

Aus der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Allgemeine Orthopädie mit Poliklinik

Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Nikolaus Wülker

**Vergleich der Expression einzelner  
Matrixproteine  
& Entzündungsmediatoren in  
HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen  
und Fibrochondrozyten-Monokulturen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von  
Edda Lisa Schmid  
aus Radolfzell am Bodensee

2007

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: PD Dr. med. M. Rudert

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. K. Weise

Meinen Eltern  
und  
meinen Geschwistern  
gewidmet



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Meniskus</b>	<b>1</b>
1.1.1	Makroskopische Anatomie	1
1.1.2	Meniskus-Zellen	4
1.1.3	Extrazelluläre Matrix	5
1.1.4	Biomechanik und Funktion des Meniskus	8
1.1.5	Meniskusverletzungen	8
1.2	<b>Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)</b>	<b>10</b>
1.3	<b>Ziel der Studie</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1.1	Labortechnische Apparate und Instrumente	12
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Medien	14
2.1.3	Antikörper	15
2.1.4	Primer-Sequenzen	16
2.1.5	Humanes Meniskuspräparat	17
2.1.6	HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	18
2.1.7	Zellkultur-Inserts	18
2.2	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1	Studienaufbau	20
2.2.2	Zellkultur	20
2.2.3	Zellernte	24
2.2.4	Zellzahlbestimmung	25
2.2.5	Cokultur	26
2.2.6	Immunhistochemische Färbungen	29
2.2.7	Coomassieblau-Färbung	32
2.2.8	RT-PCR	34
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
3.1	<b>Zellkultur</b>	<b>42</b>
3.1.1	Fibrochondrozyten	42

---

3.1.2	HUVEC .....	46
3.1.3	Vorversuche HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokultur .....	47
<b>3.2</b>	<b>Fibrochondrozyten - Untersuchungen .....</b>	<b>48</b>
3.2.1	RT-PCR .....	48
3.2.2	Immunhistochemie .....	66
<b>3.3</b>	<b>HUVEC - Coomassieblau-Färbung .....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
4.1	<b>Bedeutung von Endothelzellen für die Meniskusregeneration....</b>	<b>71</b>
4.2	<b>Methodik der Zellkultivierung .....</b>	<b>72</b>
4.2.1	Fibrochondrozyten-Kultur.....	72
4.2.2	HUVEC-Kultur .....	73
4.2.3	HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokultur .....	73
4.3	<b>Fibrochondrozyten - Untersuchungen .....</b>	<b>74</b>
4.3.1	Vorkommen, Funktion und Veränderung der untersuchten Faktoren	74
4.3.2	Methodik der RT-PCR.....	81
4.3.3	Immunhistochemie .....	81
4.4	<b>HUVEC - Coomassieblau-Färbung .....</b>	<b>82</b>
4.5	<b>Conclusio.....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>99</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Rechtes Kniegelenk in der Ansicht von oben .....	2
Abbildung 2:	Blutgefäßversorgung des Meniskus .....	3
Abbildung 3:	Morphologische Unterschiede der Fibrochondrozyten in der tiefen und oberflächlichen Zone .....	5
Abbildung 4:	Kollagenfaserstruktur des Meniskus.....	6
Abbildung 5:	Lokalisation von Meniskusrissen.....	9
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines Inserts .....	18
Abbildung 7:	Flussdiagramm des Studienaufbaus .....	20
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Cokultur .....	28
Abbildung 9:	Prinzip der Immunhistochemie .....	30
Abbildung 10:	Prinzip der DNA-Amplifikation .....	35
Abbildung 11:	exponentielle cDNA-Amplifikation .....	40
Abbildung 12:	Schema Elektrophoresekammer .....	40
Abbildung 13:	Fibrochondrozyten - Primärkultur MP5.....	42
Abbildung 14:	Fibrochondrozyten MP3 Co- & Kontrollkultur .....	43
Abbildung 15:	HUVEC - Primärkultur .....	46
Abbildung 16:	HUVEC in DMEM:F12- und EGM-Vollmedium.....	47
Abbildung 17:	Fibrochondrozyten in DMEM:F12- und EGM-Vollmedium.....	47
Abbildung 18:	PCR-Bilder GAPDH.....	49
Abbildung 19:	PCR-Bild von-Willebrand-Faktor (vWF).....	50
Abbildung 20:	PCR-Bild Aggrecan .....	51
Abbildung 21:	PCR-Bild Biglycan .....	52
Abbildung 22:	PCR-Bild Connexin-43 .....	53
Abbildung 23:	PCR-Bild Fibronectin.....	54
Abbildung 24:	PCR-Bild Kollagen-I $\alpha$ 1 .....	55
Abbildung 25:	PCR-Bild Kollagen-II .....	56
Abbildung 26:	PCR-Bild Kollagen-III .....	57
Abbildung 27:	PCR-Bild Kollagen-IV .....	58
Abbildung 28:	PCR-Bild Kollagen-VI $\alpha$ 3.....	59
Abbildung 29:	PCR-Bild Kollagen-X.....	60

---

Abbildung 30: PCR-Bild Vimentin.....	61
Abbildung 31: PCR-Bild iNOS .....	62
Abbildung 32: PCR-Bild MMP-1 .....	63
Abbildung 33: PCR-Bild MMP-3 .....	64
Abbildung 34: PCR-Bild MMP-13 .....	65
Abbildung 35: Immunhistochemie - Kollagen-I.....	68
Abbildung 36: Immunhistochemie - Kollagen-II.....	68
Abbildung 37: Immunhistochemie - von-Willebrand-Faktor (vWF) .....	68
Abbildung 38: Immunhistochemie - Negativ-Kontrolle.....	68
Abbildung 39: HUVEC nach Färbung mit Coomassieblau zu ZP1 und ZP2; Cokultur mit MP4.....	70
Abbildung 40: Coomassieblau-Färbung im Randbereich der Insert-Membran.... .....	83



---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Patientendaten .....	17
Tabelle 2:	Zellzahl.....	27
Tabelle 3:	PCR-Protokoll .....	39
Tabelle 4:	Ergebnisse der Fibrochondrozyten - Zellzahl - Bestimmung ....	44
Tabelle 5:	Ergebnisse der Fibrochondrozyten - Aufteilung .....	45
Tabelle 6:	Ergebnisse HUVEC - Zellzahl - Bestimmung .....	46
Tabelle 7:	PCR-Ergebnisse von-Willebrand-Faktor (vWF).....	50
Tabelle 8:	PCR-Ergebnisse Aggrecan .....	51
Tabelle 9:	PCR-Ergebnisse Biglycan .....	52
Tabelle 10:	PCR-Ergebnisse Connexin-43 .....	53
Tabelle 11:	PCR-Ergebnisse Fibronectin.....	54
Tabelle 12:	PCR-Ergebnisse Kollagen-I $\alpha$ 1 .....	55
Tabelle 13:	PCR-Ergebnisse Kollagen-II .....	56
Tabelle 14:	PCR-Ergebnisse Kollagen-III .....	57
Tabelle 15:	PCR-Ergebnisse Kollagen-IV .....	58
Tabelle 16:	PCR-Ergebnisse Kollagen-VI $\alpha$ 3.....	59
Tabelle 17:	PCR-Ergebnisse Kollagen-X.....	60
Tabelle 18:	PCR-Ergebnisse Vimentin.....	61
Tabelle 19:	PCR-Ergebnisse iNOS .....	62
Tabelle 20:	PCR-Ergebnisse MMP-1 .....	63
Tabelle 21:	PCR-Ergebnisse MMP-3 .....	64
Tabelle 22:	PCR-Ergebnisse MMP-13 .....	65
Tabelle 23:	Ergebnisse Immunhistochemie .....	67

## 1 EINLEITUNG

Das Kniegelenk gehört zu den komplexesten Gelenken des menschlichen Körpers. Die knöcherne Struktur verleiht keine ausreichende Stabilität und das Knie ist für einen kontrollierten Bewegungsablauf auf Bänder, Muskeln, Knorpel und Menisken angewiesen. Die Menisken sind mobile, halbmondförmige knorpelähnliche Strukturen aus Fibrochondrozyten zwischen Tibia und Femur. Innerhalb des Meniskus unterscheidet man äußere vaskuläre Anteile von inneren avaskulären. Bei sportlichen Aktivitäten, aber auch bei Alltagsbewegungen kommt es häufig infolge von degenerativen Veränderungen zu Verletzungen des Meniskus. Risse im äußeren Teil können durch die vorhandene Blutversorgung nach Primärnaht heilen, nicht jedoch Verletzungen im inneren Teil des Meniskus. Die notwendige Folge ist eine Teil- oder Totalmeniskektomie. Doch auch trotz und gerade wegen dieser operativen Möglichkeiten kommt es in einer hohen Prozentzahl der Fälle zu degenerativen Knorpelveränderungen, bis hin zur Kniegelenksarthrose.

### 1.1 Meniskus

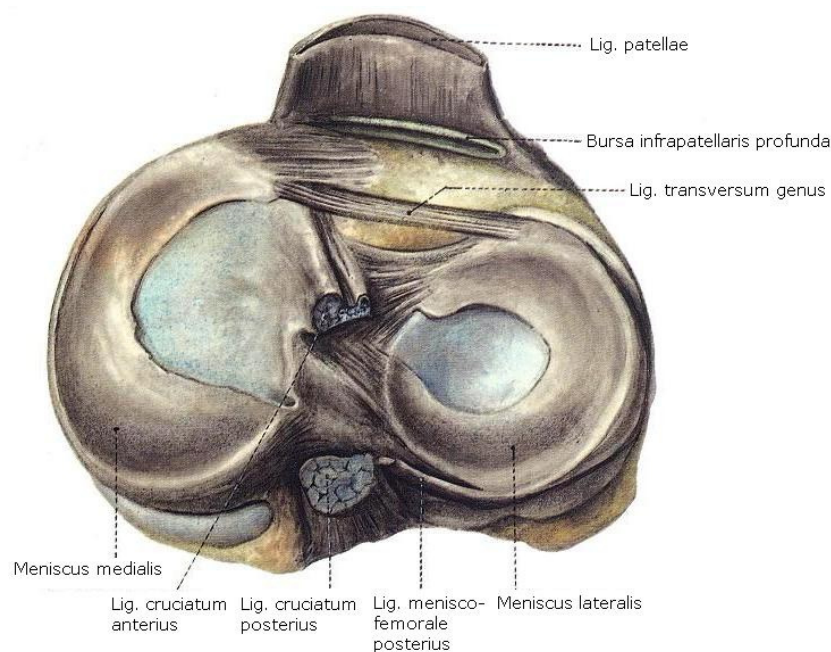
#### 1.1.1 Makroskopische Anatomie

Die Menisken entstehen während der embryonalen Entwicklung durch Kondensation von mesenchymalem Gewebe und besitzen bereits in der 8. Entwicklungswoche ihre meniskus-typische Form [20].

Es sind C-förmig gebogene Faserknorpelringe von keilförmigem Querschnitt. Der Rücken des Keils zeigt nach außen und ist mit der Gelenkkapsel des Kniegelenkes verwachsen. Die Unterfläche ist plan und die Oberfläche ist so ausgehöhlt, dass sie sich den Femurcondylen anschmiegt und auf diese Weise die Inkongruenzen zwischen Ober- und Unterschenkelknochen ausgleicht.

Die freien Enden des Meniskus werden als Vorder- bzw. Hinterhorn bezeichnet und sind über Bänder auf dem Tibiaplateau verankert. Dabei liegen die

Haftstellen des kleineren, fast kreisförmigen lateralen Meniskus dicht beieinander, während die beiden Enden des größeren medialen Meniskus die Haftstellen des lateralen Meniskus von vorn und hinten umgreifen. Der mediale Meniskus ist mit der Gelenkkapsel und dem tibialen Kollateralband verwachsen, wodurch er an Beweglichkeit verliert. Der Außenmeniskus hingegen ist nur punktuell mit der Gelenkkapsel verbunden und besitzt keine Verbindung zum fibularen Kollateralband. Er ist gut beweglich und kann unter Belastung ausweichen, wodurch er im Verhältnis zum Innenmeniskus geringer belastet wird.



**Abbildung 1:** *Rechtes Kniegelenk in der Ansicht von oben (aus Rauber/Kopsch,2003 [88])*

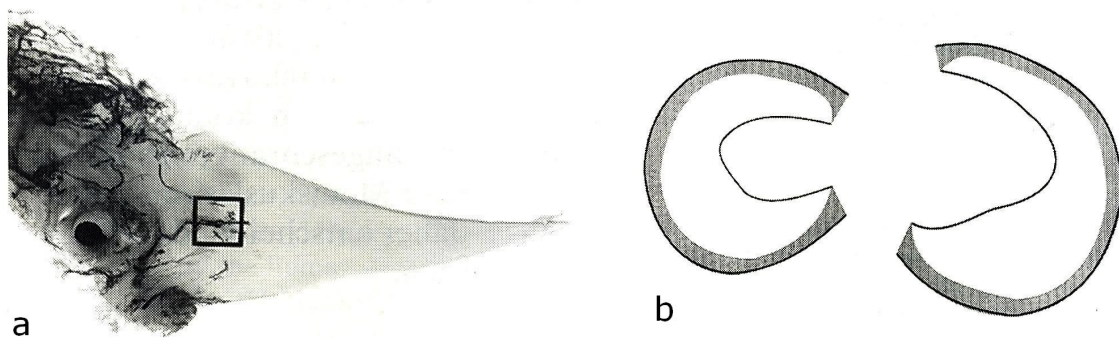
Die Blutversorgung der Menisken erfolgt über Gefäße der Kniegelenkkapsel. Parallel zur äußeren Zirkumferenz der Menisken verläuft in zirkulärer Richtung jeweils ein Ast der Arteria geniculata inferior. Kleine abgehende Blutgefäße dringen zentripetal in die Menisken ein (siehe Abbildung 2) und liefern Sauerstoff und Nährstoffe. Beim erwachsenen Menschen sind sie jedoch nur in den äußeren Anteilen nachweisbar und die Ausdehnung des mit Blutgefäßen versorgten Randsaums beträgt im lastaufnehmenden Bereich unabhängig von

der Meniskusbreite nur 1,5 - 2mm. Die einzigen vollständig vaskularisierten Anteile sind die ligamentären Anteile der Vorder- und Hinterhörner [83].

Im Kindes- und Jugendalter ist der Meniskus noch fast vollständig vaskularisiert. Nach dem 14. Lebensjahr bilden sich die Gefäße dann aber bis auf die beschriebenen Anteile rapide zurück [8,20].

Mehr als 2/3 des Meniskusgewebes sind nicht an die Blutversorgung angeschlossen und werden durch die Synovialflüssigkeit ernährt. Dies geschieht einerseits durch Diffusion und andererseits durch wiederholtes mechanisches Pumpen, welches durch Bewegungen und Belastungen des Kniegelenkes ausgelöst wird [85].

PERETTI ET AL. bezeichnen die Zone des äußeren Meniskusdrittels aufgrund ihrer guten Vaskularisierung als ‚Red-red-Zone‘, den mit Blutgefäßen geringer versorgten Bereich im mittleren Drittel als Übergangszone oder ‚Red-white-Zone‘ und die nicht vaskularisierte Zone des inneren Drittels als ‚White-white-Zone‘ [81].



**Abbildung 2:** Blutgefäßversorgung des Meniskus (nach Petersen et al., 1999 [83])

- a** - Gelatine-Tusche-Injektionspräparat eines medialen Meniskus
- b** - Schematische Darstellung des mit Blutgefäßen versorgten peripheren Randsaums

Die nervale Versorgung der Menisken ist ähnlich der Blutversorgung und beschränkt sich ebenfalls auf das äußere Drittel. Die höchste Innervationsdichte findet man in den Meniskushörnern. Im inneren Drittel des Meniskus fehlt die Innervation [36,74,100,118].

### 1.1.2 Meniskus-Zellen

Die Zellen des menschlichen Meniskus sind für die Produktion und Organisation der extrazellulären Matrix verantwortlich. Lange Zeit war über ihre Morphologie und Funktion nur wenig bekannt und sie wurden aufgrund der fibrösen Struktur der Menisken als Fibroblasten bzw. Fibrozyten bezeichnet [76]. Erst GHADIALLY ET AL. konnten durch aufwendige licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen die Meniskuszellen als Chondrozyten klassifizieren und sie zudem zwei relativ ähnlichen Populationen, den oberflächlichen und tiefen Meniskus-Chondrozyten, zuordnen [31].

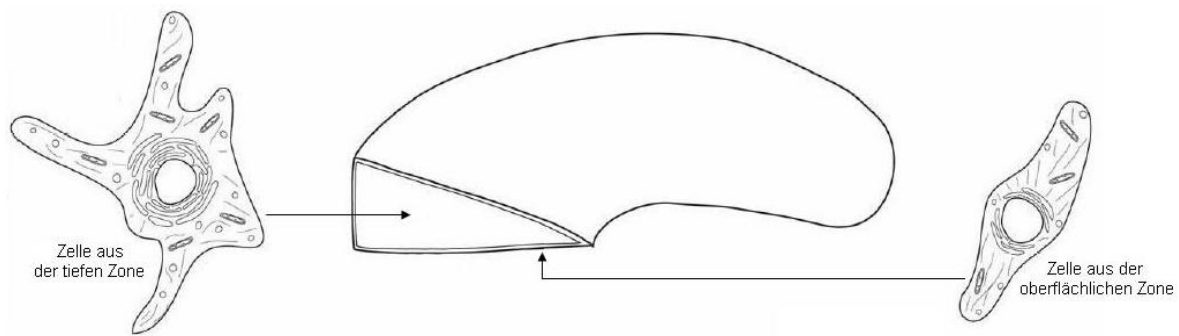
Trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu den Chondrozyten des hyalinen Knorpels gibt es einen entscheidenden Unterschied: während im artikulären Knorpel hauptsächlich Kollagen-Typ-II vorkommt, ist im Meniskus das Kollagen-Typ-I prädominant [70]. Aus diesem Grund hat sich bis heute die von WEBBER ET AL. eingeführte Bezeichnung Fibrochondrozyten durchgesetzt. Sie beschreibt nicht nur die morphologischen, sondern auch die synthetischen Eigenschaften der Meniskuszellen [114].

Die Fibrochondrozyten der oberflächlichen Meniskuszone sind normalerweise oval bzw. fusiform mit großen Kernen und wenigen kurzen Zellausläufern und haben direkten Kontakt zur Gelenkflüssigkeit [31,79]. Die Zellen in der tiefen, inneren Zone besitzen hingegen eine eher runde, polygonale, chondrozyten-ähnliche Form mit zahlreichen Zellfortsätzen, die in die amorphe perizelluläre Zone vordringen [31]. In diesem inneren Teil des Meniskus sind sie v.a. Kompressionskräften ausgesetzt.

Beide Zelltypen sind gut mit rauem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Komplexen ausgestattet, während Mitochondrien in den oberflächlichen Fibrochondrozyten nur gelegentlich nachgewiesen werden können.

NAKATA ET AL. beschreiben als weitere vorkommende Zellpopulation fibroblastenähnliche Zellen, die besonders im Außenbereich des Meniskus, mit Belastung durch Zugkräfte, vorkommen [79].

Neben den Fibrochondrozyten und fibroblastenähnlichen Zellen werden in den vaskularisierten Anteilen der Menisken auch Endothelzellen sowie gelegentlich Mastzellen gefunden [114].



**Abbildung 3:** Morphologische Unterschiede der Fibrochondrozyten in der tiefen und oberflächlichen Zone (nach Sweigart et al., 2003 [101])

### 1.1.3 Extrazelluläre Matrix

Die Fibrochondrozyten des Meniskus sind in eine reichlich vorhandene extrazelluläre Matrix eingebettet. Diese besteht aus fibrillenformenden Kollagenen, Proteoglykanen, Adhäsionsglykoproteinen, Elastin und Wasser [70]. Im humanen Meniskusgewebe ist die Verteilung 72% Wasser, 22% Kollagen, 0,8% Glykosaminoglykane, DNA und Adhäsionsmoleküle, wobei die prozentuale Verteilung abhängig von Alter und Lokalisation im Gewebe ist [44,70]. Die Extrazellulärmoleküle sind verantwortlich für die funktionelle Struktur des Meniskus und haben bedeutende Funktionen im Bereich der Biomechanik [87].

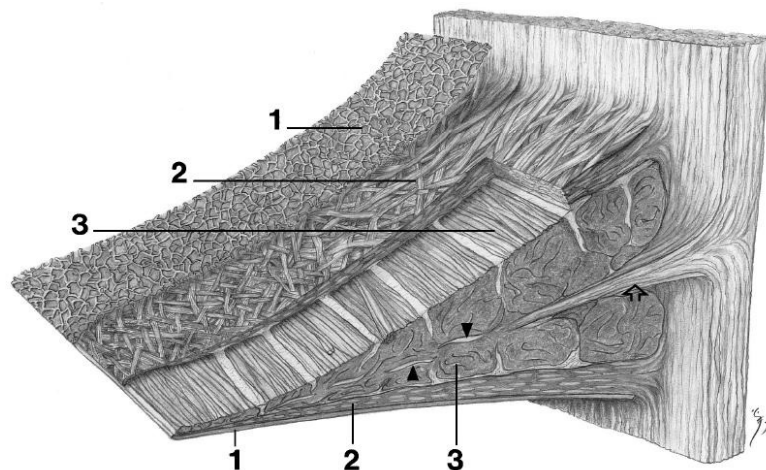
#### 1.1.3.1 Kollagene

Das Meniskusgewebe enthält mehrere verschiedene Kollagen-Arten, die zusammen 60-70% der Meniskus-Trockenmasse bilden [70].

Der Anteil der Moleküle des Kollagen-Typ-I dominiert deutlich mit mehr als 90% des Gesamtkollagens. In kleineren Mengen sind jedoch auch die Kollagene II, III, V und VI vorhanden [18,26]. Die Verteilung des Kollagen-Typ-II ist auf die inneren, nicht vaskularisierten Teile beschränkt, während Kollagen-Typ-I innerhalb des gesamten Meniskus nachgewiesen werden kann [18]. Zusätzlich wurde vor kurzem auch die Anwesenheit von Kollagen-Typ-X in normalem und

osteoarthritisch verändertem Meniskus nachgewiesen [12,13,91,111].

Die Anordnung der Kollagenfasern erfolgt entsprechend der mechanischen Belastung. Während sie an der Oberfläche fischgräten- bzw. netzartig ist, verlaufen die meisten Kollagenfasern im Korpus zirkulär und werden durch einige radiäre Bündel aus der Basis verstärkt [10,82].



**Abbildung 4:** Kollagenfaserstruktur des Meniskus (aus Petersen et al., 1998 [82])

Die Meniskusoberfläche wird von einem Netzwerk dünner Fibrillen bedeckt (Schicht 1). Unter dem oberflächlichen Netzwerk liegt eine Schicht lamellenartiger Faserbündel, die sich unter verschiedenen Winkeln überkreuzen (Schicht 2). Der Hauptteil der Kollagenfibrillen liegt zwischen den oberflächlichen Schichten. Die Kollagenfibrillenbündel sind in der inneren und in der äußeren Zirkumferenz zirkulär ausgerichtet (Schicht 3). Im Bereich der inneren Zirkumferenz sind zwischen den zirkulären Fibrillenbündeln einige radiäre Kollagenfibrillen zu finden (**Pfeilspitze**). An der Meniskusbasis dringt lockeres Bindegewebe von der Gelenkkapsel radiär zwischen die zirkulär laufenden Fibrillenbündel (**Pfeil**).

Insgesamt verleihen die fibrillären Kollagene dem Meniskus seine Dehnfestigkeit und sind möglicherweise auch an der Organisation der extrazellulären Matrix beteiligt [9,70].

### 1.1.3.2 Proteoglykane

Der Anteil der Proteoglykane an der Trockenmasse des Meniskus beträgt lediglich ca. 3%. Sie besitzen jedoch als wichtige Funktion die Wasserspeicherung im Meniskusgewebe [77].

Proteoglykane bestehen aus einem Protein (Protein-Core), das durch kovalente Bindung mit einer oder mehreren Glykosaminoglykan-Ketten (GAG-Ketten) verbunden ist. Man unterscheidet große und kleine Proteoglykane.

Die großen Proteoglykane werden im Meniskus durch die GAG Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-6-Sulfat, Dermatan-Sulfat sowie Keratan-Sulfat gebildet [2]. Chondroitin-Sulfat- und Keratan-Sulfat-Ketten aggregieren mit Hyaluronsäure und verleihen dem Meniskus dadurch neben hydrophilen auch viskoelastische Eigenschaften [77].

Das Hauptproteoglykan des Meniskus ist Aggrecan [1,90,107]. Es bindet ebenfalls an Hyaluronsäure und bildet hochmolekulare Aggregate. Funktionell macht es das Meniskusgewebe widerstandfähiger gegenüber Kompressionskräften und verleiht ihm Elastizität [23].

Als kleine Proteoglykane sind Biglycan und Decorin bekannt. Ihre Funktion wird im Schutz der Zellen während Belastung (Biglycan) und der Unterstützung der Organisation der Kollagenfibrillen (Decorin) gesehen [96].

### **1.1.3.3 Adhäsionsglykoproteine**

Der fibröse Knorpel des Meniskus enthält eine Vielzahl von Matrixproteinen, deren Identität und Funktion noch erforscht werden muss.

Drei so genannte Adhäsionsglykoproteine wurden aber bereits von McDEVITT, MILLER und WEBBER als Kollagen-Typ-VI, Fibronectin und Thrombospondin, identifiziert [70,72]. Ihre Aufgabe ist die Bindung von anderen Matrixmolekülen und Zellen.

### **1.1.3.4 Elastin**

Elastin repräsentiert mit 0,6% einen nur sehr kleinen Teil der kollagenen Proteine im humanen Meniskus. Es ist ein hochvernetztes und unlösliches Protein, das zusammen mit elastischen Mikrofibrillen die Elastizität und Formerhaltung des Meniskus gewährleistet [32].



#### 1.1.4 Biomechanik und Funktion des Meniskus

Die Menisken sind bewegliche Kniegelenkpfannen und ermöglichen zusammen mit den Bandstrukturen eine kontrollierte Flexions-Extensions- sowie Rotationsbewegung des Kniegelenkes. Bei Beugung werden die Menisken durch die Femurkondylen nach dorsal gedrängt und bei Streckung nach ventral, des Weiteren bewegt sich der laterale Meniskus bei Außenrotation und der mediale bei Innenrotation nach vorne [62].

