

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker

## **Expressionsanalyse humaner Fibrochondrozyten in Zellkultur**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Gülseren Güzel, geb. Uzunmehmetoglu  
aus Arakli/ Türkei

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Weise

Meinen Eltern



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die Menisken .....	2
1.1.2. Ultrastruktur und Biochemie des Meniskus .....	4
1.2. Meniskusschäden .....	7
1.2.1. Degenerative Läsionen .....	8
1.2.2. Traumatische Läsionen .....	8
1.3. Therapiemöglichkeiten .....	9
1.3.1. Meniskektomie .....	9
1.3.2. Meniskusrefixation .....	10
1.3.3. Meniskusersatz .....	10
1.3.4. Tissue Engineering .....	13
1.4. Aufgabenstellung der Arbeit .....	14
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1. Material .....	15
2.1.1. Gewebe .....	15
2.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Medien .....	16
2.1.3. Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.4. Antikörper .....	19
2.1.5. Geräte .....	20
2.2. Methoden .....	21
2.2.1. Zellkulturmethoden .....	21
2.2.1.1. Allgemeines .....	21
2.2.1.2. Anlegen der Primärkultur von Fibrochondrozyten aus humanen Meniskusbiopsaten .....	21
2.2.1.3. Aufbereitung des FCS .....	22
2.2.1.4. Herstellung des Vollmediums .....	22
2.2.1.5. Mediumwechsel .....	23
2.2.1.6. Subkultivierung der Zellen .....	23
2.2.1.7. Zellzahlbestimmung .....	24

---

2.2.1.8. Zellaussaat .....	24
2.2.1.9. Zellaussaat für Immunhistochemie .....	25
2.2.2. Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen .....	25
2.2.2.1. Prinzip der Immunhistochemie.....	25
2.2.2.2. Protokoll der Immunhistochemie.....	26
2.2.3. RT-PCR .....	27
2.2.3.1. RNA-Extraktion .....	27
2.2.3.3. cDNA-Synthese .....	28
2.2.3.4. PCR .....	29
2.2.3.5. Nachweis der amplifizierten Produkte mittels der Gelelektrophorese .....	31
<b>III. Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1. Optimierung der Zellkultur .....	33
3.2. RT/PCR.....	34
3.2.1. Synthese der cDNA .....	35
3.2.2. PCR .....	36
3.2.2.1. Kollagen Typ-I ( $\alpha$ 1) .....	36
3.2.2.2. Kollagen Typ-II.....	37
3.2.2.3. Kollagen Typ-III.....	38
3.2.2.4. Kollagen Typ-VI .....	39
3.2.2.5. Kollagen Typ-X .....	40
3.2.2.6. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) .....	41
3.2.2.7. Acidic Fibroblast Growth Factor (FGF-1, ECGF) .....	42
3.2.2.8. Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2).....	43
3.2.2.9. Transforming Growth Factor $\beta$ -1 (TGF $\beta$ -1).....	44
3.2.2.10. Insulin-like Growth Factor I und II (IGF-I und -II).....	46
3.2.2.11. Platelet Derived Growth Factor AB (PDGF-AB).....	47
3.2.2.12. Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) .....	48
3.2.2.13. Inducible Nitric Oxid Synthase (iNOS) .....	49
3.2.2.14. Matrix Metalloproteinase I (MMP-I).....	50
3.2.2.15. Matrix Metalloproteinase III (MMP-III).....	51

---

3.2.2.16. Matrix Metalloproteinase XIII (MMP-XIII) .....	52
3.3. Immunhistochemische Zellcharakterisierung .....	54
3.3.1. Einleitung .....	54
3.3.2. AS02 .....	54
3.3.3. Kollagen Typ-I.....	55
3.3.4. Kollagen Typ-II.....	56
3.3.5. CD11b.....	57
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	58
<b>IV. Diskussion.....</b>	<b>60</b>
4.1 Einführung.....	60
4.2. Beurteilung der Methoden.....	62
4.2.1. Zellkultur .....	62
4.2.2. PCR .....	62
4.2.3. Immunhistochemie .....	63
4.3. Beurteilung der Ergebnisse.....	64
4.3.1. Zellkultur .....	64
4.3.2. PCR .....	65
4.3.2.1. Kollagen Typ-I ( $\alpha$ 1) .....	65
4.3.2.2. Kollagen Typ-II.....	65
4.3.2.3. Kollagen Typ-III.....	66
4.3.2.4. Kollagen Typ-VI .....	67
4.3.2.5. Kollagen Typ-X .....	68
4.3.2.6. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) .....	68
4.3.2.7. Acidic und Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-1, FGF-2) ..	70
4.3.2.8. Transforming Growth Factor 1 (TGF- $\beta$ 1) .....	71
4.3.2.9. Insulin-like Growth Factor I und II (IGF-1, IGF-II).....	73
4.3.2.10. Platelet-Derived Growth Factor AB (PDGF-AB).....	74
4.3.2.11. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2).....	75
4.3.2.12. Inducible Nitric Oxid Synthase (iNOS) .....	77
4.3.2.13. Matrix Metalloproteinasen 1, -3 und -13 (MMP-1, -3, -13) ....	78
4.3.3. Immunhistochemie.....	80

---

4.3.3.1. AS02 .....	80
4.3.3.2. CD11b .....	80
4.3.3.3. Kollagen Typ-I.....	81
4.3.3.4. Kollagen Typ-II.....	81
4.4. Conclusio .....	81
<b>V. Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>VII. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
<b>VIII. Danksagung .....</b>	<b>105</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Kniegelenk und Menisken von proximal (aus Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 2, 21. Auflage, Urban und Fischer, 2000)..	3
<b>Abbildung 2:</b> Arterielle Versorgung der Menisken (aus Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 2, 21. Auflage, Urban und Fischer, 2000).	4
<b>Abbildung 3:</b> Struktur der Kollagenfasern im Meniskus (aus Petersen et al., 1998).....	6
<b>Abbildung 4:</b> Auswachskultur von Meniskuszellen des Patienten 8KB. 13 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung.....	33
<b>Abbildung 5:</b> Konfluente erste Subkultur von Meniskuszellen des Patienten 8KB. 25 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung.....	34
<b>Abbildung 6:</b> RT-PCR Nachweis von G3PDH aller elf untersuchten Zellkulturen. ....	35
<b>Abbildung 7:</b> RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-I von allen untersuchten Zellkulturen. ....	37
<b>Abbildung 8:</b> RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-II aller untersuchten Zellreihen. ....	37
<b>Abbildung 9:</b> RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-III bei allen untersuchten Zellreihen.....	38
<b>Abbildung 10:</b> RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-VI bei allen untersuchten Zellreihen.....	40
<b>Abbildung 11:</b> RT-PCR von Kollagen Typ-X bei allen untersuchten Zellreihen.....	41
<b>Abbildung 12:</b> RT-PCR Nachweis vom Primer VEGF bei allen untersuchten Zellreihen.....	42
<b>Abbildung 13:</b> RT-PCR Nachweis vom Primer FGF-1 bei allen untersuchten Zellreihen.....	43
<b>Abbildung 14:</b> RT-PCR Nachweis vom Primer FGF-2 bei allen untersuchten Zellreihen.....	44
<b>Abbildung 15:</b> RT-PCR Nachweis vom Primer TGF $\beta$ -1 bei allen untersuchten Zellreihen.....	45

---

<b>Abbildung 16:</b> RT-PCR Nachweis von den Primern IGF-I und -II .....	46
<b>Abbildung 17:</b> RT-PCR vom Primer PDGF-AB bei allen untersuchten Zellreihen .....	47
<b>Abbildung 18:</b> RT-PCR Nachweis vom Primer BMP-2 bei allen untersuchten Zellreihen .....	48
<b>Abbildung 19:</b> RT-PCR von iNOS bei elf Patientenproben .....	49
<b>Abbildung 20:</b> RT-PCR vom Primer MMP-I bei elf Patientenproben .....	50
<b>Abbildung 21:</b> RT-PCR vom Primer MMP-III bei elf Patientenproben .....	52
<b>Abbildung 22:</b> RT-PCR Nachweis vom Primer MMP-XIII bei elf Patientenproben.....	53
<b>Abbildung 23:</b> Meniskuszellen des Patienten 8KB inkubiert mit AS02 Antikörpern. 27 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Anfärbung der Zellen .....	55
<b>Abbildung 24:</b> Meniskuszellen des Patienten 8ER inkubiert mit Kollagen-I- Antikörpern. 29 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Anfärbung der Zellen .....	56
<b>Abbildung 25:</b> Meniskuszellen des Patienten 8KB inkubiert mit Kollagen II Antikörpern. 26 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Anfärbung der Zellen .....	57
<b>Abbildung 26:</b> Meniskuszellen des Patienten 8EK inkubiert mit CD11b Antikörpern. 27 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Keine Anfärbung der Zellen .....	58

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Patientendaten. Verschlüsselungscode, Alter, Geschlecht, Diagnosen und Begleitmedikation der Spender .....	15
<b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung der Reagenzien zur Durchführung der Gelelektrophorese .....	31
<b>Tabelle 3:</b> Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-I. ....	36
<b>Tabelle 4:</b> Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-II .....	37
<b>Tabelle 5:</b> Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-III .....	39
<b>Tabelle 6:</b> Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-VI.....	40
<b>Tabelle 7:</b> Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-X.....	41
<b>Tabelle 8:</b> Ergebnisse der RT-PCR für VEGF .....	42
<b>Tabelle 9:</b> Ergebnisse der RT-PCR für FGF-1 .....	43
<b>Tabelle 10:</b> Ergebnisse der RT-PCR für FGF-2.....	44
<b>Tabelle 11:</b> Ergebnisse der RT-PCR für TGF- $\beta$ 1 .....	45
<b>Tabelle 12:</b> Ergebnisse der RT-PCR für IGF-II und IGF-II .....	46
<b>Tabelle 13:</b> Ergebnisse der RT-PCR für PDGF-AB .....	47
<b>Tabelle 14:</b> Ergebnisse der RT-PCR für BMP-2 .....	48
<b>Tabelle 15:</b> Ergebnisse der RT-PCR für iNOS.....	50
<b>Tabelle 16:</b> Ergebnisse der RT-PCR für MMP-I.....	51
<b>Tabelle 17:</b> Ergebnisse der RT-PCR für MMP-III.....	52
<b>Tabelle 18:</b> Ergebnisse der RT-PCR für MMP-XIII .....	53
<b>Tabelle 19:</b> Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit AS02.....	55
<b>Tabelle 20:</b> Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Kollagen Typ-I .....	56
<b>Tabelle 21:</b> Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Kollagen Typ-II .....	57
<b>Tabelle 22:</b> Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD11b .....	58
<b>Tabelle 23:</b> Bisheriger Nachweis von Kollagenen und Wachstumsfaktoren im humanen und tierischen Meniskus .....	85

# I. Einleitung

Weltweit stellt die Arthrose die häufigste Gelenkerkrankung dar. Mehr als 10% der über 65-Jährigen weisen eine symptomatische Gonarthrose auf.

Die Bedeutung des Meniskus bei der Entstehung einer Gonarthrose ist lange Zeit nicht erkannt worden, da die Menisken lediglich als ein entwicklungs-geschichtlich funktionsloser Überrest eines Muskels der unteren Extremität betrachtet wurden. Infolgedessen erfolgte noch bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts bei jeglicher Form von Meniskusrupturen die Meniskektomie, da sich hierunter zunächst die Beschwerdefreiheit der Patienten mit kurzfristig geringen Rezidivraten erzielen ließ (Jackson 1968). Dies änderte sich erst, als Langzeitergebnisse nach Meniskektomien eine wesentlich erhöhte Arthroserate im operierten Kniegelenk offenbarten (Tapper et al., 1969). Seitdem wird versucht, den Meniskus durch mittlerweile minimal-invasive, arthroskopische Eingriffe nach Rupturen möglichst vollständig zu erhalten. Vermieden werden kann eine Resektion meist jedoch lediglich im äußeren, kapselnahen Drittel des Meniskus, wo die Heilungskapazitäten aufgrund der besseren Vaskularisierung des Gewebes wesentlich günstiger sind, während die zentralen, avaskulären Anteile nach Rupturen durch eine Resektion behandelt werden, da hier die endogene Heilungsfähigkeit des Gewebes aufgrund der schlechteren Durchblutung wesentlich eingeschränkt sind (Arnoczky et al., 1983). Infolge der Resektion geht die chondroprotektive Eigenschaft der Menisken verloren und das Risiko für spätere Knorpelschäden und die Entwicklung einer Gonarthrose wird hierdurch beachtlich erhöht. Der Meniskusverlust ist dabei insbesondere für jüngere Patienten, die aufgrund sportlicher Aktivitäten am häufigsten von Meniskusverletzungen betroffen sind, schwerwiegend.

Therapeutisch gibt es bei vollständigem Verlust des Meniskus neben der allogenen Meniskustransplantation ebenfalls Bestrebungen, die Menisken durch synthetisierte Implantate wie den Kollagemeniskus (Stone et al., 1997) zu ersetzen. Das Tissue Engineering stellt eine weitere Alternative der Meniskuser-satztherapien dar. Hierbei werden autologe Meniskuszellen nach einem Aufbe-reitungsverfahren in Zellkultur expandiert und auf unterschiedliche Trägermate-

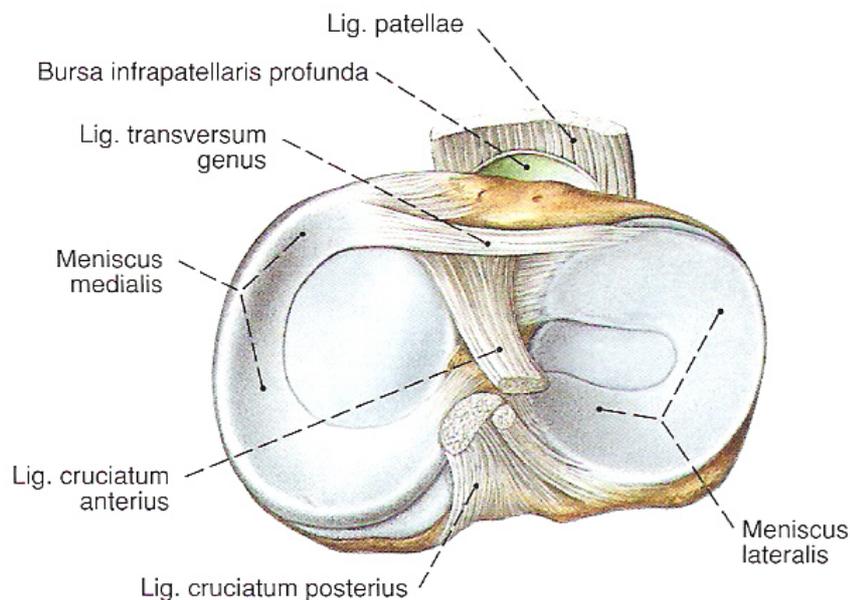
rialien gesetzt, die als Ersatz für das Gewebsstroma dienen. Entscheidend für die Entwicklung des Tissue Engineering beim Meniskus wird neben adäquaten biomechanischen Eigenschaften des Gewebes insbesondere die Zelldifferenzierung sein (Duda et al., 2000). Inwiefern sich Fibrochondrozyten nach der Aussaat auf Trägermaterialien von ihren ursprünglichen Zelltypus dedifferenzieren ist schwierig abzugrenzen, da humane Meniskuszellen bisher in erster Linie phänotypisch beschrieben worden sind und der Nachweis von Kollagenen vorwiegend durch histologische Gewebeuntersuchungen erfolgte. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Expressionsmuster von humanen Meniskuszellen umfassend zu analysieren und Fibrochondrozyten in Zellkultur auf Kollagene sowie anabole und katabole Komponenten hin auf mRNA-Ebene untersuchen.

## **1.1 Die Menisken**

Das Kniegelenk des Menschen setzt sich zusammen aus dem unteren Ende des Oberschenkelknochens, dem oberen Ende des Schienbeins, dem sogenannten Tibiaplateau, der Patella, den Seiten- und Kreuzbändern sowie den beiden Menisken.

Die Menisken übernehmen mehrere Funktionen im Kniegelenk. Sie verbessern die Kongruenz zwischen den konvexen Kondylen des Femurs und den leicht konkaven Kondylen der Tibia. Durch die Vergrößerung der Kontaktfläche nehmen sie bis zu 70 % der axialen Druckspannung auf, was eine bessere Verteilung der Kompressionskraft im Kniegelenk zur Folge hat (Dienst et al., 2006). Die Fixation der Menisken erfolgt über die Gelenkkapsel (Lig. meniscotibiale und Lig. meniscofemorale) sowie über kurze straffe Bänder ausgehend von Vorderhorn und Hinterhorn, die in die Areae intercondylares anterior et posterior der Tibia einstrahlen (Kohn et al., 1995). Das Hinterhorn des Außenmeniskus ist zusätzlich über das Lig. meniscofemorale anterius (Humphry) und das Lig. meniscofemorale posterius (Wrisberg) mit dem medialen Femurkondylus verbunden. Durch ihre Verbindungen mit der Tibia und dem Femur haben die Menisken, insbesondere der Innenmeniskus, einen sekundär stabilisierenden Effekt auf das Kniegelenk (Dienst et al., 2006), insbesondere während Extensi-

ons- und Flexionsbewegungen (Ghosh et al., 1987) und fördern ebenfalls die Schmierung des Kniegelenks (Fithian et al., 1990).

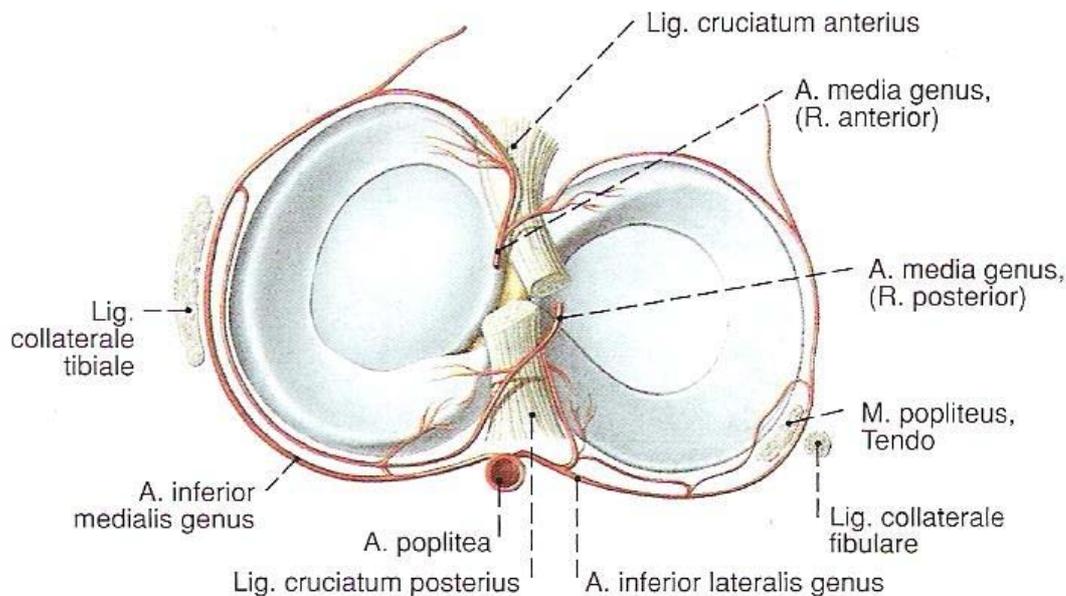


**Abbildung 1:** Kniegelenk und Menisken von proximal nach Durchtrennung der Gelenkkapsel und Kreuz- und Seitenbändern (aus Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 2, 21. Auflage, Urban und Fischer, München 2000)

Die Menisken weisen einen Gesamtwassergehalt von ca. 75% auf, während die Kollagenfasern einen Anteil von ca. 20 % einnehmen. Darüber hinaus kommen in geringeren Mengen weitere nicht - kollagene Matrixbestandteile vor (Setton et al., 1999).

Die Menisken lassen sich bereits in der achten Woche der Embryonalentwicklung nachweisen und bestehen zunächst aus einer Ansammlung von Fibroblasten ohne extrazelluläre Matrix. Während ihrer Entwicklung nimmt ihr Anteil an Kollagen stetig zu (Arnoczky 1999). Während in der Embryonalphase die äußere Hälfte des Meniskus gut mit Gefäßen versorgt ist nimmt deren Anzahl postnatal vom Zentrum zur Peripherie hin ab (Arnoczky et al., 1982). Nach Abschluss der Wachstumsphase wird das periphere Drittel des Meniskus sowie das umliegende Bindegewebe, das die Menisken mit der Gelenkkapsel verbindet, von dichten Kapillarnetzen versorgt, die aus der medialen und lateralen

Kniearterie gespeist werden (Arnoczky et al., 1982, Arnoczky et al., 1988).  
 Nach McDevitt und Webber (1990) entwickelt sich die avaskuläre, zentrale Region im Meniskus zu einem aneuralen und alymphatischen Faserknorpel aus Fibrochondrozyten, das von extrazellulärer Matrix umgeben ist.



**Abbildung 2:** Arterielle Versorgung der Menisken (aus Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen Band 2, 21. Auflage, Urban und Fischer, München 2000).

Nach Messungen von Ghosh und Taylor (1987) vermindert sich die Gefäßversorgung im lateralen Kapillarplexus bei einem Erwachsenen im vierten Lebensjahrzent auf unter 20% des gesamten Meniskus. Der Rückgang der Vaskularisierung im Meniskus wird durch den Druck erklärt, der mit Beginn des aufrechten Gangs beim Menschen auf den Menisken im Kniegelenk lastet (Arnoczky et al., 1983, Clark et al., 1983)

### 1.1.2. Ultrastruktur und Biochemie des Meniskus

Der Meniskus lässt sich in zwei verschiedene Zonen einteilen: eine oberflächliche und eine tiefe Zone. In diesen beiden Zonen sind morphologisch zwei unterschiedliche Zelltypen zu beobachten. An der Oberfläche befinden sich Zellen in ovaler Form, die einige Fortsätze haben und wenig Cytoplasma besitzen,

wobei die Kern-Plasma-Relation stark zum Kern hin verschoben ist (Ghadially et al., 1978). In der tiefen Zone befinden sich Zellen mit polygonaler Form, die manchmal in Gruppen von zwei bis drei Zellen anzutreffen sind. Diese Zellen besitzen außerdem große Mengen an rauem endoplasmatischem Retikulum (Ghadially et al., 1983), das auf eine hohe Proteinsynthese in diesen Zellen hinweist. Welchem Zelltyp diese Zellen jedoch genau angehören, ob Chondrozyten oder Fibroblasten, ist lange Zeit kontrovers debattiert worden. Die Zellen weisen Eigenschaften von beiden Zelltypen auf. Das Gewebe ist zwar fibrös, aber die Zellen ähneln aufgrund ihrer extrazellulären Matrix wiederum den Chondrozyten. Um die Einzigartigkeit dieser Zellen zu beschreiben schlugen Webber und andere 1985 den Terminus „Fibrochondrozyten“ vor.

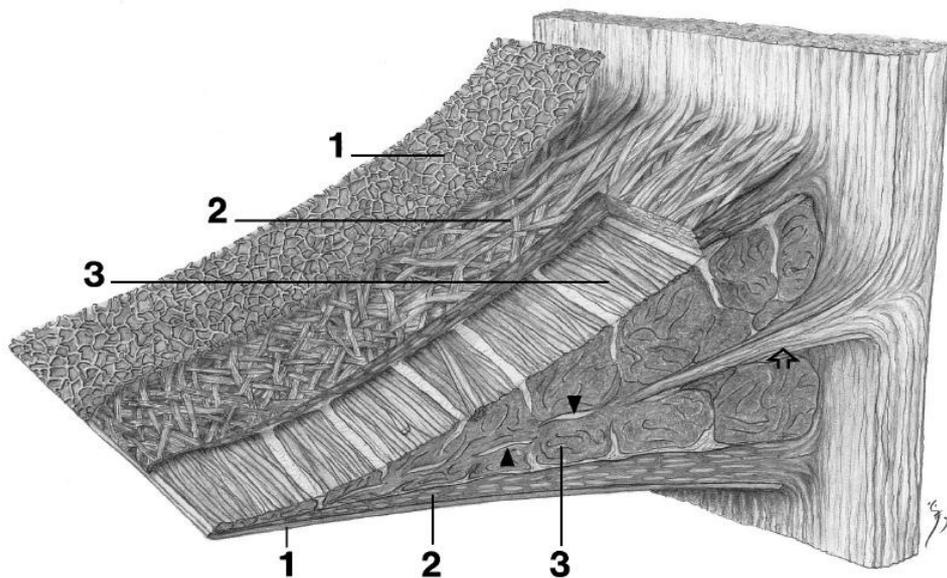
Die Meniskuszellen sind umgeben von extrazellulärer Matrix. In Bereichen mit einer hohen Zelldichte ist der Anteil an Kollagenfasern niedrig und die Matrix ist geprägt durch das Vorkommen von Elastin sowie von Matrix-Glykoproteinen und Proteoglycanen (McDevitt et al., 1990).

Proteoglycane sind große Proteine, die aufgrund ihrer hohen negativen Ladung eine 50fache Menge an Wasser in Bezug zu ihrem eigenen Gewicht aufnehmen können (Fithian et al., 1990). Mehrere kovalente Bindungsstellen ermöglichen ihnen feste Zusammenschlüsse mit Glycosaminglykan-Ketten (McDevitt et al., 1990). Diese Ketten bestehen im Meniskus zum großen Teil aus Chondroitin-Sulfat-Verbindungen, Dermatansulfat und Keratansulfat (Herwig et al., 1984), deren Sulfat-Gruppen ebenfalls zur negativen Ladung der Proteoglycan-Aggregate beitragen.

Eine andere Domäne des Proteoglycans geht nicht-kovalente Bindungen mit Hyaluronsäure ein, wobei sich mehrere Proteoglycan-Moleküle an ein Hyaluronsäure-Molekül anheften können (McDevitt et al., 1990). Mow und seine Arbeitskollegen führten die große Widerstandskraft des Meniskus gegenüber Kompressionskräften auf die negativen Ladungen innerhalb der Proteoglycan-Gruppen und der daraus resultierenden Abstoßung der Gruppen untereinander zurück. Die daraus entstehende Steifheit der Moleküle vermittelt gemeinsam mit der hohen Wasserbindungskapazität der Proteoglycane und den entstehenden

Reibungskräften mit Kollagenfasern im Meniskus ebenfalls den Widerstand gegen Zug- und Scherkräfte (Mow et al., 1984).

Im Meniskus dominiert das Kollagen vom Typ I mit einem Anteil von ca. 98 % am Gesamt-Kollagen (Eyre et al., 1975). Dieses bildet im Meniskus Faserbündel, die je nach Schicht unterschiedlich angeordnet sind (Aspden et al., 1985).



**Abbildung 3:** Struktur der Kollagenfasern im Meniskus (aus Petersen et al., 1998). Oberflächliche Schicht bestehend aus einem Netzwerk feiner Fibrillen (1). Zwischenschicht mit sich überkreuzenden, lamellenartigen Faserbündeln (2). Zirkuläre Anordnung von Kollagenfibrillenbündeln in der inneren und äußeren Zirkumferenz (3). Vereinzelt radiär ausgerichtete Kollagenfibrillen (**Pfeilspitzen**). Radiär eingewachsenes, lockeres Bindegewebe aus der Gelenkkapsel an der Meniskusbasis zwischen zirkulär gruppierten Kollagenfibrillenbündeln (**Pfeil**).

Die Arbeitsgruppe von Aspden und seinen Kollegen zeigte, dass die Kollagenfasern nahe der Oberfläche im Meniskus radial verlaufen und dort aufgrund ihrer Anordnung das Gewebe vor Längsrissen infolge von Kompressionskräften schützen, während die Kollagen-Typ-I-Faserbündel im restlichen Meniskus, insbesondere in den tieferen Schichten zirkulär verlaufen. Hier vermitteln sie eine hohe Dehnfestigkeit (Fithian et al., 1990). Aspden konnte anhand von Modellen aufzeigen, dass vertikal aufkommende Drücke im Meniskus in zirkuläre

Krafte überführt werden und auf diese Weise durch die ebenfalls zirkulär verlaufenden Kollagenfasern aufgefangen werden (Aspden 1985).

## **1.2. Meniskusschäden**

Meniskuserkrankungen sind sehr häufig und kommen als Degeneration oder als akute Schädigung durch eine Verletzung vor.

Aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften und der geometrischen Struktur des Gewebes unterliegen die Menisken Kompressions- und Scherkräften.

Der Meniskus wird zwar jedes Mal, wenn Gewicht auf das Kniegelenk verlagert wird, zusammengepresst; aufgrund seiner keilförmigen Architektur wird er aber von der Mitte der femoralen Condylen verschoben und unterliegt wegen der anterioren und posterioren Befestigung an dem Tibiaplateau nur noch einer Zugbelastung (Ikeuchi et al., 1998).

Im Vergleich zum gestreckten Kniegelenk kommt es im gebeugten Kniegelenk bei Winkeln zwischen 15° und 30° zu größeren Verschiebungen (Bylski-Austrow et al., 1994). Erleidet der Meniskus einen Riss oder wird er gänzlich entfernt, erhöht sich die Kraft, die auf das Tibiaplateau einwirkt. Hoshino und Wallace konnten 1987 zeigen, dass diese Kraft mäßig ansteigt, wenn der Meniskus einen Radialschnitt erleidet und das Meniskusgewebe im Kniegelenk belassen wird. Eine erhebliche Steigerung tritt jedoch auf, wenn der Meniskus vollständig entfernt wird.

Es wurde bereits früh nachgewiesen, dass Risse in der vaskularisierten Region des Meniskus die Fähigkeit zu Selbstheilung besitzen, während dies den Rissen in den nicht vaskularisierten Regionen nicht gelingt. Auch konnte gezeigt werden, dass Longitudinalrisse, die verheilt sind, die ursprüngliche mechanische Funktion wiederherstellen, während bei Radialrissen die mechanische Funktion nicht erhalten bleibt, da die Kollagenstruktur unterbrochen wird (Newman et al., 1989).

### **1.2.1. Degenerative Läsionen**

Makroskopisch erscheint der degenerierte Meniskusanteil weich, aufgelockert, graurot, mürbe und eingerissen. Im histologischen Schnitt beobachtet man im myxoid aufgelockerten Meniskusgewebe Nekrosefelder und pseudozystische Hohlräume. Die Sudan-Färbung weist unregelmäßig große Herde einer feintropfigen Verfettung auf, die, im Gegensatz zu einer rein traumatischen Meniskuläsion, auch den freien Rand betreffen. Bei älteren Läsionen treten auch dystrophische Kalkablagerungen auf. Diese degenerativen Veränderungen können primär vorhanden sein oder sekundär in einer älteren traumatischen Meniskuläsion entstehen. Die als Querrisse, Lappenrisse oder auch komplexe Risse unterteilten Formen von Läsionen sind mit älteren Patientengruppen assoziiert und folgen einem degenerativen Muster (Poehling et al., 1990). Der Begriff der horizontalen Spaltläsion wurde zum ersten Mal von Smillie 1962 benutzt, um eine degenerative Läsion in der horizontalen Ebene, meist in der posterioren Hälfte vom Meniskus, zu beschreiben. Er unterschied solche Risse von akuten, traumatischen und longitudinalen Rissen, die vertikal oder schräg verlaufen. Allerdings wurde auch in der Untersuchung von Noble und Hamblen 1975 gezeigt, dass die mikroskopische Degeneration bei fast allen untersuchten Patienten, die älter als 40 Jahre alt waren, festzustellen war und im medialen Meniskus in gleicher Häufigkeit vorkam wie im lateralen.

### **1.2.2. Traumatische Läsionen**

Bei der traumatischen Meniskuläsion handelt es sich um eine mechanische Zerreißung eines gesunden Meniskus infolge eines Unfalls. Dabei ist der mediale Meniskus etwa zehnmal häufiger betroffen als der laterale, da dieser mit dem medialen Kollateralband verwachsen ist. Es kann ein vollständiger oder teilweiser Meniskusriss vorliegen oder noch häufiger ein Substanzriss bestehen, bei dem der Meniskus gespalten ist.

Als Meniskusspätschäden sieht man bei einer länger zurückliegenden Meniskusverletzung einen umschriebenen Knochenschwund im Bereich der Läsion sowie Zeichen der typischen unilokulären Arthrose mit Verschmälerung des

Gelenkspalts und Randauswulstung. Histologisch findet man in den ersten drei Wochen Zellschädigungen und umschriebene Nekrosen sowie eine reaktive Zellvermehrung mit Fibrinablagerungen im Bereich des zerfetzten Rissrandes. Später kommt es zu Vernarbung und dystrophischer Verfettung, wobei – im Gegensatz zur primär degenerativen Meniskusläsion – der freie Meniskusrand fettfrei bleibt.

### **1.3. Therapiemöglichkeiten**

Die erste bedeutende Technik, die für die Behandlung von Meniskusdefekten angewandt wurde, war die Meniskektomie, die vollständige Entfernung des Meniskus. Nach schlechten Langzeitergebnissen dieser Methode (Fowler, 1976) wurde versucht, den Meniskus zu erhalten und die entstandenen Risse durch diverse Verfahren wieder zusammenzufügen. Als dritten Ansatz lässt sich das Bestreben nennen, die Menisken teilweise oder vollständig zu ersetzen.

#### **1.3.1. Meniskektomie**

Ursprünglich wurde dem Meniskus wenig Bedeutung für den Erhalt der Kniegelenksfunktionen beigemessen, sodass dieser lediglich als ein funktionsloses Rudiment der Beinmuskeln angesehen wurde. Diese Annahmen führten dazu, dass bei jeglichen Komplikationen des Meniskus dieser vollständig entfernt wurde. Nach dem Entfernen des Meniskus ändert sich die mechanische Funktion des Kniegelenks, was zu einer erhöhten Belastung des Gelenkknorpels führt (Krause et al., 1976). Mit der Zeit bildet sich hier neues Gewebe, um den Defekt aufzufüllen, das allerdings im Vergleich zum ursprünglichen Meniskus kleiner und schmaler ist. Oft bilden sich als Ersatz Fibrinklumpen, die dann einwachsenden Zellen als Gerüst dienen. Auch zeigt die Zellverteilung innerhalb dieses Gewebes Unterschiede zum Meniskus (Cooper et al., 1990). Die partielle Meniskektomie, das Entfernen von kleineren Anteilen des Meniskus, meistens aus den nicht vaskularisierten Regionen, verursacht generell weniger Degenerationen im Gelenkknorpel als die vollständige Meniskektomie. Die partielle Resekti-

on hat den Vorteil, dass der Grossteil der Kollagenstrukturen im Knie erhalten bleibt und diese noch teilweise zur Schockabsorbtion fähig ist (Cox et al., 1975).

### **1.3.2. Meniskusrefixation**

Nachdem man erkannt hatte, dass die Menishektomie Degenerationen im Gelenkknorpel hervorruft, wurde versucht, die Risse im Meniskus zu reparieren. Hierbei kam eine Reihe von unterschiedlichen Methoden zum Einsatz. Zunächst wurden die Risse genäht, später kamen noch das Schweißverfahren mit Hilfe von Laser, die Abrasionstherapie (Nakhostine et al., 1990), die Induktion der Vaskularisierung im Meniskus (Fox et al., 1993) und die Fibrinversiegelung (Forman et al., 1995) hinzu. Nähte dienen dazu, das verletzte Gewebe so lange zusammenzuhalten, bis es verheilt. Die angewandten unterschiedlichen Methoden sollen die Widerstandsfähigkeit des Gewebes an der Wundstelle optimieren. Die Abrasionstherapie raut das Gewebe um den Riss herum auf und trägt nekrotisches Gewebe ab, was die Wundheilung ebenfalls unterstützen soll.

### **1.3.3. Meniskusersatz**

Der vollständige Ersatz des Meniskus durch natürliches Meniskusgewebe oder synthetisches Material stellt einen dritten Therapieansatz dar. Diese Methode hat gegenüber den anderen den entscheidenden Vorteil, dass sie dazu fähig ist sowohl degenerative Veränderungen im Meniskus zu reparieren als auch Menisken mit Radial- oder anderen komplexen Rissen zu ersetzen. Obwohl die Forschung nach Allografts extensiv betrieben wurde, wird ihre tatsächliche Effektivität noch diskutiert (Messner, 1999). Trotz fehlender Langzeitdaten gibt es einige vielversprechende Ergebnisse (Goble et al., 1999). Untersucht wurde unter anderem die Wirkung von unterschiedlichen Konservierungs- und Befestigungstechniken. Die vorläufigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass es nach einem Zeitraum von einem Jahr nach der Implantation zwischen der Cryokon-

servierung und dem Tiefkühlverfahren keinen Unterschied gibt (Fabbriciani et al., 1997).

Eine besondere Schwierigkeit beim Totalersatz des Meniskus besteht bei der Befestigung des Gewebes am Tibiaplateau. Befestigungen am Knochen liefern zwar mechanisch die besten Ergebnisse, sie stimulieren aber nicht die Bildung und das Wachstum von natürlichem Gewebe.

Nach allogener Meniskustransplantation bei Patienten mit Kniegelenksbeschwerden nach Meniskektomie konnte in einer klinischen Studie mit 26 Patienten in den ersten Monaten nach der Transplantation eine deutliche Regredienz der subjektiven Beschwerden erreicht werden (Pasa et al., 2008).

Eine subjektive Besserung der Schmerzsymptomatik konnten auch von Lewinski und Kollegen (2007) in einer Studie mit fünf Patienten zwanzig Jahre nach einer Meniskustransplantation ermitteln. Allerdings zeigten hier die radiologischen Untersuchungen eine deutliche Progredienz der Knorpeldegeneration, sodass die Frage nach der Effizienz der Meniskustransplantation noch nicht abschließend beantwortet werden kann.

Auch wurde versucht, den Meniskus durch Gewebe aus Sehnen zu ersetzen. Sehnen haben den Vorteil, dass ihre Kollagenstruktur ähnlich aufgebaut ist wie im Meniskus. Die Hoffnung, dass sich das Sehneninterponat bei Schafen nach einiger Zeit in Fibrochondrozyten umwandelt und das Gelenk langfristig erhalten bleibt hat sich jedoch nicht erfüllt (Kohn et al., 1992). Ebenfalls lieferten weitere Versuche mit autologem Fettgewebe bei Schafen lediglich kurzfristige Erfolge (Kohn et al., 1997).

Durch die Entwicklung von Materialien wie Polytetrafluorethylen (PTFE) und Dacron wurde ein synthetischer Ersatz für den Meniskus gesucht. Obwohl PTFE die besten Ergebnisse lieferte, war es mechanisch dem natürlichen Meniskusgewebe immer noch unterlegen (Messner und Gillquist, 1993). Bei neuer entwickelten Materialien aus polymerem Gewebe wird ein Schwerpunkt auf gute Resorptionseigenschaften und eine optimale Porengröße gelegt, um das Einwachsen von Fibrochondrozyten und die Bildung einer extrazellulären Matrix zu ermöglichen (de Groot et al., 1997).

Ebenfalls gibt es Bestrebungen, tierische Menisken durch diverse Gefrier- und Inkubationsverfahren von Zellmaterial zu befreien und so ein biokompatibles und biomechanisch funktionelles Gerüst für das Tissue Engineering mit humanen Meniskuszellen zur Verfügung zu stellen (Stapleton et al., 2008).

Bei dem Kollagenmeniskusimplantat (CMI) handelt es sich um ein Gerüst aus Kollagenfasern, das über ein komplexes Aufbereitungsverfahren aus der Achillessehne von Rindern hergestellt wird. Nach ersten tierexperimentellen Untersuchungen (Stone et al., 1992) zeigte sich auch in klinischen Studien (Stone et al., 1997, Rodkey et al., 1999), dass Zellen in das Netzwerk einwachsen und das Implantat die Formation einer Kollagenmatrix unterstützt. Nachdem auch histologisch nachgewiesen wurde, dass das Implantat durch ein meniskusähnliches Gewebe ersetzt wird, bleibt offen, ob dieses Gewebe nachhaltig ebenfalls biomechanisch eine knorpelschützende Funktion übernehmen wird (Pape et al., 2006), da bei dem CMI lediglich ein inhomogenes Einwachsen der Zellen in das primär zellfreie Kollagengerüst erfolgte (Steinwachs et al., 2003).

In einer 2007 veröffentlichten prospektiven Studie mit acht Patienten konnten Zaffagnini und seine Kollegen relativ gute klinische Ergebnisse sechs bis acht Jahre nach Implantation des CMI nachweisen (Zaffagnini et al., 2007). Während die eine Hälfte der Patienten seit der Implantation schmerzfrei war, gab die andere Hälfte der Patienten weiterhin persistierende, geringgradige Kniegelenksbeschwerden an. In der MRT-Bildgebung konnte bei sechs Patienten keine progrediente Knorpeldegeneration im Vergleich zu Voraufnahmen vor der Implantation festgestellt werden, ebenfalls wurde keine Gelenkspaltverschmälerung registriert. Trotz einer bei ca. der Hälfte der Patienten darstellbaren myxoiden Degeneration des CMI-Implantats werden die bisherigen klinischen Ergebnisse als erfolgversprechend bewertet.

#### **1.3.4. Tissue Engineering**

Das Tissue engineering beim Meniskus ist ein relativ neues Forschungsgebiet. Aufgrund der sehr eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Meniskus stellt dieses Verfahren eine hoffnungsvolle Alternative zu den bisher üblichen Ersatz-

therapien dar. Beim Tissue engineering werden kleine Gewebeproben in vitro mit Hilfe diverser Verfahren expandiert und als Ersatz für verschiedene, nicht regenerationsfähige Gewebearten eingesetzt. Dabei können sowohl allogene als auch autologe Zellen verwendet werden.

Die Vermehrung der Zellen erfolgt nach einem entsprechenden Aufbereitungsverfahren des gewonnenen Gewebes in Kulturflaschen mit Nährmedien.

Nach der Zellexpansion werden die Zellen auf Trägermaterialien gesetzt, die als Ersatz für das Gewebsstroma und die extrazelluläre Matrix dienen. Für die in vitro-Entwicklung eines differenzierten Phänotyps müssen die verwendeten Biomaterialien in ihren entscheidenden Eigenschaften dem ursprünglichen Gewebe möglichst ähnlich sein, um eine optimale Differenzierung der Zellen während ihrer dreidimensionalen Ausbreitung zu erreichen (Sittinger et al., 1996).

Im Rahmen des Tissue engineering beim Meniskus wurde bisher mit Zellen unterschiedlicher Herkunft wie mesenchymalen Stammzellen und synovialen Fibroblasten sowie auch mit Meniskuszellen gearbeitet (Arnoczky, 1999).

In vitro Untersuchungen mit Meniskuszellen belegen, dass diese unter dreidimensionalen Kulturbedingungen ihren differenzierten Phänotyp ausbilden und ebenfalls extrazelluläre Matrix bilden können (Webber 1990).

Maier und seine Arbeitskollegen (2007) konnten in einer umfangreichen Studie mit Schafen die Menisken zunächst von Zellen befreien und so eine Matrix für die später ausgesäten autologen Meniskuszellen zur Verfügung stellen. Die folgenden histologischen Untersuchungen dokumentierten ein relativ homogenes Einwachsen der Zellen in das Gerüst. In biomechanischen Belastungstests bewies der Meniskusersatz ebenfalls hohe Widerstandsfähigkeit.

Ausgehend von dieser Untersuchung sind künftig auch analoge Anwendungen am humanen Meniskus vorstellbar.

Entscheidend für die Entwicklung des Tissue engineering beim Meniskus werden neben möglicher Zelltoxizität, adäquaten biomechanischen Eigenschaften und immunologischer Kompatibilität insbesondere die Zelldifferenzierung und die Produktion extrazellulärer Matrix sein (Duda et al., 2000).

Darüber hinaus weisen auch gerüstfreie, mit sehr hoher Zelldichte expandierte Mischkulturen aus Chondrozyten und Meniskuszellen neben einer robusten

Struktur die Expression der Kollagene Typ-I und Typ-II auf, sodass auch Meniskusersatzimplantate ohne Stützgewebe vorstellbar sind (Hoben et al., 2007). Des Weiteren wurde auch der Einfluss von diversen Wachstumsfaktoren auf das Zellwachstum bei Meniskuszellen untersucht (Arnoczky 1999, Ibarra et al., 2000, Nakata et al., 2001, Sweigart et al., 2001, Pangborn et al., 2005).

#### **1.4. Aufgabenstellung der Arbeit**

Bisher erfolgte die Charakterisierung von humanen Fibrochondrozyten primär phänotypisch (Nakata et al., 2001). Eine genetische Charakterisierung von Fibrochondrozyten wurde zwar vereinzelt sowohl bei humanen als auch bovinen und porcinen Meniskuszellen beschrieben; eine umfassende Analyse des Expressionsmusters von humanen Fibrochondrozyten wurde bislang jedoch nicht durchgeführt. Dies hat uns dazu bewogen, humane Meniskuszellkulturen zu etablieren und deren Expressionsmuster sowohl auf Kollagene als auch anabole und katabole Komponenten hin zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen eine genauere Charakterisierung von humanen Fibrochondrozyten liefern, um bei Untersuchungen zum Tissue engineering von Menisken, wie zum Beispiel bei der Besiedelung von Trägermaterialien oder der Exposition von Wachstumsfaktoren, eine Qualitätskontrolle der eingesetzten als auch nach dem engineering erhaltenen Zellen zur Verfügung zu haben.

## II. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Gewebe

Die Menisken wurden von Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen gewonnen, die aufgrund einer Gonarthrose operativ mit einer Knie-TEP versorgt wurden.

Nach Aufklärung der Spender wurde die Versuchreihe durch die Ethikkommission genehmigt (Nr. 192/2003).

Die im Rahmen der Operationsvorbereitung durchgeführten Untersuchungen auf virale Infektionen (Hepatitis, HIV) lieferten keine Hinweise auf eine akute Infektion bei den Spendern.

#### Patientendaten

Die Identität der Patienten wurde verschlüsselt. Der Verschlüsselungscode setzt sich zusammen aus der Ziffer des Monats, an dem die Patienten operiert wurden und ihren Initialen.

**Tabelle 1:** Patientendaten. Verschlüsselungscode, Alter, Geschlecht, Diagnosen und Begleitmedikation der Spender.

Patienten-code	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnosen	Medikamente
8AT	75	Weiblich	Gonarthrose li. Knie-TEP re. Osteoporose Hypertonie Z.n. Radiojodtherapie Chronische Gastritis	Clexane Voltaren Aspirin Concor Pantozol
7EG	70	Weiblich	Coxarthrose li. Knie-TEP li. Hüft-TEP re. Gonarthrose li. Arterielle Hypertonie	Antihypertonikum
8EK	67	Weiblich	Knie-TEP re.	-

			Meniskusteilresektion re.	
8ER	71	Weiblich	Hüft-TEP li. Schaftwechsel li. Gonarthrose li. Coxarthrose re. Knie-TEP li.	Viani mite Omebeta
6GF	85	Weiblich	Coxarthrose re. Hybrid-HTEP bds.	Claudicat Digimerk Methionin
8GM	63	Männlich	Knie-TEP li. Varusgonarthrose li.	Vioxx
6JB	50	Weiblich	Schlittenprothese re. Gonarthrose re. Meniskusteilresektion re.	-
8KB	77	Weiblich	Knie-TEP bds. Fibulaschafffraktur li. Aortensklerose Chron. Emphysembron- chitits	Bronchoretard Viani forte Allergospasmin
8LK	67	Weiblich	Gonarthrose li. Chronische Gastritis	-
7MW	71	Männlich	Knie-TEP re. Hybrid-HTP li. Hüftluxatio Leistenhernien bds. Arterielle Hypertonie Sigmaresektion	Captopril Urion Esidrix Norvasc
8RW	64	Weiblich	Schlittenprothese Gonarthrose bds. M. Parkinson	-

## 2.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Medien

5-Br-4-Cl-3-Indolyl- $\beta$ -Galactosid	( Fa. Peqlab, Erlangen, BRD )
Acrylamid	( Fa. Serena )
Agarose	( Fa. Seakem )
Agarose	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Aktivkohle	( 2186, Merck, Darmstadt)
Amoniumpersulfat	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Ampholine	(pH 5-10; Fa. Pharmacia Biotech, Erlangen)
Antimykotikum Fungizone	( Amphoterin B; Fa. Gibco, Karls- ruhe, BRD )
Aqua dest.	( Universitätsapotheke)
Basenpaarmarker	( 100 bp DNA Ladder; Gibco, Rock- ville, USA )

Beta-Mercaptoethanol	( Fa. Biorad, München, BRD )
Bis- Acrylamid	( Fa. Serena )
Bovine serum albumin	( Albumin Bovine, Nr. A-2153, Sigma, Deisenhofen )
Collagenase	(Typ 11; Fa. Sigma, St. Louis, USA )
DAKO-Kit	(LSAB2 System Alkaline Phosphatase, Fa. DAKO)
Diethylpyrocarbonat	(Nr D-5758, Sigma)
Desinfektionslösung Antifect	(Fa. Schülke & M., Norsstedt, BRD )
Desinfektionslösung Barrycidal	(Fa. Schröder, Stuttgart, BRD )
Dimethylformamid	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
Dimethylsulfoxid	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
DNA- Synthese- Kit	(Adv. RT-for- PCR Kit; Fa. Clontech, Palo Alto, USA)
DNA- Verdau	( Rnase- free DnaseSet; Quiagen, Hilden, BRD )
EDTA- Natrium	(Titriplex III z.A., Cat. Nr: 108418, Merck, Darmstadt)
Eisenzyanid	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Ethidiumbromid	(10mg/ml; Fa. Amersham, Braunschweig, BRD )
Filterpapier	( 3mm; Fa. Whatman, Kent, UK )
Formaldehyd	( Fa. Fischer, Zürich, CH )
Fetales Kälberserum	( Myoclone Super Plus FCS; Fa. Gibco, Rockville, USA)
Glutaraldehyd	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
Glycerin	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Phosphorsäure	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
Harnstoff	( 60,06 g/mol; Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
Hydroph. Scintillations Lsg.	( Ultima Gold; Fa. Packard, Meriden, USA )

Insulin- Transferrin- Selenium	( Fa. Gibco, Rockville, USA )
Magnesiumchlorid	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
Mercaptoethanol	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Methanol	(Merck, Darmstadt)
Nährmedium	( DMEM/F12 (1:1) Medium flüssig; Fa. Gibco, Rockville,USA )
NaOH	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
Natriumchlorid	( Fa. Merck, Darmstadt, BRD )
PBS- Puffer	( Dulbecco´s PBS W/O Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> ; Fa. Gibco, Rockville, USA )
PCR- Kit	( AmpliTaq DNA Polymerase; Fa. Perkin Elmer, Rodgun-Ingesheim, BRD )
Taq DNA Polymerase Kit	(Nr. 1647687, Böhlinger, Mannheim)
Penicillin/Streptomycin- Lsg.	( 10000E/10000µg/ml; Fa. Gibco, Rockville, USA )
Pepton	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Phenylhydrazin	( Cat.No.:807250, Merck, Darmstadt)
Rinderserumalbumin BSA	( Albumin Bovine; Fa. Sigma, St. Louis, USA )
RNA- Extraktion	( Rneasy Mini Kit; Fa. Quiagen, Hil- den, BRD )
Tween-Lösung	( Tween 20, Merck, Darmstadt )
Tris- Base	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Trypanblau 0,4%	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )
Trypsin EDTA 1x	( Fa. Gibco, Rockville, USA )
Vitamine	( Vitamins MEM Solution 100x; Fa. Gibco, Rockville, USA )
Zitronensäure	( Fa. Sigma, St. Louis, USA )

### 2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Cups	( 0,5 ml, 1,8 ml, Eppendorf, Hamburg)
Farbdiafilm	( Kodak Ektachrome, 100 )
Glasflaschen	( unterschiedliche Größen, Schott, Mulitmed, Kirchheim/Teck )
Handschuhe	( Beiersdorf, Hamburg )
Kulturflaschen	( 70 ml, 250 ml, Falcon für Begasung, Greiner, Nürtingen )
Pasteurpipetten	( 230 mm lang, Hilgenberg, Malsfeld )
Petrischalen	( Greiner, Nürtingen )
Pipetten	( Sterile Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10ml, 25 ml, 50 ml, Greiner, Nürtingen )
Pipettenspitzen	( Biozym )
Skalpelle	( Cutifix, Braun, Melsungen )
Spritzen	( 10 ml-Perfusorspritze, Braun, Melsungen )
Sterilfilter	( Millex GV 0,22 µm, Milipore, Molsheim, Frankreich )  ( Millisart, 0,45 µm, Cat. No. 17598 K, Sartori- us, Göttingen )
Tubes	( 15 ml, Sarstedt )  ( Falcon 50 ml, Greiner, Nürtingen )

### 2.1.4. Antikörper

AS02 Antikörper	( Cat. No. DIA 110, 1 mg/mlDianova, Hamburg )
CD 11b Antikörper Peroxidase-conjugated	( Cat. No. 30451 A, Pharmingen, USA )

AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Peroxidase-conjugated	( Cat. No. 111-035-003, Dianova, Hamburg )
AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG+IgM (H+L)	( Cat. No. 115-035-44, Dianova, Hamburg )

### 2.1.5. Geräte

Absaugpumpe	( Suc-O-Mat, Bachofer, Reutlingen )
Analysenwage	( Elektronisch, Typ H 51, Sartorius, Göttingen)
Brutschrank	( Hereaus Co <sub>2</sub> Auto-zero, Hanau, Incubat, Me- lag )
Gelkammer	( Oncor )
Lichtmikroskop	( Leitz Flouvert, FS Mikroskop mit Leitz Vario- Ortomat zur Photographie )
PCR-Block	( UNO II, Biometra, Göttingen )
Photometer	( UV-Spectrophotometer V-530, Jasco, Groß- Umstadt )
Schüttler	( Ika MTS 4, Bachofer, Reutlingen )
Sterilbank	Gelair Laminar Air Flow, Klasse II )
Wärmeplatte mit Magnetrührer	( IKAMAG RCT, Janke und Kunkel GmbH & CoKG, Staufen )
Wasserbad	( DT Hetotherm, Bachofer, Reutlingen )
Zählkammer	( Neubauer Improved Bright Line, Assistent)
Zentrifugen	( Avanti 30 Zentrifuge, GPR Centrifuge, Beckmann, München )

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkulturmethoden**

#### **2.2.1.1. Allgemeines**

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Fibrochondrozyten fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Es wurden nur sterile Materialien benutzt. Falls diese nicht steril geliefert werden konnten bzw. keine sterilen Einwegartikel waren, wurden sie gereinigt, eingetütet und von der Zentralsterilisation der Universitätsklinik Tübingen sterilisiert. Unsterile Lösungen wurden mittels Sterilfilter der Porengröße 0,22µm filtriert.

#### **2.2.1.2. Anlegen der Primärkultur von Fibrochondrozyten aus humanen Meniskusbiopsaten**

Das Meniskusgewebe wurde umgehend mit einer sterilen Pinzette aus dem Originalgefäß in eine Petrischale überführt und durch die Zugabe von einigen Millilitern PBS das Austrocknen des Gewebes verhindert. Zunächst wurde die Synovialis entfernt und verworfen. Danach wurde der Meniskus mit zwei Skalpellenspitzen breiartig zerkleinert, der Gewebeprei mit einer abgebrochenen 5ml Pipette in PBS aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Petrischale wurde mehrmals mit PBS gespült, sodass auf diese Weise das Gewebe vollständig aufgenommen werden konnte. Nun folgte der erste Waschgang. Dabei wurde mit 1500U/min, sieben Minuten lang bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Danach wurde das Röhrchen erneut auf 40ml aufgefüllt und es folgte der zweite Waschgang mit Zentrifugation und Abnehmen des Überstandes. Das Pellet wurde anschließend in 5ml 0,4% Collagenase aufgenommen, kurz geschwenkt und im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Bei den Versuchen wurde das Wachstum von Meniskuszellen verglichen, die unterschiedlich lang mit Collagenase behandelt wurden. Die zerkleinerten Gewebeproben wurde für jeweils zwei, vier, acht und zwanzig Stunden dem Ver-

dau mit Collagenase ausgesetzt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass der Gewebebrei vollständig mit der Lösung bedeckt war. Nach der Inkubationszeit wurde das Pellet in 40 ml Medium (ohne FCS und ohne Zusätze) aufgenommen, kurz geschwenkt und erneut gewaschen. Dies wurde zwei Mal wiederholt.

Dann konnte das Pellet in entsprechender Menge Vollmedium aufgenommen und ausgesät werden. Dazu wurden die Zellen in 6-Wellplatten bzw. 250ml-Gewebekulturflaschen zur Anzucht überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sup>2</sup> inkubiert.

#### **2.2.1.3. Aufbereitung des FCS**

Das FCS wurde zum Auftauen in ein Wasserbad bei 37°C gelegt. Danach wurde die Temperatur des Wasserbades auf 56°C erhöht und 30min lang inkubiert. Nachdem zwei Messerspitzen Aktivkohle hinzugegeben wurden, kam die Flasche mit FCS für 30 min auf den Schüttler. Anschließend wurde steril filtriert. Dabei wurden Filter mit dem Porendurchmesser 0,45µm benutzt. Nun konnte das FCS in 50 ml Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert werden.

#### **2.2.1.4. Herstellung des Vollmediums**

Zur Herstellung des FCS/ DMEM Vollmediums wurden zu 500 ml Dulbecco's MEM Nutrient Mix F12 Grundmedium 50 ml 10 % fetales Kälberserum (FCS), 12 ml Vitamine (Gibco), 6 ml Fungizone, 10 ml Penicillin/ Streptomycin (Gibco) und 500 µl Insulin-Transferrin-Selenium hinzugegeben. Das verwendete fetale Kälberserum (FCS) stammte bei allen Versuchen aus derselben Charge (Biochrom, Berlin). Es wurde hitzeinaktiviert (56°C, 30min) und bei -20°C tiefgefroren gelagert. Vor dem Ansetzen des Zellkulturmediums wurden die benötigten Reagenzien bis auf das ITS und das DMEM Medium schonend einige Stunden lang im Wasserbad aufgetaut.

#### **2.2.1.5. Mediumwechsel**

Das Vollmedium wird je nach Zellart, Zellaktivität und Zelldichte unterschiedlich schnell verbraucht. Eine Abweichung des pH-Wertes äußert sich durch einen Farbumschlag nach gelb (saurer Bereich) oder rot- violett (alkalischer Bereich). Um dies zu verhindern wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt, sodass ein konstantes Milieu und gleiche Bedingungen für alle Zellen gewährleistet werden konnte.

Das Medium wurde im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Von den Kulturen wurde unter der Sterilbank das alte Medium mittels einer Pasteurpipette und einer Pumpe abgesaugt. In die 6-Wellplatten wurde pro Well 3,5 ml, in die 50ml- Gewebekulturflaschen wurde 7 ml und in die 250 ml- Gewebekulturflaschen wurden jeweils 14 ml frisches Vollmedium hinzugegeben.

Wichtig war es auch, während des gesamten Vorgehens den Zellrasen nicht mit der Pipette zu berühren, da es hierdurch möglicherweise zu einem Ablösen der Zellen und somit zu deren Schädigung kommen konnte.

Anschließend kamen die Flaschen und Wells zur weiteren Inkubation erneut bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Brutschrank.

#### **2.2.1.6. Subkultivierung der Zellen**

Im Laufe der logarithmischen Wachstumsphase wurde die Flasche bzw. das Well konfluent, d.h. es kam zur dichtest möglichen Anordnung der adhärennten Zellen als Monolayer. Spätestens dann sollten die Zellen umgesetzt werden, um eine möglichst schnelle Zellvermehrung zu erreichen. Bei Erreichen von Konfluenz kommt es zur Kontaktinhibition des Zellwachstums. Außerdem besteht bei einem vollständig bewachsenen Zellrasen die Gefahr, dass sich die Zellen komplett vom Flaschenboden ablösen und damit verloren gehen.

#### **Vorgehen:**

Das Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Nun folgte der Waschschritt mit PBS. Dabei wurden je 10 ml PBS pro Flasche/ 2 ml PBS pro Well

hinzugegeben, die Flasche/ das Well geschwenkt, und das PBS wieder abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt.

Dann wurden 7 ml/ 1,5 ml Trypsin EDTA hinzugefügt, welches man ca. 7 min einwirken ließ. Für diese Zeit kamen die Flaschen erneut in den Brutschrank. Danach wurde das vollständige Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen/ Wells mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes überprüft. Hiernach wurde 3 ml/ 0,5 ml Vollmedium zugegeben, wodurch die Protease Trypsin blockiert wurde. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt, bei 1500U/min, 7 min lang bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. In die neuen Flaschen/Wells wurden jeweils 10 ml/ 1,5 ml Vollmedium vorgelegt und das Pellet in der entsprechenden Menge Vollmedium aufgenommen und in die Flaschen/ Wells überführt.

#### **2.2.1.7. Zellzahlbestimmung**

Grundbaustein für die meisten Versuchsansätze ist die Aussaat einer definierten optimalen Zellzahl. Die Bestimmung der Zellzahl kann man mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer- Zählkammer) vorgenommen werden. Zuerst musste die Zählkammer mit 70%igem Ethanol gereinigt werden. Dann wurde das leicht angefeuchtete Deckglas so auf die Zählkammer gelegt, dass die sogenannten Newton- Ringe sichtbar wurden. Danach wurde mit Hilfe einer Pipette die gut durchmischte Zellsuspension in die Kammer eingefüllt. Dann folgte die Auszählung von mindestens vier der neun Quadrate unter dem Mikroskop. Jedes Quadrat besitzt eine Fläche von  $1\text{mm}^2$ , was bei einer Tiefe der Zählkammer von 0,1mm ein Volumen von  $0,1\mu\text{l}$  ergibt. Durch Multiplikation des Mittelwertes der gezählten Quadrate mit dem Faktor  $10^4$  erhält man die Zellzahl/ml in der Suspension.

#### **2.2.1.8. Zellaussaat**

Konfluente Primärkulturen wurden wie im vorherigen Kapitel beschrieben mit Trypsin-EDTA vom Boden der Gewebekulturflaschen/ Wells abgelöst, mit fri-

schem Vollmedium suspendiert und in einer Neubauer- Zählkammer ausgezählt.

Die für die jeweiligen Versuche erforderlichen unterschiedlichen Zellkonzentrationen konnten durch die Verdünnung mit Vollmedium hergestellt werden.

#### **2.2.1.9. Zellaussaat für Immunhistochemie**

Sobald die Flaschen/ Wells konfluent waren, wurden die Zellen gepoolt. Ein Teil davon – 6ml – wurde für die Immunhistochemie verwendet. Die Aussaat erfolgte mit einer Eppendorf-Multipipette in sterile 24-Well- Kulturplatten. Es befanden sich immer jeweils 50000 Zellen/ Well in 1 ml Vollmedium gelöst.

#### **2.2.2. Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen**

Um die Zellen als Fibrochondrozyten zu identifizieren, mussten die Kollagene-Typ-I und -II auf der Proteinebene nachgewiesen werden. Um ebenfalls eine Kontamination mit unerwünschten Zelllinien wie z. B. Makrophagen auszuschließen wurde eine immunhistochemische Färbung zur Bestimmung des Zelltyps durchgeführt.

##### **2.2.2.1. Prinzip der Immunhistochemie**

Zur Sichtbarmachung der spezifischen Antigene einer Zelle werden zwei Antikörper eingesetzt. Während der primäre Antikörper mit seinem  $F(ab)_2$  – Fragment das Antigen erkennt und gebunden wird, bleibt sein Fc-Fragment frei. Der sekundäre Antikörper ist mit der Peroxidase gekoppelt und erkennt das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Durch Substratzusatz kann nun der Ort sichtbar gemacht werden, an dem sich das Antigen befindet.

#### **2.2.2.2. Protokoll der Immunhistochemie**

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und wuchsen über Nacht an, sodass eine subkonfluente Kultur zur Verfügung stand. Die Zellen wurden am folgenden Tag zweimal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Nach einer 10-minütigen Fixierung der Zellen bei Raumtemperatur mit Formaldehyd wurden sie für fünf Minuten bei -20 °C mit Ethanol erneut fixiert. Nach wiederholtem zweimaligem Spülen mit PBS erfolgte zur Hemmung endogener Peroxidasen die Inkubation mit 0,1 %igem Phenylhydrazin. Daraufhin wurden unspezifische Antigenbindungsstellen durch die einstündige Inkubation mit 1 %igem BSA blockiert. Anschließend wurde der zellspezifische Primärantikörper auf die Wells gegeben, wobei die Negativkontrollen ausgespart wurden. Inkubiert wurde über Nacht bei 4°C.

Verwendet wurden Antikörper für die Kollagene Typ-I und -II, beide in den Konzentrationen 1: 50. Der Antikörper AS02 wurde in der Konzentration 1: 100 eingesetzt. Er bindet an ein membranständiges Protein auf humanen Zellen mesenchymaler Herkunft, ohne jedoch auf Endothelzellen, Blutzellen oder an extrazelluläre Matrix zu binden. Des Weiteren wurde der Antikörper CD11b, der mit einem Adhäsionsglycoprotein der Zellmembran von Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und aktivierten Lymphozyten reagiert, verwendet.

Die folgenden Schritte der immunhistochemischen Färbung wurden am darauf folgenden Tag mit dem Kit der Firma DAKO durchgeführt.

Zuerst wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer die ungebundenen Antikörper herausgewaschen. Danach wurde mit einem zweiten Antikörper, dem biotinylierten anti-mouse bei AS02 und CD11b und einem biotinylierten anti-goat Immunglobulin bei Kollagen I weitergearbeitet. Für Kollagen II wurde Streptavidin verwendet. Dieser wurde sparsam auf alle Zellen inklusive der Negativkontrollen gegeben, sodass gerade der Boden bedeckt war und bei 37° C für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit PBS-Tween und danach mit PBS-Puffer wurde mit Detektionsreagenzien - in unserem Fall mit einem AEC-Kit weitergearbeitet. Dabei vermischte man den vorgegebenen Puffer, die AEC-Stammlösung und die Hydrogen-Peroxyd-Lösung. Nach Inkubation bei Raumtemperatur, in der Regel 10 bis 30 min, kam es zum

Farbumschlag, der mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes beobachtet und photographiert werden konnte.

### 2.2.3. RT-PCR

#### 2.2.3.1. RNA-Extraktion

Die Versuche wurden mit dem Rneasy MiniKit der Firma Qiagen durchgeführt. Zunächst wurden die adhärennten Zellen durch Zugabe von Trypsin vom Flaschenboden gelöst und abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Pellet erneut in 1 ml PBS aufgenommen und in 1 ml Eppendorf Cups überführt. Nun wurde das Pellet erneut abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen. Der Puffer enthielt neben Mercaptoethanol auch Guanidiumthiocyanat (GITC), die neben der Zelllyse auch die Inaktivierung der RNasen bewirkten, sodass intakte RNA isoliert werden konnte.

Die Homogenisierung des Lysats erfolgte durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle. Durch die Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol wurde die RNA an die Kieselerde-Membran gebunden. Beim nächsten Schritt wurde nicht gebundenes Material in 15 Sekunden bei 10000 Umdrehungen/min abzentrifugiert, sodass die RNA an der Matrix haftete. Nach einem Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer für 15 Sekunden bei 10000 Umdrehungen wurde für 15 Minuten mit RNase-freier DNase inkubiert, um eine mögliche Kontamination mit DNA zu eliminieren. Hierauf folgte ein nochmaliger Waschschrift mit dem RW1 -Puffer unter den gleichen Bedingungen. Um letztendlich noch andere mögliche Kontaminationen an der Membran herauszuwaschen erfolgte nochmaliges Waschen mit 500 µl RPE-Puffer bei 20000 Umdrehungen für jeweils eine Minute und 15 Sekunden. Nun konnte die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser aus der Matrix eluiert werden.

Die vorhandene RNA-Menge in der Probe wurde mit dem Spektrophotometer gemessen. Dazu wurde die RNA in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt und bei

260nm/280nm in Quarzküvetten vermessen. Die gemessenen Extinktionskoeffizienten lagen bei Werten zwischen 1,5 und 2,0.

### 2.2.3.3. cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wurde mit einem Kit der Firma Clontech gearbeitet, der alle für die Reaktion erforderlichen Reagenzien enthielt.

Je nach Konzentration wurde von der zuvor aus den Zellen extrahierten und vermessenen RNA das benötigte Volumen entnommen, das nach Bedarf ein  $\mu\text{g}$  oder zwei  $\mu\text{g}$  RNA ergab und in 0,5 ml Eppendorf Cups mit DEPC-Wasser (Wasser versetzt mit Diethylpyrocarbonat 1:1000) auf 25  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Hierzu wurden je 1 oder 2  $\mu\text{l}$  Oligo dT 18-Primer hinzupipettiert und das Gemisch leicht gevortexet und zentrifugiert. Die Probe wurde danach zur Entfaltung der RNA und der Bindung des Primers an den Poly-A-Schwanz der RNA im Thermocycler für zwei Minuten bei 70 °C erhitzt und wieder sofort auf Eis gelegt, um eine Rückfaltung zu verhindern.

Aus den folgenden Reagenzien wurde ein Mix hergestellt, gut gevortexet und zentrifugiert:

- 5x reaction buffer bestehend aus: 8  $\mu\text{l}$   
250 mM Tris-HCl, pH 8.3  
375 mM KCl  
15 mM MgCl<sub>2</sub>
- dNTP-Mix jeweils 10 mM 2  $\mu\text{l}$
- MMLV reverse transcriptase 200 units/ $\mu\text{l}$  2  $\mu\text{l}$   
Moloney – Murine Leukemia virus
- Recombinant RNase Inhibitor 40 units/ $\mu\text{l}$  1  $\mu\text{l}$

Zu jeder Probe wurden je 6,5 µl oder 13 µl des Mix gegeben und zentrifugiert. Die Proben wurden daraufhin im PCR-Block für eine Stunde bei 42 °C erhitzt, sodass optimale Bedingungen für den Ablauf der reverse Transkription herrschten. Nach einer Stunde wurde die Temperatur im Block für fünf Minuten auf 95 °C erhöht, um die Synthese der cDNA zu stoppen. Danach wurde das Endprodukt mit jeweils 80 µl oder 160 µl DEPC-Wasser aufgefüllt und zentrifugiert. Die DNA konnte nach dem Gebrauch bei -20 °C gelagert werden.

Als Positivkontrolle der Qualität der cDNA eignet sich eine PCR mit dem GAPDH Primer, da die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als ein Enzym der Glykolyse in jeder natürlichen Zelle vorhanden ist und per PCR nachweisbar sein sollte. Es müsste sich eine Bande bei 983 Basenpaaren zeigen. Falls es keine Verunreinigungen gegeben hat dürften auch keine weiteren Banden sichtbar sein.

#### **2.2.3.4. PCR**

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde ein Taq-Polymerase-Kit der Firma Clontech, welcher alle nötigen Reagenzien enthielt, eingesetzt.

Für die gleichzeitige Amplifikation von mehreren Proben wurde der sogenannte *Master-Mix* angefertigt, in den alle Komponenten außer der patienteneigenen cDNA hineinpipettiert wurden und der auf die jeweiligen Eppendorf Cups verteilt wurde.

Im Einzelnen setzte sich der *Master Mix* für jede einzelne Probe wie folgt zusammen:

- 5 µl 10x PCR Puffer 15mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer)
- 0,5 µl dNTPs je 10 mM
- 1 µl Upper Primer 100 pmol
- 1 µl Lower Primer 100 pmol
- 0,5 µl Taq Polymerase 5 units/µl (Perkin Elmer)
- 37 µl Aqua dest., PCR Grade

- 5 µl cDNA

Die Reagenzien wurden nach dem Auftauen sofort auf Eis gelegt und zügig in 0,5 ml Eppendorf Cups pipettiert und auf dem Schüttler geschüttelt. Die Taq Polymerase wurde dem *Master Mix* als letztes beigegeben, da sie sehr hitzeempfindlich ist und erst kurz vor dem Starten der Reaktion hinzugefügt werden sollte. Danach wurde PCR-Block auf 94 °C vorgeheizt und die Proben vom Eis direkt in den Block überführt. Dieser Vorgang wird auch als hot start bezeichnet. Bei dieser Temperatur wurden innerhalb von 45 Sekunden die cDNA denaturiert und die Doppelstränge voneinander getrennt. Im nächsten Schritt kühlte der Block auf die für das jeweilige Primerpaar optimale Annealingtemperatur (z. B. 60 °C) ab. Dies ist die errechnete Temperatur, bei der 50 % der Primer an die cDNA hybridisiert sind. Die Primer lagern sich an jeweils einen Strang an und die entsprechende Zielsequenz zwischen den beiden Primern wird später mit Hilfe der Taq Polymerase und der dNTPs amplifiziert. Die ideale Zeitspanne für die Annealingtemperatur kann ebenfalls entsprechend dem Primerpaar differieren und beträgt zwischen einer und zwei Minuten. Nun heizte der Block für zwei Minuten bei 72 °C, der optimalen Temperatur für die Taq Polymerase. Dieses Enzym katalysiert den Aufbau des gegenläufigen DNA-Strangs mit dNTPs. Dieser Vorgang wird auch als Extension bezeichnet. Daraufhin fing der Zyklus erneut an und die cDNA wurde bei 94 °C denaturiert, bei der Annealingtemperatur die Primer angelagert und bei 72 °C der Strang synthetisiert. Nach 30 Zyklen erfolgte der letzte Extensionsschritt bei 72 °C für zehn Minuten. Da nach jedem Zyklus ein neuer Doppelstrang für die erneute Synthese zur Verfügung steht, vermehrt sich das amplifizierte DNA-Segment exponentiell und kann später aufgrund der relativ hohen Konzentration durch die Elektrophorese nachgewiesen werden.

### 2.2.3.5. Nachweis der amplifizierten Produkte mittels der Gelelektrophorese

Die Darstellung der amplifizierten Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese. Hierzu wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt, dem Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Ethidiumbromid fluoresziert orange bei UV-Bestrahlung und verfügt darüber hinaus über die Eigenschaft an doppelsträngige DNA zu binden. Um die Größe der amplifizierten Produkte beurteilen zu können lief im Gel ein 100 bp DNA-Marker mit. Dokumentiert wurde die Elektrophorese durch ein Photo mit der UV-Licht-Kamera.

Folgende Reagenzien wurden zur Durchführung verwendet:

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der Reagenzien zur Durchführung der Gelelektrophorese.

<b>Agarosegel</b>	400 ml 20x TBE-Puffer 6 g Agarose 30 µl Ethidiumbromid
<b>20xTBE-Puffer</b>	ad. 1 l Aqua dest. 121 g Trisaminomethan 1M 67,1 g Borsäure 1M 7,44 g EDTA-Natrium 20mM
<b>40xTAE-Puffer</b>	ad. 1 l Aqua dest 193,6 g Trisaminomethan 1,6M 108,9 g Natriumacetat 0,8M 15,2 g EDTA-Natrium 20mM
<b>Ladepuffer</b>	250 µl 40xTAE-Puffer 5 ml Glycerin 2,75 ml Aqua dest. 1 ml Bromphenolblau 1 ml Xylene cyanol
<b>100 bp-Ladder-Mix</b>	80 µl angefertigter Ladepuffer 50 µl ddH <sub>2</sub> O 30 µl bp-Ladder

#### Durchführung:

Es wurden 6 g Agarose auf 20 ml 20xTBE-Puffer und 380 ml Aqua dest. in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben und bei 360 Watt in der Mikrowelle für 10 Minuten erhitzt. Im erhitzten Gel durften keine Schlieren mehr sichtbar sein. Nun wurde 30 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel auf dem Magnetrührer auf ca. 60 °C abgekühlt. Die Gelkammer ist mit einem Kamm ausgestattet, des-

sen Zinken Platz für die spätere Probe enthalten. Nun wurde das Gel gegossen und nach dem Polymerisieren mit 1xTBE-Puffer großzügig bedeckt.

Es wurden jeweils 20 µl des PCR-Produkts mit 5 µl Ladepuffer gemischt und 20 µl der Mischung in die einzelne Kammer gegeben. Zum Vergleich der Banden wurde noch in eine seitliche Kammer 15 µl des 100 bp-DNA-Eichmarkers pipetiert. Das Gel lief an einem Netzgerät bei 60 Volt und einem Strom zwischen 30 und 50 Milliampère. Nach 30 Minuten waren die DNA-Stücke aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und entsprechender Laufgeschwindigkeit voneinander getrennt und die Kammer wurde mit UV-Licht bestrahlt, sodass die sichtbar gewordenen Banden photographiert werden konnten.

Mit diesem Verfahren wurde die Expression von folgenden Komponenten in den Meniskuszellen der elf Patienten (n=11) untersucht.

- Kollagen-I, -II, -III, -VI, -X
- VEGF
- FGF-1
- FGF-2
- TGFβ1
- IGF-I und -II
- PDGF-AB
- BMP-2
- iNOS
- MMP-I, -III, - XIII

## III. Ergebnisse

### 3.1. Optimierung der Zellkultur

Bei dem Gewebe, das lediglich zerkleinert und gewaschen wurde und nicht in Collagenase inkubierte waren auch nach bis zu vier Wochen keine adhärenen Zellen in den Kulturflaschen zu erkennen. Nach dem zwanzig-stündigen Collagenaseverdau mit 0,4 %iger Collagenase konnte ebenfalls kein Wachstum von Zellen in den Kulturflaschen beobachtet werden. Als Optimum erwies sich eine Inkubationszeit von ca. vier bis fünf Stunden für die Meniskuszellen. Der Verdau der Zellen in einem Zeitrahmen um diesen Optimalbereich, also einer Inkubationsdauer von einer halben bis drei Stunden und sieben bis zehn Stunden hatte immer eine geringeres Zellwachstum zur Folge.

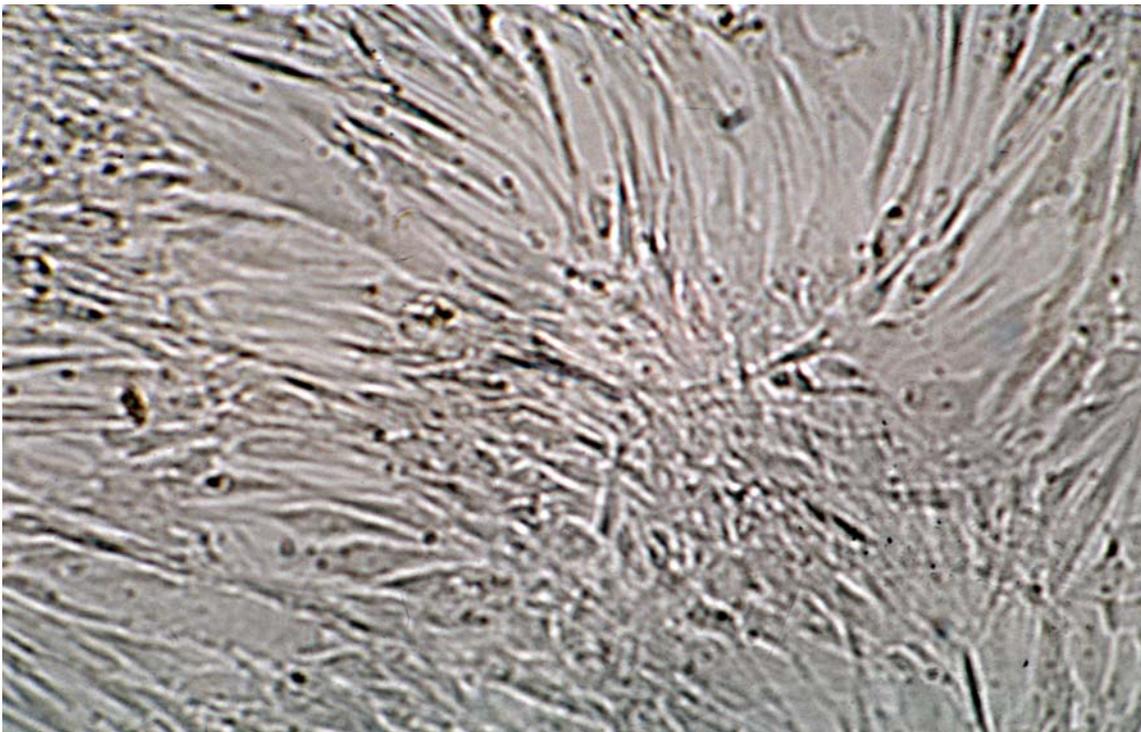
Kulturen, die vorher vier bis fünf Stunden in Collagenase verdaut wurden, wurden nach ungefähr drei bis vier Wochen konfluent. Bis zur zweiten Konfluenz, nach Aufteilung in zwei Flaschen, brauchten die Zellen 15 bis 20 Tage.



**Abbildung 4:** Auswaskkultur von Meniskuszellen des Patienten 8KB. 13 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung.

Bei Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen in die erste Subkultur überführt. Die Primärkulturen wurden möglichst wenig bewegt, um das Festwachsen am Boden der Kulturflasche nicht zu stören.

Für die Experimente wurden regelmäßig Zellen aus der ersten Subkultur verwendet, um möglichst nah an den in vivo Verhältnissen zu sein und einer Dedifferenzierung der Zellen nach mehreren Passagen entgegen zu wirken.



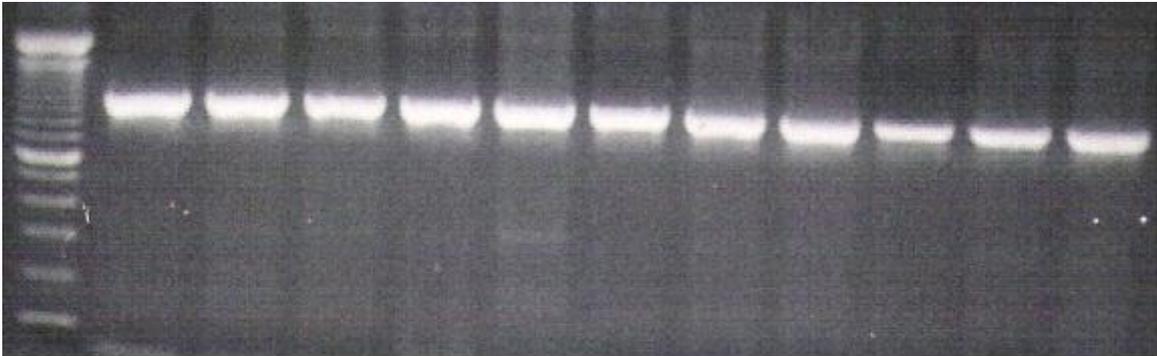
**Abbildung 5:** Konfluente erste Subkultur von Meniskuszellen des Patienten 8KB. 25 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung.

### **3.2. RT/PCR**

Eine weitere Methode zur Charakterisierung der Zellen stellt die Polymerase-Kettenreaktion dar. Sie bietet im Vergleich zur Immunhistochemie die Möglichkeit, auch die geringe Expression von Proteinen auf RNA-Ebene nachzuweisen. Es wurden Zellkulturen von elf verschiedenen (n=11) Patienten untersucht. Das Expressionsmuster der Zellen wurde auf folgende Faktoren untersucht: Kollagen-I, -II, -III, -VI und -X, FGF-1 und FGF-2, VEGF, BMP-2, TGF $\beta$ 1, PDGF-AB, MMP-I, -III und -XIII, IGF-I und -II und iNOS.

### 3.2.1. Synthese der cDNA

Nach der Extraktion der RNA wurde diese in die komplementäre DNA umgewandelt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Umschreibung in cDNA dient die PCR mit dem G3PDH-Primer. Zu erwarten wären Banden von gleichmäßiger Stärke in der Größe von 983 bp. Die Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer G3PDH-PCR. Die Banden sind von regelmäßiger Dicke und weisen die erwartete Größe von ungefähr 1000 bp auf. Außerdem sind auch keine mehrzähligen Banden vorhanden. Somit waren sowohl die RNA-Extraktion als auch die cDNA-Synthese erfolgreich.



**Abbildung 6:** RT-PCR Nachweis von G3PDH aller (n=11) elf untersuchten Zellkulturen. Primergröße 983 bp.

### 3.2.2. PCR

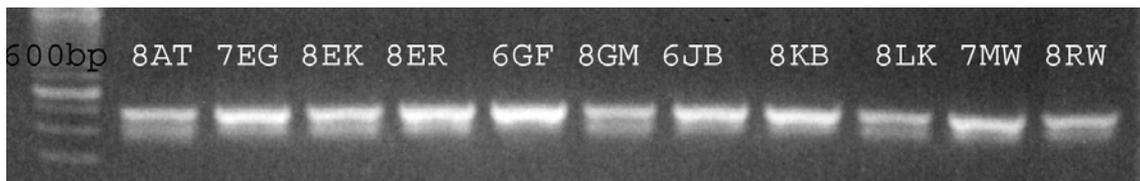
#### 3.2.2.1. Kollagen Typ-I ( $\alpha$ 1)

Sense: AGC-GCT-GGT-TTC-GAC-TTC-AGC-TTC-C

Antisense: CAT-CGG-CAG-GGT-CGG-AGC-CCT

Die PCR mit diesem Primerpaar zeigte bei allen Patientenproben deutliche Banden in der Größe von ungefähr 500 Basenpaaren, etwas mehr als die erwartete Produktgröße von 466 bp. Die optimale Annealingtemperatur lag für diesen Primer bei 66 °C.

Die Ergebnisse zeigen, dass von allen kultivierten Zellen Kollagen I exprimiert wird.



**Abbildung 7:** RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-I von allen untersuchten Zellkulturen. Primergröße 466 bp.

**Tabelle 3:** Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-I.  
kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-I
8AT	++
7EG	++
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	++

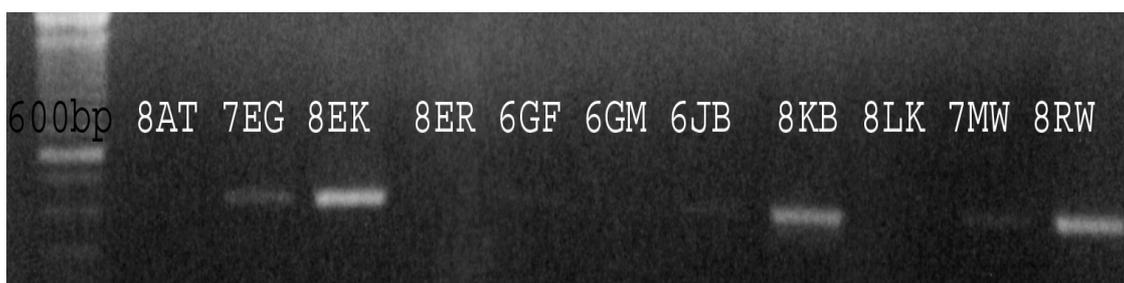
7MW	++
8RW	++

### 3.2.2.2. Kollagen Typ-II

Sense: CTG-GTC-CCC-AAC-ACT-GCC-AAC-GTC

Antisense: TCC-TTT-GGG-TTT-GCA-ACG-GAT-TGT

Die Banden der PCR-Produkte waren unter den Patienten unterschiedlich in ihrer Ausprägung. Die zu erwartende Produktgröße lag bei 414 bp, die Proben waren in der Höhe der 400er Bande angeordnet. Bei einer Annealingtemperatur von 64 °C waren bei den Patienten 7EG, 8EK, 6GF, 6JB, 8KB, 7MW und 8RW Banden unterschiedlicher Stärke zu erkennen, während bei den Patienten 8AT, 8ER, 8GM und 8LK keine Banden zu verzeichnen waren.



**Abbildung 8:** RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-II aller untersuchten Zellreihen. Primergröße 414 bp.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-II.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-II
8AT	-
7EG	+
8EK	++
8ER	-

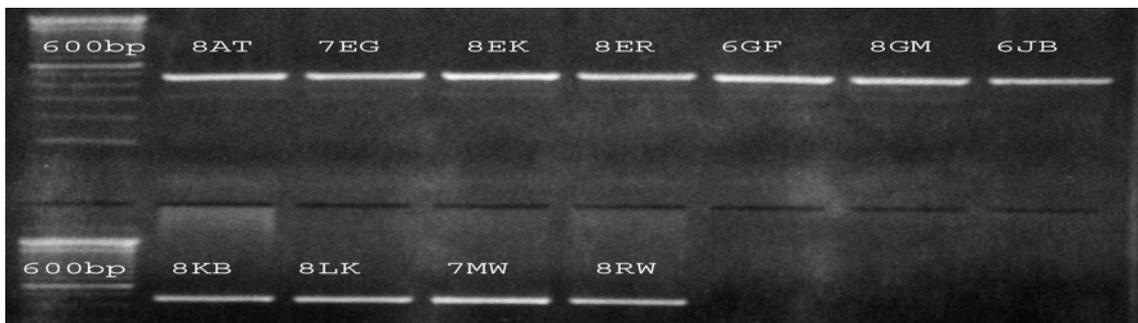
6GF	+
8GM	-
6JB	+
8KB	++
8LK	-
7MW	+
8RW	++

### 3.2.2.3. Kollagen Typ-III

Sense: CCA-AAC-TCT-ACT-TGA-A

Antisense: GGA-CTC-ATA-GAA-TAC-A

Die Expression von Kollagen III konnte bei allen der elf untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Der Primer hat die Größe von 449 Basenpaaren und ergab bei einer Annealingtemperatur von 44 °C die gleiche Bandenstärke bei allen Proben in erwarteter Höhe.



**Abbildung 9:** RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-III bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 449 bp.

**Tabelle 5:** Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-III.  
kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

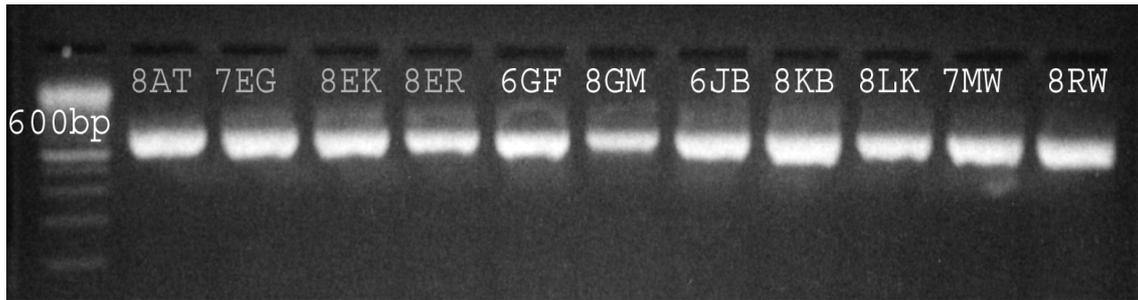
Patientencode	RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-III
8AT	++
7EG	++
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	++
7MW	++
8RW	++

#### 3.2.2.4. Kollagen Typ-VI

Sense: GCG-GGT-CCC-TCA-GAT-TGC-CTT

Antisense: CAT-AAA-CCC-TCG-CCC-AAA-CTC

Ebenso wie bei Kollagen III konnten auch bei dem Primer für Kollagen VI bei allen elf Proben Banden in gleichmäßig starker Ausprägung beobachtet werden. Die Größe des Primers lag hier bei 781 Basenpaaren, die Annealingtemperatur bei 57 °C.



**Abbildung 10:** RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-VI bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 781 bp.

**Tabelle 6:** Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-VI.  
kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-VI
8AT	++
7EG	++
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	++
7MW	++
8RW	++

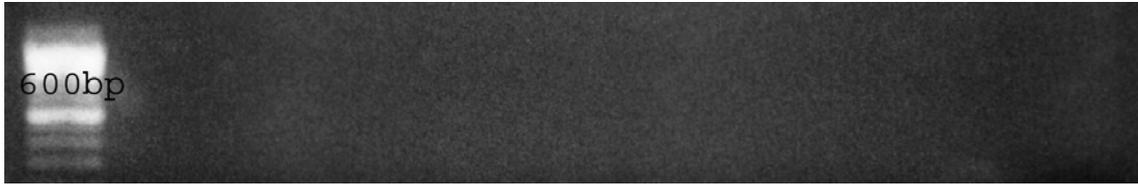
### 3.2.2.5. Kollagen Typ-X

Sense: GCC-CAA-GGC-TGC-TGT-TTG-GAG-AC

Antisense: CCT-GAG-AAA-GAG-GAG-TGG-ACA-TAC

Bei diesem Primer waren weder bei der angegebenen Annealingtemperatur von 66 °C noch bei anderen Versuchen mit Temperaturen zwischen 55 °C und 74

°C Banden erkennbar. Die durchgeführte Positivkontrolle mit dem Primer zeigte eine regelrechte Signalanhebung. Der Primer war 703 Basenpaare groß.



**Abbildung 11:** RT-PCR von Kollagen Typ-X bei allen untersuchten Zellreihen. Keine Banden vorhanden. Primergröße 703 bp.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der RT-PCR für Kollagen Typ-X.  
kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von Kollagen Typ-X
8-AT	-
7EG	-
8EK	-
8ER	-
6GF	-
8GM	-
6JB	-
8KB	-
8LK	-
7MW	-
8RW	-

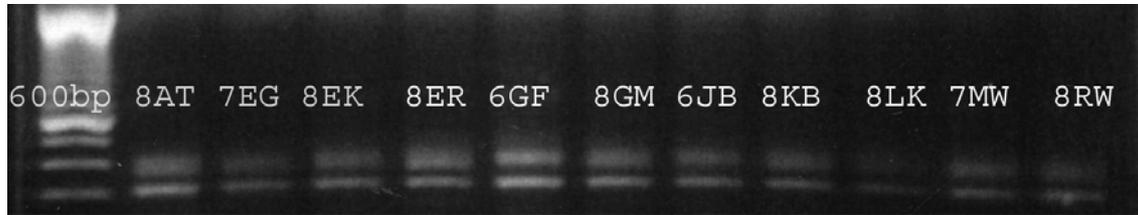
### 3.2.2.6. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Sense: GAG-TGT-GTG-CCC-ACT-GAG-GAG-TCC-AAC

Antisense: CTG-CTG-CCC-GGC-TCA-CCG-CCT-CGG-CTT

Bei diesem Primer konnte bei der erwarteten Größe von 311 Basenpaaren und 55 °C Annealingtemperatur bei allen der elf Proben eine Bande nachgewiesen

werden. Allerdings waren ebenfalls bei allen Proben Doppelbanden in der Gelelektrophorese zu erkennen.



**Abbildung 12:** RT-PCR Nachweis vom Primer VEGF bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 311 bp.

**Tabelle 8:** Ergebnisse der RT-PCR für VEGF.  
kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von VEGF
8AT	++
7EG	+
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	+
7MW	++
8RW	++

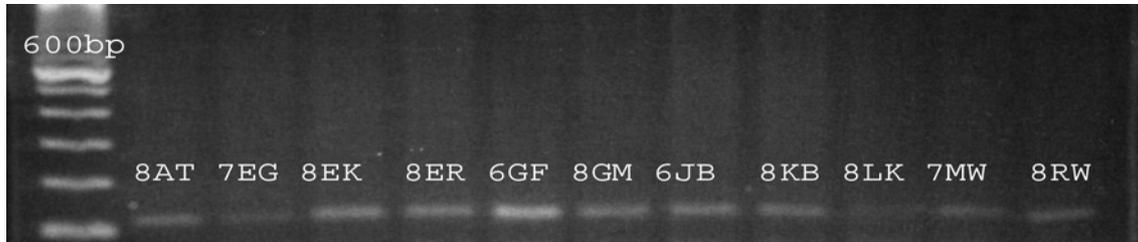
### 3.2.2.7. Acidic Fibroblast Growth Factor (FGF-1, ECGF)

Sense: TTA-CTG-TGA-GAC-TGT-ATG-TT

Antisense: TGA-GTA-GCT-TAT-ACA-TTG-TA

Bei FGF-1 waren bei allen elf Proben Banden in der erwarteten Größe von 119 Basenpaaren nachweisbar, wobei der Patient 6GF die stärkste und die Patien-

ten 8LK und 7EG die schwächste Ausprägung zeigten. Die optimierte Annealingtemperatur lag bei 50 °C.



**Abbildung 13:** RT-PCR Nachweis vom Primer FGF-1 bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 119 bp.

**Tabelle 9:** Ergebnisse der RT-PCR für FGF-1.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

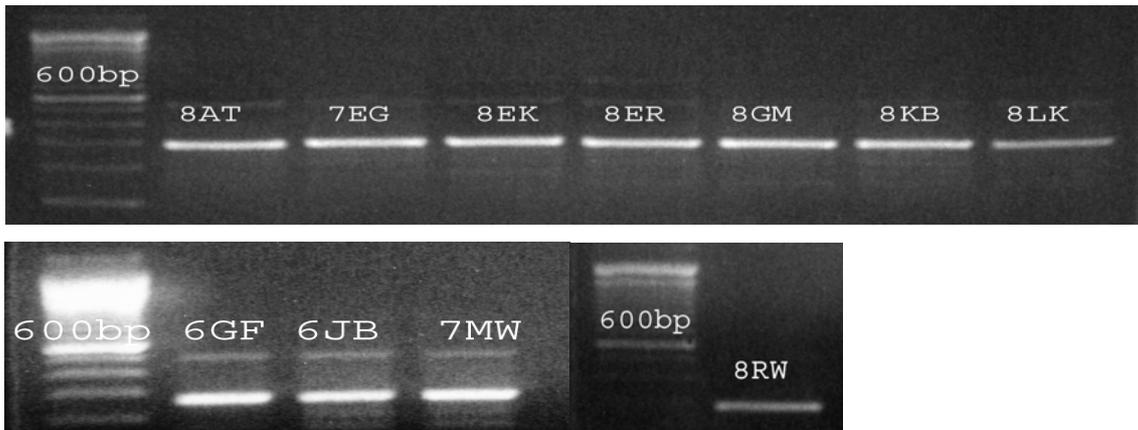
Patientencode	RT-PCR Nachweis von FGF-1
8AT	++
7EG	+
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	+
7MW	++
8RW	++

### 3.2.2.8. Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2)

Sense: GAG-AAG-AGC-GAC-CCT-CAC-A

Antisense: TAG-CTT-TCT-GCC-CAG-GTC-C

Bei einer Temperatur von 55 °C waren bei allen elf Patientenproben sehr deutliche, gleichmäßige Banden in der Größe von 277 Basenpaaren zu beobachten.



**Abbildung 14:** RT-PCR Nachweis vom Primer FGF-2 bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 277 bp.

**Tabelle 10:** Ergebnisse der RT-PCR für FGF-2.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

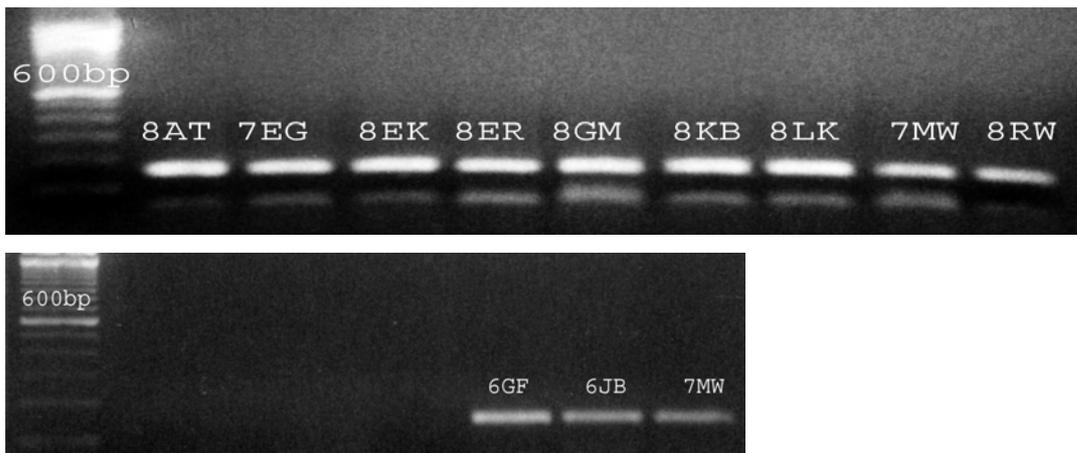
Patientencode	R-PCR Nachweis von FGF-2
8AT	++
7EG	++
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	++
7MW	++
8RW	++

### 3.2.2.9. Transforming Growth Factor $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

Sense: GCC-CTG-GAC-ACC-AAC-TAT-TGC-T

Antisense: AGG-CTC-CAA-ATG-TAG-GGC-AGG

Bei dem TGF $\beta$ -1-Primer war die Bandenstärke bei allen elf Proben gleich ausgeprägt. Das Produkt hatte die errechnete Größe von 161 Basenpaaren, die Banden waren im Gel in der Mitte zwischen der 100er und 200er Bande angeordnet. Die Annealingtemperatur betrug 60 °C. Bei diesem Primer waren bei sieben der elf untersuchten Patientenproben Doppelbanden in der Gelelektrophorese zu erkennen.



**Abbildung 15:** RT-PCR Nachweis vom Primer TGF $\beta$ -1 bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 161 bp.

**Tabelle 11:** Ergebnisse der RT-PCR für TGF- $\beta$ 1.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von TGF $\beta$ -1
8AT	++
7EG	++
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	++
7MW	++
8RW	++

### 3.2.2.10. Insulin-like Growth Factor I und II (IGF-I und -II)

#### IGF-I

Sense: ACA-TCT-CCC-ATC-TCT-CTG-GAT-TTC-CTT-TTG-C

Antisense: CCC-TCT-ACT-TGC-GTT-CTT-CAA-ATG-TAC-TTC-C

#### IGF-II

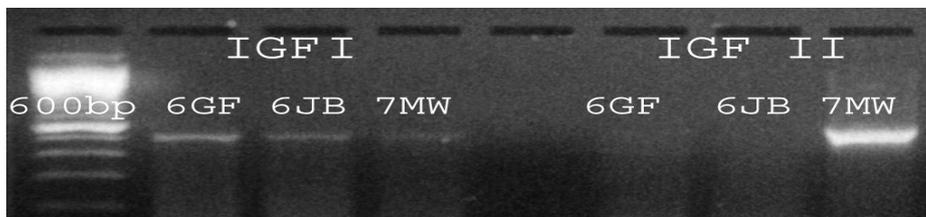
Sense: AGT-CGA-TGC-TGG-TGC-TTC-TCA-CCT-TCT-TGG-C

Antisense: TGC-GGC-AGT-TTT-GCT-CAC-TTC-CGA-TTG-CTG-G

Es wurden alle elf Proben auf die Expression von IGF-I und IGF-II hin untersucht. Der IGF-I-Primer ist 514 Basenpaare groß und wurde bei den Proben 6GF, 6JB und 7MW nachgewiesen. Bei den übrigen acht Patientenproben konnte keine Expression von IGF-I festgestellt werden.

IGF-II konnte lediglich bei einem der elf untersuchten Proben nachgewiesen werden. Der Primer ist 538 Basenpaare groß.

Die Annealingtemperaturen lagen bei beiden Primern zwischen 55°C und 65°C.



**Abbildung 16:** RT-PCR Nachweis von den Primern IGF-I und -II . Primergrößen 514 bp (IGF-I) und 538 bp (IGF-II).

**Tabelle 12:** Ergebnisse der RT-PCR für IGF-II und IGF-II.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von IGF-I	RT-PCR Nachweis von IGF-II
8AT	-	-
7EG	-	-
8EK	-	-

8ER	-	-
6GF	++	-
8GM	-	-
6JB	+	-
8KB	-	-
8LK	-	-
7MW	+	++
8RW	-	-

### 3.2.2.11. Platelet Derived Growth Factor AB (PDGF-AB)

Sense: CTG-TCC-AGG-TGA-GAA-AGA-TCG-AGA-TTG-TGC-GG

Antisense: GCC-GTC-TTG-TCA-TGC-GTG-TGC-TTG-AAT-TTC-CG

Die Annealingtemperatur war für dieses Primerpaar mit 60 °C angegeben. Weder diese noch weitere PCR mit Temperaturen zwischen 60 °C und 72 °C ergaben Banden in der erwarteten Größe von 256 Basenpaaren. Die intakte Funktion des Primers wurde in einer Positivkontrolle bestätigt.



**Abbildung 17:** RT-PCR vom Primer PDGF-AB bei allen untersuchten Zellreihen. Keine Banden nachweisbar. Primergröße 256 bp.

**Tabelle 13:** Ergebnisse der RT-PCR für PDGF-AB.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von PDGF-AB
8AT	-
7EG	-
8EK	-
8ER	-

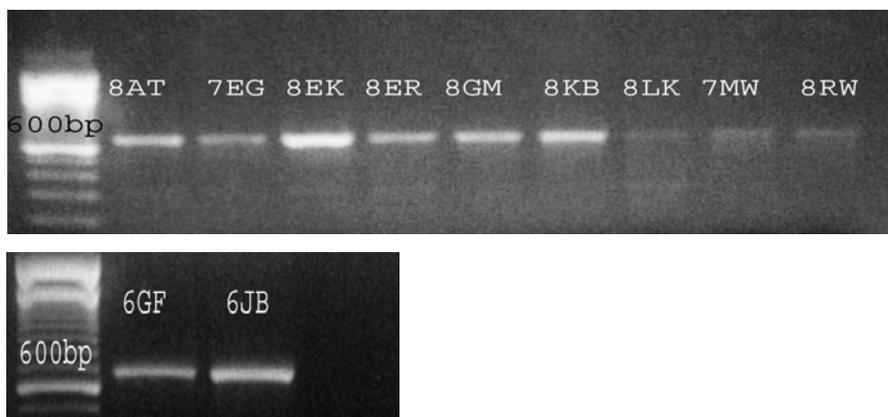
6GF	-
8GM	-
6JB	-
8KB	-
8LK	-
7MW	-
8RW	-

### 3.2.2.12. Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2)

Sense: GCT-GTA-CTA-GCG-ACA-CCC-AC

Antisense: TCA-TAA-AAC-CTG-CAA-CAG-CCA-ACT-CG

Bei den Versuchen mit BMP-2 zeigten sich bei der Temperatur von 60 °C durchweg Banden in der erwarteten Größe von 671 Basenpaaren. Zu bemerken ist, dass die Patienten 7MW, 8KL und 8RW im Vergleich zu den anderen Patienten noch erkennbare, jedoch deutlich schwächere Banden aufwiesen.



**Abbildung 18:** RT-PCR Nachweis vom Primer BMP-2 bei allen untersuchten Zellreihen. Primergröße 671 bp.

**Tabelle 14:** Ergebnisse der RT-PCR für BMP-2.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von BMP-2
8AT	++

7EG	++
8EK	++
8ER	++
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	+
7MW	+
8RW	+

### 3.2.2.13. Inducible Nitric Oxid Synthase (iNOS)

Sense: ACA-TTG-ATC-AGA-AGC-TGT-CCC-AC

Antisense: CAA-AGG-CTG-TGA-GTC-CTG-CAC

Die PCR mit diesem Primerpaar zeigte bei sieben der elf untersuchten Patientenproben nachweisbare Banden in der erwarteten Größe von 236 Basenpaaren. Eine Annealingtemperatur von 67 °C erwies sich für diesen Primer als optimal.



**Abbildung 19:** RT-PCR von iNOS bei elf Patientenproben. Primergröße 236 bp.

**Tabelle 15:** Ergebnisse der RT-PCR für iNOS.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

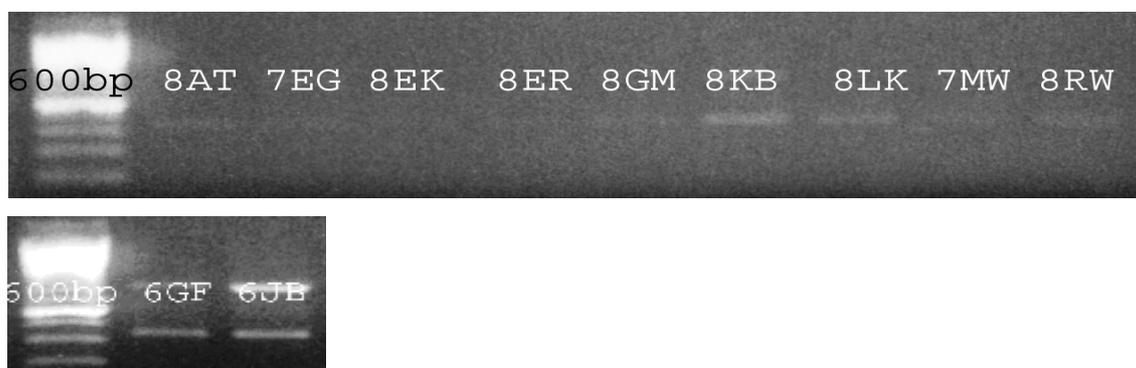
Patientencode	RT-PCR Nachweis von iNOS
8AT	-
7EG	+
8EK	++
8ER	-
6GF	-
8GM	+
6JB	++
8KB	++
8LK	+
7MW	-
8RW	+

### 3.2.2.14. Matrix Metalloproteinase I (MMP-I)

Sense: GGT-GAT-GAA-GCA-GCC-CAG

Antisense: CAG-TAG-AAT-GGG-AGA-GTC

Dieses Primerpaar zeigte im PCR-Ergebnis Banden in der erwarteten Größe von 438 Basenpaaren bei vier der elf untersuchten Patientenproben. Die Ergebnisse wurden bei einer Annealingtemperatur von 66 °C erzielt.



**Abbildung 20:** RT-PCR vom Primer MMP-I bei elf Patientenproben.

Primergröße 438 bp.

**Tabelle 16:** Ergebnisse der RT-PCR für MMP-I.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

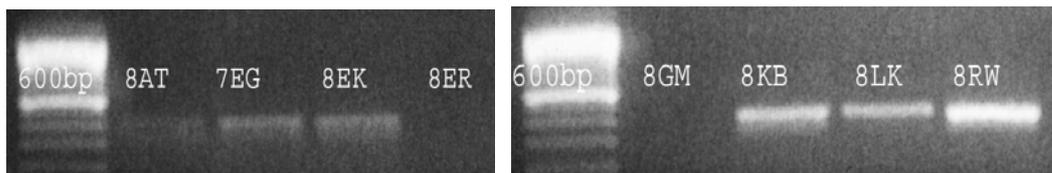
Patientencode	RT-PCR Nachweis von MMP-I
8AT	-
7EG	-
8EK	-
8ER	-
6GF	++
8GM	-
6JB	++
8KB	+
8LK	+
7MW	-
8RW	-

### 3.2.2.15. Matrix Metalloproteinase-III (MMP-III)

Sense: CCT-GGG-ACG-CCA-GCC-AAC-TGT-G

Antisense: TGC-TTG-GGA-AAG-CCT-GGC-TCC-AT

Bei dem MMP-III-Primer war die Bandenstärke bei den Proben unterschiedlich stark ausgeprägt. MMP-III wurde bei acht der untersuchten elf Proben nachgewiesen. Der Primer hat die Größe von 425 Basenpaaren, die optimale Annealingtemperatur lag bei 66°C.





**Abbildung 21:** RT-PCR vom Primer MMP-III bei elf Patientenproben. Primergröße 425 bp.

**Tabelle 17:** Ergebnisse der RT-PCR für MMP.III.  
kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

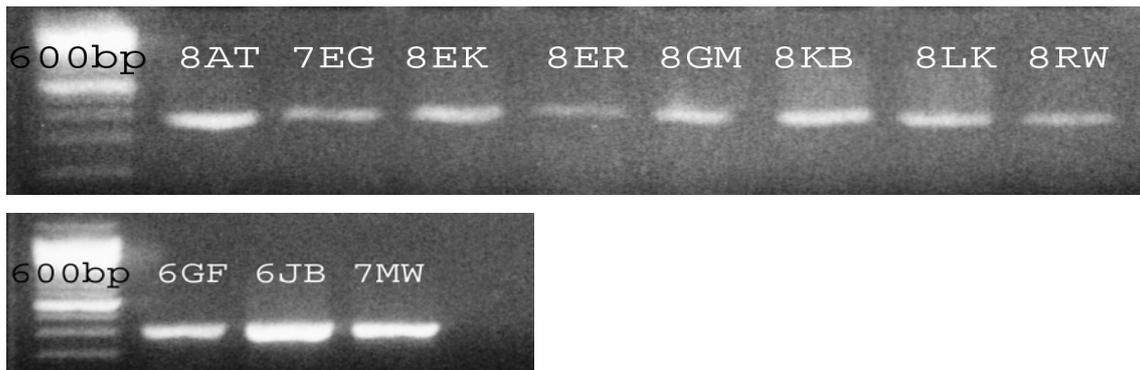
Patientencode	RT-PCR Nachweis von MMP-III
8AT	-
7EG	+
8EK	+
8ER	-
6GF	++
8GM	-
6JB	++
8KB	++
8LK	++
7MW	++
8RW	++

### 3.2.2.16. Matrix Metalloproteinase XIII (MMP-XIII)

Sense: GCG-GGG-TTC-CTG-ATG-TGG-GTG-A

Antisense: GGC-CGA-ACT-CAT-GCG-CAG-CAA-C

Bei allen elf Patientenproben wurden im Agarosegel Banden in der Größe von 390 Basenpaaren verzeichnet. Die Annealingtemperatur betrug bei dem Primer dieser Proteinase 66°C.



**Abbildung 22:** RT-PCR Nachweis vom Primer MMP-XIII bei elf Patientenproben. Primergröße 390 bp.

**Tabelle 18:** Ergebnisse der RT-PCR für MMP-XIII.

kein PCR-Signal: - schwach positiv: + deutlich positiv: ++

Patientencode	RT-PCR Nachweis von MMP-XIII
8AT	++
7EG	+
8EK	++
8ER	+
6GF	++
8GM	++
6JB	++
8KB	++
8LK	++
7MW	++
8RW	++

### **3.3. Immunhistochemische Zellcharakterisierung**

#### **3.3.1. Einleitung**

Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse wurde die Methode der Immunhistochemie bei drei Zelllinien (n=3) gewählt. Für die Zelltypbestimmung wurde der Antikörper ASO2 verwendet, der humane Zellen mesodermaler Herkunft identifiziert. Zum Ausschluss von Kontaminationen mit Makrophagen kam der Antikörper CD11b zum Einsatz, der diese spezifisch färbt.

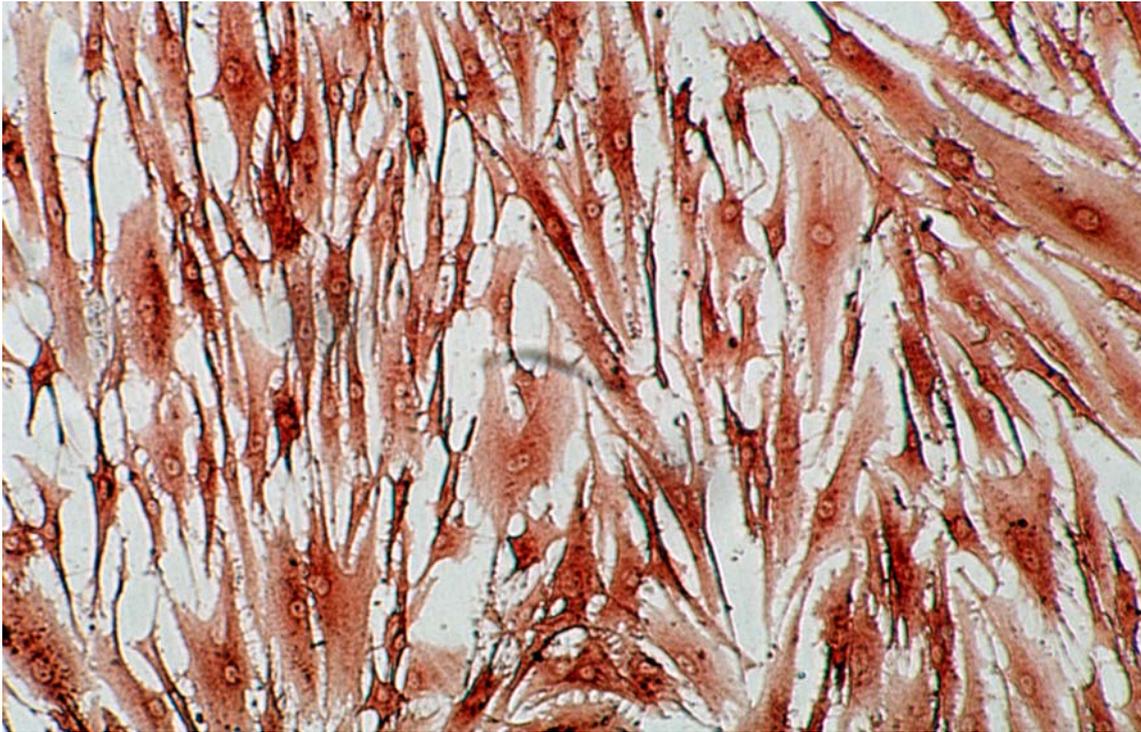
Die Ergebnisse der PCR-Analyse für die Kollagene Typ-I und Typ-II sollten immunhistochemisch erneut bestätigt werden.

Im Vorfeld der Versuche mit Meniskuszellkulturen wurde die Funktion der einzelnen Antikörper durch Positivkontrollen bestätigt.

#### **3.3.2. ASO2**

Dieser Versuch wurde mit Meniskuszellen von drei unterschiedlichen Patienten durchgeführt (n=3).

Der Versuch mit diesem Antikörper lieferte bei allen drei Patientenlinien 8EK, 8ER und 8KB stark gefärbte Zellen ohne jegliche Hintergrundfärbung. Es wurden alle Zellen angefärbt, was diese als Zellen mesenchymaler Herkunft identifiziert.



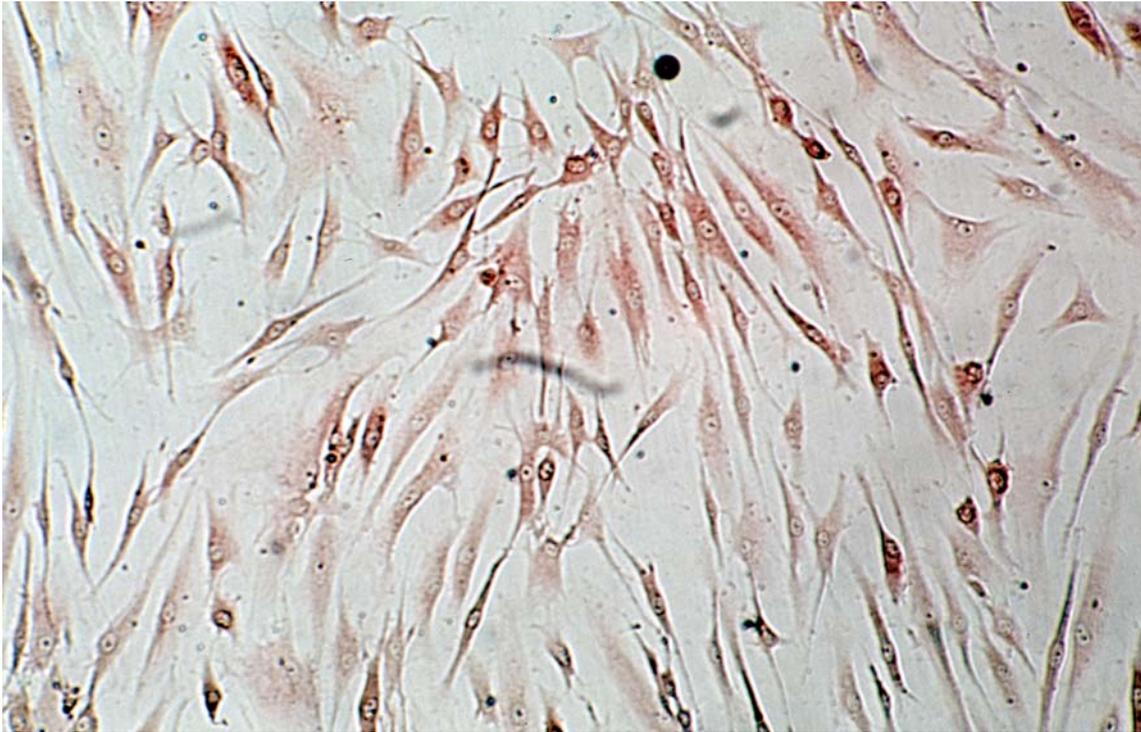
**Abbildung 23:** Meniskuszellen des Patienten 8KB inkubiert mit AS02 Antikörper. 27 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Anfärbung der Zellen.

**Tabelle 19:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit AS02.  
keine Anfärbung: - Färbung positiv: +

Patientencode	Anfärbung	Negativkontrolle
8ER	+	-
8EK	+	-
8KB	+	-

### 3.3.3. Kollagen Typ-I

Die immunhistochemischen Färbungen mit Kollagen Typ I wurden bei den drei Patientenzelllinien 8EK, 8ER und 8KB durchgeführt. Eine Anfärbung der Zellen wurde bei allen drei Zelllinien beobachtet. Die Ergebnisse für Kollagen Typ I aus der PCR-Analyse dieser drei Zelllinien konnten bestätigt werden.



**Abbildung 24:** Meniskuszellen des Patienten 8ER inkubiert mit Kollagen-I-Antikörpern. 29 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Anfärbung der Zellen.

**Tabelle 20:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Kollagen Typ-I. Keine Anfärbung: - Färbung positiv: +

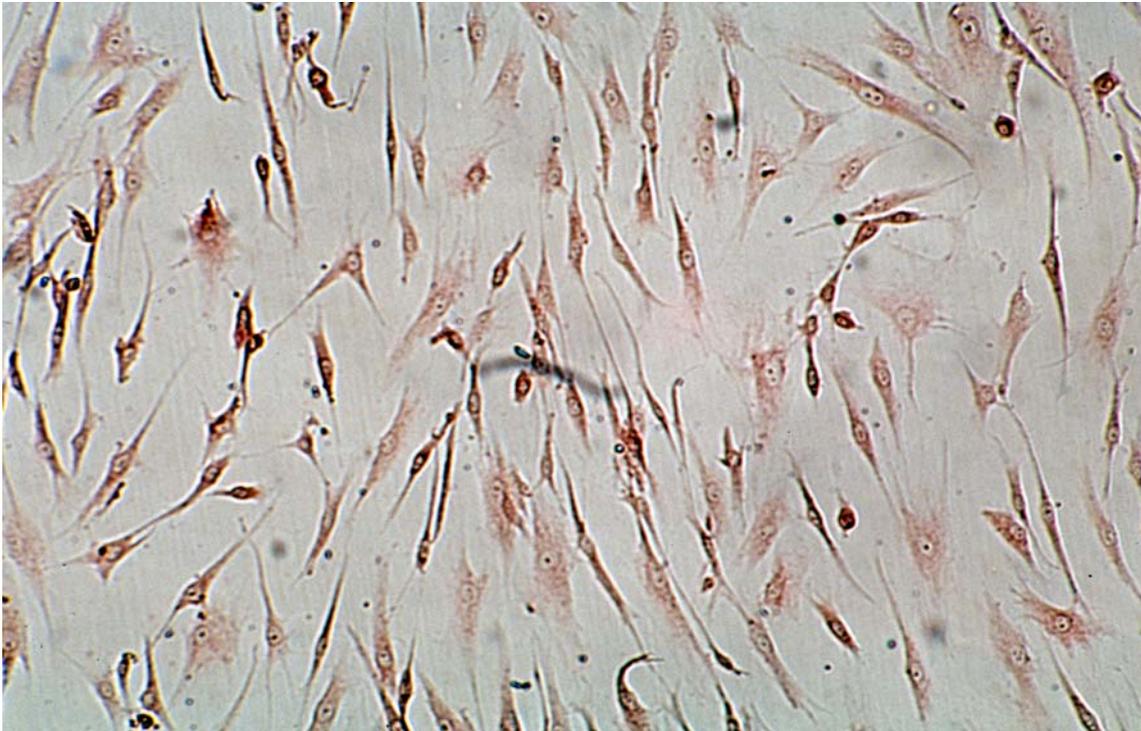
Patientencode	Anfärbung	Negativkontrolle
8EK	+	-
8ER	+	-
8KB	+	-

### 3.3.4. Kollagen Typ-II

Das Ergebnis dieser Färbung war bei den Patienten 8EK und 8KB positiv. Bei den Zellen des Patienten 8ER hingegen konnte keine Anfärbung beobachtet werden. Die Negativkontrollen aller drei Proben zeigten ebenfalls keine Anfärbung.

In der PCR-Analyse des Patienten 8ER konnte für Kollagen Typ-II ebenfalls keine Signalanhebung verzeichnet werden. Der immunhistochemische Nach-

weis von Kollagen Typ-II für die Patienten 8EK und 8KB korreliert mit einer deutlichen Signalstärke für den entsprechenden Primer bei der RT-PCR.



**Abbildung 25:** Meniskuszellen des Patienten 8KB inkubiert mit Kollagen II Antikörpern. 26 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Anfärbung der Zellen.

**Tabelle 21:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit Kollagen Typ II.  
Keine Anfärbung: - Färbung positiv: +

Patientencode	Anfärbung	Negativkontrolle
8ER	-	-
8EK	+	-
8KB	+	-

### 3.3.5. CD11b

Um eine mögliche Kontamination der Zellkulturen mit anderen Zelllinien wie Makrophagen, Granulozyten oder aktivierten Lymphozyten detektieren zu kön-

nen, wurden die Zellkulturen von drei Patienten mit dem Antikörper CD11b gefärbt. Eine Anfärbung könnte bei keiner der Zellkulturen festgestellt werden.



**Abbildung 26:** Meniskuszellen des Patienten 8EK inkubiert mit CD11b Antikörpern. 27 Tage in Kultur. 60-fache Vergrößerung. Keine Anfärbung der Zellen.

**Tabelle 22:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung mit CD11b.  
Keine Anfärbung: - Färbung positiv: +

Patientencode	Anfärbung	Negativkontrolle
8EK	-	-
8ER	-	-
8KB	-	-

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Es ist in den Versuchen gelungen, humane Fibrochondrozyten aus Menisken zu extrahieren und diese in Zellkultur zu übernehmen. Durch immunhistochemische Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper AS02 wurde gezeigt, dass

die Zellkulturen aus mesenchymalen Zellen bestehen. Andere Zelllinien wie Makrophagen und Endothelzellen wurden durch die Färbung mit dem Antikörper CD11B in der Zellkultur ausgeschlossen.

Kollagen I und Kollagen II wurden ebenfalls immunhistochemisch nachgewiesen.

Auf der Transkriptebene wurde die Expression von Kollagenen und von anabolen und katabolen Faktoren bei elf verschiedenen Patientenkulturen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass humane Meniskuszellen die Kollagene Typ-I, -II, -III und -VI exprimieren, während Kollagen Typ -X bei keiner Zelllinie nachgewiesen wurde.

Die RT-PCR zeigt für die Faktoren VEGF, FGF-1 und -2, TGF- $\beta$ 1, und MMP-III und -XIII bei allen elf Zellkulturen durchweg eine deutliche Signalstärke, während IGF-I und -II, iNOS und MMP-I nur vereinzelt nachweisbar waren und für PDGF-AB keine Signalanhebung zu verzeichnen war.

## **IV. Diskussion**

### **4.1 Einführung**

Während der menschliche Meniskus des Kniegelenks lange als funktionsloser Überrest muskulären Ursprungs galt, ist man sich heute der wichtigen Rolle des Meniskus bei der Übertragung von Kräften vom Oberschenkel auf den Unterschenkel, der Kniestabilität und der Schockabsorption bewusst (Arnoczky et al., 1988). Bei Meniskusverletzungen zielt die Therapie in erster Linie auf die Schmerzreduktion sowie auf die Wiederherstellung der Beweglichkeit im Gelenk und der Kniegelenksfunktion (Rupp et al., 2002). Verletzungen, die in äußeren, vaskularisierten Anteilen der Menisken entstehen, können durch Kapillareinsprossungen und erneute Faserknorpelbildung heilen (Hough et al., 1990). Risse, die in zentralen Anteilen der Menisken vorkommen heilen hingegen erfahrungsgemäß nicht und führen im Kniegelenk zu Degenerationen (Arnoczky et al., 1988). Im Meniskusgewebe sind nach Rissen unterschiedliche pathologische Prozesse sowohl biochemischer als auch ultrastruktureller Natur nachgewiesen worden (Arnoczky et al., 1988; Ghadially et al., 1983).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass gegenüber der totalen Meniskektomie eine Meniskus erhaltende Therapie langfristig ein geringeres Arthroserisiko aufweist (McGinity et al., 1977), war es von wesentlicher Bedeutung, dass intraoperativ möglichst viel Meniskusgewebe erhalten wird (McCarty et al., 2002). Dies machte neue Therapieansätze notwendig.

Technisch realisierbar wurden die partielle und subtotale Meniskektomie sowie die Meniskusnaht mit der Einführung der Arthroskopie. Sie gelten heute als die Standardoperationsverfahren (Rupp et al., 2002). Aufgrund des gut dokumentierten Arthroserisikos nach totaler Meniskektomie wird bei Verlust oder fehlender Indikation für eine Meniskus erhaltende Therapie eine Meniskusersatztherapie angestrebt (Rodeo 2001).

Für den Ersatz des Meniskus wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Materialien auf Ihre Eignung überprüft. So wurden neben allogenen Transplantaten (Arnoczky et al., 1990; Rupp et al., 2002) auch autologe Transplantate

(Kohn et al., 1992; Kohn et al., 1997) und permanente Implantate untersucht (Messner 1994). Klinische Anwendung fand bisher neben allogenen Transplantaten auch das Kollagenmeniskusimplantat (CMI), das über ein Aufbereitungsverfahren aus der Achillessehne von Rindern hergestellt wird (Stone et al., 1992).

Die genannten Ersatztherapien weisen jedoch noch keine hinreichenden, langfristig knorpelprotektiven Eigenschaften auf.

Angesichts dessen stellt das Tissue Engineering beim Meniskus einen hoffnungsvollen, alternativen Forschungszweig dar. Hierbei werden Ausgangszellen aus dem Meniskus extrahiert und unter drei-dimensionalen Kulturbedingung expandiert. Für diese ist nachgewiesen worden, dass sie ihren differenzierten Phänotyp ausbilden und extrazelluläre Matrix bilden können (Webber 1990). Es wurden ebenfalls verschiedene Materialien auf ihre Eignung als Zellträger untersucht. Insbesondere im Hinblick auf den Einsatz von Wachstumsfaktoren auf kultivierte Meniskuszellen (Arnoczky 1999; Nakata et al., 2001, Sweigart et al., 2001) ist es relevant, die Eigenschaften der nativen Meniskuszellen ohne den Einfluss von Wachstumsfaktoren zu kennen. Dies bewog uns dazu, eine umfassendere Analyse des genetischen Expressionsmusters von Meniskuszellen vorzunehmen.

Zunächst kultivierten wir Zellkulturen aus dem Meniskus von elf unterschiedlichen Patienten. Die gezüchteten Zellkulturen analysierten wir daraufhin per RT-PCR und teilweise immunhistochemisch.

In der RT-PCR wurden die Kulturen von elf Patientenlinien (n=11) auf die Expression von Kollagen Typ-I, -II, -III, -VI und -X, FGF-1 und -2, VEGF, PDGF-AB, BMP-2, IGF-I und -II, iNOS, TGF- $\beta$ 1, MMP-I, -III und -XIII untersucht.

Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse erfolgten immunhistochemische Analysen von drei Patientenkulturen (n=3). Die Darstellung der Meniskuszellen gelang mit dem fibroblastenspezifischen Antikörper AS02 (Saalbach et al., 1996). Zur Detektion von Makrophagen, Leukozyten und Granulozyten in der Zellkultur kam der Antikörper CD11b zum Einsatz. Immunhistochemisch wurden die drei Zellkulturen ebenfalls auf die Kollagene Typ-I und -II untersucht.

## 4.2. Beurteilung der Methoden

### 4.2.1. Zellkultur

Bei der in vitro Untersuchung der Zellen ist der Erhalt der primären Kulturzusammensetzung von besonderem Interesse. Durch zu häufiges Passagieren der Zellen in Subkulturen können Zellarten wie z.B. Makrophagen, die besser an die Kulturbedingungen angepasst sind schneller wachsen andere Zellarten mit langsamerem Wachstum überwuchern. Um die Zusammensetzung der Zellkulturen möglichst nah an ihren in vivo Verhältnissen zu belassen und diese Art der Selektion zu vermeiden wurden die Zellen für die PCR-Analysen in die erste Subkultur passagiert und danach untersucht.

Eine Verunreinigung durch hämatopoetische Zellen ist durch die Tatsache, dass diese nicht adhärent wachsen und deshalb beim ersten Mediumwechsel ausgewaschen werden, nicht gegeben. Zusätzlich wurden hämatopoetische Zellen durch die Färbung mit dem Antikörper CD11b ausgeschlossen.

### 4.2.2. PCR

Die PCR hat sich als eine bewährte Methode etabliert, die in vielen unterschiedlichen Bereichen der Medizin eingesetzt wird. Der Vorteil der PCR besteht darin, dass bereits sehr geringe Mengen an RNA nachgewiesen werden können. Auch ist sie auf posttranslationelle Schritte zur Synthese eines Proteins nicht angewiesen. Dies führt jedoch ebenfalls dazu, dass durch die PCR eher falsch positive Ergebnisse erzielt werden können, da durch Kontamination oder unspezifische Amplifikation PCR-Produkte gebildet werden, die unter Umständen von den erwarteten Produkten nicht zu unterscheiden sind. Das Ergebnis der PCR hängt in erster Linie von der Qualität der cDNA und der Affinität der Primerpaare zu dieser ab. Durch die Berechnung theoretisch optimaler Annealingtemperaturen und variierender Zykluszahlen wurde versucht, für jedes Primerpaar die optimalen Bedingungen zu schaffen.

Nach der Extraktion wurde die Menge der eluierten RNA im Spektrophotometer bestimmt und in der entsprechenden Menge für die Umschreibung in cDNA eingesetzt.

Die Qualität der extrahierten RNA wurde anhand des Extinktionskoeffizienten 260/280 nm bestimmt. Dieser sollte Werte zwischen 1,5 und 2,0 aufweisen. Größere Werte weisen auf eine Kontamination mit Salzen, kleinere Werte auf Verunreinigung mit Proteinen hin. Die Koeffizienten waren jeweils im Normbereich angesiedelt, sodass von der Extraktion reiner und intakter RNA ausgegangen werden konnte.

#### 4.2.3. Immunhistochemie

Zur Bestätigung der Ergebnisse der RT-PCR wurden exemplarisch drei unterschiedliche Zelllinien (n=3) immunhistochemisch untersucht.

Die kultivierten Zellreihen von drei verschiedenen Patienten wurden mit dem fibroblastenspezifischen Antikörper AS02 gefärbt. Dieser bindet an ein 30-35 kDa großes, membrangebundenes Protein humaner Fibroblasten (Saalbach et al., 1996). Die Spezifität des Antikörpers ist ebenfalls für Zellen aus unterschiedlichen Passagen nachgewiesen.

Der Antikörper Cd11b reagiert mit einem Adhäsionsglycoprotein der Zellmembran von Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und aktivierten Lymphozyten und markiert diese.

Ein zuverlässiges Ergebnis kann durch eine Reihe von Fehlermöglichkeiten bei der Durchführung der Färbung verhindert werden.

Anhand von Positivkontrollen wurden die Antikörper vor der Durchführung der Färbung mit Patientenkulturen zunächst überprüft.

Während der immunhistochemischen Färbung erfolgte ebenfalls die Durchführung von Negativkontrollen für die jeweilige Zelllinie. Hier wurde anstelle des Primärantikörpers 0,1% BSA-Lösung aufgetragen.

Bei der Zellaussaat muss einerseits beachtet werden, dass der Zellrasen nicht zu dicht bewachsen ist, da dies eine Differenzierung zwischen angefärbten Zellen und eventuell gefärbtem Hintergrund unmöglich macht.

Andererseits gehen bei den zahlreichen Spülvorgängen während der Färbung auch viele Zellen verloren, weshalb vorher auch eine ausreichende Zellzahl in den 24er-Wells vorhanden sein muss um ein aussagekräftiges Ergebnis verzeichnen zu können.

### **4.3. Beurteilung der Ergebnisse**

#### **4.3.1. Zellkultur**

Nakata und Kollegen (2001) untersuchten mit unterschiedlichen Protokollen das in vitro Wachstum von zerkleinerten humanen Meniskuszellen. Der Meniskus wurde hier ebenfalls in 2 bis 3 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert und für zwei bis drei Stunden in 0,4%iger Collagenase verdaut. Für die Auswuchszeit der Zellen wird ein Zeitrahmen von 7 bis 14 Tagen angegeben. Ihre Schilderungen decken sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit, wobei in unseren Versuchen die Ausbeute an Zellen durch einen längeren Verdau von vier bis fünf Stunden verbessert werden konnte. Hierbei erwies sich, dass bei der Kombination der Nährmedien eine äquivalente Menge von DMEM und F12, welche auch in unseren Versuchen verwendet wurde, in der Kultur die höchste Proliferationsrate zeigte.

Beachtenswert an unseren Versuchsreihen ist auch, dass bei der Wachstumsrate der Zellen weder die Alters- noch die Geschlechtsunterschiede innerhalb der Patientengruppe eine bestimmte Zuordnung offenbarten. So waren z. B. die Zellen aus der Probe der ältesten untersuchten Patientin vergleichsweise schnell konfluent, während auch andere Proben von relativ alten Patienten länger brauchten.

## 4.3.2. PCR

### 4.3.2.1. Kollagen Typ-I ( $\alpha 1$ )

Kollagen Typ-I nimmt einen Anteil von 90% des gesamten Körperkollagens ein und ist in unterschiedlichen Geweben wie der Haut (Fleischmajer et al., 1990), im Knochen, in Sehnen sowie Faszien, in Organen und Organkapseln, im Dentin und in der Kornea sowie in den großen Gefäßen vertreten. Nach Sweigart und Athanasiou (2001) ist Kollagen Typ-I mit einem Anteil von über 90% am Gesamtkollagen auch im Meniskus dominierend.

Es bildet in den oberflächlicheren Schichten im Meniskus radial verlaufende Fasern, die aufgrund ihrer besonderen Anordnung das Meniskusgewebe vor aufkommenden Kompressionskräften schützen und die Entstehung von Längsrissen verhindern (Fithian et al., 1990). Aspden (1985) konnte mit Modellen darlegen, wie vertikal aufkommende Kräfte im Meniskus in zirkuläre überführt werden und von den in den tieferen Schichten ebenfalls zirkulär verlaufenden Kollagenfasern aufgefangen werden.

Eyre und Muir belegten bereits 1975 in histologischen Untersuchungen von porcinen Menisken, dass Typ-I Kollagen im Meniskus das dominierende Kollagen darstellt, während Kollagen Typ-II im Gelenkknorpel vorherrscht.

Der Nachweis von Kollagen Typ-I gelang in der vorliegenden Studie für alle untersuchten Zellkulturen mit einer einheitlich gut ausgeprägten Signalanhebung in der RT-PCR. Die humanen Meniskuszellen in erster Subkultur haben die Eigenschaft bewahrt, Kollagen Typ-I zu exprimieren

Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Nakata et al. (2001), die ebenfalls die Expression von Kollagen I bei in vitro gezüchteten humanen Meniskuszellen nachweisen konnten.

### 4.3.2.2. Kollagen Typ-II

Die PCR mit dem Primer für Kollagen II lieferte bei acht der elf (n=11) untersuchten Zellreihen Banden in der erwarteten Größe von 414 bp. Bei vier Zellkulturen konnte das Kollagen nicht nachgewiesen werden. Den Angaben von

McDevitt und Webber (1990) zufolge ist Kollagen II im Gegensatz zu Kollagen I nicht überall im Meniskus vorhanden, sondern nur in geringen Mengen in der inneren, nicht vaskularisierten Region. Die schwächeren Banden bei vier Zellkulturen in der Gelelektrophorese bestätigen die These, dass auch Kollagen II von Meniskuszellen exprimiert wird, wenn auch wesentlich weniger als Kollagen I. Die voneinander abweichende Stärke der Banden kann sowohl auf quantitativen als auch regional im Meniskus variierenden Expressionsunterschieden bei den einzelnen Patienten beruhen. Cheung und Kollegen (Cheung et al., 1987) konnten anhand histologischer Gewebeanalysen im bovinen Meniskus darlegen, dass Kollagen Typ-II im inneren Drittel der Menisken dominiert, während in dem verbleibenden restlichen Gewebe Kollagen Typ-I vorherrscht.

Bland und Ashhurst (1996) entdeckten durch Untersuchungen an Menisken von Kaninchen eine Zunahme der mRNA von Typ-II Kollagen während der postnatalen Entwicklungsphase. Hier ist auch eine Assoziation zwischen dem Anstieg der Kniegelenksbelastung und der Ausbildung von Kollagen Typ-II im Meniskus zu verzeichnen.

#### **4.3.2.3. Kollagen Typ-III**

Kollagen Typ III bildet Retikulinfasern und ist als Lamina fibroreticularis in verschiedenen Gewebearten unterhalb der Basallamina lokalisiert. Es kommt in unterschiedlichen Geweben wie den lymphatischen Organen, der Haut, den Herzklappen, den großen Gefäßen, dem Darm sowie dem Uterus vor.

Die PCR mit dem Primerpaar für Kollagen III lieferte in unserer Studie bei allen Patientenproben einheitliche, deutliche Banden in der entsprechenden Länge von 449 Basenpaaren; von allen Meniskuszelllinien wurde Kollagen Typ-III exprimiert. Diese Ergebnisse werden sowohl durch die Beobachtungen von Nakata et al. (2001) als auch McDevitt et al. (2002) gestützt, die das Vorkommen und die Verteilung von unterschiedlichen fibrillären Kollagenen im Meniskus analysierten. McDevitt und Kollegen gelang der Nachweis von Kollagen Typ-III im bovinen Meniskusgewebe, während die Arbeitsgruppe von Nakata mRNA von Typ-III Kollagen bei ebenfalls in vitro gezüchteten humanen Menis-

kuszellen detektierte. Kollagen Typ-III nimmt einen Anteil von weniger als 1% am Gesamtkollagen im Meniskus ein (Cheung et al., 1987).

Wu und Eyre hatten bereits 1987 Kollagen Typ-III in geringen Mengen im bovinen Meniskusgewebe histologisch nachgewiesen. Im Meniskus findet sich nach ihren Angaben Kollagen Typ-III vorwiegend perizellulär und in den oberflächlichen Zellschichten. Der deutliche Nachweis von diesem fibrillären Kollagen in der vorliegenden Studie kann durch die Tatsache, dass die Zellen in Monolayerkulturen expandiert wurden begünstigt worden sein, da sie nicht wie unter in-vivo Bedingungen im dreidimensionalen Zellverband vermehrt wurden.

#### **4.3.2.4. Kollagen Typ-VI**

Kollagen VI besitzt mehrere einzigartige Eigenschaften, die es von allen bisher bekannten Kollagenen unterscheidet. So hat es zum einen eine relativ kurze, tripelhelikale Domäne, die weniger als die Hälfte der Gesamtmasse des Proteins ausmacht. Zum anderen fügen sich Kollagen-VI-Monomere zu Oligomeren zusammen, die die Blocks von Mikrofibrillen darstellen, die man im Gewebe und in Zellkulturen findet. Die breite Streuung von Kollagen VI auf die unterschiedlichsten Gewebearten wurde ursprünglich in biochemischen Studien herausgefunden. Das Vorkommen des Proteins reicht von der Plazenta, großen Blutgefäßen, Uterus, Leber, Niere, Haut, Muskel (Marton und Arnason, 1982) bis zur Kornea. Im Knorpel ist Kollagen Typ-VI die wichtigste Matrixkomponente in der Umgebung der Knorpelzellen, da es die Chondrozyten mit der extrazellulären Matrix verbindet (Ulrich-Vinther et al., 2003). Im Meniskus bildet Kollagen Typ-VI 2% des Trockengewichts (Wu et al., 1987) und bindet an Meniskuszellen sowie Matrixbestandteile wie Hyaluronsäure (McDevitt et al., 1991). Im Fasernknorpel und anderen Geweben steigt während unterschiedlicher Umbauprozesse die Genexpression sowie die Proteinbildung von Kollagen Typ-VI an (Willey et al., 2001).

McDevitt und Webber (1990) konnten anhand immunhistochemischen Färbungen an Menisken gesunder Hunde Kollagen Typ-VI in der Interterritorialregion zwischen den Zellen nachweisen.

Bei allen von uns untersuchten Meniskuszellkulturen konnte die Expression von Kollagen VI nachgewiesen werden. Die Banden lagen in der berechneten Größe von 781 Basenpaaren und waren deutlich in ihrer Ausprägung. Die tierexperimentellen, histologischen Untersuchungen konnten durch unsere Studie auf humane Fibrochondrozyten in Zellkultur übertragen werden.

#### **4.3.2.5. Kollagen Typ-X**

Kollagen Typ-X wird aufgrund seines nahezu alleinigen Vorkommens in der Nähe von kalzifiziertem Knorpel eine Rolle bei der Mineralisation zugeschrieben. Die Arbeitsgruppe von von der Mark hatte bereits 1992 (von der Mark et al., 1992) nachgewiesen, dass Typ-X Kollagen in der Umgebung von Chondrozyten in osteoarthrotischem Knorpel vorkommt, nicht jedoch im gesunden Knorpel. Frisch isolierte Chondrozyten aus osteoarthrotischem Knorpel produzierten in ihren Untersuchungen in erster Linie Kollagen Typ-X, während in der gesunden Kontrollgruppe Kollagen Typ-II dominierte.

Im Modell mit Kaninchen konnten die Arbeitsgruppen von Hellio Le Graverand (2001) und Gayo (2000) Kollagen X im Meniskus nachweisen, dies jedoch im osteoarthritischen bzw. kalzifizierten Gelenk.

Die PCR-Analysen unserer untersuchten elf Meniskuszellkulturen (n=11) ergaben kein positives Ergebnis für Kollagen Typ-X. Im humanen Meniskusgewebe wird Kollagen Typ-X nicht exprimiert.

#### **4.3.2.6. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Der Wachstumsfaktor VEGF entfaltet seine biologische Aktivität vorrangig in Zellen endothelialer Herkunft und spielt als Mediator eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese. VEGF ist auch bekannt als vaskulärer Permeabilitätsfaktor, da es durch Proteinextravasation (Keck et al., 1989), erhöhte hydraulische Führung (Bates et al., 1997) und Fenestration (Esser et al., 1998) zu einem potenten Faktor wird. Es ist ebenfalls ein potentes Mitogen für humane mikrovaskuläre Endothelzellen (Conn et al., 1990) und induziert endotheliale Zellmigration und

Wachstum durch Hochregulierung diverser Integrinrezeptoren. Eine wichtige Rolle spielt VEGF auch beim Überleben der Endothelzellen, indem es die Expression von dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 induziert (Gerber et al., 1998).

Viele unterschiedliche Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten sind in der Lage VEGF zu produzieren (Berse et al., 1992). Während es in normaler menschlicher Haut nur gering exprimiert wird, wird die Expression in Keratinozyten während der Wundheilung stark hochreguliert (Brown et al., 1992). VEGF ist wahrscheinlich entscheidend für die Angiogenese während der Proliferationsphase der Formation von granulärem Gewebe bei der Wundheilung (Nissen et al., 1998). Der niedrige Sauerstoffpartialdruck, der in lädiertem, hypoxischen Gewebe vorhanden ist, stellt den Hauptfaktor bei der Induktion von diesem Wachstumsfaktor dar (Dettmar, 1997). Wahrscheinlich wird dieser Prozess teilweise durch TGF- $\beta$  vermittelt (Li et al., 2003).

In Tierversuchen haben Becker et al. (2004) und Hofstaetter et al. (2004) VEGF-mRNA im Meniskus von Kaninchen nachweisen können. Die Versuchstiere in der Arbeitsgruppe von Becker hatten zuvor an einem Meniskus einen Schnitt erhalten. Bei den operierten Kaninchen konnte VEGF sowohl im lädierten als auch im kontralateralen Meniskus detektiert werden.

Hingegen konnte im Tierversuch durch die lokale Applikation von VEGF in avaskuläre Zonen von lädierten Menisken keine verbesserte Wundheilung erreicht werden (Petersen et al., 2007)

Die PCR-Analyse war bei allen untersuchten (n=11) Zellkulturen positiv; VEGF wird von Meniskuszellen exprimiert. Die in der Gelelektrophorese aufgetretenen Doppelbanden sind auf alternative Splice-Varianten zurückzuführen. Diese entstehen während der Transkription, wenn variierende Genabschnitte als Introns oder Exons durch Splice-faktoren (Proteine) definiert werden. Auf diese Weise können aus einem einzigem Gen verschiedene mRNA-Moleküle und durch deren Translation auch Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften gebildet werden. Bei dem Gen für VEGF kennt man heute bereits mehrere Splice-Varianten wie VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> oder VEGF<sub>189</sub>, die sich z. B. durch ihre Bindungsfähigkeit gegenüber Heparin unterscheiden (Eckhart et al., 1999).

#### **4.3.2.7. Acidic und Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-1 und FGF-2)**

Die FGF-Familie umfasst 20 strukturell homologe und funktionell unterschiedliche kleine Polypeptide mit einem zentralen Kern aus 140 Aminosäuren. Die ersten beiden, acidic FGF (FGF-1) und basic FGF (FGF-2), spielen in der Angiogenese eine Rolle (Friesel et al., 1995).

Ihre Sequenz ist zu 55 % homolog und sie sind biologisch in ähnlicher Weise aktiv (Seno et al., 1990). Eine Eigenschaft dieser Moleküle ist, dass sie mit heparin-ähnlichen Molekülen interagieren (Folkmann et al., 1988). Synthetisiert werden FGF-1 und FGF-2 von unterschiedlichen Zelltypen, die alle in den Prozess der Angiogenese und der Wundheilung involviert sind. Diese sind unter anderem inflammatorische Zellen (Blotnick et al., 1994), vaskuläre Endothelzellen (Schweigerer et al., 1987) und dermale Fibroblasten (Kandel et al., 1991) und ebenfalls mechanisch verwundeten Endothelzellen (McNeil et al., 1989). Die Faktoren haben eine hohe mitogene Wirkung auf Endothelzellen (Schweigerer et al., 1987) und fördern ihre Proliferation und Differenzierung (Kanda et al., 1996). Während der frühen Phase der Wundheilung wird die endotheliale Zellmigration durch eine Hochregulierung des Plasminogenaktivators vom Urokinasetyp vermittelt, welches zur Bildung von Gerinnseln und zur Ablagerung von Fibrin führt und die Migration der Endothelzellen durch die Fibrinanlagerungen erleichtert (Gualandris und Presta, 1995). Während der Formation von Granulationsgewebe vermittelt FGF-2 die Endothelzellmigration auch durch Induktion des Zelloberflächenintegrins  $\alpha v \beta 3$ , das die Bindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix vermittelt (Sepp et al., 1994).

In unseren Versuchen wurde sowohl die Expression von FGF-1, dem acidic FGF, und FGF-2, dem basic FGF untersucht. Sowohl FGF-1 als auch FGF-2 wurden bei allen Zellkulturen (n=11) mit deutlich positivem Ergebnis in der PCR-Analyse nachgewiesen.

Imler et al. (2004) wiesen in einer Studie nach, dass neben anderen Wachstumsfaktoren auch basic FGF eine, wenn auch vergleichsweise schwache, anabole Wirkung auf Fibrochondrozyten ausübt. Dies zeigte sich in Form von erhöhter Matrixproduktion.

Im Versuch mit menschlichen fetalen Fibrochondrozyten konnten Ye et al. (2007) zeigen, dass eine Kombination der Wachstumsfaktoren basic FGF, IGF-I, IGF-II und TGF- $\beta$ 1 in entsprechend optimaler Konzentration die Amplifikation von Meniskuszellen in künstlichem Milieu wesentlich verbessert.

Unsere PCR-Analysen zeigen, dass Meniskuszellen auch selbst fähig sind FGF-1 und FGF-2 in der Zellkultur zu exprimieren.

#### **4.3.2.8. Transforming Growth Factor 1 (TGF- $\beta$ 1)**

Aufgrund seiner vielseitigen, potenten Auswirkungen ist TGF- $\beta$  einer der wichtigsten Mediatoren für die Wundheilung. Seine bedeutende Rolle in der Modulation der Angiogenese während der Wundheilung erlangt der Faktor durch die Regulierung der Zellproliferation, Zellmigration und die Bildung von kapillären Tubuli (Li et al., 2003). Von Säugern werden drei verschiedene Isoformen von TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3) exprimiert, die sich bezüglich ihrer Aminosäuresequenz durch einen hohen Grad der Übereinstimmung auszeichnen. Bei den meisten untersuchten Zellkulturen zeigen alle TGF- $\beta$ -Formen ähnliche biologische Aktivitäten und binden auch an den gleichen gemeinsamen Rezeptor. Jedoch ist die Expression der Faktoren in vivo in unterschiedlichen Zelltypen und auch in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung differenzierter reguliert, was zu der Annahme führt, dass sie auch biologisch eine unterschiedliche Rolle spielen (Frank et al., 1996). TGF- $\beta$ s zeigten bedeutende Auswirkungen auf die Angiogenese in porcinen Hautwunden (Roesel und Nanney, 1995) sowie im gleichen Modell mit Ratten (Haroon et al., 1999). Auch lokal injiziert induziert TGF- $\beta$  die Bildung von Granulationsgewebe und Angiogenese (Roberts et al., 1986). Unterschiede gibt es in der lokalen Expression der TGF- $\beta$ s in normalem oder verwundetem Gewebe.

Die Expression der einzelnen Isoformen und der Rezeptoren in der Wunde ist auch räumlich und zeitlich differenzierter geregelt; während z. B. TGF- $\beta$ 1 in der Frühphase auftritt, folgt TGF- $\beta$ 3 erst spät (Frank et al., 1996). Neuere Untersuchungen an TGF- $\beta$ -Rezeptor-defizienten Mäusen zeigten eine erhöhte Proliferationsrate von Endothelzellen, eingeschränkte Zellmigration und beeinträchtigte

Produktion von extrazellulärer Matrix und bestätigten des Weiteren die Bedeutung des TGF- $\beta$ -Rezeptors in TGF- $\beta$ -induzierter Angiogenese (Larsson et al., 2001). Die Verwirrung um die Wirkungen des TGF- $\beta$ -Rezeptors könnte zum Teil auf die unterschiedlichen Modellsysteme zurückzuführen sein. Während es in vivo die Angiogenese induziert (Haroon et al., 1999) inhibiert es in vitro die endotheliale Zellproliferation (Taipale und Keski-Oja, 1996). Der stimulatorische Effekt von TGF- $\beta$  auf die Angiogenese in vivo könnte teilweise in indirekter Art durch Aktivierung inflammatorischer Zellen geschehen, die dann erst sekundär angiogene Faktoren wie z. B. VEGF, FGF und PDGF freisetzen (Kim et al., 2001). TGF- $\beta$  selbst erhöht ebenfalls die Sekretion von VEGF in dermalen Fibroblasten (Trompezinsky et al., 2000) und bewirkt, in Kombination mit Hypoxie, die Promoteraktivität von humanem VEGF (Sanchez-Elsner et al., 2001). Pangborn und Athanasiou (2005) zeigten, dass TGF- $\beta$ 1 einen potenten Faktor zur Vermehrung von extrazellulärer Matrix darstellt. In ihren Versuchsreihen wurden von Fibrochondrozyten, die dem Wachstumsfaktor exponiert wurden, sowohl Kollagene als auch Glycosaminoglycane vermehrt gebildet. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls von Stewart et al. (2007) bestätigt.

Meniskuszellen, denen per Gentransduktion durch Adenoviren die cDNA von TGF- $\beta$ 1 transferiert wurde, zeigten nach Einbettung auf eine Matrix bestehend aus Kollagen Typ I und Gluksaminoglykanen eine erhöhte Kollagen Typ-II sowie Proteoglycanproduktion (Steinert et al., 2007).

Die PCR mit dem Primer TGF- $\beta$ 1 ergab in unseren Untersuchungen ein deutlich positives Ergebnis mit einheitlicher Bandenstärke bei allen Zellreihen (n=11); TGF- $\beta$ 1 wird von humanen Fibrochondrozyten selbst exprimiert.

Gegen die Vermutung, dass die TGF- $\beta$ 1-Expression aufgrund der bei den Patienten vorbestehenden Arthrose hochreguliert wurde sprechen die Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie von Hellio Le Graverand und Kollegen (2001). Kaninchen wurden in dieser Studie zwecks Induktion einer Kniegelenksarthrose einer vorderen Kreuzbandresektion unterzogen. Im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren wurde nach Entwicklung einer Gonarthrose keine Erhöhung der mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 1 in den Menisken festgestellt.

#### **4.3.2.9. Insulin-like Growth Factor I und – II (IGF-1 und IGF-II)**

Die Insulin-like growth factors (IGF-I und IGF-II) sind einkettige Polypeptide, die dem Proinsulin strukturell ähnlich sind. Sie regulieren bei einer Vielzahl von Zelltypen die Proliferation und Differenzierung und sind in der Lage, metabolisch insulin-ähnliche Effekte hervorzurufen (Winston et al., 1999). Im Gegensatz zum Insulin werden sie aber von den meisten Gewebetypen produziert und kommen reichlich im Kreislauf vor. Auf diese Weise haben die IGFs das Potential ihre Wirkung sowohl auf endokrinem Wege als auch autokrin und parakrin zu entfalten. Sie binden nicht nur an den IGF-I-Rezeptor sondern auch an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (IGF-II-Rezeptor) und an Insulinrezeptoren. Auch IGF-binding-proteins binden an diese Rezeptoren. Sie werden auch ähnlich wie die IGFs von vielen Zelltypen produziert und modulieren die Bioaktivität der IGFs. IGF-I dient als Progressionsfaktor im Zellzyklus und steht in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF. Die Synthese der IGFs kann unter pathologischen Umständen in bestimmten Zelltypen wie Makrophagen erhöht sein (Rom et al., 1988). So ist z. B. die Bedeutung von IGF-I in der Pathogenese der Lungenfibrose sowohl durch experimentelle als auch klinische Studien nachgewiesen worden (Vanhee et al., 1994). Während die Leber die Hauptquelle für die zirkulierenden IGFs darstellt, spielt die lokale Produktion eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellwachstum und – differenzierung (Cohick und Clemmons, 1993). Die m-RNA von IGF-I und -II konnte neben dem Skelettmuskel auch in humanen Fibroblasten dermalen Herkunft detektiert werden (Lowe, 1991). Außerdem nimmt IGF-I vermutlich auch Einfluss auf die Vermittlung vom Längenwachstum in Knochen (Nilsson et al., 1990). Die Fähigkeit von Fibrochondrozyten auf den Faktor IGF-I mit vermehrter Bildung von extrazellulärer Matrix zu reagieren wurde im Tiermodell mit Rindern von Imler et al. (2004) nachgewiesen.

Um die Wirkung von IGFs auf Knorpel- und Meniskusgewebe zu erforschen werden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Mit Hilfe von nonviralem Gentransfer von IGF-I in Chondrozyten auf Kollagengerüsten erzielten Capito und Spector (2007) eine vermehrte Produktion von Glycosaminoglycanen, Chondrozyten-ähnlichen Zellen sowie eine verbesserte Gewebeformation

In unseren untersuchten Meniskuszellen wurde IGF-I bei drei der elf (n=11) Patientenkulturen nachgewiesen, IGF-II bei einer der elf Zelllinien (n=11). Bemerkenswert ist hier die von Hellio Le Graverand und Mitarbeitern beschriebene Assoziation zwischen einer IGF-II-Suppression und der gesteigerten mRNA-Expression der zytokininduzierbaren NO-Synthase (iNOS) im arthrotischen Kaninchenmeniskus. In der vorliegenden Studie ist iNOS von acht der untersuchten elf Zelllinien exprimiert worden, ein positives PCR-Signal für IGF-II wurde hingegen lediglich bei einer Zellkultur festgestellt. Die Menisken für unsere Zellkulturen sind aus vorwiegend arthrotischen Kniegelenken entnommen und weisen für IGF-II und iNOS ein mit dem tierexperimentellen Modell von Hellio Le Graverand vergleichbares Expressionsmuster auf, sodass sich die Korrelation von vermehrter iNOS- und verminderter IGF-II-Expression ebenfalls im humanen Meniskus wiederfindet..

#### **4.3.2.10. Platelet-Derived Growth Factor AB (PDGF-AB)**

PDGF ist ein potentes Mitogen und ein chemotaktisch wirksamer Faktor für eine Vielzahl von Zellen mesenchymaler Herkunft. Der biologisch aktive Ligand besteht aus zwei Monomeren, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die beiden unterschiedlichen Ketten werden jeweils als A- und B-Kette bezeichnet, wobei die Dimere sich aus den drei möglichen Kombinationen AA, AB und BB zusammensetzen können. Alle drei Formen konnten aus natürlichen Quellen isoliert werden und erwiesen sich als biologisch aktiv (Hart et al., 1990). Die Ketten A und B sind in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuresequenz zu 60% identisch.

Die biologische Aktivität von PDGF wird durch Bindungsrezeptoren an der Zelloberfläche vermittelt. Die bisher identifizierten Rezeptoren sind die Alpha- und Beta-Rezeptoren (Hart et al., 1988). Ähnlich den PDGF-Liganden wird auch von den Rezeptortypen vermutet, dass diese sich erst zu Dimeren formen müssen, um Bindungsstellen mit hoher Affinität zu generieren. Die Dimerisierung der Rezeptoren wird durch die Bindung der Liganden vermittelt, sodass die der Zelle präsentierte PDGF-Isoform entscheidend dafür ist, welche Rezeptorformen

tatsächlich gebildet werden (Eriksson et al., 1992). Die drei potentiellen PDGF-Rezeptordimere weisen auch unterschiedliche Bindungsspezifitäten für die Liganden auf. Während die Alpha-Alpha-Dimere alle drei Isoformen des PDGF-Liganden binden, binden Alpha-Beta-Dimere die Isoformen PDGF-AB und -BB und Beta-Beta-Dimere nur PDGF-BB (Hart et al., 1990).

In Studien wurde nachgewiesen, dass durch die topische Anwendung von PDGF-BB auf Wunden von diabetischen Mäusen, die nur über eingeschränkte Wundheilungskapazitäten verfügen, sowohl die Bildung von dichterem Granulationsgewebe angeregt wird als auch der Prozess des Wundverschlusses beschleunigt wird (Greenhalgh et al., 1990). Beim Menschen konnten diese Effekte bei der Behandlung vom Dekubitus ebenfalls dokumentiert werden.

