

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

**Phänotypischer Vergleich zwischen synovialen
Fibroblasten und Fibrochondrozyten aus
Menisken**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von
Lidia Sabic
aus Heilbronn

2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. M. Rudert
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Horstmann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
I. Einleitung	4
1.1 Makroskopische Anatomie des Meniskus	11
1.2 Histologie des Meniskus	15
1.3 Histologie der Synovialis	16
1.4 Zytokine	17
1.5 Fragestellung	18
II. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Gewebe	20
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien	20
2.1.3 Antikörper	22
AS02	22
Thy-1	22
Kollagen I	23
2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte	23
2.2 Zellkulturmethoden	24
2.2.1 Allgemeines	24
2.2.2 Anlegen von Primärkulturen synovialer Fibroblasten	25
2.2.3 Anlegen von Primärkulturen von Fibrochondrozyten aus Meniskuszellen	25
2.2.4 Aufbereitung des FCS	26
2.2.5 Herstellung des Vollmediums	26
2.2.6 Mediumwechsel	27
2.2.7 Subkultivierung der Zellen	27
2.2.8 Zellzahlbestimmung	28
2.2.9 Zellaussaat	28
a) Zellaussaat für Immunzytochemie	29
b) Zellaussaat für Wachstumsfaktoren	29

Inhaltsverzeichnis

Matrixmetalloproteinasen	65
VEGF und FGF (=ECGF)	66
Kollagen I und II	67
Zusammenfassung	68
V. Schlussbetrachtung	70
VI. Literaturverzeichnis	71
VII. Anhang	82
Abkürzungsverzeichnis	82
Publikationen	84
Danksagung	85
Curriculum Vitae	86

I. Einleitung

Arthrose ist einer der führenden Gründe für eine körperliche Behinderung in unserer heutigen Gesellschaft. Laut Welthandelsorganisation (WHO) steht die Kniegelenksarthrose bezüglich der globalen Erkrankungswahrscheinlichkeit bei den Frauen an 4.Stelle bzw. bei den Männern an 8.Stelle (WHO 1997). Dabei belaufen sich die direkten Krankheitskosten in Deutschland jährlich auf 3,5-5,4 Mrd. Euro – wobei dies ca. 3% der gesamten direkten Krankheitskosten ausmacht (Statistisches Bundesamt 1998; Willauschus et al. 1995).

Aufgrund der demographischen Entwicklung wird die Arthrose des Kniegelenks in naher Zukunft weiterhin an Bedeutung gewinnen (Statistisches Bundesamt 1998). Vor diesem Hintergrund ist es unerlässlich, den Meniskusschaden, der unbehandelt unweigerlich zur Kniegelenksarthrose führt (Schneider et al. 2005; Felson et al. 2000; Günther et al. 1999; Felson et al. 1998), möglichst früh und optimal zu behandeln, um die degenerativen Langzeitschäden zu reduzieren.

Dem menschlichen Meniskus des Kniegelenks wurde lange Zeit wenig Bedeutung zugemessen. Durch den medizinischen Fortschritt ist heute die zentrale Rolle des Meniskus hinsichtlich der Bewegung im Kniegelenk, der gleichmäßigen Druckverteilung vom Ober- auf den Unterschenkel, der Kniestabilität und der Schockabsorption bekannt (Arnoczky et al. 1988). Die Vaskularisation der Menisken beschränkt sich im Erwachsenenalter lediglich auf das äußere Drittel, weshalb bei Schäden in diesem Bereich eine Selbstheilung möglich ist (Sweigart et al. 2001). Das Fehlen von Blutgefäßen in den inneren zwei Meniskusdritteln bedingt dem gegenüber eine schlechte Heilungstendenz in diesem Bereich.

Da die geschilderten detaillierten Kenntnisse hinsichtlich des Aufbaus des Meniskus lange Zeit nicht bekannt waren, bestand die wohl älteste Behandlungsmethode von Meniskusschäden in einer Meniskektomie. Kennzeichnend hierfür ist die vollständige Resektion (Entfernung) des betroffenen Meniskus. Eine komplette Regeneration wurde nur in seltenen

Fällen erzielt und in den meisten Fällen entwickelten die Patienten im Laufe der Jahre eine Postmenishektomiearthrose (Fairbank 1948). Aufgrund der Nachteile dieser Behandlung ging man dazu über, weitestgehend meniskuserhaltend zu operieren, d.h. so wenig wie möglich vom Meniskugewebe zu entfernen. Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass die Arthroserate höher ist nach lateraler als nach medialer Meniskusentfernung (Chatain et al. 2003) und sich die varische Beinachse (O- Beine) negativ auf die Innenmeniskusteilresektion auswirkt (Maletius et al. 1996; Jaureguito et al. 1995).

Weil auch diese Behandlung nicht zufriedenstellend war, begann man damit, Meniskusrisse zu nähen (Rockborn und Gillquist 2000), was als Meniskusrefixation bezeichnet wird. Nach dem Glätten der Meniskusränder (Abrasion) und Entfernen eventuell abgelöster Teile aus dem Gelenkspalt kamen unterschiedliche Nahttechniken zur Anwendung. Die Indikation bestand vor allem bei Längsrissen im durchbluteten kapselnahen Drittel und bei jüngeren Patienten. Man versuchte bessere Heilungserfolge durch Needling zu erzielen, d.h. Einbringen zahlreicher kleiner Löcher bis zum Fragment der Läsion zur erleichterten Vaskularisierung und somit zur besseren Rissheilung seitens der Meniskusbasis (Fox et al. 1993). Zur Förderung der Durchblutung wurden außerdem sogenannte „fibrin clots“ bestehend aus patienteneigenem geronnenem Blut in die betroffene Region eingebracht (Port et al. 1996). Zwar gelang die Wiederherstellung der Bewegungsfunktion des Knies mit Hilfe dieser Techniken besser als im Vergleich zur partiellen Meniskusentfernung. Jedoch kam diese Vorgehensweise aufgrund der längeren Rehabilitationszeiten nur für ein kleines Patientenkollektiv in Frage (Sommerlath 1991).

Hinsichtlich der Therapie von Meniskuläsionen mithilfe von Nähten weisen Langzeitergebnisse darauf hin, dass die Rupturrate bei instabilen Kniegelenken wesentlich höher ist als bei stabilen Gelenken (Muellner et al. 1999). Aus diesem Grund kommt diese Therapieoption lediglich für Patienten mit stabilen Kniegelenken in Frage. Die Heilungsrate isolierter Meniskusrefixation in stabilen Gelenken liegt in der Regel zwischen 50% und 75%, während Nähte bei instabilen Kniegelenken ohne gleichzeitigen VKB-Ersatz Heilungsraten von zum Teil unter 50% aufweisen (Dehaven et al. 1995).

Bei Meniskusrefixation mit simultaner VKB-Plastik werden Heilungsraten bis zu 75% erzielt (Cannon und Vittori 1992). Es ist bekannt, dass peripher lokalisierte Läsionen aufgrund der guten Vaskularisierung besser heilen als weiter zentral gelegene Läsionen (Rubman et al. 1998).

In den letzten zehn Jahren kamen bei größeren Meniskusschäden verschiedene intraartikuläre Implantate, die zu Beginn noch synthetischen Ursprungs waren, in Kombination mit vereinfachten Nahttechniken zur Anwendung (Benedetto et al. 2001). Dabei war die Ausreißkraft vieler Implantate geringer als die von Nähten (Seil 2003).

Im Laufe der Zeit ging man dazu über, allogene, d.h. humane Menisken, zu implantieren. Der Vorteil humaner Meniskusimplantate besteht darin, dass diese durch Kältekonservierung einfach aufzubewahren und grundsätzlich über die Gewebekbank verfügbar sind. Die Gefahr der immunologischen Potenz, d.h. der Übertragung von Viren, ist sehr gering, da der Grossteil des Meniskusgewebes bradytroph, d.h. minderdurchblutet ist (Rodeo et al. 2000). Des Weiteren kommt es postoperativ bei den meisten Patienten zu einer deutlichen Schmerzreduktion (Stollsteimer et al. 2000), was auch die Langzeitergebnisse von Wirth belegen (Wirth et al. 2002). Diese Art der Meniskustransplantation stellt eine innovative, zukunftsorientierte Behandlungsmethode dar, die vor allem in den Vereinigten Staaten angewandt wird (Wirth et al. 2002; Van Arkel et al. 2002; Carter 1999).

Es stellte sich in einer Studie von Rodeo et al. heraus, dass allogene Meniskustransplantate und azelluläre Kollagengerüste, welche nach Implantation durch Zellen des Empfängerorganismus repopularisiert werden, einem Remodeling unterliegen und zur Bildung eines fibrocartilaginären Regeneratgewebes führen (Rodeo et al. 2000; Rodkey et al. 1999). Das Problem dieser Vorgehensweise besteht darin, dass sich diese intraartikuläre Besiedelung ungeordnet abspielt, weil diese gerade nicht durch Meniskuszellen, sondern durch synoviale Fibroblasten stattfindet (Müller-Rath et al. 2004; Rodeo et al. 2000). Daraus folgt, dass das entstandene Regeneratgewebe eher narbig und qualitativ nicht sehr hochwertig ist. Angesichts der enormen Kräfte, welchen der Meniskus im Kniegelenk

ausgesetzt ist, spielt die Qualität des Gewebes allerdings eine entscheidende Rolle. Eine Qualitätsverbesserung des Regeneratgewebes könnte durch die Besiedelung der Matrix in vitro mit autologen (körpereigenen) Meniskuszellen (Fibrochondrozyten) vor der Implantation erreicht werden, da hierdurch eine stärkere Annäherung des Regenerats an das ursprüngliche Zielgewebe in phänotypischer und vor allem auch in funktioneller Hinsicht ermöglicht wird (Müller-Rath et al. 2004).

Die Herstellung eines Ersatzgewebes, welches aus einem Matrixgerüst, Zellen und spezifischen Stimuli besteht, wird im Allgemeinen als „Tissue engineering“ bezeichnet (Arnoczky 1999). Bei der Knorpelzüchtung besteht eine etablierte und klinisch bereits eingesetzte Methode, mit autologen Chondrozyten besiedelte Matrizes zu transplantieren (MACT). Eine einheitliche Methode zur Besiedelung von Trägermaterialien mit Meniskuszellen fehlt auf dem Gebiet des Tissue engineering bis heute. Mit der klinischen Einführung des Kollagen Meniskus Implantates (CMI®) in Europa und der breiten Forschung auf dem Gebiet des Tissue engineering hat die Entwicklung von Meniskusersatzgewebe an Bedeutung gewonnen und es könnte sich ein vergleichbarer Verlauf wie auf dem Gebiet der Gelenkknorpelreparatur abzeichnen (Müller- Rath et al. 2004; Hunziker 2002).

Ätiologisch wird im Wesentlichen zwischen degenerativen und traumatischen Prozessen unterschieden.

Die über Jahrzehnte auf den Knorpel wirkenden mechanischen Belastungen führen oft zusammen mit einer genetischen Prädisposition zum beschleunigten Verschleiss des Gelenkknorpels. Die zudem altersbedingt abnehmende Regenerationsfähigkeit der Knorpelstruktur und die verminderte nutritive Versorgung führen letztlich zu einer Dekompensation des synovialen Gelenks und begünstigen so die Progredienz der Kniegelenksarthrose (Jüni 2002). Bei älteren Menschen stellen sich diese Symptome häufig im Zuge des Alterungsprozesses des Bewegungsapparates ein.

Neben dem Alter und der Adipositas (Baker et al. 2002) zählen vor allem auch ständige berufliche bzw. sportliche Überlastungen der Kniegelenke zu den

bedeutendsten Risikofaktoren (Groß et al. 2005; Theiler 2002; Stürmer et al. 2000; Felson 1988). Meist resultieren die Schmerzen und Beschwerden im Kniebereich vor allem bei jungen Menschen aus Meniskusrissen. Bei Sportarten wie Fußball oder Handball ist das Kniegelenk in 10-25% aller Verletzungen betroffen (Seil et al. 1998; Schmidt - Olsen et al. 1991). Meniskusläsionen liegen bei 25-40% dieser Verletzungen vor. Aufgrund der Fixation des medialen Meniskus an den Bandapparat ist dieser in seiner freien Verschiebbarkeit eingeschränkt, so dass bei Verletzungen der mediale Meniskus häufiger lädiert ist als der laterale Meniskus (Breul 2003).

Das Ziel einer Therapie ist somit in erster Linie die Schmerzreduktion sowie die Restitution der Beweglichkeit und der Kniefunktion. Die grundsätzliche Problematik der therapeutischen Behandlungen bei Meniskusverletzungen besteht darin, dass die konservative Therapie bisher nur in seltenen Fällen erfolgreich ist. Umso wichtiger für eine erfolgreiche Behandlung sind deshalb die frühzeitige Erkennung und Therapie der Beschwerden sowie nach neueren Therapieansätzen eine möglichst genaue histologische Kenntnis der Meniskuszellen sowie der Zellen in deren Umgebung. Bisher ist jedoch eine Charakterisierung humaner Meniskuszellen in der Literatur nur vereinzelt beschrieben worden. Es ist hinreichend bekannt, dass sich der menschliche Meniskus des Kniegelenks aus vier Zellarten zusammensetzt: überwiegend Fibrochondrozyten, fibroblasten-ähnliche Zellen, wenige Oberflächenzellen (superficial zone cells) und Endothelzellen im äußeren Drittel (Nakata et al. 2001).

Die runden bis polygonalen Fibrochondrozyten liegen in den tieferen Zonen des Meniskus, wo hauptsächlich Kompressionskräfte vorherrschen. Sie liegen meist einzeln – selten in Gruppen von zwei oder drei Zellen – und enthalten große Mengen an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) (Ghadially et al. 1983). Die ovalen bis fusiformen (spindelförmig) fibroblasten-ähnlichen Zellen befinden sich in den oberflächlichen Zonen des Meniskus, wo Zugkräfte wirken. Diese Zellen weisen weder viel Aktivität noch Zytoplasma auf.

Den sich an der Meniskusoberfläche befindlichen „superficial zone cells“ grenzt die Synovialmembran an (Nakata et al. 2001), welche als innerer Teil der

Kniegelenkscapsel an der Basis der Menisci eine lockere Bindegewebsschicht (Synovialis) bildet und sich im Wesentlichen aus den folgenden beiden Zelltypen zusammensetzt:

- Typ-A Synoviozyten haben Makrophagencharakter und werden dem Monozyten- Makrophagen- System zugeordnet (Edwards 1982),
- Typ-B Synoviozyten sind Bindegewebszellen und werden deshalb auch als synoviale Fibroblasten bezeichnet.

Ihre Aufgabe besteht in der Bildung der Gelenkflüssigkeit (Synovia). Sie produzieren Proteinase, Kollagenase, Prostaglandine und Hyaluronsäure, wobei letztere der Synovia ihre viskösen Eigenschaften verleiht (Pitsillides et al. 1993). Hieraus wird deutlich, dass die „superficial zone cells“ des Meniskus in direktem Kontakt zur Synovia stehen.

Humanes Meniskusgewebe setzt sich größtenteils aus Wasser und Kollagen zusammen (Herwig et al. 1984). Dabei befindet sich Kollagen Typ-I in den äußeren zwei Meniskusdritteln, wohingegen sich Kollagen Typ-II vorwiegend im inneren Meniskusdrittel befindet (McDevitt und Webber 1990; Cheung 1987).

Ziel dieser Dissertation ist es, in vitro angezüchtete Zellen eindeutig als Meniskuszellen zu charakterisieren und mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen von den bereits oben erwähnten, anatomisch eng anliegenden, synovialen Fibroblasten abzugrenzen. Dies ist in Zukunft für das Tissue engineering des Meniskus von elementarer Bedeutung, um die Zellen auch richtig und eindeutig differenzieren zu können.

Im Folgenden wird zunächst dargestellt, wie mit Hilfe von Färbungen mit entsprechenden Antikörpern der phänotypische Unterschied zwischen Meniskus- und Synovialzellen sichtbar gemacht und dadurch eine exakte Differenzierung dieser beiden Zellarten erreicht werden kann.

Der zweite Teil der Dissertation geht der Frage nach, ob und inwiefern sich Zellen nach einmonatiger Kultur bezüglich ihres Aussehens und ihrer Expressionseigenschaften verändern und wie sie auf die Zugabe von

I. Einleitung

unterschiedlichen Zytokinen reagieren. Es ist deshalb im Rahmen dieser Einleitung erlaubt, kurz auf die unterschiedlichen Zelltypen und die verwendeten Zytokine hinzuweisen.

1.1 Makroskopische Anatomie des Meniskus

Die Menisken des menschlichen Kniegelenks sind transportable Gelenkflächen und gleichen zum einen die Inkongruenz zwischen Femurkondylen und Tibiaplateau aus, zum anderen vergrößern sie deren Kontaktfläche (Abb. 1). Seitlich sind die Menisken mit der Gelenkkapsel (*Capsula articularis*) verwachsen und mit ihren freien Enden ventral und dorsal im Bereich der *Eminentia intercondylaris* fixiert. Der sichelförmige mediale Meniskus ist mit der hinteren Region des *Ligamentum collaterale mediale* verwachsen und deshalb in seiner freien Verschiebbarkeit erheblich limitiert. Vor allem bei plötzlicher energischer Außenrotation der Tibia kommt es häufig durch einen verstärkten Zug des Meniskus zu einem Abriss an dessen vorderer Insertion. Ventral können die beiden Menisken durch ein *Ligamentum transversum genus* verbunden sein. Vom lateralen Meniskus zieht zum vorderen Kreuzband (VKB) ein *Ligamentum meniscofemorale anterius* sowie zum hinteren Kreuzband (HKB) ein *Ligamentum meniscofemorale posterius*. In diesen Ligamenten sowie in den Ansatzfasern der Menisken sind Mechanorezeptoren lokalisiert, welche für die muskuläre Steuerung sowie für die Sicherung der Statik und Kinematik des Kniegelenks wichtig sind (Platzer, 1991).

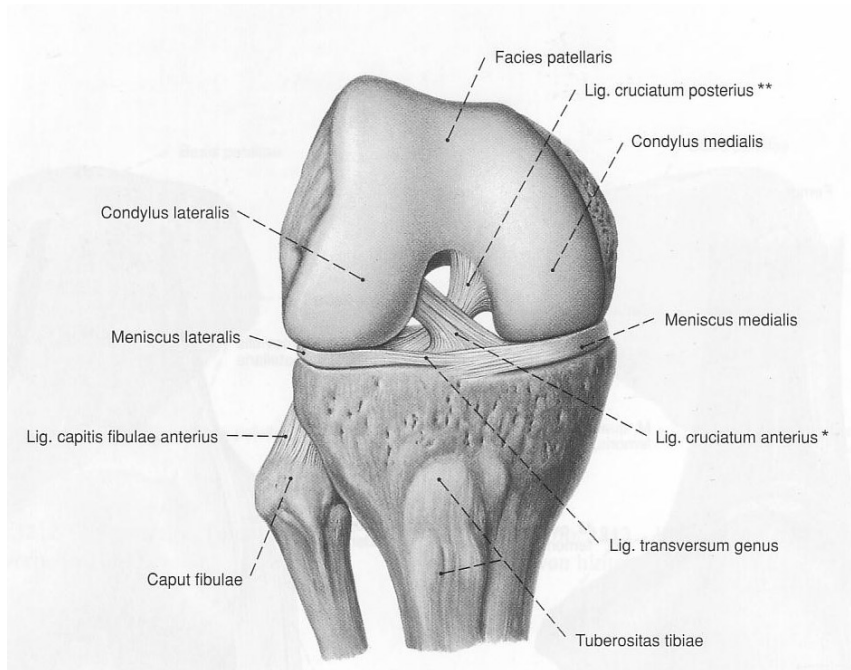


Abb.1: Kniegelenk nach Entfernung der Gelenkkapsel, von vorne
(aus Sobotta: „Atlas der Anatomie des Menschen“ Band 2, Urban und Fischer,
München, 2000)

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Kollagenfasertextur haben gezeigt, dass sich am Meniskus drei unterschiedliche Schichten abgrenzen lassen:

- ein die Meniskusoberfläche bedeckendes Fibrillennetz (Abb. 2 c-1),
- eine lamellenartig aufgebaute Schicht jeweils an der tibialen und femoralen Oberfläche (Abb. 2 c-2),
- ein zentraler Hauptanteil (Abb. 2 c-3).

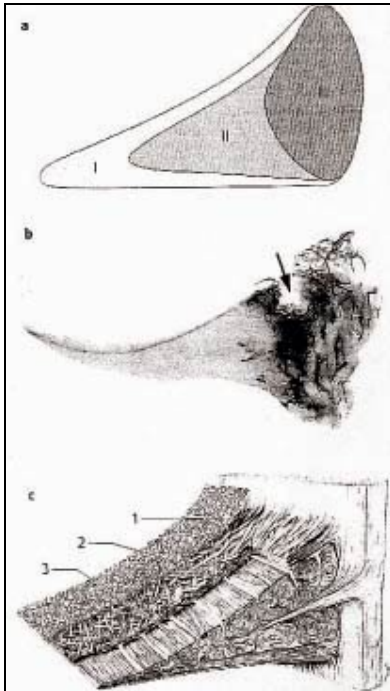


Abb.2: a-c: Struktur und Blutgefäßversorgung der Menisken (aus: Kohn, D.: „Das Knie“, Thieme, Stuttgart 2000)

- a) Zone I: Faserknorpelzone
- Zone II: Zone mit Faserknorpel und straffem kollagenfasrigem Bindegewebe
- Zone III: Zone mit straffem kollagenfasrigem Bindegewebe
- b) Querschnitt durch den hinteren Bereich eines medialen Meniskus eines Erwachsenen
- c) 1) Die Meniskusoberfläche wird auf der tibialen und femoralen Seite von einem Geflecht dünner Fibrillen bedeckt.
- 2) Unter dem oberflächlichen Netzwerk liegt an der tibialen und femoralen Oberfläche eine Schicht lamellenartiger Fasersysteme. Im Bereich der Basis sind die parallel verlaufenden Kollagenfibrillenbündel radiär ausgerichtet; im inneren Abschnitt überkreuzen sich die Faserlamellen unter verschiedenen Winkeln.
- 3) Im zentralen Hauptanteil der Menisken sind die Kollagenfibrillenbündel in allen Bereichen zirkulär ausgerichtet.

Aufgrund der Keilform der Menisken und der Fixation seiner Enden an der Eminentia intercondylaris entstehen durch die wirkenden Kräfte Zugspannungen, die über die zirkulären Kollagenfibrillen auf die Insertionszonen am Tibiaplateau übertragen werden. Die Druckbeanspruchung des Tibiaplateaus wird auf diese Weise reduziert (Abb.3).

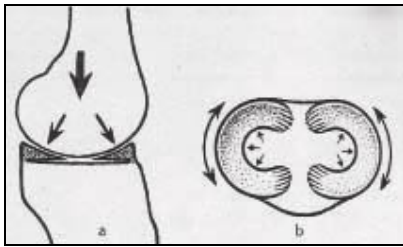


Abb. 3: *Verschiedene Funktionen des Meniskus und Druckverteilung (aus: Debrunner, A.M.: „Orthopädie, Orthopädische Chirurgie“, Huber, Bern 2002)*

Aus klinischer Sicht ist dieser Mechanismus für die operative Therapie von Meniskusläsionen bedeutend, denn im Falle einer vollständigen Durchtrennung der zirkulären Fasern kann der Gelenkdruck nicht in Zugspannungen umgesetzt werden, was einer kompletten Meniskusentfernung gleich kommen würde.

Hinsichtlich der Nahttechniken zur Meniskusrefixation ist die Stabilität vertikaler Meniskusnähte besser als die horizontaler Nähte, da bei einer vertikalen Naht mehr Faserbündel von der Naht erfasst werden können.

Die Vaskularisation der Menisken findet über die Gefäße der Gelenkkapsel statt, die zentripetal die Menisken durchsetzen. Während im ersten Lebensjahr der Meniskus noch vollständig vaskularisiert ist, entwickelt sich ab dem zweiten Lebensjahr nahe der inneren Zirkumferenz eine avaskuläre Zone. Im Erwachsenenalter ist lediglich der äußere Teil der Meniskusbasis durchblutet. Das Fehlen von Blutgefäßen sowie das Vorhandensein von Faserknorpel in den inneren zwei Meniskusdritteln erklärt die schlechte Heilungstendenz von Meniskusläsionen in diesem Bereich (Sweigart et al. 2001).

1.2 Histologie des Meniskus

Meniskuszellen stellen wie bereits erwähnt keine einheitliche Population dar (Nakata et al. 2001). Während die Zellen der oberflächlichen Schichten eher oval bis fusiform (spindelförmig) sind, sind die Zellen der tieferen Zonen rund bis polygonal. Erstere weisen weder viel Aktivität noch eine größere Menge an Zytoplasma auf, weshalb ihr Nukleus abnormal lang erscheint. Letztere beinhalten runde, polygonale Zellen, die meist einzeln - selten in Gruppen von zwei oder drei Zellen - vorkommen und eine große Menge an rauem endoplasmatischem Retikulum (rER) enthalten. Trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit mit artikulären Chondrozyten exprimieren Meniskuszellen vorwiegend Kollagen Typ-I. Die hierdurch entstandene Schwierigkeit der Klassifikation hat zum Terminus „Fibrochondrozyt“ geführt (Webber et al. 1985). Fibrochondrozyten sind in einem In-vitro- Organkulturmodell in der Lage, sich aus ihrer Matrix zu lösen, in eine Defektmatrix (Fibringerinnsel) einzuwandern und eine extrazelluläre Matrix zu bilden (Webber et al. 1989).

Die extrazelluläre Matrix besteht aus vier Komponenten: Wasser, fibrilläre Komponenten, Adhäsionsglykoproteine und Proteoglykane.

Humanes Meniskusgewebe besteht zu 72% aus Wasser, zu 22% aus Kollagen, zu 0,8% aus Glukosaminen und Adhäsionsmolekülen (Herwig et al. 1984). Diese prozentualen Anteile variieren je nach Alter, Spezies und Lokalisation innerhalb des Gewebes (McDevitt et al. 1990).

Die fibrillären Komponenten bestehen aus Elastin und Kollagen. Die Konzentration an Kollagen ist im äußeren Teil höher als im Inneren: Im äußeren Teil beträgt sie 80,1%, im inneren Teil 69,3% des Trockengewichts (Cheung 1987). Meniskusgewebe setzt sich aus Kollagen Typ-I, II, III, V und VI zusammen - dabei macht Kollagen 60 bis 70% des Trockengewichts aus. Hierbei überwiegt quantitativ Kollagen Typ-I, welches mehr als 90% des Kollagens im Meniskus ausmacht (Eyre & Wu 1983).

Eine Studie, die von Cheung durchgeführt wurde, zeigt, dass im Rindermeniskus in den äußeren zwei Dritteln Kollagen Typ-I dominiert, während sich das innere Meniskusdrittel zu 60% aus Kollagen Typ-II und zu 40% aus

Kollagen Typ-I zusammensetzt. McDevitt und Webber (1990) eruierten, dass Kollagen Typ-II vorwiegend in der inneren, nicht vaskularisierten Region des humanen Meniskusgewebes vorkommt. Des Weiteren ist es im hyalinen Gelenkknorpel enthalten und wird von den Chondrozyten produziert.

1.3 Histologie der Synovialis

Die Synovialmembran (Synovialis) geht an der Basis der Menisci in die innerste Schicht der Gelenkkapsel über und umschließt somit als Endothel die Kniegelenkshöhle. Ähnlich wie beim Knorpel liegen auch die Zellen der Synovialis getrennt voneinander in einer Matrix, die reich an Kollagenfibrillen und Proteoglykanen ist. Die Gelenkflüssigkeit (Synovia) wird von der Synovialmembran sezerniert und dient der Versorgung des Knorpelgewebes mit Nährstoffen (Debrunner 2002). Diese Synovialis setzt sich aus den folgenden beiden Zelltypen zusammen:

Typ A-Synoviozyten haben Makrophagencharakter und werden dem Monozyten-Makrophagen-System zugeordnet (Edwards 1982). Sie sind an der Immunabwehr beteiligt, sind phagozytosefähig und werden bei Entzündung aktiviert. Außerdem können sie Immunglobuline und Komplementfaktoren binden (Theofilopoulos et al. 1980).

Typ-B Synoviozyten sind Bindegewebszellen und werden deshalb auch als synoviale Fibroblasten bezeichnet. Ihre Aufgabe besteht in der Bildung der Synovia. Sie produzieren Proteinase, Kollagenase, Prostaglandine und Hyaluronsäure, wobei letztere der Synovia ihre viskösen Eigenschaften verleiht (Pitsillides et al. 1993).

In synovialen Fibroblasten ist Kollagen Typ-I nachweisbar (Riquet et al. 2000; Hunter et al. 1984).

Da dem Synovialgewebe ein Abschluss gegenüber dem Gelenkraum fehlt, kann es eher zu entzündlich-exsudativen Prozessen durch lokale intraartikuläre Reize kommen. Dabei kommt es nach Plasmaexsudation und

Fibrinpolymerisation allerdings nicht zur Granulationsgewebsbildung mit anschließender Umwandlung in eine zellarme dichte Kollagenfasernarbe, sondern zur Proliferation ortsständiger unreifer synovialer Bindegewebszellen, zur Zottenvermehrung und Dickenzunahme. Schließlich kommt es zur Bildung eines funktionsfähigen Synovialgewebes, welches sich wiederum entzünden kann. Durch ihre Ausstattung mit lysosomalen Enzymsystemen können diese aggressiven Zellverbände sowohl das Kollagenfasernetz als auch die Proteoglykane des Gelenkknorpels zerstören.

1.4 Zytokine

Zytokine können nach ihrer biologischen Funktion allgemein in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine eingeteilt werden (Löffler, Petrides 2003).

Bei Zytokinen handelt es sich um Eiweißmoleküle, die den Zellen als „Botenstoffe“ dienen, über die sie kommunizieren. Sie werden nach Verletzungen, Infektionen oder Stress sezerniert und wirken bereits im pico- bis nanomolaren Bereich. Sie können die Synthese anderer Zytokine beeinflussen und können additiv, antagonistisch oder synergistisch wirken.

Die verwendeten Synovialis- und Meniskuszellen wurden im Rahmen dieser Dissertation mit folgenden Zytokinen stimuliert:

IL-1 β , TNF- α und TGF- β .

Mittels PCR wurden die Effekte der Stimulation der Genexpression folgender Faktoren bestimmt:

- Bone morphogenetic protein- 2 (BMP-2) und transforming growth factor β (TGF- β) als chondrogene Faktoren,
- Interleukin- 1 β (IL-1 β), Interleukin- 6 (IL-6), Interleukin- 18 (IL-18) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) als Entzündungsfaktoren,
- Matrixmetalloproteinasen 1,- 2,- 3 (MMP-1,- 2,- 3) als matrixabbauende Faktoren.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) und fibroblast growth factor (FGF) kamen ebenfalls zur Anwendung sowie Kollagen Typ-I und -II als Matrixkomponenten.

1.5 Fragestellung

Das Auffinden und charakterisieren geeigneter Zellen ist unabdingliche Voraussetzung zur Besiedelung eines Kollagengerüsts für eine erfolgreiche Therapie von Meniskusschäden im Rahmen des Tissue engineering. Insbesondere wurde beabsichtigt, eine genauere Charakterisierung von humanen Fibrochondrozyten zu ermöglichen, um auf diese Weise bei Untersuchungen zum Tissue engineering von Menisken eine Qualitätskontrolle bereitzustellen, sowohl hinsichtlich der eingesetzten als auch hinsichtlich der nach dem Engineering erhaltenen Zellen.

Schwerpunkt dieser Dissertation ist der phänotypische Vergleich synovialer Fibroblasten mit Fibrochondrozyten aus Menisken in vitro. Die Unterscheidung zwischen Synovialiszellen und Fibrochondrozyten gestaltet sich bisher schwierig.

Für die Experimente standen sowohl Meniskus- als auch Synovialiszellen von Patienten zur Verfügung. Nach deren Anzucht wurde je an einem Teil der Zellen (Meniskus- und Synovialiszellen) eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, die Hälfte der restlichen Zellen wurden in die 1. Subkultur überführt und mit Wachstumsfaktoren wie IL-1 β , TNF- α und TGF- β induziert und der PCR zugeführt.

Die andere Hälfte der Zellen stand der immunzytochemischen Färbung mit Antikörpern wie ASO2, Thy-1 und Kollagen Typ-I zur Verfügung.

Ein Ziel weiterer Experimente war der Vergleich uninduzierter und induzierter Zellen auf Protein-Ebene. Hierbei wurden die Untersuchungsergebnisse auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Meniskus- und Synovialiszellen sowie auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Patienten untereinander hin verglichen. Auf immunzytochemischer Ebene sollte die Frage geklärt werden,

I. Einleitung

ob es einen Unterschied im Proteinexpressionsverhalten zwischen Meniskus- und Synovialiszellen gibt.

II. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebe

Das Biopsiematerial wurde von fünf Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen nach deren Einverständniserklärung gewonnen. Die Namen der Patienten wurden aus Gründen des Datenschutzes abgekürzt. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Fakultät genehmigt. Die Patienten hatten sich aufgrund einer Gonarthrose einer bikompartimentellen Knieendoprothese (KTP) unterzogen. Bei makroskopisch intaktem Meniskus (meist Außenmeniskus) wurde die Entscheidung gefällt, diesen für die vorliegende Studie zu asservieren (analog zu Brocklehurst et al. 1984). Zusätzlich wurde Synovialis entnommen.

Diese beiden Gewebe wurden bis zur weiteren Verarbeitung jeweils in einem sterilen, mit NaCl gefüllten Gefäß gelagert.

Da bei jedem der fünf Patienten sowohl Meniskus- als auch Synovialisgewebe reseziert wurde, war es möglich, nicht nur zwischen den Zelllinien eines Patienten zu differenzieren (also Meniskus- und Synovialiszellen). Es konnten auch die jeweiligen Zelllinien der unterschiedlichen Patienten miteinander verglichen werden (z.B. Meniskuszellen der Patienten EH, HF, DK, WA und GSC untereinander; entsprechendes gilt auch für Synovialiszellen).

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Medien

5-Br-4-Cl-3-Indolyl- β -Galactosid	Fa. Peqlab, Erlangen
Acrylamid	Fa. Serena, Ratingen
Agarose	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Amoniumpersulfat	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Ampholine	pH 5-10; Fa. Pharmacia Biotech, Erlangen
Antimykotikum Fungizone	Amphoterin B; Fa. Gibco, Karlsruhe
Basenpaarmarker	100 bp DNA Ladder; Gibco, Rockville, USA

II. Material und Methoden

Beta-Mercaptoethanol	Fa. Biorad, München
Bis- Acrylamid	Fa. Serena, Ratingen
Collagenase	Typ 11; Fa. Sigma, St. Louis, USA
Desinfektionslösung Antifect	Fa. Schülke & M., Nordsstedt
Desinfektionslösung Barrycidal	Fa. Schröder, Stuttgart
Dimethylformamid	Fa. Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Fa. Merck, Darmstadt
Dispase	Grad II; Fa. Roche, Mannheim
DNA- Synthese- Kit	Adv. RT-for- PCR Kit; Fa. Clontech, Palo Alto, USA
DNA- Verdau	RNase- free DnaseSet; Quiagen, Hilden
Ethidiumbromid	10mg/ml; Fa. Amersham, Braunschweig
Ferricyanid	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Ferrocyanic	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Filterpapier	3mm; Fa. Whatman, Kent, UK
Formaldehyd	Fa. Fischer, Zürich, CH
Fetales Kälberserum	Myoclone Super Plus FCS; Fa. Gibco, Rockville, USA
Glutaraldehyd	Fa. Merck, Darmstadt
Glycerin	Fa. Sigma, St. Louis, USA
H ₃ PO ₄	Fa. Merck, Darmstadt
Harnstoff	60,06 g/mol; Fa. Merck, Darmstadt
Insulin- Transferrin- Selen	Fa. Gibco, Rockville, USA
Magnesiumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
Nährmedium	DMEM/F12(1:1)Medium flüssig; Fa. Gibco, Rockville, USA
NaOH	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt
PBS- Puffer	Dulbecco's PBS W/O Ca ²⁺ /Mg ²⁺ ; Fa. Gibco, Rockville, USA
PCR- Kit	AmpliTaq DNA Polymerase; Fa. Perkin Elmer, Rodgun- Ingesheim

II. Material und Methoden

Penicillin/Streptomycin- Lsg.	10000E/10000µg/ml; Fa. Gibco, Rockville, USA
Pepton	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Albumin Bovine; Fa. Sigma, St. Louis, USA
RNA- Extraktion	RNeasy Mini Kit; Fa. Quiagen, Hilden
TEMED	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Tris- Base	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau 0,4%	Fa. Sigma, St. Louis, USA
Trypsin EDTA 1x	Fa. Gibco, Rockville, USA
Vitamine	Vitamins MEM Solution 100x; Fa. Gibco, Rockville, USA
Zitronensäure	Fa. Sigma, St. Louis, USA

2.1.3 Antikörper

AS02

Cat.No.DIA 110, 1mg/ml, Dianova, Hamburg
aus Maus spezifisch gegen humane Fibroblasten
Konzentration 1:100 (Dianova, Hamburg)

Sekundärantikörper:

Peroxidase- konjugierter Ziege anti- Maus IgG
(H+L)-AK
Konzentration 1:500 (Dianova, Hamburg)

Thy-1

aus F15.42.1- Kulturüberständen spezifisch
gegen humane Fibroblasten
Konzentration 1:100 [McKenzie & Fabre, 1981]

Sekundärantikörper:

Peroxidase- konjugierter Ziege anti- Maus IgG
(H+L)-AK
Konzentration 1:500 (Dianova, Hamburg)

Kollagen I

Cat.No.: AF5610, 0,5mg/ml

Clone: I- 8H5

Mouse IgG2a/ k

Konzentration 1:50

Acris Antibodies, Hiddenhausen

Sekundärantikörper:

Ziege anti- Maus IgG

Konzentration 1:500

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Analysenwaage Sartorius H51	Sartorius, Göttingen
6- Well- Makroplatten	Fa. Greiner, Nürtingen
96- Well- Makroplatten	Fa. Greiner, Nürtingen
Absaugpumpe	Suc- O- Mat, Fa. Bachofer, Reutlingen
Brutschrank	CO2 Auto- Zero, Fa. Haraeus, Hanau
Einmalskalpelle	Cutfix; Braun Medical AG, Melsungen, CH
Elektrophoresekammer	DNA pocket block UV; Fa. Biozym, Hess. Oldendorf
Eppendorf- Cups	0,5ml, 1,8ml; Eppendorf, Hamburg
Farbdiafilm	Kodak Ektachrome 100 HC; Kodak, Stuttgart
Fotoapparat Vario-Orthomat	Fa. Leitz, Wetzlar
Gelkammer	Fa. Apligene, Heidelberg
Gewebekulturflaschen	25cm ² , 75cm ² ; Fa. Eppendorf, Hamburg
Insulinspritzen	1ml; Fa. Braun Medical AG, Melsungen, CH
Kanülen	Sterican 0,9 x 70mm; Braun Medical AG, Melsungen, CH
Lichtmikroskop	Fluovert FS Mikroskop; Fa. Leitz, Wetzlar
Mehrfachpipette	Fa. Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Fa. Bosch, Hildesheim
Mikrozentrifuge	Typ 5412; Fa. Eppendorf, Hamburg
PCR- Block	Typ UNO II; Fa. Biometra, Göttingen

II. Material und Methoden

Perfusorspritzen	25ml / 50ml; Fa. Braun Medical AG, Melsungen, CH
Petrischalen	Cellstar, 94/16mm, steril; Fa. Greiner, Nürtingen
Photometer	Spectrophotometer V- 530; Fa. Jasco, Groß Umstadt
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg Greiner Medical AG, Kremsmünster, Österreich
Schüttler	Ika MTS4; Fa. Bachofer, Reutlingen
Software	AnalySIS; Soft- Imaging Software, Münster
Sterilbank	Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl
Sterilfilter	Milisart 0,45µm; Sartorius, Göttingen
Sterilfilter	Millex GV 0,22; Fa. Millipore, Molsheim
Stickstofftank	Taylor Wharton Cryogenetics; Fa. Bachofer, Reutlingen
Vakuum- Absaugpumpe	Laboport N 86, KNF Neuberger, Freiburg
Wasserbad	DT Hetotherm; Fa. Bachofer, Reutlingen
Zellzentrifuge	Beckman GPR, München

2.2 Zellkulturmethoden

2.2.1 Allgemeines

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der synovialen Fibroblasten und der Fibrochondrozyten fand im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ statt. Es wurden nur sterile Materialien benutzt. Falls diese nicht steril geliefert werden konnten bzw. keine sterilen Einwegartikel waren, wurden sie gereinigt, eingetütet und von der Zentralsterilisation der Universitätsklinik Tübingen sterilisiert. Unsterile Lösungen wurden mittels Sterilfilter der Porengröße 0,22µm filtriert.

2.2.2 Anlegen von Primärkulturen synovialer Fibroblasten

Die humanen Synovialis-Biopsate wurden im OP unverzüglich in ein steriles Gefäß überführt und mit PBS-Puffer versetzt, um eine Kontamination und ein vorzeitiges Austrocknen zu vermeiden. Nach der Befreiung der Synovialis von Fettgewebe im Labor erfolgte die Zerkleinerung in einer Petrischale - unter Zugabe von PBS-Puffer - mittels zweier Skalpelle zu ca. 1 mm³ großen Stücken. Auf diese Weise konnte eine Oberflächenvergrößerung erreicht werden und der Dispase und Collagenase eine größere Angriffsfläche zum Verdau geliefert werden. Das zerkleinerte Gewebe wurde in PBS aufgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Petrischale mehrmals mit PBS gespült, um die vollständige Aufnahme des Gewebes zu gewährleisten. Der erste Waschgang bestand aus dem Zentrifugieren mit 1000 U/ min, 8 min, 4°C und Abnehmen des Überstandes mit einer Pipette. Nach der erneuten Aufnahme des Sediments in 40 ml PBS und kurzem Schütteln folgte ein zweiter Waschgang. Danach erfolgte die Aufnahme des Pellets in jeweils 2,5 ml Dispase und Collagenase (Vorverdau), ein kurzes Schwenken und eine 30-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C mit erneutem Waschgang. Nach Aufnahme des Sediments in 5 ml Collagenase (Hauptverdau), kurzem Schwenken des Röhrchens und 2-stündiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C folgte die Zugabe von 20 ml PBS und 2 ml Vollmedium, um den Verdau zum Erliegen zu bringen. Der darauf folgende Waschgang wurde zwei Mal wiederholt. Den Abschluss bildete die Aufnahme des Sediments in der entsprechenden Menge Vollmedium, dessen Suspension, der Transfer in 6-Wellplatten bzw. 250 ml-Gewebekulturflaschen zur Anzucht und die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.3 Anlegen von Primärkulturen von Fibrochondrozyten aus Meniskuszellen

Nach der Überführung des Meniskusgewebes mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus dem Originalgefäß in eine Petrischale, der Zugabe einiger ml PBS (um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden) erfolgte dessen breiartige Zerkleinerung mittels zweier Skalpelle, die Aufnahme des Gewebebreis in PBS

mit einer abgebrochenen 5 ml Pipette und dessen Platzierung in ein 50 ml Röhrchen. Mehrmaliges Spülen der Petrischale mit PBS ermöglichte die vollständige Aufnahme des Gewebebreis. Der erste Waschgang setzte sich zusammen aus dem Zentrifugieren bei 1500 U/ min, 7min, 4°C und dem Abnehmen des Überstandes mit einer Pipette. Zurück blieb das Pellet (Zellmasse). Nach Auffüllen des Röhrchens auf 40 ml folgte ein zweiter Waschgang, die Aufnahme des Sediments in 5 ml 0,4 %-ige Collagenase, kurzes Schwenken und eine 4-stündige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Der Gewebebrei musste dabei stets vollständig bedeckt sein, um einen optimalen Verdau zu ermöglichen. Die Aufnahme des Sediments in 40 ml Medium (ohne FCS und ohne Zusätze), kurzes Schwenken und erneutes Waschen erfolgten zweimal. Hierdurch wurde die Herauslösung der Zellen aus der Matrix erleichtert. Den Abschluss bildete die Aufnahme des Sediments in der entsprechenden Menge Vollmedium, dessen Suspension, die Aussaat in 6-Wellplatten bzw. 250 ml-Gewebekulturflaschen zur Anzucht und die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.4 Aufbereitung des FCS

Dem Auftauen des FCS in einem Wasserbad bei 37°C folgte dessen Temperaturerhöhung auf 56°C und eine 30-minütige Inkubation (dabei Inaktivierung des Komplements). Nach Zugabe zweier Messerspitzen Aktivkohle kam die Flasche mit dem FCS für 30 min auf einen Schüttler (dabei Entfernung von Lipopolysacchariden und organischen Komponenten). Bei der sich anschließenden Sterilfiltration kam ein Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm zum Einsatz. Abschließend wurde das FCS in 50 ml Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Herstellung des Vollmediums

Vor dem Ansetzen und Schütteln des Zellkulturmediums bewährte sich das kurze schonende Auftauen der benötigten Reagenzien (bis auf ITS und DMEM) im Wasserbad. Das FCS/ DMEM Vollmedium setzte sich zusammen aus

500 ml Dulbecco's MEM Nutrient Mix F12 Grundmedium, 50 ml 10 %-igem fetalen Kälberserum (bei allen Versuchen aus derselben Charge stammend), 12 ml Vitaminen, 6 ml Fungizone, 10 ml Penicillin/ Streptomycin und 500 µl ITS.

2.2.6 Mediumwechsel

Durch die metabolische Aktivität der Zellen wurde das Vollmedium je nach Zellart, Zellaktivität und Zelldichte unterschiedlich schnell verbraucht. Eine Abweichung des pH-Wertes äußerte sich in einem Farbumschlag nach gelb (saurer Bereich), was einen Mediumwechsel erforderlich machte.

Medienwechsel fand alle zwei Tage statt, um ein konstantes Milieu und gleiche Bedingungen für alle Zellen zu gewährleisten. Nach dem Vorwärmen des Vollmediums (im Wasserbad) bei 37°C erleichterte eine kleine Pumpe das Absaugen (mit einer Pasteurpipette) des verbrauchten Mediums unter der Sterilbank. In die 6-Wellplatten wurden pro Well-Loch 3,5 ml, in die 50 ml-Gewebekulturflaschen je 7 ml und in die 250 ml-Gewebekulturflaschen je 14 ml frisches Vollmedium gegeben.

Der wachsende Zellrasen durfte während des Mediumwechsels nicht mit der Pipette berührt werden, da sich die Zellen dadurch ablösen und absterben könnten. Zur weiteren Inkubation kamen die Zellen erneut in den Brutschrank. Hinsichtlich des Wachstumsvorgangs erwies sich die sorgfältige Behandlung der Zellkulturen und eine möglichst kurze Phase außerhalb des Brutschranks als günstig.

2.2.7 Subkultivierung der Zellen

Durch Expansion der Zellen kam es nach wenigen Tagen zur Konfluenz (dichtest mögliche Anordnung der adhärenenten Zellen als Monolayer), was ein Umsetzen der Zellen in andere Wells bzw. Flaschen erforderlich machte, um eine möglichst schnelle Zellvermehrung zu erreichen. Weiteres Zellwachstum führt zu Kontaktinhibition, wenn man die Zellen weiter wachsen lässt, d.h. zum Stopp des Wachstums und der Mitoseaktivität - die Zellen können absterben.

Das Absaugen des abgestandenen Mediums erleichterte eine Pasteurpipette. Beim darauf folgenden Waschschrift wurden je 10 ml PBS pro Flasche bzw.

2 ml PBS pro Well hinzu gegeben, die Flasche bzw. das Well geschwenkt, das PBS abgesaugt und dieser Vorgang zwei Mal wiederholt.

Zum Ablösen der Zellen benötigte man 7 ml bzw. 1,5 ml Trypsin EDTA (Einwirkzeit ca. 7 min bei 37°C), zur Blockierung der Protease Trypsin je 3 ml bzw. 0,5 ml des Vollmediums. Sanftes Beklopfen der Flasche bzw. des Wells an der Tischplatte erleichterte die vollständige Ablösung der Zellen - zur Kontrolle bewährte sich ein Phasenkontrastmikroskop. Nach Überführung der Zellen in ein 50 ml Röhrchen, Zentrifugieren (bei 1500U/ min, 7 min, 4°C) und Abnehmen des Überstandes wurde das übrig gebliebene Zellpellet in neue Flaschen bzw. Wells eingebracht, die zuvor beschriftet und mit jeweils 10 ml bzw. 1,5 ml Vollmedium gefüllt worden waren.

2.2.8 Zellzahlbestimmung

Grundbaustein für Versuchsansätze ist die Aussaat einer definierten optimalen Zellzahl. Die Bestimmung der Zellzahl konnte mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer- Zählkammer) vorgenommen werden. Der Reinigung der Zählkammer mit 70%-igem Ethanol schloss sich das Auflegen des leicht angefeuchteten Deckglases an (die Newton-Ringe müssen sichtbar sein), das Füllen der Zählkammer mit der gut durchmischten Zellsuspension und die Auszählung von mindestens vier von neun Quadraten unter dem Mikroskop.

Jedes Quadrat besaß eine Fläche von 1 mm², was bei einer Tiefe der Zählkammer von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl ergab. Durch Multiplikation des Mittelwertes der gezählten Quadrate mit dem Faktor 10⁴ erhält man die Zellzahl/ml in der Suspension (Lindl, Bauer 1989).

2.2.9 Zellaussaat

Konfluente Primärkulturen wurden, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, mit Trypsin/ EDTA vom Boden der Gewebekulturflaschen bzw. Wells abgelöst, mit frischem Vollmedium suspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die für die jeweiligen Versuche erforderlichen Zellkonzentrationen konnten durch Verdünnung mit Vollmedium leicht eingestellt werden.

II. Material und Methoden

a) Zellaussaat für Immunzytochemie

Sobald die Flaschen bzw. Wells konfluent waren (vollständige Bedeckung des Bodens mit Zellen), wurden die Zellen eines Patienten gepoolt (d.h. alle Zellen eines Patienten vereinigt, jedoch Trennung von Synovialis- und Meniskuszellen). Ein Teil davon - 6 ml - wurde für die Immunzytochemie verwendet. Die Aussaat erfolgte mit einer Eppendorf-Multipipette in sterile 24-Well-Kulturplatten. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen/ Well in 1 ml Vollmedium gelöst, um die Reaktion mit folgenden Antikörpern zu untersuchen: Anti-AS02 und Anti-Thy1 und Anti-Kollagen I.

b) Zellaussaat für Wachstumsfaktoren

34 ml wurden aus dem Zellpool entnommen und für Induktionsexperimente verwendet. Drei Zytokine und eine Negativkontrolle waren relevant. Zu 4 ml Vollmedium (VM) traten 8 ml Zellsuspension aus dem Pool und jeweils noch die Wachstumsfaktoren hinzu (s. Tabelle 1).

VM (ml)	Zellsuspension(ml)	Zytokin (in μl) gelöst in 2ml VM	Endkonzentration	induziert mit
4	8	7	1 ng/ml	IL 1β
4	8	140	10 ng/ml	TGF β
4	8	14	0,1 μ l/ml	TNF α
6	8	-	-	-

Tab. 1: Konzentrationen der Wachstumsfaktoren

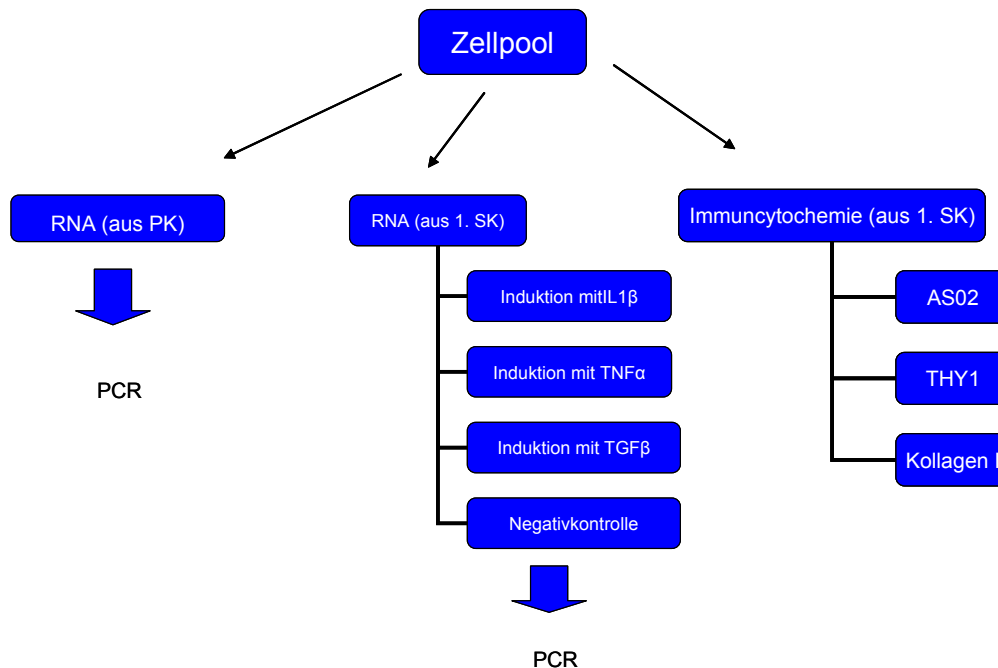


Abb. 4: Strukturierung der vorliegenden Untersuchungen

<i>PK</i>	<i>Primärkultur</i>
<i>SK</i>	<i>Subkultur</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerasekettenreaktion</i>

2.3 RT/ Polymerasekettenreaktion (reverse Transkriptase/PCR)

2.3.1 Allgemeines

Die Aufarbeitung der RNA, DNA sowie PCR erfolgte mit einem eigens dafür verwendeten Satz Pipetten, sterilen Pipettenspitzen, sterilisierten Eppendorf-Cups und Reagenzien.

2.3.2 RNA-Extraktion

Es wurde ein RNeasy MiniKit der Firma Qiagen zur RNA-Extraktion benutzt. Nach Ablösen der adhären Zellen mit Trypsin, Zentrifugieren und Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Aufnahme des Sediments in 1 ml PBS und die Überführung in 1 ml Eppendorf Cups. Erneutem Zentrifugieren, Absaugen des Überstandes und Durchmischen (Vortex) folgte das Aufnehmen in 350 µl RLT-

Puffer. Der RLT-Puffer enthielt neben Mercaptoethanol auch Guanidiumthiocyanat (GITC), welches neben der Zelllyse auch die Inaktivierung der RNasen bewirkt, so dass intakte RNA isoliert werden konnte. Die Homogenisierung des Lysats wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Kanüle erreicht. Durch Zugabe von weiteren 350 µl 70 %-igem Ethanol haftete die RNA an der Kieselerde-Matrix. Dem Zentrifugieren (15 s bei 10000 U/ min) folgte ein Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer (15s bei 10000 U/ min), eine 15-minütige Inkubation mit RNase-freier DNase (Vermeidung einer möglichen Kontamination mit DNA), ein Waschschriff mit RW-1-Puffer, zwei weitere Waschschriffe mit 500 µl RPE-Puffer (20000 U/ min, jeweils 15 s und 1 min), die Eluierung der RNA aus der Matrix mit 40 µl RNase-freiem Wasser. Die vorhandene RNA-Menge in der Probe wurde mit dem Spektrophotometer gemessen. Dazu wurde die RNA in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt und bei 260 nm in Quarzküvetten vermessen.

2.3.3 cDNA-Synthese

Bei der Synthese der cDNA wurde ein Kit der Firma Clontech verwendet, welches alle für die Reaktion erforderlichen Reagenzien beinhaltet.

Je nach Konzentration erfolgte von der zuvor aus den Zellen extrahierten und vermessenen RNA eine Entnahme des benötigten Volumens, welches nach Bedarf 1 µg oder 2 µg RNA ergab, und das Auffüllen in 0,5 ml Eppendorf-Cups mit 25 µl DEPC-Wasser (Wasser versetzt mit Diethylpyrocarbonat 1:1.000). Hierzu wurden je 1 oder 2 µl oligo dT-Primer hinzupipettiert, die Lösung vermischt und zentrifugiert. Durch Erhitzen der Probe im Thermocycler (2 min, 70°C) entfaltete sich die RNA und verband sich mit dem Primer. Daran schloss sich eine sofortige Kühlung des Cups mit der Probe auf Eis an, um eine RNA-Rückfaltung zu vermeiden.

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

- 5x reaction buffer bestehend aus : 8 µl
250mM Tris- HCl, pH 8,3
375mM KCl
15mM MgCl₂

II. Material und Methoden

- dNTP-Mix jeweils 10 mM 2 µl
- MMLV reverse transcriptase 200 units/µl 2 µl
Moloney- Murine Leukemia Virus
- recombinanter RNase Inhibitor 40 units/µl 1 µl

Nachdem jede Probe je 6,5 µl oder 13 µl des Mix erhielt, folgte das Vermischen, Zentrifugieren und Erhitzen der Proben im PCR-Block für 1 h bei 42 °C, so dass optimale Bedingungen für den Ablauf der reversen Transkription herrschten. Nach einer Stunde erhöhte man die Temperatur im Block für 5 min auf 95 °C, um die Synthese der cDNA zu stoppen. Dann erfolgte das Ergänzen des Endproduktes (DNA) mit jeweils 80 µl oder 160 µl DEPC-Wasser, dessen Durchmischen, Zentrifugieren und Lagern bei -20°C. Als Qualitätskontrolle der cDNA eignete sich die PCR-Amplifikation mit einem GAPDH Primer, da die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-mRNA als ein Enzym der Glykolyse in jeder natürlichen Zelle vorhanden und per PCR nachweisbar ist. Bei vorhandenem GAPDH ist eine Bande bei 983 bp sichtbar. Zusätzliche Banden lassen auf Verunreinigungen schließen.

2.3.4 Primer - Sequenzen, Basenpaarlängen und Annealing-Temperaturen

TGFβ 161bp
s 5`- GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T-3`
as 5`- AGG CTC CAA ATG TAG GGC AGG-3`
60°C, 1 min

BMP-2 671bp
s 5`- TCA TAA AAC CTG CAA CAG CCA ACT CG-3`
as 5`- GCT GTA CTA GCG ACA CCC AC-3`
60°C, 2 min

MMP-1 438bp
s 5`- GGT GAT GAA GCA GCC CAG-3`

II. Material und Methoden

as 5`- CAG TAG AAT GGG AGA GTC-3`

64°C, 1 min 30 s, Puffer 7,5µl und MgCl 6,5µl

MMP-2 480bp

s 5`- CCA CGT GAC AAG CCC ATG GGG CCC-3`

as 5`- GCA GCC TAG CCA GTC GGA TTT GAT G-3`

60°C, 2 min, Puffer 7,5µl und MgCl 6,5µl

MMP-3 425bp

s 5`- CCT GGG ACG CCA GCC AAC TGT G-3`

as 5`- TGC TTG GGA AAG CCT GGC TCC AT-3`

64°C, 1 min 30 s

IL1β 802bp

s 5`- ATG GCA GAA GTA CCT AAG CTC GC-3`

as 5`- A CAC AAA TTG CAT GGT GAA GTC AGT T-3`

60°C, 45s

IL6 628bp

s 5`- ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3`

as 5`- G AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG-3`

60°C, 45 s

IL18 341bp

s 5`- GCT TGA ATC TAA ATT ATC AGT C-3`

as 5`- GAA GAT TCA AAT TGC ATC TTA T-3`

60°C, 45 s

Kollagen I 466bp

s 5`- AGC GCT GGT TTC GAC TTC AGC TTC C-3`

as 5`- CAT CGG CAG GGT CGG AGC CCT-3`

64°C, 1 min 30 s, Puffer 7,5µl und MgCl 6,5µl

II. Material und Methoden

Kollagen II 414bp
s 5`- CTG GCT CCC AAC ACT GCC AAC GTC-3`
as 5`- TCC TTT GGG TTT GCA ACG GAT TGT-3`
65°C, 1 min

FGF α (=ECGF) 119bp
s 5`- TTA CTG TGA GAC TGT ATG TT-3`
as 5`- TGA GTA GCT TAT ACA TTG TA-3`
50°C, 2 min

VEGF 311bp¹
s 5`- GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC-3`
as 5`- CTC CTG CCC GGC TCA CCG CCT CGG CTT-3`
55°C, 2 min

2.3.5 Protokoll der PCR

Für die RT-Polymerase-Ketten-Reaktion wurde ein Taq-Polymerase-Kit der Firma Clontech verwendet, welches alle nötigen Reagenzien enthielt.

Für die gleichzeitige Amplifikation mehrerer Proben erfolgte die Anfertigung eines so genannten Master-Mixes, in den alle Komponenten außer der patienteneigenen cDNA hinein pipettiert wurden und der auf die jeweiligen Eppendorf Cups verteilt wurde.

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

- 5 μ l 10x PCR Puffer 15 mM MgCl₂ (Perkin Elmer)
- 0,5 μ l dNTP's je 10 mM
- 1 μ l Upper Primer 100 pmol
- 1 μ l Lower Primer 100 pmol
- 0,5 μ l Taq Polymerase 5 units/ μ l (Perkin Elmer)
- 37 μ l Aqua dest., PCR Grade
- 5 μ l cDNA

¹ Es werden drei Splicevarianten amplifiziert: 180 bp, 311 bp und 384 bp.

II. Material und Methoden

Die Reagenzien wurden nach dem Auftauen sofort auf Eis gelegt, zügig in 0,5 ml Eppendorf Cups pipettiert und vermischt - zuletzt kam die Taq Polymerase zum Master Mix, da sie sehr hitzeempfindlich war und erst kurz vor Beginn der Reaktion hinzugefügt werden sollte. Eine Erhitzung des PCR-Blocks auf 94°C schloss sich an sowie die Überführung der Proben direkt vom Eis in den PCR-Block. Dieser Vorgang wird als Hot Start bezeichnet. Bei 94°C für 45 s erfolgte eine Denaturierung der DNA (Trennung der Doppelstränge voneinander). Nach Abkühlen des PCR-Blocks auf die für das jeweilige Primerpaar optimale Annealing-Temperatur (diejenige Temperatur, bei der 50% der Primer an die cDNA hybridisiert sind) lagerten sich die Primer an jeweils einem Strang an und amplifizierten die entsprechende Zielsequenz zwischen beiden Primern mit Hilfe der Taq Polymerase und der dNTPs. Die ideale Zeitspanne für die Annealing-Temperatur konnte ebenfalls entsprechend dem Primerpaar differieren und betrug zwischen 1 und 2 min. Der Block wurde für 2 min bei 72°C erhitzt, der optimalen Temperatur für die Taq Polymerase. Dieses Enzym katalysierte den Aufbau des gegenläufigen DNA-Strangs mit dNTPs. Dieser Vorgang wird auch als Extension bezeichnet. Daraufhin fing der Zyklus erneut an und die cDNA wurde bei 94°C denaturiert, bei der Annealing-Temperatur die Primer angelagert und bei 72°C der Strang synthetisiert. Nach 30 Zyklen erfolgte der letzte Extensionsschritt bei 72°C für 10 min. Da nach jedem Zyklus ein weiterer Doppelstrang für die erneute Synthese zur Verfügung stand, vermehrte sich das amplifizierte DNA-Segment exponentiell und war mit Hilfe der Elektrophorese im Agarosegel sichtbar.

Mittels PCR wurden die Effekte der Stimulierung der Genexpression bestimmt. Zu beachten ist, dass es sich hierbei um eine semiquantitative Meßmethode handelt. Die PCR-Produkte wurden der Gelelektrophorese zugeführt, um die Banden sichtbar zu machen. Dabei repräsentiert die Stärke der PCR-Banden den jeweiligen Expressionsstatus des untersuchten Gens. Die Stärke der Bande verhält sich proportional zur spezifischen RNA-Menge, die sich nach Zytokinstimulation in den Synovialis- bzw. Meniskuszellen befand. Somit ist sie ein Maß für die jeweilige Stimulation auf die Genexpression. Stellt sich die Bande z.B. stärker dar als diejenige der unstimulierten Kontrolle, so wurde die

Genexpression durch dieses Zytokin angeregt. Fällt dagegen die Bande schwächer aus, so war die Genexpression vermindert.

2.3.6 Nachweis der amplifizierten Produkte mittels Gelelektrophorese

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

a) Reagenzien

Folgende Reagenzien wurden zur Durchführung verwendet:

Agarosegel:

- 400 ml 20xTBE-Puffer
- 6 g Agarose
- 30 µl Ethidiumbromid

20xTBE-Puffer:

- ad. 1 l Aqua dest.
- 121 g Trisaminomethan 1M
- 67,1 g Borsäure 1M
- 7,44 g EDTA-Natrium 20mM

40xTAE-Puffer

- ad. 1 l Aqua dest.
- 193,6 g Trisaminomethan 1,6 M
- 108,9 g Natriumacetat 0,8 M
- 15,2 g EDTA-Natrium 20 mM

Ladepuffer:

- 250 ml 40xTAE-Puffer
- 5 ml Glycerin
- 2,75 ml Aqua dest.
- 1 ml Bromphenolblau
- 1 ml Xylene cyanol

100 bp-Ladder-Mix:

- 80 µl Ladepuffer
- 50 µl ddH₂O
- 30 µl bp-Ladder

b) Durchführung:

Nach der Zugabe von 6 g Agarose zu 20 ml 20-fachem TBE-Puffer und 380 ml Aqua dest. in einen Erlenmeyer-Kolben, 10-minütigem Erhitzen in der Mikrowelle bei 360 Watt (bis im Gel keine Schlieren mehr sichtbar waren), Zugabe von 30 µl Ethidiumbromid, Auskühlen des Gels auf einem Magnetrührer bis auf ca. 60°C, Platzierung eines Kamms in die Gelkammer (Zinken machten Platz für die späteren Proben möglich) wurde das Gel in die Kammer gegossen und nach dem Polymerisieren (Festwerden) großzügig mit 1xTBE-Puffer bedeckt. Es erfolgte die Vermischung von jeweils 20 µl des PCR-Produkts mit 5 µl Ladepuffer und Hinzufügen von 20 µl der Mischung in die einzelnen Aussparungen. Zum Vergleich der Banden wurden noch in eine seitliche Aussparung 15 µl des 100 bp-DNA-Eichmarkers pipettiert. Das Gel lief an einem Netzgerät bei 60 Volt und einem Strom zwischen 30 und 50 mA. Nach 30 min waren die DNA-Stücke aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und ihrer entsprechenden Laufgeschwindigkeit voneinander getrennt und die gesamte Kammer wurde mit UV-Licht bestrahlt und die sichtbar gewordenen Banden fotografiert.

2.4 Immunzytochemische Charakterisierung der Zellen

Um eine Kontamination mit unerwünschten Zelllinien, wie z. B. Makrophagen und Endothelzellen auszuschließen, wurde eine immunzytochemische Färbung zur Bestimmung des Zelltyps durchgeführt.

2.4.1 Prinzip der Immunzytochemie

Zur Sichtbarmachung der spezifischen Antigene einer Zelle werden zwei Antikörper eingesetzt, ein primärer und ein sekundärer. Während der primäre Antikörper mit seinem F(ab)₂-Fragment das Antigen erkennt und bindet, bleibt sein Fc-Fragment frei. Der sekundäre Antikörper ist mit einem Enzym - einer Peroxidase - gekoppelt und erkennt das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Durch Substratzusatz kann der Ort sichtbar gemacht werden, an dem sich das Antigen befindet.

2.4.2 Protokoll der Immunzytochemie

Die Aussaat in 24-Well-Platten führte zum Heranwachsen einer konfluenten Zellkultur im Laufe von 24 h. Diese Zellen wurden am darauf folgenden Tag zweimal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Nach einer 10-minütigen Fixierung der Zellen bei Raumtemperatur mit Formaldehyd wurden sie für 5 min bei -20°C mit Ethanol erneut fixiert. Nach wiederholtem zweimaligem Spülen mit PBS erfolgte zur Hemmung endogener Peroxidasen eine 30-minütige Inkubation mit 0,1 %-igem Phenylhydrazin, mehrere Waschschriffe mit PBS-Puffer, eine einstündige Inkubation mit 1 %-igem BSA (zur Blockierung unspezifischer Antigenbindungsstellen), die Zugabe der zellspezifischen Primärantikörper auf die Wells (Ausparung der Negativkontrollen) und eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Zur Anwendung kam ein Antikörper für Kollagen I (Konzentration 1:50), sowie der fibroblastenspezifische Antikörper AS02 (1:100), der an ein membranständiges Protein auf humanen Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft bindet, ohne jedoch auf Endothelzellen, Blutzellen oder an extrazelluläre Matrix zu binden (Saalbach et al. 1996).

Des Weiteren wurde der Antikörper Thy-1 (F15421) in der Konzentration 1:100 verwendet. Das Antigen ist ein dem T-Zell-Antigen auf T-Zellen der Maus

II. Material und Methoden

verwandtes Antigen, das auf humanen Zellen mesodermaler Herkunft exprimiert wird, nicht jedoch auf menschlichen T-Zellen. Zu den antigenproduzierenden Zellen gehören Fibroblasten, Epithelzellen und hämatopoetische Stammzellen (Chen et al. 1999).

Am darauf folgenden Tag wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween die nichtgebundenen Antikörper herausgewaschen. Danach wurde mit dem zweiten Antikörper, einem biotinylierten anti-mouse jeweils bei ASO2 und Thy-1 und anti-goat Immunglobulin bei Kollagen I weitergearbeitet. Den zweiten Antikörper verteilte man sparsam auf alle Zellen einschließlich der Negativkontrollen bis der Boden bedeckt war und inkubierte bei 37°C für 2 h. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit PBS-Tween und danach mit PBS-Puffer wurde mit Detektionsreagenzien - in unserem Fall mit einem AEC-Kit - weitergearbeitet. Dabei vermischte man den vorgegebenen Puffer, die AEC-Stammlösung und die Hydrogen-Peroxyd-Lösung. Nach Inkubation bei Raumtemperatur - in der Regel 10 bis 30 min - kam es zum Farbumschlag, der mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops festgehalten wurde.

III. Ergebnisse

3.1 Die Patienten

Patient	Gewebe	Alter	Geschlecht	OP	Diagnose
EH	Men & Syn	75	w	KTP	Gonarthrose
HF	Men & Syn	77	m	KTP	Gonarthrose
DK	Men & Syn	77	m	KTP	Gonarthrose
WA	Men & Syn	72	w	KTP	Gonarthrose
GSC	Men & Syn	77	w	KTP	Gonarthrose

Tab.2: Patientendaten

EH, HF, DK, WA, GSC

Men & Syn

w

m

KTP

jeweilige Patienten

Meniskus-und Synovialisgewebe

weibliches Geschlecht

männliches Geschlecht

Knietotalprothese

3.2 Zellkultur

Bereits einige Tage nach Aufarbeitung des Gewebes und dessen Aussaat waren mittels eines Lichtmikroskops die ersten adhärennten Zellen sichtbar.

Je nach Inokulationsmenge dauerte es ca. 4-6 Wochen bis die Flaschen konfluent waren. Diese Phase bezeichnet man als Primärkultur.

Wie bereits erwähnt weisen synoviale Fibroblasten eine ovale, blastenartige Struktur auf, wohingegen Fibrochondrozyten aus Menisken eine eher stern- oder astrozytenförmige Struktur haben. Lässt man die Zellen zu lange in einer Kultur, beginnen sie dreidimensional zu wachsen. Dies ist sowohl bei den Synovialis- als auch bei den Meniskuszellen der Fall. Es kommt zu keiner weiteren Proliferation, es löst sich lediglich allmählich der Zellrasen ab.

3.3 Immunzytochemie

Nachdem die Zellen der einzelnen Flaschen vereint wurden - nach Patienten getrennt sowie nach Meniskus von Synovialis - erfolgte erneut die Aussaat in

III. Ergebnisse

6-Well-Platten. Dies stellt die Überführung in die 1. Subkultur dar. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank waren die Wells konfluent und die darin befindlichen Zellen adhärent.

	AS02	Thy-1	Kollagen I
EH			
Synovialis	+	+	+
Meniskus	+	+	-
HF			
Synovialis	+	+	+
Meniskus	+	+	+
DK			
Synovialis	+	+	+
Meniskus	+	+	+
WA			
Synovialis	+	+	+
Meniskus	+	+	+
GSC			
Synovialis	+	+	+
Meniskus	+	+	+

Tab.3: Immunzytochemische Färbung der Synovialis- bzw.

Meniskuszellen mit AS02, Thy-1 und Kollagen I

- + Färbung positiv
- Färbung negativ

AS02	+	10 (10)
Thy-1	+	10 (10)
Kollagen I	+	9 (10)
Kollagen I	-	1 (10)

Tab.4: Immunzytochemische Färbung, Übersicht

- + Färbung positiv
- keine Färbung

in Klammern Anzahl der Proben insgesamt

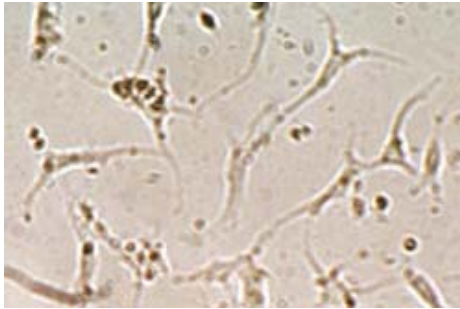


Abb.5a: Meniskuszellen (HF)
17. Tag nach Aussaat
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

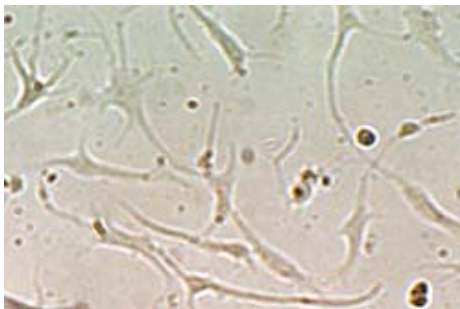


Abb.5b: Meniskuszellen (HF)
25. Tag nach Aussaat
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

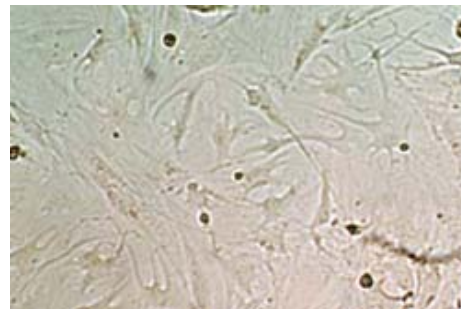


Abb.6: Synovialiszellen (HF)
25. Tag nach Aussaat
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

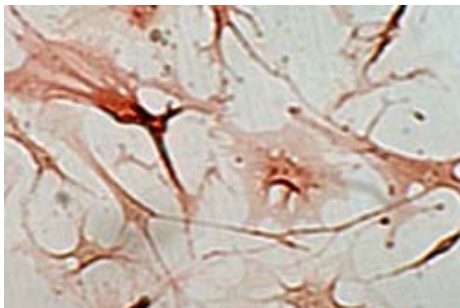


Abb.7a: Meniskuszellen (HF)
mit Antikörpern gegen AS02
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

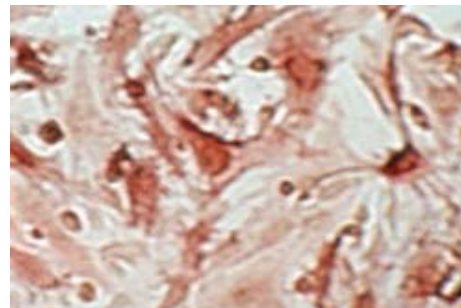


Abb.8a: Synovialiszellen (HF)
mit Antikörpern gegen AS02
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

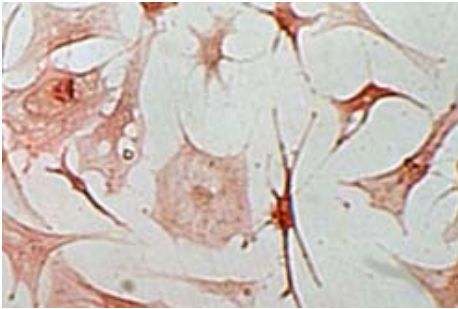


Abb.7b: Meniskuszellen (HF)
mit Antikörpern gegen Thy-1
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

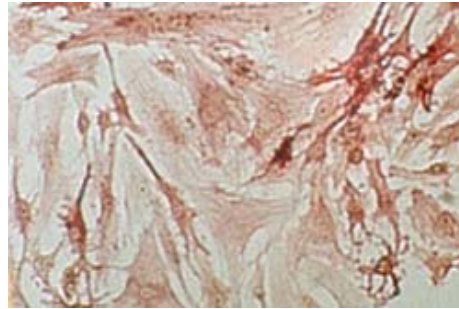


Abb.8b: Synovialiszellen (HF)
mit Antikörpern gegen Thy-1
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

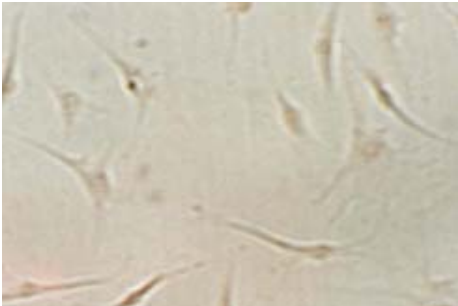


Abb.7c: Meniskuszellen (HF)
Negativkontrolle
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

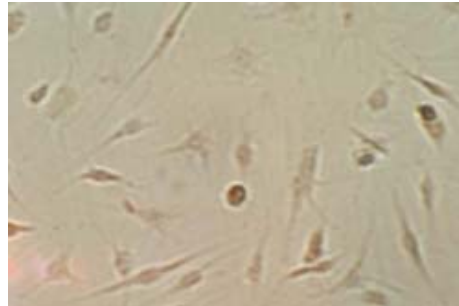


Abb.8c: Synovialiszellen (HF)
Negativkontrolle
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

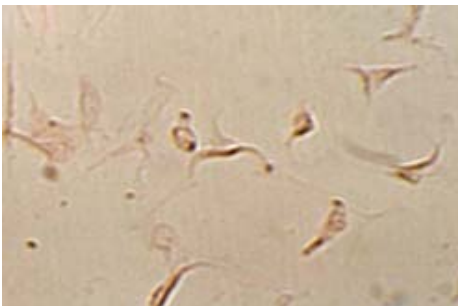


Abb.7d: Meniskuszellen (HF)
mit Antikörpern gegen Kollagen I
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

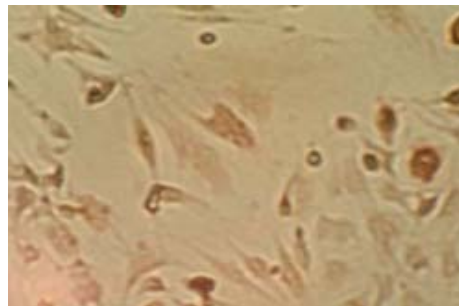


Abb.8d: Synovialiszellen (HF)
mit Antikörpern gegen Kollagen I
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)



Abb.7e: Meniskuszellen (HF)
Negativkontrolle
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

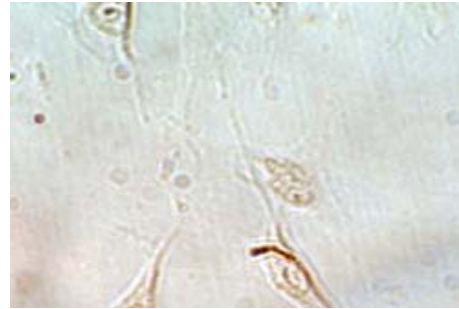


Abb.8e: Synovialiszellen (HF)
Negativkontrolle
(Vergrößerung 10 x 12,5 –fach)

Bei Färbungen mit dem monoklonalen Antikörper AS02 waren alle 10 Proben positiv.

Im Hinblick auf den Antikörper Thy- 1 waren alle 10 Proben positiv.

Neun der Proben des Antikörpers für Kollagen Typ- I fielen positiv aus, eine negativ.

Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich des Färbeverhaltens zwischen Meniskus- und Synovialiszellen festgestellt werden.

3.4 RT/ PCR

Zur Charakterisierung der einzelnen Zellen diente als weitere Methode die Polymerasekettenreaktion. Die PCR wurde unter strengsten Reinheitskriterien durchgeführt, um Verunreinigungen, die sich als zusätzliche Banden bei der Gelelektrophorese niederschlagen, zu vermeiden. Außerdem wurde vor den PCR-Durchläufen die für die jeweiligen Primer günstigste Annealing-Temperatur ermittelt. Dabei setzte sich das Patientenkollektiv - wie bei der immunzytochemischen Färbung - aus den Zelllinien der fünf Patienten mit jeweils Meniskus- und Synovialiszellen zusammen.

Als Fibrochondrozytenmarker wurde ein Primer für Kollagen II verwendet, auf den das Hauptaugenmerk gerichtet wurde, da hier die größte Diskrepanz auf Proteinebene zu erwarten war.

3.4.1 RNA- Extraktion

Der erste Teil der PCR bestand aus der RNA-Extraktion. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der RNA-Extraktion. Die Extraktion verlief bei allen Proben erfolgreich.

III. Ergebnisse

Patient	Extinktion bei 260 nm	µg/ml RNA	µg RNA
EH Meniskus			
PK	0,0272	54,4	2,176
Neg.Kontr.	0,05	100	4
IL-1β	0,04	80	3,2
TNF-α	0,05	100	4
TGF-β	0,15	300	12
EH Synovialis			
PK	0,1317	263	10,5
Neg.Kontr.	0,07	140	5,6
IL-1β	0,09	180	7,2
TNF-α	0,13	260	10,4
TGF-β	0,01	20	0,8
HF Meniskus			
PK	0,0128	25,6	1,024
Neg.Kontr.	0,06	120	4,8
IL-1β	0,01	20	0,8
TNF-α	0,02	40	1,6
TGF-β	0,18	360	14,4
HF Synovialis			
PK	0,0914	183	7,32
Neg.Kontr.	0,15	300	12
IL-1β	0,19	380	15,2
TNF-α	0,16	320	12,8
TGF-β	0,05	100	4

III. Ergebnisse

Patient	Extinktion bei 260 nm	µg/ml RNA	µg RNA
DK Meniskus			
PK	0,1588	300	12
Neg.Kontr.	0,089	178	7,12
IL-1β	0,0732	146	5,84
TNF-α	0,1646	330	13,2
TGF-β	0,0688	138	5,52
DK Synovialis			
PK	0,18	360	14,4
Neg.Kontr.	0,0983	196	7,84
IL-1β	0,0855	171	6,84
TNF-α	0,1154	231	9,24
TGF-β	0,2429	486	19,44
WA Meniskus			
PK	0,0299	60	2,4
Neg.Kontr.	0,01	20	0,8
IL-1β	0,07	140	5,6
TNF-α	0,02	40	1,6
TGF-β	0,002	4	0,16
WA Synovialis			
PK	0,1424	284,8	11,4
Neg.Kontr.	0,02	40	1,6
IL-1β	0,17	340	13,6
TNF-α	0,16	320	12,8
TGF-β	0,004	8	0,32

Patient	Extinktion bei 260 nm	$\mu\text{g/ml RNA}$	$\mu\text{g RNA}$
GSC Meniskus			
PK			
Neg.Kontr.	0,16	320	12,8
IL-1 β	0,07	140	5,6
TNF- α	0,055	110	4,4
TGF- β	0,03	60	2,4
GSC Synovialis			
PK			
Neg.Kontr.	0,02	40	1,6
IL-1 β	0,01	20	0,8
TNF- α	0,03	60	2,4
TGF- β	0,02	40	1,6

Tab.5: Tabelle gibt die gemessene Extinktion und RNA- Menge für die jeweiligen Patienten an
PK Primärkultur
Negativkontrolle, Induktion mit IL-1 β , TNF- α und TGF- β
in der 1. Subkultur

3.4.2 cDNA- Synthese

Der zweite Teil der RT-PCR besteht in der Umwandlung von RNA in komplementäre DNA, d.h. cDNA. Eine einfache Analyse der Qualität der cDNA-Synthese ist in der Amplifikation von z.B. GAPDH-cDNA gegeben, welche in allen Zellen nachweisbar ist. Als Kontroll- Primer wurde in dieser Arbeit stets GAPDH verwendet. Anschließend wurde das Produkt auf ein Agarose-Gel gegeben. Lagen die Banden bei 983bp, war sowohl die RNA-Extraktion als auch die cDNA-Synthese erfolgreich.

III. Ergebnisse

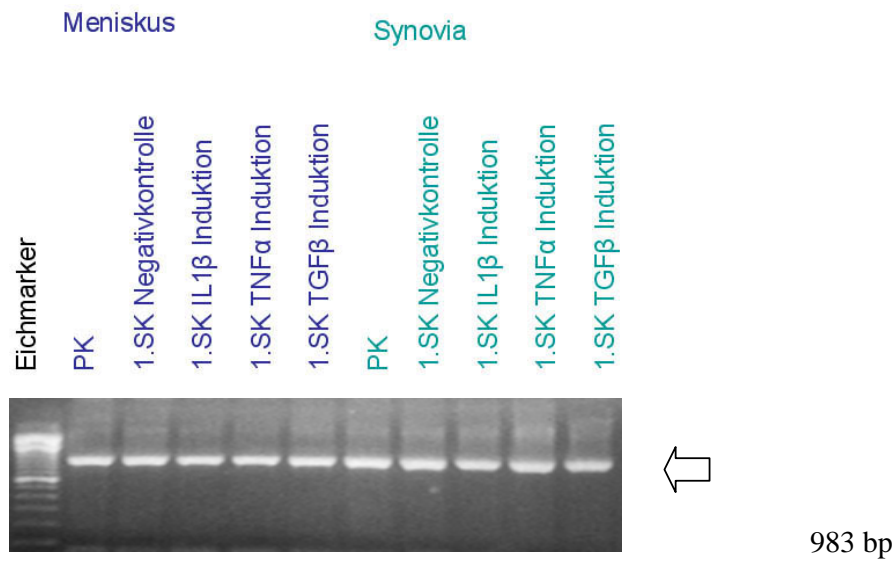


Abb.9: PCR mit GAPDH- Primer bei 60°C und 30 Zyklen zur Überprüfung der cDNA- Synthese Patient HF

3.4.3 PCR- Auswertung

a) Patient EH

EH	Men PK	Men 1.SK-	Men IL1β	Men TNFα	Men TGFβ	Syn PK	Syn 1.SK-	Syn IL1β	Syn TNFα	Syn TGFβ
TGF-β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MMP-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-1β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ECGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

VEGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tab.6: Beurteilung der PCR- Banden für Patient EH

- + *starke Bande*
- + *Bande positiv*
- + *schwache Bande*
- *keine Bande*

Die Zugabe von TGF- β zu den Synovialiszellen resultierte in einem schwächeren RT-PCR- Signal des TGF- β -Amplifikationproduktes im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Die Signale für BMP-2 und MMP-1 wurden durch Zugabe von TGF- β zu den Synovialiszellen supprimiert.

Die MMP-2-Expressionsrate wurde durch Zugabe von TGF- β zu den Synovialiszellen ein wenig geschwächt.

Die MMP-3-Signale fielen schwächer aus nach Zugabe von TNF- α und TGF- β zur 1. Subkultur (SK) und fielen ebenfalls schwächer aus in der uninduzierten Primärkultur (PK) der synovialen Fibroblasten. Dies zeigt die Grenzen der semiquantitativen RT-PCR auf, denn zumindest TNF- α induziert in mesenchymalen Zellen in der Regel die Expression der MMP's.

Das IL-1 β RT - PCR Signal wurde durch Zugabe von TGF- β zu Meniskuszellen geschwächt.

Das RT-PCR Signal von IL-18 wurde durch Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen geschwächt. Die RT-PCR Signale in der uninduzierten PK und der verschiedenen Faktoren in der 1. SK wurden bis auf TGF- β erhöht.

Kollagen Typ- II RT-PCR Signale wurden in Zellen aus der Synovialmembran nicht gefunden.

Die RT - PCR Signale für ECGF fielen schwächer aus bei den unbehandelten Kontrollen und nach Zugabe von IL-1 β , TNF- α und TGF- β zu den synovialen Fibroblasten.

Das RT-PCR Signal für VEGF fiel schwächer aus nach Zugabe von TGF- β zu den Synovialiszellen.

b) Patient HF

HF	Men PK	Men 1.SK-	Men IL1 β	Men TNF α	Men TGF β	Syn PK	Syn 1.SK-	Syn IL1 β	Syn TNF α	Syn TGF β
TGF-β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
IL-1β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ECGF	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
VEGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab.7: Beurteilung der PCR- Banden für Patient HF

- +
 starke Bande |
- +
 Bande positiv |
- +
 schwache Bande |
- *keine Bande* |

Das BMP-2-Signal wurde durch Zugabe von IL-1 β und TNF- α zu den Meniskuszellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen geschwächt; bei den uninduzierten Synovialzellen der PK und der 1. SK sowie nach Zugabe von IL-1 β , TNF- α und TGF- β wurde das BMP-2-RT-PCR Signal verstärkt.

Das RT-PCR Signal für MMP-3 wurde unterdrückt sowohl in der uninduzierten 1. SK als auch nach Zugabe von IL-1 β zu den Meniskuszellen; in der uninduzierten PK der Synovialzellen fiel es dagegen lediglich schwächer aus.

Das IL-1 β -RT-PCR Signal fiel schwächer aus bei den unbehandelten Kontrollen und durch Zugabe von IL-1 β , TNF- α und TGF- β zu den Meniskuszellen.

Das RT-PCR Signal für IL-6 fiel stärker aus nach Zugabe von IL-1 β sowohl zu den Fibrochondrozyten als auch zu den synovialen Fibroblasten.

III. Ergebnisse

Das IL-18 RT-PCR Signal wurde verstärkt in den unbehandelten Kontrollen sowie nach Zugabe von IL-1 β , TNF- α und TGF- β zu den synovialen Fibroblasten.

Kollagen Typ- II RT-PCR Signale wurden in Zellen aus der Synovialmembran nicht gefunden.

Das RT-PCR Signal für ECGF wurde nach Zugabe von IL-1 β und TNF- α zu den Fibrochondrozyten der Meniskuszellen unterdrückt.

c) Patient DK

DK	Men PK	Men 1.SK-	Men IL1 β	Men TNF α	Men TGF β	Syn PK	Syn 1.SK-	Syn IL1 β	Syn TNF α	Syn TGF β
TGF-β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
MMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-1β	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
IL-6	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
IL-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ECGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VEGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab.8: Beurteilung der PCR- Banden für Patient DK

- + *starke Bande*
- + *Bande positiv*
- + *schwache Bande*
- *keine Bande*

Das MMP-1 RT- PCR Signal wurde durch Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen supprimiert.

III. Ergebnisse

Das RT-PCR Signal für IL-1 β wurde durch Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen unterdrückt; von der uninduzierten Subkultur der synovialen Fibroblasten wurde das RT-PCR Signal geschwächt.

Das IL-6 RT-PCR Signal wurde von der PK und 1. SK der Meniskuszellen supprimiert; nach Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen wurde das Signal geschwächt. Bei den synovialen Fibroblasten wurde das RT-PCR Signal für IL-6 in der SK supprimiert.

Durch Zugabe von TNF- α zu den Meniskuszellen wurde das RT-PCR Signal für IL-18 verstärkt; bei den Kontrollen und nach Zugabe der drei Faktoren zu den Fibroblasten fielen die Signale stärker aus.

Kollagen Typ- II RT-PCR Signale konnten in Zellen aus der Synovialmembran nicht nachgewiesen werden.

d) Patient WA

WA	Men PK	Men 1.SK-	Men IL1 β	Men TNF α	Men TGF β	Syn PK	Syn 1.SK-	Syn IL1 β	Syn TNF α	Syn TGF β
TGF-β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BMP-2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-1β	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
IL-6	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
IL-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ECGF	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
VEGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab.9: Beurteilung der PCR- Banden für Patient WA

+ starke Bande + schwache Bande
 + Bande positiv - keine Bande

III. Ergebnisse

Das RT-PCR Signal für BMP-2 wurde in der Kontrolle der 1. SK supprimiert und fiel nach Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen schwächer aus. Bei den synovialen Fibroblasten fiel es in der Kontrolle der 1. SK und nach Zugabe von TGF- β schwächer aus.

Das MMP-1 RT-PCR Signal fiel bei den Kontrollen der PK und 1. SK der Meniskuszellen und ebenfalls nach Zugabe von TGF- β zu den Fibroblasten schwächer aus.

Das RT-PCR Signal für IL-1 β fiel bei den Meniskuszellen schwächer aus in der PK; in der Kontrolle der 1. SK sowie nach Zugabe von TNF- α und TGF- β wurde es supprimiert. Das RT-PCR Signal fiel bei der Kontrolle der PK stärker aus; in der Kontrolle der 1. SK sowie nach Zugabe der Faktoren IL-1 β und TNF- α fiel es schwächer aus und wurde nach Zugabe von TGF- β zu den synovialen Fibroblasten unterdrückt.

Das IL-6 RT-PCR Signal wurde bei den Kontrollen der PK und 1. SK sowie nach Zugabe der Faktoren TNF- α und TGF- β zu den Meniskuszellen supprimiert; bei der Kontrolle der 1. SK und nach Zugabe von TGF- β wurde das Signal ebenfalls unterdrückt.

Das RT-PCR Signal für IL-18 fiel in der Kontrolle der 1. SK sowie nach Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen schwächer aus; es fiel in der uninduzierten Kontrolle der PK sowie nach Zugabe von IL-1 β und TNF- α zu den synovialen Fibroblasten stärker aus. Durch Zugabe von TGF- β zu den Synovialiszellen fiel das Signal schwächer aus.

Kollagen Typ-II RT-PCR Signale konnten in Zellen aus der Synovialmembran nicht festgestellt werden.

Das RT-PCR Signal für ECGF wurde nach Zugabe von IL-1 β zu den Meniskuszellen und ebenfalls nach Zugabe von TGF- β zu den Synovialiszellen unterdrückt.

Für VEGF fiel das RT-PCR Signal schwächer aus bei den beiden Kontrollen der PK und 1. SK bei den Meniskuszellen.

e) Patient GSC

GSC	Men PK	Men 1.SK-	Men IL1 β	Men TNF α	Men TGF β	Syn PK	Syn 1.SK-	Syn IL1 β	Syn TNF α	Syn TGF β
TGF-β	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MMP-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-1β	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
IL-6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
IL-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Koll II	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ECGF	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
VEGF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab.10: Beurteilung der PCR- Banden für Patient GSC

- +
 - +
 - +
 -
- + starke Bande
 + Bande positiv
 + schwache Bande
 - keine Bande

Die RT-PCR Signale für BMP-2 fielen durch Zugabe von IL-1 β und TNF- α zu den Meniskuszellen stärker aus.

Das MMP-3 RT-PCR Signal fiel schwächer aus in der Kontrolle der PK bei den Meniskuszellen.

Die IL-1 β RT-PCR Signale wurden in den Kontrollen der PK und 1. SK sowie nach Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen supprimiert; die Signale wurden ebenfalls supprimiert in den Kontrollen der PK und 1. SK und auch nach Zugabe von IL-1 β und TGF- β zu den Synovialzellen.

Die RT-PCR Signale für IL-6 wurden in den Kontrollen der PK und 1. SK sowie nach Zugabe von TGF- β zu den Meniskuszellen supprimiert; die Signale

III. Ergebnisse

wurden ebenfalls supprimiert in den Kontrollen der PK und 1. SK und auch nach Zugabe von IL-1 β und TGF- β zu den Synovialiszellen.

Das RT-PCR Signal für IL18 fiel in der PK der Synovialiszellen stärker aus.

Kollagen Typ-II RT-PCR Signale konnten in Zellen aus der Synovialmembran nicht nachgewiesen werden.

Die RT-PCR Signale für ECGF wurden in den Kontrollen der PK und 1. SK sowie nach Zugabe von IL-1 β zu den Meniskuszellen unterdrückt; in der PK sowie der 1. SK einschließlich nach Zugabe der Faktoren IL-1 β , TNF- α und TGF- β fielen die RT-PCR Signale schwächer aus.

f) Zusammenfassung der PCR- Auswertung

Die RT-PCR Signale für TGF- β , MMP-1, MMP-2, MMP-3, Kollagen Typ-I und VEGF blieben unverändert.

Das BMP-2- Signal war teilweise verstärkt bei den Meniskuszellen von GSC sowie bei den Synovialiszellen von HF.

Die PCR- Banden von IL-1 β fielen schwächer aus mit Ausnahme von Patient EH.

Die IL-6- PCR- Banden fielen bei drei der fünf Patienten sehr schwach aus (DK, WA, GSC).

Die IL-18- Banden fielen bei den Synovialiszellen sehr stark aus.

Kollagen Typ-II konnte bei keinem der fünf Patienten in der Synovialis nachgewiesen werden.

Die PCR- Banden für ECGF fielen für die Synovialiszellen schwächer aus bei zwei Patienten (EH, GSC).

g) PCR- Beispiele

Im linken Teil jeder Abbildung konnte die Basenpaarlänge (bp) des PCR- Produktes, das durch die Gelelektrophorese zustande kam, abgelesen werden. Dabei korrelierte die Helligkeit der Bande des PCR- Produktes nicht mit der tatsächlich vorhandenen Menge an cDNA, da die Polymerasekettenreaktion eine semiquantitative Methode darstellt.

III. Ergebnisse



Abb.10: Patient DK, MMP-2, 480 bp

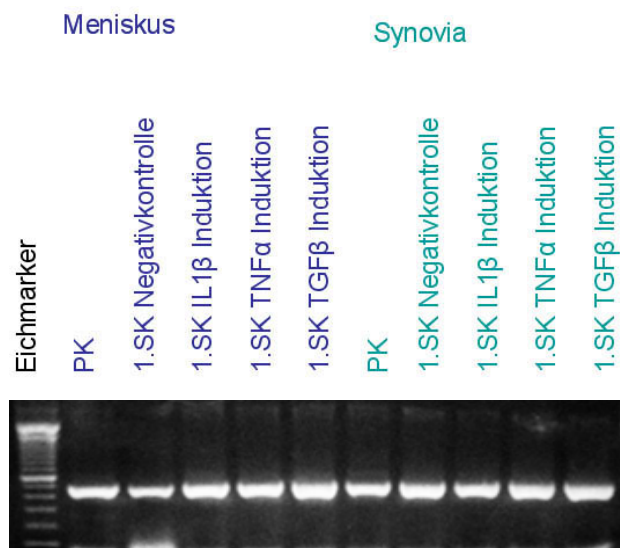


Abb.11: Patient GSC, Kollagen I, 466 bp

III. Ergebnisse

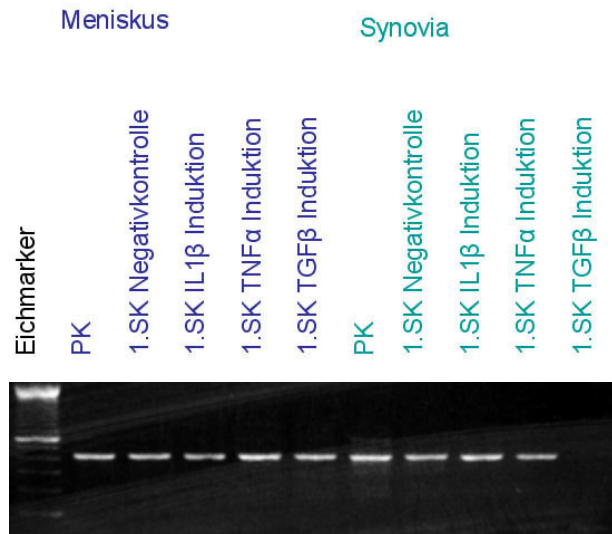


Abb.12: Patient EH, MMP-1, 438 bp

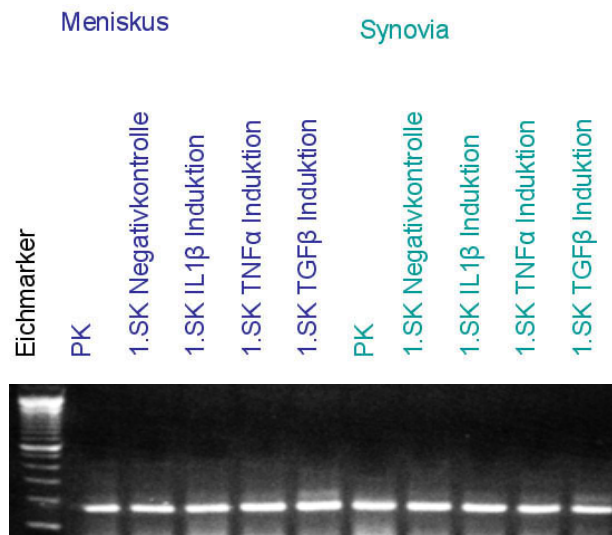


Abb.13: Patient DK, TGF- β_1 , 161 bp

III. Ergebnisse



Abb.14: Patient DK, MMP-3, 425 bp



Abb.15: Patient DK, Kollagen II, 414 bp

III. Ergebnisse

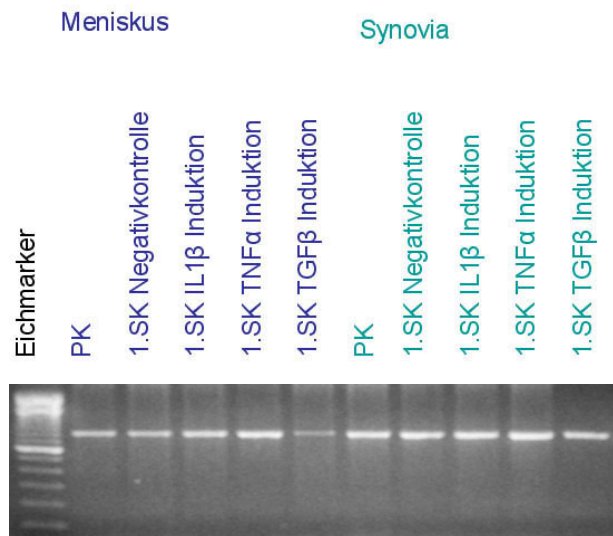


Abb.16: Patient EH, IL-1 β , 802 bp

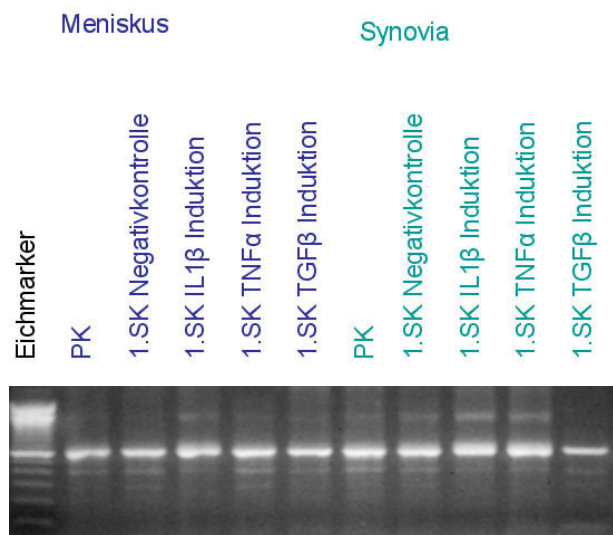


Abb.17: Patient EH, IL-6, 628 bp

III. Ergebnisse

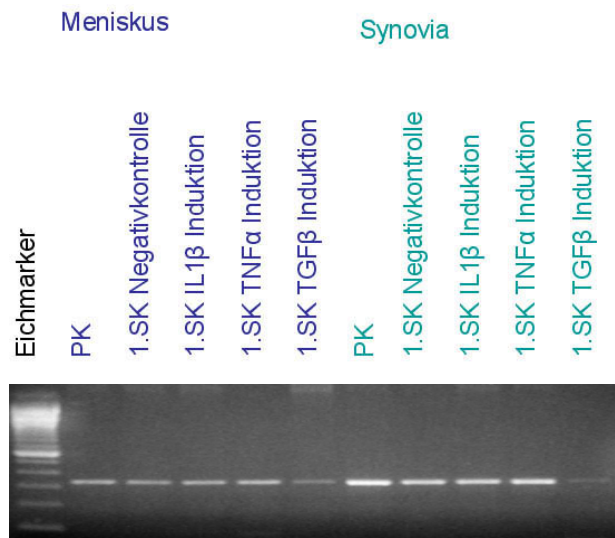


Abb.18: Patient EH, IL-18, 341 bp

IV. Diskussion

Ziel dieser Untersuchungen war es, geeignete Zellen zur Besiedelung eines Kollagengerüsts zu finden und zu charakterisieren, um ein möglichst qualitativ hochwertiges Meniskusersatzgewebe herzustellen. Dieses Ersatzgewebe dient als Grundlage für eine erfolgreiche Therapie von Meniskusverletzungen im Rahmen des Tissue engineering.

Da synoviale Fibroblasten und Fibrochondrozyten aus Meniskuszellen im Kniegelenk eng beieinander liegen, wurden beide Zellarten bereits im OP von einem erfahrenen Operateur getrennt und im Rahmen dieser Arbeit auf immunzytochemischer Ebene und auf Protein-Ebene miteinander verglichen. Bereits während der Kultivierung der Zellen fiel auf, dass die synovialen Fibroblasten deutlich schneller heranwuchsen als Fibrochondrozyten aus Meniskuszellen.

Die beiden Zellarten sind phänotypisch dadurch zu unterscheiden, dass synoviale Fibroblasten eine eher ovale, spindelartige Form aufweisen, die Fibrochondrozyten der inneren Meniskusschichten hingegen eher rund bis polygonal mit astrozytenförmigen Ausläufern sind (Ghadially et al. 1983). Dies erklärt das astrozytenartige Wachstum der Fibrochondrozyten und deckt sich mit der Studie von Moon et al. (1984), die hervorbrachte, dass im peripheren Meniskus fibroblastenartige und im zentralen Teil chondrozytenartige Zellen lokalisiert sind. Das korreliert mit dem funktionellen Aspekt des Gewebes: der innere Teil ist lasttragend, starken Kompressionskräften ausgesetzt und enthält Kollagen Typ-I und -II. Der periphere Teil dient der Schockabsorption, ist Zugkräften ausgesetzt und enthält große Mengen Kollagen Typ-I (Riquet et al. 2000; Arnoczky et al. 1988; Hunter et al. 1984).

Eine Differenzierung von Meniskus- und Synovialiszellen war mit Hilfe der angewandten Antikörper(AS02, THY-1, Kollagen Typ-I) nicht möglich.

Färbungen mit AS02 und THY-1 fielen sowohl bei den synovialen Fibroblasten als auch bei den Fibrochondrozyten positiv aus, da diese Antikörper fibroblastenspezifisch sind und sowohl die Meniskus- als auch die

Synovialiszellen diese Komponente besitzen. Bei beiden handelt es sich um hochspezifische Antikörper (Fa. Dianova). Die Kollagen Typ-I-Färbung fiel bei beiden Zelllinien ebenfalls positiv aus.

Diese Ergebnisse decken sich mit der Studie von Cheung (1987). Nur bei einem Patienten fiel Kollagen Typ-I negativ aus. Bei Letzterem handelt es sich wahrscheinlich um ein Artefakt. Kollagen Typ-I ist in beiden Zellarten vorhanden. Die Negativkontrollen bestätigten die Richtigkeit der Färbung. Eine Unterscheidung dieser beiden Zellarten mittels Färbung mit den oben erwähnten Antikörpern ist nicht möglich.

Nach der Umwandlung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde die Qualität der cDNA- Synthese mittels einer PCR mit einem Primer für GAPDH überprüft. Eine sichtbare PCR- Bande in der Höhe von 983 bp bestätigte die Präsenz der cDNA.

Chondrogene Faktoren

Die BMP-2-Expression war nur bei den synovialen Fibroblasten eines Patienten deutlich gesteigert sowie bei den Fibrochondrozyten eines anderen Patienten durch Stimulierung mit IL-1 β und TNF- α . Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse ergibt sich in dieser Hinsicht kein zuverlässiges Unterscheidungsmerkmal hinsichtlich der Genexpression von BMP-2.

Die einzigen bisher veröffentlichten Studien, in denen die BMP-2 Genexpression in humanen synovialen Fibroblasten untersucht wurde, weisen eine Stimulierung durch die Zytokine IL-1 β und TNF- α nach (Lories et al. 2003; Fowler et al. 1998). Allerdings wurden Zellen von Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht. Dieser Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation nur bei einem der fünf Patienten nachgewiesen werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei den Versuchspersonen im Gegensatz zur Studie von Lories und Fowler eine Kniegelenksarthrose diagnostiziert wurde.

Die gesteigerte BMP-2 Expression bei den Fibrochondrozyten eines Patienten deckt sich mit der Studie von Fukui et al. (2003), der eine Stimulierung der BMP-2 Expression durch IL-1 β und TNF- α in normalen und arthrotischen Chondrozyten nachwies.

IV. Diskussion

BMP-2 stimuliert die Migration von Fibrochondrozyten aus dem inneren Meniskus um 40-50% (Bhargava et al. 1999). BMP's stellen einen Teil des komplexen Regulationssystems für Gewebsdifferenzierung dar (Reddi 1998). Des Weiteren initiieren sie die Proliferation und Differenzierung bei Knorpel und Knochen (Aspenberg 2000).

Trotz seiner verstärkenden Eigenschaft in Bezug auf andere Wachstumsfaktoren (Wahl et al. 1987) sowie der Kollagen I-Synthese von Fibroblasten in vitro (Marui 1997; Roberts et al. 1986) ergaben sich keine signifikanten Effekte auf die Expression von TGF- β durch Stimulation mit den drei Zytokinen IL-1 β , TNF- α und TGF- β .

TGF- β stellt einen der potentesten Mediatoren der Knorpelmatrixsynthese dar (Shuler 2000). Es wirkt entzündungshemmend, inhibiert im Allgemeinen das Zellwachstum und ist ein multifunktionales Regulationspolypeptid (Montesano et al. 1988), welches die Bildung einer extrazellulären Matrix (Varga et al. 1987; Ignatz et al. 1986) verstärkt. Außerdem verstärkt TGF- β die Proteoglykansynthese in Fibrochondrozyten, wie Studien von Tanaka und Collier et al. (Tanaka et al. 1999; Collier et al. 1995) belegen.

Entzündungsfaktoren

Die Ergebnisse für die Faktoren IL-1 β und IL-6 fielen unterschiedlich aus.

IL-1 β ist mit TNF- α an der Progression von Arthrose beteiligt (Caron et al. 1996). Es wirkt proinflammatorisch, wird von Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet und stimuliert die Migration von Zellen aus dem peripheren Meniskusdrittel (Bhargava et al. 1999).

IL-6 wirkt pro- und antiinflammatorisch, wird von Fibroblasten und Leukozyten produziert, wirkt teilweise synergistisch mit IL-1 β und TNF- α (Van de Loo et al. 1995; Guerne et al. 1989). Es stimuliert die Produktion von Chondrozyten, induziert eine Verstärkung der IL-1- Effekte im Sinne einer erhöhten MMP-Synthese und verminderten Proteoglykan- Produktion (Nietfeld et al. 1990).

Eindeutig war jedoch die verstärkte Genexpression von IL-18 bei den synovialen Fibroblasten sowohl mit als auch ohne Stimulierung mit den drei

Zytokinen. Da IL-18 ein proinflammatorisches Zytokin ist, welches von Fibroblasten gebildet wird (Saha 1999), weist dessen verstärkte Genexpression auf eine Synovitis hin. Bei den Fibrochondrozyten war IL-18 nachweisbar, fiel allerdings schwächer aus als bei den synovialen Fibroblasten. Dies deckt sich mit der Studie von Yamamura et al. (2001), der die IL-18 Expression synovialer Fibroblasten von Rheumapatienten und Arthrosepatienten verglich. Dabei war die Genexpression von IL-18 bei den Rheumapatienten deutlich nachweisbar (Gracie et al. 1999), während sie bei den Arthrosepatienten geringer ausfiel. Saha et al. (1999) wiesen IL-18 im Knorpel von Arthrosepatienten nach.

TNF- α - auch Kachektin genannt - wirkt synergistisch mit EGF und PDGF. Es stellt eines der wichtigsten Zytokine der Immunantwort dar und stellt mit IL-1 β eines der beiden proinflammatorischen Zytokine dar, die im Zuge des Arthroseprozesses vorrangig synthetisiert werden (Van de Loo et al. 1995).

Matrixmetalloproteinasen

Die verminderte Expression von MMP-3 konnte bei drei Patienten nachgewiesen werden. Eine Hochregulierung des MMP-2 Gens war nicht feststellbar.

Hinsichtlich der Stimulierung mit IL-1 β und TNF- α waren bei den synovialen Fibroblasten keine signifikanten Effekte nachweisbar. Eine leicht verstärkte Genexpression konnte eher bei den Meniskuszellen festgestellt werden, vor allem beim Vergleich der stimulierten Zellen mit der uninduzierten Primärkultur bzw. 1.Subkultur, deren Expression teilweise abgeschwächt war.

Bei den Synoviozyten eines Patienten kam es zu einer verminderten Expression von allen drei MMP`s durch Induktion mit TGF- β ; ansonsten waren keine signifikanten Effekte durch TGF- β nachweisbar. Dieses Ergebnis entspricht teilweise den Untersuchungen von Aigner und McKenna (2002), die zeigten, dass die Matrixmetalloproteinase-3 (Stromelysin I) in den späten Arthrostadien vermindert exprimiert wird, während andere Metalloproteinasen (MMP-13, MMP-2 und MMP-11) hochreguliert werden.

Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse stellte die Untersuchung der synovialen Fibroblasten und der Fibrochondrozyten auf MMP-1 bis -3 kein zuverlässiges Unterscheidungskriterium dar.

Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, -2,-3) sind proteolytische Enzyme, die an der Knorpeldegradation beteiligt sind, also für den Abbau der Knochen- und Knorpelmatrix zuständig sind. Bevor sie wirken können, müssen sie durch Proteolyse aktiviert werden (Klippel und Dieppe 1998). Wichtige Vertreter dieser Enzyme sind interstitielle Kollagenase (MMP-1), Gelatinase 1 (MMP-2) und Stromelysin (MMP-3), welche vorwiegend an der Knorpel-Knochen-Grenze lokalisiert sind und unter anderem zum destruierenden Geschehen der rheumatoiden Arthritis beitragen (Gravallese et al. 1991; McCachren et al. 1990). Der Nachweis von Aggrekan-Metaboliten aus MMP's in synovialer Flüssigkeit von Patienten mit Arthritis ist ein Hinweis auf fortgeschrittene intraartikuläre Knorpelläsionen (Fosang et al. 1996, 1995).

VEGF und FGF (=ECGF)

Im Rahmen dieser Dissertation waren die PCR-Signale für VEGF weitgehend unauffällig. Jackson et al. (1997) fand heraus, dass die Stimulierung mit TNF- α keine signifikanten Effekte bezüglich der VEGF-Expression ergibt. Insoweit decken sich hiermit auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung. Es ist bekannt, dass VEGF die Wundheilung beschleunigt (Schultz et al. 1987). Molloy et al. (2003) zeigten, dass eine Hochregulierung von VEGF bei der Heilung von Bändern und Sehnen stattfindet. In vitro bewirkt VEGF eine Endothelzellproliferation und Migration (Leung et al. 1989). Jackson et al. (1997) zeigten eine direkte Beeinflussung der Endothelzellen.

In der vorliegenden Studie fiel auf, dass bei den synovialen Fibroblasten von zwei der fünf Patienten die Genexpression für FGF herunterreguliert war, und zwar sowohl in der Primär- als auch in der 1.Subkultur. Bei allen Patienten konnte für die Fibrochondrozyten FGF nachgewiesen werden.

Webber et al. (1985) untersuchten den Effekt von FGF bezüglich der Proliferation von Fibrochondrozyten und stellten fest, dass dieses Zytokin deren

IV. Diskussion

Wachstum stimuliert. Insoweit bestätigen die gegenständlichen Untersuchungen auch die Erkenntnisse von Webber et al.

Nabeshima et al. (1995) führten eine Studie durch, in der sie Fibrinkleber mit dem Zusatz von FGF im transplantierten allogenen Meniskus untersuchten. Es stellte sich heraus, dass FGF die Heilungsrate zunächst beschleunigte, nicht jedoch auf lange Sicht hin. Hashimoto et al. (1992) erreichten die besten Ergebnisse im Bezug auf die Defektheilung des Meniskus durch Zugabe von FGF zum Fibrinkleber. Dabei waren nach einer Heilungsperiode von 24 Monaten bis zu 90% des Defekts geheilt.

Kollagen I und II

Bezüglich Kollagen Typ-I ergaben sich keine signifikanten Effekte durch Stimulierung mit den Zytokinen IL-1 β , TNF- α und TGF- β .

Eine Genexpression für Kollagen Typ-II war bei keinem der fünf Patienten für die Synovialiszellen nachweisbar. Hieraus folgt, dass synoviale Fibroblasten kein Kollagen Typ-II exprimieren. Dies ist verständlich, wenn man sich die Kräfteverhältnisse im Meniskus vergegenwärtigt. Während im zentralen Meniskusteil chondrozytenartige, lasttragende Zellen vorzufinden sind, die Kollagen Typ-I und -II exprimieren, sind die fibroblastenartigen Zellen peripher lokalisiert. Da letztere starken Zugkräften ausgesetzt sind, bestehen sie vorwiegend aus Kollagen Typ-I (Riquet et al. 2000; Hunter et al. 1984). Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Erkenntnissen zahlreicher anderer Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet (McDevitt und Webber 1990; Cheung et al. 1987; