Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. N. Wülker

Doppelkultur von Endothelzellen mit Fibrochondrozyten im Vergleich zur Einzelkultur. Veränderung der Proliferation und Expression von Zytokinen / Wachstumsfaktoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Melanie Türk
aus
Ehningen
2008

Dekan:	Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. M. Rudert
2. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Skutella

Gewidmet

Robby und Lorelay

1. EINLEITUNG 7

1.1. ANATOMIE 7
1.2. GEFÄßVERSORGUNG 9
1.3. NERVENVERSORGUNG 9
1.4. HISTOLOGIE 10
1.5. BIOMECHANIK 11
1.6. LÄSIONEN 12
1.7. FOLGEN VON LÄSIONEN 13
1.8. BEHANDLUNGSSTRATEGIEN 14
1.8.1. KONSERVATIVE THERAPIE 14
1.8.2. CHIRURGISCHE INTERVENTIONEN 14
1.8.3. MENISKUSTRANSPLANTATE 15
1.8.4. TISSUE-ENGINEERING UND ZELLKULTUR 16
1.13. ZIELSETZUNG 17

2. MATERIAL UND METHODEN 19

2.1. MATERIAL 19
2.1.1. LABORTECHNISCHE APPARATE UND INSTRUMENTE / MATERIALIEN 19
2.1.2. CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL 21
2.1.2.1. Zellbiologische Medien 23
2.1.2.1.1. Mediumbestandteile für die Fibrochondrozytenkultur 23
2.1.2.1.2. Medium für Endothelzellkultur 23
2.1.2.2. Reagenzien für RT-PCR 24
2.1.2.2.1. Bestandteile und Herstellung des dNTP-Mix 24
2.1.2.3. Reagenzien für cDNA-Herstellung 24
2.1.2.4. Reagenzien für Gelelektrophorese 24
2.1.2.4.1. Bestandteile und Herstellung des TBE-Puffers 24
2.1.2.4.2. Ethidiumbromid-Lösung 25
2.1.3. ÜBERSICHT ÜBER DIE IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE 25
2.1.4. HUMANES ZELLMATERIAL 26
2.1.4.1. HUVECs 26
2.1.4.2. Fibrochondrozyten 26
2.2. METHODEN 28
2.2.1. STUDIENAUFBAU 28
2.2.2. ZELLKULTUR 30
2.2.2.1. Allgemeines 30
2.2.2.2. Anlegen der HUVEC-Zellkultur 30
2.2.2.3. Anlegen der Primärkultur humaner Fibrochondrozyten 31
2.2.2.4. Herstellung des Mediums für die HUVECs-Zellkultur 32
2.2.2.5 Herstellung des Vollmediums für die Fibrochondrozytenkultur 32
2.2.2.6. Mediumwechsel 32
2.2.3. PASSAGIEREN VON ZELLEN 33
2.2.3.1. Zellernte 33
2.2.3.2. Zellzahlbestimmung 34

2.2.3.3. Verwendete Zellzahl 34
2.2.4. Isolierung und Quantifizierung von mRNA 35
2.2.4.1. Isolierung 35
2.2.4.2. Quantifizierung 36
2.2.5. Herstellung von cDNA 37
2.2.5.1. Prinzip 37
2.2.6. Durchführung der RT-PCR 38
2.2.6.1. Prinzip 38
2.2.6.2. Durchführung der RT-PCR 39
2.2.7. Gelelektrophorese 42
2.2.7.1. Prinzip 42
2.2.7.2. Herstellung des Agarosegels 42
2.2.7.3. Auftrennen und Sichtbarmachung der PCR-Produkte 43
2.2.7.4. Bewertung der Bandenstärke 43

3. ERGEBNISSE 45

3.1 Photographien der Einzelkulturen von Fibrochondrozyten und von HUVECs 45
3.1.1 Fibrochondrozyten 45
3.1.2 HUVECs 45
3.2. Nachweisbarkeit von GAPDH und vWF in Fibrochondrozyten 46
3.2.1. RT-PCR-Bilder der Faktoren GAPDH und vWF 47
3.2.2. Auswertung der Bandenstärke der Faktoren GAPDH und vWF 48
3.3. TGF-b 49
3.3.1. RT-PCR-Bilder des Faktors TGF-b 49
3.3.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors TGF-b 49
3.4. BMP2 50
3.4.1. RT-PCR-Bilder des Faktors BMP2 50
3.4.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors BMP2 51
3.5. BMP4 52
3.5.1. RT-PCR-Bilder des Faktors BMP4 52
3.5.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors BMP4 53
3.6. IGF-1 54
3.6.1. RT-PCR-Bilder des Faktors IGF-1 54
3.6.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors IGF-1 54
3.7. IGF-2 56
3.7.1. RT-PCR-Bilder des Faktors IGF-2 56
3.7.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors IGF-2 56
3.8. EGF 58
3.8.1. RT-PCR-Bilder des Faktors EGF 58
3.8.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors EGF 58
3.9. bFGF 60
3.9.1. RT-PCR-Bilder des Faktors bFGF 60
3.9.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors bFGF 60
3.10. ECGF 62
3.10.1. RT-PCR-Bilder des Faktors ECGF 62
3.10.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors ECGF 62

4. DISKUSSION 64

4.1. ZELLKULTUR 64
4.2. ZELLCHARAKTERISIERUNG 65
RT-PCR 65
VON WILLEBRAND FAKTOR (VWF) 66
IMMUNHISTOCHEMIE 66
4.3. WACHSTUMSFAKTOREN 67
TGF-B 67
BMP2 UND BMP4 68
IGF-1 UND IGF-2 69
EGF 71
BFGF 71
ECGF 72
4.4. SCHLUSSFOLGERUNG 72

5. ZUSAMMENFASSUNG 74

6. ABBILDUNGEN UND TABELLEN 76

6.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 76
6.2. TABELLENVERZEICHNIS 78

7. LITERATURVERZEICHNIS 79

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 85

9. DANKSAGUNG 87

10. CURRICULUM VITAE 89

1. Einleitung

Aufgrund der Tatsache, dass Meniskusläsionen, unabhängig ihrer Genese, mit den aktuell zur Verfügung stehenden Therapieoptionen zwar kurzfristig gut behandelt werden können, oftmals jedoch keine befriedigenden Langzeitergebnisse erbringen und es trotz der Intervention zu einer verfrüht einsetzenden Knorpeldegeneration im Kniegelenk kommt, ist die Suche nach alternativen Therapieoptionen ein dringliches Anliegen der Forschung (1 - 4).

Bereits 1975 untersuchten Walker et al. die Rolle der Menisken bei der Kraftübertragung an Kniegelenken und ordneten ihnen zwei Hauptaufgaben zu: erstens die Flächenvergrößerung bei der Kraftübertragung und zweitens die Verbesserung der Stabilität des Kniegelenks (5). Kummer et al. sprechen von einer Vergrößerung der Tragfläche des Gelenks auf mehr als das Doppelte der reinen Knorpelkontaktfläche. Neben dieser Tragflächenvergrößerung erweitern die Menisken den Verkehrsraum der Kniegelenkresultierenden erheblich, da sie die Inkongruenz zwischen den Gelenkflächen ausgleichen. Die Autoren bezeichnen sie auch als „transportablen Gelenkflächen“ für die Femurkondylen (6). Müller et al. führen zudem eine Optimierung der Kraftübertragung und eine Dämpfung von Belastungsspitzen bei Translation und Rotation an (7). Sie wirken als Stabilisatoren, Druckverteiler und als Neutralisatoren aufgrund viskoelastischer Eigenschaften (7 - 11).

1.1. Anatomie

Die Menisken weisen im Frontalschnitt die Form eines Dreiecks auf, dessen Basis den äußeren Rand bildet. Beide setzen über die Cornuu anterius et posterius mit kurzen Fasern an der tibialen Gelenkfläche an und sind ventral durch das Lig. transversum genus miteinander verbunden (8).
Die Größe der Menisken differiert ebenso wie deren Volumen und ihre Beweglichkeit aufgrund der Beschaffenheit der tibialen Gelenkfläche. Da der laterale Anteil der tibialen Gelenkfläche kuppelartig gewölbt ist, bildet der laterale Meniskus durch seine eng beieinander liegenden Ansatzstellen einen

5/6-Kreis (7). Um eine ideale Pfanne für die laterale Femurkondyle in allen Positionen bilden zu können, ist der laterale Meniskus wesentlich elastischer fixiert als der mediale. Das Cornu posterius kann über ein oder zwei Bänder (Lig. meniscofemorale anterius und / oder Lig. meniscofemorale posterius), die mit dem Lig. cruciatum posterius ziehen, zum medialen Femurkondylen Verbindung haben. Da er nicht mit dem Lig. collaterale fibulare und nur punktuell mit der Gelenkkapsel verwachsen ist, wird er bei allen Bewegungen des Kniegelenks deutlich weniger beansprucht als der Meniscus medialis (12, 13).

Der mediale Meniskus liegt in einer Tibiamulde und ist daher weniger voluminös als sein lateraler Gegenpart (7). Seine Ansatzstellen auf dem Tibiaplateau liegen relativ weit auseinander und lassen ihn im Transversalschnitt C-förmig aussehen. Das ventrale Cornu anterius ist wesentlich dünner als das dorsale Cornu posterius. An der Außenseite ist er fest mit der Gelenkkapsel und dem Lig. collaterale tibiale verwachsen und daher deutlich weniger verschieblich als der Meniscus lateralis. Bei der Außenrotation wird er stark verlagert und gespannt, bei der Innenrotation entlastet (12, 13)

Zwischen den Menisken liegt die Area intercondylaris tibiae, von der aus die beiden Kreuzbänder zu Ihren Ursprungsstellen am Femur ziehen. Der Ansatz des vorderen Kreuzbandes befindet sich zwischen den anterioren Ansatzpunkten der beiden Menisci, der Ansatz des Lig. cruciatum posterius liegt dorsal der posterioren Meniskusansätze.

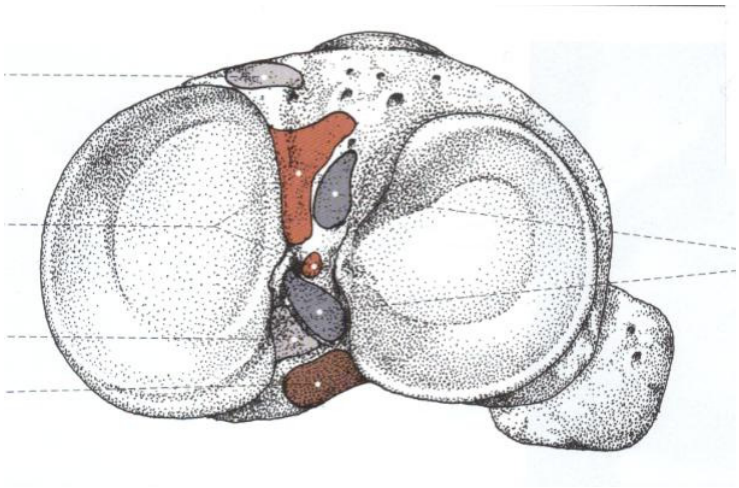


Abbildung 1: Ansatzstellen von Menisken und Kreuzbändern auf dem Tibiaplateau (14)

Der Verlauf der Kollagenfaserbündel innerhalb der Menisken folgt zwei Hauptrichtungen: die stärkeren Fasern folgen der Bogenform, die schwächeren Fasern verlaufen radiär zu einem gedachten Mittelpunkt und durchflechten die Fasern (13). Kummer et al. vergleichen diese kräftig ausgebildeten straffen Kollagenfaserbündel mit Sehnen, die von elastischen Netzen umsponnen sind (6).

1.2. Gefäßversorgung

Die arterielle Versorgung der Menisken erfolgt über ein Gefäßnetz, dessen Anteile allesamt aus der A. poplitea stammen: Die A. inferior medialis genus, die A. inferior lateralis genus, die A. media genus und ein Rete hinter dem Lig. patellae. Beide Menisken haben Anschluß an dieses Gefäßnetz über das Cornu anterius et posterius, über welche eine zirkuläre Versorgung entlang des äußeren Meniskusrandes stattfindet. Diese Versorgung erreicht etwa 10 – 30 % des Durchmessers des Innenmeniskus und etwa 10 – 25 % des Durchmessers des Außenmeniskus, die weitere Ernährung erfolgt über die Synovialmembran des Kniegelenks (8).
Aufgrund der arteriellen Versorgung wird der Meniskus in verschiedene Zonen eingeteilt, denen Heilungstendenzen zuordnen werden können (8, 15).

- *red – red - zone* = gut vaskularisiert → gute Heilungstendenz
- *red – white - zone* = mäßig vaskularisiert → mäßige Heilungstendenz
- *white – white - zone* = keine Vakularisation → sehr geringe Heilungstendez

1.3. Nervenversorgung

Dem Meniskus wird eine propriozeptive Funktion zugesprochen. Diese *Feedback*-Funktion wird durch histologische Untersuchungen bestätigt, in denen Typ-I- und Typ-II-Nervenendigungen im Vorder- und Hinterhorn nachgewiesen werden (8).

1.4. Histologie

Das Meniskusgewebe besteht aus einem Netzwerk kollagener Faserbündel, welches durchsetzt ist von Fibrochondrozyten (Meniskuszellen) und der Extrazellularmatrix (8, 9, 16). Neben diesen Hauptbestandteilen befinden sich in den durchbluteten Bereichen mikrovaskuläre Endothelzellen, nach Verletzungen können zusätzlich Myofibroblasten nachgewiesen werden (9).

Die Meniskuszellen lassen sich in zwei verschiedene Zelltypen unterteilen, welche in verschiedenen Schichten des Meniskusgewebes zu finden sind. Die oberflächlichen Schichten enthalten ovale oder fusiforme, die tiefer gelegenen Gewebsschichten runde oder polygonal geformte Zellen (9, 16). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die ovalen oder fusiformen Zellen wenige intrazelluläre Prozesse und geringe Mengen an Zytoplasma und Zellorganellen besitzen, wie Mitochondrien oder raues endoplasmatisches Retikulum. Im Gegensatz dazu enthalten die runden oder polygonalen Zellen deutlich mehr raues endoplasmatisches Retikulum, größere Glykogendepots und einen größeren Golgiapparat (9, 16).

Die humanen Menisken bestehen in der Fötalperiode rein aus Fibroblasten. Erst im Laufe der weiteren Entwicklung nimmt der Kollagengehalt auf ein Trockengewicht von 60 % bis 70 % zu, wovon mehr als 90 % dem Typ I angehören. Neben diesem werden noch Kollagen vom Typ II, III, V und VI nachgewiesen (9). Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Meniskuszellen als Fibrochondrozyten bezeichnet, da die Produktion von Kollagenen auch zu den wesentlichen Eigenschaften von Chondrozyten zählt. Als weitere fibrilläre Komponente wurde Elastin mit einem Anteil von etwa 0,6 % des Trockengewichts beschrieben, wobei die genaue Funktion letztlich noch ungeklärt ist (9).

Die Extrazellularmatrix besteht aus Proteoglykanen (1 % des Trockengewichts), nichtkollagene Proteinen (8 % bis 13 % des Trockengewichts) und Wasser, das 70 % bis 75 % der Matrix ausmacht (16). Sweigart et al. splittet die Extrazellularmatrix in vier verschiedene Bestandteile: Wasser, Proteoglykane,

Adhäsionsmoleküle und die fibrillären Komponenten, zu denen Kollagen und Elastin gerechnet werden (9).

Die Proteoglykane kommen in langer und kurzer Form vor. Die langen Proteoglykane sind verantwortlich für die Hydrierung des Meniskusgewebes und damit für dessen Kompressionsfähigkeit (zum Vergleich: die Konzentration ist achtfach höher als in Gelenkknorpelgewebe) (9). In gesundem Meniskusgewebe findet man 40 % Chondroitin-4-Sulfat, 10 % bis 20 % Chondroitin-6-Sulfat, 20 % bis 30 % Dermatan-Sulfat und 15 % Keratan-Sulfat (9).

Es wurden drei Adhäsionsmoleküle identifiziert: Kollagen Typ VI, Fibronektin und Thrombospondin (9). Sie tragen die Verantwortung für die Bindung mit anderen Matrixmolekülen oder Zellen.

1.5. Biomechanik

Die biomechanischen Eigenschaften der beiden Menisken liegen sowohl in ihrer Form und Befestigung als auch in ihrer Histologie und dem Faseraufbau begründet.

Da der Meniskus medialis wie bereits beschrieben an der Außenseite fest mit der Gelenkkapsel und dem Lig. collaterale tibiale verwachsen ist, ist seine Verschieblichkeit im Vergleich zum Meniskus lateralis eingeschränkt und seine Verletzungsanfälligkeit deutlich erhöht (12). Platzer et al. sprechen von einer etwa 20mal häufiger auftretenden Verletzung des medialen Meniskus (13).

Der fast kreisförmige Meniskus lateralis ist durch seine eng beieinander liegenden Ansatzstellen und die nur punktuelle Verwachsung mit der Gelenkkapsel flexibler in seinem Bewegungsspielraum und wird somit bei allen Bewegungen des Kniegelenks deutlich weniger beansprucht als der Meniskus medialis (12, 13).

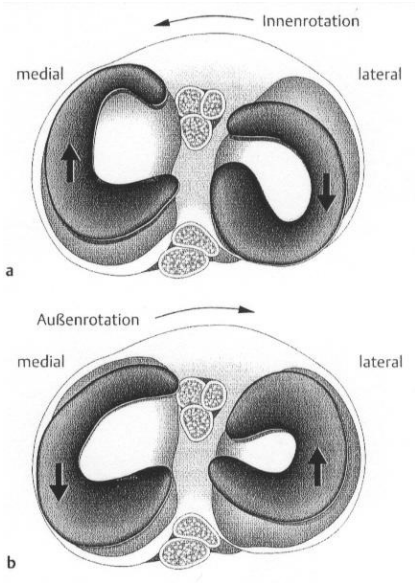


Abbildung 2: Verformung der Menisken in Abhängigkeit von der Bewegung. a) Verhalten der Menisken bei Innenrotation b) Verhalten der Menisken bei Außenrotation (8)

Wie unter 1.1. Anatomie beschrieben, verlaufen die im Meniskus vorhandenen Kollagenfasern in sowohl zirkulärer als auch radiärer Richtung (6). Grundsätzlich orientiert sich die Kollagenfaserausrichtung an den auf sie einwirkenden Kräften: Die radiär gerichteten Schubkräfte wirken von der Spitze zur Basis des im Querschnitt sichtbaren Dreiecks. Der so entstehende nach außen gerichtete Schub führt zu einer zentrifugalen Verschiebung des Meniskus, was durch die Fixierung der Meniskushörner verhindert wird. Dadurch kommt es zur zirkulär gerichtete Zugspannung. Kummer et al. sprechen von zugspannungstrajektoriell ausgerichteten Kollagenfaserbündeln, bestehend aus straffem kollagenem Bindegewebe, das, wie die Kollagenfaserbündel der Sehnen, von elastischen Netzen umsponnen ist (6).

1.6. Läsionen

Der Verlauf von Rissen im Meniskusgewebe ist abhängig vom Verletzungsmechanismus. Es entscheidet die Richtung der Gewalteinwirkung in Bezug zum Kollagenfaserverlauf. Die Kollagenfaserausrichtung gibt dabei

oftmals den Rissverlauf vor. Da die stärkeren Fasern der Halbmondform folgen, entstehen bogenförmige Längsrisse leichter als Querrisse (13).

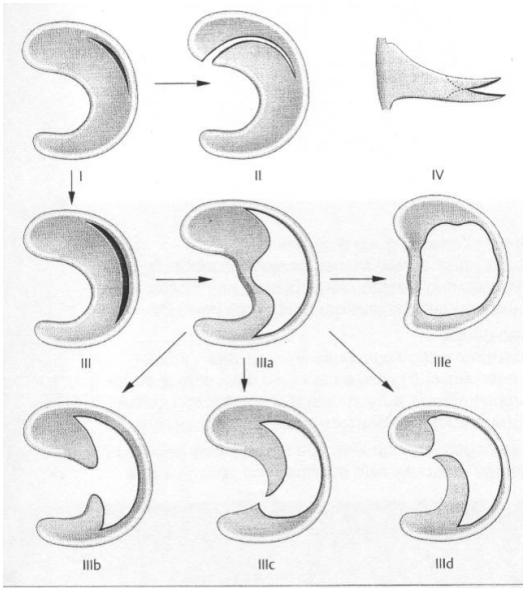


Abbildung 3: Häufigste Rissformen (8):

I: Basisnaher Längsriss
II: Lappenriss
III: Ausgedehnter basisnaher Längsriss
IIIa: Korbhenkelriss
IIIb: Rupturierter Korbhenkelriss
IIIc: Rupturierter Korbhenkelriss mit Hinterhornlappen
IIId: Rupturierter Korbhenkelriss mit Vorderhornlappen
IIIe: Dislozierter Korbhenkelriss
IV: Horizontalriss

1.7. Folgen von Läsionen

Ein Meniskusdefekt, traumatisch oder degenerativ entstanden, führt immer zu einem gewissen Funktionsverlust, was sich in einer größeren Beanspruchung der anderen Gelenkstrukturen, insbesondere der Kreuzbänder und der Knorpelflächen, zeigt. Folge ist eine auf vergrößertem Verschleiß basierende verfrüht einsetzenden Degeneration des gesamten Kniegelenks, die in Form von Arthrose bis hin zur Arthritis oder Synovitis sichtbar wird (2, 11, 17- 19). Bei kleinen Defekten wird vom Patienten meist keine direkte Beeinträchtigung

wahrgenommen, bei größeren Ein- oder Ausrissen kann das Kniegelenk im schlimmsten Fall in einer Stellung arretieren, was eine baldige Operation unabdingbar macht.

1.8. Behandlungsstrategien

1.8.1. Konservative Therapie

Stabile Meniskusläsionen mit einer Ausdehnung kleiner als 5 mm bzw. 8 mm (je nach Studie) sind häufig klinisch völlig symptomlos und bedürfen keiner chirurgischen Therapie (8, 11). Einzig eine stabile Bandsituation ist Voraussetzung für die optimale Ausschöpfung des Heilungspotetials. Hierbei ist die Kniestabilisierung vor allem durch ein intaktes ACL zu gewährleisten (10).

1.8.2. Chirurgische Interventionen

Der ältesten Behandlungsmethode, der Meniskektomie, folgten, wann immer durchführbar, immer sparsamere Teilresektionen, da die Langzeitfolgen einer Totalentfernung die funktionelle Bedeutung der Menisken für das Kniegelenk deutlich machten (20 - 22). Zudem führte die Entwicklung der Arthroskopie zu schonenderen Eingriffen, deren Komplikationsrate insgesamt und im Speziellen bei der Behandlung von Meniskusläsionen immer weiter abnahm (11, 23, 24). Mittels verschiedener Nahttechniken und dem Einsatz immer kleiner werdender Werkzeuge und bioabsorbierbarer Anker kann das Ziel einer Meniskusteilresektion oder auch einer Refixation erreicht werden (25, 26). Für den Erfolg einer Operation sind neben den immer vorhandenen Operationsrisiken Faktoren wie die Operationstechnik, das Ausmaß des Traumas und ein stabiler Bandapparat, im Besonderen ein funktionierendes ACL, verantwortlich (6, 27 - 30).
Was die Behandlung von Intrasubstanz-Meniskusläsionen angeht, erbringt die Teilresektion im Vergleich zu anderen Methoden die besten klinischen

Resultate (31). Eine erfolgreiche Meniskusrefixation ist zur Zeit nur in den vaskularisierten Bereichen des Meniskus möglich.
Die Heilung wird durch den intraoperativ erzeugten Hämarthros und den sich dabei bildenden Fibrinklumpen unterstützt (31 - 34). Ebenfalls hilfreich ist der Einsatz des sogenannten Meniscal Rasping, welches mit dem Ziel einer Vaskularisierungs- und Heilungsinduktion durchgeführt wird. Nachweislich führt das Meniscal Rasping im avaskulären Bereich zu einer vermehrten Expression von Cytokinen (IL-1α, TGF-β, PDGF und PCNA) (35).
Der Versuch einer nahtlose Reparatur einer Meniskusläsion im avaskulären Bereich mit Hilfe einer photoaktiven Naphthalimid-Verbindung zeigte innerhalb einer in vivo Studie zwar den Verschluss der Läsionen, eine wirkliche Heilung fand aber nicht statt, es kam zu einer Verringerung der Zellzahl (36). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem *Thermal welding* erzielt, das bei einer Schweißtemperatur von 63° C zu einem Läsionsverschluss führte (37).

1.8.3. Meniskustransplantate

Das erste allogene Meniskustransplantat wurde bereits 1984 Schafen eingesetzt (4, 47). Diesem ersten Versuch folgten eine Vielzahl weiterer Forschungsarbeiten, die in der Hauptsache am Tiermodell unternommen wurden (4, 9, 16, 18, 36 - 42). Untersucht wurden allogenen Transplantaten, die entweder vital (46, 47), nach einer Aufbewahrungszeit in tiefgekühltem Zustand (4, 40, 44 – 52) oder nach anderweitiger Vorbehandlung (44, 51, 52) implantiert wurden. Neben der Möglichkeit, die Spendermenisken tiefzukühlen (*Cryopreserved meniscal allografts*), testete man γ-Strahlen-sterilisierte gefriergetrocknete oder auch chemisch getrocknete Menisken, wobei die beiden letzteren zu avitalem Gewebe führen und sich daher nicht in der klinischen Anwendung durchsetzen (53). Eine vierte Aufbewahrungsmöglichkeit besteht in der Lagerung der frischen Transplantate in Kulturlösung aus DMEM, Antimykotika und FCS, wie sie auch in dieser Arbeit für die Zellkultivierung verwendet wurde (53). Da das Meniskusgewebe zu den bradytrophen Geweben des Körpers zählt, können allogene Menikustransplantate ohne

Immunsuppression transplantiert werden (54, 55). Problematisch gestaltet sich eher die Einheilung, die durch die einwirkende mechanische Belastung erschwert wird (55).

Der klinische Einsatz der tiefgekühlten allogenen Transplantate wird bereits seit längerem vor allem in den USA an zuvor meniskektomierten, jetzt symptomatischen Patienten durchgeführt, bei denen alle anderen Komorbiditäten, die als eventuelle Schmerzquelle in Frage kommen, ebenso wie eine koexistierende Arthritis ausgeschlossen werden können. Allein die Langzeitergebnisse der allogenen Transplantate sind keineswegs zufriedenstellend (4, 43 - 52). Unter anderem wurde auch der Verlust von zuvor tiefgekühlten allogenen Transplantaten (in drei von insgesamt 25 Fällen) beschrieben, dessen Ursachen in einer mangelhaften Vaskularisierung, einer unzureichenden Transplantatfixierung und einer nach der Operation weiter bestehenden Instabilität des Kniegelenks zu suchen sind (55).

Prinzipiell ist ein autologes Meniskustransplantat dem allogenen Transplantat vorzuziehen, wobei auch auf dem Gebiet des künstlichen Meniskusersatzes geforscht wird. Ein Beispiel hierfür zeigte eine Studie an Kaninchen, denen der mediale Meniskus mit einer Kombination aus Teflon und Periost ersetzt wurde. Die Ergebnisse waren jedoch nicht überzeugend, da unter anderem von Teflonpartikeln ausgelöste Gelenkschleimhautentzündungen auftraten (56).

1.8.4. *Tissue-engineering* und Zellkultur

In der Vergangenheit wurden hauptsächlich tierische Zellen für die Grundlagenforschung an Meniskusgewebe herangezogen, an welchen Heilungsprozesse nachvollzogen werden konnten (41, 57). Daher wird zur Zeit mit Hilfe der Technik des *Tissue-engineerings* versucht, Meniskusläsionen mit autologem Zellmaterial zu behandeln, wobei sowohl die Heilungsinduktion, als auch der teilweise oder vollständige Ersatz von Meniskusgewebe angestrebt werden (58). Der Einsatz von Wachstumsfaktoren oder auch von anderen anabolen Stoffen, wie zum Beispiel TGF-β zur Zellstimulation, erbringt unter isolierten Laborbedingungen gute Ergebnisse, sie sind jedoch für einen

gezielten therapeutischen Einsatz im komplexen System des Kniegelenks nicht ausreichend untersucht (33, 58). Auch der Einsatz unterstützender Gentherapie ist noch nicht ausgereift und bedarf weiterer Nachforschungen (59).
Ein mit autologem Gewebe besiedeltes Gerüst, ein *Scaffold*, das in der Form dem Meniskus nachempfunden ist, erfordert den Einsatz einer Zellart, die als Reinkultur in absehbarer Zeit vermehrt werden und dann auf das *Scaffold* dauerhaft aufgesiedelt werden kann. Als Quellen für die Spenderzellen werden neben dem Meniskus selbst (57, 60, 61), Synovia (62), Knorpelgewebe (63) oder mesenchymale Stammzellen diskutiert.

1.13. Zielsetzung

Die zuvor aufgeführten Therapieoptionen erzielen allesamt nur kurzfristig gute Ergebnisse. Auf lange Sicht kommt es jedoch trotz des Eingreifens zu einer verfrüht einsetzenden Degeneration. Daher ist die Grundlagenforschung auf dem vielversprechenden Gebiet des *Tissue-engineering* zu forcieren.

Da Meniskusnähte im gut vaskularisierten Anteil des Gewebes heilen können, ist es naheliegend, dass endotheliale Faktoren hier eine Rolle spielen. Daher ist der Einfluss zu klären, den Endothelzellen auf die Expression von Wachstumsfaktoren in Fibrochondrozyten ausüben. Grundsätzlich ist bekannt, dass Endothelzellen eine Reihe von Wachstumsfaktoren selbst bilden können und an der Wundheilung per se beteiligt sind (64). Bisher jedoch wurden keine Untersuchungen durchgeführt, die die gegenseitigen Beeinflussung von Endothelzellen und Fibrochondrozyten in Cokultur bezogen auf die Veränderung des Proliferations- und Expressionsverhaltens analysieren.

Im Labor der Orthopädie des Universitätsklinikums Tübingen wurde das endogene Expressionsverhalten von humanen Fibrochondrozyten in Doppelkultur mit Endothelzellen (HUVECs) im Vergleich zur reinen Fibrochondrozytenkultur mittels RT-PCR in drei parallelen Versuchsreihen untersucht.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Expression der folgenden Wachstumsfaktoren und Zytokine: ECGF, IGF-1 u. –2, TGF-β, BMP2 und 4, FGF-2 und EGF, sowohl in der Fibrochondrozyten-Einzelkultur als auch unter den Bedingungen der Cokultur mit Endothelzellen (HUVECs).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Labortechnische Apparate und Instrumente / Materialien

Absaugpumpe

Suc-O-Mat; Bachofer, Reutlingen/D

Brutschrank

CO2 Auto Zero Inkubator, Heraeus, Hanau/D

Einmalskalpelle

Cutifix; Braun Medical AG, Melsungen/CH

Eppendorf-Cups

0,5ml; Eppendorf, Hamburg/D

Feinwaage

Mettler P1210; Mettler Toledo, Giessen/D

Gelkammer

DNA Pocket-Block UV; Biozym, Hess. Oldendorf/D

Gewebekulturplatte 6-Well

Greiner GmbH, Nürtingen/D

Kulturflaschen

Tissue Culture Flask 250ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA

Lichtmikroskop

Fluovert FS Mikroskop; Leitz, Wetzlar/D

Magnetrührer

Ikamag RCT; Ika-Labortechnik, Staufen i.Br./D

Mixer

Super-Mixer; Lab-Line Instruments, Inc., USA

PCR-Block

Thermocycler UNO II; Biometra, Göttingen/D

Petrischalen

Cellstar, 94/16mm, steril; Greiner, Nürtingen/D

Photoapparat

Vario-Orthomat; Leitz, Wetzlar/D

Pinzetten

Fa. Aesculap, Tuttlingen/D

Pipetten

EpT.I.P.S.; Eppendorf, Hamburg/D

Serological Pipet, 1, 2, 5, 10, 25ml; Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA

Combitips Biopur; Eppendorf, Hamburg/D

Pipettierhilfen

Pipetman 10/20/100/200µl; Gilson, Middleton/USA

Accujet; Brand GmbH, Wertheim/D

Power Pack P25 (Gelelektrophorese)

Biometra; Göttingen/D

Scheren

Aesculap, Tuttlingen/D

Spectrophotometer

Jasco V530; Jasco, Groß Umstadt/D

Sterilarbeitsbank

Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl/D

Sterilfilter

Millex GV 0,22µm; Millipore, Molsheim/F

Test-Röhrchen

PP Test tubes 50ml; Greiner, Nürtingen/D

Urinbecher

Wasserbad

Memmert GmbH, Schwabach/D

Daglef Patz, Wankendorf/D

Zentrifuge

Zentrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg/D

Zentrifuge 5412; Eppendorf, Hamburg/D

2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

2-Mercaptoethanol

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Agarose

SeaKem LE agarose; Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland/USA

Borsäure

Merck, Darmstadt/D

Bovines Serumalbumin

Albumine, bovine, Fraction V; Sigma Aldrich, St. Louis/USA

cDNA-Umschreibekit (dNTP-Mix, Reverse Transkripase, RNAse-Inhibitor)

BD Biosiense, Palo Alto, California/USA

Kollagenase Typ XI

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Desinfektionslösung

Antifect Liquid; Schülke & Mayr, Norderstedt/D

DNA-Eichmarker

100bp DNA-Ladder; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

dNTP-Mix

Roche, F

***Dulbeccos` modified eagle medium* (DMEM)**

+L-Glutamine +15mM HEPES

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

***Endothelial growth medium* (EGM)**

Cambrex Bioscience, Walkersville/USA

Ethanol

Ethanol p.a., absolut; Merck, Darmstadt/D

Ethidiumbromid

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Formalin

Rotihistofix 4%, Phosphat-gepuffert, pH 7,2; Roth, Karlsruhe/D

Fötales Kälberserum (FCS)

Seromed / Biochrom KG, Berlin/D

Fungizone (Amphotericin B)

250 UG/ml; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

H_2O dest.

Universitätsapotheke Tübingen

HUVEC

Cambrex Walkerville/USA MD

Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

$MgCL_2$

Roche, F

Oligo dt Primer

Amersham Pharmacia Biotec, Piscataway/USA

DPBS-Puffer

Dulbecco´s Phosphate buffered saline 0,0095 M; Cambrex Bio Science, Verviers/B

PBS-Tabletts; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Penicillin-Streptomycin

10.000 U/mg Pen, 10.000 µg/ml Str.; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Phenylhydrazin

Merck, Darmstadt/D

***Primer*: BFGF (FGF2), BMP2, BMP4, ECGF, EGF, GAPDH, IGF-1, IGF-2, TGF-β, von Willebrand Faktor (vWF)**

MWG, Ebersberg/D

Puffer ohne MgCl2
Roche, F

RNA-Extraktionskit

RNeasy Minikit (250); Quiagen, Maryland/USA

RNase-free water

10ml QIAGEN GmbH; Hilden/D

Taq-Polymerase

Roche, F

Titriplex III

EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat; Merck, Darmstadt/D

Trizma Base

Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Trypsin EDTA (1x)

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Vitaminlösung

MEM Vitamins Solution (100x); Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Waschdetergenz

Tween 20; Merck, Darmstadt/D

Wasserdesinfektion

Acryl AquaClean; WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden/D

Xylol p.a.

Merck, Darmstadt/D

2.1.2.1. Zellbiologische Medien

2.1.2.1.1. Mediumbestandteile für die Fibrochondrozytenkultur

- 500 ml DMEM
- 10 % FCS
- 2 % Penicillin/Streptomycin
- 12 % Fungizone (Amphotericin B)
- 2,4 % MEM Vitaminlösung
- 0,1 % ITS

2.1.2.1.2. Medium für Endothelzellkultur

Endothelial growth medium (EGM) der Firma Cambrex Bioscience (Walkersville/USA).

2.1.2.2. Reagenzien für RT-PCR

- RNase-freies Wasser
- PCR-Puffer bestehend aus 100 mM Tris-HCl und 500 mM KCl, pH-Wert 8,3
- $MgCl_2$ zur Blockierung der cDNA-Phosphatgruppen
- dNTP-Mix (siehe unter Punkt 4.1.2.2.1)
- 250 Units Taq-Polymerase
- Primer: BFGF (FGF2), BMP2, BMP4, ECGF, EGF, GAPDH, IGF-1, IGF-2, TGF-β, von Willebrand Faktor (vWF)

2.1.2.2.1. Bestandteile und Herstellung des dNTP-Mix

Je 100 mM Cytosin, Thymidin, Guanin und Adenosin wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Basengemisch wurde auf 10 mM mit RNase freiem Wasser verdünnt und in dieser gebrauchsfertigen Form bei –20°C gelagert.

2.1.2.3. Reagenzien für cDNA-Herstellung

- 5-fach Puffer der Firma BD Biosciences
- 200 U/µl Reverse Transkriptase
- 20 µM Oligo dt *Primer*
- 10 mM dNTP-Mix
- 40 U/µl *RNase-Inhibitor*

2.1.2.4. Reagenzien für Gelelektrophorese

2.1.2.4.1. Bestandteile und Herstellung des TBE-Puffers

- 121 g Tris base (1 M)
- 61,7 g Borsäure (1 M)
- 7,44 g EDTA-$Na_2 \times 2\ H_2O$ (20 mM)

Die oben genannten Bestandteile wurden gemischt und mit Aquadest auf 1 l aufgefüllt.

2.1.2.4.2. Ethidiumbromid-Lösung

Die gebrauchsfertig gelieferte Lösung der Firma Sigma Aldrich (St. Louis/USA) ist in ihrer Konzentration 0,001 %ig.