Aufgrund der vielen variierenden biologischen Aktivitäten, die durch PDGF in kultivierten Zellen stimuliert werden, wird PDGF als eine der Hauptkomponenten in der dermalen Wundheilung angesehen. Neben seinen mitogenen Effekten wirkt PDGF auch chemotaktisch auf Fibroblasten (Seppa et al., 1982), Monozyten und Neutrophile (Deuel et al., 1982).

Unsere PCR-Analyse der elf Zelllinien (n=11) aus humanen Meniskuszellen ergab ein negatives Ergebnis für PDGF. Der Wachstumsfaktor wurde von keiner der Kulturen exprimiert.

Es wurde nachgewiesen, dass PDGF die erhöhte Produktion von extrazellulärer Matrix in kultivierten Fibroblasten stimuliert (Narayanan et al., 1983). Bovine Fibrochondrozyten in Kultur reagierten ebenso mit erhöhter Matrixproduktion, welches anhand des Gesamtproteins und der Proteoglykanproduktion gemessen wurde (Imler et al., 2004).

#### **4.3.2.11. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)**

Die BMPs sind Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie mit mehr als einem Dutzend verwandter Proteine, die über ähnliche Fähigkeiten verfügen (Sandberg et al., 1993). Die meisten dieser Proteine haben Auswirkungen auf die Heilung von Frakturen. BMP-Rezeptoren sind Heterodimere und kommen in zwei unterschiedlichen Formen vor, die wiederum jeweils in unterschiedlichen Isoformen

auftreten und bezüglich ihrer Affinität zum BMP-Liganden variieren. Es wurden mindestens drei Familien nachgewiesen, die ihrer Funktion nach unter anderem an einen oder mehrere BMPs spezifisch binden und die Interaktion mit dem Rezeptor inhibieren (Aspenberg und Forslund, 2000). Die BMPs selbst initiieren in Frakturen die Proliferation und die spätere Differenzierung zu Knochen oder Knorpel. Nachdem ihre Wirkungen auf Knochen und Frakturen genauer untersucht wurde, zeigte sich auch, dass die BMPs eine entscheidende Rolle in der Entwicklungsbiologie spielen. Sie sind an den unterschiedlichsten Prozessen während diversen Entwicklungsphasen beteiligt, die vom Blastulastadium bis zur letzten Feinregulierung der Extremitäten reicht. So führen z. B. Spontanmutationen in Form von Deletionen von BMP-14 oder BMP-5 zu Malformationen im Skelettsystem wie etwa verkürzten Gliedern oder dem Fehlen von bestimmten Knochen (Thomas et al., 1997).

Nakase et al. (2003) entdeckten BMP-2 in osteoarthrotischem humanem Knorpel und wiesen auf die Bedeutung des Faktors bei anabolen Reparaturvorgängen in beschädigtem Knorpelgewebe hin. Blaney Davidson et al. (2007) bestätigten diese Annahme durch in vivo Studien. Sie wiesen nach, dass BMP-2 die Reparatur von lädiertem murinem Knorpel ermöglicht und dabei die intrinsische Reparaturkapazität im defekten Gewebe erhöht.

Im humanen Meniskus wird BMP-2 ebenfalls exprimiert. Unsere PCR-Analyse ergab für alle elf Zellkulturen (n=11) ein durchgehend positives Ergebnis. Während im gesunden Knorpelgewebe die BMP-2-Expression relativ niedrig ist, lässt sich nach mechanischer Verletzung des Knorpels sowie nach osteoarthrotischen Veränderungen eine erhöhte BMP-2-Expression im Gewebe feststellen. Der Arbeitsgruppe von Blaney Davidson (2007) gelang es, BMP-2 als anabole Komponente im pathologisch veränderten Knorpelgewebe zu identifizieren. BMP-2 sorgt hier zwar zunächst ebenfalls für einen vermehrten Matrixabbau; dies erfolgt jedoch im Sinne von Abbau beschädigter Matrixmoleküle, sodass im Knorpel Raum für neu synthetisierte Matrixkomponenten entsteht.

In der vorliegenden Studie konnte für alle untersuchten Meniskuszellkulturen ein positives PCR-Signal für BMP-2 verbucht werden. Angesichts der Tatsache, dass die Spendermenisken aus arthrotisch veränderten Kniegelenken entnom-

men wurden, kann die BMP-2-Expression in den Fibrochondrozyten ebenfalls als eine anabole Antwort auf die arthrosebedingten Degeneration im Meniskus gewertet werden.

#### **4.3.2.12. Inducible Nitric Oxid Synthase (iNOS)**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges Signalmolekül und wird von den diversen Isoformen der Nitric-Oxid-Synthase (NOS) aus L-Arginin synthetisiert. Als Signalmolekül wird es von zwei Calcium-abhängigen Isoformen, der neuronalen und der endothelialen NOS produziert. Das durch Calcium aktivierte Calmodulin bindet und aktiviert vorübergehend NOS-Dimere. Aufgrund der flüchtigen Natur von erhöhten Calciumspiegeln ist die Aktivität des NO sehr kurzlebig. Als ein Vertreter von Inflammation und zellvermittelter Immunität wird NO von Calcium-unabhängigen, zytokininduzierbaren NOS (iNOS) produziert, die von vielen unterschiedlichen Zelltypen unter transkriptionaler Regulierung durch inflammatorische Mediatoren exprimiert werden. Calmodulin ist sogar bei basalen Calciumspiegeln streng an iNOS gebunden, sodass sich iNOS von den anderen Isoformen durch die verlängerte Produktion relativ großer Menge an NO unterscheidet. Das besondere Interesse an der Aufklärung der genauen Regulationsmechanismen von iNOS auf die Synthese von NO findet seine Begründung darin, dass iNOS eine Rolle in der Pathogenese von vielen unterschiedlichen Krankheiten wie Multiple Sklerose, Schlaganfall, Morbus Parkinson, Tuberkulose und Arthritis spielt (Lee et al., 2003). Während einerseits hohe Spiegel an iNOS einen hohen zellulären Schutz gegenüber Mikroorganismen bieten und die homöostatische Antwort auf Hypoxie liefern, führt andererseits die persistierende Aktivierung von iNOS zu bereits toxischen NO-Konzentrationen. Da NO ein freies Radikal darstellt, kann es Proteine, Lipide oder auch DNA oxidieren und seine oxidativ-toxischen Eigenschaften werden durch die Reaktion mit einem anionischen Superoxidradikal noch weiter erhöht (Estevez et al., 1998).

In unseren PCR-Untersuchungen konnte bei acht der untersuchten elf (n=11) Patientenproben aus dem Meniskus die Expression von iNOS nachgewiesen werden.

Hellio Le Graverand et al. (2001) beobachteten im Modell mit Kaninchen, bei denen ein vorderer Kreuzbandschnitt durchgeführt wurde, nach jeweils drei und acht Wochen erhöhte mRNA-Werte für iNOS.

In einer Studie von Kobayashi und seinen Kollegen (2001) konnten bei Patienten mit teilreseziertem medialem Meniskus im Vergleich zu normalen Menisken erhöhte iNOS-Werte festgestellt werden. Dies bestätigt auch die Ergebnisse unserer Arbeit. Bei Osteoarthrose wird im Meniskus vermehrt iNOS produziert (Kobayashi et al., 2001). So sind in fortgeschritteneren Stadien der Arthrose auch proportional größere Mengen an iNOS im Meniskus nachzuweisen. Somit könnte bei den drei Patienten, bei denen iNOS nicht zu detektieren war, die Schädigung durch Gonarthrose im Vergleich zu den anderen Patienten wesentlich geringer ausgeprägt sein.

#### **4.3.2.13. Matrix Metalloproteinasen 1, -3 und -13 (MMP-1, -3, -13)**

Die MMP-Familie umfasst mindestens 19 eng verwandte Mitglieder, die nicht nur in der Entstehung der Arthrose, sondern auch in einer Vielzahl von unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie z.B. in der embryonalen Entwicklung oder der Tumorzellinvasion (Woessner, 1994) eine Rolle spielen. Die Gemeinsamkeit der Metalloproteinasen besteht in ihrer proteolytischen Aktivität gegen alle bisher bekannten Komponenten der Knorpelmatrix wie Kollagene, Proteoglycane, nichtkollagene Proteine und Matrixglycoproteine. Alle bekannten MMPs sind sich in ihre Struktur sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität (Hasty et al., 1993). Innerhalb der Familie befinden sich drei Kollagenasen: Kollagenase-1 oder MMP-1 (Goldberg et al., 1986), Kollagenase-2 oder MMP-8 (Hasty et al., 1990) und Kollagenase-3 oder MMP-13 (Moldovan et al., 1997). Außerdem gibt es noch drei unterschiedliche Stromelysine (MMP-3, MMP-10 und MMP-11), zwei Gelatinasen

(MMP-2 und MMP-9) und vier MMPs vom Matrixtyp: MMP-14 (Sato et al., 1994), MMP-15, MMP-16 und MMP-17 (Nagase, 1996).

Während in Studien in osteoarthrotischem humanem Knorpel im Vergleich zu normalem Knorpel über eine erhöhte MMP-Expression (MMP-1, MMP-3, MMP-9) berichtet wird (Mohtai et al., 1993), gibt es auch Hinweise darauf, dass z. B. MMP-3 auch in gesundem humanem Knorpelgewebe vorzufinden ist (Nguyen et al., 1992). MMP-1 und MMP-13, die beide zur Familie der Kollagenasen gehören, weisen für Kollagen Typ-I, dem wichtigsten Kollagen im Meniskus, eine sehr ähnliche Hydrolysefähigkeit auf (Knauper et al., 1996).

MMP-13 wird ebenfalls eine Beteiligung an Prozessen wie z.B. der Wundheilung (Yamagiwa et al., 1999) und rheumatoider Arthritis (Lindy et al., 1997) zugeschrieben.

Die Expression von MMPs in den von uns untersuchten elf (n=11) Menisken variierte stark. MMP-1 wurde lediglich von vier Patienten exprimiert (n=4), während für MMP-3 bei neun Zellkulturen (n=9) ein positives Ergebnis in der PCR-Analyse verbucht werden konnte. MMP-13 war bei allen Zelllinien (n=11) nachweisbar. Die Arbeitsgruppe von Le Graverand (2000) wies im Meniskus von Kaninchen MMP-13 nach. Ebenfalls im Modell mit Menisken von Kaninchen konnten Bluteau et al. nach Induktion einer histologisch nachweisbaren Arthrose (2001) in der RT-PCR einen signifikanten Anstieg von MMP-1, -3 und -13 nachweisen. Des Weiteren zeigten Lorenz (2005) und seine Kollegen in Studien mit Hunden, dass die MMP-13-Expression im Rahmen von osteoarthrotischen Veränderungen im Knorpelgewebe hochreguliert wird.

In der vorliegenden Studie weist das unterschiedliche Expressionsmuster der drei untersuchten MMPs im humanen Meniskus darauf hin, dass MMP-13 hier am aktiven Umbauprozess im Rahmen einer graduell variierenden Arthrose stets beteiligt ist. Da MMP-3 ebenfalls im gesunden humanen Knorpel auffindbar ist und von neun der elf untersuchten Meniskuszellkulturen exprimiert wurde, kann die Rolle dieses Stromelysins im Meniskus nicht eindeutig definiert werden. Es sorgt für den Abbau von extrazellulärer Matrix und nicht fibrillärer Kollagene und kann in der Zellkultur sowohl pathologisch erhöht sein als auch lediglich physiologisch im Rahmen von regulären Um- und Abbauprozessen

vorkommen. Dies müsste in weiteren quantifizierenden PCR-Untersuchungen erforscht werden.

### 4.3.3. Immunhistochemie

#### 4.3.3.1. AS02

Der Antikörper AS02 bindet an ein Protein an der Membran auf humanen Fibroblasten. Er reagiert nicht mit Keratinozyten, Endothelzellen und Blutzellen (Saalbach et al., 1996). Die Färbung mit diesem Antikörper zeigte bei allen Meniskuszellen (n=3) eine positive Reaktion. Dass Meniskuszellen viele Eigenschaften sowohl von Fibroblasten als auch von Chondrozyten aufweisen wurde bereits durch die Arbeitsgruppen von Ghadially (Ghadially et al., 1983) und Nakata (Nakata et al., 2001) beschrieben.

#### 4.3.3.2. CD11b

Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper CD11b sollte mit den Meniskuszellen eventuell mitgezüchtete Monozyten, Makrophagen oder Granulozyten demaskieren. Der Antikörper CD11b reagiert mit einem Adhäsionsglycoprotein der Zellmembran von Monozyten, Granulozyten, Makrophagen und aktivierten Lymphozyten und färbt die entsprechenden Zellen (Springer et al., 1979, McFarland et al., 1992).

Um die Validität der PCR-Ergebnisse zu gewährleisten, musste die Reinheit der Zellkulturen, die aus Fibrochondrozyten bestehen, durch die Färbung mit diesem Antikörper bestätigt werden. Keine der drei untersuchten (n=3) Zellkulturen zeigte in der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper CD11b ein positives Ergebnis.

#### **4.3.3.3. Kollagen Typ-I**

Die Färbung war bei allen drei Patienten (n=3) positiv, Kollagen Typ-I wurde bei allen Zellkulturen auf der Proteinebene nachgewiesen. Das Kollagen Typ-I ist mit einem Anteil von über 90% am Gesamtkollagen das dominierende im Meniskus (Aspden et al., 1985). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls von Nakata (Nakata et al., 2001) und anderen bestätigt.

#### **4.3.3.4. Kollagen Typ-II**

Der Nachweis von Kollagen Typ-II gelang für zwei der drei (n=3) untersuchten Patienten. Bei der Zellkultur, die keine Anfärbung zeigte, korrelierte das Ergebnis der Immunhistochemie mit der RT-PCR, wo ebenfalls keine Kollagen Typ-II Expression nachgewiesen werden konnte. Hier wurde gegebenenfalls nicht genügend Kollagen II in Protein umgeschrieben, wie es für eine Färbung mit Antikörpern nötig wäre. Kollagen Typ-II kommt im Meniskus in geringeren Mengen von 1-2 % vor (Benjamin et al., 1990), während es das vorherrschende Kollagen im Knorpelgewebe darstellt (Aigner et al., 1992). Dieses unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Kollagene wird auf biochemischer Ebene zur Differenzierung zwischen hyalinem - und Faserknorpel angewandt (Arnoczky et al., 1988).

### **4.4. Conclusio**

Das vorrangige Ziel dieser Studie war es, humane Fibrochondrozyten in Zellkultur mittels RT-PCR und Immunhistochemie auf ihr Synthesmuster für Kollagene (Kollagen Typ-I, -I, -III, -VI und -X) sowie für die Faktoren VEGF, TGF- $\beta$ 1, IGF-I und -II, FGF-1 und -2, PDGF, iNOS und MMP-1, -3 und -13 zu analysieren. Hierzu wurden humane Menisken von elf unterschiedlichen Patienten nach mechanischer Aufarbeitung und Kollagenaseverdau in Zellkultur aufgenommen. Für die PCR-Analysen kamen Zellen aus der ersten Subkultur zum Einsatz, um möglichst nah an den in-vivo-Verhältnissen zu sein und einer durch häufige

Passagierung der Zellen aufkommenden Entdifferenzierung der Fibrochondrozyten entgegenzuwirken.

Zur Bestätigung der PCR-Ergebnisse für die Kollagene I und II wurden exemplarisch immunhistochemische Färbungen an drei verschiedenen Meniskuszellkulturen vorgenommen. Neben dem Nachweis der beiden Kollagene auf Proteinebene erfolgten ebenfalls immunhistochemische Untersuchungen der drei Zelllinien mit dem Antikörper CD11b zum Ausschluss eventuell mitgezüchteter Endothelzellen. Der Antikörper AS02 färbt humane Zellen mesenchymaler Herkunft und identifizierte die drei genannten Zellreihen als solche.

Bezüglich der Expression von Kollagenen konnten die Kollagene Typ-I und -II sowohl immunhistochemisch auf Proteinebene als auch per PCR auf der Transkriptionsebene nachgewiesen werden. Auch das Vorkommen von Kollagen Typ-III und -VI wurde bestätigt, wohingegen Kollagen Typ-X nach unseren Ergebnissen nicht von humanen Fibrochondrozyten exprimiert wird.

Die vorliegende Arbeit konnte auch erstmals eine Reihe von Wachstumsfaktoren in humanen Meniskuszellkulturen nachweisen, die bisher von anderen Autoren, wenn überhaupt, vorwiegend im Tiermodell mittels histologischer Gewebeatersuchungen dargestellt worden sind. In der vorliegenden Studie wurde die Expression von VEGF, FGF-1 und -2, TGF- $\beta$ 1, BMP-2, iNOS und MMP-3 und -13 nachgewiesen. Bei vereinzelt Proben konnte auch die mRNA von IGF-I und -II und MMP-1 detektiert werden. Vom humanen Meniskusgewebe gar nicht exprimiert wird hingegen PDGF-AB.

Einzelne Wachstumsfaktoren mit positivem Effekt auf Proliferation, Matrix-Synthese oder Differenzierung von Fibrochondrozyten in der Zellkultur und in vivo sind zwar bekannt, deren agonistisches und antagonistisches Wirken und Zusammenspiel im Meniskus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist gut möglich, dass auch bei den Wachstumsfaktoren, ähnlich wie bei den Komplement- oder Gerinnungsfaktoren, ganze Wirkungskaskaden existieren, auf deren Ende die Heilung und Regeneration des verletzten Gewebes steht. Die genaue Differenzierung, ob einzelne Faktoren in der Meniskuszellkultur aufgrund einer Arthrose aktiviert wurden oder lediglich unter physiologischen Bedingungen vorkommen kann durch die vorliegende Studie jedoch nicht ab-

schließlich beantwortet werden, da die Menisken von Patienten mit variierenden Arthroseschäden entnommen wurden.

## V. Zusammenfassung

Viele Erkrankungen des Kniegelenks lassen sich auf eine degenerative oder traumatische Läsion des Meniskus zurückführen. Der Meniskus spielt eine entscheidende Rolle für die Schockabsorption und Kräfteverteilung im Kniegelenk. Wenn dessen Funktion eingeschränkt ist und aus therapeutischen Gründen eine Resektion durchgeführt wird, wirkt sich dies beschleunigend auf die Entstehung einer Gonarthrose aus. Das Interesse am möglichst vollständigen Erhalt des Meniskusgewebes ist dementsprechend hoch.

Angesichts der lediglich in der Meniskus-Peripherie vorhandenen ausreichenden Vaskularisierung sind der inneren Meniskusheilung jedoch Grenzen gesetzt. In Anbetracht dessen sind innovative Verfahren wie das Tissue Engineering, das u. a. die Herstellung von autologen Meniskusersatzimplantaten anvisiert, in der Orthopädie von großer Bedeutung für die Zukunft.

Hierbei werden zunächst Meniskuszellen aus Gewebeproben gewonnen und mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren expandiert. Die expandierten Zellen werden später auf Trägermaterialien gesetzt, die als künstliches Gewebstroma dienen, innerhalb derer sich die Zellen dreidimensional ausbreiten.

Ob sich diese Zellen im Verlauf wie native Meniskuszellen entwickeln und dem Gerüst die entsprechenden biomechanischen Eigenschaften verleihen ist bisher nicht nachvollziehbar gewesen, da sich bisher die Charakterisierung von humanen Meniskuszellen auf die Beschreibung morphologischer Eigenschaften konzentrierte.

Das Bestreben dieser Untersuchungen war es, diese Lücke zu schließen und eine umfassende Expressionsanalyse von Fibrochondrozyten zur Verfügung zu stellen, sodass eine Qualitätskontrolle von eingesetzten und nach dem Engineering erhaltenen Meniskuszellen durch unsere Analysen möglich wird.

Bezüglich der Expression von Kollagenen konnten die Kollagene Typ-I und -II sowohl immunhistochemisch auf Proteinebene als auch per PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Auch das Vorkommen von Kollagen Typ-III und -VI wurde bestätigt, wohingegen Kollagen Typ-X nach unseren Ergebnissen nicht von humanen Fibrochondrozyten exprimiert wird.

Die vorliegende Arbeit konnte auch erstmals eine Reihe von Wachstumsfaktoren in humanen Meniskuszellkulturen nachweisen, die bisher von anderen Autoren, wenn überhaupt, vorwiegend im Tiermodell mittels histologischer Gewebeatersuchungen dargestellt worden sind. So wurde die Expression von VEGF, FGF-1 und -2, TGF- $\beta$ 1, BMP-2, iNOS und MMP-3 und -13 nachgewiesen. Bei vereinzelt Proben konnte auch die mRNA von IGF-I und II und MMP-1 detektiert werden. Vom humanen Meniskusgewebe gar nicht exprimiert wird hingegen PDGF-AB, das neben seiner Funktion als starkes Mitogen auch chemotaktisch auf Monozyten, Neutrophile und Fibroblasten wirkt und in vitro ebenfalls die Produktion von extrazellulärer Matrix durch Fibrochondrozyten stimuliert.

**Tabelle 23:** Bisheriger Nachweis von Kollagenen und Wachstumsfaktoren im humanen und tierischen Meniskus.

Faktor	Nachweis in humaner Meniskuszellkultur durch die vorliegende Arbeit	Bisheriger Nachweis im humanen Meniskus	Nachweis in tierexperimentellen Untersuchungen im Meniskus
Kollagen Typ I	+	Eyre et al. (1975)	-
Kollagen Typ II	+	Eyre et al. (1975)	-
Kollagen Typ III	+	Nakata et al. (2001)	Wu et al. (1987)
Kollagen Typ VI	+		McDevitt und Webber (1990)
Kollagen Typ X	-	-	Hellio Le Graverand et al. (2001)
VEGF	+	-	Becker et al. (2004) Hofstaetter et al. (2004)
FGF-1	+	-	-
FGF-2	+	-	-
TGF $\beta$ 1	+	-	Hellio Le Graverand et al. (2001)
IGF-I	(+)	-	-
IGF-II	(+)	-	-
PDGF-AB	-	-	-
BMP-2	+	-	-
iNOS	+	Kobayashi et al. (2001)	Hellio Le Graverand et al. (2001)
MMP-I	(+)	-	Le Graverand et al. (2000), Bluteau et al. (2001)
MMP-III	+	-	Bluteau et al. (2001)
MMP-XIII	+	-	Bluteau et al.

			(2001), Lorenz et al., (2005)
--	--	--	-------------------------------------

## **VI. Literaturverzeichnis**

**Aigner, T., Stöss, H., Weseloh, G., Zeiler, G., von der Mark, K. (1992)**  
Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage  
Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1992, 62: 337-345

**Arnoczky, S. P. (1999)**  
Building a meniscus. Biologic considerations  
Clin Orthop 367: 244-253

**Arnoczky, S. P., Warren, R. F., Spivak, J. M. (1988)**  
Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs  
J Bone Joint Surg 1988, 70: 1209-1217

**Arnoczky S. P., Adams M., DeHaven, K. E. (1988)**  
Meniscus  
In: Woo S.Y., Buckwalter J.A. (Hrsg), Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues, Park Ridge, IL.  
American Academy of Orthopaedic Surgeons 487-537

**Arnoczky, S. P., Warren, R. F. (1983)**  
The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog  
Am J Sports Med 1983, 131 - 141

**Arnoczky, S. P., Warren, R. F. (1982)**  
Microvasculature of the human meniscus  
Am J Sports Med 1982, 10: 90-95

**Aspenberg, P., Forslund, C. (2000)**  
Bone morphogenetic proteins and tendon repair  
Scand J Med Sci Sports 2000, 10: 372-375

**Aspden R. M. (1985)**  
A model for the function and failure of the meniscus  
Eng Med 1985, 14:119-122

**Aspden R. M., Yarker Y. E., Hukins D. W. (1985)**  
Collagen orientations in the meniscus of the knee joint  
J Anat 1985, 140 (Pt 3):371-380.

**Bates, D. O., Curry, F. E. (1997)**  
Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway  
Am J Physiol 1997, 273: 687-694

**Benjamin, M., Evans, A. J. (1990)**

Fibrocartilage

J Anat 1990, 171: 1-15

**Becker, R., Pufe, T., Kulow, S., Giessmann, N., Neumann, W., Mentlein, R., Petersen, W. (2004)**

Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model

J Bone Joint Surg Br 2004, 86: 1082-7

**Berse, B., Brown, L. F., van der Water, L., Dvorak, H. F., Senger, D. R. (1992)**

Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages and tumors

Mol Biol Cell 1992, 3: 211-220

**Bland Y. S., Ashhurst, D. E. (1996)**

Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing

Histochemical Journal 1996, 28: 265-74

**Blaney Davidson, E. N., Vitters, E. L., van Lent, P. L., van de Loo, F. A., van der Berg, W. B., van der Kraan, P.M. (2007)**

Elevated extracellular matrix production and degradation upon BMP-2 stimulation point towards a role for BMP-2 in cartilage repair and remodeling

Arthritis Res Ther 2007, 9: R102

**Blotnick, S., Peoples, G. E., Freeman, M. R., Eberlein, T., J., Klagsbrun, M. (1994)**

T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor like acidic growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells

Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91: 2890-2894

**Bluteau, G., Conrozier, T., Mathieu, P., Vignon, E., Herbage, D., Mallein-Gerin, F. (2001)**

Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis

Biochim Biophys Acta 2001, 1526: 147-58

**Brown, L. F., Yeo, K. T., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., Van de Water, L. (1992)**

Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing

L Exp Med 1992, 176:1375-1379

- Bylski-Austrow, D. I., Ciarelli, M. J., Kayner, D. C., Matthews, L. S., Goldstein, S. A. (1994)**  
Displacements of the menisci under joint load: an in vitro study in human knees  
J Biomech 1994, 27: 421
- Capito, R. M., Spector, M. (2007)**  
Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering  
Gene Ther 2007, 14: 721-732
- Cheung, H. S. (1987)**  
Distribution of Type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine meniscus  
Connective Tiss Res 1987, 16: 343-356
- Clark C. R., Ogden, J. A. (1983):**  
Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury  
J Bone J Surg 1983, 65: 538-547.
- Cohick, W. S., Clemmons, D. R. (1993)**  
The insulin-like growth factors  
Annu Rev Physiol 1993, 55: 131-53
- Conn, G., Bayne, M. L., Sodermann D. D., Kwok, P. W., Sullivan, K. A., Palisi, T. M., Hope, D. A., Thomas, K. A. (1990)**  
Amino acid and cDNA sequences of vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor  
Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 2628-2632
- Cooper, D. E., Arnoczky, S. P., Warren, R. F. (1990)**  
Arthroscopic meniscal repair  
Clin Sports Med 1990, 9: 589
- Cox , J. S., Nye, C. E., Schaefer, W. W., Woodstein, I. J. (1975)**  
The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees  
Clin Orthop 1975, 109: 178
- De Groot, J. H., Zijlstra, F. M., Kuipers, H. W., Pennings, A. J., Klomp-maker, J., Veth, R. P., Jansen, H. W. (1997)**  
Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly- (L-lactide/epsilon-caprolactone) implants  
Biomaterials 1997, 18: 613-622.
- Dettmar, M. Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Elicker, B. M., Dvorak, H. F., Claffey, K. P. (1997)**

Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin  
J Invest Dermatol 1997, 108: 263-268

**Deuel, T. F., Senior, R. M., Huang, J. S., Griffin, G. L. (1982)**  
Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor  
J Clin Invest 1982, 69: 1049-49

**Dienst, M., Kohn, D. (2006)**  
Die allogene Meniskustransplantation  
Oper Orthop Traumatol 2006, 18: 463-80

**Duda, G. N., Haisch, A., Endres, M. (2000)**  
Mechanical quality of tissue engineered cartilage: results after 6 and 12 weeks in vivo  
J Biomed Mater Res 2000, 53:673-677

**Eckhart, L., Ban, J., Ballaun, C., Weninger, W., Tschachler, E. (1999)**  
Reverse transcription-polymerase chain reaction products of alternatively spliced mRNAs form DNA heteroduplexes and heteroduplex complexes  
J Biol Chem 1999, 274: 2613-2615

**Eriksson, A., Rorsman, C., Ernlund, A., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H. (1992)**  
Ligand-induced homo and hetero-dimerization of platelet derived growth factor alpha- and beta-receptors in intact cells  
Growth Factors 1992, 6: 1-14

**Esser, S., Wollburg, K., Wollburg, H., Breier, B., Kurzchalia, T., Risau, W. (1998)**  
Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro  
J Cell Biol 1998, 140: 947-959

**Estevez, A. G., Spear, N., Manuel, S. M., Barbeito, L., Radi, R., Beckman, J. S. (1998)**  
Prog Brain Res 1998, 118: 269-280

**Eyre, D. R., Muir, H. (1975)**  
The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of the pig  
Biochem J 1975, 151: 592-602

**Fabbriciani, C., Lucania, L., Milano, G., Schiavone Panni, A., Evangelisti, M (1997)**  
Meniscal allografts: cryopreservation vs deep frozen technique. An experimental study in goats  
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 1997, 5: 124

**Fithian, D. C., Kelly, M. A., Mow, V. C. (1990)**

Material properties and structure-function relationships in the menisci  
Clin Orthop 1990, 252: 19-31.

**Fleischmajer, R., MacDonald, E. D., Perlish, J. S., Burgeson, R. E., Fisher, L. W. (1990)**

Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules  
J Struct Biol 1990, 105: 162-169

**Folkmann, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D., Vlodavsky, I (1988)**

A heparin-binding angiogenic protein-basic fibroblast growth factor- is stored within basement membrane

Am J Pathol 1988; 130: 393-400

**Forman, S. K., Oz, M. C., Lontz, J. F., Treat, M. R., Forman, T. A., Kiernan H. A. (1995)**

Laser assisted fibrin clot soldering of human menisci

Clin Orthop 1995, 310: 37-41

**Fowler, A. W. (1976)**

Journal of Bone and Joint Surgery, 1976, 58: 136

**Frank, S., Madlener, M., Werner, S. (1996)**

Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing

J Biol Chem 1996, 271: 10188-10193

**Friesel, R. E., Maciag, T. (1995)**

Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction

FASEB J 1995, 9: 919-925

**Gayo, J. (2000)**

Immunolocalization of types I, II, and X collagen in the tibial insertion sites of the medial meniscus

Knee Sports Surg Traumatol Athrosc 2000, 8: 61-5

**Gerber, H. P., Dixit, V., Ferrara, N. (1998)**

Vascular endothelial growth factor induces expression of antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells

J Biol Chem 1998, 273:13312-13316

**Ghadially, F. N., Lalonde, J. M., Wedge, J. H. (1978)**

Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages

J Anat 1978, 125: 499

**Ghadially, F. N., Lalonde, J. M., Wedge, J. H. (1983)**

Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint

J Anat 1983, 136, 4: 773-791

**Ghosh, P., Taylor, T. K. (1987):**

The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction

Clin Orthop 1987, 224: 52-63

**Goble, E. M., Kohn, D., Verdonk, R., Kane, S. M. (1999)**

Meniscal substitutes - human experience

Scand J Med Sci Sports 1999, 9: 146

**Goldberg, G. I., Wilhelm, S. M., Kronberger, A., Bauer, E. A., Grant, G. A., Eisen, A. Z. (1986)**

Human fibroblast collagenase: Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein

J Biol Chem 1986, 261: 6600-6605

**Greenhalgh, D. G., Sprugel, K. H., Murray, M. J., Ross, R. (1990)**

PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse

Am J Pathol 1990, 139: 1235-1246

**Gualandris, A., Presta, M. (1995)**

Transcriptional and posttranscriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator expression in endothelial cells by basic fibroblast growth factor

J Cell Physiol 1995, 162: 400-409

**Haroon, Z. A., Hettasch, J. M., Lai, T. S., Dewhirst, M. W., Greenberg, C. S. (1999)**

Tissue transglutaminase is expressed active and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis

FASEB 1999, 13; 1787-1795

**Hart, C. E., Bailey, D. A., Curtis S., Osborn, E., Raines, R., Forstrom, J. W. (1990)**

Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and the identification of all three PDGF dimers in human platelets

Biochemistry 1990, 29: 166-172

**Hart, C. E., Forstrom, J. W., Kelly, J. D., Seifert, R. A., Smith, R. A., Ross, R., Murray, M. J., Bowen-Pope, D. F. (1988)**

Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF

Science (Wash. D. C.)1988, 240: 1529-1531

**Hasty, K. A., Pourmotabbed, R. F., Goldberg, G. I., Thomson, G. P., Spinella, D. G., Stevens, R. M., Mainardi, C. L. (1990)**

Human neutrophil collagenase: A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases

J Biol Chem 1990, 265: 11421-11424

**Hasty, K. A., Wu, H., Byrne, M. (1993)**

Susceptibility to cleavage by human neutrophil collagenase of type I collagen molecules containing mutated  $\alpha 1(I)$  chains

Matrix 1993, 13: 181-186

**Hellio Le Graverand, M. P., Eggerer, J., Sciore, P., Reno, C., Vignon, E., Otterness, I., Hart, D. A. (2000)**

Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury

Matrix Biology 2000, 19: 431-441

**Hellio Le Graverand, M. P., Sciore, P., Eggerer, J., Rattner, J. B., Vignon, E., Barclay, L., Hart, D. A., Rattner, J. B. (2001)**

Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus

Arthritis Rheum 2001, 44: 1808-18

**Hellio Le Graverand, M. P., Vignon, E., Otterness I. G., Hart, D. A. (2001)**

Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part II: molecular alterations

Osteoarthritis Cartilage 2001, 9: 65-72

**Herwig, J., Egner, E., Buddecke, E. (1984)**

Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration

Ann Rheum Dis 1984, 43:635-640

**Hoben, G. M., Hu, J.C., James, R. A., Athanasiou, K. A. (2007)**

Self-assembly of fibrochondrocytes and chondrocytes for tissue engineering of the knee meniscus

Tissue Eng. 2007, 5:939-46

**Hofstaetter, J. G., Saad, F. A., Samuel, R. E., Wunderlich, L., Choi, J. H., Glimcher, M. J. (2004)**

Differential expression of VEGF isoforms and receptors in knee joint menisci under systemic hypoxia

Biochem Biophys Res Comm 2004, 324: 667-72

**Hough, A. J. Jr., Webber, R. J. (1990)**

Pathology of the meniscus

Clin Orthop 1990, 252:32-40

**Hoshino, A., Wallace, W. A. (1987)**

Impact-absorbing properties of the human knee

J Bone Joint Surg Br 1987, 69: 807

**Ibarra, C., Koski, J. A., Warren, R. F. (2000)**

Tissue engineering meniscus: cells and matrix  
Orthop Clin North Am 2000, 31: 411-418

**Ikeuchi, K., Sakoda, H., Sakaue, R., Tsuji, K., Tomita, N. (1998)**

A new method for accurate measurement of displacement of the knee menisci  
Proc Inst Mech Eng 1998, 212: 183

**Imler, S. M., Doshi, A. N., Levenston, M. E. (2004)**

Combined effects of growth factors and static mechanical compression on meniscus explant biosynthesis  
Osteoarthritis Cartilage 2004, 12: 736-44

**Jackson, J. P. (1968)**

Degenerative changes in the knee after meniscectomy  
Br Med J 1968, 525 - 527

**Kanda, S., Landgren, E., Ljungstro, M., laesson-Welsh, L. (1996)**

Fibroblast growth factor receptor 1 induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice  
Cell Growth Differ 1996, 7: 393-395

**Kandel, J., Bossy-Wetzel, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., Hanahan, D. (1991)**

Neovascularisation is associated with a switch to the export bFGF in the multistep development of fibrosarcoma  
Cell 1991, 66: 1095

**Keck, P. J., Hauser, S. D., Kivi, G. Sanzo, K, Warren, T., Feder, J., Connolly, D. T. (1989)**

Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related zu PDGF  
Science 1989, 246: 1309-1313

**Kim, K. Y., Jeong, S. Y., Won, J., Ryu, P. D., Nam, M. J. (2001)**

Induction of angiogenesis by expresssion of soluble type II transforming growth factor-beta receptor in mouse hapatoma  
J Biol Chem 2001, 276: 38781-38786

**Knauper, V., Lopez-Otin, C., Smith, B., Knight, G., Murphy, G. (1996)**

Biochemical characterization of human collagenase-3  
J Biol Chem 1996, 271: 1544-1550

**Kobayashi, K., Mishima, H., Hashimoto, S., Goomer, R. S., Harwood F. L., Lotz, M., Moriya, H., Amiel, D. (2001)**

Chondrocyte apoptosis and regional differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy  
J Orthop Res 2001, 19: 802-8

**Kohn, D., Wirth, C. J., Reiss, G., Plitz, W., Maschek, H., Erhardt, W., Wülker, N. (1992)**

Medial meniscus replacement by a tendon autograft. Experiments in sheep  
J Bone Joint Surg Br 1992, 74: 910-917

**Kohn, D., Moreno, B. (1995)**

Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study  
Arthroscopy 1995, 11: 96-103

**Kohn, D., Rudert, M., Wirth, C. J., Plitz, W., Reiss, G., Maschek, H. (1997)**

Medial meniscus replacement by a fat pad autograft. An experimental study in sheep  
Int Orthop 1997, 21: 232-238

**Krause, W. R., Pope, M. H., Johnson, R. J., Wildler, D. G. (1976)**

Mechanical changes in the knee after meniscectomy  
J Bone Joint Surg Am 1976, 58: 599

**Larsson, J., Goumans, M. J., Sjostrand, L. J., van Rooijen, M. A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C. L., Karlsson, S. (2001)**

Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice  
EMBO J 2001, 20: 1663-1673

**Le Graverand, M-P. H., Eggerer, J., Sciore, P., Reno, C., Vignon, E., Otterness, I., Hart, D. A. (2000)**

Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury  
Matrix Biology 2000, 19: 431-441

**Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R. J., Morris, S. M., Ratan, R. R. (2003)**

Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox  
Neuroscience 2003, 100: 4843-4848

**Li, J., Zhang, Y-P., Kirsner, R. S. (2003)**

Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix  
Microscopy Research and Technique 2003, 60: 107-114

**Lindy, O., Konttinen, Y. T., Sorsa T. (1997)**

Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium  
Arthritis Rheum 1997, 40: 1391-1399

**Lorenz, H., Wenz, W., Ivancic M., Steck, E., Richter W. (2005)**

Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading  
Arthritis Res Ther 2005: 156-165

**Lowe, W. L. Jr. (1991)**

Biological actions of the insulin-like growth factors  
In "Insulin-Like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects"  
Ed. D. LeRoith, pp. 49-85, Boca Ranton, CRC Press

**Maier, D., Braeun, K., Steinhauser, E., Ueblacker, P., Oberst, M., Kreuz, P.C., Roos, N., Martinek, V., Imhof, A. B. (2007)**

In vitro analysis of an allogenic scaffold for tissue-engineered meniscus replacement  
J Orthop Res 2007, 12: 1598-608

**Marton, L. S. G., Arnason, B. G., W. (1982)**

J Cell Biochem 1982, 19: 363-381

**McCarty, E. C., Marx, R. G., DeHaven, K. E. (2002)**

Meniscus repair: considerations in treatment and update of clinical results  
Clin Orthop 2002, 402: 122-134

**McDevitt, C. A., Webber, R. J. (1990)**

The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage  
Clin Orthop Relat Res 1990, 252: 8-18

**McDevitt, C. A., Marcelino, J., Tucker, L. (1991)**

Interaction of intact type VI collagen with hyaluronan  
FEBS Lett 1991, 294:167-70

**McDevitt, C. A., Mukherjee, S., Kambic, H., Parker, R. (2002)**

Emerging concepts of the cell biology of the meniscus  
Curr Opin Orthop 2002, 13(5): 345-350

**McFarland, H. I., Nahill, S. R., Maciaszek, J. W., Welsh, R. M. (1992)**

CD11b (Mac-1): a marker for CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell activation and memory in virus infection  
J Immunol 1992, 149:1326

**McGinity, J. B., Geuss, L. F., Marvin, R. A. (1977)**

Partial or total meniscectomy: a comparative analysis  
J Bone J Surg 1977, 59: 763-766

**McNeil, P. L., Muthukrishnan, L., Warder, E., D'Amore P. A. 1989**

Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells  
J Cell Biol 1989, 109: 811-822

**Messner, K., Gillquist, J. (1993)**

Prosthetic replacement of the rabbit medial meniscus  
J Biomed Mater Res 1993, 27: 1165

**Messner, K. (1994):**

Meniscal substitution with a Teflon-periosteal composite graft: a rabbit experiment  
Biomaterials 1994, 15: 223-230

**Messner, K. (1999)**

Indications for meniscal transplantation. Who and how many need a meniscus substitute. A personal view  
Scand J Med Sci Sports 1999, 9: 184

**Mohtai, M., Smith, R. L., Schurman, D. J., Tsuji, Y., Torti, F. M., Hutchinson, N. I., Stetler-Stevenson, W. G., Goldberg, G. I. (1993)**

Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1  
J Clin Invest 1993, 92: 179-185

**Moldovan, F., Pelletier, J-P., Hambor, J., Cloutier, J-M., Martel-Pelletier, J. (1997)**

Collagenase-3 (matrix metalloproteinase 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ  
Arthritis Rheum 1997, 40: 1653-1661

**Mow, V. C., Holmes, M. H., Lai, W. M. (1984)**

Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review  
J Biomech 1984, 17:377-394

**Nagase, H. (1996)**

Matrix Metalloproteinases In: Hooper, N. M., editor.  
Zinc metalloproteinases in health and disease  
London: Taylor and Francis, 153-204

**Nakase, T., Miyaji, T., Tomita, T., Kaneko, M., Kuriyama, K., Myoui, A., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H. (2003)**

Localization of bone morphogenic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte  
Osteoarthritis Cartilage 2003, 11: 278-284

**Nakata, K., Shino, K., Hamada, M., Mae, T., Miyama, T., Shinjo, H., Horibe, S., Tada, K., Ochi, T., Yoshikawa, H. (2001)**

Human meniscus cell: Characterisation of the primary culture and use for tissue engineering  
Clin Orthop 2001, 391 (Suppl): 208-218

**Nakhostine, M, Gershuni, D. H., Anderson, R., Danzig, L. A., Weiner, G. M. (1990)**

Effects of abrasion therapy on tears in the avascular region of sheep menisci  
Arthroscopy 1990, 6: 280

**Narayanan, A. S., Page, R. S. (1983)**

Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid human fibroblasts  
J Biol Chem 1983, 258: 11694-11699

**Newman, A. P., Anderson, D. R., Daniels, A. U., Dales, M. C. (1989)**

Mechanics of the healed meniscus in a canine model  
Am J Sports 1989, 17: 164

**Nguyen, Q., Mort, J. S., Roughley, P. J. (1992)**

Prefential mRNA eexpression of prostromelysin relative to procollagenase in situ hybridization localization in human articular cartilage  
J Clin Invest 1992, 89: 1189-1197

**Nilsson, A., Carlsson, B., Isgaard, J., Isaksson, O. G., Rymo, L. (1990)**

Regulation by GH of insulin-like growth factor-I mRNA expression in rat epiphyseal growth plate as studied with in-situ hybridization  
L Endocrinol 1990, 125: 67-74

**Nissen, N. N., Polverini, P. J., Koch, A. E., Volin, M. V., Gamelli, R. L., Di-  
pietro, L. A. (1998)**

Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing  
Am J Pathol 1998, 152: 1445-1452

**Noble, J., Hamblen, D. L. (1975)**

The pathology of the degenerate meniscus lesion  
Journal of Bone and Joint Surgery 1975, 180-186

**Pangborn, C. A., Athanasiou, K. A. (2005)**

Effects of growth factors on meniscal fibrochondrocytes  
Tissue Eng 2005, 11: 1141-1148

**Pape, D., Seil, R., Kohn, D. (2006)**

Meniskusersatz  
Trauma Berufskrankh 2006, 8: 232-236

**Pasa, L., Pokorny, V., Kalandra, S., Melichar, I., Bilik, A. (2008)**

Transplantation of deep frozen menisci  
Acta Chir Orthop Traumatol Cech 2008, 1: 40-7

**Petersen, W., Pufe, T., Stärke, C., Fuchs, T., Kopf, S., Neumann, W., Zantop, T., Paletta, J., Raschke, M., Becker R. (2007)**

The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings  
Arch Orthop Trauma Surg 2007, 4: 235-40

**Petersen, W., Tillmann, B. (1998)**

Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci  
Anat Embryol 1998, 197: 317-24

**Poehling, G. G., Ruch D. S., Chabon S. J. (1990)**

The landscape of meniscal injuries  
Clin Sports Med 1990 9:539-49

**Prockop, D. J., Kivirikko, K. I. (1995)**

Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy  
Annu Rev Biochem 1995, 64: 403-434

**Risau, W. (1997)**

Mechanisms of angiogenesis  
Nature 1997, 386: 671-674

**Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K., Smith, J. M., Roche, N. S., Wakefield, L. M., Heine, U. I., Liotta, L. A., Falanga, V., Kehrl, J. H., Fauci, A. S. (1986)**

Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro  
Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83: 4167

**Rodeo, S. A. (2001)**

Meniscal allografts - where do we stand?  
Am J Sports Med 2001, 29: 246-261

**Rodkey, W. G., Steadman, J. R., Li, S. T. (1999)**

A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus  
Clin Orthop Relat Res 1999, 367: 281-292

**Roesel, J. F., Nanney, L., B., (1995)**

Assesment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair  
J Surg Res 1995, 58: 449-459

**Rom, W. N., Basset, P., Fells, G. A., Nukiwa, T., Trapnell, B. C., Crystal, R. G. (1988)**

Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule  
J Clin Invest 1988, 82: 1685-93

**Rupp, S., Seil, R., Kohn, D. (2002)**

Meniskusläsion

Orthopäde 2002, 31: 812-831

**Saalbach, A., Aneregg, U., Bruns, M., Schnabel, E., Herrmann, K., Hausteiner, U. F. (1996)**

Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities

J Invest Dermatol 1996, 10: 1314.

**Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Corbi, A., Attisano, L., Bernabeu, C. (2001)**

Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor- $\beta$  pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression

J Biol Chem 2001, 276: 38527-38535

**Sandberg, M. M., Aro, H. T., Vuorio, E. I. (1993)**

Gene expression during bone repair

Clin Orthop 1993, 289: 292

**Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M. (1994)**

A matrix metalloproteinase expresses on the surface of invasive tumor cells

Nature 1994, 370: 61-65

**Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J. A., Fiddes, J. C., Gospodarowicz, D. 1987**

Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth

Nature 1987, 325: 257-259

**Seno, M., Sasada, R., Kurokawa, T., Igarashi, K. (1990)**

Carboxyl-terminal structure of basic fibroblast growth factor significantly contributes to its affinity for heparin

Eur J Biochem 1990, 188: 239-245

**Sepp, N. T., Li, L. J., Lee, K. H., Brown, E. J., Caughman, S. W., Lawley, T., Swerlick, R. A. (1994)**

Basic fibroblast growth factor increases expression of the  $\alpha$ - $\beta$ 3 integrin complex on human microvascular endothelial cells

J Invest Dermatol 1994, 103: 295-299

**Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffmann, E., Martin, G. R. (1982)**

Platelet derived growth factor is chemotactic for fibroblasts

J Cell Biol 1982, 92: 584-588

**Setton, L. A., Guilak, F., Hsu, E. W., Vail, T. P. (1999)**

Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair

Clin Orthop 1999, Suppl: 254-272

**Sittinger, M., Bujia, J., Rotter, N., Reitzel, D., Minuth, W. W., Burmester, G. R. (1996)**

Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques  
Biomaterials 1996, 17: 237-242

**Smillie, I. S. (1962)**

Injuries of the knee joint  
Third edition, p.60. Edinburgh and London : E. and S. Livingstone Ltd.

**Springer, T., Galfre, G., Secher, D. S., Milstein, C. (1979)**

Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody  
Eur J Immunol 1979, 9: 301

**Stapleton, T. W., Ingram, J., Katta, J., Knight, R., Korossis, S., Fisher, J., Ingham, E. (2008)**

Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering  
Tissue Eng Part A 2008, 4: 505-18

**Steinert, A. F., Palmer, G. D., Capito, R., Hofstaetter, J. G., Pilapil, C., Ghivizzani, S. C., Spector, M., Evans, C. H. (2007)**

Genetically enhanced engineering of meniscus tissue using ex vivo delivery of transforming growth factor beta-1 complementary desoxyribonucleic acid  
Tissue Eng 2007, 9: 2227-37

**Steinwachs, M. R., Prettin, S., Steimer, T. (2003)**

Soft-Tissue-Engineering von Menisken  
In: Bruns J. (Hrsg), Tissue Engineering, Steinkopff Verlag, Darmstadt. S.156-163

**Stewart, K., Pabbruwe, M., Dickinson, S., Sims, T., Hollander, A. P., Chaudhuri J. B. (2007)**

The effect of growth factor treatment on meniscal chondrocyte proliferation and differentiation on polyglycolic acid scaffolds  
Tissue Eng 2007, 2: 271-80

**Stone, K. R., Rodkey, W. G., Webber, R. (1992)**

Meniscal regeneration with polymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically and biochemically  
Am J Sports Med 1992, 20: 104-111

**Stone, K. R., Steadman, J. R., Rodkey, W. G., Li, S. T. (1997)**

Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold  
J Bone Joint Surg Am 1997, 79A: 1770-1777

**Sweigart, M. A., Athanasiou, K. A. (2001)**

Toward tissue engineering of the knee meniscus

Tissue Engineering 2001, 7:111-129

**Taipale, J., Keski-Oja, J. (1996)**

Hepatocyte growth factor releases epithelial and endothelial cells from growth arrest induced by transforming growth factor-beta1

J Biol Chem 1996, 271: 4342-4348

**Tapper, E. M., Hoover, N. W. 1969)**

Late results after meniscectomy

J Bone Joint Surg 1969: 517 - 526

**Thomas, J. T., Kilpatrick, M. W., Lin, K., Erlacher, L., Lembessis, O., Costa, T., Tsipouras, P., Luyten, F. P. (1997)**

Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1

Nat Genet 1997, 17: 58-64

**Trompezinsky, S., Pernet, I., Mayoux, C., Schmitt, D, Viiac, J. (2000)**

Transforming growth factor-beta1 and ultraviolet A1 radiation increases production of vascular endothelial growth factor but not endothelin -1 in human dermal fibroblasts

Br J Dermatol 2000, 143: 539-545

**Ulrich-Vinther, M., Maloney, M. D., Schwarz, E. M., Rosier, R., O'Keefe, R. J. (2003)**

Articular cartilage biology

J Am Acad Orthop Surg 2003, 11: 421-430

**Vanhee, D., Gosset, P., Wallaert, B., Voisin, C., Tonnel, A. B. (1994)**

Mechanism of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis. Increased production of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor type I and transforming growth factor beta and relationship to disease severity

Am J Respir Crit Care Med 1994, 150: 1049-55

**Von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A. G., Kuss, A., Weseloh, K., Glü-ckert, K, Stöss, H. (1992)**

Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage: Indication of chondrocyte hypertrophy

Arthritis Rheum 1992, 35: 806-811

**Von Lewinski, G., Milachowski, K. A., Weismeier K., Kohn, D., Wirth, C. J. (2007)**

Twenty -year results of combined meniscal allograft transplantation, anterior cruciate ligament reconstruction and advancement of the medial collateral ligament

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2007, 15: 1072-82

**Webber, R. J. (1990)**

In vitro culture of meniscal tissue  
Clin Orthop 1990, 252: 114-120

**Willey, G. M., Billetz, A. C., Matyas, J. R., Adams, M. E., McDevitt, C. A. (2001)**

Absolute concentrations of mRNA for type I and type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay  
J Orthop Res 2001, 19: 650-8

**Winston, B. W., Krein, P. M., Mowat, C., Huang, Y. (1999)**

Cytokine-induced macrophage differentiation: a tale of two genes  
Clin Invest Med 1999, 22(6): 236-55

**Woessner, J. F. Jr. (1994)**

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling  
FASEB J 1994, 5: 2145-54

**Wu, J. J., Eyre, D. R., Slayter, H. S. (1987)**

Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein  
Biochem J 1987, 248: 373-81

**Yamagiwa, H., Tokunaga, K., Hayami, T. (1999)**

Expression of metalloproteinase-13 (collagenase-3) is induced during fracture healing in mice  
Bone 1999, 25: 197-203

**Ye, C., Deng, Z., Li, B. (2007)**

Effect of three growth factors on proliferation and cell phenotype of human fetal meniscal cells  
Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2007, 21: 1137-41

**Zaffagnini, S., Giodano, G., Vascellari, A., Bruni D., Neri, M. P., Iacono, F., Kon, E., Presti, M. L., Marcacci, M. (2007)**

Arthroscopic collagen meniscus implant results at 6 to 8 years follow up  
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2007, 2: 175-83

## **VII. Abkürzungsverzeichnis**

Aqua dest.	Destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy- Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alteri, und andere
FCS	Fetales Kälberserum
G3PDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HTEP	Hüfttotalendoprothese
kDA	kiloDalton
kg	Kilogramm
KTEP	Knietotalendoprothese
l	Liter
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease, Enzym zur Spaltung der RNA
UV	Ultraviolett (Licht)
Z. n.	Zustand nach

## **VIII. Danksagung**

Mein besonderer Dank für die Fertigstellung dieser Arbeit gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Maximilian Rudert für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Wilhelm Aicher, dem Leiter des osteologischen Labors, der durch seine große Erfahrung und Kompetenz erst die Umsetzung der Experimente ermöglichte und die Arbeit im Labor stets mit wertvollen Ratschlägen unterstützte.

Herrn Dr. Maik Hoberg danke ich für die Hilfe bei der Literaturrecherche und die zahlreichen praktischen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Lidia Sabic für ihre Unterstützung bei der gesamten Arbeit und die großartige gemeinsame Zeit im Labor.

Frau Anita Hack danke ich für die vielen praktischen Tipps im Labor.  
Den operierenden Ärzten, MTA's und den OP- Schwestern der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen danke ich für die Bereitstellung der Menisken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Ajnur Jusufoska, die mir durch ihre immerwährende Unterstützung stets bei allem zur Seite steht.

Aus ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir erst das Studium und dadurch diese Arbeit ermöglicht haben und mich stets in jeder Hinsicht förderten. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Schwester Tuba und Kaan sowie all meinen Freunden für ihre fortwährende Motivation in allen Lebenslagen.