol Kollagen (Median: 47,0). Beim Schweregrad III sind $55,2\pm15,7$ mol HHL zu finden. Der Median liegt hier bei einem Wert von 51,8. Die Klumpfüße Typ IV haben bei einem Median von 47,5 einen Mittelwert von $48,7\pm7,9$ mmol/mol Kollagen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Klumpfüßtypen ist nicht zu ermitteln (Mann-Whitney Test).

Die Referenzwerte kommen bezüglich des HHL auf einen Durchschnittswert von $38,0\pm6,9$ mmol pro Mol Kollagen. Der Median beträgt 39,8 mmol/mol. Der Anstieg der Quervernetzung HHL in der Gruppe der kongenitalen Klumpfüße in Bezug auf die Kontrollen ist mit p < 0,001 signifikant (Mann-Whitney Test) (siehe Graphik 3.17).



Graphik 3.17: Boxplots der Anzahl der HHL-Quervernetzungen in mmol/mol Kollagenmoleküle mit Median und Interquartilabständen bei Referenzen und Klumpfüßen

Die Gruppe der Rezidivklumpfüße hat im Mittel 43,5±8,1 mmol der Quervernetzung HHL pro Mol Kollagen. Dieser Wert ist im Vergleich zu den Klumpfüßreferenzen leicht erhöht, jedoch niedriger als bei den kongenitalen Klumpfüßen. Der alte, unbehandelte Klumpfüß ("neglected clubfoot") zeigt 77,7 mmol HHL pro Mol Kollagen. Die Werte der neurogenen Klumpfüße sind mit 79,4 mmol/mol und 61,3 mmol/mol im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht. Der Plattfuß hat 47,9 mmol der Quervernetzung HHL pro Mol Kollagen im Bereich der Rezidivklumpfüße (siehe Graphik 3.18).



Graphik 3.18: Durchschnittliche Anzahl der Quervernetzungen

Histidinohydroxylysinonorleucin (HHL) in mmol pro Mol Kollagenmoleküle mit Standardabweichung

3.7.2.2. Messung von Dehydro-Hydroxylysinonorleucin (deH-HLNL)

Die kongenitalen Klumpfüße enthalten im Durchschnitt 24,1±16,9 mmol deH-HLNL pro Mol Kollagenmoleküle. Der Median liegt bei 22,0 mmol/mol. Es liegt bei dieser

Untersuchung kein signifikanter Unterschied der Hydroxylysinonorleucin-Werte zwischen den Schweregraden des Klumpfußes vor.

Bei den Referenzen findet sich für deH-HLNL ein Wert von 32,0±17,6 mmol/mol Kollagenmoleküle. Der Median beträgt hier 26,5 mol pro Mol Kollagen. Der Unterschied zu der Gruppe der Klumpfüße erreicht kein Signifikanzniveau (Mann-Whitney Test).

Bei den Klumpfußrezidiven findet sich bei dieser Untersuchung im Mittel 16,7±10,0 mmol (Median: 13,7 mmol/mol) deH-HLNL pro Mol Kollagen. Sie liegen somit auf dem Werteniveau von Referenzen und Klumpfüßen. Auch der unbehandelte Klumpfuß liegt mit 33,1 mmol/mol im Bereich der Referenzen. Die neurogenen Klumpfüße zeigen Werte von 19,2 und 4,5. Der mituntersuchte Plattfuß kommt wie die Klumpfußreferenzen auf eine Anzahl von 40,2 mmol/mol (siehe Graphik 3.19).



Graphik 3.19: Durchschnittliche Anzahl der Quervernetzung deH-HLNL in mmol pro Mol Kollagenmoleküle mit Standardabweichung

3.7.2.3. Messung von Dehydro-Hydrohydroxymerodesmosin

(deH-HHMD)

Die reduzierbare Quervernetzung deH-HHMD ist bei den kongenitalen Klumpfüßen mit den Nummern 31 und 35 (siehe Anhang 8.1.) in einer Größenordnung von etwa 200 mmol pro Mol Kollagenmoleküle vorhanden.

Die Referenzen (Probenummern 5 und 12) liegen im Bereich von etwa 400 mmol deH-HHMD pro Mol Kollagen. Der als Fallbeispiel herangezogene Rezidivklumpfuß (Probenummer 43) ist mit 400 mmol deH-HHMD pro Mol Kollagenmoleküle im Wertebereich der Referenzen der kongenitalen Klumpfüße zu finden.

4. Diskussion

Die Ätiologie des kongenitalen Klumpfußes ist unbekannt. Eine Reihe unterschiedlicher Faktoren werden als Ursache dieser Fußdeformität zum Teil kontrovers diskutiert. Zahlreiche Autoren kommen in neueren Arbeiten zu dem Schluss, dass eine im medialen Kapsel-Band-Komplex lokalisierte Fibrose ein wichtiger pathogenetischer Faktor des kongenitalen Klumpfußes sei. Fried (35) beschrieb bereits 1959 eine harte fibröse Masse, die den gesamten Talus medial umgibt. Auch Hersh (47) wies früh auf eine diskusähnliche Masse fibrösen Gewebes im Bereich des Ligamentum deltoideum hin. Ippolito (57) beschrieb anhand histologischer Untersuchungen an Feten mit kongenitalem Klumpfuß im Bereich des Ligamentum deltoideum eine retrahierende Fibrose, die den Fuß in seiner Fehlstellung zu fixieren scheint. Weiterführende anatomische Studien des Klumpfußes durch McKay (82) und später erneut durch Ippolito (56) wiesen ebenfalls auf dieses, für die Pathogenese wichtige mediale Gewebe hin. Beobachtungen an plastinierten fetalen Klumpfußpräparaten durch Fritsch (36) unterstützten diese Ergebnisse. Computersimulationen, durchgeführt an 3D-Rekonstruktionen von Rab (106), zeigten ergänzend, dass das medial gelegene Ligamentum deltoideum die am stärksten kontrahierte Struktur des kongenitalen Klumpfußes ist. Der Grund dieser lokalisierten "retracting fibrosis" ist jedoch unklar. Zimny (149) postulierte eine durch Histamin induzierte Kontraktion von Myofibroblasten. Sie begründete dies mit dem elektronenmikroskopischen Nachweis von Mastzellen und myofibroblastenähnlichen Zellen im medialen Bereich des Klumpfußes. Auch Fukuhara (38) und Sano (118) sahen im Nachweis von Zellen mit Eigenschaften von Myofibroblasten und dem immunhistologischen Nachweis von Vimentin einen Beweis für eine lokalisierte Weichgewebskontraktion. Fukuhara konnte jedoch in seiner Arbeit keine Unterschiede zu Patienten mit neurogenen Klumpfüßen finden und blieb somit den Nachweis eines primären Mechanismus beim sogenannten idiopathischen Klumpfuß schuldig.

Bis heute ist in noch keiner Arbeit das Kollagen als die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix des pathologisch veränderten Gewebes im Bereich des Ligamentum deltoideum des idiopathischen Klumpfußes hinreichend "in vivo" untersucht und mit Referenzgeweben verglichen worden. So sind beispielsweise nach Aumailley und Nicholls Klumpfüße gehäuft in Verbindung mit dem Ehlers-Danlos Syndrom IV zu finden (3;92). In zahlreichen Publikationen konnten unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigen, dass bereits kleine, biochemisch messbare Veränderungen der intra- und extrazellulären Modifikationen des Kollagens zu manifesten Erkrankungen des Bindegewebes führen (91). Li et al. konnten darstellten, dass beim idiopathischen Klumpfuß Veränderungen auf zellulärer Ebene vorliegen (77). Sie fanden in "in vitro" Experimenten mit Zellen aus dem medialseitigen, kontrakten Gewebe eine erhöhte stellten eine Behandlungsoption vor, wonach durch eine Blockade dieser Faktoren eine Verminderung der Zellproliferation und Kollagensynthese bewirkt werden könne.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals das Kollagen des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes zwischen Innenknöchel, Os naviculare und Talus kongenitaler Klumpfüße biochemisch charakterisiert und mit gesunden Kontrollen verglichen.

Das Kollektiv der Klumpfüße besteht ausschließlich aus idiopathischen Klumpfüßen. Syndromale oder neurogene Klumpfüße werden explizit ausgeschlossen und in Ergebnisse gesondert aufgeführt, da hier die Grunderkrankung mit muskulärer Dysbalance zur Fehlstellung des betroffenen Fußes führt. Die Gruppierung der Klumpfüße erfolgt nach der Schwere des Klumpfußes, analog der Einteilung nach Diméglio (26). Es kann in der Untersuchung kein mathematisch signifikanter Unterschied innerhalb der nach der Diméglio-Einteilung definierten Klumpfußschweregraden herausgearbeitet werden. Tendenziell folgen die Ergebnisse jedoch der klinischen Diméglio-Einteilung. Nachfolgend wird das Gesamtkollektiv der idiopathischen Klumpfüße im Vergleich zu den Referenzen diskutiert.

Die Referenzwerte dieser Untersuchung stammen allesamt aus der gleichen anatomischen Region von Säuglingen bzw. Kleinkindern der vergleichbaren Altersgruppe, da die intra- und extrazelluläre Modifikation des Kollagens altersabhängig ist und von biomechanischen Faktoren beeinflusst wird. Die eigene Untersuchung von Gewebsproben normaler Füße war notwendig geworden, da es keine Literaturangaben zu Normwerten aus diesem anatomischen Bereich im Alter der untersuchten Klumpfußpatienten gibt. Eine von van der Sluijs (142) durchgeführte Quervernetzungsanalyse des Kollagens der hinteren Sprunggelenkskapsel beim Klumpfuß verglich beispielsweise die gemessenen Daten mit Literaturwerten gesunder Erwachsener. Dieser Vergleich ist im Hinblick auf ein, so Yamauchi (147), physiologisches Ansteigen des Quervernetzungsgrades im Alter kritisch. Ist der Quervernetzungsgrad, wie von van der Sluijs publiziert, beim Säugling mit kongenitalem Klumpfuß so hoch wie beim gesunden Erwachsenen, so kann dies dennoch einen pathologischen Anstieg der Quervernetzungen im Vergleich zum gesunden, gleichaltrigen Säugling bedeuten. Bei der Auswahl der Referenzproben der vorliegenden Arbeit wurde sichergestellt, dass keine Hinweise auf eine Krankheit des Bindegewebes und speziell des Kollagens vorlagen. Die erhobenen Daten in der Referenzgruppe sind durchweg homogen und bewegen sich im Fehlerbereich der für die einzelnen Versuche verwendeten Untersuchungsmethoden.

Die untersuchten fünf Rezidivklumpfüße sind Klumpfüße, die nicht in unserer Arbeitsgruppe voroperiert sind, wobei nach Durchsicht der Operationsberichte der mediale Aspekt in der ersten und bis dahin einzigen Operation nicht angegangen wurde. Die entnommenen Proben sind also, abgesehen von einer indirekten manuellen redressierenden Kraft vor und während der Operation, nicht iatrogen im Sinne einer Narbe verändert. Ein direkter Vergleich mit den Referenzen ist aufgrund der Altersdifferenz nicht zulässig. Die Daten geben jedoch Hinweise auf die Biochemie des Kollagens des Gewebes zu diesem Zeitpunkt. Wie groß der Einfluss der vorangegangenen konservativen Behandlung ist, lässt sich jedoch nicht beurteilen.

Bei der Untersuchung des unbehandelten Klumpfußes ("neglected clubfoot") kann ein iatrogener Einfluss auf das Kollagen des Bandes definitionsgemäß ausgeschlossen werden. Dieser siebeneinhalb jährige Junge hat weder eine redressierende konservative noch eine primäre operative Behandlung erfahren. Die durch dieses Fallbeispiel erhaltenen Daten sind in Hinblick auf die Frage, was primär für den Klumpfuß verantwortlich und was durch die Therapie an Veränderungen im Kollagen verursacht wurde, von großem Interesse. In der Analyse hebt sich dieser Patient deutlich von den Untersuchungswerten der Referenzen, der neurogenen Klumpfüße und des gleichaltrigen Plattfußes ab und unterstützt die gefundenen signifikanten Veränderungen der posttranslationalen Modifikation des Kollagens beim Klumpfuß.