2.1.3. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Tabelle 1: Oligonukleotide (*Primer*)

Oligonukleotide	**Sequenz (5` → 3`)**
GAPDH	TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC
TGFβ1	GCC CTG GAC ACC AAC TAT T AGG CTC CAA ATG TAG GGG CAG G
BMP2	TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA ACT CG GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC
BMP4	ACT GGT CCA CCA CAA TGT GAC ACG GCT GAA GTC CAC ATA GAG CGA GTG
IGF1	ACA TCT CCC ATG TCT CTG GAT TTC CTT TTG C CCC TCT ACT TGC GTT CTT CAA ATG TAC TTC C
IGF2	GGA ATC CCA ATG GGG AAG TC TTG GTG GGT AGA GCA ATG AGG
EGF	TCT CAA CAC ATG CTA GTG GCT GAA ATC ATG TCA ATA TAC ATG CAC ACA CAA TCA TGG AGG C
BFGF = FGF2	GAG AAG AGC GAC CCT CAC A TAG CTT TCT GCC CAG GTC C

ECGF	TTA CTG TGA GAC TGT ATG TT TGA GTA GCT TAT ACA TTG TA
Von Willebrand	TGT ACC ATG AGG TTC TCA ATG C TTA TTG TGG GCT TAG AAG GG

2.1.4. Humanes Zellmaterial

2.1.4.1. HUVECs

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) wurden von der Firma Cambrex (Walkersville/USA) bezogen und von uns in EGM-Medium kultiviert und vermehrt.

2.1.4.2. Fibrochondrozyten

Die verwendeten Fibrochondrozyten entstammen allesamt Menisken, die in der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen im Rahmen eines Kniegelenkersatzes entnommen wurden. Die schriftliche Einwilligung der Spender wurde jeweils zuvor zusätzlich zur standardisierten Operationseinwilligung eingeholt, ein positives Votum der Ethikkommission lag bereits vor Beginn der Durchführung vor.
Insgesamt handelt es sich um 6 Patienten, 5 Frauen und ein Mann, deren durchschnittliches Alter bei 73,5 Jahren lag. Allen wurde eine Genesis-Knie-Totalendoprothese eingesetzt. Das Alter der Patientenmenisken spielte für die Qualität der Fibrochondrozytenkulturen keine Rolle, da sichtbar degenerierte Bereiche verworfen und nur Zellen aus intakten Gebieten eingesetzt wurden. Zudem zeigten bereits Lafeber et al. an Knorpelzellen, dass die Proliferationseigenschaften der Zellkulturen unabhängig vom Spenderalter sind, was sich auf die den Chondrozyten ähnlichen Fibrochondrozyten übertragen läßt (77).

In der folgenden Tabelle sind die Daten zu den Spendern gesammelt aufgeführt.

Tabelle 2: Patientendaten

Patientenkürzel	Geschlecht	Geburtsdatum	Relevante Diagnose	Therapie
AB26	W	1939	Gonarthrose	Genesis-KTP
DU23	W	1929	Vagusarthrose	Genesis-KTP
KH25	W	1935	Gonarthrose	Genesis-KTP
QQ28	W	1922	Varusgonarthrose	Genesis-KTP
SL22	W	1932	Gonarthrose	Genesis-KTP
KW27	M	1926	Gonarthrose	Genesis-KTP

2.2. Methoden

2.2.1. Studienaufbau

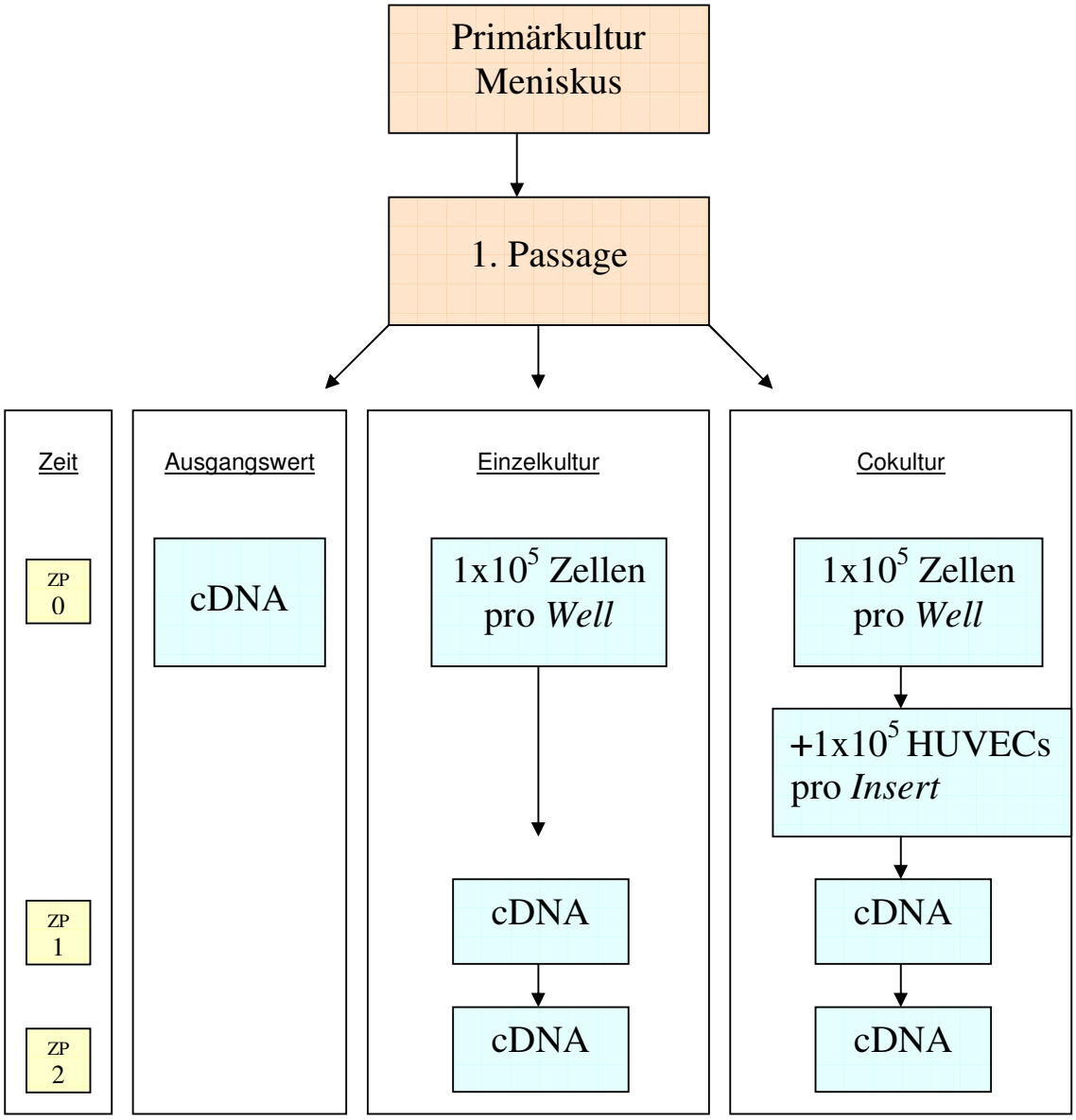


Abbildung 4: Studienaufbau mit verschiedenen Zeitpunkten (ZP) der Zellaussaht (incl. Zellzahlen pro *Well*) und Herstellung von cDNA.

Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Tag 0, an dem die Meniskuszellaussaat sowohl für die Einzel- als auch für die Cokultur in die 6-*Well*-Platten stattfand. Diese erfolgte jeweils in zwei 6-*Well*-Platten, um für die folgenden beiden Zeitpunkte

jeweils eine komplette 6-*Well*-Platte für die cDNA-Synthese zur Verfügung zu haben. Es wurden pro *Well* $1x10^5$ Meniskuszellen in 2,5 ml FCS-haltigem Vollmedium ausgesät. Zur selben Zeit erfolgte die mRNA-Extraktion aus $1x10^6$ Zellen der ersten Passage, um einen Ausgangswert der Faktorenkonzentration zum Zeitpunkt 0 zu erhalten.

Die Meniskuszellen benötigten nach der Aussaat etwa zwei Tage um sich am Grund der *Wells* abzusiedeln. Um die Gefahr der Einschwemmung von Meniskuszellen in die Endothelkultur zu minimieren und nicht zu viele Zellen beim anstehenden Mediumtausch (von FCS- zu EBM-Medium) zu verlieren, war es notwendig, diese Zeit abzuwarten, bevor am Tag drei die HUVECs zu den für die Cokultur bestimmten Zellen gesetzt wurden.

Für das Anlegen der Cokultur setzte man nach dem Absaugen des FCS-Mediums in jeweils ein *Well* ein *Insert* ein, dessen Boden einem Filter mit einer Porengröße von 2 µm entsprach. Diese Porengröße verhinderte einerseits die Zellmigration beider Zellarten, ermöglichte aber andererseits den Stoffaustausch über das Medium. Diese mögliche Kommunikation der beiden Zellarten war die Grundvoraussetzung für unseren Versuchsaufbau. In jedes *Insert* wurden $1x10^5$ HUVECs ausgesät, dann pro *Well* und *Insert* etwa 2,5 ml EBM-Medium zugegeben, die Zellen für die Einzelkultur blieben unangetastet.

Am Tag sieben, welcher dem Zeitpunkt 1 entsprach, wurde aus den Meniskuszellen jeweils einer 6-*Well*-Platte der Einzel- und der Cokultur die mRNA extrahiert, während ein teilweiser Mediumwechsel bei den für den Zeitpunkt 2 bestimmten Zellen stattfand.

Am Zeitpunkt 2, Tag zehn der Zellkultur, erfolgte die mRNA-Extraktion aus den beiden verbliebenen 6-*Well*-Platten.

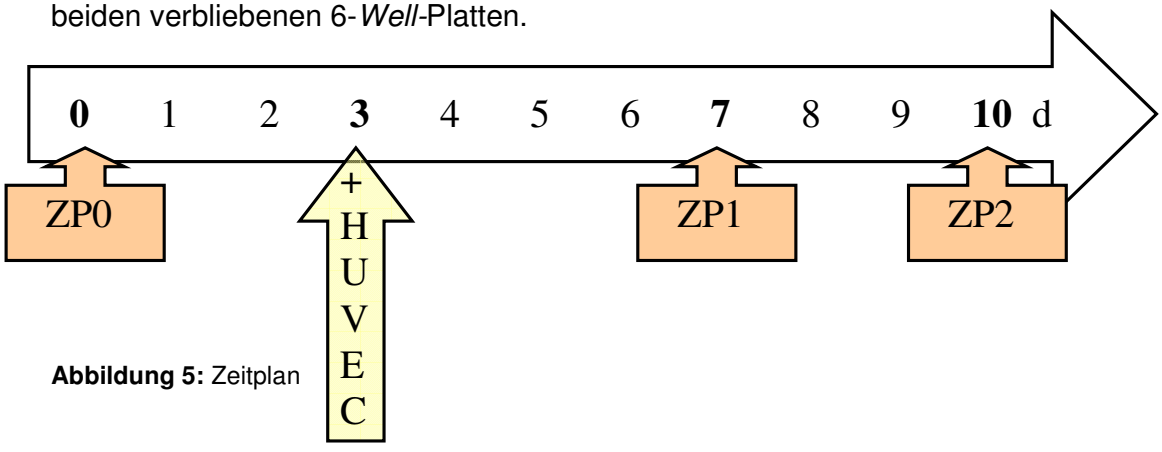


Abbildung 5: Zeitplan

Tabelle 3: Aufschlüsselung der verschiedenen Zeitpunkte der Zellernte im Verlauf der Arbeit

ZP 0	= entspricht dem Tag der Meniskuszelleinsaht in die 6-*Well*-Platten, ist also der Zeitpunkt 0 der Kultur bzw. der Cokultur.
ZP 1-	= entspricht dem Tag 7 der Kontrollkultur (nur Meniskuszellen in 6-*Well*-Platten)
ZP 1+	= entspricht dem Tag 7 der Cokultur (Meniskuszellen in 6-*Well*-Plattten mit Endotholezellen in *Inserts*)
ZP 2-	= entspricht dem Tag 10 der Kontrollkultur
ZP 2+	= entspricht dem Tag 10 der Cokultur

2.2.2. Zellkultur

2.2.2.1. Allgemeines

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Sterilbank mit *laminar airflow* 4 m/s). Vor Inbetriebnahme der Sterilbank wurde diese mit Desinfektionsmittel ausgesprüht und zusätzlich für mindestens 10 min eine UV-Licht-Desinfektion angeschaltet. Alle notwendigen Geräte und Materialien wurden steril verwendet, unsterile Lösungen durch einen Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße filtriert.
Die Bedingungen im Brutschrank (37°C, 5% CO2 und Wasserdampfsättigung) wurden über den gesamten Arbeitszeitraum hinweg konstant gehalten.
Die verwendeten Medien wurden bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

2.2.2.2. Anlegen der HUVEC-Zellkultur

Die auf Trockeneis gelieferte Zelllinie wurde nach dem Auftauen in EGM-Medium im Brutschrank unter den oben beschriebenen Bedingungen kultiviert und anschließend, um die Zellzahl zu erhöhen, bis in die dritte Passage expandiert.
In einer Reihe von Vorversuchen, die im Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführt wurden, hatte sich gezeigt, dass die Endothelzellen nicht in mit fötalem Rinderserum versetztem Medium gediehen. Sie benötigten für ein optimales Wachstum humanes Serum als Mediumzusatz. Aus diesem Grund erfolgte am Tag drei der Studie (mit Beginn der Cokultur) ein Wechsel von FCS- zu EBM-Medium.

2.2.2.3. Anlegen der Primärkultur humaner Fibrochondrozyten

Das Meniskustotalresektat wurde nach der Entnahme im Operationssaal in ein steriles Tansportgefäß, in etwas steriler Kochsalzlösung zum Schutz vor Austrocknung, überführt und in die Laborräume verbracht. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Unter der Sterilbank wurde das Meniskusmaterial in einer Petrischale mit etwa 10 ml DPBS übergossen. Es erfolgte die Säuberung von Fremdgewebe wie etwa Synovia. Um eine möglichst große Oberfläche für den späteren Kollagenaseverdau zu schaffen zerkleinerte man den Meniskus mit Hilfe von zwei Skalpellen und einer Pinzette soweit, bis eine breiartige Masse entstand. Dieser Gewebebrei wurde nach Überführung in ein 50 ml-Röhrchen einer zweimaligen Waschprozedur mit jeweiliger Zugabe von 40 ml DPBS unterzogen. Jeder Waschgang dauerte 7 min bei 4°C und 1500 rpm in der Zentrifuge, der Überstand bestehend aus DBPS, Blut- und Fettbestandteilen anschließend abgesaugt. Direkt im Anschluss erfolgte der Zusatz von 5 ml 0,4% Kollagenaselösung zur Beseitigung der nicht erwünschten Interzellularsustanz, die Inkubationszeit betrug 4 h im 37°C warmen Wasserbad. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt und mit Vollmedium auf 40 ml aufgefüllt. Es folgte abermals ein Waschgang (4°C,1500 rpm, 7 min), daraufhin das Absaugen des Überstandes und ein Lösen des Gewebebreis in einer entsprechenden Menge Vollmedium. Von

dieser Gewebesuspension wurden jeweils etwa 12 ml pro Kulturflasche auf mindestens 4 Kulturflaschen verteilt und zur Anzucht in den Brutschrank gestellt.

2.2.2.4. Herstellung des Mediums für die HUVECs-Zellkultur

Das benötigte EBM wurde als Fertigmedium geliefert, so dass nur noch die mitgelieferten Zusätze beigefügt werden mussten.

2.2.2.5 Herstellung des Vollmediums für die Fibrochondrozytenkultur

Zu 500 ml DMEM-Grundmedium wurden 50 ml FCS, 10 ml Penicillin/Streptomycin, 6 ml Fungizone (Amphotericin B), 12 ml MEM-Vitaminlösung und 0,5 ml ITS unter sterilen Bedingungen hinzugefügt.
Das FCS musste vor Gebrauch wie folgt behandelt werden: Hitzeinaktivierung für 30 min im Wasserbad bei 56°C, Bindung unerwünschter Bestandteile mithilfe 1 g Aktivkohle auf einem Schüttler für 1 h, anschließende Sterilfiltration. Die Lagerung der Zusätze erfolgte nach deren Vorportionierung. FCS, Penicillin/Streptomycin, Fungizone und die Vitaminlösung lagerten bei –20°C und kamen unmittelbar vor Gebrauch zum Auftauen in ein 37°C warmes Wasserbad. Das Grundmedium und ITS wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.6. Mediumwechsel

Um die Adhäsion der neu angesetzten Fibrochondrozyten in den Kulturflaschen zu gewährleisten, wurde eine Ruhephase von circa 6 Tagen eigehalten. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle erfolgte der erste Mediumwechsel. Nach vorsichtigem Absaugen der Hälfte des verbrauchten Mediums mit Hilfe einer Pasteurpipette erfolgte die Zugabe von 6ml des 37°C warmen Vollmediums. Alle weiteren Mediumwechsel erfolgten im Abstand von 3 bis 4 Tagen. Hierbei wurde jeweils das gesamte Medium ausgetauscht und wieder 12 ml frisches

Vollmedium zugegeben. Die Mediummenge für die 6-*Well*-Platten lag bei 2,5 ml.
Der pH-abhängige Farbumschlag wurde durch einen Farbindikator hervorgerufen, das Absinken des pH-Wertes lag in der Anhäufung von Stoffwechselendprodukten begründet.

2.2.3. Passagieren von Zellen

In den Kulturflaschen befanden sich bei Erreichen der Konfluenz etwa $1x10^6$ Zellen. Da in diesem Stadium des *Monolayer* aufgrund der gegenseitigen Kontaktinhibition kein weiteres logarithmisches Wachstum mehr zu erwarten war, musste, um eine ausreichende Vermehrung garantieren zu können, das Passagieren der Zellen erfolgen. Bis zur Verwendung der Zellen im eigentlichen Versuchsablauf wurden die Fibrochondrozyten einmal, die HUVECS dreimal passagiert.

2.2.3.1. Zellernte

Nach Erreichen des Konfluenzstadiums der Fibrochondrozyten in den Kulturflaschen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit DPBS gewaschen. Zur Aufhebung der Zelladhärenz erfolgte die Zugabe von jeweils 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung mit anschließender Inkubation im Brutschrank. Der Ablösevorgang dauerte zwischen 2 bis 5 min und ließ sich unter dem Lichtmikroskop überprüfen. Bei vollständiger Ablösung wurde die Reaktion mit 5 ml Vollmedium abgestoppt, um eine weitere Schädigung der Zellen zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C wurde der Überstand abgesaugt und das verbliebene Zellpellet vorsichtig in 20 ml Vollmedium gelöst.

2.2.3.2. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.
Ein angefeuchtetes Deckglas wurde auf die Zählkammer aufgesetzt und dessen korrekter Sitz durch das Sichtbarwerden der Newtonschen Ringe überprüft. Es folgte das Auftropfen eines Tropfens der Zellsuspension an den Rand des Deckglases. Durch Kapillarkräfte wurde dieser unter das Deckglas gesogen und die Zellen in der Zählkammer verteilt. Das Zählen der lebenden Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop (100-fache Vergrößerung) in allen 4 Großquadraten der Kammer. Die so erhaltene Zahl **n** wurde in folgende Formel eingesetzt:

n/4 (Großquadrate) x 10^4 (Volumenfaktor) x 20 ml (Lösungsmittel)
= Zellzahl pro ml

Daraufhin wurde die gewünschte Zellzahl in der entsprechenden Menge Lösung für die weiteren Arbeitsschritte aufgeteilt.

2.2.3.3. Verwendete Zellzahl

Ausgehend von der Annahme, dass sich in einer Kulturflasche bei konfluent besiedeltem Flaschenboden $1x10^6$ Zellen befinden, benötigten wir für die Ausführung unserer Versuche $3,4x10^6$ Meniskuszellen und ebenso viele HUVECs. Um diese Zellzahlen sicherzustellen, verwendeten wir die Meniskuszellen der ersten Passage und zogen die HUVECs bis in die dritte Passage hoch.
Es wurden $1x10^5$ Meniskuszellen pro *Well* und $1x10^5$ HUVECs pro *Insert* ausgesät.

2.2.4. Isolierung und Quantifizierung von mRNA

2.2.4.1. Isolierung

Die Isolierung der mRNA aus Fibrochondrozyten erfolgte mit einem RNA-Extraktionskit, dem RNeasy Minikit der Firma Quiagen, aus den geernteten Zellen.

Im Vorfeld wurde eine RLT-Puffer-Stammlösung aus 10 ml des RLT-Puffers und 100 µl Mercaptoethanol hergestellt und der RPE-Puffer mit 100% Ethanol verdünnt.

Zu Beginn wurde das in Vollmedium gelöste Zellpellet zentrifugiert (7 min, 4°C, 1500 rpm), der Überstand verworfen, das Sediment in 1 ml DPBS resuspendiert und abermals wie zuvor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Zellpellet fügte man 350 µl der RLT-Puffer-Stammlösung und 350 µl 70% Ethanol hinzu um es anschließend mit Hilfe einer Insulinspritze zu homogenisieren.

Zur Aufreinigung der RNA wurde das gesamt Volumen auf die Säule (*spin column*) übertragen und bei Raumtemperatur für 15 s bei 10 000 Rpm zentrifugiert. Die RNA verblieb aufgrund von Ionenautauscheffekten in der Säule, das Eluat wurde verworfen. Auf die Säule gab man im Anschluss daran 350 µl RW1-Puffer, zentrifugierte bei Raumtemperatur für 15 s bei 10 000 Rpm und verwarf abermals das Eluat. Nun wurden 10 µl DNase stock solution und 70 µl RDD-Puffer gemischt und in die Säulenmitte aufgetragen um in den folgenden 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur die unerwünschte DNA zu eliminieren. Es folgten drei Waschschritte: erstens mit 350 µl RW1-Puffer und Zentrifugation für 15 s bei 10 000 Rpm in Raumtemperatur, zweitens mit 500 µl RPE-Puffer für 15 s bei 10 000 Rpm und drittens mit abermals 500 µl RPE-Puffer, diesmal für 2 min bei 10 000 Rpm. Das Eluat wurde jedes mal verworfen. Zum Trocknen der Säule und zur Entfernung der letzten Ethanolrückstände wurde diese nochmals für 15 s bei 10 000 Rpm zentrifugiert.

Im nun folgenden letzten Schritt eluierte man die RNA, indem man die Säule in ein neues Eppendorf-Cup einsetzte und 40 µl RNase freies Wasser auf die Säule auftrug. Durch die folgende Zentrifugation (1min, 10 000 Rpm, Raumtemperatur) löste sich die aufgereinigte RNA und wurde im Eluat als RNA-H_2O-Suspension aufgefangen und sofort auf Eis gestellt. Es folgte die Quantifizierung und entweder die Umschreibung in cDNA oder die sofortige Lagerung bei –70°C.

2.2.4.2. Quantifizierung

Die Quantifizierung der eluierten mRNA erfolgte mit dem Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Das Prinzip dieser Meßmethode beruht auf der Eigenschaft von Stoffen, Licht einer bestimmten Wellenlänge abhängig von der Stoffkonzentration zu absorbieren. Die Absorption und die Konzentration sind zueinander proportional, weshalb die Auslöschung des Lichts, die Extinktion E, zur genauen Quantifizierung herangezogen werden kann. Gemessen wurde die Extinkion nach Abgleichung gegen RNase freies Wasser als Nullwert. Bei einer Wellenlänge von 260 nm hat RNA ihr Extinkionsmaximum, diese eignet sich somit hervorragend für die Quantifizierung. Der Quotient E_{260nm} / E_{280nm} beschreibt die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.
Zur Quantifizierung wurden 4 µl RNA mit 196 µl RNase freies Wasser verdünnt (1:50), gemessen wurde die Extinkion E nach dem Abgleich des Gerätes gegen RNase freies Wasser als Ausgangswert.
Die genaue Konzentration der mRNA in der RNA-H_2O-Suspension wurde mit folgender Formel berechnet:

E_{260nm} x Verdünnung (50) x Extinktionskoeffizient (40) =
RNA-Konzentration µg / ml

2.2.5. Herstellung von cDNA

2.2.5.1. Prinzip

Ziel der Umschreibung der einsträngigen mRNA in die doppelsträngige cDNA war es die notwendigen Voraussetzungen zu schaffen für die im Anschluss folgende RT-PCR, für die eine doppelsträngige DNA eine Bedingung darstellt.
Für die cDNA-Synthese wurden zwischen 500 und 1000 ng RNA eingesetzt.
Vorgehensweise für 1000 ng RNA:
Die benötigten Menge an RNA-H_2O-Suspension in µl wurde berechnet.
Alle benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut, sofort nach Gebrauch wieder auf selbiges zurückgestellt. Ebenso wurden die angesetzten Lösungen zwischen den Arbeitsschritten auf Eis gelagert.
In einem Eppendorf-Cup wurden 12 µl RNase freies Wasser vorgelegt, dann das benötigte RNA-Volumen entnommen und verworfen. Nach Zugabe der errechneten Menge an RNA-H_2O-Suspension wurde das Eppendorf-Cup auf Eis gestellt, 1 µl Oligo-dt-*Primer* zupipettiert und homogenisiert. Die Mischung wurde bei 65°C für 2 min inkubiert um die RNA zu entspannen und die Anlagerung der zugesetzten *Primer* zu ermöglichen. Nach Ablauf der 2 min wurde das Eppendorf-Cup sofort auf Eis gestellt, um den erreichten Zustand beizubehalten. Für die folgende eigentliche Umschreibung wurden folgende Komponenten hinzugefügt: 4 µl des 5xPuffers der Firma BD Biosciences, 1 µl des 1mM dNTP-Mix, 1 µl der 200 U/µl Reverse Transkriptase und 0,5 µl des 40 U/µl RNase-Inhibitor. Die Aufgabe des Puffers war die Konstanterhaltung des pH-Wertes, der dNTP-Mix lieferte die komplementären Basen, die Reverse Transkriptase war für die Umschreibung verantwortlich und der RNase-Inhibitor diente dem Schutz der RNA. Die Umschreibung erfolgte in der nun folgenden Inkubationszeit von 1 h bei 42°C, die mit einer Temperaturerhöhung von 5 min auf 94°C abgestoppt wurde. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei –20°C.

2.2.6. Durchführung der RT-PCR

2.2.6.1. Prinzip

Die *Reverse-Transcription-Polymerase-Chain-Reaction* (RT-PCR) dient in erster Linie der Vervielfältigung einer kleinen Menge DNA, um diese mit herkömmlichen Nachweismethoden sichtbar zu machen.
Welcher Bereich der cDNA amplifiziert wird hängt von den verwendeten Primern ab, die durch bilaterale Anlagerung an die beiden komplementären DNA-Stränge den zu vermehrenden Genbereich eingrenzen.
Die exponentielle Vermehrung läuft nach einem immer wiederkehrenden Schema ab, das durch Temperaturänderungen bestimmt wird.

a) Denaturierung; 94°C
b) Hybridisierung (*Primer-Annealing*); 50 – 60°C
c) Neusynthese durch Taq-Polymerase; 72°C

Wiederholung der Schritte a)-c).

Jede Abfolge von a) nach c) wird als Zyklus bezeichnet, die Anzahl der Zyklen kann variieren (siehe Tabelle 5: Standard-Programme für PCR-Block).

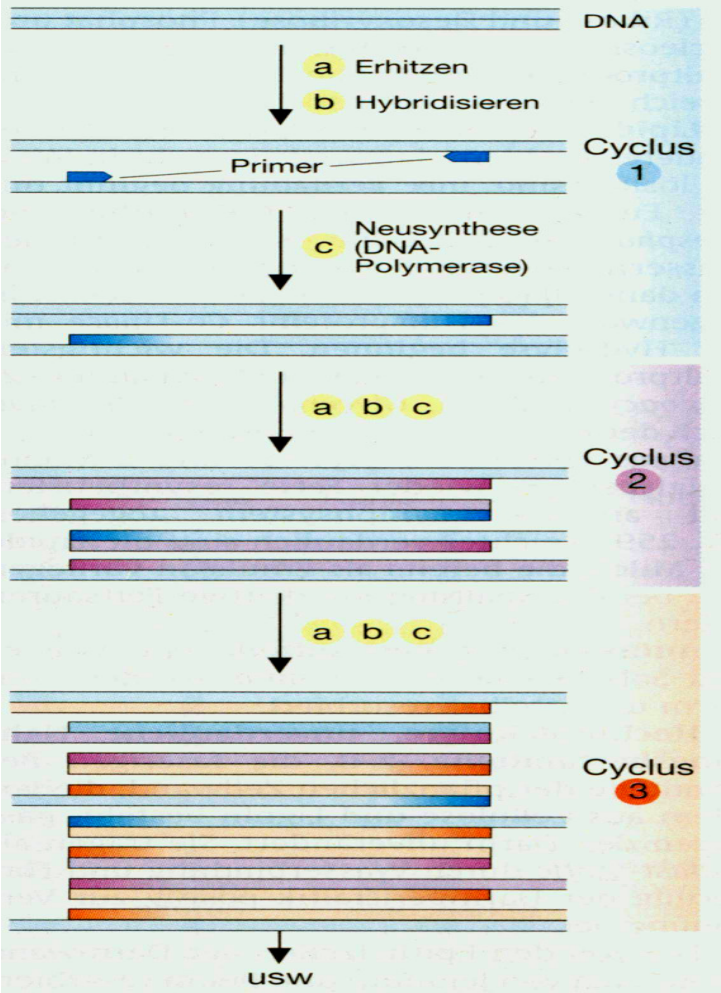


Abbildung 6: Vervielfältigung einer kleinen Menge DNA mit Hilfe der RT-PCR (67)

Im Anschluss an die RT-PCR erfolgt der Nachweis der mit speziellen Primern gezielt vermehrten cDNA-Stücke mit Hilfe der Gelelektrophorese statt.

2.2.6.2. Durchführung der RT-PCR

Die einzelnen Reagenzien wurden alle bei –22°C gelagert und erst kurz vor Gebrauch auf Eis aufgetaut, auf dem sie dann für die Zeit der Erstellung des Reaktionsgemisches lagerten.

In einem Eppendorf-Cup wurden die Reagenzien in der folgenden Zusammensetzung gemischt: 13 µl RNase-freies Wasser, 2,5 µl PCR-Puffer

(bestehend aus100 mM Tris-HCl und 500 mM KCl) für stabile pH-Verhältnisse, 4,5 µl $MgCl_2$ zur Blockierung der cDNA-Phosphatgruppen, 0,5 µl dNTP-Mix (s. 4.1.2.2.1), der die benötigten Basen zur Verfügung stellte, jeweils 0,5 µl Upper und Lower *Primer* als Startpunkt der Vermehrung und zur genauen Abgrenzung des zu amplifizierenden Genabschnitts, 1 µl der 250 U Taq-Polymerase, die als thermostabiles Enzym die Amplifizierung erst ermöglichte, und 2,5 µl der cDNA-Probe.

Nach sorgfältigem Homogenisieren und Abzentrifugieren der insgesamt 22,5 µl stellte man das Eppendorf-Cup in den vorgewärmten PCR-Block und startete das der *Primer-Annealing*-Temperatur entsprechende Programm (siehe folgende Auflistung).

Nach Beendigung der Vermehrungszyklen im PCR-Block wurde das Ergebnis der Amplifizierung per Gelelektrophorese überprüft und gegebenenfalls über die Salzkonzentration ($MgCl_2$ und PCR-Puffer) oder die Zyklenanzahl optimiert.

Tabelle 4: Standard-Programme für PCR-Block

***Annealing*-Temperatur**	**Denaturierung**	***Annealing***	**Extension**	**Zyklenanzahl**	**Heizdeckel-Temperatur**
PCR bei 50°C	94°C/6min	50°C/45sec	72°C/2min	34	150°C
PCR bei 56°C	94°C/6min	56°C/45sec	72°C/2min	34	150°C
PCR bei 60°C	94°C/6min	60°C/1min	72°C/2min	34	150°C
PCR bei 63°C	94°C/6min	63°C/1min	72°C/2min	34	150°C

Tabelle 5: Folgende *Primer* wurden verwendet

Primer	***PCR-Product Size* (bp)**	***Annealing (temperature, time)***	**Besonderheiten**
GAPDH	983	60°C/1 min	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
TGF-β	161	60°C/1min	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
BMP2	671	60°C/1min	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
BMP4	346	60°C/1min	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
IGF-1	514	60°C/1min	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
IGF-2	488	63°C/1min	4 µl Puffer ohne Mg; 3µl MgCl
EGF	527	60°C/1min	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
BFGF (FGF2)	277	56°C/45 sec	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
ECGF	119	50°C/45 sec	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl
vWF	176	56°C/45 sec	5 µl Puffer ohne Mg; 9 µl MgCl

2.2.7. Gelelektrophorese

2.2.7.1. Prinzip

Sie dient dem Nachweis der amplifizierten RT-PCR-Produkte. Nach dem Auftragen der mit Ethidiumbromid angefärbten PCR-Produkte auf ein Agarosegel werden diese durch anlegen einer Spannung entsprechend ihrer Basenpaarlänge aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei legen die kürzesten PCR-Produkte die weiteste Strecke zurück. Der Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Basenpaarstandard, die Basenpaar-Leiter, erlaubt die Einschätzung der genauen Basenpaarlänge.

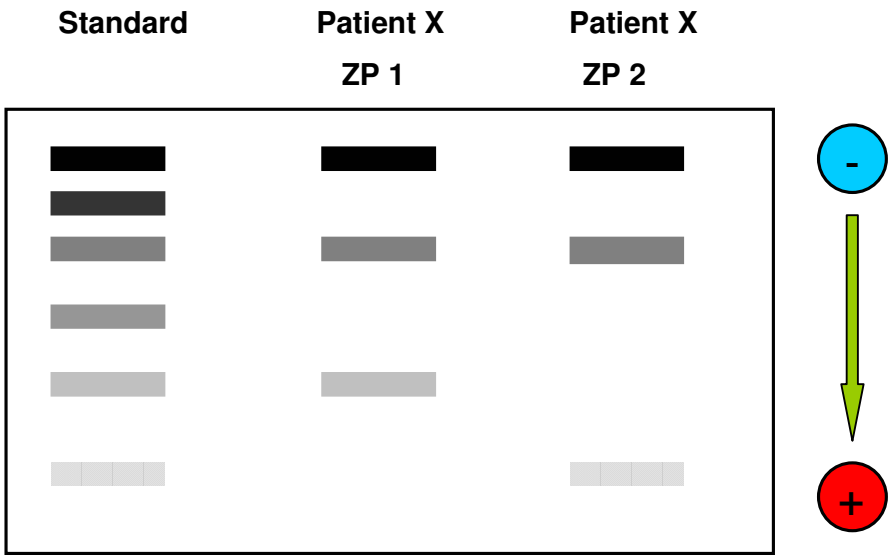


Abbildung 7: Schema der Gelelektrophorese

2.2.7.2. Herstellung des Agarosegels

Für das Gel wurden 6 g Agarose mit 400 ml des TBE-Puffer (Zusammensetzung s. 4.1.2.4.1) mit einem Magnetrührfisch gemischt und in der Mikrowelle für10 Minuten bei 600 Watt aufgekocht. Der Mischung fügte man anschließen 30 µl der gebrauchsfertigen Ethidiumbromidmischung zu während sie auf einem Magnetrührer bis auf etwa 60°C abkühlte. 150 ml des soweit

abgekühlten Gels wurden in die bereits vorbereitete Gelkammer gegossen ohne Blasen oder Schlieren zu enthalten. Nach dem kompletter Erkalten wurde das erstarrte Gel mit TBE-Puffer übergossen und die Gelkämme und Begrenzungen entfernt.

2.2.7.3. Auftrennen und Sichtbarmachung der PCR-Produkte

Nach der Herstellung einer Mischung aus 5 µl des Ladepuffers und dem PCR-Produkt, wurde mit einer Pipette 20 µl dieser Mischung für das Beschicken einer einzelnen Tasche des Gel verwendet. Die Tasche auf der linken Seite wurde mit 10 µl eines Eichmarkers, dem sogenannten Basenpaar-Leiter, gefüllt, er ist im Folgenden an der Stelle der 600 Basenpaar langen Leiterstelle gekennzeichnet. Die restlichen Taschen wurden in Abhängigkeit des Extraktionszeitpunktes der RNA mit den PCR-Produkten eines Patienten und eines Primers beschickt. Nach Beendigung dieser Beladung des Gels legte man eine Spannung von 60 mA an, was zur Wanderung der PCR-Produkte führte. Die Richtung dieser Wanderung verlief vom Minus-Pol zum Plus-Pol der Elektroden, da die PCR-Produkte selbst eine negative Ladung aufweisen. Am Ende konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert werden.

2.2.7.4. Bewertung der Bandenstärke

Tabelle 6: Die Beurteilung der Bandenstärke erfolgte immer im Vergleich der Banden untereinander auf einem PCR-Bild

Keine Expression	Schwache Expression	Deutliche Expression
(-)	**(+)**	**(++)**

Die Dicke der Banden ist Ausdruck der quantitativen Expression, wobei die Beurteilen nur eingeschränkt möglich ist, da diese Form der RT-PCR-Bilder keine genauen Angaben über die exprimierte Menge eines Faktors machen kann.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Expression von Wachstumsfaktoren in Fibrochondrozyten, die in Einzel- und in Cokultur mit HUVECs angezüchtet wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-PCR untersucht werden. Dabei sollte die Expression der Wachstumsfaktoren im Zeitverlauf analysiert werden. Außerdem wurde nach Expressionstendenzen in Fibrochondrozyten in Abhängigkeit vom Vorhandensein von HUVECs gesucht.