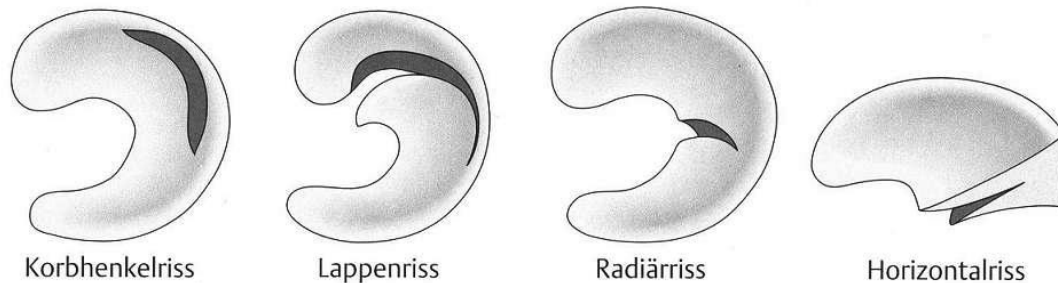
Neben diesen beiden Rollen in der Kniebewegung und -stabilisierung hat der Meniskus aber noch weitere Aufgaben. Er ist funktionell ein Stoßdämpfer, hilft bei der Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Tibia und Femur und damit der Verteilung des Körpergewichtdruckes auf eine größere Gelenkfläche. Ebenso sorgt er für die Kraftübertragung des Ober- auf den Unterschenkel und unterstützt die Gelenkschmierung [49,51,80,86,95,106,113]. Aufgrund dieser unterschiedlichen Aufgaben und der Geometrie des Gewebes ist der Meniskus Kompressions-, Dehnungs- und Abscherkräften ausgesetzt. Dies macht verständlich, dass die Menisken einer großen mechanischen Beanspruchung unterliegen und es infolge von Überbeanspruchung und Degeneration nicht selten zu Verletzungen kommen kann.

#### 1.1.5 Meniskusverletzungen

Meniskusverletzungen sind mit die häufigsten Verletzungen in der Orthopädie und führen unwiderruflich zu einer Degeneration des Kniegelenkknorpels. Laut einer Studie des ‚National Center for Health Statistics‘ sind in den USA jährlich über 600.000 Operationen die Folge von Meniskusschäden [100]. Als Ursache kommen meist Degeneration oder Trauma infolge von Überbeanspruchung in Frage.

Die häufigsten Verletzungsformen sind Risse des Meniskusgewebes, obwohl auch Ablösungen von der tibialen Anheftung und Gewebedegeneration vorkommen können [29,57,64,80]. Unter den Meniskusrissen werden verschiedene Formen unterschieden: einerseits Radiär-, Längs-, Lappen-, Korbhenkel- und Horizontalriss und andererseits unvollständige und komplexe

Risse. Die folgende Abbildung zeigt die Lokalisation und Art von einigen der beschriebenen Rissformen.



**Abbildung 5:** Lokalisation von Meniskusrissen

Für die Therapie von Meniskusschäden bieten sich derzeit verschiedene Optionen wie beispielsweise eine Naht der Risse oder aber eine Teil- bzw. Totalresektion an. Viele Studien beschreiben jedoch die Probleme und Folgen dieser Therapiemethoden.

So zeigte KING 1936 [58] als erster, dass Risse im äußeren Meniskusanteil durch die vorhandene Blutversorgung heilen können, nicht jedoch Verletzungen im inneren avaskulären Bereich. Einer späteren Studie zufolge kann ein Längsriss im Bereich des äußeren, gefäßversorgten Teiles mit ca. 80-90%iger Wahrscheinlichkeit durch eine Primärnaht geheilt werden, während ein Schaden im inneren Drittel des Meniskus irreparabel ist und aufgrund möglicher Symptome wie Einklemmungserscheinungen entfernt werden muss [42].

Die partielle bzw. totale Meniskektomie führt im operierten Knie zu einer Reduzierung der Kontaktfläche zwischen Ober- und Unterschenkelknochen um ca. 50% und zu einer Reduzierung der Möglichkeit der Schockabsorption um ca. 20% [3,110]. Daraus resultierend kommt zu einer massiven Zunahme der Beanspruchung des Kniegelenknorpels und dadurch zu Knorpelschäden und Knorpeldegeneration. Langfristige Folge ist eine frühe Arthrose im Kniegelenk [5,21,22,30,34,53,58,60,63,98,104,108].

Bei einem zusätzlich nicht mehr vorhandenen oder funktionslosen vorderen Kreuzband ist der Verlust von Meniskusteilen ein noch bedeutenderer Faktor in der Entwicklung einer Gonarthrose [94].

Der Erhalt des kompletten Meniskus ist deshalb ein äußerst wichtiges Ziel in der Behandlung von Verletzungen des Kniegelenkes.

## 1.2 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)

HUVEC sind Zellen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen und dienen in der vorliegenden Arbeit als Vertreter humaner Gefäßendothelzellen.

Vaskuläre Endothelzellen kleiden als einschichtige Zellschicht das gesamte Blutgefäßsystem luminal aus und bilden zusammen mit der Basalmembran die Tunica intima der Blutgefäße [54]. Sie bilden eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umgebendem Gewebe und regulieren den Stoff- und Zellaustausch zwischen diesen beiden Kompartimenten [28].

Zu ihren synthetischen Fähigkeiten gehört die Produktion von Bestandteilen der Basalmembran (z.B. Kollagen-IV, Laminin, Fibronectin). Als spezifische Zellorganellen besitzen zahlreiche Spezies sog. Weibel-Palade-Körperchen, in denen u.a. der für die Adhäsion von Blutplättchen an Gefäßwandverletzungen notwendige von-Willebrand-Faktor (vWF) sowie P-Selektin, welches die Adhäsion von Leukozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermittelt, nach ihrer Synthese gespeichert werden [54,112].

Das Endothel ist des Weiteren durch die Bildung biologisch aktiver Substanzen an der Regulation des Gefäßtonus sowie an Koagulation und Fibrinolyse beteiligt [19,35] und kontrolliert durch Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle die selektive Verteilung von zirkulierenden Zellen, wie Leukozyten, in bestimmte Organe und Gewebe.

Insgesamt stellt das vaskuläre Endothel eine sehr heterogene Zellpopulation dar [84] und Endothelzellen werden als dynamische, systemisch disseminierte, heterogene Zellen mit synthetischen, sekretorischen, metabolischen und immunologischen Funktionen betrachtet [19].

### 1.3 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der Beeinflussung von Meniskus-Fibrochondrozyten durch Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) im Rahmen einer Cokultur zur Heilungsverbesserung von Meniskusschäden.

Hierzu liegen in der uns bekannten Literatur keine Daten vor. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen geht aber die Wichtigkeit von Endothelzellen im Zusammenspiel mit Bindegewebszellen und extrazellulärer Matrix bei Wundheilung und Neovaskularisierung hervor [52,59,61,92,102].

Für folgende Matrixproteine und Entzündungsmediatoren wurde eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR (reverse-Transcriptions-Polymerase-Kettenreaktion) durchgeführt.

- Matrixproteine:
  - Aggrecan
  - Biglycan
  - Connexin-43
  - Fibronectin
  - Kollagen-I, -II, -III, -IV, -VI, -X
  - Vimentin
- Entzündungsmediatoren:
  - induzierbare Stickoxid-Synthetase (iNOS)
  - Matrix-Metalloproteinase (MMP) 1, 3, 13

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Labortechnische Apparate und Instrumente

<b>Absaugpumpe</b>	Suc-O-Mat; Bachofer, Reutlingen/D
<b>Brutschrank</b>	CO <sub>2</sub> Auto Zero Inkubator; Heraeus, Hanau/D
<b>Cell Culture Inserts, Falcon™</b>	PET, Porengröße 1.0µm; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA
<b>Deckgläser</b>	24x32mm; Langenbrinck, Emmendingen/D
<b>Einmalskalpelle</b>	Cutifix; Braun Medical AG, Melsungen/D
<b>Elektrophoresekammer</b>	DNA Pocket-Block UV; Biozym, Hess. Oldendorf/D
<b>Eppendorf-Cups</b>	0,5ml; Eppendorf, Hamburg/D
<b>Feinwaage</b>	Mettler P1210; Mettler Toledo, Giessen/D
<b>Fotoapparat</b>	Vario-Orthomat; Leitz, Wetzlar/D Canon PowerShot S45, Tokio/Japan
<b>Gefrierschrank</b>	Bosch, Ditzingen/D
<b>Gewebekulturplatte 6-Well</b>	Greiner GmbH, Nürtingen/D
<b>Insulinspritzen</b>	1ml; Braun Medical AG, Melsungen/D
<b>Kanülen</b>	Sterican 0.9 x 70mm; Braun Medical AG, Melsungen/D
<b>Kühlschrank</b>	Bosch, Ditzingen/D
<b>Kulturflaschen</b>	Tissue Culture Flask 250ml; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA
<b>Lichtmikroskop</b>	Fluovort FS Mikroskop; Leitz, Wetzlar/D
<b>Magnetrührer</b>	Ikamag RCT; Ika-Labortechnik, Staufen i.Br./D
<b>Mikrowelle</b>	Bosch, Ditzingen/D
<b>Objektträger</b>	Super Frost plus, 25x75x1,0mm; Langenbrinck, Emmendingen/D
<b>PCR-Block</b>	Thermocycler UNO II; Biometra, Göttingen/D
<b>Perfusorspritzen</b>	50ml; Braun Medical AG, Melsungen/D

---

<b>Petrischalen</b>	Cellstar, 94/16mm, steril; Greiner, Nürtingen/D
<b>Pinzetten</b>	Fa. Aesculap, Tuttlingen/D
<b>Pipetten</b>	EpT.I.P.S.; Eppendorf, Hamburg/D Serological Pipet, 1, 2, 5, 10, 25ml; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA Combitips Biopur; Eppendorf, Hamburg/D
<b>Pipettierhilfen</b>	Pipetman 10/20/100/200µl; Gilson, Middleton/USA Accujet; Brand GmbH, Wertheim/D
<b>Power Pack P25 (Gelelektrophorese)</b>	Biometra; Göttingen/D
<b>Scheren</b>	Aesculap, Tuttlingen/D
<b>Schüttler</b>	Ika MTS 4; Bachofer, Reutlingen/D
<b>Spectrophotometer</b>	Jasco V-530; Jasco, Groß Umstadt/D
<b>Sterilarbeitsbank</b>	Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl/D
<b>Sterilfilter</b>	Millex GV 0,22µm; Millipore, Molsheim/F
<b>Stickstofftank</b>	Taylor Wharton Cryogenetics; Bachofer, Reutlingen/D
<b>Test-Röhrchen</b>	PP Test Tubes 50ml; Greiner, Nürtingen/D
<b>Wasserbad</b>	Memmert GmbH, Schwabach/D Daglef Patz, Wankendorf/D
<b>Zentrifuge</b>	Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg/D Zentrifuge 5412; Eppendorf, Hamburg/D

### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

<b>β-Mercaptoethanol</b>	Sigma Aldrich, St. Louis/USA
<b>Agarose</b>	SeaKem LE Agarose; Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland/USA
<b>Borsäure</b>	Merck, Darmstadt/D
<b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>	Albumine, bovine, Fraction V; Sigma Aldrich, St. Louis/USA
<b>cDNA-Synthese-Kit</b>	Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto/USA
<b>Collagenase Typ 11</b>	Sigma Aldrich, St. Louis/USA
<b>Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue R-250</b>	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
<b>Desinfektionslösung</b>	Antifect Liquid; Schülke & Mayr, Norderstedt/D
<b>Dulbecco's MEM / NUT Mix F12 (Ham)</b>	Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>DNA-Eichmarker</b>	100bp DNA-Ladder; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>Endothelial Growth Medium EGM<sup>™</sup> (Clonetics<sup>®</sup>)</b>	Cambrex Bio Science, Walkersville/USA
<b>EGM<sup>™</sup> SingleQuots<sup>®</sup> (Clonetics<sup>®</sup>)</b>	enthalten: BBE, rhEGF, Hydrocortisone, GA-1000 und FCS; Cambrex Bio Science, Walkersville/USA
<b>Essigsäure</b>	Merck, Darmstadt/D
<b>Ethanol</b>	Ethanol p.a., absolut; Merck, Darmstadt/D
<b>Ethidiumbromid</b>	Sigma Aldrich, St. Louis/USA
<b>Fötales Kälberserum (FCS)</b>	Seromed / Biochrom KG, Berlin/D
<b>Fungizone (Amphotericin B)</b>	250 UG/ml; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>H<sub>2</sub>O bidest.</b>	Universitätsapotheke Tübingen
<b>HUVEC, Pooled (Lot Number 3F0096)</b>	Cambrex Bio Science, Walkersville/USA
<b>Insulin-Transferrin- Selenium</b>	Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>Methanol</b>	Methanol p.a., absolut; Merck, Darmstadt/D

<b>PBS-Puffer</b>	Dulbecco´s Phosphate buffered saline 0,0095 M; Cambrex Bio Science, Verviers/B PBS-Tablets; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>PCR-Kit</b>	enthält: RNase-freies H <sub>2</sub> O bidest., 10xPCR-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> , Magnesiumchlorid (25mM), dNTP-Mix (10mM), Taq-Polymerase; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
<b>Penicillin- Streptomycin</b>	10.000 U/mg Pen, 10.000µg/ml Str.; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>Phenylhydrazin</b>	Merck, Darmstadt/D
<b>RNA-Extraktionskit</b>	RNeasy Mini Kit (250); Qiagen, Hilden/D
<b>Trypanblau 0.4%</b>	Sigma Aldrich, St. Louis/USA
<b>Trypsin EDTA 1x</b>	Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>Vectastain AEC- Substrate-Kit for Peroxidase</b>	Vector Laboratories, Burlingame/USA
<b>Vectastain Universal Elite ABC-Kit</b>	Vector Laboratories, Burlingame/USA
<b>Vitamine</b>	MEM Vitamins Solution 100x; Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA
<b>Wasserdesinfektion</b>	Acryl Aqua Clean; WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden/D

### 2.1.3 Antikörper

<b>Kollagen-I</b>	Ziege IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA
<b>Kollagen-II</b>	Ziege IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA
<b>vWF</b>	Hase IgG; Oncogene Research Products, San Diego/USA



## 2.1.4 Primer-Sequenzen

<b>GAPDH</b>	se: 5' 5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3' as: 5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'
<b>vWF</b>	se: 5' TGT ACC ATG AGG TTC TCA ATG C 3' as: 5' TTA TTG TGG GCT CAG AAG GG 3'
<b>Aggrecan</b>	se: 5' AAG CTG GGT TCG GGG CAT CT 3' as: 5' TGG TAG TCT TGG GCA TTG TTG TTG A 3'
<b>Biglycan</b>	se: 5' ACA CAC CGG ACA GAT AGA 3' as: 5' CTC TTT GGG CAC AGA CTT 3'
<b>Connexin-43</b>	se: 5' GGA GGG AAG GTG TGG CTG TC 3' as: 5' GGC AGG GCT CAG CGC ACC AC 3'
<b>Fibronectin</b>	se: 5' CAA ACG GCC AGC AGG GAA AT 3' as: 5' GTG AGG TTG GTG AGG GTG ATG 3'
<b>Kollagen-I<math>\alpha</math>1</b>	se: 5' AGC GCT GGT TTC GAC TTC AGC TTC C 3' as: 5' CAT CGG CAG GGT CGG AGC CCT 3'
<b>Kollagen-II</b>	se: 5' CTG GCT CCC AAC ACT GCC AAC GTC 3' as: 5' TCC TTT GGG TTT GCA ACG GAT TGT 3'
<b>Kollagen-III</b>	se: 5' CCA AAC TCT ATC TGA A 3' as: 5' GGA CTC ATA GAA TAC A 3'
<b>Kollagen-IV</b>	se: 5' GAG GAG AAA AAG GTG ACC GAG 3' as: 5' TAT CAG CCC TGG TGT ACC TTG 3'
<b>Kollagen-VI<math>\alpha</math>3</b>	se: 5' GCG GGT CCC TCA GAT TGC CCT 3' as: 5' CAT AAA CCC TCG CCC AAA CTC 3'
<b>Kollagen-X</b>	se: 5' ACA GGA ATG CCT GTG TCT GCT TTT AC 3' as: 5' ATT TGABCTC GGC ATT GGG AAG CTG GAG CCA 3'
<b>Vimentin</b>	se: 5' TTG GTT GGA TAC TTG CTG GA 3' as: 5' TGC AGC AAT ATA TTA CCC AGC A 3'
<b>iNOS</b>	se: 5' ACA TTG ATC AGA AGC TGT CCC AC 3' as: 5' CAA AGG CTG TGA GTC CTG CAC 3'
<b>MMP-1</b>	se: 5' GGT GAT GGA GCA GCC CAG 3' as: 5' CAG TAG AAT GGG AGA GTC 3'
<b>MMP-3</b>	se: 5' CCT GGG ACG CCA GCC AAC TGT G 3' as: 5' TGC TTG GGA AAG CCT GGC TCC AT 3'
<b>MMP-13</b>	se: 5' GCG GGG TTC CTG ATG TGG GTG A 3' as: 5' GGC CGA ACT CAT GCG CAG CAA C 3'

### 2.1.5 Humanes Meniskuspräparat

Für die Herstellung und Anzucht der humanen Fibrochondrozyten-Kulturen wurde Meniskusgewebe aus Kniegelenksoperationen der orthopädischen Universitätsklinik Tübingen verwendet. Die Operationsindikation war stets eine fortgeschrittene, einseitig betonte Gonarthrose und wurde immer endoprothetisch durch den Einbau einer Knie totalendoprothese (KTEP) versorgt. Für die Patienten blieb die Meniskektomie dadurch ohne weitere Folgeschäden.

Das Patientenkollektiv bestand aus sechs Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 65,8 Jahren. Bei den sechs Patienten handelte es sich um fünf Frauen und einen Mann.

Genauere Daten zu den einzelnen Patienten sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Namen der Patienten werden aus Datenschutzgründen nicht genannt. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission genehmigt. Vor der Operation wurden die Patienten über die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit aufgeklärt und waren mit der Entnahme des Meniskusgewebes einverstanden.

Patient	Alter	Geschlecht	relevante Diagnosen	Therapie
MP1	75 J	f	Gonarthrose li.	KTEP li.
MP2	79 J	f	Gonarthrose li., Z.n. KTP rechts 10/03	KTEP li.
MP3	59 J	f	Gonarthrose re., Adipositas permagna	KTEP re.
MP4	56 J	f	Gonarthrose re.	KTEP re.
MP5	61 J	f	Valgusgonarthrose re.	KTEP re.
MP6	65 J	m	Gonarthrose li.	KTEP li.

**Tabelle 1:** Patientendaten

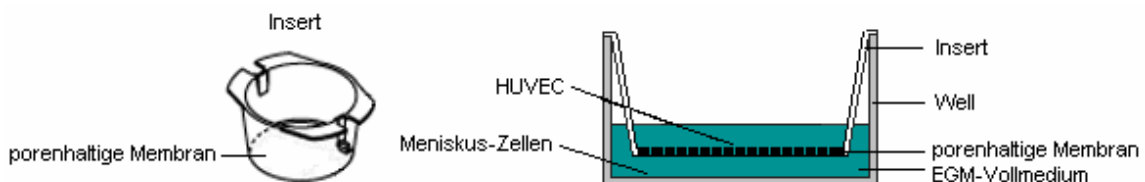
### 2.1.6 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Die für die Cokultur verwendeten HUVEC sind Zellen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen. Sie wurden bei der Firma Cambrex Bio Science, Walkersville/USA bestellt und auf Trockeneis gelagert verschickt. Ein Teil der Zellen wurde sofort nach Lieferung aufgetaut und verarbeitet, der restliche Teil für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert.

Da das Zellmedium der Meniskuszellen für Endothelzellen nicht geeignet ist, wurde bei Cambrex Bio Science zusätzlich ein speziell für Endothelzellen entwickeltes Medium, das sog. Endothelial Growth Medium (EGM), bestellt. Alle Versuche der Cokultur wurden in diesem Medium durchgeführt. In Vorversuchen wurde das Wachstumsverhalten der Meniskuszellen in diesem Medium getestet und kein Unterschied zur Proliferation in DMEM-F12-Vollmedium festgestellt.

### 2.1.7 Zellkultur-Inserts

Für die Cokultur wurden die HUVEC in sog. Cell-Culture-Inserts der Firma Falcon umgesiedelt. Diese Inserts sind runde Einsätze aus Polyethylen-Terephthalate (PET) mit einer porenhaltigen Membran an der Unterseite. Die verwendete Porengröße betrug  $1\mu\text{m}$ . Dies ist die optimale Größe um eine Migration von Zellen zu verhindern, aber eine ausreichende Stoffdiffusion zu erlauben.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung eines Inserts

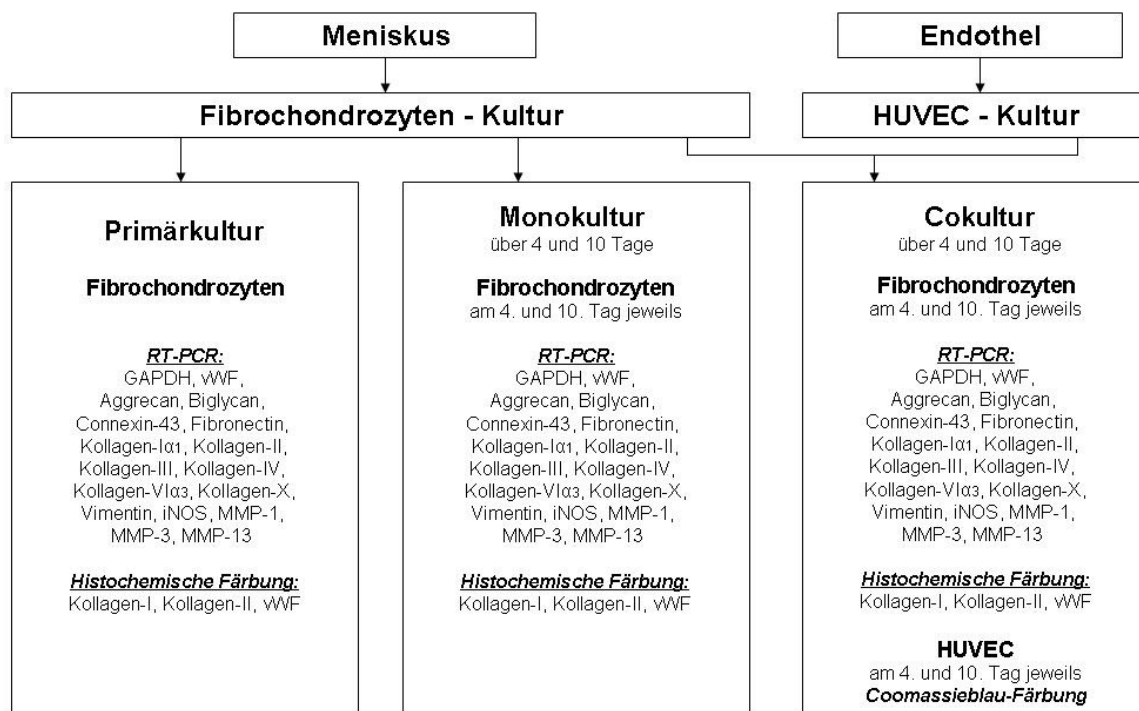
Die Inserts wurden in 6-Well-Platten eingebracht, in denen zuvor die Fibrochondrozyten ausgesiedelt worden waren. HUVEC und Fibrochondrozyten befanden sich somit in zwei voneinander getrennten Kompartimenten, standen

aber durch das Medium und die darin enthaltenen, von den Zellen produzierten Stoffen, miteinander in Kontakt.

Die PET-Membran an der Unterseite der Inserts ist durchsichtig und ermöglichte eine mikroskopische Beobachtung der unter der Membran liegenden Fibrochondrozyten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Studienaufbau



**Abbildung 7:** Flussdiagramm des Studienaufbaus

### 2.2.2 Zellkultur

#### 2.2.2.1 Sterile Arbeitsbedingungen

Sämtliche Arbeiten, die direkt oder indirekt mit der Zellkultur zu tun hatten, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu verhindern.

Dazu gehörte das Arbeiten in einer Sterilarbeitsbank, in der durch vorausgehende UV-Bestrahlung und desinfizierende Reinigung die Keimzahl reduziert und durch einen permanenten Luftstrom von 4m/s Staubpartikel und andere Verunreinigungen minimiert wurden. Diese Vorsichtsmaßnahmen

wurden durch sterile Arbeitsinstrumente und desinfizierte Einmalhandschuhe ergänzt. Sämtliche Chemikalien und Zusätze der Zellkultur wurden unter der Sterilbank geöffnet und verwendet, sowie gegebenenfalls zusätzlich sterilfiltriert.

#### **2.2.2.2 Herstellung des Mediums zur Fibrochondrozytenproliferation**

Für die primäre Anzucht der Fibrochondrozyten wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mix/F12 (DMEM-F12) als Grundmedium verwendet. Zur Fertigung des DMEM-F12-Vollmediums mussten zu den 500ml des Grundmediums 10ml Penicillin/Streptomycin, 50ml fötales Kälberserum (FCS), 6ml Fungizone (Amphotericin B), 12ml MEM Vitaminlösung und 0,5ml Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) hinzu gegeben werden.

Penicillin/Streptomycin, FCS, Fungizone und die Vitaminlösung waren stets bei -20°C gelagert und wurden erst unmittelbar vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. ITS, das Grundmedium, sowie das gebrauchsfertige Vollmedium lagerten bis zur Aufwärmung im Kühlschrank bei 4°C.

Das FCS wurde zusätzlich vor der Aufbewahrung bei -20°C 30min lang bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert, und anschließend mit 1g Aktivkohle versetzt und 1h auf dem Schüttler ausgeschüttelt. Nach der anschließenden Sterilfiltration war das FCS gebrauchsfertig.

#### **2.2.2.3 Herstellung des Mediums zur HUVEC-Proliferation und Cokultur**

Für die primäre Proliferation der HUVEC sowie für die späteren Versuche der Cokultur wurde das Endothelial Growth Medium (EGM) als Grundmedium verwendet. Zur Herstellung des EGM-Vollmediums wurden das EGM sowie sämtliche Zusätze im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zu den 500ml des Grundmediums wurden 10ml fötales Kälberserum (FCS), 0,5ml Gentamicin-Amphotericin B (GA-1000), 0,5ml Hydrocortison, 0,5ml rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (rhEGF) und 2ml Rinderhirn-Extrakt (BBE) hinzugefügt. Die Zusätze wurden alle bei -20°C gelagert, während EGM-Grund- und EGM-Vollmedium im Kühlschrank bei 4°C lagerten.

#### 2.2.2.4 Anlegen der humanen Meniskuszellkultur

Die intraoperativ entnommenen Menisken wurden zum Transport und bis zur Verarbeitung in steriler Kochsalzlösung und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Mit Hilfe zweier Skalpelle und einer Pinzette wurde der Meniskus in einer sterilen Petrischale geschält und zerkleinert. Das Schälen des Meniskus war notwendig, um einerseits meniskusfremdes Gewebe wie Fett und Synovia zu entfernen und um andererseits die eigenen Endothelzellen des im Randbereich gut vaskularisierten Meniskus in der Zellkultur möglichst gering zu halten.

Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Meniskus bis zu einer breiartigen Konsistenz zerkleinert und dadurch für den späteren Enzymverdau eine größere Oberfläche geschaffen. Um eine Austrocknung während des Zerkleinerungsvorgangs zu verhindern wurde gelegentlich Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline (DPBS) zugegeben.

Anschließend wurde der Gewebebrei einer zweimaligen Waschprozedur unterzogen. Dazu wurde er mit ausreichend DPBS in ein 50ml Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1500 Umdrehungen pro Minute (U/min) jeweils 7min lang zentrifugiert. Nach jedem Waschgang wurde der Überstand, bestehend aus DPBS, Fett- und Blutanteilen, abgesaugt.

Um die nicht erwünschte Interzellulärsubstanz zu entfernen, wurde der Gewebebrei mit 6ml 0,4% Kollagenaselösung versetzt und für 4h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit folgten wiederum zwei Waschschrirte, diesmal mit DMEM-F12 als Suspensionslösung, sonst aber unter den bereits genannten Bedingungen. Die überschüssige Kollagenase und das verdaute Material wurden hierbei entfernt.

Das Zellpellet konnte nun in DMEM-F12-Vollmedium suspendiert und in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt werden. Für eine Kulturflasche wurden 9ml Vollmedium und 5 ml der Zellsuspension verwendet. Pro Patient ergaben sich daraus, abhängig von der Größe des entnommenen Meniskus, 3-4 Zellkulturflaschen. Diese konnten nun bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre im Brutschrank inkubiert werden.

### 2.2.2.5 Anlegen der HUVEC - Kultur

Die verwendeten HUVEC wurden wie oben beschrieben bei der Firma Cambrex Bio Science bestellt, in flüssigem Stickstoff gelagert verschickt und bis zum Gebrauch ebenso gelagert.

Es handelte es sich hierbei um gepoolte Zellen und sie wurden demnach aus den Nabelschnurvenen verschiedener Neugeborener gewonnen und entsprechend charakterisiert.

Um die HUVEC-Kultur anzulegen, wurden die Zellen durch wiederholtes Umspülen mit EGM-Vollmedium aufgetaut. Im Medium gelöste Zellen wurden währenddessen vorsichtig in eine Pipette aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt bis sämtliche Zellen aufgetaut waren. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen mit zusätzlichem EGM-Vollmedium auf ein Gesamtvolumen von 14ml aufgefüllt. Nun konnten die HUVEC bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre im Brutschrank inkubiert werden.

### 2.2.2.6 Mediumwechsel der Primärkultur

Der erste Mediumwechsel wurde nach 5 Tagen durchgeführt, um eine ungehinderte Adhärenz möglichst vieler Zellen sicherzustellen.

Im weiteren Verlauf der Zellkultur wurde das Medium alle 3-4 Tage gewechselt. Dadurch konnten den Zellen konstante pH- und Nährbedingungen geboten werden.

Dem DMEM-F12-Vollmedium war außerdem ein pH-abhängiger Farbindikator beigemischt. So zeigte das Medium bei Verbrauch vieler Nährstoffe und somit sinkendem pH-Wert einen gelblichen Farbton und bei steigendem pH-Wert (z.B. durch verminderten CO<sub>2</sub>-Gehalt) einen violetten Farbton. Stellte sich eine derartige Verfärbung des Mediums ein wurde es umgehend durch frisches Medium ersetzt.

Beim Mediumwechsel wurde das alte Medium mithilfe einer Pasteurpipette und einer Absaugpumpe möglichst schonend abgesaugt, um die adhärennten Zellen nicht zu schädigen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 14ml neuem DMEM-



F12-Vollmedium pro Fibrochondrozyten-Kulturflasche und 14ml EGM-Vollmedium pro HUVEC-Flasche.

### 2.2.3 Zellernte

Damit die Fibrochondrozyten und die HUVEC für die RNA-Extraktion und für die Versuche der Cokultur zur Verfügung stehen konnten, mussten sie aus den Zellkulturflaschen beziehungsweise den 6-Well-Platten abgeerntet werden. Da für jeden Patienten mehrere Flaschen, bzw. pro Patient und Zeitpunkt jeweils zwei 6-Well-Platten angelegt worden waren, empfahl es sich alle Zellen eines Patienten bzw. eines Versuchsschrittes erst zu poolen und dann für die weiteren Bestimmungen (immunhistochemische Färbung, PCR, Cokultur-Versuche) aufzuteilen. Sinn des Poolens war es Auswirkungen eventueller Differenzen zwischen den Zellen der einzelnen Zellkulturflaschen bzw. Wells auf die Ergebnisse der Cokultur zu verhindern.

Die Zellernte der Kulturflaschen wurde bei Subkonfluenz vorgenommen, d.h. sobald die Zellen am Boden der Flasche ein fast vollständiges Monolayer ausgebildet hatten. Dies dauerte bei den Fibrochondrozyten-Kulturen je nach Patient zwischen 4-6 Wochen. Bei den HUVEC konnte die Ernte schon nach 10 Tagen erfolgen. Aus den 6-Well-Platten wurden die Fibrochondrozyten zum Zeitpunkt 1 (ZP1) nach 4 Tagen und zum Zeitpunkt 2 (ZP2) nach 10 Tagen abgeerntet (siehe Abbildung 7).

In einem ersten Schritt wurde das Vollmedium mithilfe von Pasteurpipette und Pumpe abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Hierdurch sollten vor allem Proteine herausgewaschen werden, die den nachfolgenden Ablösevorgang mittels Trypsin-Lösung erschwert hätten. Zum Ablösen wurden die Zellen mit 5ml Trypsin-Lösung bedeckt und für kurze Zeit im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Trypsin besitzt bei 37°C sein Temperaturoptimum und konnte somit optimal arbeiten. Zusätzlich wurde das Ablösen durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche aktiv unterstützt.

Der Erfolg des Ablösevorgangs ließ sich unter dem Lichtmikroskop beurteilen. Nach Ablösung möglichst aller Zellen vom Boden der Zellkulturflasche bzw. der

6-Well-Platte wurde sofort Vollmedium zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren und so eine Schädigung der Zellen zu verhindern.

Nun wurde die erhaltene Zellsuspension aus den Behältern eines Patienten bzw. eines Versuchschrilles in ein 50ml Röhrcben überführt und 4min lang bei 4°C und 1000U/min zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 40ml Vollmedium resuspendiert.

Bei dieser Resuspension wurden die Fibrochondrozyten, die für die primäre Proliferation in der Kulturflasche DMEM-F12-Vollmedium als Nährmedium hatten, in EGM-Vollmedium überführt. Für die Versuche der Cokultur musste für Fibrochondrozyten und HUVEC das gleiche Vollmedium verwendet werden, um Medien-spezifische Unterschiede auszuschließen. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die HUVEC nach Zugabe von DMEM-F12-Vollmedium absterben, Fibrochondrozyten in EGM-Vollmedium jedoch proliferierten und nicht dedifferenzieren. Die primäre Proliferation der Fibrochondrozyten fand aus Kostengründen ausschließlich in DMEM-F12-Vollmedium statt.

#### 2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Lichtmikroskopes bestimmt. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Trypanblau im Verhältnis Zellsuspension:Trypanblau = 1:1. Tote Zellen stellten sich in dieser Färbung dunkelblau dar, da das Trypanblau durch die defekte Zellmembranen ungehindert eindringen konnte.

Hierzu wurde ein Deckglas leicht befeuchtet und auf die Neubauer-Zählkammer aufgesetzt. Zeigten sich nun die so genannten Newton-Ringe, hatte das Deckglas die richtige Lage.

Die Zellsuspension wurde nach der Zugabe des Trypanblau und vor der Probenentnahme zur Zellzahlbestimmung gut durchmischt. Nun wurde jeweils ein Tropfen an beide Enden des Deckglases der Neubauer-Zählkammer pipettiert und durch dort herrschende Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der vier großen Eckquadrate. Nach Einsetzen des Ergebnisses  $n$  in die folgende Formel

$$Z = n/4 \cdot 10^4 \cdot 40 \text{ ml}$$

konnte die totale Zellzahl (Z) ermittelt werden.

## 2.2.5 Cokultur

### 2.2.5.1 Vorversuche

Um für die Cokultur die optimale Zellzahl an Fibrochondrozyten und HUVEC herauszufinden wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Die Fibrochondrozyten wurden hierfür in unterschiedlicher Anzahl von  $1 \cdot 10^3$ ,  $1 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^5$  Zellen in jeweils zwei Wells einer 6-Well-Platte ausgesiedelt. Gleichzeitig wurden auch die HUVEC in verschiedener Anzahl von  $1 \cdot 10^4$ ,  $2,5 \cdot 10^4$  und  $5 \cdot 10^4$  Zellen in jeweils zwei Inserts ausgesiedelt und anschließend in eine 6-Well-Platte, die pro Well mit 3ml EGM-Vollmedium befüllt war, eingehängt. Die beiden 6-Well-Platten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre über 10 Tage inkubiert, beobachtet und die Zelldichte der Fibrochondrozyten und HUVEC direkt nach Aussaat, nach 4 Tagen (ZP1) und nach 10 Tagen (ZP2), beurteilt.

Die Zelldichtenbestimmung erfolgte bei den Fibrochondrozyten unter dem Lichtmikroskop. Bei den HUVEC war dies nicht möglich, da sie auf der porenhaltigen Membran des Inserts, wahrscheinlich durch an den Poren entstehende Lichtreflexe, im Mikroskop nur sehr schlecht zu erkennen waren. Die HUVEC wurden deshalb für die Bestimmung der Zelldichte mittels Coomassieblau-Färbung angefärbt. Nach der Blaufärbung standen die HUVEC für die Cokultur nicht weiter zur Verfügung, was aber nicht von Bedeutung war, da zum Zeitpunkt der Färbung die Cokultur schon beendet war.

Die optimale Zelldichte wurde abhängig von zwei Kriterien bestimmt. Einerseits sollte es nach der Aussaat Zellkontakte zwischen den Zellen geben, damit die Zellen besser proliferieren können. Andererseits sollte aber frühestens nach 10 Tagen ein kompletter Zellrasen entstanden sein, damit die Zellen bis zum Abschluss der Cokultur die Möglichkeit haben auf Einflüsse der jeweils anderen Zellen zu reagieren.

### 2.2.5.2 Aussiedelung der Fibrochondrozyten

Die primär in Zellkulturflaschen proliferierten Fibrochondrozyten wurden für die Cokultur in 6-Well-Platten überführt. Pro Well wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen ausgesät. Durch Zellzahlbestimmung wurde die benötigte ml-Menge für jeden Patienten individuell berechnet und in die Wells überführt (nähere Angaben siehe Tabelle 2). Anschließend wurde mit EGM-Vollmedium auf ein Gesamtvolumen von 3ml pro Well aufgefüllt.

Die 6-Well-Platten wurden nun im Brutschrank für 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Dieser Schritt war notwendig um eine gewisse Adhärenz der Fibrochondrozyten zum Boden der Platte zu gewährleisten, da in Vorversuchen aufgefallen war, dass sich frei schwimmende Fibrochondrozyten bei Zugabe des Inserts unmittelbar nach Aussiedlung der Zellen durch die Membranporen drücken und auf der Insert-Membran ansiedeln können.

	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	HUVEC
ges. Zellzahl	$3,8 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^6$	$6,7 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^6$
Zellzahl / ml	$0,58 \cdot 10^5$	$1,11 \cdot 10^5$	$0,84 \cdot 10^5$	$1,53 \cdot 10^5$	$1,67 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^5$	$1,25 \cdot 10^5$
ml / Well	1,7	0,9	1,2	0,7	0,6	0,7	0,2

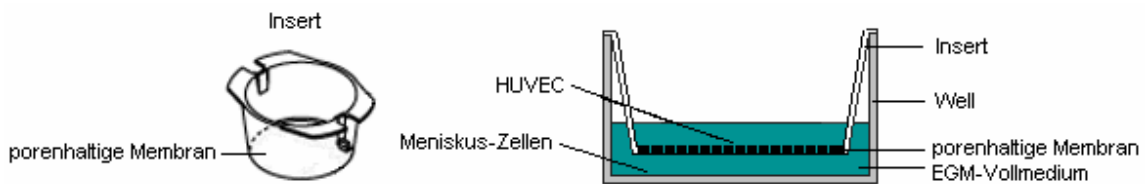
**Tabelle 2:** Zellzahl

### 2.2.5.3 Zugabe der Inserts und HUVEC

Die steril verpackten Inserts wurden unter der Sterilbank geöffnet und mit einer sterilen Pinzette in das Well überführt. In jedes Insert wurden  $2,5 \cdot 10^4$  HUVEC gegeben. Durch Zellzahlbestimmung wurde auch hier die benötigte Milliliter-Menge der Zellsuspension berechnet (siehe Tabelle 2) und in einem weiteren Schritt mit EGM-Vollmedium auf 2ml pro Insert aufgefüllt.

Pro Patient wurden zwei 6-Well-Platten mit Inserts angelegt. Eine 6-Well-Platte für die Zellernte nach 4 Tagen (ZP1) und eine weitere für die Zellernte nach 10 Tagen (ZP2).

Folgende Abbildung zeigt ein Insert sowie den Querschnitt eines Wells der fertigen Cokultur.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Cokultur

#### 2.2.5.4 Reine Fibrochondrozyten-Kultur als Kontrolle

Zur Beurteilung des Einflusses der HUVEC auf die Fibrochondrozyten wurde zusätzlich zur 6-Well-Platte der Cokultur eine Platte mit ausschließlich Fibrochondrozyten angelegt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden auch hier pro Patient zwei 6-Well-Platten für ZP1 und ZP2 mit  $1 \cdot 10^5$  Meniskuszellen pro Well verwendet und es herrschten während des gesamten Versuchszeitraumes die gleichen Bedingungen für Co- und Kontrollkultur.

#### 2.2.5.5 Fibrochondrozyten-Kultur für immunhistochemische Färbung

Drei weitere 6-Well-Platten jedes Patienten wurden für eine immunhistochemische Untersuchung zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 angelegt. Für diesen Schritt wurden die restlichen Fibrochondrozyten der Primärkultur verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Primärkultur-Gesamtzellzahl jedes Patienten (siehe Tabelle 2) variierte die Anzahl der verwendeten Zellen für jeden Patienten. Dies wurde in Anbetracht der morphologisch orientierten Betrachtung aber als nicht relevant gewertet.

#### 2.2.5.6 Mediumwechsel der Cokultur

Das Medium in den Wells der Cokultur, der Kontrollkultur und der Immunhistochemie wurde erstmals nach den 4 Tagen der Fibrochondrozyten-adhärenzzeit ausgetauscht. Nach Zugabe der HUVEC-Inserts wurde das

Medium nach weiteren 4 Tagen (ZP1) erneut gewechselt. Anschließend wurde das Medium bis zum ZP2 nicht mehr ersetzt.

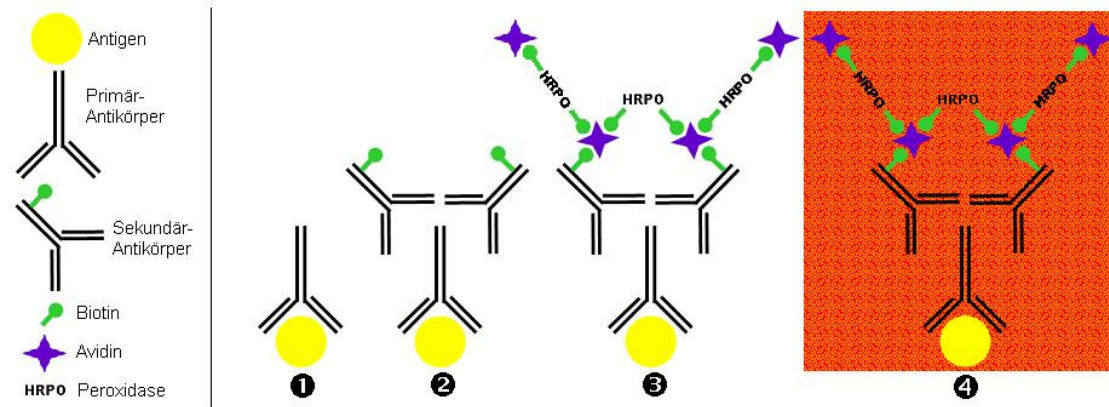
Beim jedem Mediumwechsel wurde das alte Medium mithilfe einer Pasteurpipette und einer Absaugpumpe möglichst schonend abgesaugt, um eine Schädigung der adhären Zellen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Zugabe von neuem EGM-Vollmedium in folgender Aufteilung: jeweils 3ml pro 6-Well und 2ml pro Zellkulturinsert.

## 2.2.6 Immunhistochemische Färbungen

Zum Nachweis der Fibrochondrozyten des Meniskus wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-II und von-Willebrand-Faktor (vWF) durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkultur mit unerwünschten Zelllinien wie zum Beispiel Makrophagen und Endothelzellen auszuschließen.

### 2.2.6.1 Prinzip

Die immunhistochemische Färbung dient der Sichtbarmachung eines spezifischen Antigens einer Zelle mit Hilfe zweier Antikörper (siehe Abbildung 9). Der Primär-Antikörper bindet dabei in einem ersten Schritt an das exprimierte Antigen der Zelle (❶). Um nun diese Antigen-Antikörper-Bindung sichtbar zu machen ist die Zugabe eines sekundären Antikörpers, der gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist, notwendig (❷). Der Sekundär-Antikörper ist, bei der verwendeten Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode), an Biotin gekoppelt. Nach Zugabe von Avidin und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (HRPO) kommt es zur Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes (❸). Die HRPO setzt nach Zugabe des Indikatorstoffes 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) einen rötlichen Farbstoff um (❹). Nach Entfernung des nicht gebundenen HRPO-konjugierten Avidin-Biotin-Sekundär-Antikörper-Komplexes können nun die Antigen-bildenden Zellen anhand der Färbung erkannt werden.



**Abbildung 9:** Prinzip der Immunhistochemie

### 2.2.6.2 Herstellung der Reagenzien:

PBS-Puffer:	1 PBS-Tablette (Invitrogen), 500ml H <sub>2</sub> O bidest.
0.1% Phenylhydrazin-Lösung:	0,01ml Phenylhydrazin, 10ml PBS-Puffer
1% BSA-Lösung:	0,5g bovines Albumin, 50ml PBS-Puffer
Sekundär-Antikörper-Lösung:	2,5ml PBS-Puffer, 1 Tropfen Normal-Blocking-Serum, 1 Tropfen biotinylierter Antikörper (Vectastain Universal Elite ABC-Kit)
ABC-Komplex-Lösung:	2,5ml PBS-Puffer, 1 Tropfen Lösung A, 1 Tropfen Lösung B (Vectastain Universal Elite ABC-Kit)
AEC-Chromogen-Lösung:	5ml H <sub>2</sub> O bidest., 2 Tropfen Pufferlösung (pH 5,3), 3 Tropfen AEC-Lösung, 2 Tropfen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Vectastain AEC-Substrate-Kit for Peroxidase)

### 2.2.6.3 Vorbereitung

Nach der Zellernte der Fibrochondrozyten-Primärkultur und Auszählung der Zellen wurden zunächst die benötigten Zellen für die Cokultur und Kontrollkultur ausgesiedelt. Die übrigen Zellen wurden für die Versuche der Immunhistochemie herangezogen und für die Zeitpunkte 0, 1 und 2 jeweils in eine 6-Well-Platte überführt. Die Färbung wurde für ZP0 nach Inkubation der

Zellen im Brutschrank über Nacht durchgeführt, um den Zellen eine Adhärenz und unter Umständen eine nochmalige Teilung zu ermöglichen. Die Zellen des ZP1 und ZP2 wurden an den entsprechenden Terminen, d.h. nach 4 und 10 Tagen gefärbt.

Als Erstes erfolgten nun zwei Waschschritte mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer), um angefallene Stoffwechsel- und Abfallprodukte zu entfernen. Dafür wurde in beiden Schritten zunächst das Vollmedium abgesaugt, 1ml PBS-Puffer in jedes Well pipettiert und die Platte für 2min mit Hilfe eines Schüttlers geschwenkt und der Überstand anschließend abgesaugt. Nach einer kurzen Luftrocknungszeit konnten die Zellen mit 100% Ethanol für 10min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert werden. Nach Absaugung des Ethanols und Waschung mit PBS-Puffer wurde im folgenden Schritt 0,1% Phenylhydrazin-Lösung zur Inaktivierung endogener Peroxidasen bei Raumtemperatur hinzu gegeben und nach 30min wieder entfernt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1% bovine Serumalbumin-Lösung (BSA-Lösung), um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, welche ebenfalls ein falsch-positives Ergebnis hätten vortäuschen können. Nach einer Einwirkdauer von 1h wurde die Lösung abgesaugt.

#### **2.2.6.4 Zugabe der Antikörper**

Im nächsten Schritt wurden nun 0,5ml des jeweiligen Primär-Antikörpers auf die entsprechenden Wells verteilt und über Nacht bei einer Temperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert, wobei die niedrige Inkubationstemperatur für eine erhöhte Bindungsspezifität der Antigen-Antikörper-Bindung sorgte.

Die Antikörper waren zuvor alle im Verhältnis 1:100 mit 1% BSA-Lösung verdünnt worden.

Am nächsten Morgen wurde die Antikörper-Lösung abgesaugt und die Zellen einem dreimaligen Waschen mit PBS-Lösung für jeweils 5min unterzogen, um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde nach jedem einzelnen Waschgang entfernt.

Zur Kopplung des biotinylierten sekundären Antikörpers an das Fc-Teil des primären Antikörpers wurde die Sekundär-Antikörper-Lösung zugegeben und



für 1h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder dreimalig mit PBS-Lösung unter den oben genannten Bedingungen gewaschen, um nochmals ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde die Platte anschließend 30min lang bei 37°C mit der sog. ABC-Komplex-Lösung inkubiert. Der ABC-Komplex ist ein HRPO-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, welcher irreversibel an das Biotinmolekül des sekundären Antikörpers bindet. Vor der abschließenden Färbung erfolgte erneut eine zweimalige Waschung mit PBS-Puffer.

#### **2.2.6.5 Färbung**

Zur Färbung wurde die AEC-Chromogen-Lösung (Vector Laboratories) für 30 min zu den Zellen gegeben. Durch das Enzym Peroxidase wurde unter Zusatz des Elektronendonors Wasserstoffperoxid das Chromogen AEC zu einem roten Farbniederschlag ausgefällt. Dieses Reaktionsprodukt ist außerordentlich stabil und lagert sich in unmittelbarer Nähe des Antigens ab, so dass eine genaue lichtmikroskopische Zuordnung möglich ist.

Nun wurden die Zellen zum Abschluss jeweils 5min mit PBS-Puffer und H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen und die Ergebnisse mit einem Lichtmikroskop und einer Digitalkamera dokumentiert.

#### **2.2.7 Coomassieblau-Färbung**

Die HUVEC wurden zur Bestimmung der Zelldichte im Rahmen der Cokultur mittels Coomassieblau-Färbung in den Zellkultur-Inserts angefärbt.

##### **2.2.7.1 Herstellung der Reagenzien**

Coomassie-Färbelösung: 50% Methanol, 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% Acet-Essig und 40% H<sub>2</sub>O bidest.

Waschlösung: 50% Methanol, 10% Acet-Essig und 40% H<sub>2</sub>O bidest.

### 2.2.7.2 Vorbereitung

In einem ersten Schritt wurden die Inserts aus den 6-Well-Platten der Cokultur entfernt und in eine sterile Petrischale gegeben. Anschließend wurden die HUVEC zwei Waschschritten mit PBS-Puffer unterzogen, um Stoffwechsel und Abfallprodukte zu entfernen. Dazu wurde zunächst das EGM-Vollmedium abgesaugt, 1ml PBS-Puffer in jedes Insert pipettiert und das ganze 1min lang geschwenkt. Der Überstand wurde schließlich entfernt und die Prozedur wiederholt.

Nach einer kurzen Lufttrocknungszeit konnten die Zellen mit je 1ml gekühltem 100% Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10min fixiert werden. Das Ethanol wurde anschließend abgesaugt. Es erfolgte ein weiterer Waschschriff mit PBS unter den oben genannten Bedingungen.

### 2.2.7.3 Färbung

Zur Färbung wurde in jedes Insert 1ml der Coomassie-Färbelösung pipettiert und konnte bei Raumtemperatur 5min lang einwirken. Im Folgenden wurden die Zellen einer zweimaligen Waschprozedur unterzogen, indem diese einmal 1min mit 1ml Waschlösung und einmal 5min mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf dem Schüttler gewaschen und der Überstand jeweils abgesaugt wurde. Ziel war es, den nicht in die Zellen eingedrungenen Farbstoff zu entfernen. Anschließend konnte man die gefärbten Zellen mikroskopieren und fotografieren.

## 2.2.8 RT-PCR

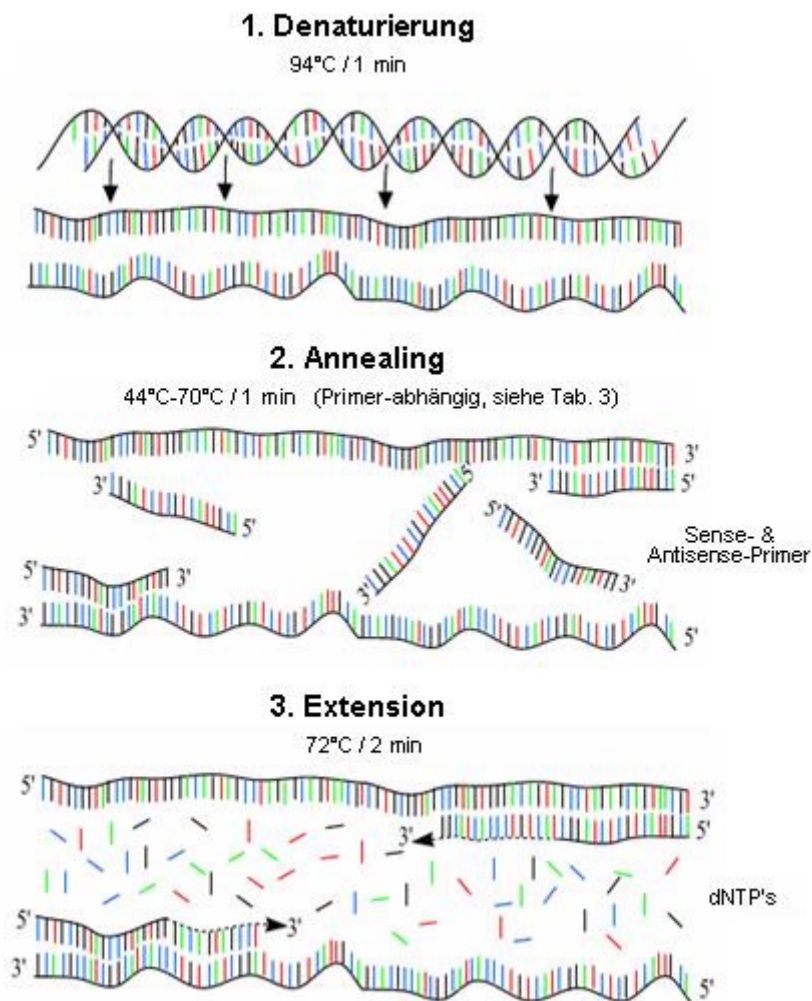
### 2.2.8.1 Allgemeines und Prinzip

Die in den 80er Jahren von K. Mullis entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur künstlichen Vervielfältigung von DNA durch wiederholte Verdoppelung in mehreren Zyklen mit Hilfe eines Enzyms namens DNA-Polymerase.