In der Gruppe der neurogenen Klumpfüße liegt aufgrund von Innervationsstörungen, eine Muskelimbalance vor. Eine primäre Veränderung des Bindegewebes, respektive des Kollagens, als Ursache der Fehlstellung ist somit ausgeschlossen. Messwerte neurogener Klumpfüße sind, obwohl lediglich zwei Fälle untersucht wurden, von großem Interesse, da sekundäre Veränderungen des Kollagens als Folge der Fehlstellung des Fußes den Veränderungen beim idiopathischen Klumpfuß gegenübergestellt werden können.

95

Die Messwerte des untersuchten, etwa fünf jährigen Patienten mit Plattfuß, entsprechen den physiologischen und erwarteten Verhältnissen dieser primär nicht das Deltaband betreffenden Fehlstellung. Diese Werte können als Orientierung für die gleichaltrigen Rezidivklumpfüße betrachtet werden, ohne Unterschiede als Beweis für eine bestehende Pathologie zu bewerten. In den Untersuchungen liegt der Plattfuß für alle gemessenen Parameter im Wertebereich der Referenzen.

In der vorangestellten histologischen Untersuchung des Kollagens lässt sich im Vergleich zum Referenzgewebe beim idiopathischen Klumpfuß, wie auch Fukuhara (38) und Sano (118) darstellten, ein Verlust der räumlichen Ordnung mit irregulärem Faserverlauf feststellen (siehe Abb. 3.03). Fukuhara führte dies auf eine beim Klumpfuß vorliegende Fibromatose zurück und postulierte zudem, dass das Kollagen besonders dicht gepackt erscheint. In den eigenen Übersichtsfärbungen der Klumpfußpräparate lässt sich diese Verdichtung nachvollziehen (siehe Abb.3.01). Zudem sind die Klumpfußpräparate kernreicher. Die mikroskopisch erkennbare Störung der sonst strengen Ausrichtung der Kollagenfibrillen im Band kann als mikroskopisches Korrelat einer Störung des architektonischen Arrangements der Kollagenfasern im medioplantaren Kapsel-Band-Komplexe des idiopathischen Klumpfußes gewertet werden. Eine rein passive Stauchung des Deltabandes würde im mikroskopischen Ausschnitt nicht zu einer derartig gestörten Ordnung führen. Diese aufgehobene Ordnung kann nach Scott (120) Ausdruck einer Störung der Interaktion mit anderen Makromolekülen des Extrazellulärraumes, wie beispielsweise dem Fibronektin und den Proteoglykanen sein.

Die immunhistochemische Untersuchung der Klumpfußpräparate mit polyklonalen Antikörpern gegen Kollagen I, III und V zeigt eine regelmäßige Verteilung der unterschiedlichen Kollagentypen. Es wurden also keine Unterschiede im

96

Verteilungsmuster der Kollagentypen von Klumpfüßen im Vergleich zu den Referenzen festgestellt. Ein wie von Fukuhura (38) publiziertes gehäuftes Auftreten von immunhistochemisch nachgewiesenem Kollagen III in Bereichen des Ligamentum deltoideum wird durch diese Arbeit nicht bestätigt. Ein lokalisiertes, vermehrtes Vorkommen von Kollagen III lässt darüber hinaus nicht den von Fukuhara formulierten Schluss zu, dass es sich dabei um den Ort mit kontraktiler Potenz handelt. Es gibt bis zum jetzigen Zeitpunkt keinen Hinweis auf eine kontraktile Potenz des Kollagen III. Durch die Immunhistochemie ist es zudem nicht möglich, eine zuverlässige Aussage über die quantitative Verteilung der unterschiedlichen Kollagentypen in einem Ligament zu treffen, da die Anfärbung im Gewebe nicht linear zur Kollagenmenge ist.

Die Elektronenmikroskopie der Klumpfußproben zeigt eine intakte Fibrillenbildung mit physiologischem Erscheinungsbild der "gab-" und "overlap-Zonen". Allerdings findet sich wie in der histologischen Untersuchung auch die aufgehobene Ordnung in der feingeweblichen Architektur (siehe Abb. 3.05). Ein signifikanter Unterschied zu den Referenzen bezüglich der Fibrillendicke ist nicht zu messen. Dies bestätigen Überlegungen Notbohm's (97), dass eine Übermodifikation der Kollagenfibrille "in vivo" nicht einen geringeren Fibrillendurchmesser zur Folge haben muss. Es gibt jedoch deutliche Hinweise auf eine Zunahme der Fibrillendicke bei Rezidivklumpfüßen. Eine zuverlässige Einschätzung ist jedoch nicht möglich, da die Kontrollen jüngeren Alters sind und ein größerer Fibrillendurchmesser, wie von Cetta (19) beschrieben, altersbedingte Ursachen haben kann. Zur endgültigen Beantwortung dieser Frage bedarf es weiterer Untersuchungen, in denen altersentsprechende Kontrollen zum Vergleich herangezogen werden müssen. Die mit pepsinlöslichem Kollagen geladenen SDS-Polyacrylamidgele (siehe Abb.3.06) präzisieren die in der Immunhistochemie gezeigten Ergebnisse. Die gemessenen Banden bestätigen durch den Vergleich mit laborinternen Standards der Haut, die intakte Fibrillenbildung des Klumpfußkollagens. Ein Vergleich der Kollagenbanden von Ligamenten mit denen der Haut ist möglich, da die Fibrillenbildung unabhängig vom Gewebe ist. Mutationen und somit Veränderungen der Aminosäuresequenz des Kollagenmoleküls sind somit unwahrscheinlich. Eine semiquantitative Auswertung der Banden zeigt, dass im Ligamentum deltoideum des kongenitalen Klumpfußes erwartungsgemäß hauptsächlich Kollagen Typ I zu finden ist. Es findet sich etwas Kollagen III und wenig Kollagen V. Diese Verteilung der Typen ist nach Kielty für ligamentöses Gewebe physiologisch (66). Eine exakte Bestimmung der prozentualen Verteilung konnte nicht durchgeführt werden, da, wie in den FPLC-Läufen gezeigt, nur etwa 28% der Kollagenfibrillen in den für die quantitative Auswertung entscheidenden α -Banden zu finden sind. Eine Fraktionierung der Kollagentypen und somit eine exakte Mengenbestimmung via Salzfällung der pepsingelösten Peptide (66) ist mit diesen "in vivo" Präparaten nicht exakt möglich. Die Anfärbung der Kollagenbanden im Gel mit Coomassie folgt nicht linearen Gesetzmäßigkeiten. Deshalb ist auf eine densitometrische Quantifizierung verzichtet worden. Die Kontrollen zeigen in den gleichen Läufen eine identische Bandenverteilung. Eine Verschiebung des relativen Anteils der Kollagentypen, wie sie beispielsweise zugunsten des Typ III beim Morbus Dupuytren durch Notbohm (95) aufgezeigt wurde, ist beim Klumpfuß nicht zu finden. Ferner widersprechen unsere Daten der These, es läge beim idiopathischen Klumpfuß aufgrund des Nachweises von Kollagen Typ III, das als Kollagentyp der embryonalen Entwicklung gilt, ein unreifes, embryonales Stadium vor (38). Dies kann durch den Nachweis identischer Banden der Referenzen entkräftet werden. Auch die älteren Rezidivklumpfüße zeigen ein gleiches Bandenmuster. Hier kommt es demnach ebenfalls nicht zu einer messbaren Verschiebung innerhalb der Kollagentypen.

Das Verhältnis von α_1 (I) zu α_2 (I) beträgt etwa 4:1, was einem Normalverhältnis der α -Ketten zueinander im Ligament entspricht (65). Es ist folglich keine der beiden α -Ketten des pepsinlöslichen Typ I Kollagens des kongenitalen Klumpfußes vermehrt in Quervernetzungen eingebunden.

Wie in den FPLC-Läufen gezeigt findet sich in der SDS-PAGE der überwiegende Teil (~70%) des pepsinlöslichen Kollagens in den β - und γ -Banden sowie in den hochmolekularen Polymeren. Eine weitere Differenzierung und Analyse dieser Fraktionen wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt und ist Ziel weiterer Untersuchungen. Es ist deshalb keine Aussage zu Unterschieden möglich.

Die verlässliche Bestimmung der relativen Menge Kollagen im Ligamentum deltoideum wird zum einen mit Ehrlich's Reagenz und zum anderen mit der Messung von Hydroxyprolin via Aminosäureanalyzer durchgeführt. Als Bezugsgröße dient das Trockengewicht des unbehandelten Bandes. Eine Bestimmung des Nassgewichtes, das Aussagen zum Wassergehalt im Ligament ermöglicht hätte, ist aufgrund vieler Störfaktoren wie etwa Spülflüssigkeit, nasse Tupfer und Pufferlösungen nicht zuverlässig möglich. Bei der Messung mit Ehrlich's Reagenz zeigt sich in Relation zum Trockengewicht eine Reduktion des Kollagenanteils. Der relative Anteil des Kollagens am Trockengewicht ist bei den idiopathischen Klumpfüßen gegenüber den Referenzen signifikant erniedrigt (siehe Graphik 3.01). Die Messung im Aminosäureanalyzer zeigt, dass der Anteil des Kollagens am Gesamtprotein beim Klumpfuß ebenfalls niedriger ist als bei den Kontrollen (siehe Graphik 3.03). Betrachtet man die Analysewerte der Rezidivklumpfüße, so liegen diese zwischen den niedrigen der Klumpfußpatienten und den höheren Werten der gesunden Referenzen. Der unbehandelte, alte Klumpfuß findet

99

sich demgegenüber im Bereich der Referenzen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der gefundene niedrigere Kollagengehalt ein bereits intrauterin beginnendes, im Säuglings- bzw. Kleinkindalter noch nachweisbares Phänomen darstellt, das bei älteren Klumpfüßen nicht mehr in gleicher Form nachweisbar ist. Diese Untersuchungen könnten somit die embryonale Klumpfußtheorie Iranis (58) stützen. Dass es sich nicht um ein sekundäres Phänomen handelt zeigt die Tatsache, dass die neurogenen Klumpfüße in beiden Untersuchungen in Bezug auf die Kollagenmenge Referenzniveau haben. Die Frage der biologischen Wertigkeit der relativen Verminderung des Kollagens bei Klumpfußpräparaten muss vorerst unbeantwortet bleiben. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass im Gegensatz zu den von Li (77) vorgestellten Ergebnissen in Relation zu anderen extrazellulären Proteinen im Säuglings- bzw. Kleinkindalter keine vermehrte Kollagensynthese vorliegt, diese sogar relativ vermindert ist. Unklar bleibt, ob wirklich vergleichsweise weniger Kollagen gebildet wird, oder ein anderes nichtkollagenes Protein vermehrt synthetisiert wird und deshalb der relative Anteil des Kollagens am Gesamtprotein im Band sinkt. Durch die vorliegenden Analysedaten kann dies nicht weiter spezifiziert werden. Es müssen sich deshalb in weiteren Arbeiten umfassende Untersuchungen der Extrazellularmatrix anschließen, die klären sollen, inwieweit es zu einer Änderung in der Verteilung nichtkollagener Proteine gekommen ist und ob ein "klumpfußbildendes" Protein existiert. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Analyse des Gewebes nach spezifischem Abbau des Kollagens mit Kollagenase. Die Makromoleküle des Extrazellulärraumes, wie beispielsweise Proteoglykane und Fibronektin, die nach Scott (120) durch Interaktion mit dem Kollagen zu einer Störung des architektonischen Arrangements der Kollagenfasern führen können, sollten ebenfalls Ziel weiterer Untersuchungen sein. In diesem Zusammenhang wird das Elastin mit seinen Quervernetzungen Desmosin und

Isodesmosin als wichtige Komponente des ligamentären Bindegewebes im Fokus zukünftiger Studien sein.

Die Zelle kann über die Regulation der posttranslationalen Modifikation der α-Kollagenkette auf geänderte biomechanische Anforderungen an die extrazelluläre Matrix reagieren. Murrell (90) stellt fest, dass ein Anstieg dieser enzymgesteuerten Modifikationen Ausdruck einer höheren Proliferationsrate und gesteigerter metabolischer Aktivität sein kann. Zu den posttranslationalen Modifikationen gehört neben einer Glykosylierung die Hydroxylierung des Lysins. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass diese Hydroxylierung bei Patienten mit kongenitalem Klumpfuß gegenüber den Referenzen signifikant erhöht ist (siehe Graphik 3.05). Die Zelle reguliert über die Hydroxylierung von Lysinresten die Art der Quervernetzungen. Diese Lysinreste sind Ausgangspunkte für die extrazelluläre Ausbildung von intra- und intermolekularen Quervernetzungen (6;65). Diese verstärkte Hydroxylierung findet sich zum einen in der Untersuchung des ohne weitere Vorbehandlung sauer hydrolysierten Bandes, als auch sehr deutlich im stark quervernetzten, pepsinunlöslichen Pellet, das nur noch aus hochvernetztem Kollagen und Elastin besteht. Reguliert wird die Enzymaktivität der Hydroxylasen über Kofaktoren und -substrate in der Zelle. Der genaue Mechanismus ist momentan noch nicht verstanden. Die Enzymaktivität der Hydroxylasen wird jedoch u.a. durch die Prokollagensynthese rückgekoppelt und reguliert. Bei einer Abnahme der Syntheserate kommt es dabei nach Kivirikko zu einer Zunahme an posttranslationalen Modifikationen (70). Auf diesem Hintergrund könnte der gefundene Anstieg der Hydroxylierung ein Hinweis darauf sein, dass beim kongenitalen Klumpfuß weniger Kollagen synthetisiert wird.