3.1 Photographien der Einzelkulturen von Fibrochondrozyten und von HUVECs

3.1.1 Fibrochondrozyten

A **B**

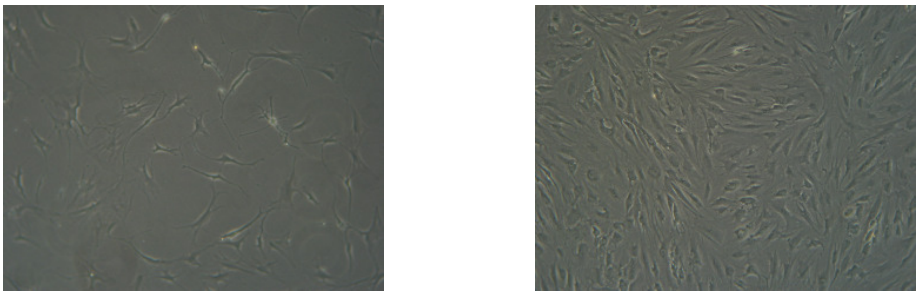


Abbildung 8: a) Meniskuszellen kurz nach dem Adhärieren auf dem Kulturflaschenboden **b)** konfluenter Meniskuszellrasen auf dem Kulturflaschenboden

3.1.2 HUVECs

A **B**

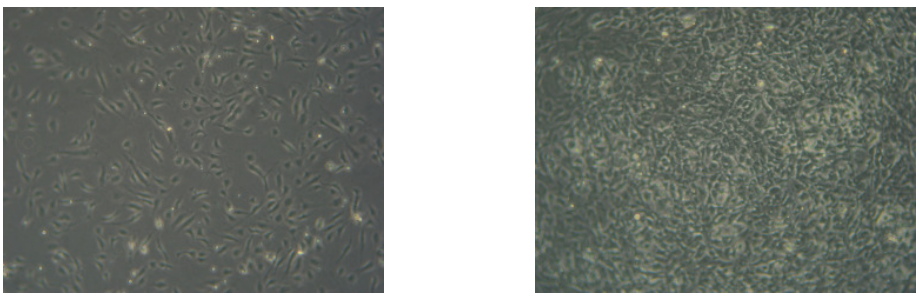


Abbildung 9: a) Endothelzellen kurz nach dem Adhärieren auf dem Kulturflaschenboden

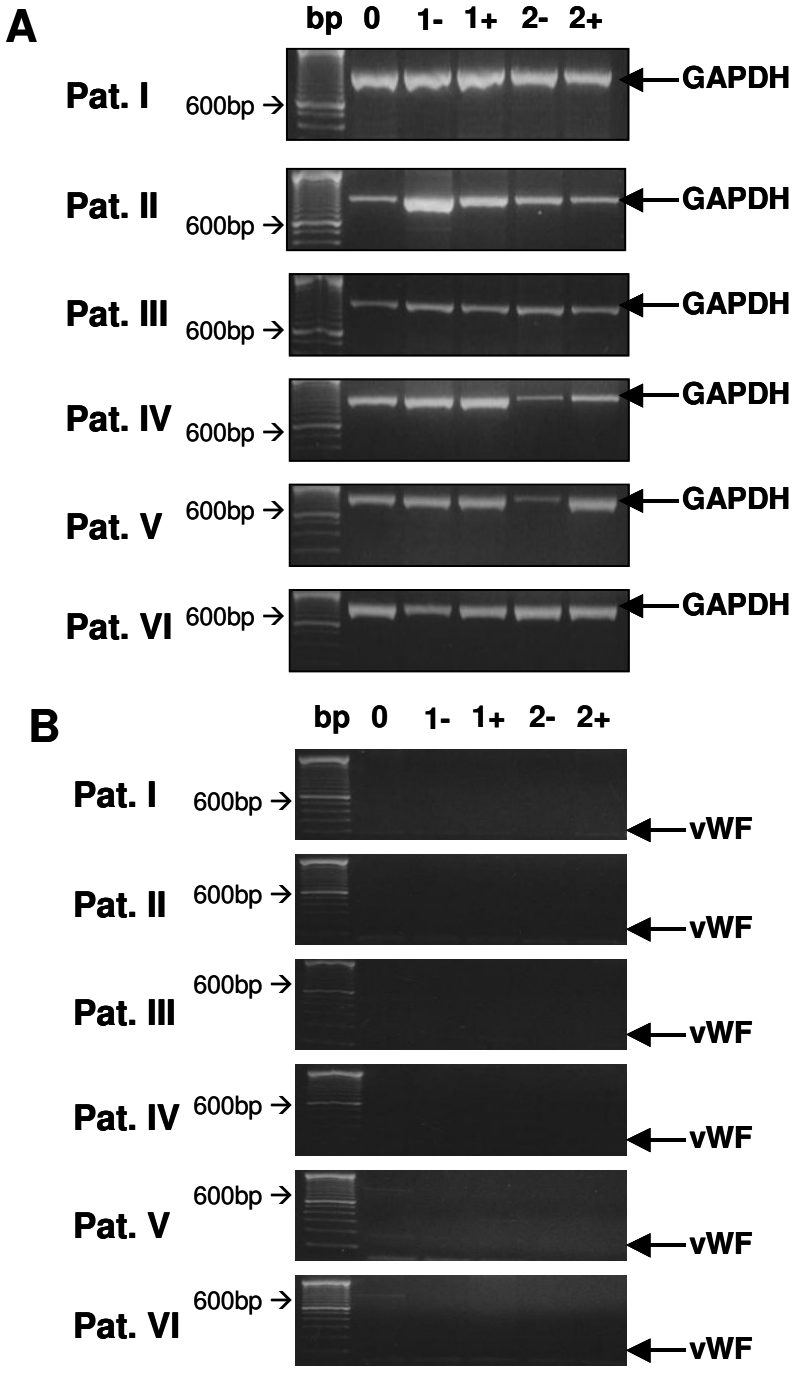
b) konfluenter Endothelzellrasen auf dem Kulturflaschenboden

3.2. Nachweisbarkeit von GAPDH und vWF in Fibrochondrozyten

Um zu zeigen, dass bei allen Patientenmenisken zu allen Zeitpunkten die Umschreibung des Genproduktes in die cDNA erfolgreich war, wurde bei allen Patienten zu allen Zeitpunkten die Expression der GAPDH untersucht. Bei allen untersuchten Fibrochondrocyenkulturen konnte die GAPDH nachgewiesen werden, jedoch wurde diese unterschiedlich stark exprimiert (siehe Abbildung 10 A, Tabelle 7). Diese Ergebnisse weisen auf eine unterschiedliche cDNA-Quantität der verwendeten Proben hin, was Einfluss auf die weiteren Ergebnisse nehmen könnte.
Da bei jeder verwendeten Probe bei 983 bp die GAPDH detektiert werden konnte, wurden diese Proben im folgenden mittels RT-PCR auf die Expression aller weiterer Wachstumsfaktoren untersucht.

Um die Reinheit der Fibrochondrozytenzellkultur und die Funktionsfähigkeit der Inserts als unüberwindliche Barriere für Zellen zu überprüfen, wurde mit dem Primer des von Willebrand Faktors nach eventuellen Endothelzellverunreinigungen in der Fibrochondrozytenzellkultur gesucht. Es wurde der Nachweis einer reinen Zellkultur erbracht, da auf keinem der RT-PCR-Bilder der Patienten I bis VI eine Bande bei der entsprechenden Basenpaarläge von 176bp zu erkennen war (siehe Abbildung 10 B, Tabelle 8).

3.2.1. RT-PCR-Bilder der Faktoren GAPDH und vWF



Abbildungen 10: Nachweisbarkeit der Expression von GAPDH (983 bp) (A) und vWF (176 bp) (B) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression der GAPDH (983 bp) und des vWF (176 bp)

mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.2.2. Auswertung der Bandenstärke der Faktoren GAPDH undvWF

Tabelle 7: Bewertung der Expression der GAPDH

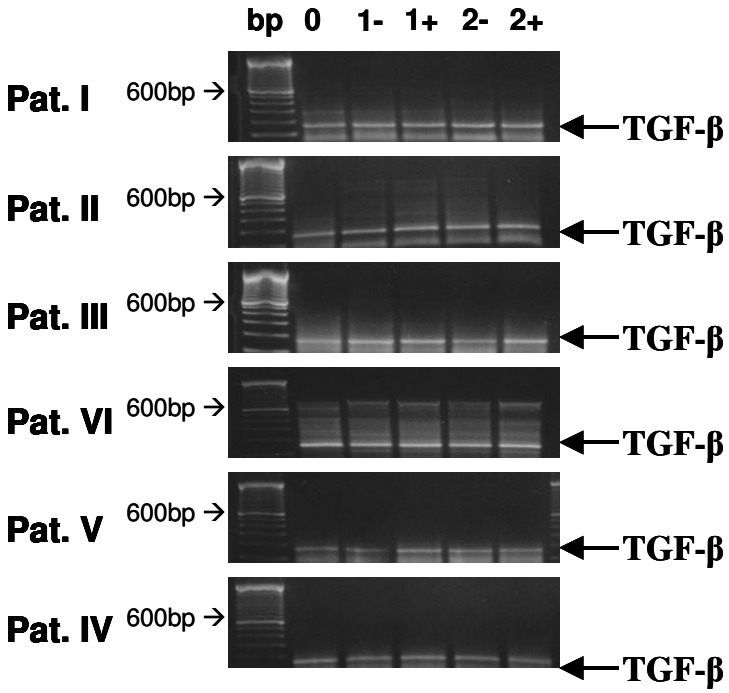
Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
II	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
III	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
IV	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)
V	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)
VI	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

Tabelle 8: Bewertung der Expression des vWF

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
II	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
III	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
IV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
V	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
VI	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

3.3. TGF-β

3.3.1. RT-PCR-Bilder des Faktors TGF-β



Abbildunen 11: Nachweisbarkeit der Expression von TGF-β (161 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors TGF-β (161 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.3.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors TGF-β

Tabelle 9: Bewertung der Expression von TGF-β

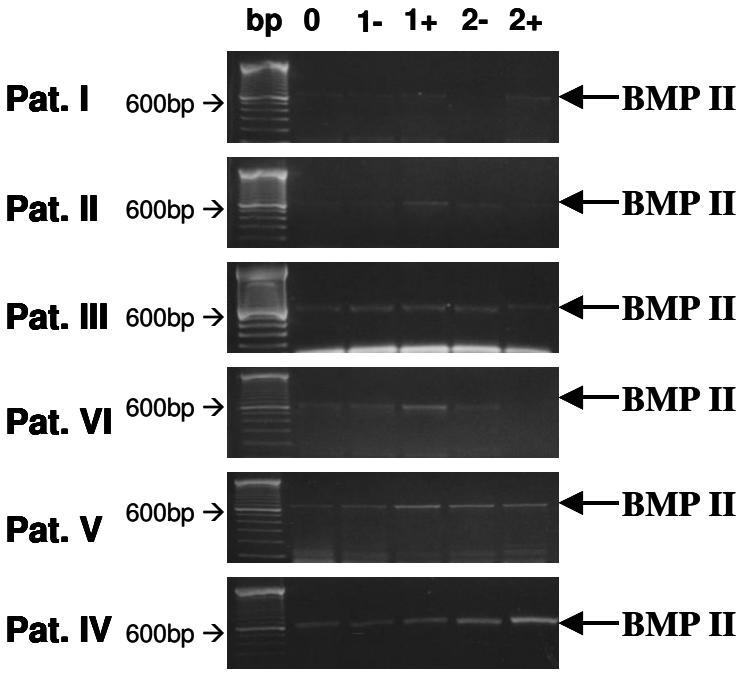
Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

II	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
III	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
IV	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
V	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
VI	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

Die auf jedem der RT-PCR-Bilder zu jedem Zeitpunkt deutlich zu sehenden Banden zeigen eine über die gesamte Versuchszeit konstante Expression dieses Faktors.

3.4. BMP2

3.4.1. RT-PCR-Bilder des Faktors BMP2



Abbildungen 12: Nachweisbarkeit der Expression von BMP2 (671 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors BMP2 (671 bp) mittels RT-PCR an den

Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.4.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors BMP2

Tabelle 10: Bewertung der Expression von BMP2

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
II	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
III	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)
IV	(+)	(+)	(++)	(+)	(-)
V	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)
VI	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

Um die Vermutung zu untermauern, dass der Faktor BMP2, der die Kollagensynthese in Osteoblasten-Zellkulturen und die Proteoglycansynthese fördert, in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Endothelzellen an der Wachstumsstimulation der Meniskuszellen beteiligt sein könnte, wurde dessen Expression im zeitlichen Verlauf überprüft.

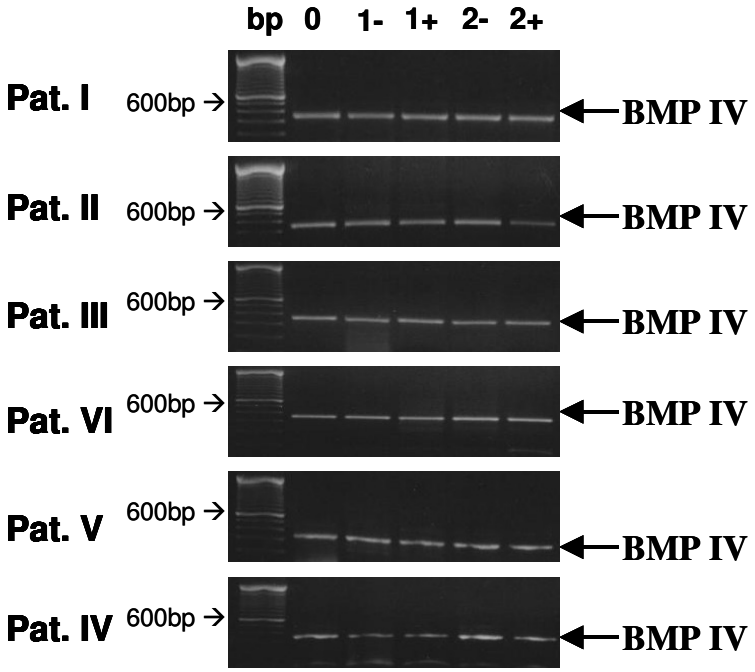
Von Patient zu Patient zeigen sich deutliche Unterschiede in der Expression.

Die Banden der Patienten I und II zeigen im zeitlichen Verlauf jeweils nur eine Abweichung von der ansonsten einheitlichen schwachen Bandenstärke. Bei Patient I ist zum ZP2- keinerlei Expression des Faktors nachweisbar. Die Abweichung bei Patienten II ist in Gegensatz dazu hin zu einer deutlichen Expression zum ZP1+. Bei Patient III weicht die ansonsten durchweg deutliche Expression zum ZP2+ hin zu einer schwach sichtbaren Bande ab. Die Bandenstärke des Patienten IV zeigt das gesamte Bewertungsspektrum: ZP2+

lässt keine Bande erkennen, die Zeitpunkte ZP0, ZP1- und ZP2- zeigen eine schwache und ZP2- eine starke Bande.
Der Patient V zeigt eine Expressionszunahme von einer schwachen (ZP0 und ZP1-) hin zu einer deutlichen Bandenstärke zu den Zeitpunkten ZP1+, ZP2- und ZP2+, es kann hier also von einer Expressionszunahme im zeitlichen Verlauf gesprochen werden.
Die Banden des Patienten VI sind zu jedem Zeitpunkt gleich deutlich sichtbar und weisen keinerlei quantitative Änderung im Versuchsverlauf auf.

3.5. BMP4

3.5.1. RT-PCR-Bilder des Faktors BMP4



Abbildungen 13: Nachweisbarkeit der Expression von BMP4 (346 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors BMP4 (346 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.5.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors BMP4

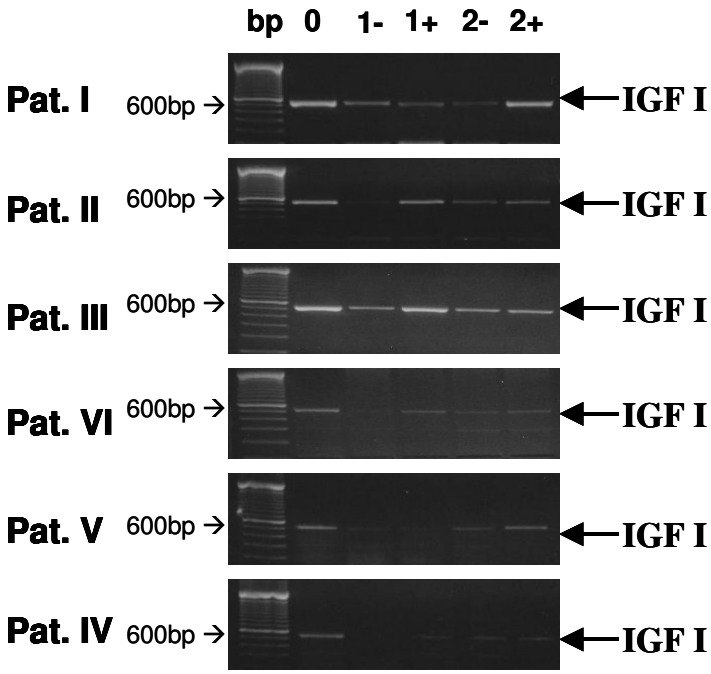
Tabelle 11: Bewertung der Expression von BMP4

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
II	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)
III	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
IV	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
V	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
VI	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

Da die beiden Wachstumsfaktoren BMP2 und BMP4 qualitativ die selben Effekte auf Knorpel- und Knochengewebe haben und sich gegenseitig ersetzen können, wurde die Expression des Faktors BMP4 untersucht, mit dem Ergebnis, dass diese über den gesamten Versuchsverlauf hinweg bei nahezu allen Patienten einheitlich deutliche Bandenstärken ergab. Einzige Ausnahme war hierbei der Patient II, der zum ZP2+ eine nur schwach sichtbare Bande aufwies.

3.6. IGF-1

3.6.1. RT-PCR-Bilder des Faktors IGF-1



Abbildungen 14: Nachweisbarkeit der Expression von IGF-1 (514 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors IGF-1 (514 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.6.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors IGF-1

Tabelle 12: Bewertung der Expression von IGF-1

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
II	(++)	(+)	(++)	(++)	(++)

III	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
IV	(++)	(+)	(++)	(+)	(+)
V	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)
VI	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)

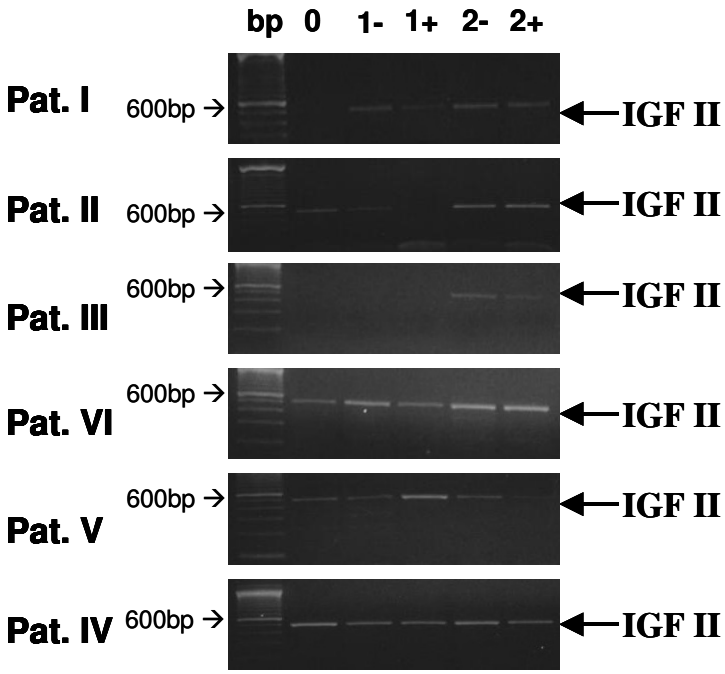
Unter anderem durch die Aussage von Tumia et al. 2004, dass Fibrochondrozyten aus Schafmenisken der avaskulären Zone in Kultur (hier mit FCS als Medium) durch die Zugabe von anabolen Zytokinen die Fähigkeit zur Regeneration erhalten, im Speziellen durch die Zugabe von IGF-1 (35), unterstützt, wurde ein eventueller Zusammenhang mit der Anwesenheit von Endothelzellen und der Expression dieses Faktors in Fibrochondrozyten in dieser Studie untersucht.

Bei den Patienten I und III blieb die Bandenstärke über den gesamten Versuchablauf hinweg gleich deutlich, während es bei den Patienten II, IV, V und VI zu einer Abnahme der Bandenstärke in der Einzellkultur vom ZP0 bis zum ZP1- kam. Der weiter Verlauf des Expressionsverhaltens in der Einzelkultur differierte insoweit, als dass es bei den Patienten II und VI zu einem Anstieg der Expressionsstärke kam, bei Patient II auf das Ausgangsniveau und bei Patient VI von einer fehlenden Bande zum ZP1- auf eine schwach sichtbare Bande zum ZP2-, währen die Patienten IV und V eine gleichbleibend schwache Expression zum ZP2- beibehielten.

In der Cokultur zeigte der Patienten II zeigte ein gleichbleibend starkes Expressionsverhalten zu beiden Zeitpunkten. Die Patienten IV, V und VI zeigten jeweils ein abweichendes Verhalten. Bei Patient IV kam es
zu einer Abnahme von einer zum ZP1+ deutlichen auf eine schwache Bandenstärke (ZP2+), bei Patient V zu einer Zunahme von einer schwachen (ZP1+) auf eine deutliche (ZP2+) Bandenstärke und schließlich Patient VI zeigte eine gleichbleibend schwache Bande zu beiden Zeitpunkten der Cokultur.

3.7. IGF-2

3.7.1. RT-PCR-Bilder des Faktors IGF-2



Abbildungen 15: Nachweisbarkeit der Expression von IGF-2 (538 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors IGF-2 (538 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.7.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors IGF-2

Tabelle 13: Bewertung der Expression von IGF-2

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

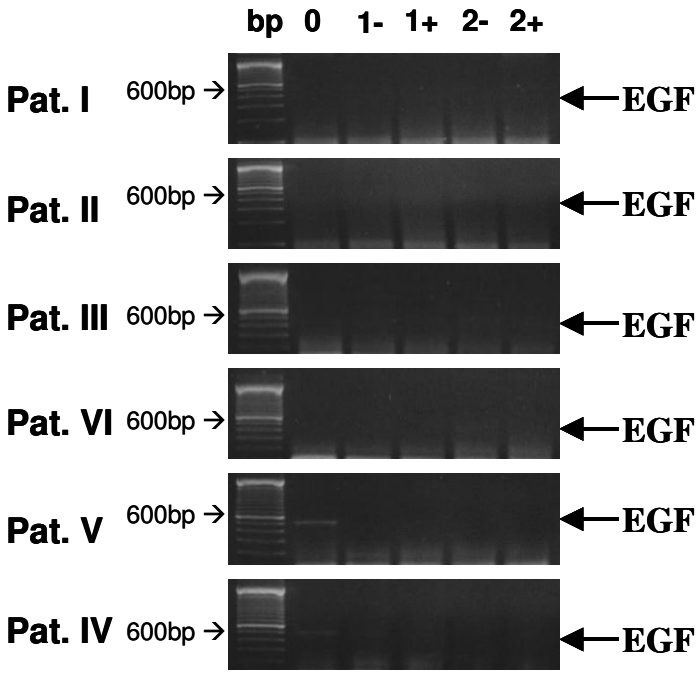
II	(+)	(+)	(-)	(++)	(++)
III	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)
IV	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
V	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
VI	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

Da IGF-2 ein embryonaler Wachstumsfaktor für die Fibroblastenproliferation, Myofibroblastendifferenzierung und die Erhöhung der Kollagensynthese ist, wurde er in diese Untersuchungsreihe mit aufgenommen.

Bereits zum ZP0 zeigen die einzelnen Patientenmenisken untereinander eine starke Varianz in der Expressionsquantität: bei den Patienten I und III ist keine, bei den Patienten II und V eine schwache, bei den Patienten IV und VI eine deutliche Faktorenexpression in der Bandenstärke zu unterscheiden. Bei allen weiteren Proben des Patienten I ist nach einer anfänglich fehlenden Expression eine schwache Bande erkennbar. Bei Patient II bleibt die Bandenstärke zum ZP1- auf dem schwachen Niveau des ZP0, fällt zum ZP1+ sogar ab auf eine nicht mehr nachweisbare Bande, zeigt jedoch zu den Zeitpunkten ZP2- und ZP2+ eine starke Expression. Patient III zeigt nach einer fehlenden Expression des Faktors zu den Zeitpunkten ZP0 und ZP1- eine zu den Zeitpunkten ZP2- und ZP2+ deutlich sichtbare Banden. Die nahezu einheitlich schwache Bandenstärke des Patienten V wird nur zum ZP1+ durch eine deutliche Bande unterbrochen. Das Verhalten der Zellen aus den Menisken der Patienten IV und VI gleicht sich im weiteren Verlauf. Bei beiden ist keine Änderung des starken Expressionsverhaltens erkennbar.

3.8. EGF

3.8.1. RT-PCR-Bilder des Faktors EGF



Abbildungen 16: Nachweisbarkeit der Expression des Faktors EGF (527 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors EGF (527 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.8.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors EGF

Tabelle 14: Bewertung der Expression von EGF

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
II	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

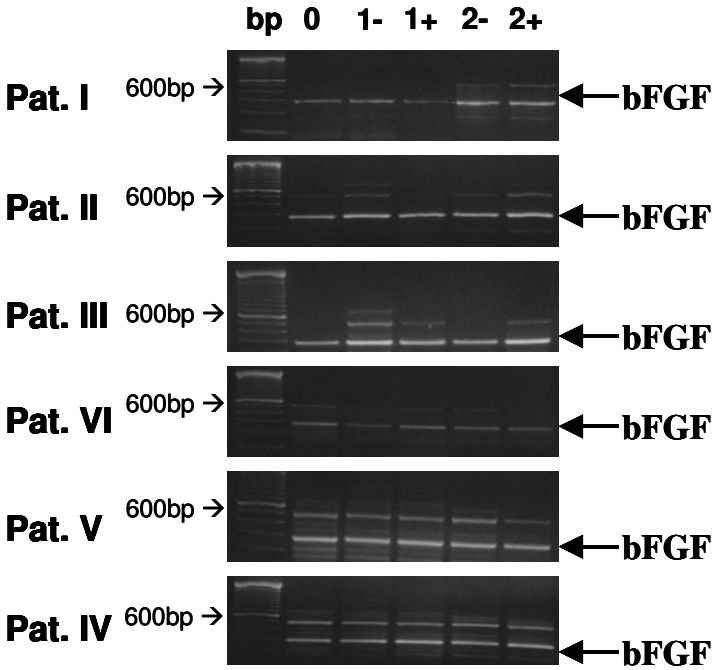
III	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
IV	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
V	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
VI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Da der *Epidermal growth factors* Einfluss nimmt auf die Proteinsynthese der extrazellulären Matrix, im speziellen auf die Synthese von Fibronectin, Kollagen, Laminin und Glycosaminoglycanen und zusätzlich die Angiogenese anregt, ist das Expressionsverhalten der Fibrochondrozyten in Bezug auf diesen Faktor von Interesse für diese Studie.

Es hat sich gezeigt, dass die Fibrochondrozyten weder in der Einzel- noch in der Cokultur diesen Faktor exprimieren, einzig bei den Patienten V und VI konnte eine deutliche (Patient V) und eine schwache (Patient VI) Bande zum ZP0 der Versuchsreihe nachgewiesen werden.

3.9. bFGF

3.9.1. RT-PCR-Bilder des Faktors bFGF



Abbildungen 17: Nachweisbarkeit der Expression von bFGF (277 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors bFGF (277 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.9.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors bFGF

Tabelle 15: Bewertung der Expression von bFGF

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(++)	(++)	(+)	(++)	(++)
II	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

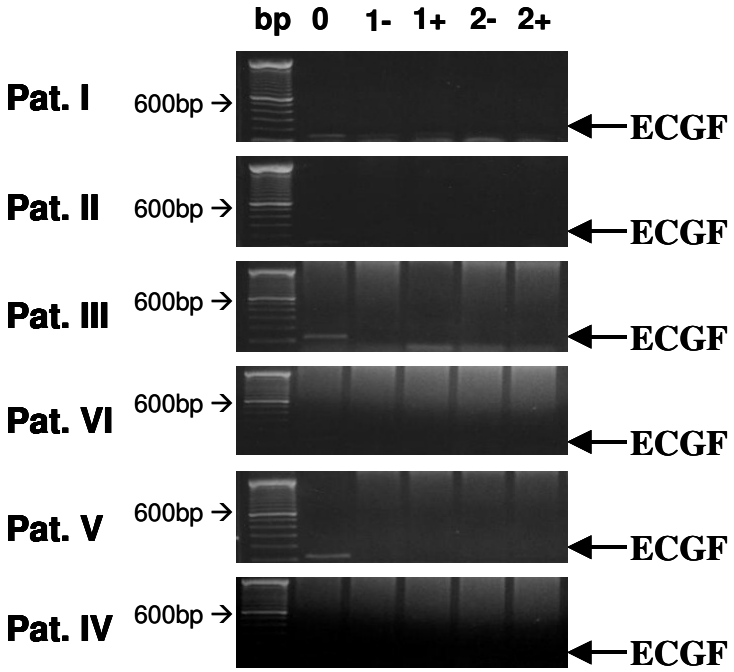
III	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
IV	(++)	(+)	(++)	(++)	(++)
V	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)
VI	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)

Da neben der Wachstumsstimulation von Fibroblasten, Chondroblasten, und anderen Zellen auch die Wundheilung und Geweberegeneration als solche zu den Aufgaben von bFGF gehören und bereits Webber et al. 1985 Fibrochondrozytenkulturen, die den Menisken von Neuseeland-Hasen entstammten, zeigen konnten, dass nach Zugabe von bFGF eine dosisabhängige Steigerung von Proliferation und Matrixsynthese erfolgte (58), und Tumia et al. durch den Einsatz von bFGF die Proliferation und die Synthese der Extrazellularmatrix einer Fibrochondroctenkulur unabhängig von der Herkunft der Zellen aus den verschiedenen Meniskusregionen steigerten (59), ist dieser Faktor Gegenstand unserer Untersuchungen.

Es zeigte sich eine annähernd gleichbleibende Expressionsquantität in einer deutlich sichtbaren Bandenstärke über den gesamten Zeitraum der Studie hinweg. Einzige Ausnahme war eine nur schwach sichtbare Bande bei Patient I zum ZP1+ und bei Patient IV zum ZP1-.

3.10. ECGF

3.10.1. RT-PCR-Bilder des Faktors ECGF



Abbildungen 18: Nachweisbarkeit der Expression von ECGF (119 bp) in Fibrochondrozyten. Fibrochondrozyten wurden in Einzel- (-) bzw. Cokultur (+) mit HUVECs über 10 d kultiviert und die Expression des Faktors ECGF (119 bp) mittels RT-PCR an den Tagen 0 (ZP 0), 7 (ZP 1) und 10 (ZP 2) untersucht. Den einzelnen Patientenproben wurden römische Ziffern zugeordnet.

3.10.2. Auswertung der Bandenstärke des Faktors ECGF

Tabelle 16: Bewertung der Expression von ECGF

Patienten	ZP 0	ZP 1-	ZP 1+	ZP 2-	ZP 2+
I	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
II	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)

III	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
IV	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
V	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
VI	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Der *Platelet-derived endothelial cell growth factor* sorgt für eine selektive Wachstumsförderung von Endothelzellen und Monocyten und ist für die Generierung neuer Blutgefäße in Plazenta und Embryo mitverantwortlich, weshalb ein Einfluss auf die Wundheilung und die damit assoziierte Neubildung von Blutgefäßen auch in anderen Geweben nicht ausgeschlossen werden kann. In einer bereits 1995 veröffentlichten Studie wurde die Auswirkung von ECGF auf die Meniskustransplantateinheilung an Hunden getestet, wobei sich jedoch keine signifikanten Vorteile gegenüber anderen Methoden zeigte (36). Um festzustellen, ob dieser Faktor von Fibrochondrozyten (mit oder ohne die Anwesenheit von Endothelzellen) exprimiert beziehungsweise verstärkt exprimiert wird um dann später einen möglichen Ansatz für eine Angiogeneseinduktion zu haben, wurde er in die Reihe der anderen untersuchten Faktoren aufgenommen.

Zum ZP0 zeigen alle Patientenmenisken eine entweder schwache (Patienten IV und VI) oder eine deutliche (Patienten I, II, III und V) Bande für ECGF. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigt einzig der Patient I eine anhaltend schwache Bande sowohl in der Einzel- als auch in der Cokultur, während bei allen anderen Patienten keinerlei Expression mehr nachzuweisen ist.

4. Diskussion

Im Falle einer traumatisch oder degenerativ bedingten Verletzung des Meniskus können die dadurch verursachten Beschwerden mit Hilfe eines operativen Eingriffs beseitigt werden. Eine gute Heilung nach einer Naht ist jedoch nur im vaskularisierten Bereich des Meniskusgewebes möglich. Daher sind Läsionen in den anderen Bereichen oftmals nur durch Teilexzision behandelbar, was kurzfristig ebenfalls zu guten Ergebnissen führt. Auf lange Sicht jedoch kommt es bei einem Großteil der Patienten zu einer verfrüht einsetzenden Gelenkdegeneration. Basierend auf diesen Tatsachen ist eine genaue Untersuchung des Einflusses notwendig, den das Endothel auf die Meniskuszellen ausübt.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, inwieweit die Expression von Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen in Fibrochondrozyten durch die Anwesenheit von Endothelzellen beeinflusst wird. Dazu wurden mit Hilfe der RT-PCR folgende Faktoren sowohl in der Fibrochondrozyten-Einzelkultur als auch unter den Bedingungen der Cokultur mit Endothelzellen untersucht: ECGF, IGF-1 u. -2, TGF-β, BMP2 u. 4, FGF-2 und EGF. Der Nachweis der Expression erfolgte mit der RT-PCR, deren semiquantitative Aussagekraft für diese Zwecke ausreichend ist.

4.1. Zellkultur

Die in dieser Arbeit eingesetzten Zellen wurden in Form einer *Monolayer*-Kultur kultiviert, die den Vorteil besitzt, dass Veränderungen der Zellen im Sinne einer Dedifferenzierung lichtmikroskopisch schnell zu erkennen und daraufhin nachzuweisen sind (zum Beispiel mittels Immunhistologie). Da die Zellen sich unter isolierten und definierten Bedingungen befinden, nehmen komplexe Wechselwirkungen und mechanische Änderungen, wie sie im menschlichen Organismus vorkommen, keinen Einfluss auf sie. Die Gegebenheiten sind somit nicht uneingeschränkt mit denen *in vivo* vergleichbar. Für die hier durchgeführten Untersuchungen hat dies jedoch keiner Relevanz, erst in einem

zukünftigen Abschnitt der Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet wird die Reaktion der Zellen im Gewebeverband *in vitro* untersucht.

Unter Umständen können Zellen Eigenschaften verlieren oder auch phänotypische Merkmale durch Dedifferenzierung verändert werden (61, 65, 66). Aus diesen Gründen sind prinzipiell frühpassagige Zellkulturen vorzuziehen, was sich jedoch nicht immer aufgrund der begrenzten Menge an Ausgangsgewebe verwirklichen lässt. Die Meniskuszellen standen nach der ersten Passage in ausreichender Zellzahl zur Verfügung und wurden, um eine Dedifferenzierung zu erkennen, innerhalb des Studienaufbaus zu jedem Zeitpunkt und bei jedem Patienten mit Hilfe der RT-PCR charakterisiert (im Speziellen mittels des vWF auf ihre Reinheit überprüft). Um eine ausreichende Zellzahl der Endothelzellen zu garantieren, wurden die HUVECs der dritten Passage verwendet.

4.2. Zellcharakterisierung

RT-PCR

Die Methode der RT-PCR erbringt zwar nur semi-quantitative Aussagen zur Menge der exprimierten mRNA, es ist mit ihr jedoch der Nachweis bereits geringster mRNA-Mengen möglich, daher ist sie für eine Beantwortung der Frage nach der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren sehr gut geeignet.

Um quantitative Aussagen machen zu können, müssen weiterführende Methoden, wie zum Beispiel die *Light-Cycler*-PCR, durchgeführt werden.

Ein weiterer Vorteil der RT-PCR ist die Tatsache, dass diese Methode auf die weiteren Syntheseschritte eines Proteins, die nach der Translation in der Zelle stattfinden, nicht angewiesen ist. Der Nachweis der Expression erfolgt also auf direktem Wege. Aussagen über die tatsächlichen Syntheseleistungen der Zellen können jedoch nicht gemacht werden, da die Informationsebene der mRNA nicht überschritten wird. Diese Informationen liefern immunhistochemische Färbungen (61).

Neben der starken Abhängigkeit der RT-PCR-Ergebnisse von der Qualität der cDNA und Affinität der Primerpaare zu dieser, sind falsch positive Ergebnisse möglich. Diese können durch unspezifische Amplifikation am PCR-Produkt oder durch Verunreinigungen der Probe entstehen und sind von den zu erwarteten Produkten nicht zu unterscheiden (61).

von Willebrand Faktor (vWF)

Der vWF wird nur von Endothelzellen produziert und dient in dieser Studie als Negativkontrolle, d.h. die Abwesenheit des vWF wird als Beweis dafür angesehen, dass Endothelzellen mit nicht verunreinigte Fibrochondrozytenkulturen für die Versuche herangezogen wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nur bei einer Patientenkultur eine sichtbare Bande als Nachweis der Expression dieses Faktors, was auf eine großzügigere Schälung der aus dem Operationssaal kommenden Menisci zurückzuführen ist.

Immunhistochemie

In Vorarbeiten wurden Patienten Fibrochondrozyten mit Hilfe der Immunhistochemie charakterisiert. Im Speziellen kamen dabei Antikörper gegen Kollagen I und Kollagen II zum Einsatz. Die Ergebnisse dieser Färbungen unterschieden sich weder zwischen den einzelnen Patientenzellkulturen noch zu den verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Studienaufbaus unter den Bedingungen der Einzel- oder Cokultur. Zudem stimmten diese mit den Ergebnissen anderer Autoren überein. Es zeigte sich das klassische Expressionsmuster der Fibrochondrozyten: Die Kollagen I-Färbungen waren stets positiv, die Kollagen II-Färbungen stets negativ. Die ebenfalls durchgeführten Färbungen mit dem vWF zeigten nur unspezifisch bindende Antikörper, vermutlich bedingt durch Kreuzreaktionen und wurden als falsch positiv bewertet (65, 66). Damit ist es für die vorliegende Arbeit anzunehmen, dass es sich um reine Fibrochondrozytenkulturen handelt, da diese unter identischen Bedingung kultiviert wurden.

4.3. Wachstumsfaktoren

Die Ergebnisse dieser Studie sollen Aufschluss darüber geben, inwieweit die Anwesenheit der Endothelzellen die Expression von Wachstumsfaktoren in Fibrochondrozyten beeinflusst und ob eine eventuelle Induktion durch eine vermehrte Expression einzelner Faktoren unter den Bedingungen der Cokultur nachzuweisen ist. Die Auswahl der untersuchten Faktoren gründet sich auf deren in der Literatur beschriebenen Funktionen im Organismus, welche im Folgenden kurz beschrieben werden.

TGF-β

Die in dieser Arbeit auf jedem der RT-PCR-Bilder zu jedem Zeitpunkt deutlich zu sehenden Banden des Faktors TGF-β zeigen eine über die gesamte Versuchszeit konstante Expression dieses Faktors. Weder die Einzel- noch die Doppelkulturen zeigen irgendwelche Schwankungen der Expressionsstärke. Das durch die Endothelzellen konditionierte Nährmedium nimmt keinen Einfluss auf die Synthese dieses Faktors in Fibrochondrozyten.

Der *Transforming growth factor*-β gehört zu den die Angiogenese hemmenden Faktoren und antagonisiert zudem in vielen Zellen die Wirkung der die Angiogenese aktivierenden Faktoren EGF und bFGF (68). Weitere Funktionen sind die Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase, insbesondere durch eine Steigerung der Proteoglycansynthese und einer forcierten Heilung des Knorpelgewebes (9). Eine für die Wundheilung von Bändern und Sehnen ist anscheinend eine Hochregulierung der TGF-β Expression unabdingbar (64). Nach Zugabe dieses Faktors zu einer Fibrohondrozytenkultur kam es im Rahmen einer Studie zu einer Steigerung der Proliferation der Proteoglycansynthese in Zellen aus allen Meniskusregionen um bis zu 100 % (69, 70).

BMP2 und BMP4

Um herauszufinden, ob der Faktor BMP2 in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Endothelzellen eine Expressionssteigerung oder -abnahme erfährt, wurde dessen Expression im zeitlichen Verlauf der Studie überprüft. Die Ergebnisse unterschied sich von Patient zu Patient deutlich.

Die einzelnen Abweichungen zu je nur einem der Zeitpunkte bei den Patienten I bis III und die durchweg unveränderte Bandenstärke des Patienten VI lassen die Vermutung nach einer von der Cokultur unbeeinflussten Expression des Faktors BMP2 aufkommen. Dagegen ist dem Expressionsverhalten der Zellkultur des Patienten IV keine eindeutige Verlaufsrichtung zuzuordnen. Eine Expressionszunahme mit fortschreitender Kulturzeit, allerdings unabhängig von der Art der Kultur (Einzel- oder Cokultur), kann bei dem Patienten V beobachtet werden. Eine Verlängerung des Versuchsaufbaus mit weiteren Überprüfungen des Expressionsverhaltens wäre hier von Interesse, um eine mögliche Tendenz zu erkennen.

Die Expression des Faktors BMP4 blieb bis auf eine Ausnahme, bei der Patient II zum ZP2+ eine nur schwach sichtbare Bande aufwies, über den gesamten Versuchsverlauf hinweg bei einer deutlich sichtbaren Bandenstärke. Die Endothelzellen nahmen keinerlei Einfluss auf das Expressionsverhalten des Faktors BMP4 in der Fibrochondrozytenkultur.

Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Expression von BMP2 und 4 in Fibrochondrozyten nicht durch konditionierte Kulturmedien beeinflusst werden kann.

Die aus der Gruppe der *Bone morphogenic proteins* ausgewählten Isoformen BMP2 und BMP4 besitzen folgende biologischen Aktivitäten: sie induzieren die Knochenformierung und beeinflussen die Spezialisierung hämatopoetischen Gewebes, indem sie dessen Proliferation und Differenzierung regulieren. Alle Aktivitäten der BMPs werden von dem Faktor OIP (*osteogenesis inhibitory protein*) antagonisiert während einzelne von dem Faktor TGF-β gefördert werden. Aus der Gruppe der *Bone morphogenic proteins* wählten wir die beiden Isoformen BMP2 und BMP4 aus, diese beiden Wachstumsfaktoren haben

qualitativ die selben Effekte auf Knorpel- und Knochengewebe und können sich gegenseitig ersetzen.
BMP2 im Speziellen stimuliert die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Kollagensynthese in Osteoblasten-Zellkulturen (68). Ebenso wie TGF-β gilt BMP2 als mitverantwortlicher Faktor für die Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase durch eine gesteigerte Proteoglycansynthese und eine Heilungsförderung (9). BMP4 dagegen soll die Stimulation der Chondrogenese in Mesodermzellen von Gelenkknospen anregen, welche dann durch TGF-β moduliert wird (68).

IGF-1 und IGF-2

Die Untersuchungen des Expressionsverhaltens ergaben für den Faktor IGF-1 kein einheitliches Bild, allerdings deuten die Ergebnisse der Patienten I bis III auf eine gleich bleiben starke Expression hin. Die bei allen Patienten zum ZP0 starke Expression schwankt im weiteren Verlauf bei den Patienten IV bis VI derart, dass bei diesen Patienten keine eindeutige Richtung erkennbar ist.
Auch die Ergebnisse zur Expression des Faktors IGF-2 zeigen kein eindeutiges Verhalten der Zellen im Studienverlauf, es kann abermals nur von einer Tendenz des gleichbleibend starken Expressionsverhaltens gesprochen werden. Gestützt wird diese Aussage durch das Verhalten der Zellkulturen der Patienten I, IV, V und VI. Allerdings steht dieser Annahme das Verhalten der Patienten II und III entgegen, da bei beiden eher von einer Zunahme der Expression im zeitlichen Verlauf sowohl in der Einzel- als auch in der Cokultur gesprochen werden kann. Auffällig ist zudem die starke Varianz in der Expressionsquantität zum ZP0. Diese Tatsache kann durch eine verschieden große Zellzahl begründet werden, da die Methode der Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer eine relative Varianzbreite mit sich bringt. Eine weitere mögliche Erklärung sind Fehler im Verlauf der RT-PCR, was die einzelnen abweichenden Werte der Patienten zum selben Zeitpunkt erklärt. Auch eine unterschiedlich starke Expressionsquantität der einzelnen Zellkulturen im Vergleich untereinander sind mögliche Quellen für derartige Abweichungen.

Die Isoformen des *Insulin like growth factors* besitzen insulinähnliche Aktivität und stimulieren die Kollagen- und Matrixsynthese von Knochenzellen. In diesem Versuchsablauf wurden gezielt die beiden Isoformen IGF-1 und IGF-2 analysiert.

IGF-1 (Somatomedin C; *Erythropoietic factor*) gilt als hauptverantwortlicher anaboler Faktor der Metabolisierungsregulation im Gelenkknorpel und führt zu einer Heilungsstimulation an Sehnen und Gelenkknorpel (9, 36, 39). Er induziert die fetale Skelettentwicklung und Myoblastendifferenzierung und übt einen allgemein stimulierenden Effekt auf die weichen Anteile des muskuloskelettalen Gewebes aus.

Im klinischen Alltag wird der IGF-1-Serumspiegel zur Diagnostik pathologischer Wachstumshormonspiegel herangezogen, da ein normaler IGF-1-Serumspiegel einen Mangel an Wachstumshormonen ausschließt. Zur Zeit in Erprobung befindet sich der Einsatz von IGF-1 zur Behandlung degenerativer Gelenkerkrankungen durch lokale Applikation, von der eine Osteoblastenstimulation und eine Steigerung der Kollagensynthese erwartet wird. Auch der mögliche Einsatz bei der Frakturheilung oder der postmenopausalen Osteoporose wird diskutiert (68, 71, 72). Zudem reagiert eine Fibrochondrozytenzellkultur, die der avaskulären Meniskuszone entstammt, auf die Zugabe von IGF-1 mit einer signifikanten Steigerung der DNA-Menge, der Zellproliferation und der Zellformierung (39).

Der Faktor IGF-2 (Somatomedin A; *Growth-promoting activity for vascular endothelial cells*) ist ein embryonaler Wachstumsfaktor für Fibroblastenproliferation, Myofibroblastendifferenzierung und die Erhöhung der Kollagensynthese. IGF-2-Serumspiegel beim Menschen ermöglichen wohl eine Vorhersage in Hinblick auf Gewichtszunahme und Fettleibigkeit, somit spielt IGF-2 wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes. Dies trifft sowohl für Männer als auch für Frauen mit normaler Glucosetoleranz zu (73).

EGF

Es hat sich gezeigt, dass die Fibrochondrozyten weder in der Einzel- noch in der Cokultur diesen Faktor exprimieren, einzig bei den Patienten V und VI konnte eine deutliche (Patient V) und eine schwache (Patient VI) Bande zum ZP0 der Versuchsreihe nachgewiesen werden. Daher wird ein stimulierender Einfluss der Endothelzellen auf die Fibrochondrozyten in Bezug auf EGF ausgeschlossen.

Der *Epidermal growth factors* nimmt auf die Proteinsynthese der extrazellulären Matrix Einfluss, im Speziellen auf die Synthese von Fibronectin, Kollagen, Laminin und Glycosaminoglycanen. Neben der Kontrolle und Stimulation der Proliferation von epidermalen und epithelialen Zellen führt er durch seine mitogene Wirkung auf Endothelzellen zu einer vermehrten Angiogenese. Zudem gilt er als ein wichtiges Zytokin der Wundheilung, da er als starkes Chemotaktivum auf Fibroblasten und Epithelzellen wirkt. In manchen Zelltypen verursacht EGF eine verminderte Expression der Rezeptoren für TGF-β, was diesen Faktor indirekt zu einem Antagonisten von TGF-β macht (68).

bFGF

Eine annähernd gleichbleibende Expressionsquantität des bFGF über den gesamten Zeitraum der Studie hinweg spricht für eine von der Anwesenheit der Endothelzellen unbeeinflussten Faktorenexpression.

Da neben der Wachstumsstimulation von Fibroblasten, Chondroblasten und anderen Zellen auch die Wundheilung, die Angiogenese und Geweberegeneration zu den Aufgaben von bFGF (FGF-2) gehört und nach Zugabe von bFGF eine dosisabhängige Steigerung von Proliferation und Matrixsynthese nachgewiesen werden konnte, ist der *Basic fibroblast growth factor* Gegenstand dieser Arbeit (58, 59, 74, 76). Neben den zuvor genannten Aufgaben besitzt bFGF noch eine hohe Affinität zu Heparin, weshalb er auch als *Heparin-binding growth factor* (HBGF) bezeichnet wird.

ECGF

Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben, dass die Produktion dieses Faktors durch Fibrochondrozyten nicht von der Anwesenheit von Endothelzellen abhängt, vielmehr ist es eine Frage der Zeit und der Kulturbedingungen, ob und wie stark dieser Faktor gebildet wird. Zum ZP0 zeigen noch alle Patientenmenisken eine entweder schwache (Patienten IV und VI) oder eine deutliche (Patienten I, II, III und V) Bande für ECGF. Einzig der Patient I zeigt im weiteren zeitlichen Verlauf sowohl in der Einzel- als auch in der Cokultur eine anhaltend schwache Bande, während bei allen anderen Patienten keinerlei Expression mehr nachzuweisen war. Dies könnte auf ein geändertes Expressionsverhalten dieses Faktors in Fibrochondrozyten aufgrund der *in vitro*-Kulturbedingungen zurückzuführen sein.

Der *Endothelial cell growth factor*, auch als PD-ECGF bekannt (*Platelet-derived endothelial cell growth factor*), der von den verschiedensten Geweben mit Ausnahme des Endothels gebildet wird, sorgt für eine selektive Wachstumsförderung von Endothelzellen und gilt als Mitverantwortlicher für die Generierung neuer Blutgefäße in Plazenta und Embryo. Deshalb wird ein Einfluss auf die Wundheilung und die damit assoziierte Neovaskularisation auch in anderen Geweben nicht ausgeschlossen. In einer bereits 1995 veröffentlichten Studie wurde die Auswirkung von ECGF auf die Meniskustransplantateinheilung an Hunden getestet, es konnten jedoch keine signifikanten Vorteile gegenüber anderen Methoden gezeigt werden (75).

4.4. Schlussfolgerung

Die Beeinflussung des Expressionsverhaltens der Fibrochondrozyten durch die Anwesenheit der Endothelzellen kann wie folgt zusammengefasst werden: Bei den Faktoren BMP4, IGF-1 und –2, bFGF und ECGF kann zu jeder Zeit und unter den Bedingungen der Einzel- und der Cokultur eine nahezu gleichbleibend starke, unbeeinflusste Expression festgestellt werden. Die Auswertung der Banden des Faktors BMP2 lässt keine Tendenz erkennen. Der

Faktor EGF wird zu keinem Zeitpunkt der Studie von den Meniskuszellen exprimiert.

Insgesamt wird die Wachstumsfaktorenproduktion durch das von den Endothelzellen konditionierte Kulturmedium nicht beeinflusst. Einzige Ausnahme hiervon könnte der Faktor BMP2 sein, was jedoch in weiteren Studien zu klären ist. Somit war in dieser Arbeit kein Einfluss von Endothelzellen auf die Expression von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in Meniskuszellen nachweisbar. So kann nicht auf eine Proliferationssteigerung im Sinne einer Heilungsinduktion ausgehend von den Endothelzellen in diesem Modell geschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Da es bei einer traumatisch oder degenerativ bedingten Schädigung der Menisken trotz Intervention zu verfrüht einsetzender Gelenkdegeneration kommt, ist es notwendig, die aktuellen Therapieoptionen kritisch zu hinterfragen und nach neuen wegen der Behandlung zu suchen. Dabei sind die Möglichkeiten, die das Gebiet des *Tissue-engineering* bietet sehr vielversprechend, stehen jedoch in Bezug auf den Meniskus noch relativ am Anfang.

Die Tatsache aufgreifend, dass das Heilungspotential des Meniskusgewebes auf den vaskularisierten Bereich beschränkt ist, wird in dieser Arbeit der Einfluss, den Endothelzellen auf die Meniskuszellen ausüben, anhand der Expression bestimmter Wachstumsfaktoren untersucht.

Der Studienaufbau ermöglichte den Vergleich des endogene Expressionsverhaltens von humanen Fibrochondrozyten in Monokultur zur Doppelkultur mit Endothelzellen (HUVECs) bezogen auf die Wachstumsfaktoren ECGF, IGF-1 u. -2, TGF-β, BMP2 u. 4, bFGF (FGF-2) und EGF. Die mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesene Faktorenexpression wurde jeweils im direkten Vergleich der Bandenstärken untereinander zu drei verschiedenen Zeitpunkten des Studienaufbaus und in der Gegenüberstellung von Einzel- und Cokultur bewertet. Die gewählte technische Umsetzung verhinderte einen direkten Kontakt der verschiedenen Zellarten, um die Reinheit der Fibrochondrozytenkulturen zu gewährleisten. Dies wurde zudem durch die fehlende Expression des von Willebrand Faktors nachgewiesen. Einzig durch das gemeinsame Kulturmedium war ein Informationsaustausch möglich.

Die Meniskuszellen zeigen sich in Doppelkultur mit Endothelzellen im Vergleich zur reinen Meniskuszellkultur bezogen auf die Expression der Wachstumsfaktoren ECGF, IGF-1 u. -2, TGF-β,BMP4 und bFGF durchweg unbeeinflusst. Auch Tendenzen der Expressionssteigerung oder –hemmung im zeitlichen Ablauf konnten nicht nachgewiesen werden. Der Faktor EGF wurde zu keinem Zeitpunkt der Studie von den Meniskuszellen exprimiert, der Faktor BMP2 zeigte ein uneinheitliches Expressionsbild, so dass keine Tendenzen

erkennbar waren und somit von keiner Einflussnahme des von den Endothelzellen konditionierten Mediums ausgegangen werden muss.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit der Endothelzellen nicht zu einer Steigerung der Wachstumsfaktorenproduktion in den Meniskuszellen führt und es auf diesem Wege nicht zu einer Proliferationssteigerung im Sinne einer Heilungsinduktion kommt.

Es bleibt daher unklar, weshalb es im gut vaskularisierten Teil des Meniskus zu einer besseren Heilung nach der Naht von Meniskusrissen kommt.

6. Abbildungen und Tabellen

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr.:	Abbildungsbezeichnung	Seitenzahl
1	Ansatzstellen von Menisken und Kreuzbändern auf dem Tibiaplateau	8
2	Verformung der Menisken in Abhängigkeit von der Bewegung. a) Verhalten der Menisken bei Innenrotation b) Verhalten der Menisken bei Außenrotation	11
3	Häufigste Rissformen	12
4	Studienaufbau mit verschiedenen Zeitpunkten (ZP) der Zellaussaht (incl. Zellzahlen pro *Well*) und Herstellung von cDNA.	25
5	Zeitplan	26
6	Vervielfältigung einer kleinen Menge DNA mit Hilfe der RT-PCR	35
7	Schema der Gelelektrophorese	38
8a)	Meniskuszellen kurz nach dem Adhärieren auf dem Kulturflaschenboden	40
8b)	konfluenter Meniskuszellrasen auf dem Kulturflaschenboden	40
9a)	Endothelzellen kurz nach dem Adhärieren auf dem Kulturflaschenboden	40
9b)	konfluenter Endothelzellrasen auf dem Kulturflaschenboden	40
10	Nachweisbarkeit der Expression von GAPDH (A) und vWF (B) in Fibrochondrozyten	42
11	Nachweisbarkeit der Expression von TGF-β in Fibrochondrozyten.	44

12	Nachweisbarkeit der Expression von BMP2 in Fibrochondrozyten.	45
13	Nachweisbarkeit der Expression von BMP4 in Fibrochondrozyten	47
14	Nachweisbarkeit der Expression von IGF-1 in Fibrochondrozyten	48
15	Nachweisbarkeit der Expression von IGF-2 in Fibrochondrozyten	50
16	Nachweisbarkeit der Expression des Faktors EGF in Fibrochondrozyten	52
17	Nachweisbarkeit der Expression von bFGF in Fibrochondrozyten	54
18	Nachweisbarkeit der Expression von ECGF in Fibrochondrozyten	56

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle Nr.:	Tabelleninhalt	Seitenzahl
1	Oligonukleotide (*Primer*)	23
2	Patientendaten	24
3	Aufschlüsselung der verschiedenen Zeitpunkte der Zellernte im Verlauf der Arbeit	27
4	Standard-Programme für PCR-Block	36
5	Folgende *Primer* wurden verwendet	37
6	Die Beurteilung der Bandenstärke erfolgte immer im Vergleich der Banden untereinander auf einem PCR-Bild	39
7	Bewertung der Expression der GAPDH	43
8	Bewertung der Expression des vWF	43
9	Bewertung der Expression von TGF-β	44/45
10	Bewertung der Expression von BMP2	46
11	Bewertung der Expression von BMP4	47/48
12	Bewertung der Expression von IGF-1	49
13	Bewertung der Expression von IGF-2	51
14	Bewertung der Expression von EGF	52/53
15	Bewertung der Expression von bFGF	54/55
16	Bewertung der Expression von ECGF	56/57

7. Literaturverzeichnis

1 Lanzer WL, Komenda G. Changes in cartilage after meniscectomy. Lin Orthop. 1990 Mar(252): 41-8

2 Roos E. M. Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults. Curr Opin Rheumatol 2005 Mar; 17(2): 195-200

3 Fermor B, Jeffcoat D, Hennerbichler a, Pisetsdy DS, Weinberg JB, Guilak F. The effects of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus. Osteoarthritis Cartilage. 2004 Dec; 12(12): 956-62

4 Milachowski KA, Kohn D, Wirth CJ. Transplantation of allogeneic menisci. Orthopade. 1994 Apr; 23(2): 160-3

5 Walker PS, Erkman MJ. The role of the menisci in force transmission across the knee.Clin Orthop. 1975(109):184-92

6 Kummer B. Biomechanik des Meniskus. Orthopäde 1994 Apr; 23(2): 90-92

7 Müller W. Menisken und Kniestabilität. Orthopäde 1994 Apr; 23(2): 93-97

8 Mutschler W, Haas N. Praxis der Unfallchirurgie. Thieme Verlag. Auflage: 483-489

9 Mark A. Sweigart, B. S., Kyeiacos A. Athansasiou. Tissue enginnering 2001 Apr; 7(2): 111-29

10 Yagishita K, Muneta T, Ogiuchi T, Sekiya I, Shinomiya K. Healing potenital of meniscal tears without repair in knees with anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med. 2004 Dec ; 32(8): 1953-61

11 Boyd KT, Myers PT. Meniscus preservation; rationale, repair techniques and results. The Knee 2003 Mar; 10(1): 1-11

12 Moll KJ, Moll M, Anatomie, Gustav Fischer Verlag. 15. Auflage: 182-186

13 Platzer W, Taschenatlas der Anatomie, Band 1, Thieme Verlag, 6. Auflage: 188-211

14 Köpf-Maier P, Atlas der Anatomie des Menschen, Band 1, Karger Verlag, 5. Auflage: 201

15 Benedetto KP, Glotzer W, Kunzel KH, Gaber O. The vascularization of the menisci. Morphological basis for the repair. Acta Anat (Basel). 1985; 124(1-2): 88-92

16 Arnocky SP. Building a meniscua. Biologic considerations. Clin Orthop. 1999 Oct (367 Suppl): 244-53

17 Reinig JW, McDevitt ER, Ove PN. Progression of meniscal degenerative changes in college football players: evaluation with MR imaging. Radiology. 1991 Oct; 181(1):255-7

18 McDevitt CA, Muir H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthrosis in dog. J Bone Joint Surg Br. 1976 Feb; 58(1): 94-101

19 Kelly JD 4th, Ebrahimpour P. Chondral injury and synovitis after arthroscopic meniscal repair using an outside-in mulberry knot suture technique. Arthroscopy. 2004 May; 20(5): e49-52

20 Sommerlath K, Gillquist J. Knee function after meniscus repair and total meniscectomy--a 7-year follow-up study. Arthroscopy. 1987; 3(3): 166-9

21 Rosenberg TD, Metcalf RW, Gurley WD. Arthroscopic meniscectomy. Instr Course Lect. 1988; 37: 203-8

22 Stone KR. Current and future directions for meniscus repair and replacement. Clin Orthop Retat Res. 1990 Oct (367 Suppl): S273-80

23 Small NC. Complications in arthroscopic meniscal surgery. Clin Sports Med. 1990 Jul; 9(3): 609-17

24 Frosch KH, Fuchs M, Losch A, Stürmer KM. Repair of meniscal tears with the absorbable Clearix screw: results after 1-3 years. Arch Orthop Trauma Surg. 2005 Nov; 125(9): 585-91

25 Petsche TS, Selesnick H, Rochman A. Arthroscopic meniscus repair with bioabsorbable arrows. Arthroscopy. 2002 Mar; 18(3): 246-53

26 Ellermann A, Siebold R, Buelow JU, Sobau C. Clinical evaluation of meniscus repair with a bioabsorbable arrow: a 2- to 3-year follow-up study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2002 Sep; 10(5): 289-93

27 Beaufils P. Meniscal lesions. Rev Prt. 1998 Oct 15;48(16): 1773-9

28 Greis PE, Holmstrom MC, Bardana DD, Burks RT. Meniscal injury: II. Management. J Am Acad Orthop Surg. 2002 May-Jun; 10(3): 177-87

29 Freedman K.B., Nho S. J. Cole B.J. Marrow stimulating technique to augment meniscus repair. Arthroscopy. 2003 Sep; 19(7): 794-98

30 Schmitz MA, Rouse LM Jr, DeHaven KE. The management of meniscal tears

in the ACL-deficint knee. Clin Sports Med. 1996 Jul; 15(3): 573-93

31 Biedert RM. Treatment of intrasubstance meniscal lesions: a randomized prospective study of four different methods. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2000; 8(2): 104-8

32 Arnoczky SP, Warren RF, Kaplan N. Meniscal remodeling following partial meniscectomy—an experimental study in the dog. Arthroscopy. 1985; 1(4): 247-52

33 Rodeo SA, Warre RF. Meniscal repair using the outside-to-inside technique. Clin Sports Med. 1996 Jul; 15(3): 469-81 m

34 Rosenberg TD, Paulos LE, Wnorowski DC, Gurley WD. Arthroscopic surgery: meniscus refixation and meniscus healing. Orthopade. 1990 Apr; 19(2): 82-9

35 Ochi M, Uchio Y, Okuda K, Shu N, Yamaguchi H, Sakai Y. Expression of cytokines after meniscal rasping to promote meniscal healing. Arthroscopy. 2001 Sep; 17(7): 724-31

36 Pollo FE, Jackson RW, Kane RR, Chang HM, Zhang J, Dieterichs CP, Riedel S. Sutureless avascular meniscal repair with a photoactive naphthalimide compound: a preliminary animal study. Arthroscopy. 2004 Oct; 20(8): 824-30

37 Imakiire N, Kotani A, Ishii Y. Experimental study on thermal welding for knee meniscal white zone. J Orthop Sci. 2003; 8(5): 683-92

38 Spindler KP, Miller RR, Andrish JT, McDevitt CA. Comparison of collagen synthesis in the peripheral and central region of the canine meniscus. Clin Orthop. 1994 Jun(303); 256-63

39 Tumia NS, Jhonstone AJ. Regional regenerative potential of meniscal cartilage exposed to recombinant insulin-like growth factor-I in vitro. J Bone Joint Surg Br. 2004 Sep; 86(7): 1077-81

40 Guisasila I, Vaquero J, Forriol F. Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep. Clin Orthop. 2002 Feb (395): 227-33

41 Webber RJ, York JL, Venderschilden JL, Hough AJ Jr.. An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. Am J Sports Med. 1989 May-Jun; 17(3): 393-400

42 Gastel JA, Muirhead WR, Lifrak JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, Labrador DP. Meniscal tissue regeneration using a collagenous biomaterial derived from porcine small intestine submucosa. Arthroscopy. 2001 Feb; 17(2): 151-9

43 Jackson DW, McDevitt CA, Simon TM, Arnoczky SP, Atwell EA, Sivino NJ. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserded allografts.An

experimental study in goats. Am J Sports Med. 1992 Nov-Dec;20(6): 644-56

44 Goble EM, Kohn D, Verdonk R, Kane SM. Meniscal substitutes – human experience. Scand J Med Sci Sports. 1999 Ju; 9(3): 146-57

45 Sumen Y, Ochi M, Ikuta Y. Treatment of articular defects with meniscal allografts in a rabbit knee model. Arthroscopy. 1995 Apr; 11(2): 185-93

46 Arnoczky SP, Warren RF, McDevitt CA. Meniscal replacement using a cryopreserved allograft . An experimental study in the dog. Clin Orthop. 1990 Mar(252): 121-8

47 Boss A, Klimkiewicz J, Fu FH. Technical innovation: creation of a peripheral vascularized trough to enhance healing in cryopreserved meniscal allograft reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2000;8(3):159-62

48 Siegel MG, Roberts CS. Meniscal allografts. Clin Sports Med. 1993 Jan; 12(1): 59-80

49 Ochi M, Sumen Y, Jitsuiki J, Ikuta Y. Allogeneic deep frozen meniscal graft for repair of osteochondral defects in the knee joint. Arch Orthop Trauma Surg. 1995; 114(5): 260-6

50 van Arkel ER, de Boer HH. Human meniscal transplantation. Preliminary results at 2 to 5-year follow-up. J Bone Joint Surg Br. 1995 Jul; 77(4): 589-95

51 Milachowski KA. Current aspects of meniscus transplantation. Sportverletz Sportschaden. 1993 Jun;7(2): 63-7

52 Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, Weismeier KG, Kohn D. Long-term results of meniscal allograft transplantation. Am J Sports Med. 2002 Mar-Apr; 30(2): 174-81

53 Verdonk R, Van Daele P, Claus B, Vandenabeele K, Desmet P, Verbruggen G, Veys EM, Claessens H. Viable meniscuc transplantation. Orthopade 1994 Apr; 23(2): 153-59

54 Ochi M, Ishida O, Daisaku H, Ikuta Y, Akiyama M. Immune response to fresh meniscal allografts in mice. J Surg Res. 1995 May; 58(5): 478-84

55 de Boer HH, Koudstaal J. Failed meniscus transplantation. A report of three cases. Clin Orthop. 1994 Sep(306): 155-62

56 Messner K. Meniscal substitution with a Teflon-periosteal composite graft: a rabbit experiment. Biomaterials. 1994 Feb; 15(3): 223-30

57 Cui Y, CaoY, Shang Q, Cui L, Liu W. Repair of meniscal defects with autologous tissue engineered fibrocartilage. ZhoghuaYi Xue Za Zhi. 2002 Feb

10; 82(3): 191-3

58 Bhargava MM, Attia ET, Murrell GA, Dolan MM, Warren RF, Hannafin JA. The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. Am J Sports Med. 1999 Sept-Oct; 27(5): 636-43

58 Kollias SL, Fox JM. Meniscal repair. Where do we go from here? Clin Sports Med. 1996 Jul; 15(3): 621-30

59 Berkes I, Harbula I, Kynsburg A, Falus A. Gene therapy in surgical sport medicine. Orv Hetil. 2002 Sep 15; 143(37): 2131-3

60 Peretti GM, Gill TJ, Xu JW, Randolph MA, Morse KR, Zaleske DJ. Cell-based therapy for meniscal repair: a large animal study. Am J Sports Med. 2004 Jan-Feb;32(1):146-58

61 Sebastian Reese. Ansiedlungsversuche von humanen Fibrochondrozyten auf biokompatiblen, dreidimensionalen Trägermaterialien. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen 2004

62 Ochi M, Michizuki Y, Deie M, Ikuta Y. Augmented meniscal healing with free synovial autografts: an culture model. Arch Orthop Trauma Surg. 1996; 115(3-4): 123-6

63 Wang J, Yang Z, Xie H, Qin T. Possibility of using cartilage cultured in centrifuge tube as a substitute for meniscus. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2004 Sep; 18(5): 426-30

64 Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. Sports Med. 2003; 33(5): 381-94

65 Viviane Stark. Vergleich der Expression einzelner Angiogenesefaktoren zwischen der Kokultur aus HUVEC und Fibrochondrozyten und der reinen Fibrochondrozytenkultur. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen 2006

66 Edda Lisa Schmid. Vergleich der Expression einzelner Matrixproteine und Entzündungsmediatoren in HUVEC-Fibrochondrozyten-Kokultur und Fibrochondrozyten-Monokultur. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen 2006

67 Koolman J, Röhm KH. Taschenatlas der Biochemie. Thieme Verlag. 2. Auflage: 250-251

68 http://www.copewithcytokines.de

Horst Ibelgaufts` COPE:Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia
COPE Philippine Iniversities Library Help Initiative

69 Collier S, Ghosh P. Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. Osteoarthritis Cartilage. 1995 Jun; 3(2): 127-38

70 Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1999; 7(2): 75-80

71 Kim JG, Roh KR, Lee JY. The relationship among serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal women in Korea. Am J. Obstet Gynecol. 2002 Mar; 186(3): 345-50

72 Rhee EJ, Oh KW, Lee WY, Kim SW, Oh ES, Baek KH, Kang MI, Park CY, Choi MG, Yoo HJ, Park SW. Age, body mass index, current smoking history, and serum insuline-like groth factor-I levels associated with bone mineral density in middle-aged Korean men. J Bone Miner Metab. 2004; 22(4): 392-8

73 Sandhu MS, Gibson JM, Heald AH, Dunger DB, Wareham NJ. Low circulating IGF-II concentrations predict weigth gain and obesity in humans. Diabetes 2003 Jun; 52(6): 1403-8

74 Webber RJ, Harris MG, Hough AJ Jr.. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. J Orthop Res. 1985; 3(1): 36-42

75 Nabeshima Y, Kurosaka M, Yoshiya S, Mizuno K. Effect of fibrin glue and endothelial cell growth factor on the early healing response of the transplanted allogenic meniscus: a pilot study. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1995; 3(1): 34-8

76 Tumia NS, Jhonstone AJ. Promoting the proliferative and synthetic activity of knee meniscal fibrochondrocytes using basic fibroblast growth factor in vitro. Am J Sports Med. 2004 Jun; 32(4): 915-20

77 Lafeber FP, Van der Kraan PM, Van Roy JL, Huber-Bruning O, Bijlsma JW. Articular cartilage explant culture; an appropriate in vitro system to compare osteoarthritic and normal human cartilage. Conntect Tissue Res 1993; 29: 287-299

8. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mycroliter
µm	Mycrometer
℃	Grad Celsius
ACL	*Anterior cruciate ligament*
BFGF	*basic fibroblast growth factor*
BMI	*Body mass index*
BMP	*bone morphogenic protein*
bzw.	beziehungsweise
cDNA	*copy desoxyribo nucleosid acid*
CO_2	Kohlendioxyd
DMEM	*Dulbeccos` modified eagle medium*
DNA	*desoxyribo nucleosid acid*
DPBS	*Dulbecco´s Phosphate buffered saline*
EBM	*Endothelial growth medium*
ECGF	*endothelial cell growth factor*
EGF	*epidermal growth factor*
EGM	*Endothelial Growth Media*, Clonetics (Cambrex)
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	*fibroblast growth factor*
FOP	*fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva*
GAPDH	glyceraldehyd 3-phospat dehydrogenase
h	Stunde
HBGF	*heparin-binding growth factors*
IGF	*inslulin-like growth factor*
incl.	inclusive
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
l	Liter
Lig.	Ligamentum
m	Meter

min	Minute
ml	Milliliter
nm	Nanometer
OIP	*osteogenesis inhibitory protein*
PCNA	*Proliferating-cell nuclear antigen*
PCR	*polymerase chain reaction*
PD-ECGF	*platelet-derived endothelial cell growth factor*
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PNS	Peripheres Nervensystem
rhEGF	*Recombinant human epidermal growth factor*
RNA	*ribo nucleosid acid*
rpm	*rounds per minute*
s	Sekunde
Taq	Thermophilus aquaticus
TGF-β	*transforming growth factor-beta*
u.	und
u. a.	unter anderem
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZP	Zeitpunkt

9. Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn PD Dr. Maximilian Rudert, Leitender Oberarzt der Orthopädie des Universitätsklinikums Tübingen und Herrn Dr. Maik Hoberg, Arzt in der Orthopädie des Universitätsklinikums Tübingen. Ihnen beiden herzlichen Dank für die Überlassung des Themas, für tatkräftige Unterstützung, für aufgebrachte Zeit und im Besonderen für Ihre stete Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft in allen Dingen.

Herrn PD Dr. Wilhem Aicher, Leiter des Forschungslabors der Orthopädie des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für das Einbringen seiner Kompetenz und Erfahrung, mit der er entscheidende Impulse für die Richtung und Ausführung der praktischen Arbeit gab.

Besonderer Dank gilt:

Frau Anita Hack für ihre strategische und praktische Unterstützung, für Geduld, Zeit, Motivation und planerisches Geschick. Dies alles ermöglichte die Durchführung der Arbeit in der bestehenden Form.

Frau Marion Lichtenauer, die jederzeit mit praktischer Hilfe und theoretischem Wissen weiterhelfen konnte und die mit mir Hochs und Tiefs durchgestanden hat. Vor allem der Abschluss der praktischen Arbeit wäre ohne ihren Einsatz und Teamgeist nicht in dieser Art und Weise möglich gewesen.

Frau Dr. Dorothea Alexander, Frau Tanja Abbruzese und Frau Elisabeth Kienzle, die mit Motivation, Laborerfahrung und auch Labormaterialien viel Zeit und Nerven einsparten.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Orthopädie und des OP-Traktes für ihre Zuverlässigkeit und die praktische Unterstützung.

Meinen beiden Mitdoktorandinnen Edda Lisa Schmid und Viviane Stark für wertvolle Hinweise und Tipps und ihre unerschütterliche gute Laune.

Carola Wagner für Ihre unerschöpfliche Energie und ein erstaunliches Durchhaltevermögen bei der Korrektur dieser Arbeit.

Alexandra Spreitzer für wertvolle Tipps die EDV betreffend.

Meinem Mann Robby, meiner Familie, und meinen Freunden für jede erdenkliche Unterstützung.

10. Curriculum vitae

Persönliche Angaben	Familienstand: verheiratet, eine Tochter Staatsangehörigkeit: deutsch Geburtsdatum: 06.04.1977 Geburtsort: Waiblingen Eltern: Anton und Gisela Türk, geborene Krisst
Werdegang	• 1983 bis 1987 Grundschule, Weiler zum Stein • 1987 bis1993 Geschwister – Scholl – Realschule, Winnenden • 1993 bis 1994 Berufskolleg für Ernährung und Hauswirtschaft, Backnang • 1994 bis 1997 Berufskolleg Glucker für Sport- und Gymnastiklehrer, Stuttgart • 1997 bis 1998 Berufskolleg Glucker, Zusatzausbildung Sporttherapie • 1998 bis 2001 Kolping – Kolleg zur Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife • seit 2001 Studium der Humanmedizin, Eberhard – Karls – Universität Tübingen • 31.10.2008 Ärztliche Prüfung
Zulassung	Staatlich geprüfte Sport- und Gymnastiklehrerin Sporttherapeutin