Heute wird die PCR eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Strangs zu vervielfältigen. Dabei kann es sich um ein Gen oder auch nur um einen Teil eines Gens handeln oder auch um nicht codierende DNA-Sequenzen.

Grundlegende Komponenten, die zur Durchführung benötigt werden, sind die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält, zwei Primer, um Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts festzulegen, eine DNA-Polymerase, um den festgelegten Abschnitt zu kopieren, Nukleotide, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang sind und Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen. Als DNA-Polymerase wird heute die thermostabile Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* verwendet.

Die Polymerase-Kettenreaktion findet in einem so genannten Thermocycler statt. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Um Verdunstung zu verhindern, wird ein beheizbarer Deckel auf den Reaktionsgefäßen benutzt.



**Abbildung 10:** Prinzip der DNA-Amplifikation

### 2.2.8.2 RNA-Extraktion

Zur Gewinnung der für die PCR benötigten Form der DNA musste die mRNA aus den Fibrochondrozyten, des bei der Zellernte erhaltenen Zellpellets, extrahiert bzw. isoliert werden.

Für die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy-Minikit 250 der Firma Qiagen gearbeitet.

Vor Beginn der eigentlichen Extraktion wurde 1ml des RLT-Puffers mit 10µl  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und der RPE-Puffer mit 100% Ethanol verdünnt. Ebenso musste zunächst die bei der Zellernte gewonnene Suspension bei 4°C und 1500U/min 10min lang zentrifugiert und der Mediumüberstand

anschließend verworfen werden. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und erneut 10min lang bei 4°C und 1500U/min zentrifugiert, der Überstand wurde ebenfalls verworfen.

Um die Zellen zu lysieren, wurde das Zellpellet mit 350µl RLT-Pufferlösung und 350µl 70% Ethanol versetzt und mit Hilfe einer Insulinspritze homogenisiert. Dies musste solange durchgeführt werden bis alle sichtbaren Zellklümpchen aufgelöst waren. Das gesamte Suspensionsvolumen wurde im nächsten Schritt auf das „Spin Column“ des Minikits aufgetragen und 15sek lang bei Raumtemperatur und 10000U/min zentrifugiert. Das „Spin Column“ ist eine aus Kieselerde bestehende Säule, die aufgrund von Ionenaustauschereffekten RNA bindet.

Es folgte ein Waschschrift durch Zugabe von 350µl RW1-Puffer und Zentrifugation der Säule bei Raumtemperatur und 10000 U/min für 15sek, das Eluat wurde verworfen. Nun wurden 10µl DNase Stocksolution und 70µl RDD-Puffer gemischt und exakt auf die Säulenmitte des Spin Column aufgetragen. Es folgte eine Inkubation unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur für 15min, um die nicht erwünschte DNA zu eliminieren. Danach wurde mit 350µl RW1-Puffer unter oben beschriebenen Bedingungen gewaschen und anschließend folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500µl RPE-Puffer, wobei nach der zweiten Zugabe des RPE-Puffers für 2min bei 20000U/min und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde verworfen und die Säule nochmals 15sek lang bei 20000U/min und Raumtemperatur zentrifugiert, um auch den letzten Rest Ethanol aus der Matrix des Spin Columns zu entfernen.

In einem letzten Schritt konnte nun die RNA eluiert werden. Dazu wurde die Säule in ein steriles Eppendorf-Cup eingesetzt und 40µl RNase-freies H<sub>2</sub>O bidest. aufgetragen. Nach 1min Zentrifugation bei 10000U/min und Raumtemperatur befand sich die RNA-H<sub>2</sub>O-Suspension im Eppendorf-Cup. Dieses wurde sofort auf Eis gestellt und bis zur Umschreibung in cDNA maximal 3h bei -20°C gelagert.

### 2.2.8.3 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit dem Photometer V530 der Firma Jasco. Dazu wurden 4µl RNA mit 196µl Ampuwa-Wasser versetzt (Verdünnung 1:50) und die Extinktion E gegen das Ampuwa-Wasser bei 260nm und 280nm mit Hilfe einer Software der Firma Jasco gemessen. Die Extinktion ist hierbei proportional zur Menge der RNA und beschreibt die Absorption des Lichtes durch die RNA bei verschiedenen Wellenlängen. Da die RNA bei 260nm ein Extinktionsmaximum hat und Proteine bei 280nm absorbieren, ist dies die Wellenlänge der Wahl für die Quantifizierung von Nukleinsäuren.

Der Quotient  $E_{260nm} / E_{280nm}$  beschreibt dabei die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Nach dem Einsetzen der Extinktion  $E_{260nm}$  in die Formel

$$R = E_{260nm} \cdot \text{Verdünnung} \cdot \text{Extinktionskoeffizient} \cdot 0,04ml = E_{260nm} \cdot 50 \cdot 40 \cdot 0,04ml$$

konnte man die RNA-Menge (R) in µg berechnen.

### 2.2.8.4 cDNA-Synthese

Zur Durchführung der PCR war es erforderlich die gewonnene Einzelstrang-RNA in eine komplementäre Doppelstrang-DNA zu übersetzen.

Dazu wurde mit Reagenzien des RT-for-PCR-Kits der Firma Clontech gearbeitet. Sämtliche Reagenzien lagerten stets bei -20°C und wurden vor Gebrauch schonend auf Eis aufgetaut.

In einem sterilen 0.5ml Eppendorf-Cup wurden zunächst 25µl RNA mit 2µl Oligo(dT)<sub>18</sub>Primer gemischt und 2min lang bei 72°C inkubiert, um die RNA zu entfalten und die Anlagerung des Primers an den Poly-A-Schwanz der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde die Probe sofort wieder auf Eis gestellt und dadurch ein erneutes Zusammenziehen der RNA verhindert.

Für die eigentliche Komplementierung der cDNA wurden der Probe 8µl eines Reaktionspuffers, der für stabile pH-Verhältnisse sorgte, 2µl dNTP-Mix als Lieferant für die komplementären Basen, 2µl MMLV-Reverse-Transkriptase zur Katalysierung des Umschreibeprozesses und 1µl rekombinanter RNase-Inhibitor zum Schutz der RNA beigefügt. Die Mischung wurde daraufhin in den

PCR-Block gegeben und für 1h bei 42 °C inkubiert, um den Ablauf der Reversen Transkription optimal zu unterstützen. Für den Synthesestop sorgte eine abschließende vierminütige Phase bei 94 °C. Dem Endprodukt wurden nun noch 160µl H<sub>2</sub>O bidest. zugegeben und die fertige cDNA bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### 2.2.8.5 PCR

Für die RT-PCR wurden Reagenzien der Firma Roche Diagnostics GmbH-Mannheim verwendet, die stets bei -20 °C gelagert und erst kurz vor Gebrauch auf Eis aufgetaut und auch während des Gebrauchs auf Eis gelagert wurden.

Als Reaktionsgemisch wurden folgende Komponenten in ein steriles 0.5ml Eppendorf-Cup gegeben und mit 5µl cDNA sorgfältig gemischt und kurz abzentrifugiert: 26µl RNase-freies H<sub>2</sub>O bidest., 5µl 10xPCR-Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> für stabile pH-Verhältnisse, 9µl Magnesiumchlorid (25mM), um die Phosphatgruppen der cDNA außer Gefecht zu setzen, 1µl dNTP-Mix (10mM) als Basenlieferant für die Komplementierung, sowie je 1µl Sense- und Antisense-Primer zur Amplifizierung des gewünschten Gens. Als letztes wurden noch 2µl der sehr hitzeempfindlichen Taq-Polymerase zugefügt.

Der Eppendorf-Cup wurde nun in den auf 94 °C vorgewärmten PCR-Block gegeben (sog. Hot Start) und je nach zu amplifizierendem Gen das entsprechende Programm gestartet.

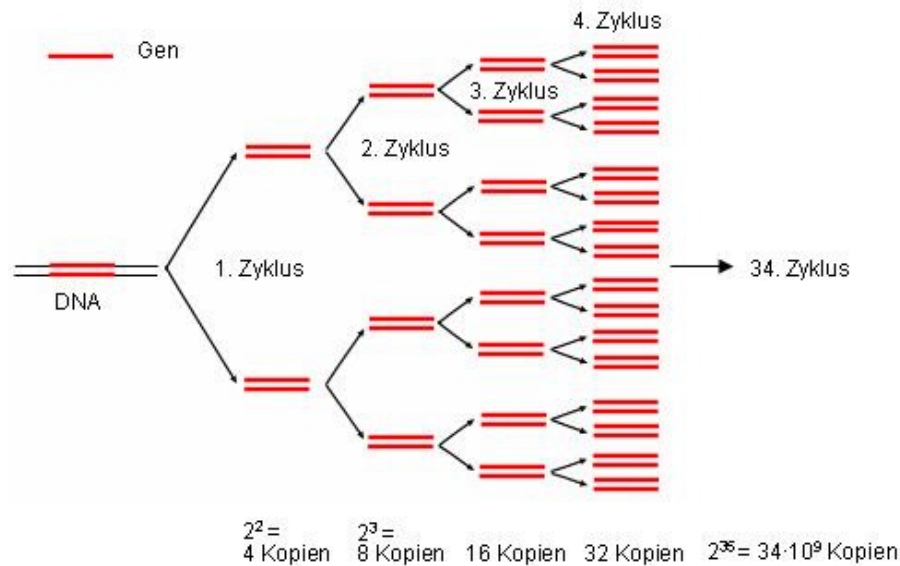
Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der verschiedenen Primer, für die in zahlreichen Vorversuchen optimale Annealing-Temperaturen und teilweise unterschiedliche MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen ermittelt wurden.

Gen	Länge [bp]	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen	Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> / MgCl <sub>2</sub> [μl]
GAPDH	983	94°C / 1min	60°C / 1min	72°C / 2min	34	5 / 9
vWF	176	94°C / 1min	56°C / 1min	72°C / 2min	34	6,5 / 7,5
Aggrecan	350	94°C / 1min	70°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
Biglycan	356	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
Connexin-43	710	94°C / 1min	68°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
Fibronectin	619	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	9 / 5
Kollagen-Iα <sub>1</sub>	466	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	9 / 5
Kollagen-II	414	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
Kollagen-III	449	94°C / 1min	44°C / 1min	72°C / 2min	34	5 / 9
Kollagen-IV	394	94°C / 1min	60°C / 1min	72°C / 2min	34	9 / 5
Kollagen-VIα <sub>3</sub>	781	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
Kollagen-X	340	94°C / 1min	68°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
Vimentin	272	94°C / 1min	60°C / 1min	72°C / 2min	34	5 / 9
iNOS	236	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	9 / 5
MMP-1	438	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
MMP-3	425	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5
MMP-13	390	94°C / 1min	64°C / 1min	72°C / 2min	34	7,5 / 6,5

**Tabelle 3:** PCR-Protokoll

Im Denaturierungsschritt der PCR wurden durch Erhöhung der Temperatur auf 94°C die Doppelstränge der cDNA voneinander getrennt, dadurch konnte sich im anschließenden Schritt nach rascher Abkühlung auf die jeweils optimale Annealing-Temperatur das Gen-spezifische Primerpaar an die cDNA anlagern. Die zugegebene Taq-Polymerase komplementierte im nachfolgenden Extensionsschritt bei 72°C die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang, so dass nun zwei identische Doppelstränge vorhanden waren. Diese drei Reaktionszyklen wurden insgesamt 34-mal durchlaufen und es ergab sich daraus eine exponentielle Zunahme der amplifizierten cDNA.



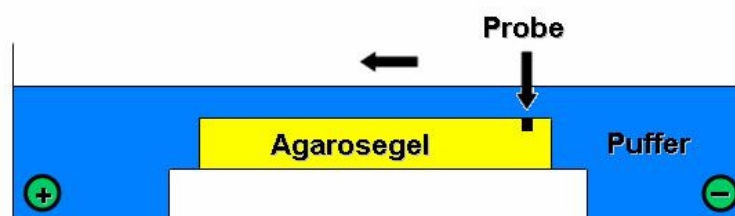


**Abbildung 11:** exponentielle cDNA-Amplifikation

### 2.2.8.6 Gelelektrophorese

Agarosegel:

Zur Herstellung von 1,5 % Agarosegel wurden 6g Agarose mit 400ml 1xTBE-Puffer in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben. Nach Zugabe eines Magnet-Rührfisches (Siedeverzug) wurde das Gemisch bei 360W in der Mikrowelle für 10min erhitzt. Anschließend wurden 30 $\mu$ l Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel mit Hilfe eines Magnetrührers auf 60°C abgekühlt. 150ml des Gels wurden nun in eine Gelkammer gegeben und nach vollständiger Polymerisierung mit 1xTBE-Puffer bedeckt.



**Abbildung 12:** Schema Elektrophoresekammer

Gelelektrophorese:

20µl jeweils eines PCR-Produktes wurden mit 5µl PCR-Ladepuffer gemischt und 20µl dieser Mischung in eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurde eine Tasche am linken Rand des Gels mit 10µl eines 100bp-DNA-Eichmarkers bestückt, um am Ende die Basenpaarlänge der einzelnen PCR-Produkte bestimmen zu können. Nun wurde eine Spannung von 60mV und eine Stromstärke von 40-60mA angelegt und die eigentliche Gelelektrophorese gestartet. Nach 30min waren die DNA-Stücke aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe voneinander getrennt und die Banden konnten mit Hilfe einer UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert werden.

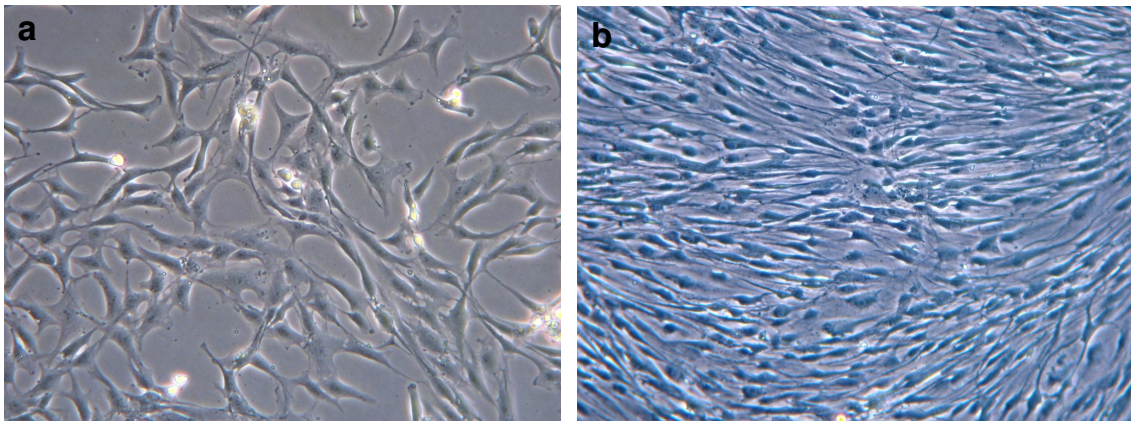
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Fibrochondrozyten

Es wurden Fibrochondrozyten-Kulturen von sechs Patienten (MP1 - MP6) angelegt und es dauerte je nach Inokulationsmenge zwischen 4-6 Wochen bis sich ein geschlossener Zellrasen gebildet hatte. Nach durchschnittlich 48,5 Tagen ( $s = 5,05$ ) wurden die Zellen geerntet.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft die Primärkultur von Meniskuspatient 5 (MP5) zu zwei Zeitpunkten.



**Abbildung 13:** *Fibrochondrozyten - Primärkultur MP5*

*a - nach 18 Tagen*

*b - nach 48 Tagen (ZP0 = Erntezeitpunkt der Primärkultur)*

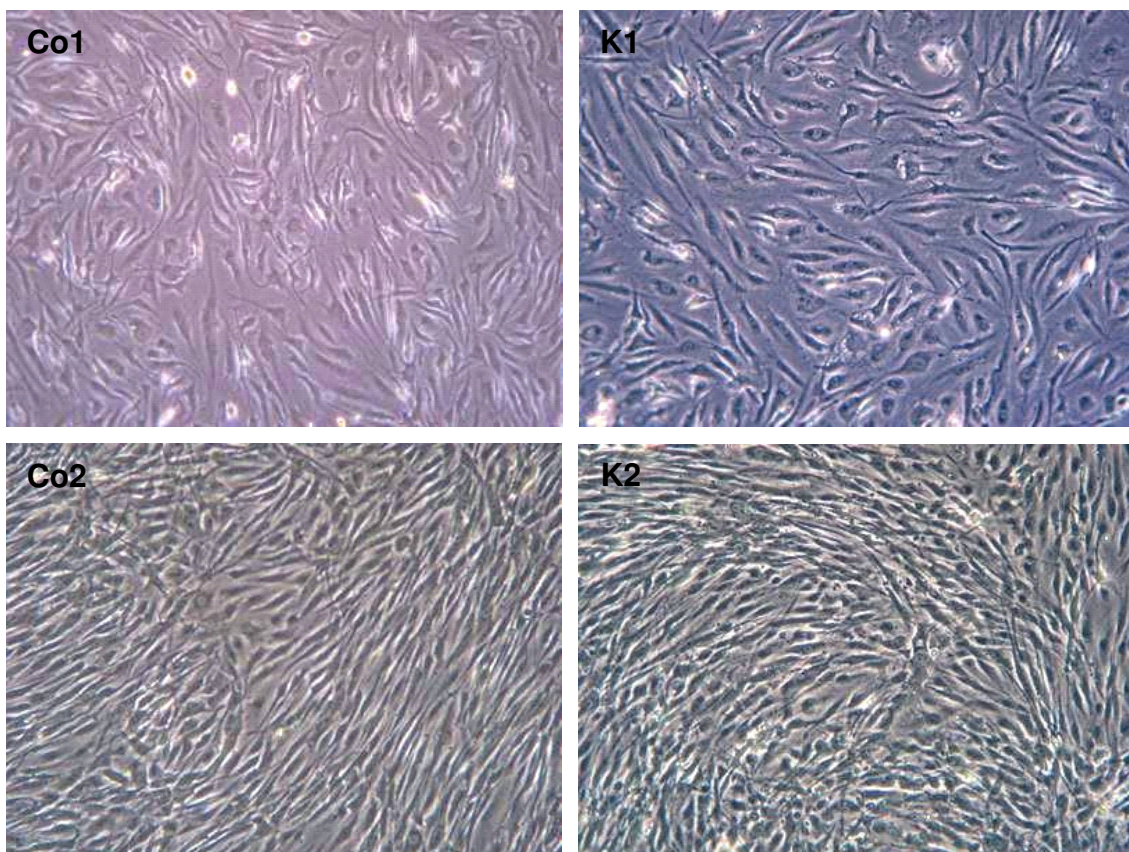
Die Fibrochondrozyten wurden auch während des gesamten Zeitraums der Co- bzw. Kontrollkultur mit Hilfe eines Lichtmikroskopes beobachtet, um Unterschiede in Morphologie, Zellzahl, Zelldichte und Proliferationsgeschwindigkeit zwischen den einzelnen Patienten und Zeitpunkten feststellen

zu können. Vor der Ernte wurden die Zellen erneut mit Hilfe einer am Mikroskop angebrachten Digitalkamera fotografiert.

Es ergab sich für alle Patienten ein ähnliches Bild und es konnten keine signifikanten Unterschiede in Morphologie, Zellzahl, Zelldichte und Proliferationsgeschwindigkeit beobachtet werden.

Zum ZP1 hatten sich sowohl die Zellen der Co- als auch der Kontrollkultur stark vermehrt, bildeten aber noch keinen geschlossenen Zellrasen. Dieser bildete sich in beiden Kulturen erst um den 9. - 10.Tag (ZP2).

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft sowohl die Co- als auch die Kontrollkultur des Patienten 3 zu ZP1 und ZP2.



**Abbildung 14:** Fibrochondrozyten MP3 Co- & Kontrollkultur

MP: Meniskus-Patient

ZP: Zeitpunkt

Co1: Cokultur ZP1

K1: Kontrollkultur ZP1

Co2: Cokultur ZP2

K2: Kontrollkultur ZP2

### 3.1.1.1 Zellzahl

Nach der genannten Primärkulturzeit wurden die Zellen geerntet und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, um die Zellen für die nachfolgenden Versuche quantitativ aufteilen zu können.

Patient	Gesamt-Zellzahl	Gewebekulturflaschen
MP1	$3,5 \cdot 10^6$	3
MP2	$4,4 \cdot 10^6$	3
MP3	$3,8 \cdot 10^6$	3
MP4	$6,1 \cdot 10^6$	4
MP5	$6,7 \cdot 10^6$	4
MP6	$5,4 \cdot 10^6$	3
Mittelwert $X = 5,0 \cdot 10^6$ , Standardabweichung $s = 1,3 \cdot 10^6$		

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Fibrochondrozyten - Zellzahl - Bestimmung  
MP: Meniskuspatient

Durchschnittlich wurden  $5,0 \cdot 10^6$  Zellen pro Patient gezählt, bei einer Standardabweichung von  $s = 1,3 \cdot 10^6$  Zellen/Patient.

Die Aufteilung der Zellen der Primärkultur erfolgte anhand des in Tabelle 5 dargestellten Schemas. Die Fibrochondrozyten der Co- und Kontrollkultur wurden am Ende des Versuchszeitraums geerntet und komplett zur RNA-Extraktion verwendet.

Patient	Cokultur ZP1 +ZP2	Kontrollkultur ZP1 + ZP2	PCR ZP0	IHC ZP0 + ZP1 + ZP2
MP1	pro Well $1 \cdot 10^5$ Zellen	pro Well $1 \cdot 10^5$ Zellen	jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen	je $3,3 \cdot 10^4$ Zellen
MP2				je $3,3 \cdot 10^5$ Zellen
MP3				je $1,3 \cdot 10^5$ Zellen
MP4				je $9,0 \cdot 10^5$ Zellen
MP5				je $1,1 \cdot 10^6$ Zellen
MP6				je $6,7 \cdot 10^5$ Zellen

**Tabelle 5:** Ergebnisse der Fibrochondrozyten - Aufteilung

MP: Meniskus-Patient

ZP: Zeitpunkt

ZP1: nach 4 Tagen

ZP0: Erntezeitpunkt der Primärkultur

ZP2: nach 10 Tagen

### 3.1.1.2 RNA-Quantifizierung

Nach der RNA-Extraktion aus den Fibrochondrozyten konnte die Menge und die Reinheit der RNA mit Hilfe eines UV-Spectrometers ermittelt werden.

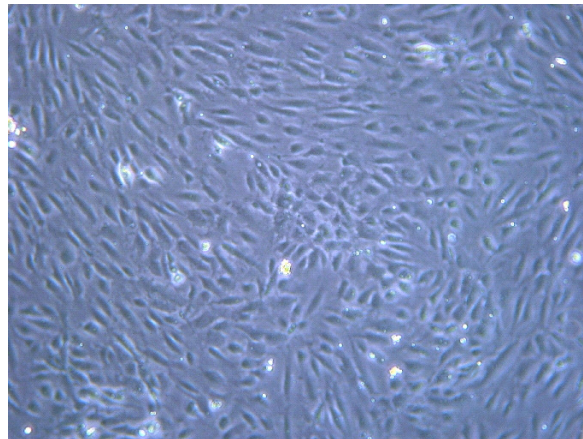
Die RNA-Menge (R) wurde durch Einsetzen der Extinktion (E) bei 260nm in die Formel  $R = E_{260nm} \cdot 40 \cdot 50 \cdot 0,04$  bestimmt.

Die Reinheit der RNA wurde aus dem Quotient  $E_{260nm} / E_{280nm}$  berechnet, wobei der Quotient einen Wert zwischen 1,5 und 2,0 einnehmen sollte.

Für die untersuchten Proben ergab sich eine durchschnittliche RNA-Menge von  $13,12\mu\text{g}$  und der Quotient  $E_{260nm} / E_{280nm}$  lag für alle Messungen zwischen 1,51 und 2,0.

### 3.1.2 HUVEC

Es wurde eine HUVEC-Gewebekulturflasche zur Durchführung der Versuche der Cokultur angelegt. Nach 10-tägiger Proliferation hatte sich ein geschlossener Zellrasen gebildet und die Zellen wurden geerntet.



**Abbildung 15:** HUVEC - Primärkultur

Im Lichtmikroskop zeigte sich ein kopfsteinpflasterartig angeordneter Zellrasen aus runden bis länglichen Endothelzellen.

#### 3.1.2.1 Zellzahl

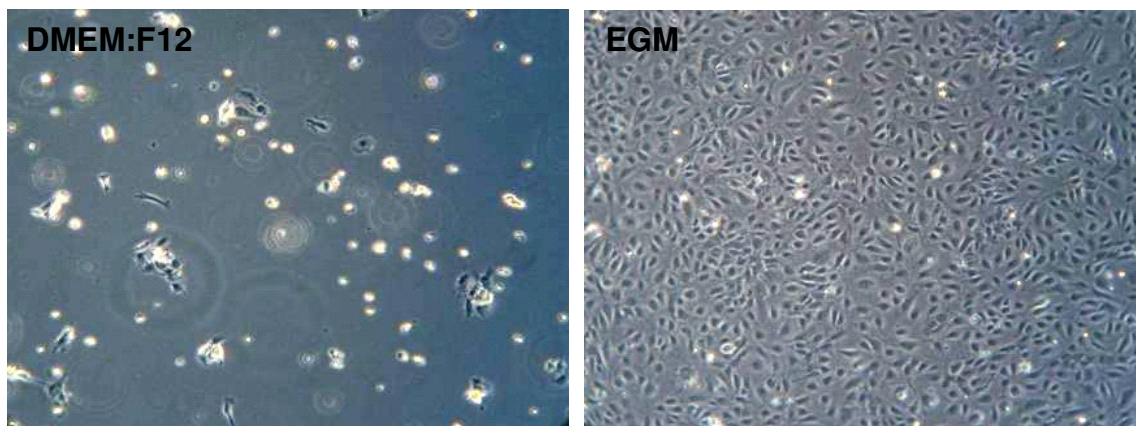
Die Zellzahl wurde wie auch bei den Fibrochondrozyten mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, um anschließend eine quantitative Aufteilung der HUVEC in die Inserts zu gewährleisten.

Gesamt-Zellzahl	Gewebekulturflasche	Zellmenge pro Insert
$5,3 \cdot 10^6$	1	$2,5 \cdot 10^4$

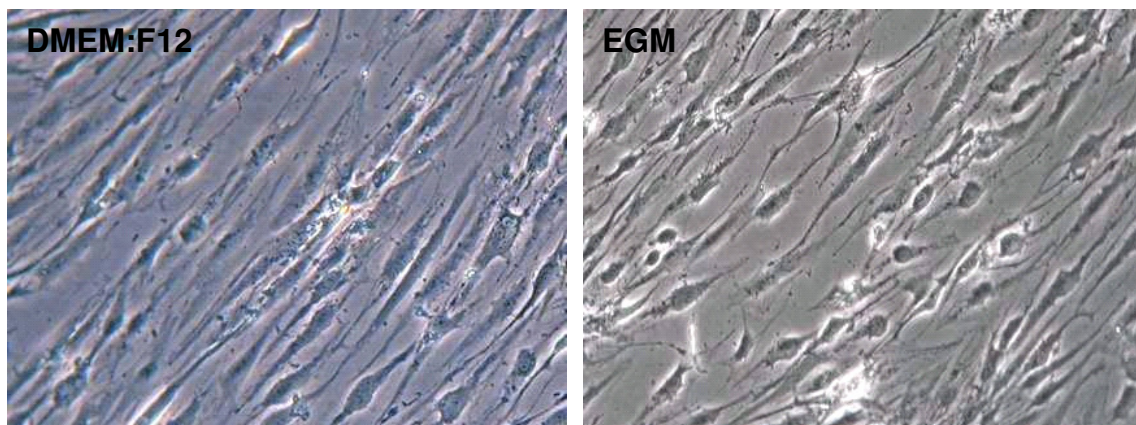
**Tabelle 6:** Ergebnisse HUVEC - Zellzahl - Bestimmung

### 3.1.3 Vorversuche HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokultur

Zur Auswahl des Mediums für die Versuche der Cokultur wurden Vorversuche mit DMEM:F12-Vollmedium und EGM-Vollmedium durchgeführt. Sowohl HUVEC als auch Fibrochondrozyten wurden für 10 Tage in beiden Medien kultiviert. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen nach 10-tägiger Proliferationszeit.



*Abbildung 16: HUVEC in DMEM:F12- und EGM-Vollmedium*



*Abbildung 17: Fibrochondrozyten in DMEM:F12- und EGM-Vollmedium*

HUVEC proliferieren nur in EGM-Vollmedium, in DMEM:F12-Vollmedium sterben sie nach einigen Tagen ab. Fibrochondrozyten hingegen wachsen sowohl in EGM- als auch in DMEM:F12-Vollmedium ohne Anhalt für Entdifferenzierung



## 3.2 Fibrochondrozyten - Untersuchungen

### 3.2.1 RT-PCR

Die Fibrochondrozyten wurden einer Gen-Expressionsanalyse für folgende Matrixproteine und Entzündungsmediatoren durch RT-PCR unterzogen:

- Matrixproteine:
  - Aggrecan
  - Biglycan
  - Connexin-43
  - Fibronectin
  - Kollagen-I, -II, -III, -IV, -VI, -X
  - Vimentin
- Entzündungsmediatoren:
  - induzierbare Stickoxid-Synthetase (iNOS)
  - Matrix-Metalloproteinase (MMP) 1, 3, 13

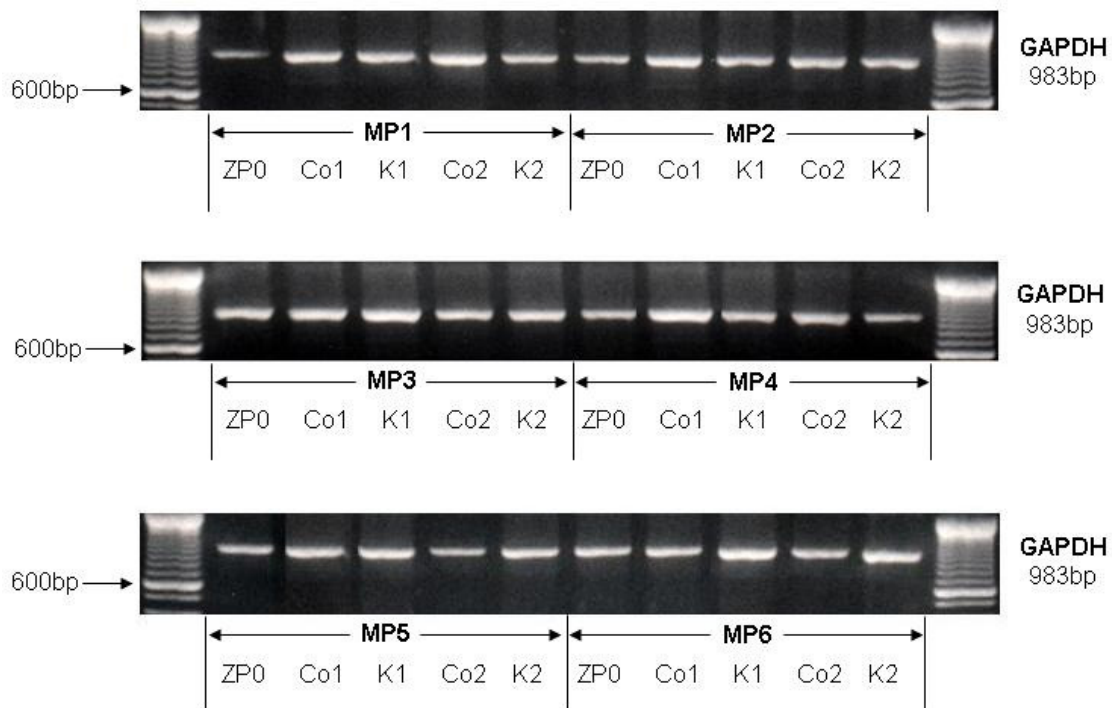
Die einzelnen Gene wurden jeweils zu ZP0, ZP1 und ZP2 sowohl in der Co- als auch in der Kontrollkultur untersucht.

Die Beschriftungsabkürzungen der folgenden Abbildungen und Tabellen lauten:

- negativ	MP: Meniskus-Patient
-/+ sehr schwach positiv	ZP0: Primärkultur
+ positiv	Co1: Cokultur ZP1      K1: Kontrollkultur ZP1
++ stark positiv	Co2: Cokultur ZP2      K2: Kontrollkultur ZP2

Zusätzlich wurde schon nach der RNA-Extraktion aus den Fibrochondrozyten und der Umschreibung in cDNA bei jeder Probe eine PCR für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Das GAPDH-Gen kommt in fast allen menschlichen Zellen vor und diente als Nachweis für eine erfolgreiche RNA-Extraktion sowie eine gelungene Umschreibung in cDNA.

Des Weiteren konnte aufgrund ähnlich stark ausgeprägter Banden bei allen Patienten und Untersuchungszeitpunkten darauf geschlossen werden, dass sich der RNA- bzw. cDNA-Gehalt der einzelnen Proben nicht wesentlich unterscheidet.

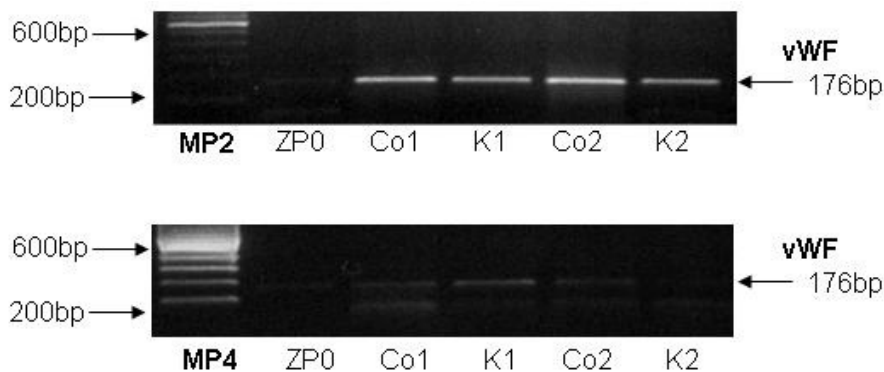


**Abbildung 18:** PCR-Bilder GAPDH

Als weiterer Faktor wurde in jeder Probe der von-Willebrand-Faktor (vWF) untersucht, da er ein spezifischer Endothelzell-Marker ist. Der vWF wird von den Endothelzellen gebildet, verbleibt dort überwiegend membrangebunden und wird nur zu einem geringen Teil ins Plasma sezerniert. Im Plasma fungiert er als Transport- und Schutzprotein des Faktors VIII der Blutgerinnung und als aggregierendes Brückenprotein (Klebeprotein) zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-/+	+	+	+	+
MP2	-/+	+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
MP5	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
MP6	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+

**Tabelle 7:** PCR-Ergebnisse von-Willebrand-Faktor (vWF)



**Abbildung 19:** PCR-Bild von-Willebrand-Faktor (vWF)

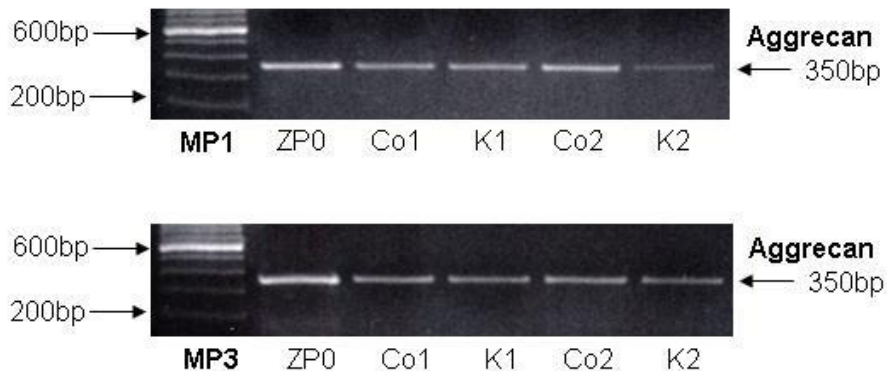
Der von-Willebrand-Faktor zeigte durchweg positive Banden mit inter-individuellen Expressionsunterschieden. Während MP1, MP2 und MP3 eindeutig positive Signale lieferten, wurde vWF von MP4, MP5 und MP6 nur schwach exprimiert.

### 3.2.1.1.1 Matrixproteine

Im Folgenden sind die Ergebnisse der RT-PCR der Matrixproteine dargestellt. Eine Tabelle gibt die gesamten Ergebnisse jedes einzelnen Faktors wieder, während die anschließend folgende Abbildung jeweils beispielhaft die Ergebnisse von zwei der sechs Meniskuspatienten (MP) zeigt.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	+	+	+	+
MP2	+	+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	+	+	+	+	+
MP5	+	+	+	+	+
MP6	+	+	+	+	+

**Tabelle 8:** PCR-Ergebnisse Aggrecan

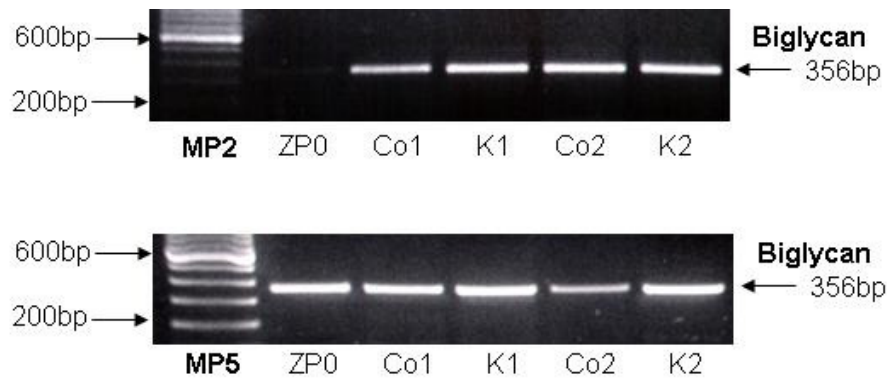


**Abbildung 20:** PCR-Bild Aggrecan

Die Ausprägung der Banden für Aggrecan war für alle untersuchten Proben annähernd gleichmäßig vorhanden. Es war kein Unterschied zwischen den Proben der Co- und Kontrollkultur zu erkennen.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-/+	++	++	++	++
MP2	-/+	++	++	++	++
MP3	-/+	++	++	++	++
MP4	+	++	++	-	++
MP5	++	++	++	++	++
MP6	+	++	++	+	++

**Tabelle 9:** PCR-Ergebnisse Biglycan



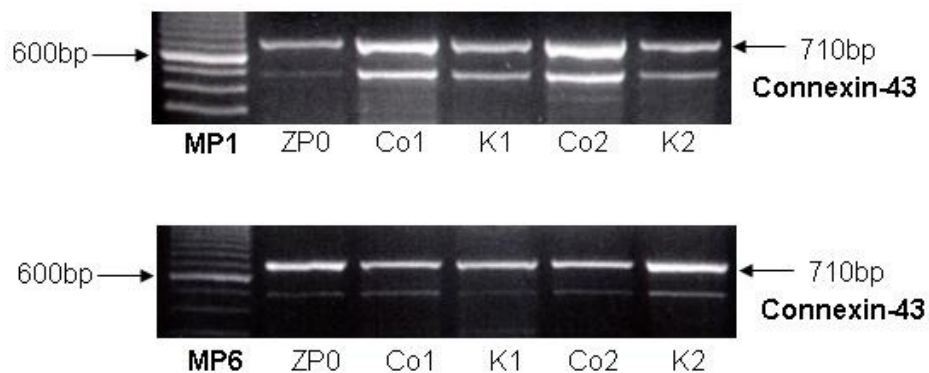
**Abbildung 21:** PCR-Bild Biglycan

Für das Proteoglykan Biglycan war außer bei MP5 zu den ZP1 und ZP2 eine Zunahme der Bandenstärke gegenüber der Bandenintensität zu ZP0 (Primärkultur) erkennbar, nur bei MP4 war in der Probe der Cokultur zu ZP2 kein Biglycan nachweisbar und MP5 hatte durchgehend gleichmäßige Banden. Ein Unterschied zwischen den Proben der Co- und Kontrollkultur war nicht festzustellen.

Die Primärkultur (ZP0) wurde in DMEM:F12-Vollmedium kultiviert, während Co- und Kontrollkultur in EGM-Vollmedium proliferierten.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	++	+	++	+
MP2	-/+	+	+	++	+
MP3	+	++	+	+	+
MP4	+	+	+	+	+
MP5	+	+	+	+	+
MP6	+	+	+	+	+

**Tabelle 10:** PCR-Ergebnisse Connexin-43



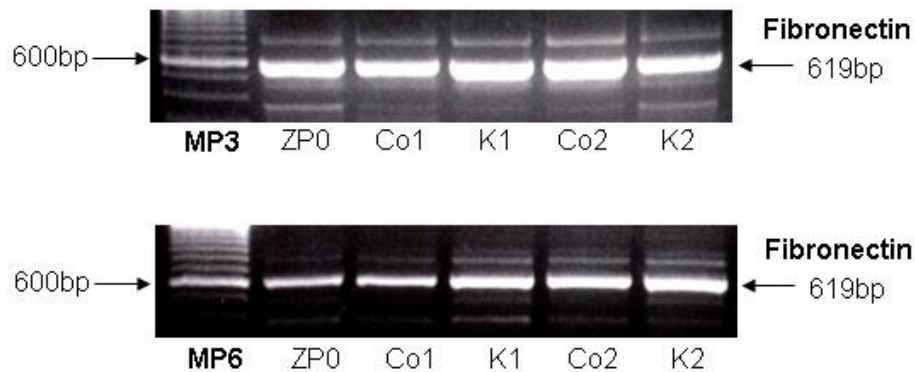
**Abbildung 22:** PCR-Bild Connexin-43

Bei PCR des Gap-Junction-Proteins Connexin-43 konnte trotz intensiver Optimierungsversuche zusätzlich zur Bande bei 710bp eine zweite Bande (bei ca. 500bp) nicht eliminiert werden. Das verwendete Primerpaar hatte aber auch bei Untersuchungen von VILLARS ET AL. eine zweite Bande gezeigt [109].

Die 710bp-Bande zeigte bei den Patienten MP4, MP5 und MP6 eine gleichmäßige Ausprägung. Bei den Patienten MP1, MP2 und MP3 bestand zu den Zeitpunkten der Cokultur teilweise eine stärkere Bande, dies war jedoch nicht einheitlich der Fall.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	++	++	++	++	++
MP2	+	++	++	++	++
MP3	++	++	++	++	++
MP4	+	+	++	+	++
MP5	+	+	++	+	++
MP6	+	+	++	++	++

**Tabelle 11:** PCR-Ergebnisse Fibronectin



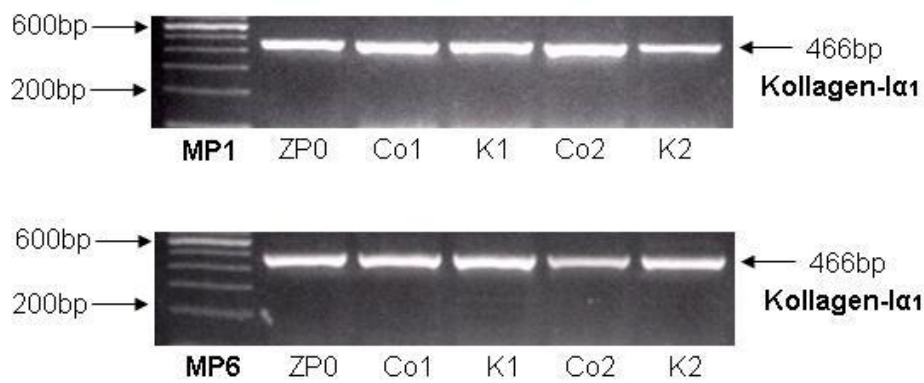
**Abbildung 23:** PCR-Bild Fibronectin

Auch bei der PCR des Adhäsionsglykoproteins Fibronectin konnte trotz zahlreicher Optimierungsversuche keine Eliminierung der zusätzlich sichtbaren Banden erreicht werden.

Für Fibronectin sind durchweg positive Ergebnisse mit interindividuellen Unterschieden zu erkennen. MP4, MP5 und MP6 zeigen ein verstärktes Signal zu den Zeitpunkten K1 und K2 und MP6 zusätzlich auch zum Zeitpunkt Co2. MP1 und MP3 exprimieren Fibronectin zu allen Zeitpunkten stark, während MP2 eine schwächere Expression zum ZP0 aufweist.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	++	++	++	++	+
MP2	+	++	++	++	++
MP3	++	++	++	++	++
MP4	++	++	++	++	++
MP5	++	++	++	++	++
MP6	++	++	++	++	++

**Tabelle 12:** PCR-Ergebnisse Kollagen-I $\alpha$ 1



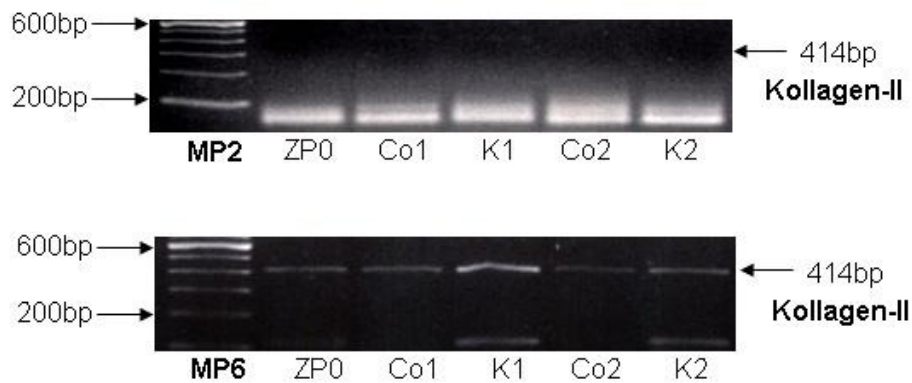
**Abbildung 24:** PCR-Bild Kollagen-I $\alpha$ 1

Das PCR-Signal für Kollagen-I war einheitlich positiv und es stellten sich stark ausgeprägte Banden bei 466bp dar. Eine schwächere Bandenintensität war lediglich bei MP1 zum ZP der zweiten Kontrollkultur und bei MP2 zu ZP0 festzustellen.



Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-	-	-	-	-
MP2	-	-	-	-	-
MP3	-	-	-/+	-	-
MP4	-	-/+	-/+	-	-/+
MP5	-/+	-/+	-/+	-	-/+
MP6	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+

**Tabelle 13:** PCR-Ergebnisse Kollagen-II

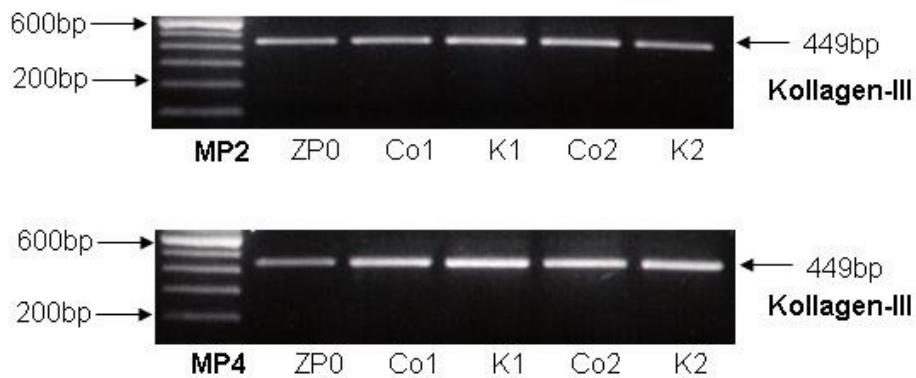


**Abbildung 25:** PCR-Bild Kollagen-II

Die Kollagen-II-Expression war im Gegensatz zur Kollagen-I-Expression für alle Patienten deutlich schwächer und zum Teil auch nicht nachweisbar. Auch hier war kein Unterschied in der Ausprägung der Banden zwischen den HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen und den Fibrochondrozyten-Monokulturen zu erkennen.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	+	+	+	+
MP2	+	+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	+	+	+	+	+
MP5	+	+	+	+	+
MP6	+	+	+	+	+

**Tabelle 14:** PCR-Ergebnisse Kollagen-III

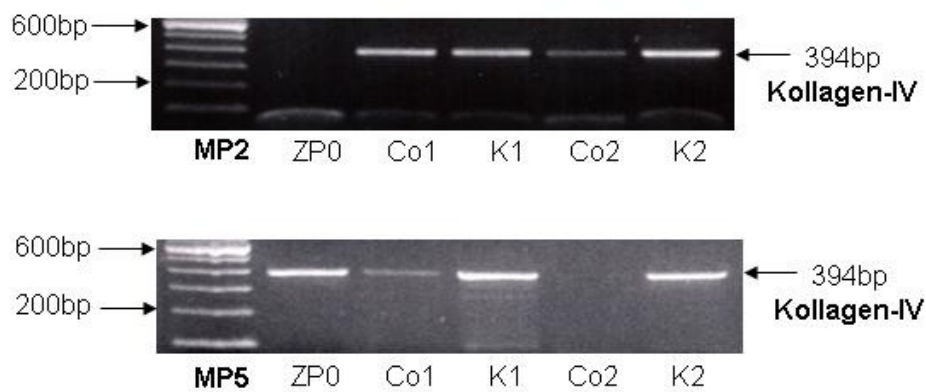


**Abbildung 26:** PCR-Bild Kollagen-III

Für Kollagen-III waren gleich starke Banden für alle Patienten und Zeitpunkte erkennbar. Ein Unterschied zwischen den Fibrochondrozyten der Co- bzw. Kontrollkultur war nicht zu beobachten.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-	-	+	+	+
MP2	-	+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	+	-/+	+	-	+
MP5	+	-/+	+	-	+
MP6	+	+	+	-/+	+

**Tabelle 15:** PCR-Ergebnisse Kollagen-IV

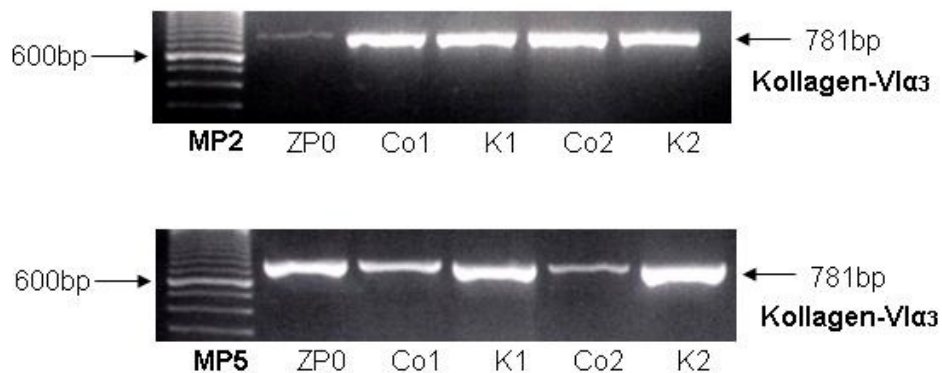


**Abbildung 27:** PCR-Bild Kollagen-IV

In der Fibrochondrozyten-cDNA waren für die Kollagen-IV-Expression interindividuelle Unterschiede festzustellen. MP3 hatte als einziger Patient durchgehend positive Banden, während bei den anderen Patienten bei bis zu zwei Zeitpunkten der Cokultur nur eine schwache bis gar keine Bande erkennbar war. Die Fibrochondrozyten der Kontrollkultur lieferten ein einheitlich positives Kollagen-IV-Signal.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	+	+	+	+
MP2	+	++	++	++	++
MP3	+	+	+	+	+
MP4	+	+	++	+	++
MP5	++	+	++	+	++
MP6	++	+	+	+	++

**Tabelle 16:** PCR-Ergebnisse Kollagen-VI $\alpha$ 3

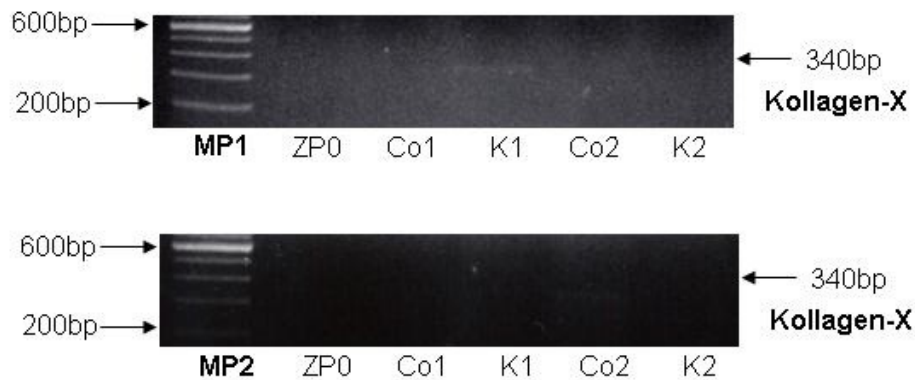


**Abbildung 28:** PCR-Bild Kollagen-VI $\alpha$ 3

Ein Signal für das Zell-Matrix bildende Kollagen-VI war bei allen Patienten zu allen Zeitpunkten erkennbar, in der Ausprägung der Bandenintensität zwischen den einzelnen Patienten gab es jedoch große Unterschiede. MP1 und MP3 hatten für alle Zeitpunkte gleichmäßig starke Signale, während bei MP2 eine Verstärkung des Signals für die Zeitpunkte 1 und 2 der Co- und Kontrollkultur erkennbar war. Für die Patienten MP4 und MP5 waren deutlich stärkere Banden in den Messungen der Proben der Kontrollkultur zu erkennen, wobei MP5 auch eine stärkere Bande zu ZP0 aufwies. Bei Patient MP6 zeigten sich für Kollagen-VI stärker ausgeprägte Banden zu ZP0 und ZP2 der Kontrollkultur.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-	-	-	-	-
MP2	-	-	-	-	-
MP3	-	-	-	-	-
MP4	-	-	-	-	-
MP5	-	-	-	-	-
MP6	-	-	-	-	-

**Tabelle 17:** PCR-Ergebnisse Kollagen-X

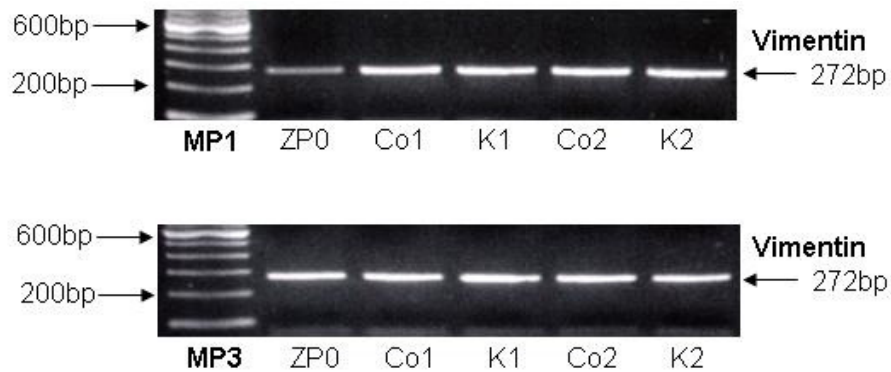


**Abbildung 29:** PCR-Bild Kollagen-X

Kollagen-X war in allen durchgeführten Untersuchungen bei keinem Patienten nachweisbar.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	+	+	+	+
MP2	+	+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	+	+	+	+	+
MP5	+	+	+	+	+
MP6	+	+	+	+	+

**Tabelle 18:** PCR-Ergebnisse Vimentin



**Abbildung 30:** PCR-Bild Vimentin

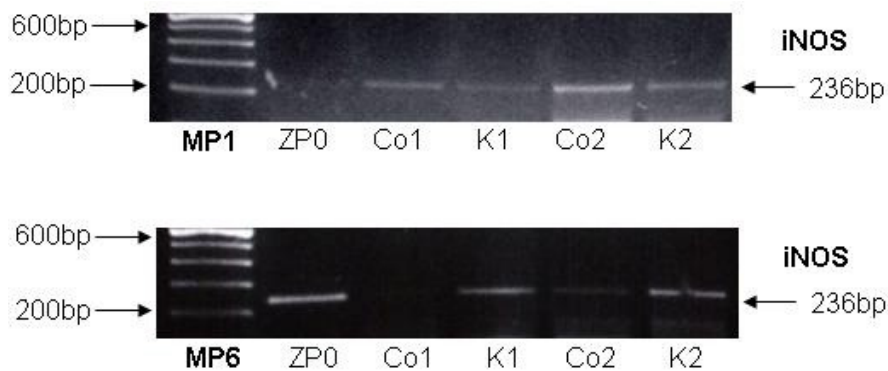
In allen Fibrochondrozyten-Kulturen konnte für das Zytoskelettprotein Vimentin eine Expression nachgewiesen werden. Die Bandenintensität war einheitlich stark ausgeprägt und es zeigte sich kein Unterschied zwischen den HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen und den Fibrochondrozyten-Monokulturen.

### 3.2.1.1.2 Entzündungsmediatoren

Im Folgenden sind die Ergebnisse der RT-PCR der Entzündungsmediatoren dargestellt. Eine Tabelle gibt die gesamten Ergebnisse jedes einzelnen Faktors wieder, während die anschließend folgende Abbildung jeweils beispielhaft die Ergebnisse von zwei der sechs Meniskuspatienten (MP) wiedergibt.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-	+	-/+	+	+
MP2	-	-/+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	-/+	+	+	+	+
MP5	+	+	+	+	+
MP6	+	-	+	-/+	+

**Tabelle 19:** PCR-Ergebnisse iNOS

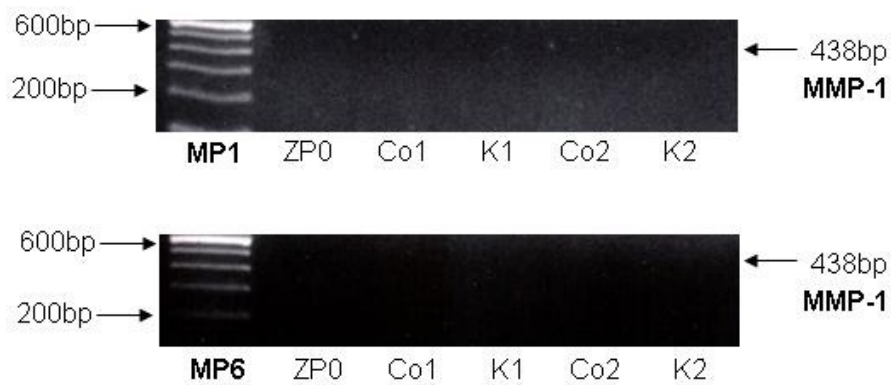


**Abbildung 31:** PCR-Bild iNOS

Das PCR-Signal für die induzierbare NO-Synthetase war nicht einheitlich und es zeigte sich zu einzelnen Zeitpunkten keine oder nur eine sehr schwache Expression. Im Großteil der Proben konnte aber ein positives iNOS-Signal nachgewiesen werden.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	-	-	-	-	-
MP2	-	-	-	-	-
MP3	-	-	-	-	-
MP4	-	-	-	-	-
MP5	-	-	-	-	-
MP6	-	-	-	-	-

**Tabelle 20:** PCR-Ergebnisse MMP-1



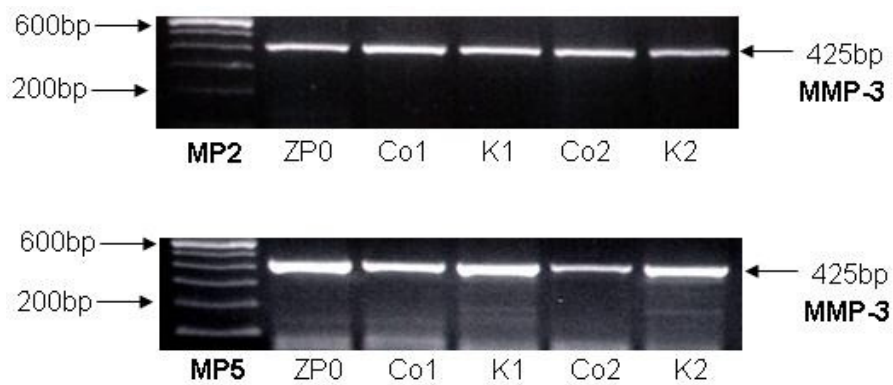
**Abbildung 32:** PCR-Bild MMP-1

Wie schon Kollagen-X war auch die Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) in allen durchgeführten Untersuchungen nicht nachzuweisen.



Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	+	+	+	+
MP2	+	+	+	+	+
MP3	++	++	++	+	+
MP4	+	+	+	+	+
MP5	++	++	++	+	++
MP6	+	+	+	+	+

**Tabelle 21:** PCR-Ergebnisse MMP-3

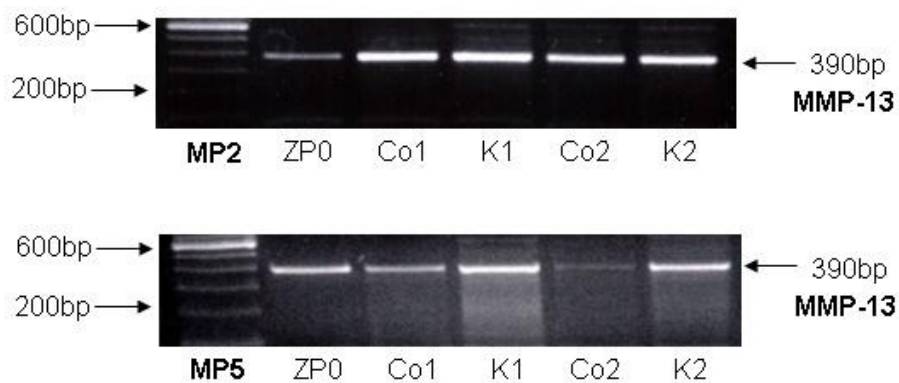


**Abbildung 33:** PCR-Bild MMP-3

Das PCR-Signal für MMP-3 war einheitlich positiv und es hatte gleichmäßig ausgeprägte Banden bei 425bp. Eine stärkere Bandenintensität war lediglich bei MP3 und MP5 zu einzelnen Zeitpunkten festzustellen. Ein Intensitätsunterschied zwischen den Proben der Co- und Kontrollkultur war nicht erkennbar.

Patient	ZP0	Co1	K1	Co2	K2
MP1	+	+	+	+	+
MP2	+	+	+	+	+
MP3	+	+	+	+	+
MP4	-/+	+	+	-/+	+
MP5	+	+	+	-/+	+
MP6	+	+	+	+	+

**Tabelle 22:** PCR-Ergebnisse MMP-13



**Abbildung 34:** PCR-Bild MMP-13

In allen Fibrochondrozyten-Kulturen konnte für die Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13) ein Signal erkannt werden. Die Bandenintensität war einheitlich positiv, wobei einzelne Proben allerdings nur eine sehr schwache Ausprägung hatten (MP4-ZP0, MP4-Co2 und MP5-Co2). Insgesamt war aber kein deutlicher Unterschied zwischen den HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen und den Fibrochondrozyten-Monokulturen zu erkennen.

### 3.2.2 Immunhistochemie

Zusätzlich zur Charakterisierung der Fibrochondrozyten auf der Transkriptionsebene mit RT-PCR, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt um vorhandene Translationsprodukte nachzuweisen. Hierzu wurden Antikörper gegen Kollagen-I, Kollagen-II und von-Willebrand-Faktor verwendet.

Als Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers 0,1% BSA-Lösung aufgetragen. Dadurch sollten unspezifische Färbereaktionen, die nicht durch die Antikörperbindung zustande kommen, ausgeschlossen werden.

Patient	ZP	Kollagen-I	Kollagen-II	vWF	Negativ-Kontrolle
MP1	ZP0	+	-	f+	-
	Co1	+	-	f+	-
	K1	+	-	f+	-
	Co2	+	-	f+	-
	K2	+	-	f+	-
MP2	ZP0	+	-	f+	-
	Co1	+	-	f+	-
	K1	+	-	f+	-
	Co2	+	-	f+	-
	K2	+	-	f+	-
MP3	ZP0	+	-	-	-
	Co1	+	-	f+	-
	K1	+	-	f+	-
	Co2	+	-	f+	-
	K2	+	-	f+	-
MP4	ZP0	+	-	f+	-
	Co1	+	-	f+	-
	K1	+	-	f+	-
	Co2	+	-	f+	-
	K2	+	-	f+	-
MP5	ZP0	+	-	f+	-
	Co1	+	-	-	-
	K1	+	-	f+	-

Patient	ZP	Kollagen-I	Kollagen-II	vWF	Negativ-Kontrolle
MP5	Co2	+	-	f+	-
	K2	+	-	f+	-
MP6	ZP0	+	-	f+	-
	Co1	+	-	f+	-
	K1	+	-	f+	-
	Co2	+	-	f+	-
	K2	+	-	f+	-

- negativ	MP: Meniskus-Patient
+ positiv	ZP0: Primärkultur
f+ falsch positiv	Co1: Cokultur ZP1      K1: Kontrollkultur ZP1
	Co2: Cokultur ZP2      K2: Kontrollkultur ZP2

**Tabelle 23:** Ergebnisse Immunhistochemie

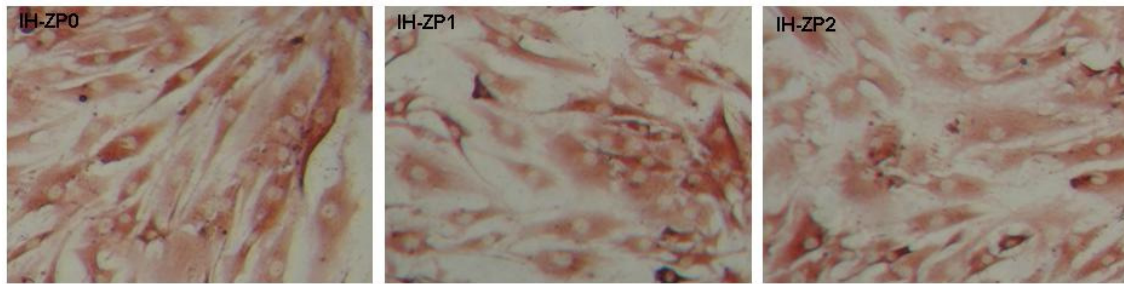
Bei den immunhistochemischen Färbungen aller drei Faktoren wurden weder zwischen den einzelnen Zeitpunkten noch zwischen Cokultur und Kontrolle wesentliche Unterschiede erkennbar. Auch zwischen den einzelnen Patienten konnten keine erheblichen Unterschiede festgestellt werden.

Für Kollagen-I ist einheitlich eine deutliche rötliche Färbung des Zytoplasmas und ungefärbte Zellkerne zu beobachten.

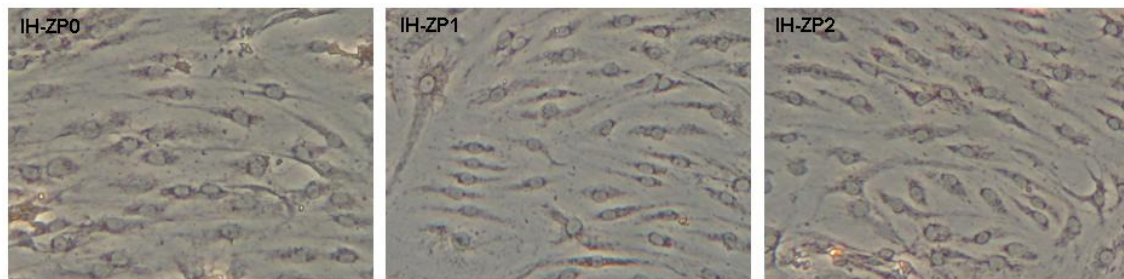
Kollagen-II hingegen färbte die Zellen nicht rot. Das Zytoplasma tritt aber durch eine leichte Dunkelfärbung hervor, während die Zellkerne ungefärbt bleiben. Da keine Rotfärbung zu erkennen ist, wird das Ergebnis als negativ gewertet.

Die Färbung des von-Willebrand-Faktors zeigt ein unspezifisches Färbeergebnis. Während bei einigen Zellen der Zellkern eine rötliche Färbung erkennbar ist, ist bei anderen Zellen eher das Zytoplasma rötlich gefärbt. Die meisten Zellen weisen allerdings gar keine Färbung auf. Dieses unspezifische Ergebnis ist wahrscheinlich durch Kreuzreaktivität des Antikörpers zu erklären und wurde daher als falsch positiv gewertet.

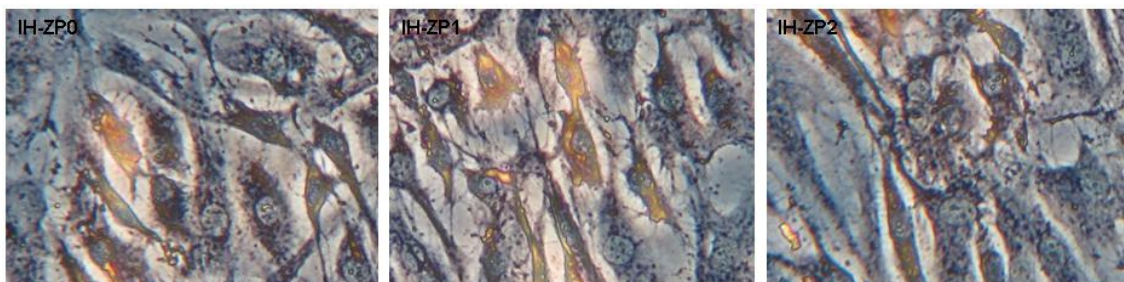
In der Negativkontrolle sind die Zellen nur schemenhaft zu erkennen und zeigen keine rötliche Färbung.



**Abbildung 35:** Immunhistochemie - Kollagen-I



**Abbildung 36:** Immunhistochemie - Kollagen-II



**Abbildung 37:** Immunhistochemie - von-Willebrand-Faktor (vWF)



**Abbildung 38:** Immunhistochemie - Negativ-Kontrolle

IH: Immunhistochemie

ZP0: Primärkultur

ZP1: nach 4 Tagen Cokultur

ZP2: nach 10 Tagen Cokultur

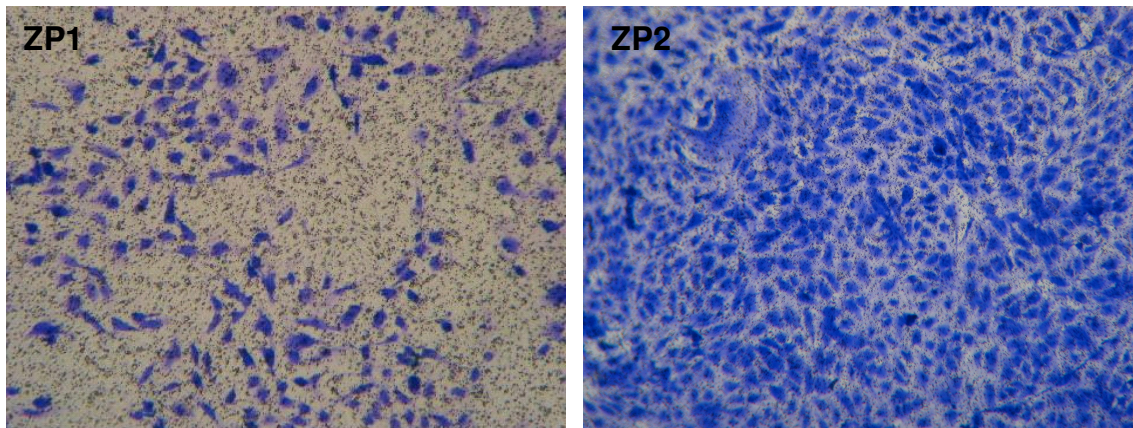
Während des gesamten Versuchszeitraums wurde das für Fibrochondrozyten typische Expressionsmuster nachgewiesen und somit konnten etwaige Entdifferenzierungen und Verunreinigungen ausgeschlossen werden.

### 3.3 HUVEC - Coomassieblau-Färbung

Die HUVEC wurden zur Kontrolle von Zellzahl, Zelldichte, Adhärenz zur Insert-Membran und stattfindenden Proliferationstendenzen mittels Coomassieblau-Färbung angefärbt, da sie auf der porenhaltigen Membran des Inserts, wahrscheinlich durch an den Poren entstehende Lichtreflexe im Mikroskop nur sehr schlecht zu erkennen waren. Weitere zytologische und immunologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

In Vorversuchen wurde durch Anfärbung die optimale Zellzahl von  $2,5 \cdot 10^4$  HUVEC für die Versuche der Cokultur ermittelt. Hierbei war wichtig, dass zum Zeitpunkt der HUVEC-Aussiedlung genügend Zellen vorhanden waren, um eine rasche Proliferation zu ermöglichen, es aber andererseits nur so viele Zellen waren, dass ein geschlossener Zellrasen erst nach 10 Tagen (ZP2) erreicht wurde.

Die HUVEC wurden in den durchgeführten Versuchen als Angiogenese- und Wachstumsstimulatoren eingesetzt und nur quantitativ untersucht. Nach Abschluss der Cokultur wurden sie direkt auf der Membran der Inserts mit Coomassieblau angefärbt, um etwaige Unterschiede in Morphologie, Zellzahl und Zelldichte zwischen den einzelnen Patienten und Zeitpunkten feststellen zu können. Es ergab sich jedoch für alle Patienten ein ähnliches Bild. Zum ZP2, nach 10 Tagen, hatten die Zellen auf der Membran annähernd ein HUVEC-Monolayer ausgebildet, während zum ZP1 (nach 4 Tagen) noch deutlich weniger Zellen vorhanden waren. Die HUVEC proliferierten demnach während den 10 Tagen der Cokultur deutlich.



**Abbildung 39:** HUVEC nach Färbung mit Coomassieblau zu ZP1 und ZP2; Cokultur mit MP4

MP: Meniskuspatient

ZP: Zeitpunkt

ZP1: nach 4 Tagen Cokultur

ZP2: nach 10 Tagen Cokultur

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Bedeutung von Endothelzellen für die Meniskusregeneration

In Anbetracht der Rolle der Menisken im menschlichen Kniegelenk und der Konsequenzen einer Meniskektomie ist die Entwicklung biologischer Maßnahmen zur Erhaltung des Meniskus von großer Bedeutung [71]. Dabei ist vor allem die nach einem Trauma fehlende Heilung in den avaskulären Zonen der Menisken seit Jahrzehnten von besonderem Interesse [7,58,97]. Eine Vielzahl an Naht- und Reparationstechniken wurde für Verletzungen in den inneren Meniskusbereichen entwickelt, jedoch führen diese nur bei Kommunikation mit dem peripheren Blutsystem auch zu einer stabilen Heilung [81]. Auch die Versuche, eine Einsprossung von kleinen Gefäßen in die Red-White- und die White-White-Zonen des Meniskus mit Synovialis- und Periosttransplantationen zu induzieren, brachten keine ausreichenden Heilungserfolge [8,42]. ARNOCZKY ET AL. und HENNING ET AL. demonstrierten eine Verbesserung der Heilungsrate durch Einbringen eines Fibrinkoagels in Meniskusrupturen der avaskulären Zone [9,43]. Mit Hilfe eines In-vitro-Modells zeigten WEBBER ET AL. jedoch, dass auch ein mit einem Fibrinkoagel gefüllter Defekt nur teilweise heilt [115].

Miller und Rydell schließen daraus, dass andere Faktoren als das Fibringerinnsel für eine effektive Heilung benötigt werden und betonen, dass zum vollen Verständnis des Prozesses der Meniskusregeneration, der relative Beitrag aller Zelltypen, einschließlich der mikrovaskulären Endothelzellen, untersucht werden muss [73].

In der vorliegenden Arbeit wird über die Wirkung von Endothelzellen (HUVEC) auf Meniskus-Fibrochondrozyten im Rahmen einer Cokultur berichtet. Die Untersuchungen beschränken sich hierbei auf einzelne Matrixfaktoren und Entzündungsmediatoren.



## 4.2 Methodik der Zellkultivierung

### 4.2.1 Fibrochondrozyten-Kultur

Die in dieser Arbeit angezüchteten Fibrochondrozyten stammen aus den Menisken von sechs Patienten mit fortgeschrittener Gonarthrose. Der Altersdurchschnitt der Patienten beträgt 65,8 Jahre.

Bei den Patienten MP1, MP2, MP3 und MP6 wurden die Zellen jeweils aus einem Meniskus gewonnen, während bei den Patienten MP4 und MP5 die Zellen sowohl aus dem Außen- als auch dem Innenmeniskus gewonnen wurden.

Die Meniskuszellen wurden nach durchschnittlich 48,5 Tagen aus den Kulturflaschen geerntet und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, um eine quantitative Aufteilung der Zellen für die folgenden Versuche zu gewährleisten.

Aufgrund der ähnlichen Größe der Menisken der Patienten MP1, MP2 und MP3 sowie der annähernd gleich langen Inkubationszeit der Zellen konnten bei der Zählung vergleichbare Zellzahlen ermittelt werden. Die erhöhte Zellzahl bei Patient MP6 ist durch den vergleichsweise großen Meniskus des männlichen Patienten zu erklären. Die größeren Zellzahlen der Patienten MP4 und MP5 sind hingegen durch die Verwendung von Außen- und Innenmeniskus zur Herstellung der Meniskuskultur zu begründen.

Insgesamt zeigte sich, dass die gewonnene Zellzahl pro Patient zur Durchführung der folgenden Versuche ausreichend war. Für die Versuche der Cokultur, Kontrollkultur und PCR wurden stets gleich große Zellzahlen verwendet, während die Anzahl der Zellen für die Immunhistochemie von der Gesamtzellzahl abhängig war und dadurch interindividuelle Unterschiede aufwies.

Als wichtiger Punkt bleibt zu bedenken, dass man die Inkubationszeit der Fibrochondrozyten-Primärkultur in den Kulturflaschen verkürzen sollte, um eine mögliche Entdifferenzierung der Zellen zu vermeiden. Da generell für die

Zellkultur gilt, dass die Gefahr der Zellentdifferenzierung mit wachsender Kulturzeit, insbesondere in Monolayer-Kulturen, ansteigt [99].

#### 4.2.2 HUVEC-Kultur

Die angezüchteten HUVEC proliferierten in EGM-Vollmedium und wurden nach 10 Tagen geerntet. Die Gesamtzellzahl von  $5,3 \cdot 10^6$  HUVEC war für die Aufteilung der Zellen in die Inserts der Cokultur ausreichend.

#### 4.2.3 HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokultur

Bei der HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokultur handelt es sich um ein in der Literatur noch nicht beschriebenes Verfahren. Dabei war es wichtig, dass HUVEC und Fibrochondrozyten in zwei durch eine Membran voneinander getrennten Kompartimenten ohne direkten Zell-Zell-Kontakt proliferierten, die Membranporen aber eine ungehinderte Stoffdiffusion ermöglichten und die Zellen auf diese Weise trotz des fehlenden Zell-Zell-Kontakts miteinander kommunizieren konnten. HUVEC und Fibrochondrozyten sollten keinen direkten Zell-Zell-Kontakt haben, da nur der Einfluss der von den HUVEC produzierten Stoffe auf die Fibrochondrozyten untersucht werden sollte und nicht die direkte Interaktion der Zellen. Durch Verwendung eines sog. Inserts konnten beide Eigenschaften miteinander verbunden werden. Das Insert wurde in ein Well einer Kulturplatte eingehängt und durch die, aus einer Membran bestehende, Insert-Unterseite entstanden zwei getrennte Kompartimente.

Bei der Durchführung stellten sich jedoch folgende Probleme: Welche Art von Inserts verwendet man? Welche Porengröße ist optimal? In welchem Medium proliferieren beide Zellarten?

Bei der Wahl der Inserts fiel die Entscheidung auf BD Falcon™ Cell-Culture-Inserts mit PET-Membran und einer Porengröße von  $1\mu\text{m}$ . Die transparente PET-Membran ermöglicht eine lichtmikroskopische Beobachtung der darunter liegenden Zellen und somit eine Beurteilung von Zellwachstum, -morphologie, -zahl und -dichte. Und eine Porengröße von  $1\mu\text{m}$  war optimal, um eine Zellmigration zu verhindern, aber eine ausreichende Stoffdiffusion zu erlauben.

Zur Auswahl des Mediums wurden Vorversuche mit DMEM:F12-Vollmedium und EGM-Vollmedium durchgeführt. Es zeigte sich, dass HUVEC in DMEM:F12-Vollmedium nicht proliferieren und nach einigen Tagen absterben. Meniskus-Zellen hingegen proliferierten in EGM-Medium gut und ohne Anhalt für Entdifferenzierung. Um mögliche Einflüsse des EGM-Mediums gegenüber den Einflüssen der HUVEC abzugrenzen, wurde zusätzlich zu jeder Cokultur eine Kontrollkultur mit ausschließlich Fibrochondrozyten in EGM-Medium durchgeführt.

### **4.3 Fibrochondrozyten - Untersuchungen**

#### **4.3.1 Vorkommen, Funktion und Veränderung der untersuchten Faktoren**

Man muss darauf hinweisen, dass die in dieser Arbeit angezüchteten Fibrochondrozyten aus den Menisken von Patienten mit fortgeschrittener Gonarthrose stammen und das Expressionsmuster wahrscheinlich schon zu Zeitpunkt 0 keinen Normalbefund darstellt. Es kann davon ausgegangen werden, dass einige der Matrixproteine und Entzündungsmediatoren durch die Arthrose vermehrt exprimiert werden. In verschiedenen Tiermodellen wurde bereits die Genexpression einiger Faktoren nach Meniskustrauma untersucht. Die Autoren beschrieben einen starken Anstieg der Expression der Kollagene-I, -II, -III und -VI, einen Anstieg von MMP-1, MMP-3 und MMP-13, Aggrecan, Biglycan, iNOS und eine erhöhte Chondrozytenapoptose [12,38,40,116]. Im Zuge der durchgeführten Untersuchungen wurde deshalb besonderes Augenmerk auf Veränderungen der Expressionsstärke in Co- und Kontrollkultur im Vergleich zur Primärkultur gelegt.

Aggrecan ist das Hauptproteoglykan des Meniskus [1,90,107]. Es bindet an Hyaluronsäure und bildet hochmolekulare Aggregate. Funktionell macht es das Meniskusgewebe widerstandsfähiger gegenüber Kompressionskräften und verleiht ihm Elastizität [23]. Das Kernprotein von Aggrecan wird durch viele Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sowie durch Aggrecanase-1 und -2

gespalten, wodurch es zu einem Funktionsverlust kommt [12,17]. Infolge von Trauma, Arthrose oder Immobilisation verändert sich die Aggrecan-Expression. MATYAS ET AL. beschreiben einen Anstieg der Aggrecan-Expression bei Arthrose, BLUTEAU ET AL. keine deutliche Veränderung des Expressionslevels und DJURASOVIC ET AL. beschreiben eine Abnahme der Expression als Antwort auf eine Gelenk-Immobilisation und eine verringerte Belastung innerhalb der Kniegelenkes [12,23,66].

In den durchgeführten Untersuchungen konnte in allen Primärkulturen Aggrecan-mRNA nachgewiesen werden und die Expressionsstärke zeigte im Zuge der Co- als auch der Kontrollkultur keine deutliche Veränderung. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die HUVEC der Cokultur keinen Einfluss auf die Aggrecan-Expression der Fibrochondrozyten haben.

Biglycan ist ein weiteres Proteoglykan des Meniskus, gehört aber wie auch Decorin zur Gruppe der kleinen Proteoglykane. Es ist an der Matrixorganisation und, zusammen mit Decorin, an Zell-Matrix-Interaktionen und der Bindung von Wachstumsfaktoren beteiligt und wird in verletztem Gewebe verstärkt exprimiert [15,41,46,55]. Im inneren Bereich des Meniskus ist es in enger Nachbarschaft zu Kollagen-Typ-II prädominant und seine Funktion wird im Zusammenhang mit den erhöhten Kompressionskräften in dieser Region gesehen [11,55,78,96].

Die Experimente zeigten eine verstärkte Biglycan-Expression in den Proben der in EGM-Vollmedium kultivierten Co- und Kontrollkultur und eine schwächere Expression in der in DMEM:F12-Vollmedium angezüchteten Primärkultur. Da die mRNA der Zellen der Co- und Kontrollkultur eine ähnlich starke Biglycan-Expression zeigte, ist davon auszugehen, dass nicht die HUVEC sondern das EGM-Medium für die verstärkte Expression verantwortlich ist.

Connexin-43 ist ein Gap-Junction-Protein, das im Meniskusaußenbereich vorkommt. Zellfortsätze der dort lokalisierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen nehmen über Gap-Junctions Kontakt zu benachbarten Zellen auf. Meniskuszellen aus der inneren, eher hyalin-ähnlichen Region zeigen hingegen keine Connexin-43-Expression [39]. Aufgrund der spezifischen Verteilung der Gap-

Junctions und der Zellausläufer im Meniskusgewebe, vermuten HELLIO LE GRAVERAND ET AL., dass diese Strukturen es den Zellen ermöglichen Zugkräften, im Gegensatz zu Kompressionskräften, zu widerstehen. Ebenso scheint das Vorhandensein von Zellen mit langen Ausläufern, die über Gap-Junctions Kontakt zu anderen Zellen aufnehmen, diesen Gewebeteil mit einem Zellmatrix-Interaktions-System zu versehen, welches es der Zelle ermöglicht seine Homöostase beizubehalten [39,69].

Connexin-43 konnte in den durchgeführten Untersuchungen stets nachgewiesen werden. Es war keine Zu- oder Abnahme der Connexin-43-mRNA in den Fibrochondrozyten-Monokulturen und nur eine teilweise Verstärkung in den HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen zu erkennen.

Lediglich 3 der 6 Patienten zeigten eine teilweise Verstärkung des Signals in den Proben der Cokultur. Da die RT-PCR aber nur eine rein qualitative Methode darstellt, können nur relative Aussagen zur mRNA-Menge gemacht werden und es sind weitere quantitative Untersuchungen (z.B. Light-Cycler-PCR) notwendig, um diese Beobachtung zu verifizieren.

Fibronectin gehört wie Kollagen-Typ-VI zu den extrazellulären Adhäsionsglykoproteinen des Meniskus. Es bindet an andere Matrixkomponenten, Fibrin und Zelloberflächenrezeptoren aus der Familie der Integrine und verankert Zellen an der extrazellulären Matrix. Im Meniskus ist es wahrscheinlich an Reparatur und Regeneration nach Verletzung beteiligt [70]. Im Knorpel kommt es infolge von Degeneration zu einer verstärkten Fibronectin-Expression und die Fibronectinfragmente erhöhen die katabole Aktivität der Chondrozyten [4,47,48].

In der Primärkultur war eine starke Fibronectin-Expression zu erkennen. Nach Umsiedlung der Zellen in EGM-Medium und auch nach Zugabe der Endothelzellen war keine eindeutige Signalverstärkung oder -abschwächung zu beobachten. Insgesamt war die Bandenstärke der Fibronectin-mRNA, möglicherweise infolge der Arthrose, sehr stark ausgeprägt.

Bei der Fibronectin-PCR konnten trotz zahlreicher Optimierungsversuche zusätzlich sichtbare Banden eliminiert werden. Es handelt sich dabei um

sog. ‚Splice-Varianten‘ des Fibronectin-Gens. HYNES zeigte 1986, dass es verschiedene gewebespezifische Fibronectine gibt, die alle von einem einzelnen Gen kodiert werden und durch alternatives ‚Splicing‘ entstehen [50].

Kollagen-I macht 90% des Gesamtkollagens aus und ist vorherrschendes Kollagen und Strukturprotein des Meniskus. Es kommt im gesamten Meniskus mit Prädominanz in den äußeren zwei Dritteln vor [26]. In geringen aber nachweisbaren Mengen sind auch Kollagen-Typ-II und Kollagen-Typ-III vorhanden [18,26], wobei das Kollagen-II-Vorkommen auf die inneren, nicht vaskularisierten Anteile beschränkt ist [18]. Nach einer Meniskusverletzung kommt es zu einem starken Anstieg von Kollagen-I-, Kollagen-II- und Kollagen-III-mRNA [116].

Die untersuchten Meniskuszellen zeigten durchgehend eine sehr starke Kollagen-I-Expression, eine schwächere für Kollagen-III und eine sehr schwache bis gar keine Expression für Kollagen-Typ-II, ohne Unterschiede zwischen Primär-, Co- und Kontrollkultur. Die Untersuchungen von NAKATA ET AL. hatten 2001 für diese Gene das gleiche, für Meniskuszellen typische Expressionsmuster, aufgezeigt [79].

Kollagen-Typ-IV wird von Endothelzellen produziert und bildet in der Basalmembran in Verbindung mit nicht-kollagenen Proteinen ein flächenhaft verzweigtes Netz [75].

Da Fibrochondrozyten und Fibroblasten-ähnliche Zellen kein Kollagen-IV exprimieren, zeigen die PCR-Ergebnisse die Kollagen-IV-Expression der mikrovaskulären Endothelzellen des Meniskus an. Hierbei zeigte sich eine schwach positive bis positive Kollagen-IV-Expression ohne Signalverstärkung in den Proben der Co-Kultur. Dies lässt vermuten, dass es in der Co-Kultur zu keiner erhöhten Endothelzell-Proliferation gekommen ist.

Kollagen-VI bildet nur ungefähr 2% des Meniskus-Trockengewichtes [117] und wird aufgrund seiner Struktur den Matrix- bzw. Adhäsionsglykoproteinen zugeordnet [70,72]. Es bindet an Rezeptoren von Meniskuszellen und

Chondrozyten und hat Affinitäten zu vielen Matrix-Makromolekülen, einschließlich Hyaluronsäure [65,67,68]. Die Genexpression und Proteinbildung von Typ6-Kollagen steigen bei Umbauvorgängen in vielen Bindegeweben einschließlich Faserknorpel an [116].

Die Kollagen-Typ-VI-Expression war in den Proben der durchgeführten Versuche stets positiv, zeigte aber interindividuelle Unterschiede. Es zeigte sich keine eindeutige Zu- oder Abnahme der Kollagen-VI-mRNA in den HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokulturen und nur eine teilweise Verstärkung in den Fibrochondrozyten-Monokulturen. Lediglich 4 der 6 Patienten zeigten eine teilweise Verstärkung des Signals in den Proben der Kontrollkultur. Wie bei Connexin-43 sind zur Verifizierung der Beobachtungen aber quantitativere Untersuchungen notwendig.

Kollagen-Typ-X ist ein nicht-fibrillen-formendes Kollagen, welches zunächst nur als Marker für hypertrophe Chondrozyten in der Wachstumsplatte bekannt war [56]. Genauere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es auch im normalen und arthrotisch veränderten Knorpel und Meniskus vorkommt [13,91,111]. Aber nach VON DER MARK ET AL. bedeuten Kollagen-X-exprimierende hypertrophe Chondrozyten in hyalinem Knorpel Degeneration [111].

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von BLUTEAU ET AL. konnte im vorliegenden Versuch keine Expression von Kollagen-X nachgewiesen werden [13]. ROBBINS ET AL. hatten 2000 bei Versuchen mit humanen Chondrozyten das gleiche Primerpaar verwendet und auch sie konnten keine Kollagen-X-Expression feststellen [89].

Vimentin ist ein Zytoskelett-Protein in Faserknorpelzellen. TISCHER ET AL. vermuten, dass Vimentin den Zellen ermöglicht Kompression zu widerstehen. Schon DURRANT ET AL. hatten in einer Studie gezeigt, dass sich die Vimentin-Expression infolge von hydrostatischer Belastung verändert [24,105].

Auch für Vimentin konnte in allen Proben mRNA nachgewiesen werden. Die Expressionsstärke zeigte keine deutliche Veränderung in Co- und Kontrollkultur

und es kann davon ausgegangen werden, dass die HUVEC keinen Einfluss auf die Vimentin-Expression der Fibrochondrozyten haben.

Die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) ist ein Entzündungsmediator und wirkt über die NO-Synthese auf die intrazelluläre Signalverarbeitung. NO induziert die Synthese von Gewebe-zerstörenden Enzymen und inhibiert die Matrixsynthese [25,93,103]. HICKERY ET AL. und HAYASHI ET AL. beschreiben zusätzlich eine Hemmung der Sulfatierung von Proteoglykanen [37,45]. Die Expression von iNOS steigt infolge von Verletzung und nach mechanischer Belastung in den Meniskuszellen an [27,41].

In den vorliegenden Versuchen zeigten die Zellen der Gonarthrose-Patienten für den Entzündungsmediator iNOS hauptsächlich schwach positive und positive Werte. Diese Beobachtungen unterstützen den im Tierversuch von HELLIO LE GRAVERAND ET AL. beschriebenen iNOS-Anstieg infolge von Arthrose [41]. Ein Unterschied zwischen den Proben der Primär-, Co- und Kontrollkultur war nicht zu erkennen.

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind Schlüsselenzyme für den enzymatischen Metabolismus von Proteinen der extrazellulären Matrix, einschließlich fibrillen- und nicht fibrillenformender Kollagene (MMP-1, MMP-13) und Stromelysin (MMP-3). Unter physiologischen Bedingungen sind sie an Bildung, Umbau und Heilung von Knorpel- und Meniskusgewebe beteiligt und werden nach Verletzung aktiviert [12,14,33,38,41]. BLUTEAU ET AL. beschreiben erhöhte MMP-Werte bei Arthrose und vermuten ein Ungleichgewicht zwischen den MMPs und ihren Inhibitoren [12].

Die Ergebnisse der MMP-Expression zeigten positive Werte für MMP-3 und MMP-13 sowie negative Werte bzw. keine Expression für MMP-1. Der Nachweis von MMP-3 und MMP-13 sprechen für einen aktiven Umbauprozess und eine mögliche erhöhte Aktivierung infolge der Arthrose. Die Expressionsstärke der MMPs zeigte keine Unterschiede in den Proben der Primär-, Co- und Kontrollkultur und die HUVEC haben keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Matrix-Metalloproteinasen.



Zusammenfassend lässt sich einerseits sagen, dass bei keinem der untersuchten Faktoren während des Zeitraums der Cokultur eine deutliche Expressionsänderung beobachtet werden konnte und die HUVEC demnach keinen, durch RT-PCR erkennbaren, Einfluss auf die Gen-Expression von Meniskuszellen haben. Andererseits lässt der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren darauf schließen, dass die vorliegenden Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraums kein Opfer von Entdifferenzierung geworden sind und sie noch immer als Fibrochondrozyten bezeichnet werden dürfen.

Die teilweise Signalverstärkung für Connexin-43 in der HUVEC-Fibrochondrozyten-Cokultur muss kritisch betrachtet werden, da das Gap-Junction-Protein nur im vaskularisierten Meniskusaußenbereich vorkommt [39]. Der Aufbau der vorliegenden Studie erlaubt jedoch keine Unterscheidung zwischen oberflächlichen und tiefen Fibrochondrozyten, fibroblastenähnlichen Zellen und mikrovaskulären Meniskus-Endothelzellen, so dass nicht geklärt werden kann, wodurch der Connexin-43-Anstieg verursacht wurde. In Zukunft sind dafür weitere Untersuchungen notwendig. Auch liefern die Versuche keine genaueren Informationen über die stimulierbaren Zellen und über den genauen Mechanismus des Effekts, so dass auch die teilweise Verstärkung für das Adhäsionsglykoprotein Kollagen-VI in den Fibrochondrozyten-Kontrollkulturen keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulässt.

Insgesamt wird deutlich, dass nicht allein die Endothelzellen für die Regenerationsfähigkeit des Meniskusaußenbereichs verantwortlich sind, sondern die Heilungsfähigkeit vielmehr ein Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren sein muss, und dass zum vollen Verständnis des Prozesses der Meniskusregeneration der relative Beitrag aller Zelltypen [73] sowie die Wirkung von Wachstumsfaktoren [6,16,100] untersucht werden muss.

### 4.3.2 Methodik der RT-PCR

Zur Methode der RT-PCR muss einschränkend gesagt werden, dass es sich um keine quantitative, sondern im Grunde um eine rein qualitative, Methode handelt, die nur relative mRNA-Mengen-Werte liefert. Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen geben deshalb nur Expressionstendenzen an. Um quantitativ verwertbare Ergebnisse zu erhalten, müssen aufwendigere Bestimmungsmethoden, wie z.B. die Light-Cycler-PCR, angewendet werden.

Als zweiter Kritikpunkt muss zur Polymerase-Kettenreaktion gesagt werden, dass sie sich auf die Transkriptionsebene der Genexpression einer Zelle beschränkt und nichts über die tatsächliche Syntheseleistung auf Proteinebene aussagt. Zum Nachweis der Syntheseprodukte sind deshalb weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. immunhistochemische Färbungen.

### 4.3.3 Immunhistochemie

Neben der RT-PCR wurden die Meniskuszellen auch immunhistochemisch charakterisiert, um das tatsächliche Synthesemuster zu erfassen und eine Kontamination der Zellkultur mit Endothelzellen auszuschließen. Es wurden Antikörper gegen Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-II und von-Willebrand-Faktor verwendet.

Die immunhistochemischen Färbungen mit Kollagen-I- und Kollagen-II-Antikörpern dienten dabei der Charakterisierung der Fibrochondrozyten, da diese Kollagen-I stark, Kollagen-II hingegen nur schwach exprimieren. Durch den Endothelzell-spezifischen von-Willebrand-Faktor sollte dagegen eine Verunreinigung mit Endothelzellen ausgeschlossen werden.

Das Meniskus-typische Kollagen-I konnte durch Rotfärbung des Zytoplasmas in allen Proben nachgewiesen werden.

Kollagen-II hingegen zeigte keine Rotfärbung, sondern nur eine leichte Dunkelfärbung des Zytoplasmas und das Ergebnis wurde als negativ gewertet. Da Kollagen-Typ-II aber in geringen Mengen Bestandteil des Meniskusgewebes ist und sich das Zytoplasma unspezifisch, körnig dunkel anfärbte, ist es möglicherweise zu einer ‚Maskierung‘ des Kollagen-II gekommen.

Bei der vWF-Färbung waren wechselnde und unspezifische Ergebnisse zu beobachten. Dies weist auf Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit Zellstrukturen hin.

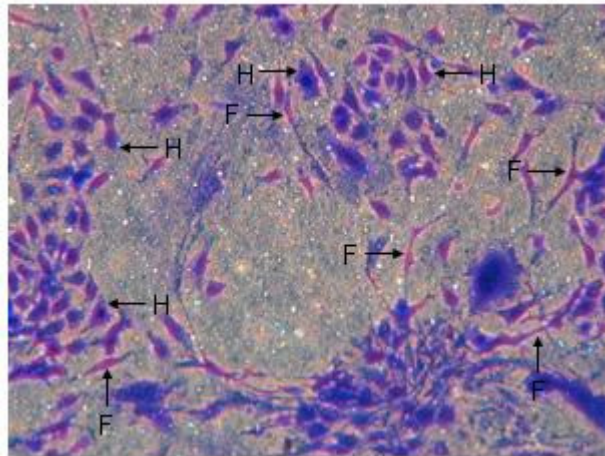
Die fraglichen Ergebnisse der Färbungen der Antikörper gegen Kollagen-II und vWF zeigen, dass die Immunhistochemie ein äußerst störanfälliges Verfahren ist. Einerseits gibt es Probleme in Form von Kreuzreaktivität und starker Hintergrundfärbung durch unzureichend ausgeschaltete Enzyme und unspezifische Bindungsstellen und andererseits kommt es häufig zu einer erschweren Interpretation durch ‚Maskierung‘ des Zielproteins. Insbesondere Formalin hat die Eigenschaft durch Proteindenaturierung das Antigen für den Antikörper unsichtbar zu machen.

Insgesamt sind daher sowohl negative als auch positive Ergebnisse der Immunhistochemie zu hinterfragen.

#### **4.4 HUVEC - Coomassieblau-Färbung**

Die Coomassieblau-Färbung der HUVEC diente allein der Sichtbarmachung der Zellen auf der porenhaltigen Membran des Inserts, da die HUVEC durch wahrscheinlich an den Poren entstehende Lichtreflexe nur schemenhaft zu erkennen waren. Der organische Farbstoff Coomassie-Brilliantblau ist ein Säurefarbstoff (Triphenylmethanfarbstoff), der zur Proteinfärbung eingesetzt wird. Er färbte das Zytoplasma der HUVEC Zellen blau an und ermöglichte somit eine Beurteilung von Morphologie, Zellzahl und Zelldichte. Da die Färbung unspezifisch Proteine anfärbt und keine spezifische Endothelzell-Färbung ist, wurden sämtliche Zellen auf der Membran angefärbt. Dabei zeigte sich, dass im Randbereich der Inserts auch einzelne Fibrochondrozyten gewachsen waren. In Vorversuchen war schon aufgefallen, dass sich bei unmittelbar aufeinander folgender Zugabe von Fibrochondrozyten und HUVEC-Insert noch frei im Medium schwimmende Meniskuszellen durch die Poren der Insertmembran drücken können. Den Fibrochondrozyten wurden deshalb 4 Tage vor Zugabe der Inserts in die 6-Well-Platte überführt, um eine gewisse

Adhärenz zum Boden der Platte zu gewährleisten. Die Coomassieblau-Färbung zeigt jedoch, dass sich auch trotz dieser Vorsichtsmaßnahme einige Fibrochondrozyten durch die Membran drücken konnten.



**Abbildung 40:** Coomassieblau-Färbung im Randbereich der Insert-Membran

H: HUVEC

F: Fibrochondrozyten

Ansonsten war aber ein konfluentes Wachstum der HUVEC und ohne lichtmikroskopisch erkennbare Morphologieänderung zu beobachten.

Auf eine spezielle Endothelzell-Färbung wurde aus Kostengründen verzichtet.

#### 4.5 Conclusio

Die Blutgefäßversorgung der aus Faserknorpel bestehenden Menisken beschränkt sich auf das äußere, von Synovia überzogene Drittel. Die fehlende Vaskularisierung in den inneren Meniskus-Dritteln scheint für die fehlende endogene Heilung in diesem Bereich verantwortlich zu sein und es war Ziel der vorliegenden Arbeit den Einfluss von gefäßbildenden Endothelzellen (HUVEC) auf humane Meniskus-Fibrochondrozyten im Rahmen einer Cokultur zur Heilungsverbesserung von Meniskusschäden zu überprüfen.

Hierzu war zunächst die Etablierung eines gemeinsamen Zellkultursystems für Meniskus-Fibrochondrozyten und HUVEC erforderlich. BD Falcon™ Cell-Culture-Inserts mit PET-Membran und einer Porengröße von 1µm erwiesen sich

bei der Durchführung als optimal, da die transparente PET-Membran eine lichtmikroskopische Beobachtung der darunter liegenden Zellen ermöglichte und die Porengröße von  $1\mu\text{m}$  eine Zellmigration verhinderte, aber eine ausreichende Stoffdiffusion erlaubte. Als Kulturmedium wurde EGM-Vollmedium verwendet, da sowohl HUVEC als auch Fibrochondrozyten eine gute Proliferation ohne Anhalt für Entdifferenzierung zeigten.

Der Einfluss der HUVEC auf das Expressionsmuster der Fibrochondrozyten wurde für einige wichtige Matrixfaktoren und Entzündungsmediatoren mittels RT-PCR erfasst. Gleichzeitig wurde das tatsächliche Synthesemuster der Zellen durch Immunhistochemie kontrolliert, um eine Kontamination der Fibrochondrozyten-Kultur mit Endothelzellen auszuschließen.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass bei keinem der untersuchten Faktoren während des Zeitraums der Cokultur eine deutliche Expressionsänderung beobachtet werden konnte und die HUVEC keinen, durch RT-PCR erkennbaren, Einfluss auf die Gen-Expression von Meniskuszellen haben. Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren lässt darauf schließen, dass die vorliegenden Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraums nicht entdifferenzierten und noch immer als Fibrochondrozyten bezeichnet werden dürfen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass also nicht allein die Endothelzellen für die Regenerationsfähigkeit des Meniskusaußenbereichs verantwortlich sind, sondern die Heilungsfähigkeit vielmehr ein Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren sein muss. Zum vollen Verständnis der Meniskusregeneration muss daher der relative Beitrag aller Zelltypen [73] und die Wirkung von Wachstumsfaktoren [6,16,100] in weiterführenden Studien untersucht werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Menisken des menschlichen Kniegelenkes sind bewegliche Gelenkpfannen aus Faserknorpel. Sie spielen eine überragende Rolle in der Bewegung und der Biomechanik des Kniegelenkes. Infolge von Überbeanspruchung und Degeneration kommt es häufig zu Meniskusläsionen, die die Entstehung einer Gonarthrose begünstigen. Die Vaskularisierung des Meniskus beschränkt sich auf das periphere von Synovia überzogene Drittel, während die restlichen zwei Drittel des Meniskusgewebes nicht an die Blutversorgung angeschlossen sind.

Die fehlende Vaskularisierung in den inneren Meniskus-Dritteln scheint für die fehlende endogene Heilung in diesem Bereich verantwortlich zu sein und es war Ziel dieser Studie den Einfluss von gefäßbildenden Endothelzellen (HUVEC) auf humane Meniskus-Fibrochondrozyten im Rahmen einer Cokultur zur Heilungsverbesserung von Meniskusschäden zu überprüfen.

Das Gen-Expressionsmuster der Fibrochondrozyten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten sowohl in einer Cokultur als auch in einer reinen Fibrochondrozyten-Kontrollkultur durch RT-PCR für verschiedene Matrixproteine und Entzündungsmediatoren untersucht.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten für keinen der Faktoren eine signifikante Veränderung der Expressionsstärke und die HUVEC haben in den durchgeführten Versuchen keinen, durch RT-PCR erkennbaren, Einfluss auf die Gen-Expression der Meniskuszellen. Andererseits lässt der Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren aber darauf schließen, dass die Meniskuszellen während des gesamten Untersuchungszeitraums kein Opfer von Entdifferenzierung geworden sind und noch immer als Fibrochondrozyten bezeichnet werden dürfen.

In den Fibrochondrozyten wurden zusätzlich immunhistochemisch Proteine angefärbt, um das tatsächliche Synthesemuster der Zellen zu erfassen. Hierbei konnte Kollagen-Typ-I eindeutig nachgewiesen werden.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass also nicht allein die Endothelzellen für die Regenerationsfähigkeit des Meniskusaußenbereichs verantwortlich sind, sondern die Heilungsfähigkeit vielmehr ein Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren sein muss. Zum vollen Verständnis der Meniskusregeneration muss daher der relative Beitrag aller Zelltypen [73] und die Wirkung von Wachstumsfaktoren [6,16,100] in weiterführenden Studien untersucht werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adams, M.E., McDevitt, C.A., Ho, A., Muir, H.:** Isolation and characterization of high-buoyant-density proteoglycans from semilunar menisci. *J Bone Joint Surg Am*, 68(1): 55-64, 1986.
2. **Adams, M.E., Muir, H.:** The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem J*, 197(2): 385-9, 1981.
3. **Ahmed, A.M., Burke, D.L.:** In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints--Part I: Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng*, 105(3): 216-25, 1983.
4. **Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P.M., McKenna, L.:** Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum*, 44(12): 2777-89, 2001.
5. **Allen, P.R., Denham, R.A., Swan, A.V.:** Late degenerative changes after meniscectomy. Factors affecting the knee after operation. *J Bone Joint Surg Br*, 66(5): 666-71, 1984.
6. **Arnoczky, S.P.:** Building a meniscus. Biologic considerations. *Clin Orthop Relat Res*, (367 Suppl): S244-53, 1999.
7. **Arnoczky, S.P., Warren, R.F.:** Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*, 10(2): 90-5, 1982.
8. **Arnoczky, S.P., Warren, R.F.:** The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med*, 11(3): 131-41, 1983.
9. **Arnoczky, S.P., Warren, R.F., Spivak, J.M.:** Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 70(8): 1209-17, 1988.
10. **Beaupre, A., Choukroun, R., Guidouin, R., Garneau, R., Gerardin, H., Cardou, A., Tordion, G.:** A study of the menisci of the knee by scanning electron microscopy (author's transl). *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, 67(8): 713-9, 1981.
11. **Bland, Y.S., Ashhurst, D.E.:** Changes in the content of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. *Histochem J*, 28(4): 265-74, 1996.
12. **Bluteau, G., Conrozier, T., Mathieu, P., Vignon, E., Herbage, D., Mallein-Gerin, F.:** Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*, 1526(2): 147-58, 2001.
13. **Bluteau, G., Labourdette, L., Ronziere, M., Conrozier, T., Mathieu, P., Herbage, D., Mallein-Gerin, F.:** Type X collagen in rabbit and human meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*, 7(5): 498-501, 1999.
14. **Borkakoti, N.:** Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog Biophys Mol Biol*, 70(1): 73-94, 1998.
15. **Buckwalter, J.A., Mankin, H.J.:** Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47: 477-86, 1998.



16. **Buma, P., Ramrattan, N.N., van Tienen, T.G., Veth, R.P.:** Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials*, 25(9): 1523-32, 2004.
17. **Caterson, B., Flannery, C.R., Hughes, C.E., Little, C.B.:** Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol*, 19(4): 333-44, 2000.
18. **Cheung, H.S.:** Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res*, 16(4): 343-56, 1987.
19. **Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., Stern, D.M.:** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91(10): 3527-61, 1998.
20. **Clark, C.R., Ogden, J.A.:** Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg Am*, 65(4): 538-47, 1983.
21. **Cox, J.S., Nye, C.E., Schaefer, W.W., Woodstein, I.J.:** The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. *Clin Orthop Relat Res*, (109): 178-83, 1975.
22. **Del Pizzo, W., Fox, J.M.:** Results of arthroscopic meniscectomy. *Clin Sports Med*, 9(3): 633-9, 1990.
23. **Djurasovic, M., Aldridge, J.W., Grumbles, R., Rosenwasser, M.P., Howell, D., Ratcliffe, A.:** Knee joint immobilization decreases aggrecan gene expression in the meniscus. *Am J Sports Med*, 26(3): 460-6, 1998.
24. **Durrant, L.A., Archer, C.W., Benjamin, M., Ralphs, J.R.:** Organisation of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. *J Anat*, 194 (Pt 3): 343-53, 1999.
25. **Evans, C.H., Watkins, S.C., Stefanovic-Racic, M.:** Nitric oxide and cartilage metabolism. *Methods Enzymol*, 269: 75-88, 1996.
26. **Eyre, D.R., Wu, J.J.:** Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett*, 158(2): 265-70, 1983.
27. **Fink, C., Fermor, B., Weinberg, J.B., Pisetsky, D.S., Misukonis, M.A., Guilak, F.:** The effect of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(5): 481-7, 2001.
28. **Fishman, A.P.:** Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci*, 401: 1-8, 1982.
29. **Gao, J., Messner, K.:** Natural healing of anterior and posterior attachments of the rabbit meniscus. *Clin Orthop Relat Res*, (328): 276-84, 1996.
30. **Gear, M.W.:** The late results of meniscectomy. *Br J Surg*, 54(4): 270-2, 1967.
31. **Ghadially, F.N., Thomas, I., Yong, N., Lalonde, J.M.:** Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages. *J Anat*, 125(3): 499-517, 1978.
32. **Ghosh, P., Taylor, T.K.:** The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop Relat Res*, (224): 52-63, 1987.
33. **Giambernardi, T.A., Grant, G.M., Taylor, G.P., Hay, R.J., Maher, V.M., McCormick, J.J., Klebe, R.J.:** Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol*, 16(8): 483-96, 1998.

34. **Gillquist, J., Oretorp, N.:** Arthroscopic partial meniscectomy. Technique and long-term results. *Clin Orthop Relat Res*, (167): 29-33, 1982.
35. **Griendling, K.K., Alexander, R.W.:** Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *Faseb J*, 10(2): 283-92, 1996.
36. **Gronblad, M., Korkala, O., Liesi, P., Karaharju, E.:** Innervation of synovial membrane and meniscus. *Acta Orthop Scand*, 56(6): 484-6, 1985.
37. **Hayashi, T., Abe, E., Yamate, T., Taguchi, Y., Jasin, H.E.:** Nitric oxide production by superficial and deep articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 40(2): 261-9, 1997.
38. **Hellio Le Graverand, M.P., Eggerer, J., Sciore, P., Reno, C., Vignon, E., Otterness, I., Hart, D.A.:** Matrix metalloproteinase-13 expression in rabbit knee joint connective tissues: influence of maturation and response to injury. *Matrix Biol*, 19(5): 431-41, 2000.
39. **Hellio Le Graverand, M.P., Ou, Y., Schield-Yee, T., Barclay, L., Hart, D., Natsume, T., Rattner, J.B.:** The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat*, 198(Pt 5): 525-35, 2001.
40. **Hellio Le Graverand, M.P., Sciore, P., Eggerer, J., Rattner, J.P., Vignon, E., Barclay, L., Hart, D.A., Rattner, J.B.:** Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum*, 44(8): 1808-18, 2001.
41. **Hellio Le Graverand, M.P., Vignon, E., Otterness, I.G., Hart, D.A.:** Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part II: molecular alterations. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(1): 65-72, 2001.
42. **Henning, C.E., Lynch, M.A., Clark, J.R.:** Vascularity for healing of meniscus repairs. *Arthroscopy*, 3(1): 13-8, 1987.
43. **Henning, C.E., Lynch, M.A., Yearout, K.M., Vequist, S.W., Stallbaumer, R.J., Decker, K.A.:** Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 64-72, 1990.
44. **Herwig, J., Egner, E., Buddecke, E.:** Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis*, 43(4): 635-40, 1984.
45. **Hickery, M.S., Bayliss, M.T.:** Interleukin-1 induced nitric oxide inhibits sulphation of glycosaminoglycan chains in human articular chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1425(2): 282-90, 1998.
46. **Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L.M., Heinegard, D., Twardzik, D.R., Border, W.A., Ruoslahti, E.:** Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 302 (Pt 2): 527-34, 1994.
47. **Homandberg, G.A., Wen, C.:** Exposure of cartilage to a fibronectin fragment amplifies catabolic processes while also enhancing anabolic processes to limit damage. *J Orthop Res*, 16(2): 237-46, 1998.
48. **Homandberg, G.A., Wen, C., Hui, F.:** Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*, 6(4): 231-44, 1998.
49. **Hoshino, A., Wallace, W.A.:** Impact-absorbing properties of the human knee. *J Bone Joint Surg Br*, 69(5): 807-11, 1987.

50. **Hynes, R.O.:** Fibronectins: a family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. *Harvey Lect*, 81: 133-52, 1985.
51. **Ihn, J.C., Ahn, M.W., Kim, D.M.:** Photoelastic analysis of stress distribution on the tibiofemoral joint after meniscectomy. *Orthopedics*, 15(12): 1445-50, 1992.
52. **Ilan, N., Mahooti, S., Madri, J.A.:** Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci*, 111 (Pt 24): 3621-31, 1998.
53. **Johnson, R.J., Kettelkamp, D.B., Clark, W., Leaverton, P.:** Factors effecting late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 56(4): 719-29, 1974.
54. **Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.:** Histologie. Hrsg. von Manfred Gratzl, Springer Verlag, 2002.
55. **Kavanagh, E., Ashhurst, D.E.:** Distribution of biglycan and decorin in collateral and cruciate ligaments and menisci of the rabbit knee joint. *J Histochem Cytochem*, 49(7): 877-85, 2001.
56. **Kielty, C.M., Kwan, A.P., Holmes, D.F., Schor, S.L., Grant, M.E.:** Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem J*, 227(2): 545-54, 1985.
57. **King, D.:** The function of semilunar cartilages. *J Bone Joint Surg Am*, (18): 1069-76, 1936.
58. **King, D.:** The healing of semilunar cartilages. *J Bone Joint Surg Am*, (18): 333-42, 1936.
59. **Kohn, E.C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R.P., Liotta, L.A.:** Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5): 1307-11, 1995.
60. **Levy, I.M., Torzilli, P.A., Gould, J.D., Warren, R.F.:** The effect of lateral meniscectomy on motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am*, 71(3): 401-6, 1989.
61. **Li, J., Zhang, Y.P., Kirsner, R.S.:** Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, 60(1): 107-14, 2003.
62. **Lippert, H.:** Lehrbuch Anatomie. Hrsg. von Herbert Lippert, Urban & Fischer, 2000.
63. **Lynch, M.A., Henning, C.E., Glick, K.R., Jr.:** Knee joint surface changes. Long-term follow-up meniscus tear treatment in stable anterior cruciate ligament reconstructions. *Clin Orthop Relat Res*, (172): 148-53, 1983.
64. **Manco, L.G., Kavanaugh, J.H., Fay, J.J., Bilfield, B.S.:** Meniscus tears of the knee: prospective evaluation with CT. *Radiology*, 159(1): 147-51, 1986.
65. **Marcelino, J., McDevitt, C.A.:** Attachment of articular cartilage chondrocytes to the tissue form of type VI collagen. *Biochim Biophys Acta*, 1249(2): 180-8, 1995.
66. **Matyas, J.R., Ehlers, P.F., Huang, D., Adams, M.E.:** The early molecular natural history of experimental osteoarthritis. I. Progressive discoordinate expression of aggrecan and type II procollagen messenger

- RNA in the articular cartilage of adult animals. *Arthritis Rheum*, 42(5): 993-1002, 1999.
67. **McDevitt, C.A., Marcelino, J., Tucker, L.:** Interaction of intact type VI collagen with hyaluronan. *FEBS Lett*, 294(3): 167-70, 1991.
68. **McDevitt, C.A., Miller, R.R., Spindler, K.P.:** The cells and cellmatrix interactions of the meniscus. In *Knee meniscus: basic and clinical foundations.*, Hrsg. von V. C. Mow, S. P. Arnoczky, D.W. Jackson, Raven Press, 1992.
69. **McDevitt, C.A., Mukherjee, S., Kambic, H., Parker, R.:** Emerging concepts of the cell biology of the meniscus. *Curr Opin Orthop*, 13(5): 345-50, 2002.
70. **McDevitt, C.A., Webber, R.J.:** The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, (252): 8-18, 1990.
71. **Messner, K., Kohn, D., Verdonk, R.:** Future research in meniscal replacement. *Scand J Med Sci Sports*, 9(3): 181-3, 1999.
72. **Miller, R.R., McDevitt, C.A.:** Thrombospondin in ligament, meniscus and intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta*, 1115(1): 85-8, 1991.
73. **Miller, R.R., Rydell, P.A.:** Primary culture of microvascular endothelial cells from canine meniscus. *J Orthop Res*, 11(6): 907-11, 1993.
74. **Mine, T., Kimura, M., Sakka, A., Kawai, S.:** Innervation of nociceptors in the menisci of the knee joint: an immunohistochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg*, 120(3-4): 201-4, 2000.
75. **Minuth, W.W., Strehl, R., Schumacher, K.:** Zukunftstechnologie Tissue Engineering: Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. Hrsg. von W.W. Minuth, R. Strehl, K. Schumacher, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003.
76. **Moon, M.S., Kim, J.M., Ok, I.Y.:** The normal and regenerated meniscus in rabbits. Morphologic and histologic studies. *Clin Orthop Relat Res*, (182): 264-9, 1984.
77. **Mow, V.C., Holmes, M.H., Lai, W.M.:** Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech*, 17(5): 377-94, 1984.
78. **Nakano, T., Dodd, C.M., Scott, P.G.:** Glycosaminoglycans and proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *J Orthop Res*, 15(2): 213-20, 1997.
79. **Nakata, K., Shino, K., Hamada, M., Mae, T., Miyama, T., Shinjo, H., Horibe, S., Tada, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.:** Human meniscus cell: characterization of the primary culture and use for tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res*, (391 Suppl): S208-18, 2001.
80. **Newman, A.P., Anderson, D.R., Daniels, A.U., Dales, M.C.:** Mechanics of the healed meniscus in a canine model. *Am J Sports Med*, 17(2): 164-75, 1989.
81. **Peretti, G.M., Caruso, E.M., Randolph, M.A., Zaleske, D.J.:** Meniscal repair using engineered tissue. *J Orthop Res*, 19(2): 278-85, 2001.
82. **Petersen, W., Tillmann, B.:** Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anat Embryol (Berl)*, 197(4): 317-24, 1998.
83. **Petersen, W., Tillmann, B.:** Structure and vascularization of the knee joint menisci. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 137(1): 31-7, 1999.

84. **Plendl, J., Sinowatz, F., Auerbach, R.:** The heterogeneity of the vascular endothelium. *Anat Histol Embryol*, 21(3): 256-62, 1992.
85. **Proctor, C.S., Schmidt, M.B., Whipple, R.R., Kelly, M.A., Mow, V.C.:** Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res*, 7(6): 771-82, 1989.
86. **Radin, E.L., de Lamotte, F., Maquet, P.:** Role of the menisci in the distribution of stress in the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (185): 290-4, 1984.
87. **Rath, E., Richmond, J.C.:** The menisci: basic science and advances in treatment. *Br J Sports Med*, 34(4): 252-7, 2000.
88. **Rauber, A., Kopsch, F.:** Anatomie des Menschen, Band 1 Bewegungsapparat. Hrsg. von H. Leonhardt, B. Tillmann, G. Töndury, K. Zilles, Georg Thieme Verlag, 2003.
89. **Robbins, J.R., Thomas, B., Tan, L., Choy, B., Arbiser, J.L., Berenbaum, F., Goldring, M.B.:** Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta. *Arthritis Rheum*, 43(10): 2189-201, 2000.
90. **Roughley, P.J., White, R.J.:** The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus. *J Orthop Res*, 10(5): 631-7, 1992.
91. **Rucklidge, G.J., Milne, G., Robins, S.P.:** Collagen type X: a component of the surface of normal human, pig, and rat articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 224(2): 297-302, 1996.
92. **Rundhaug, J.E.:** Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 9(2): 267-85, 2005.
93. **Sakurai, H., Kohsaka, H., Liu, M.F., Higashiyama, H., Hirata, Y., Kanno, K., Saito, I., Miyasaka, N.:** Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest*, 96(5): 2357-63, 1995.
94. **Schmitz, M.A., Rouse, L.M., Jr., DeHaven, K.E.:** The management of meniscal tears in the ACL-deficient knee. *Clin Sports Med*, 15(3): 573-93, 1996.
95. **Schreppers, G.J., Sauren, A.A., Huson, A.:** A numerical model of the load transmission in the tibio-femoral contact area. *Proc Inst Mech Eng [H]*, 204(1): 53-9, 1990.
96. **Scott, P.G., Nakano, T., Dodd, C.M.:** Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys Acta*, 1336(2): 254-62, 1997.
97. **Smillie, I.S.:** Observations on the regeneration of the semilunar cartilages in man. *Br J Surg*, (31): 398-401, 1944.
98. **Sommerlath, K.G.:** Results of meniscal repair and partial meniscectomy in stable knees. *Int Orthop*, 15(4): 347-50, 1991.
99. **Stokes, D.G., Liu, G., Dharmavaram, R., Hawkins, D., Piera-Velazquez, S., Jimenez, S.A.:** Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*, 360(Pt 2): 461-70, 2001.

100. **Sweigart, M.A., Athanasiou, K.A.:** Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*, 7(2): 111-29, 2001.
101. **Sweigart, M.A., AufDerHeide, A.C., Athanasiou, K.A.:** Fibrochondrocytes and their Use in Tissue Engineering of the Meniscus. In *Topics in Tissue Engineering, e-book* ([http://www.tissue-engineering-oc.com/ebook\\_topics\\_in\\_t\\_e/abstracts/sweigart\\_1.pdf](http://www.tissue-engineering-oc.com/ebook_topics_in_t_e/abstracts/sweigart_1.pdf)), Hrsg. von N. Ashammakhi und P. Ferretti, 2003.
102. **Szekanecz, Z., Koch, A.E.:** Endothelial cells in inflammation and angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(3): 319-23, 2005.
103. **Tanaka, S., Hamanishi, C., Kikuchi, H., Fukuda, K.:** Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum*, 27(6): 392-9, 1998.
104. **Tapper, E.M., Hoover, N.W.:** Late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 51(3): 517-26 passim, 1969.
105. **Tischer, T., Milz, S., Maier, M., Schieker, M., Benjamin, M.:** An immunohistochemical study of the rabbit suprapatella, a sesamoid fibrocartilage in the quadriceps tendon containing aggrecan. *J Histochem Cytochem*, 50(7): 955-60, 2002.
106. **Toyonaga, T., Uezaki, N., Chikama, H.:** Substitute meniscus of Teflon-net for the knee joint of dogs. *Clin Orthop Relat Res*, (179): 291-7, 1983.
107. **Valhmu, W.B., Palmer, G.D., Rivers, P.A., Ebara, S., Cheng, J.F., Fischer, S., Ratcliffe, A.:** Structure of the human aggrecan gene: exon-intron organization and association with the protein domains. *Biochem J*, 309 (Pt 2): 535-42, 1995.
108. **Veth, R.P.:** Clinical significance of knee joint changes after meniscectomy. *Clin Orthop Relat Res*, (198): 56-60, 1985.
109. **Villars, F., Guillotin, B., Amedee, T., Dutoya, S., Bordenave, L., Bareille, R., Amedee, J.:** Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(4): C775-85, 2002.
110. **Voloshin, A.S., Wosk, J.:** Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng*, 5(2): 157-61, 1983.
111. **von der Mark, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Gluckert, K., Stoss, H.:** Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 35(7): 806-11, 1992.
112. **Wagner, D.D.:** The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost*, 70(1): 105-10, 1993.
113. **Walker, P.S., Erkman, M.J.:** The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop Relat Res*, (109): 184-92, 1975.
114. **Webber, R.J., Harris, M.G., Hough, A.J., Jr.:** Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res*, 3(1): 36-42, 1985.
115. **Webber, R.J., York, J.L., Vanderschilden, J.L., Hough, A.J., Jr.:** An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med*, 17(3): 393-400, 1989.

- 
116. **Willey, G.M., Billetz, A.C., Matyas, J.R., Adams, M.E., McDevitt, C.A.:** Absolute concentrations of mRNA for type I and type VI collagen in the canine meniscus in normal and ACL-deficient knee joints obtained by RNase protection assay. *J Orthop Res*, 19(4): 650-8, 2001.
  117. **Wu, J.J., Eyre, D.R., Slayter, H.S.:** Type VI collagen of the intervertebral disc. Biochemical and electron-microscopic characterization of the native protein. *Biochem J*, 248(2): 373-81, 1987.
  118. **Zimny, M.L., Albright, D.J., Dabezies, E.:** Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat (Basel)*, 133(1): 35-40, 1988.

## 7 ABKÜRZUNGEN

-	negativ
-/+	sehr schwach positiv
+	positiv
++	stark positiv
µl:	Mikroliter
ABC-Komplex:	Avidin-Biotin-Komplex
AEC:	3-Amino-9-Ethylcarbazol
as:	antisense
BBE:	Rinderhirn-Extrakt
bp:	Basenpaare
BSA:	bovines Serumalbumin
°C:	Grad Celsius
cDNA:	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Co1:	Cokultur ZP1
Co2:	Cokultur ZP2
CO <sub>2</sub> :	Kohlendioxid
DMEM-F12:	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mix/F12
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
dNTP:	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS:	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline
E.:	Extinktion
EDTA:	Ethylendiamintertraessigsäure
EGM:	Endothelial Growth Medium
f:	female (weiblich)
FCS:	fötales Kälberserum
f+:	falsch positiv
g:	Gramm
GA-1000:	Gentamicin sulphate, Amphotericin-B
GAG	Glykosaminoglykan



---

GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h:	Stunde
H <sub>2</sub> O:	Wasser
HRPO:	biotinylierte Meerrettichperoxidase (Horseradisch-Peroxidase)
HUVEC:	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
iNOS:	induzierbare Stickoxid-Synthetase
ITS:	Insulin-Transferrin-Selenium
J:	Jahre
KTEP:	Knietotalendoprothese
li.:	links
m:	maskulin (männlich)
mA:	Milliampère
MgCl <sub>2</sub> :	Magnesiumchlorid
min:	Minute
ml:	Milliliter
mM:	Millimolar
MMP:	Matrix-Metalloproteinase
MP:	Meniskus-Patient
m/s:	Meter pro Sekunde
mV:	Millivolt
nm:	Nanometer
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PBS:	phosphatgepufferte Saline
PET:	Polyethylen-Terephthalate
pH:	Potentia hydrogenii
R:	RNA-Menge
re.:	rechts
rhEGF:	recombinant human Epidermal Growth Factor
RLT-Puffer:	Lyse-Puffer
RNA:	Ribonukleinsäure
RNAse:	Ribonuklease
RT-PCR:	Reverse-Transcriptions-Polymerase-Kettenreaktion

---

s:	Standardabweichung
se:	sense
sek.:	Sekunde
taq:	Thermophilus aquaticus
TBE:	Tris-Borsäure-EDTA-Lösung
U:	Unit
U/min :	Umdrehungen pro Minute
UV:	Ultraviolett
vWF:	von-Willebrand-Faktor
W:	Watt
X:	Mittelwert
Z:	totale Zellzahl
ZP:	Zeitpunkt
ZP0:	Primärkultur
ZP1:	nach 4 Tagen Cokultur
ZP2:	nach 10 Tagen Cokultur

## 8 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei allen, die diese Doktorarbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. med. Maximilian Rudert und Herrn Dr. med. Maik Hoberg für die Überlassung des Dissertationsthemas, für ihre Unterstützung, Geduld und konstruktive Kritik während der Durchführung bedanken.

Herrn Prof. Wilhelm Aicher, Leiter des zellbiologischen Labors, danke ich für die theoretische und methodische Betreuung der Arbeit. Durch seine Kompetenz und Erfahrung ermöglichte er die Durchführung der Arbeit maßgeblich.

Mein Dank gilt weiterhin:

- der deutschen Arthroshilfe für die finanzielle Unterstützung
- Frau Anita Hack für ihre praktische und strategische Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.
- Ebenso Frau Dr. Dorothea Alexander und Frau Tanja Abruzzese für wertvolle Tipps, Aushilfe mit Labormaterialien und gute Zusammenarbeit.
- Den operierenden Ärzten, Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des OP-Traktes der Orthopädischen Uniklinik und besonders Frau Elisabeth Kienzle für ihre Mithilfe bei der Organisation der Meniskusbiopsien.
- Viviane Stark für ihre Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und Freundschaft.
- Meinen Freunden

Meiner Schwester Sabine danke ich für ihre konstruktive Kritik und dass sie immer für mich da ist.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für Alles. Sie haben mir mein Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht und haben mich darüber hinaus in jeder Hinsicht unterstützt und gefördert.

## 9 CURRICULUM VITAE

### ***Persönliche Daten***

Name	Edda Lisa Schmid
Geburtsdatum	26.03.1980
Geburtsort	Radolfzell am Bodensee
Eltern	Dr. Rainer und Suse Schmid
Geschwister	Sabine und Julian Schmid

### ***Schulbildung***

1986-1988	Grundschule Radolfzell-Möggingen
1988-1990	Grundschule Radolfzell-Güttingen
1990-1999	Ev. Internatschule Schloss Gaienhofen e.V. (Ambrosius-Blarer-Gymnasium)
1996	Ridgetown-District-Highschool, Kanada
1999	Allgemeine Hochschulreife

### ***Studium***

WS 99/00	Studium der Mineralogie an der Universität zu Köln
2000-2002	Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität Giessen
2002	ärztliche Vorprüfung
2002-2007	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2003	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
ab Frühjahr 2004	experimentelle Doktorarbeit bei Herrn OA PD Dr. M. Rudert in der orthopädischen Abteilung der Universität Tübingen
2006	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006-2007	Praktisches Jahr: Chirurgie, Klinikum Friedrichshafen Orthopädie, Klinik Gut St. Moritz, Schweiz Innere, Spital Oberengadin, Schweiz
2007	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### ***Famulaturen***

März - April 2003	Gynäkologie, Universitätsklinik Tübingen
-------------------	--

Sept. - Okt. 2003 Urologie, Kreiskrankenhaus Sigmaringen

August 2004 Orthopädie, North Sydney Orthopaedic & Sports Medicine  
Centre (Dr. Mervyn Cross), Australien

August 2005 Orthopädie, Vincentius-Krankenhaus Konstanz