Für die Zelle ist eine posttranslationale Kollagenmodifikation nur in der Zeitspanne von der Synthese der Kollagenkette am rauem Endoplasmatischen Retikulum bis zur

101

Bildung der Tripelhelix möglich. Je länger diese Zeitspanne ist, desto stärker ist die Kette modifiziert. Der Vorgang der Helixbildung ist nicht spontan sondern steht unter dem Einfluss zahlreicher intrazellularer Moleküle. Diese Moleküle haben somit Einfluss auf eben diese Zeit, in der posttranslationale Modifikationen durchgeführt werden können (70). Beim kongenitalen Klumpfuß könnte diese Zeitspanne pathologisch der Tripelhelix verlängert sein. Die Bildung wird von Chaperonen des Endoplasmatischen Retikulums unterstützt. Ein wichtiges Chaperon ist das kollagenspezifische Hsp47, dessen Rolle bei der Bildung des Kollagenmoleküls noch nicht endgültig geklärt ist, das aber (thermo)- stabilisierende und kontrollierende Aufgaben während der Helixbildung im Endoplasmatischen Retikulum zu haben scheint. So fand sich u.a. in Geweben mit einer pathologisch erhöhten Kollagensynthese oder einer gestörten Kollagenakkumulation eine dramatische Hochregulation der Hsp47 Expression (73). Eine Untersuchung der Chaperone der Prokollagen-Biosynthese könnte einen weiteren Beitrag zum Verständnis des Pathomechanismus beim kongenitalen Klumpfuß leisten.

Der Anstieg der posttranslationalen Modifikationen beim kongenitalen Klumpfuß könnte ebenso eine Antwort auf veränderte biomechanische Kräfte durch die Fehlstellung im peritalaren Gelenkkomplex sein. Diese Zellmechanismen wären dann sekundärer, reaktiver Natur. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die typische Fehlstellung des neurogenen Klumpfußes als Folge eines Muskelungleichgewichts eben keine Erhöhung des Hydroxylysins - bei geringem Quervernetzungsgrad - zur Folge hat (siehe Graphik 3.06). Die Analysen der neurogenen Klumpfüße zeigen, dass vielmehr gerade die pathologische Klumpfußfehlhaltung die Bildung von weniger Hydroxylysin zur Folge haben müsste. Die bloße Fehlstellung des Fußes wäre demnach für den Anstieg der Hydroxylierung der α -Kette nicht verantwortlich. Die gezeigten Daten lassen demnach die Vermutung zu, dass es beim kongenitalen Klumpfuß zu einer

102
auf aktiven. unphysiologisch übersteigerten Antwort der Zelle die pathobiomechanischen Faktoren der extrazellulären Matrix gekommen sein könnte. Dies ergibt sich aus den dargestellten Daten, die zeigen, dass im Vergleich zum normalen Fuß eine gesteigerte Hydroxylierung und damit eine gesteigerte Stoffwechselleistung vorliegt, obwohl diese Übermodifikation ursprünglich zur Stabilisierung des Sprunggelenkes nicht notwendig ist. Die Abkopplung der Stoffwechselleistung des idiopathischen Klumpfußes von den normalen Anforderungen an den Extrazellulärraum könnte demnach als primärer, pathologisch bedeutsamer Prozess verstanden werden, der bereits intrauterin abläuft.

Betrachtet man ergänzend die Lysinhydroxylierung der Klumpfußrezidive, so nehmen diese Messergebnisse eine Mittelstellung zwischen gesunden und kranken Füßen ein. Bedenkt man aber, dass die Quervernetzungsanalyse für die Rezidive sehr hohe Werte ergibt, so relativiert sich die leicht erhöhte Hydroxylierung, denn in eine HP-Quervernetzung gehen drei Hydroxylysingruppen zur Bildung dieser Quervernetzung ein. Diese Hydroxylysingruppen sind in der Aminosäureanalyse nicht mehr messbar. Der Messwert des unbehandelten Klumpfußes zeigt, dass ohne konservative Behandlung des Fußes eine sehr hohe Menge an Hydroxylysin zu detektieren ist. Dies zeigt, dass der beim idiopathischen Klumpfuß gezeigte signifikante Anstieg der Hydroxylierung des Lysins keine Folge der Fehlstellung, sondern ein primärer Prozess sein kann.

Ein Anstieg der Hydroxylierung des Lysins, gleichbedeutend mit einer Erhöhung der intrazellulären, posttranslationalen Modifikation, geht, wie auch Brinckmann (15) feststellt, einher mit dem Anstieg der Disaccharide (Glykosyl-Galaktose) als Zeichen einer Erhöhung der den posttranslationalen Modifikationen zugehörenden Glykosylierung. Dies lässt sich auch bei den idiopathischen Klumpfüßen beobachten, deren Anteil an Glykosyl-Galaktose gegenüber den Referenzen signifikant ansteigt.

Eine hinreichende Erklärung für konstante Werte des Monosaccharides gibt es nach Miller (85) nicht. Welchen Einfluss die gestiegene Glykosylierung auf biomechanische Eigenschaften hat, ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass die Glykosylierung über die Interaktion zwischen den Kollagenmolekülen und nichtkollagenen Matrixmolekülen eine wichtige Rolle in der Architektur der extrazellulären Matrix spielt (135). Zudem hat die Glykosylierung Einfluss zu Beginn der Fibrillenbildung, bei der Zuckerreste bei der Interaktion der Kollagenmoleküle wirken. Die Auswirkungen auf thermodynamische Eigenschaften der Tripelhelix gilt es in folgenden Experimenten zu untersuchen. Die Glykosylierung des Kollagens der neurogenen Klumpfüße ist wie die der Referenzpräparate. Dies könnte bedeuten, dass auch die enzymatische Glykosylierung keine Folge der Fußfehlstellung ist. Der unbehandelte Klumpfuß ("neglected clubfoot") zeigt einen sehr hohen Anstieg sowohl der Disaccharide als auch erstaunlicherweise der Monosaccharide. Es liegt auch ohne entsprechende Referenzen die Vermutung nahe, dass die Übermodifikation der Kollagenkette bei einem unbehandelten Klumpfuß auch im Alter von mehr als neun Jahren noch nachzuweisen ist, denn sowohl die Hydroxylierung als auch die Glykosylierung als Mechanismen der posttranslationalen Modifikation, erreichen nach den von Miller (85) veröffentlichten Daten bei weitem zu hohe Werte.

Die Festigkeit des Stützapparates resultiert unmittelbar aus der Art und dem Grad der kovalenten intermolekularen Quervernetzungen des Kollagens. Prinzipiell findet man laut Eyre (30) in Knorpel und Knochen, also dem festen Gewebe, bevorzugt die Pyridinolinquervernetzungen HP und LP. Die Quervernetzung HHL hingegen wird bevorzugt in weichen Geweben, wie beispielsweise der Haut, gefunden (31). Die genaue mechanische Funktion der verschiedenen Quervernetzungen sowie die Bedeutung der unterschiedlichen Verteilungsmuster im harten und weichen Gewebe sind unklar, scheinen jedoch mehr gewebespezifisch als kollagenspezifisch zu sein (31).

Die Analyse der Pyridinolinquervernetzungen HP und LP wird im Gegensatz zu van der Sluijs (142), der seine Analysedaten von Klumpfüßen mit Literaturwerten Erwachsener verglich, mit "altersgematchten" Proben der gleichen anatomischen Region verglichen. Hier zeigt sich, dass es weder bei HP noch bei LP signifikante Unterschiede zwischen idiopathischen Klumpfüßen und Referenzen gibt. Es ist jedoch tendenziell ein Anstieg beider Quervernetzungen bei Klumpfüßen gegenüber den gemessenen Kontrollen zu erkennen. Nach den von Eyre gezeigten Werten (30) nähern sich die Pyridinolinquervernetzungen dem Niveau der Vernetzung bei Erwachsenen. Betrachtet man die Analysedaten der neurogenen Klumpfüße, bei denen die Füße in der gleichen Fehlstellung wie jene der idiopathischen Klumpfüße fixiert sind, so reduzieren sich hier die Pyridinolinquervernetzungen, trotz des gegenüber der Klumpfußgruppe höheren Alters, nahezu um die Hälfte. Dies kann mit der neurogenen, muskulären Fixierung dieser Füße in der typischen Fehlstellung und der damit verbundenen aufgehobenen Funktion des Ligamentum deltoideum als medialer Stabilisator des Sprunggelenkes zu erklären sein. Der geringe Vernetzungsgrad mit Pyridinolinquervernetzungen geht Klumpfüße einher mit den für die neurogenen detektierten niedrigen Hydroxylierungswerten des Lysins. Beim kongenitalen Klumpfuß hingegen kommt es bei einer dem neurogenen Klumpfuß vergleichbaren Fehlstellung zur Synthese eines biomechanisch belastbaren Bandes, das in hohem Maß guervernetzt ist. Im Gegensatz zum neurogenen Klumpfuß fixiert dieses Band beim idiopathischen Klumpfuß den Fuß in seiner pathologischen Stellung.

Die Auswirkungen der redressierenden, konservativen Behandlung auf die biochemischen Veränderungen konnten in dieser Arbeit nicht dargestellt werden, da sowohl die idiopathischen als auch die neurogenen Klumpfüße mit redressierenden Gipsen vorbehandelt waren. Untersuchungen an fetalen Klumpfüßen wären hier wünschenswert, da der Klumpfuß bereits ausgebildet und ohne iatrogenen Einfluss ist.

In weiteren Untersuchungen gilt es nun, Kollagen aus dem Gewebe zu isolieren und die gefundenen Veränderungen auf die einzelne Kollagenkette zu übertragen. Wichtig wäre auch die Darstellung der Art und Anzahl der inter- und intramolekularen Quervernetzung der β - und γ -Fraktionen sowie der Polymeren. Daran anschließend sollte eine Separation und Kultivierung der im Band befindlichen und für die Synthese der Extrazellulärmatrix verantwortlichen Fibrozyten erfolgen. So wäre der Einfluss von Faktoren auf die pathologische Kollagenproduktion in Zellkultur ohne mechanischen Reiz reproduzierbar. Hier könnte dann ein Ansatzpunkt einer Therapie durch Einflussnahme auf Faktoren der Kollagensynthese wie Wachstumsfaktoren, Enzyme und/oder Chaperone erarbeitet werden.

Die Rezidivklumpfüße zeigen sehr hohe HP und auch LP Werte. Eine im Alter vergleichbare Kontrollgruppe steht zwar aus (der gleichaltrige Plattfuß lag im Bereich der Klumpfußreferenzen), doch erreichen die Rezidive mit Messwerten im Bereich des von Eyre (30) für Knorpel publizierten Wertes eine für ein Band bei weitem zu hohe Quervernetzung mit Pyridinolinquervernetzungen. Eine iatrogene Ursache dieses Phänomens ist möglich, dagegen spricht jedoch, dass beim unbehandelten Klumpfuß ("neglected clubfoot") bezüglich der Pyridinolinquervernetzungen der höchste Quervernetzungsgrad aller untersuchter Proben gefunden wurde.

Die Quervernetzung HHL ist als die Quervernetzung des weichen Gewebes die für die Haut typische Quervernetzung und nur in Spuren im Ligament zu finden (31). Gegenüber den gleichaltrigen Referenzen zeigen die idiopathischen Klumpfüße einen signifikanten Anstieg der Quervernetzung des Lysinaldehyd-Pfades. Die Konzentration von HHL bei neurogenen Klumpfüßen ist ebenso hoch wie die der idiopathischen Klumpfüße. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Erhöhung der Quervernetzung HHL um eine Folge der Fehlstellung handeln könnte. Der "neglected clubfoot" zeigt ebenfalls erhöhte HHL Werte. Interessanterweise bewegen sich die durch eine erste Operation zunächst wieder aus ihrer angeborenen Fehlstellung gebrachten Rezidivklumpfüße im Wertebereich der Referenzen bzw. des Plattfußes. Auch dies deutet ebenfalls darauf hin, dass der erhöhte HHL Quervernetzungsgrad eine Folge und nicht eine der Ursachen der Fehlstellung sein könnte. Die genaue biologische Rolle des HHL ist unklar und Ziel weiterer Grundlagenforschung.

In der Zusammenschau der gefundenen Daten zeigt sich, dass das Kollagen im Ligamentum deltoideum beim idiopathischen Klumpfuß bereits intrauterin durch eine Abkopplung Kollagensyntheseleistung der des Fibrozyten posttranslational übermodifiziert und stark mit Pyridinolinquervernetzungen HP und LP quervernetzt embryonalen gebildet sein kann. Dies könnte analog der Theorie der Klumpfußentstehung zwischen Konzeption und der zwölften Schwangerschaftswoche (58) oder aber in Modifikation der osteogenetischen Theorie (63) zwischen der sechsten und achten Woche geschehen. Das Ausmaß der posttranslationalen Modifikationen und der Quervernetzungen des Kollagens ist zur Stabilisierung des fetalen Fußes nicht erforderlich und übersteigt die biomechanische Notwendigkeit. Im weiteren Wachstum fixiert dieser fibröse, diskusartige Kern das Os naviculare im Bereich des Innenknöchels mit typischem sekundärem subtalaren Drehfehler und führt so zum klinischen Bild des Klumpfußes. Das weitere Wachstum der Kollagenfibrillen und des Bandes könnte von diesem fibrösen strukturellen Kern ausgehen, von dem sich das Wachstum durch Anlagerung in beide Richtungen, also longitudinal und axial, entwickelt (50;62;105;123;144). Durch die entstandene pathologische Anatomie ist der weitere Wachstumsverlauf des Bandes makroskopisch und mikroskopisch verändert. Es kommt zur Störung des architektonischen Arrangements der sonst im mikroskopischen Bild parallel ausgerichteten Kollagenfasern des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes. Die Zusammensetzung der Kollagentypen ändert sich hierbei nicht. Die Pathoanatomie des Klumpfußes führt nun zu einer Verminderung der biomechanischen Kräften, die auf das Ligamentum deltoideum wirken. Eine hohe Festigkeit des Bandes und damit die Quervernetzung des Kollagens mit Pyridinolinquervernetzungen HP und LP ist im Bereich des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes nun im weiteren Wachstum nicht mehr notwendig. Dies könnte dazu führen, dass das Kollagen des Bandes in der Folge nicht mehr mit Pyridinolinquervernetzungen, sondern mit dem für das Band unüblichen HHL des weichen Gewebes quervernetzt wird (30;31). Zudem könnte die Zelle die Syntheserate für Kollagen, das für eine hohe Zugfestigkeit sorgt, senken sodass es beim kongenitalen Klumpfuß im Säuglings- bzw. Kleinkindalter zu einem verminderten Anteil des Kollagens am Gesamtprotein bzw. am Trockengewicht des Bandes kommt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Hypothese einer "retracting fibrosis" des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes biochemisch bestätigt werden könnte und unmittelbar zur Pathogenese des idiopathischen Klumpfußes beitragen könnte. Dieser Pathomechanismus sollte ein exponierter Angriffspunkt der konservativen und operativen Behandlung sein. Die guten Resultate bei der Behandlung des kongenitalen Klumpfußes nach der Ponseti-Methode (103) könnte sich dadurch erklären, dass eine Überdehnung des "fibrotischen" medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes unmittelbar am Ort der Pathologie ansetzt und die retrahierten Strukturen gewaltsam aufdehnt. Eine operative Korrektur des Klumpfußes, die diesen pathologischen Bereich nicht einschließt, vernachlässigt eine für die Fehlbildung verantwortliche Struktur. Folglich ist bei der operativen Korrektur eine peritalare Arthrolyse via Cincinnati-Zugang (21;75) erforderlich. Dieser Zugang ermöglicht den medialen, dorsalen und lateralen Zugang zum Rück- und Mittelfuß. Von hier kann die bestehende Fehlstellung im Talocalcaneal-, Talonavicular- und Calcaneocuboidgelenk derotiert und reponiert werden. Ausgehend von den gefundenen neuen Parametern, wie etwa dem Absinken des Kollagenanteils am Gesamtprotein oder dem Grad an posttranslationaler Modifikation der Kollagenkette, könnte durch eine intraoperative Probeentnahme an der Stelle des Deltabandes ein Grading entwickelt werden, das beispielsweise mit dem Auftreten eines Klumpfußrezidives korreliert werden kann. Bei stark gefährdeten Kindern wäre dann etwa eine intensive Nachbehandlung und Nachkontrolle notwendig. Bei Kindern mit geringerem Risiko wäre es möglich, längere Kontrollintervalle festzulegen und so Nachbehandlungskosten zu senken.

Sehr wichtig erscheint die Analyse von Geweben aus unterschiedlichen Gelenkregionen von Patienten mit Arthrogrypose multiplex congenita zu sein. Hier gilt es, die für den idiopathischen Klumpfuß gefundene Pathologie auf die Arthrogrypose zu übertragen, um einen Ansatz zur Pathologie und Heilung dieser Erkrankung zu finden.

Es sind weitere Untersuchungen nötig, um diese neuen Erkenntnisse zur Pathogenese auf einen Gendefekt und somit Genlocus des Klumpfußes zurückzuführen. Dies könnte dann bei Identifizierung einer Mutation eine Therapie des kongenitalen Klumpfußes auf genetischer und/oder zellulärer Ebene ermöglichen.

Ein Therapieansatz besteht in der Prävention oder Heilung der den Fuß in seiner Fehlstellung fixierenden Fibrose. Verstehen wir zukünftig die Kollagensynthese mit ihrer Vielzahl an modifizierenden Proteinen und Faktoren besser als heute, so könnte jedes dieser beteiligten Proteine ein Angriffspunkt einer medikamentösen Therapie sein (73). Eine medikamentöse Blockade des Chaperon Hsp47 beispielsweise, dessen Expression in verschiedensten fibrösen Erkrankungen stark erhöht ist, könnte zu einer "antifibrosierenden" Therapie des idiopathischen Klumpfußes führen (93;132).

5. Zusammenfassung

Die Ätiologie des kongenitalen Klumpfußes ist noch immer unklar. Die vorliegende Arbeit charakterisiert das Kollagen im Bereich des Ligamentum deltoideum beim kongenitalen Klumpfuß im Vergleich zu "altersgematchten" gesunden Kontrollen, um so die Pathogenese der medioplantaren Weichteilkontraktur (retracting fibrosis) weiter aufzuklären.

Die Arbeit umfasst 14 gesunde Füße, 23 kongenitale Klumpfüße, fünf Rezidivklumpfüße, zwei neurogene Klumpfüße, einen unbehandelten Klumpfuß ("neglected clubfoot") sowie einen Plattfuß.

Die histologische Auswertung zeigt beim kongenitalen Klumpfuß einen Verlust der räumlichen Ordnung der Kollagenfibrillen. Die immunhistochemischen Untersuchungen weisen Typ I, III und V Kollagen ohne eine besondere Häufung eines Typs an einem bestimmten Ort nach.

Die SDS-PAGE der pepsinlöslichen Kollagene zeigt, dass beim kongenitalen Klumpfuß genau wie bei den Referenzen ein hoher Anteil an Kollagen I, etwas Kollagen III und wenig Kollagen V vorhanden sind. Das Bandenmuster und damit die Helixbildung ist unverändert.

In der Elektronenmikroskopie kommt beim idiopathischen Klumpfuß eine intakte Fibrillenbildung ohne Variation des Fibrillendurchmessers bei Verlust der streng parallelen Ausrichtung zur Darstellung. Bei älteren Kindern mit Rezidivklumpfüßen findet sich eine Zunahme der Fibrillendicke.

Der Anteil des Kollagens am Trockengewicht und der Anteil des Kollagens am Gesamtprotein sind beim idiopathischen Klumpfuß im Vergleich zu den Kontrollen hoch signifikant verringert.

Die auf zellulärer Ebene modulierbaren posttranslationalen Modifikationen, die Hydroxylierung von Lysinresten und die Glykosylierung von Hydroxylysinresten steigen beim idiopathischen Klumpfuß im Vergleich zum normalen Fuß und zum neurogenen Fuß signifikant an. Dies führt zu einer Änderung von biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften des Bindegewebes. Dieser Anstieg ist ebenfalls beim unbehandelten Klumpfuß zu finden. Die Kollegenquervernetzung HHL steigt beim kongenitalen Klumpfuß, ähnlich wie bei neurogenen Klumpfüßen, im Vergleich zu den Kontrollen signifikant an. Die Quervernetzungen HP und LP, die beim idiopathischen Klumpfuß gegenüber dem Normalfuß leicht erhöht sind, sind beim neurogenen Klumpfuß stark erniedrigt. Bei den Rezidivklumpfüßen und dem "neglected clubfoot" findet sich dagegen ein sehr stark erhöhter Quervernetzungsgrad. Die immaturen Quervernetzungen HLNL, HHMD und DHLNL können in repräsentativen Proben detektiert werden.

Die präsentierten Daten zeigen vor dem Hintergrund der Hypothese einer "retracting fibrosis" erstmalig spezifische Unterschiede im Gehalt an Kollagen und der posttranslationalen Modifikation des Kollagens im Bereich des Ligamentum deltoideum beim kongenitalen Klumpfuß im Vergleich zum normalen Fuß. Zudem besteht ein hoher Grad an Lysinoxidase-abhängigen Quervernetzungen. Diese Veränderungen scheinen primär zu sein. Ein Ansteigen von HHL könnte eine Folge der langfristigen Klumpfußfehlstellung sein und wäre damit als sekundäre Veränderung zu werten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse tragen zum Verständnis der Pathogenese des idiopathischen Klumpfußes bei. Die Veränderungen des Kollagens stellen einen Ansatz zur weiteren Aufklärung der Ätiologie der Klumpfußdeformität dar. Die "retracting fibrosis" des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes sollte ein exponierter Angriffspunkt der konservativen und operativen Behandlung des kongenitalen Klumpfußes sein.

6. Literaturnachweis

- Atlas S, Menacho LC, Ures S. Some new aspects in the pathology of clubfoot. Clin Orthop 1980;(149):224-228.
- Attenborough CG. Early posterior soft-tissue release in severe congenital talipes equinovarus. Clin Orthop 1972; 84:71-78.
- (3) Aumailley M, Krieg T, Dessau W, Muller PK, Timpl R, Bricaud H. Biochemical and immunological studies of fibroblasts derived from a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. Demonstrate reduced type III collagen synthesis. Arch Dermatol Res 1980; 269(2):169-177.
- Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. Mech Ageing Dev 1998; 106(1-2):1-56.
- (5) Bannister DW, Burns AB. Adaptation of the Bergman and Loxley technique for hydroxyproline determination to the autoanalyzer and its use in determining plasma hydroxyproline in the domestic fowl. Analyst 1970; 95(131):596-600.
- (6) Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JAM. Extracellular matrix, Volume 2, Molecular components and interactions. Amsterdam, NL: Harwood Academic Publishers GmbH, 1996.
- (7) Batge B, Nerlich A, Brenner R, Yang C, Muller PK. Collagen type II in Langer-Saldino achondrogenesis: absence of major abnormalities in a less severe case. Acta Paediatr 1992; 81(2):158-162.
- (8) Bechtol CO, Mossman HW. Club-foot. An embryological study of associated muscle abnormalities. J Bone Joint Surg Am 1950;(32):827-836.
- (9) Berg RA, Prockop DJ. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. Biochem Biophys Res Commun 1973; 52(1):115-120.
- (10) Bill PL, Versfeld GA. Congenital clubfoot: an electromyographic study. J Pediatr Orthop 1982;
 2(2):139-142.
- (11) Birk D, Bruckner P. Collagen Suprastructures. In: Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, editors. Collagen. Berlin Heidelberg: 2005: 185-205.
- (12) Black D, Duncan A, Robins SP. Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1988; 169(1):197-203.

- Bornstein P, Traub W. The chemistry and biology of collagen. In: Neurath H, Hill R, editors.
 Proteins. New York: Academic Press, 1979: 411-632.
- (14) Brinckmann J, Acil Y, Tronnier M, Notbohm H, Batge B, Schmeller W et al. Altered x-ray diffraction pattern is accompanied by a change in the mode of cross-link formation in lipodermatosclerosis. J Invest Dermatol 1996; 107(4):589-592.
- (15) Brinckmann J, Notbohm H, Tronnier M, Acil Y, Fietzek PP, Schmeller W et al. Overhydroxylation of lysyl residues is the initial step for altered collagen cross-links and fibril architecture in fibrotic skin. J Invest Dermatol 1999; 113(4):617-621.
- (16) Browne D. Congenital deformities of mechanical origin. Arch Dis Child 1955;(30):37.
- (17) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. Diabetes Metab Rev 1988; 4(5):437-451.
- (18) Carroll NC. Clubfoot: what have we learned in the last quarter century? J Pediatr Orthop 1997;
 17(1):1-2.
- (19) Cetta G, Tenni R, Zanaboni G, De Luca G, Ippolito E, De Martino C et al. Biochemical and morphological modifications in rabbit Achilles tendon during maturation and ageing. Biochem J 1982; 204(1):61-67.
- (20) Ching GH, Chung CS, Nemechek RW. Genetic and epidemiological studies of clubfoot in Hawaii: ascertainment and incidence. Am J Hum Genet 1969; 21(6):566-580.
- (21) Crawford AH, Marxen J, Osterfeld D. The Cincinnati incision: a comprehensive approach for surgical procedures of the foot and ankle in childhood. J Bone Joint Surg Am 1982;(64):1355-1358.
- (22) Culbert AA, Lowe MP, Atkinson M, Byers PH, Wallis GA, Kadler KE. Substitutions of aspartic acid for glycine-220 and of arginine for glycine-664 in the triple helix of the pro alpha 1(I) chain of type I procollagen produce lethal osteogenesis imperfecta and disrupt the ability of collagen fibrils to incorporate crystalline hydroxyapatite. Biochem J 1995; 311 (Pt 3):815-820.
- (23) Davis NR, Bailey AJ. Chemical synthesis of the reduced form of an intermolecular crosslink of collagen: a re-evaluation of the structure of syndesine. Biochem Biophys Res Commun 1971; 45(6):1416-1422.
- (24) Delgado-Baeza E, Santos-Alvarez I, Martos-Rodriguez A. Retinoic acid-induced clubfoot-like deformity: pathoanatomy in rat fetuses. J Pediatr Orthop B 1999; 8(1):12-18.
- (25) Dietz FR. Effect of denervation on limb growth. J Orthop Res 1989; 7(2):292-303.

- (26) Dimeglio A, Bensahel H, Souchet P, Mazeau P, Bonnet F. Classification of clubfoot. J Pediatr Orthop B 1995; 4(2):129-136.
- (27) Engel J, Bachinger HP. Structer, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. In: Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, editors. Collagen. Berlin Heidelberg: Springer, 2005: 7-33.
- (28) Epeldegui T, Delgado E. Acetabulum pedis. Part II: Talocalcaneonavicular joint socket in clubfoot. J Pediatr Orthop B 1995; 4(1):11-16.
- (29) Eyre DR, Oguchi H. The hydroxypyridinium crosslinks of skeletal collagens: their measurement, properties and a proposed pathway of formation. Biochem Biophys Res Commun 1980; 92(2):403-410.
- (30) Eyre DR, Paz MA, Gallop PM. Cross-linking in collagen and elastin. Annu Rev Biochem 1984; 53:717-748.
- (31) Eyre DR, Wu JJ. Collagen Cross-Links. In: Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, editors. Collagen. Berlin Heidelberg: Springer, 2005: 207-229.
- (32) Feldbrin Z, Gilai AN, Ezra E, Khermosh O, Kramer U, Wientroub S. Muscle imbalance in the aetiology of idiopathic club foot. An electromyographic study. J Bone Joint Surg Br 1995; 77(4):596-601.
- (33) Fietzek PP. Major Cross-Linking in Collagen Typ I. 1998. Ref Type: Personal Communication
- (34) Fietzek PP, Kuhn K. The primary structure of collagen. Int Rev Connect Tissue Res 1976; 7:1-60.
- (35) Fried A. Recurrent congenital club-foot: the role of the m. tibialis posterior in etiology and treatment. J Bone Joint Surg Am 1959; 41-A:243-252.
- (36) Fritsch H, Eggers R. Ossification of the calcaneus in the normal fetal foot and in clubfoot. J Pediatr Orthop 1999; 19(1):22-26.
- (37) Fujimoto D. Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. Biochem Biophys Res Commun 1977; 76(4):1124-1129.
- (38) Fukuhara K, Schollmeier G, Uhthoff HK. The pathogenesis of club foot. A histomorphometric and immunohistochemical study of fetuses. J Bone Joint Surg Br 1994; 76(3):450-457.
- (39) Germiller JA, Lerner AL, Pacifico RJ, Loder RT, Hensinger RN. Muscle and tendon size relationships in a paralyzed chick embryo model of clubfoot. J Pediatr Orthop 1998; 18(3):314-318.

- (40) Grant J. A method of anatomy. Baltimore: Williams and Wilkins, 1952.
- (41) Grill F. Der Klumpfuß. Orthopade 1996; 25(4):364-378.
- (42) Grynpas MD, Eyre DR, Kirschner DA. Collagen type II differs from type I in native molecular packing. Biochim Biophys Acta 1980; 626(2):346-355.
- (43) Gustavson K. The Chemistry and Reactivity of Collagen. New York: Academic Press, 1956.
- (44) Handelsman JE, Badalamente MA. Club foot: a neuromuscular disease. Dev Med Child Neurol 1982; 24(1):3-12.
- (45) Henkel HL, Woods CG, Arnold M. Die Muskulatur beim angeborenen Klumpfuß. Z Orthop Ihre Grenzgeb 1971; 108(4):604-632.
- (46) Herring JA. Disorders of the Foot Congenital Talpis equinovarus (Clubfoot). In: Herring JA, editor. Tachdjian's pediatric orthopaedics. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002: 922-959.
- (47) Hersh A. The role of surgery in the treatment of club feet. J Bone Joint Surg Am 1967; 49(8):1684-1696.
- (48) Herzenberg JE, Carroll NC, Christofersen MR, Lee EH, White S, Munroe R. Clubfoot analysis with three-dimensional computer modeling. J Pediatr Orthop 1988; 8(3):257-262.
- (49) Hjelmstedt A, Sahlstedt B. Talar deformity in congenital clubfeet. An anatomical and functional study with special reference to the ankle joint mobility. Acta Orthop Scand 1974; 45(4):628-640.
- (50) Holmes DF, Chapman JA, Prockop DJ, Kadler KE. Growing tips of type I collagen fibrils formed in vitro are near-paraboloidal in shape, implying a reciprocal relationship between accretion and diameter. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(20):9855-9859.
- (51) Hootnick DR, Packard DS, Jr., Levinsohn EM, Crider RJ, Jr. Confirmation of arterial deficiencies in a limb with necrosis following clubfoot surgery. J Pediatr Orthop B 1999; 8(3):187-193.
- (52) Howard CB, Benson MK. The ossific nuclei and the cartilage anlage of the talus and calcaneum. J Bone Joint Surg Br 1992; 74(4):620-623.
- (53) Howard CB, Benson MK. Clubfoot: its pathological anatomy. J Pediatr Orthop 1993; 13(5):654-659.
- (54) Huang YT, Lei W, Zhao L, Wang J. The treatment of congenital club foot by operation to correct deformity and achieve dynamic muscle balance. J Bone Joint Surg Br 1999; 81(5):858-862.

- (55) Ionasescu V, Maynard JA, Ponseti IV, Zellweger H. The role of collagen in the pathogenesis of idiopathic clubfoot. Biochemical and electron microscopic correlations. Helv Paediatr Acta 1974; 29(4):305-314.
- (56) Ippolito E. Update on pathologic anatomy of clubfoot. J Pediatr Orthop B 1995; 4(1):17-24.
- (57) Ippolito E, Ponseti IV. Congenital club foot in the human fetus. A histological study. J Bone Joint Surg Am 1980; 62(1):8-22.
- (58) Irani RN, Sherman MS. The pathological anatomy of idiopathic clubfoot. Clin Orthop 1972; 84:14-20.
- (59) Isaacs H, Handelsman JE, Badenhorst M, Pickering A. The muscles in club foot--a histological histochemical and electron microscopic study. J Bone Joint Surg Br 1977; 59-B(4):465-472.
- (60) Jago RH. Arthrogryposis following treatment of maternal tetanus with muscle relaxans. A case report. Arch Dis Child 1970;(45):277-279.
- (61) Jahss MH. Medical and surgical management. Disorders of the foot and ankle. 1991: 771-829.
- (62) Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. Biochem J 1996; 316 (Pt 1):1-11.
- (63) Kawashima T, Uhthoff HK. Development of the foot in prenatal life in relation to idiopathic club foot. J Pediatr Orthop 1990; 10(2):232-237.
- (64) Khan AM, Ryan MG, Gruber MM, Haralabatos SP, Badalamente MA. Connective tissue structures in clubfoot: A morphologic study. J Pediatr Orthop 2001;(21):708-712.
- (65) Kielty CM, Hopkinson I, Grant ME. Connective Tissue and its Heritable Disorders. New York: Wiley-Liss, Inc., 1993.
- (66) Kielty CM, Hopkinson I, Grant M. The collagen Family: Structure, Assembly and Organization in the Extracellular Matrix. Connective Tissue and Its Heritable Disorders. 1993: 103-147.
- (67) Kivirikko KI, Myllyla R. Collagen glycosyltransferases. Int Rev Connect Tissue Res 1979; 8:23-72.
- (68) Kivirikko KI, Myllyla R. Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes. Methods Enzymol 1982; 82 Pt A:245-304.
- (69) Kivirikko KI, Myllyla R. Extracellular matrix biochemistry. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier Publishing Co, Inc., 1984.
- (70) Kivirikko KI, Myllylä R. Collagen in health and disease. Edingburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone, 1982.

- (71) Kivirikko KI, Myllylä R. Post-translational modifications. In: Weiss JB, Jayson M.IV, editors. Collagen in Health and Disease. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1982: 101-120.
- (72) Kofford M, Schwartz L, Schechter N, Yager D, Diegelmann R, Graham M. Cleavage of type I procollagen by mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyterminal propeptide. J Biol Chem 1997;(272):7127-7131.
- (73) Koide T, Nagata K. Collagen Biosynthesis. In: Brinckmann J, Notbohm H, Muller PK, editors. Collagen. Berlin Heidelberg: Springer, 2005: 85-114.
- (74) Kondo A, Ishikawa O, Okada K, Miyachi Y, Abe S, Kuboki Y. Measurement of histidinohydroxylysinonorleucine and hydroxyproline in skin collagen by reversed-phase highperformance liquid chromatography after 9-fluorenylmethyl chloroformate labeling. Anal Biochem 1997; 252(2):255-259.
- (75) Krauspe R, Parsch K. Die peritalare Arthrolyse zur Klumpfußkorrektur über den sogenannten Cincinnati-Zugang. Operative Orthopädie und Traumatologie 1995; 2(7):125-140.
- (76) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227(259):680-685.
- (77) Li C, Nguyen Q, Cole WG, Alman BA. Potential treatment for clubfeet based on growth factor blockade. J Pediatr Orthop 2001; 21(3):372-377.
- (78) Li C, Nguyen Q, Cole WG, Alman BA. Potential treatment for clubfeet based on growth factor blockade. J Pediatr Orthop 2001; 21(3):372-377.
- (79) Loren GJ, Karpinski NC, Mubarak SJ. Clinical implications of clubfoot histopathology. J Pediatr Orthop 1998; 18(6):765-769.
- (80) Macnicol MF, Nadeem RD. Evaluation of the deformity in club foot by somatosensory evoked potentials. J Bone Joint Surg Br 2000; 82(5):731-735.
- (81) Maffulli N, Capasso G, Testa V, Borrelli L. Histochemistry of the triceps surae muscle in idiopathic congenital clubfoot. Foot Ankle 1992; 13(2):80-84.
- (82) McKay DW. New concept of and approach to clubfoot treatment: section I-principles and morbid anatomy. J Pediatr Orthop 1982; 2(4):347-356.
- (83) Mechanic G, Tanzer ML. Biochemistry of collagen crosslinking. Isolation of a new crosslink, hydroxylysinohydroxynorleucine, and its reduced precursor, dihydroxynorleucine, from bovine tendon. Biochem Biophys Res Commun 1970; 41(6):1597-1604.
- (84) Miles CA, Knott L, Sumner IG, Bailey AJ. Differences between the thermal stabilities of the three triple-helical domains of type IX collagen. J Mol Biol 1998; 277(1):135-144.

- (85) Miller EJ. Chemistry of the Collagens and Their Distribution. In: Piez KA, Reddi AH, editors. Extracellular Matrix Biochemistry. New York: Elsevier, 1984: 41-81.
- (86) Miller EJ, Epstein EH, Jr., Piez KA. Identification of three genetically distinct collagens by cyanogen bromide cleavage of insoluble human skin and cartilage collagen. Biochem Biophys Res Commun 1971; 42(6):1024-1029.
- (87) Miller EJ, Rhodes RK. Preparation and characterization of the different types of collagen. Methods Enzymol 1982; 82 Pt A:33-64.
- (88) Mosca VS. The Foot Clubfoot (Congenital Talpis Equinovarus). In: Morrissy RT, Weinstein S, editors. Lovell and Winter's Pediatric Orthopaedics. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1153-1161.
- (89) Muir L, Laliotis N, Kutty S, Klenerman L. Absence of the dorsalis pedis pulse in the parents of children with club foot. J Bone Joint Surg Br 1995; 77(1):114-116.
- (90) Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. The collagen changes of Dupuytren's contracture. J Hand Surg [Br] 1991; 16(3):263-266.
- (91) Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. Ann Med 2001; 33(1):7-21.
- (92) Nicholls AC, De Paepe A, Narcisi P, Dalgleish R, De Keyser F, Matton M et al. Linkage of a polymorphic marker for the type III collagen gene (COL3A1) to atypical autosomal dominant Ehlers-Danlos syndrome type IV in a large Belgian pedigree. Hum Genet 1988; 78(3):276-281.
- (93) Nishino T, Miyazaki M, Abe K, Koji T, Kohno S. Antisense oligonucleotides against collagenbinding stress protein HSP47 supress peritoneal fibrosis in rats. Kidney Int 2003; Sept; 64(3):887-896.
- (94) Niyibizi C, Fietzek PP, van der RM. Human placenta type V collagens. Evidence for the existence of an alpha 1(V) alpha 2(V) alpha 3(V) collagen molecule. J Biol Chem 1984; 259(22):14170-14174.
- (95) Notbohm H, Bigi A, Roveri N, Hoch J, Acil Y, Koch MH. Ultrastructural and biochemical modifications of collagen from tissue of Morbus Dupuytren patients. J Biochem (Tokyo) 1995; 118(2):405-410.
- (96) Notbohm H, Mosler S, Bodo M, Yang C, Lehmann H, Batge B et al. Comparative study on the thermostability of collagen I of skin and bone: influence of posttranslational hydroxylation of prolyl and lysyl residues. J Protein Chem 1992; 11(6):635-643.
- (97) Notbohm H, Mosler S, Muller PK, Brinckmann J. In vitro formation and aggregation of heterotypic collagen I and III fibrils. Int J Biol Macromol 1993; 15(5):299-304.

- (98) Pandey S, Lehman WB, Kuo KN. Neglected Clubfeet/Revision Surgery. In: Simons GW, editor. The Clubfoot. New York: Springer-Verlag, 1994: 505-520.
- (99) Paton RW, Freemont AJ. A clinicopathological study of idiopathic CTEV. J R Coll Surg Edinb 1993; 38(2):108-109.
- (100) Piez KA. Molecular and Aggregate Structures of the Collagens. In: Royce PM, Steinmann B, editors. Connective Tissue and Its Heritable Disorders. New York: Wiley-Liss, 1993: 1-39.
- (101) Piez KA, Eigner EA, Lewis M. The chromatographic separation and amino acid composition of subunits of several collagens. Biochemistry 1963;(2):58-66.
- (102) Ponseti IV. Congenital clubfoot Fundamentals of treatment. Oxford: 1996.
- (103) Ponseti IV. Congenital Clubfoot: Fundamentals of Tretament. New York: Oxford University Press, 1996.
- (104) Ponseti IV, Campos J. Observations on pathogenesis and treatment of congenital clubfoot. Clin Orthop 1972; 84:50-60.
- (105) Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 1995; 64:403-434.
- (106) Rab GT. A Mathematical Model of Congenital Clubfoot. In: Simons GW, editor. The Clubfoot-The Present and a View of the Future. New York: Springer, 1994: 69-76.
- (107) Raghunath M, Bruckner P, Steinmann B. Delayed triple helix formation of mutant collagen from patients with osteogenesis imperfecta. J Biol Chem 1994;(254):2234-2243.
- (108) Ramachandran GN. Molecular Structur. In: Ramachandran GN, Reddi AH, editors. Biochemestry of Collagen. New York: Plenum, 1976: 45-84.
- (109) Ramachandran GN. Stereochemistry of collagen. Int J Pept Protein Res 1988; 31(1):1-16.
- (110) Rao N, Adams E. Collagen helix stabilisation by hydroxyproline in (Ala-Hyp-Gly)_n. Biochem Biophys Res Commun 1979;(86):654-660.
- (111) Rebbeck TR, Dietz FR, Murray JC, Buetow KH. A single-gene explanation for the probability of having idiopathic talipes equinovarus. Am J Hum Genet 1993; 53(5):1051-1063.
- (112) Robertson WW, Jr., Corbett D. Congenital clubfoot. Month of conception. Clin Orthop 1997;(338):14-18.
- (113) Robins SP. Collagen in health and disease. Edingburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone, 1982.

- (114) Robins SP, Bailey AJ. Age-related changes in collagen: the identification of reducible lysinecarbohydrate condensation products. Biochem Biophys Res Commun 1972; 48(1):76-84.
- (115) Rosenbloom J, Harsch M, Jimenez S. Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. Arch Biochem Biophys 1973; 158(2):478-484.
- Royce PM, Barnes MJ. Comparative studies on collagen glycosylation in chick skin and bone. Biochim Biophys Acta 1977; 498(1):132-142.
- (117) Sakakibara S, Inouye K, Shudo K, Kishida Y, Kobayashi Y, Prockop DJ. Synthesis of (Pro-Hyp-Gly) n of defined molecular weights. Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxypyroline. Biochim Biophys Acta 1973; 303(1):198-202.
- (118) Sano H, Uhthoff HK, Jarvis JG, Mansingh A, Wenckebach GF. Pathogenesis of soft-tissue contracture in club foot. J Bone Joint Surg Br 1998; 80(4):641-644.
- (119) Scher M, Handelsman JE, Isaacs H. The effects on muscle of immobilisation under tension and relaxation. J Bone Joint Surg Br 1977;(59):257.
- (120) Scott JE. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. Biochem J 1988; 252(2):313-323.
- (121) Shapiro F, Glimcher MJ. Gross and histological abnormalities of the talus in congenital club foot. J Bone Joint Surg Am 1979; 61(4):522-530.
- (122) Shaw EB, Steinbach HL. Aminopterin-induced fetal malformation. Am J Dis Child 1968;(115):477-482.
- (123) Silver D, Miller J, Harrison R, Prockop DJ. Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: a special example of self-assembly of rod-like monomers. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(20):9860-9864.
- (124) Simons GW. Analytical radiography of club feet. J Bone Joint Surg Br 1977; 59-B(4):485-489.
- (125) Simons GW. A standardized method for the radiographic evaluation of clubfeet. Clin Orthop 1978;(135):107-118.
- (126) Simons GW. The diagnosis and treatment of deformity combinations in clubfeet. Clin Orthop 1980;(150):229-244.
- (127) Simons GW. Complete subtalar release in club feet. Part I--A preliminary report. J Bone Joint Surg Am 1985; 67(7):1044-1055.
- (128) Simons GW. Etiological Theories of CTEV. In: Simons GW, editor. The Clubfoot-The Present and a View of the Future. New York: Springer, 1994: 3.

- (129) Sims TJ, Bailey AJ. Quantitative analysis of collagen and elastin cross-links using a singlecolumn system. J Chromatogr 1992; 582(1-2):49-55.
- (130) Smith RB. Dysplasia and the effects of soft tissue release in congenital talipes equinovarus. Clin Orthop 1983;(174):303-309.
- (131) Sodre H, Bruschini S, Magalhaes A, Lourenco A. Anomalous muscles in clubfeet. In: Simons GW, editor. The Clubfoot: The Present and a View of the Future. New York: Springer, 1993: 43-48.
- (132) Sunamoto M, Kuze K, Kita T, Doi T. Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 supress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. Lab Invest 1998 Aug;78(8):967-972.
- (133) Sykes B, Puddle B, Francis M, Smith R. The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. Biochem Biophys Res Commun 1976; 72(4):1472-1480.
- (134) Tenni R, Rimoldi D, Zanaboni G, Cetta G, Castellani AA. Hydroxylysine glycosides: preparation and analysis by reverse phase high performance liquid chromatography. Ital J Biochem 1984; 33(2):117-127.
- (135) Tenni R, Valli M, Rossi A, Cetta G. Possible role of overglycosylation in the type I collagen triple helical domain in the molecular pathogenesis of osteogenesis imperfecta. Am J Med Genet 1993; 45(2):252-256.
- (136) Torre-Blanco A, Adachi E, Hojima Y, Wootton JA, Minor RR, Prockop DJ. Temperatureinduced post-translational over-modification of type I procollagen. Effects of over-modification of the protein on the rate of cleavage by procollagen N-proteinase and on self-assembly of collagen into fibrils. J Biol Chem 1992; 267(4):2650-2655.
- (137) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology 1992; 24:145-149.
- (138) Tönnis D. Elektromyographische und histologische Untersuchungen zur Frage der Entstehung des angeborenen Klumpfußes. Z Orthop Ihre Grenzgeb 1969; 105(4):527-552.
- (139) Tönnis D. Elektromyographische und histologische Untersuchungen zur Frage der Entstehungdes angeborenen Klumpfußes. Z Orthop 1969; 105(4):595-615.
- (140) Turco VJ. Present management of idiopathic clubfoot. J Pediatr Orthop B 1994;(3):149-154.
- (141) van der Rest M., Fietzek PP. A comprehensive approach to the study of collagen primary structure based on high-performance liquid chromatography. Eur J Biochem 1982; 125(3):491-496.

- (142) van der Sluijs JA, Pruys JE. Normal collagen structure in the posterior ankle capsule in different types of clubfeet. J Pediatr Orthop B 1999; 8(4):261-263.
- (143) Vispo Seara JL, Arnold JP, Lorenz M, Krauspe R. [Arterial blood flow in congenital idiopathic clubfoot]. Z Orthop Ihre Grenzgeb 1996; 134(6):533-536.
- (144) Woodhead-Galloway J. Collagen in Health and Disease. Edingburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone, 1982.
- (145) Wynne-Davies R. Genetic and environmental factors in the etiology of talipes equinovarus. Clin Orthop 1972; 84:9-13.
- (146) Yamauchi M, Mechanic G. Collagen Volume I, Biochemistry. Boca Raton: CRC Press, 1988.
- (147) Yamauchi M, Woodley DT, Mechanic GL. Aging and cross-linking of skin collagen. Biochem Biophys Res Commun 1988; 152(2):898-903.
- (148) Yang CL, Rui H, Mosler S, Notbohm H, Sawaryn A, Muller PK. Collagen II from articular cartilage and annulus fibrosus. Structural and functional implication of tissue specific posttranslational modifications of collagen molecules. Eur J Biochem 1993; 213(3):1297-1302.
- (149) Zimny ML, Willig SJ, Roberts JM, D'Ambrosia RD. An electron microscopic study of the fascia from the medial and lateral sides of clubfoot. J Pediatr Orthop 1985; 5(5):577-581.

7. Anhang

7.1. Patientenliste

Referenzen

<u>Nr.</u>	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose Seit	te
1	R 5	R.S. (w)	11.12.97	25.12.97	14 Tage	V.a. SIDS	
2	R 3	H.V. (w)	19.12.97	16.01.98	1 Mon	V.a. SIDS	
3	R 6	Z.Z. (w)	05.12.97	13.01.98	1 Mon	V.a. SIDS	
4	R 7	W.M. (w)	02.01.98	01.03.98	2 Mon	V.a. SIDS	
5	R 9	B.J. (w.)	17.11.97	10.03.98	4 Mon	V.a. SIDS	
6	R 1	D.J. (w)	17.07.97	26.12.97	5 Mon	V.a. SIDS	
7	R 2	E.S. (w)	18.04.97	18.01.98	9 Mon	ZRV bei SHT	
8	R 4	H.N. (m.)	12.02.97	31.12.97	10 Mon	V.a. SIDS	
9	R 8	K.A. (w)	01.02.97	07.03.98	13 Mon	Pneumonie	
10	R11a	R.J. (w)	08.01.97	30.03.98	14 Mon	Pneumonie	
11	R11b	R.J. (w)	08.01.97	30.03.98	14 Mon	Pneumonie	
12	R10	S.A. (w)	29.07.96	20.03.98	15 Mon	ZRV	
13	R12a	W.K. (w)	27.08.95	01.04.98	2;8 Jahre	Infektion	
14	R12b	W.K. (w)	27.08.95	01.04.98	2;8 Jahre	Infektion	

Patienten mit Typ II Klumpfuß nach Diméglio

Nr.	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
15	KF 22	P. S. (w)	08.09.95	13.06.96	9 Mon	kong. KF li	li
16	KF 72	H.M. (w)	09.03.97	12.09.97	6 Mon	kong. KF bds	li
17	KF 72	H.M. (w)	09.03.97	12.09.97	6 Mon	kong. KF bds	re
18	KF 86	L.K. (m)	03.02.97	18.11.97	9 Mon	kong. KF re	re
19	KF 94	R.J. (m)	16.07.97	05.03.98	8 Mon	kong. KF li	li

männliche Patienten mit Typ III Klumpfuß nach Diméglio

Nr.	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
20	KF 13	L.N.	11.10.95	13.05.96	7 Mon	kong. KF li	li
21	KF 62	F.K.	19.10.96	17.06.97	8 Mon	kong. KF bds	li
22	KF 69	F.F.	16.03.97	12.08.97	5 Mon	kong. KF bds	re
23	KF 81	W.J.	01.03.97	16.10.97	4 Mon	kong. KF re	re
24	KF 89	H.D.	06.05.97	15.01.98	8 Mon	kong. KF li	li
25	KF 78	H.M.	03.01.97	14.10.97	9 Mon	kong. KF	re
26	KF 82	A.C.	01.03.97	21.10.97	5 Mon	kong. KF bds	1.
27	KF 82	A.C.	01.03.97	21.10.97	5 Mon	kong. KF bds	2.

<u>Nr.</u>	ID	Name	geboren	Operation	<u>Op-Alter</u>	Diagnose	Seite
28	KF 9	D.L.	11.08.95	16.04.96	8 Mon	kong. KF li	li
29	KF 40	S.A.	31.08.95	28.10.96	15 Mon	kong. KF re	re
30	KF 63	H.N.	13.09.96	19.06.97	9 Mon	kong. KF re	re
31	KF 96	S.M.	17.09.97	06.03.98	6 Mon	kong. KF re	re

weibliche Patienten mit Typ III Klumpfuß nach Diméglio

männliche Patienten mit Typ IV Klumpfuß nach Diméglio

Nr.	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
32	KF 42	C.C.	22.04.96	21.11.96	7 Mon	kong. KF re	re
33	KF 50	G.M.	12.05.96	20.01.97	8 Mon	kong. KF bds	re
34	KF 64	K.R.	03.12.96	02.07.97	7 Mon	kong. KF re	re
35	KF 97	S.D.	19.09.97	06.03.98	6 Mon	kong. KF bds	1.
36	KF 97	S.D.	19.09.97	06.03.98	6 Mon	kong. KF bds	2.

weibliche Patienten mit Typ IV Klumpfuß nach Diméglio

Nr.	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
38	KF 12	H.V. (w)	02.09.95	09.05.96	7 Mon	kong. KF bds	re
39	KF 12	H.V. (w)	02.09.95	09.05.96	7 Mon	kong. KF bds	li

Patienten mit Rezidivklumpfuß

Nr.	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
40	KF 57	N.D. (w)	21.11.92	15.04.97	4;5 Jahre	Rezidiv re	re
41	KF 59	H.D. (m)	17.02.92	21.04.97	5;2 Jahre	Rezidiv li	li
42	KF 65	S.J. (w)	22.08.92	02.07.97	4;11 Jahre	Rezidiv bds	li
43	KF 92	S.J. (w)	22.08.92	17.02.98	5;6 Jahre	Rezidiv bds	re
44	KF 83	H.V. (w)	02.09.95	06.11.97	2;6 Jahre	Rezidiv li	li

Unbehandelter Klumpfuß_("neglected clubfood")

<u>Nr.</u>	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
37	KF 58	P.V. (m)	18.10.89	20.09.96	7;6 Jahre	kong. KF bds	re

Patient mit Plattfuß

<u>Nr.</u>	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
45	KF 77	A.M. (m.)	29.08.92	07.10.97	5;2 Jahre	Plattfuß	li

Patienten mit neurogenem Klumpfuß

Nr.	ID	Name	geboren	Operation	Op-Alter	Diagnose	Seite
46	KF 99	K.O. (m)	01.12.95	19.03.98	2;3 Jahre	neurog. KF	ods 1.
47	KF 99	K.O. (m.)	01.12.95	19.03.98	2;3 Jahre	neurog. KF	ods 2.

7.2. Chemikalienliste

Acetonitril	Fa. Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamid	Fa. Roth, Karlsruhe
APS	Fa. Roth, Karlsruhe
Baker-Wasser	Fa. Baker, Deventer, Niederlande
β–Mercaptoethanol	Fa. BioRad, München
Bromphenol-blau 0,25%	Fa. Biomol, Hamburg
CF 1	Fa. Whatman, Springfield Mill Maidstone, England
Coomassie (w/v)	Fa. BioRad, München
Dimethylaminobenzaldehyd	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Eisessig	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Ethanol	Fa. Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fa. Biomol, Hamburg
Glycin	Fa. Biomol, Hamburg
HC1	Fa. Roth, Karlsruhe
Heptafluorbuttersäure	Fa. Sigma, St. Louis, USA
КОН	Fa. Roth, Karlsruhe
Methanol	Fa. Sigma, St. Louis, USA
NaBH ₄	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Ninhydrin	Fa. Biomol, Hamburg
Pepsin	Fa. Boehringer, Mannheim
Perchlorsäure	Fa. Aldrich, Steinheim
Polyacrylamid	Fa. BioRad, München
SDS	Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
Standard HP	Institut für Molekularbiologie, MUzL, Lübeck
Standard Aminosäuren	Fa. Sigma, Deisenhofen
Standards Cross-links	Institut für Molekularbiologie, MUzL, Lübeck
Standard-Zucker	Institut für Molekularbiologie, MUzL, Lübeck
TEMED	Fa. BioRad, München
Tris-HCl	Fa. Biomol, Hamburg

Antikörper für Immunhistologie

Primärantikörper:

anti-Kollagen Typ I (Kaninchen); gegen foetale Kalbshaut, Verdünnung 1:1500 (Medizinische Molekularbiologie; MUzL) anti-Kollagen Typ III (Kaninchen); gegen foetale Kalbshaut Verdünnung 1:10000 (Medizinische Molekularbiologie; MUzL) anti-Kollagen Typ V (Kaninchen); gegen humane Placenta; Verdünnung 1:1000 (Medizinische Molekularbiologie; MUzL) anti-Fibrillin-1 –mAb 201- (Maus); gegen humane Haut; Verdünnung 1:100 (Arbeitsgruppe Fibrillin (D. Reinhardt, PhD), Shriners Hospitals for Children; Portland USA)

Sekundärantikörper:

Schwein anti-Kaninchen IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat; Dako, Glostrup, DK Verdünnung 1:3000 Ziege anti-Maus IgG- alkalische Phosphatase-Konjugat; Dako, Glostrup, DK Verdünnung 1:50

Puffer und Lösungen

PBS-Puffer	85,00 g	NaCl
	0,20 g	KCl
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	2,00 g	KH ₂ PO ₄
	1,67 g	Ca ₂ Cl
	1,00 g	MgCl ₂
	0,10 g	Rinderserumalbumin
Reduktionspuffer	0,025M	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
	0,15 M	NaCl

SDS-PAGE

Laufpuffer

0,2M Glycin; 0,025 M Tris-HCl; 1% SDS (w/v)	
1,0 M Tris/HCl, pH 6,8: 10% SDS (w/v):	6,25 ml; 25 ml;
Glycerol 100%:	10 ml;
Bromphenol-blau 0,25%	3,75 ml;
H_2O :	17,5 ml;
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 ml
30% Polyacrylamid	4 ml
H_2O	10,35 ml
10% SDS	0,4 ml
TEMED	30 µl
10% APS	220 µl
	0,2M Glycin; 0,025 M Tris-HCl; 1% SDS (w/v) 1,0 M Tris/HCl, pH 6,8: 10% SDS (w/v): Glycerol 100%: Bromphenol-blau 0,25% H ₂ O: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 30% Polyacrylamid H ₂ O 10% SDS TEMED 10% APS

Sammelgel 4% (für 20ml)	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8 30% Polyacrylamid H ₂ O 10% SDS (w/v) TEMED 10 % APS	2,5 ml 2,67 ml 14,06 ml 0,4 ml 48 µl 320 µl			
Hydroxyprolinbestimmung					
Chloramin T Lösung	Chloramin T H ₂ O (Baker) Puffer	70 mg 1 ml 5 ml			
Chloramin T Puffer:	Natriumacetat Natriumcitrat Citronensäure 2-Propanol auffüllen mit Baker-Wasser	34,38 g 42,73 g 6,02 400 ml auf 1 1			
Ehrlichs Reagenz:	Dimethylaminobenzaldehyd 2-Propanol Perchlorsäure 60%	1,525 g 12,71 ml 2,29 ml			
Propanol/H ₂ O-Gemisch:	2-Propanol Baker-Wasser	10 ml 5 ml			
Chromatographie					
FPLC Startpuffer	0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 0,2 M NaCl; 2 M Harnstoff	8,6;			
HP/LP Analysen via Fluoreszenz: Puffer A: Puffer B:	0,22%HBFA in Baker-Wasser 80% Acetonitril; 0,22% HBFA				
Gradient (PufferB): 124. min 2429. min 3034. min 3440. min 4043. min	Puffer B steigt linear von 16% auf 2 Puffer B steigt linear von 24% auf 1 Puffer B bei 100% Puffer B fällt auf 16% Puffer B bei 16%	24% 00%			
Elutionspuffer	Eisessig 1 ml Wasser 1 ml n-Butanol 4 ml				

7.3. Geräte

Aminosäureanalyzer, 6300 Amino Acid Analyzer, Beckmann, München Anionenaustauschersäule, Bio-Scale DEAE 20, Bio-Rad, München Dialyseschläuche, Roth, Karlsruhe Econo-Säule Polyprop, 4 x 0,8 mm, Fa. BioRad, München Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden FPLC Systems (FPLC-Pumpe P-500, Gradientprogrammierer GP-250 Plus, Gefriertrocknungsanlage Alpha I/6, Christ, Osterode Gelair Drying Systems, Fa.Bio-Rad, München HPLCChromatographie Datensystem Version 5.30, Fa. Gynkotek, Germing HPLC Fluoreszenzdetektion Fluorescence HPLC-Monitor RF 1002, Gynkotek, Ismaningen HPLC-Pumpe Modell 480, Fa.Gynkotek, Germing HPLC-Pumpe, Modell 300; Fa.Gynkotek, Germing HPLC-Säule Inerstil ODS-2; 125 x 4,6 mm; 5 µm Partikelgröße; VDS optilab, Montabaur Kationenaustauschersäule Dowex 50 W-X8, Fa. BioRad, Richmond CA, USA Kryoröhrchen, Fa. Corning, Cambridge, UK Kryoröhrchen, Sarstedt, Nümbrecht Mikrowaage, Fa. Sartorius Power Supply 2301; Macrodrive 1; Fa. Bromma Reinstwasseranlage, Purelab Plus, UFS Seral, Ransbach-Baumbach) Speedvac (SpeedVac plusSC 110 AR; Universal Vakuum System Plus UVS 400 A; Fa. Savant, New York, USA) Ultracentrifuge; L8-55 ,Rotor R45 Ti, Fa. Beckmann, München Ultraspec 3000, UV-Photometer, Fa. Pharmacia Biotech UV-Photometer (LKB Uvicord SD, Pharmacia, Uppsala, Schweden) Vortex-Genie K 550-GE, Fa. Medica, Lausanne, Schweiz

7.4. Chromatogramme

Aminosäureanalyse des Klumpfußes Nr. 37:





Aminosäureanalyse Referenz Nr. 2:



Aminosäureanalyse des Pellets des Klumpfußes Nr. 18:



Aminosäureanalyse des Pellets der Referenz Nr. 12:

DP Integration Kalibration von HP und LP		SYS	51 - C:HP19980	4.SMP		1998-04-18712:30			
Kai 048 KF89			CHNL_1	L		1998-04-17 GynkoSoft V5.50			
Smp. Samp] Acguis Metho	No/Pos: 2 e Type: sition: d:	28/20 Integration 1998-04-17/1	6:50 R	ontrol: TEST. ignals: TEST. eport: -Table: TEST.	PGM SIG TAB		Standard Inject: Dil. Fac Weight:	d: External 100 0 uL ct.: 5.00000 1.00000	
110	00 <u>m</u> V							CHNL_1 397 nm	
8	00 -			jahoxypyri di no			- /~~^	1	
60	- 00			21700 H dinolin			ľ		
40 20			- <u>^</u>	73 18.62 Lysylpyri	1 4 24.49				
-10	0.0	5.0	10.0 15.0	20.0	25.0	30.0	35.0		
No.	Ret. T min	Peak Name	Area mV*min	Amount pMol/Probe	Туре	Height	Rel Are		
1200+15	2.54 17.08 18.62 24.49 33.71	Hydroxypyr Lysylpyrid	9.613e+0 id 2.730e+2 in 6.434e+0 2.553e+0 1.473e+2	^{327.922} .750	BMB BMB BMB BMB	106.26 604.92 15.92 407.47	62.201 62.201 1.466 33.561		
		Total Sums	4.388e+2	335.672		1142.53	100.000		

HP / LP Analyse des Klumpfußes Nr. 24:

DP.Integration Kalibration von HP und LP		SYS1	SYS1 - C:HP199804.SMP			Page 27 1998-04-18/12:28			
Kaj 041 Modified. R2				CHNL_1		1998-04-17 GynkoSoft V5.50			
Smp. 1 Samp]e Acquis Method	No/Pos: 2 e Type: sition: 2 d:	21/13 Integration 1998-04-17/11:3	8 Rej P-	ntrol: TEST gnals: TEST port: Table: TEST.	PGM SIG TAB		Standard Inject: Dil. Fac Weight:	1: Ext 10 ct.: 5.(1.(ernal 0000 0000 00000
110 100	00 <u>mu</u>			olin			83.71	CHNL 397	1 nm
80	- 00			ydroxypyri di n			m	1	
6 (- 00			2 12 86 H linolin					
4(- 00			usyl pyrid			/		
20		, , ,		23 19.18					
-10	»	50 100	150		25.0		25 0	mi	
No.	Ret. T min	Peak Name	Area mV*min	Amount pMol/Probe	Type	Height	Rel Are	40.0	43.2
	2.54 17.56 19.18 33.71	Hydroxypyrid Lysylpyridin	1.017e+1 2.935e+2 5.885e+0 1.841e+2	353.066 7.136	BMB BMB BMB BMB BMB BMB BMB	109.21 648.27 429.28	2.059 59.453 37.296		
		Total Sums	4.937e+2	360.202		1202.45	100.000		

HP / LP Analyse der Referenz Nr. 7:

Quervernetzungsanalyse mit Ninhydrin über den Aminosäureanalyser des

Rezidivklumpfußes Nr.: 42:





Quervernetzungsanalyse mit Ninhydrin über den Aminosäureanalyser der Referenz Nr.



Zuckeranalyse des Klumpfußes Nr. 32:



Zuckeranalyse der Referenz Nr. 7:
7.5. Statistik

I. Mann Whitney Test: Referenzen gegen Klumpfüße:

	% TG	HYPRO	HYL/HYP	GGH	GH	HP	LP	HHL	PELLET
Mann-Whitney-U	21,500	1,500	53,000	39,000	72,000	43,000	128,500	51,000	,000
Wilcoxon-W	321,500	254,500	158,000	94,000	127,000	374,000	233,500	156,000	21,000
Z	-4,434	-4,951	-3,278	-2,684	-1,232	-,135	-,623	-3,342	-3,464
Asymptotische	,000,	,000	,001	,007	,218	,893	,533	,001	,001
Signifikanz (2-seitig	g)								
Exakte Signifikanz	,000	,000	,001	,006	,231	,907	,538	,001	,000
[2*(1-seitig Sig.)] a Nicht für Bindung b Gruppenvariable:	en korrig KFTYP	giert. 2							

II. Kruskal-Wallis- Test für Referenzen und Klumfußtyp 2-4:

	% TG	HYPRO	HYL/HYP	GGH	GH	HP	LP	HHL	PELLET
Chi-Quadrat	20,614	25,199	10,946	9,449	2,037	2,045	1,317	11,682	13,085
df	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Asymptotische Signifikanz	,000	,000	,012	,024	,565	,563	,725	,009	,004
a Kruskal-Wallis- b Gruppenvariable	Test e: TYP								

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Hier ist zuerst mein Lehrer Prof. Dr. Krauspe zu nennen, der mir dieses interessante Projekt ermöglicht hat. Er hatte immer ein offenes Ohr und stand mir mit Rat und Tat bei so manchen Schwierigkeiten zur Seite. Besonders geschätzt habe ich die von ihm gewährte Freiheit im Rahmen meiner Promotion auch eigene Wege gehen zu dürfen. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Peter Raab bedanken, der die Arbeit vom ersten Tag an freundschaftlich und mit seinem fachlichen Rat betreut hat.

Diese Arbeit wäre in ihrem Umfang und Ergebnissen ohne die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für medizinische Molekularbiologie der Universität Lübeck nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt hier Prof. Dr. Müller, der mich wie selbstverständlich in sein Team aufgenommen und gefördert hat. Dr. Ulrike Stahl möchte ich für ihre nette, hilfsbereite und kompetente Betreuung bei meinen Experimenten danken.

Danken möchte ich Herrn Fietzek. Sein unerschöpfliches Wissen und seine Erfahrung in der Kollagenforschung, die ständigen Gespräche und Anregungen über die Jahre der Zusammenarbeit fließen in diese Arbeit ein. Es war mir eine Ehre und gleichsam eine große Freude mit Ihnen zusammengearbeitet zu haben.

Mein Dank gilt auch Dr. Ronneberger aus der Rechtsmedizin der Universität Erlangen, der die Referenzpräparate zur Verfügung stellte.

Der größte Dank kommt meiner Familie zu, die mich zu jeder Zeit vertrauensvoll unterstützt. Insbesondere meine Frau Birgit hat mir auch in stürmischen Zeiten immer liebevoll den Rücken frei gehalten.

Abstract

Die Ätiologie des kongenitalen Klumpfußes ist noch immer unklar. Die vorliegende Arbeit charakterisiert Kollagene im Bereich des Ligamentum deltoideum beim kongenitalen Klumpfuß im Vergleich zu "altersgematchten" gesunden Kontrollen, um so die Pathogenese der medioplantaren Weichteilkontraktur (retracting fibrosis) weiter aufzuklären.

Die Arbeit umfasst 14 gesunde Füße, 23 kongenitale Klumpfüße, fünf Rezidivklumpfüße, zwei neurogene Klumpfüße, einen unbehandelten Klumpfuß ("neglected clubfoot") sowie einen Plattfuß.

Die histologische Auswertung zeigt beim kongenitalen Klumpfuß einen Verlust der räumlichen Ordnung der Kollagenfibrillen. Die immunhistochemischen Untersuchungen weisen Typ I, III und V Kollagen ohne eine besondere Häufung eines Typs an einem bestimmten Ort nach.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) der pepsinlöslichen Kollagene zeigt, dass beim kongenitalen Klumpfuß, genau wie bei den Referenzen, ein hoher Anteil an Kollagen I, etwas Kollagen III und wenig Kollagen V vorhanden sind. Das Bandenmuster und damit die Helixbildung ist unverändert.

In der Elektronenmikroskopie kommt beim idiopathischen Klumpfuß eine intakte Fibrillenbildung ohne Variation des Fibrillendurchmessers bei Verlust der streng parallelen Ausrichtung zur Darstellung. Bei älteren Kindern mit Rezidivklumpfüßen findet sich eine Zunahme der Fibrillendicke.

Der Anteil des Kollagens am Trockengewicht und der Anteil des Kollagens am Gesamtprotein sind beim idiopathischen Klumpfuß im Vergleich zu den Kontrollen hoch signifikant verringert.

Die auf zellulärer Ebene modulierbaren posttranslationalen Modifikationen, die Hydroxylierung von Lysinresten und die Glykosylierung von Hydroxylysinresten steigen beim idiopathischen Klumpfuß im Vergleich zum normalen Fuß und zum neurogenen Fuß signifikant an. Dies führt zu einer Änderung von biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften des Bindegewebes. Dieser Anstieg ist ebenfalls beim unbehandelten Klumpfuß zu finden. Die Ouervernetzung Histidinohydroxylysinonorleucin (HHL) steigt beim kongenitalen Klumpfuß, ähnlich wie bei neurogenen Klumpfüßen, im Vergleich zu den Kontrollen signifikant an. Die Quervernetzungen Hydroxylysyl-Pyridinolin (HP) und Lysyl-Pyridinolin (LP), die beim idiopathischen Klumpfuß gegenüber dem Normalfuß leicht erhöht sind, sind beim neurogenen Klumpfuß stark erniedrigt. Bei den Rezidivklumpfüßen und dem "neglected clubfoot" finden sich dagegen ein sehr stark erhöhter Quervernetzungsgrad.

Die präsentierten Daten zeigen vor dem Hintergrund der Hypothese einer "retracting fibrosis" erstmalig spezifische Unterschiede im Gehalt an Kollagen und der posttranslationalen Modifikation des Kollagens im Bereich des Ligamentum deltoideum beim kongenitalen Klumpfuß im Vergleich zum normalen Fuß. Zudem besteht ein hoher Grad an Lysinoxidase abhängigen Quervernetzungen. Diese Veränderungen scheinen primär zu sein.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse tragen zum Verständnis der Pathogenese des idiopathischen Klumpfußes bei. Die Veränderungen des Kollagens stellen einen Ansatz zur weiteren Aufklärung der Ätiologie der Klumpfußdeformität dar. Die "retracting fibrosis" des medioplantaren Kapsel-Band-Komplexes sollte ein exponierter Angriffspunkt der konservativen und operativen Behandlung des kongenitalen Klumpfußes sein.

Lebenslauf

Name	Kai-Michael Wess
Anschrift	Am Schwalbenberg 10, 40627 Düsseldorf
Familienstand	verheiratet, 1 Kind
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum/ -ort	19.12.1972 in Fulda

Schule

Zivildienst	
08/1980 - 06/1984	Cuno-Raabe Schule Fulda (Grundschule)
08/1984 - 06/1992	Winfriedschule Fulda (Gymnasium) Abschluss: allgemeine Hochschulreife

07/1992 - 08/1993	Städtisches Klinikum Fulda
	Abteilung für Unfallchirurgie/Orthopädie (Prof. Dr. O. Wörsdörfer)

Studium

11/2000	Ärztliche Prüfung				
10/1999 - 11/2000	Praktisches Jahr: Universitätskliniken Düsseldorf (Innere Medizin/Chirurgie), Harvard Medical School (Orthopädische Chirurgie)				
09/1999	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung				
04/1998 - 02/1999	Kollagenforschung im Institut für Medizinische Molekularbiologie, Universität zu Lübeck				
04/1998	Forschungsstipendium des "Vereins zur Förderung orthopädischer Mittel" Würzburg				
08/1997	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung				
10/1995 - 07/1999	Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg				
09/1995	Physikum				
10/1993 - 10/1995	Studium an der Medizinischen Universität zu Lübeck				

ärztliche Weiterbildung

07/2009 bis dato	Assistenzarzt im Zentrum für Unfallchirurgie und Orthopädische Chirurgie HELIOS Klinikum Wuppertal (Prof. Dr. A. Dávid)
10/2004 - 06/2009	Assistenzarzt in der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universitätskliniken Düsseldorf (Prof. Dr. R. Krauspe)
11.06.2008	Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie
10/2002 - 09/2004	Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar München (Prof. Dr. Dr. R. Siewert)
01/2001 - 07/2002	Arzt im Praktikum in der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universitätskliniken Düsseldorf (Prof. Dr. R. Krauspe)

Düsseldorf, 01.08.2009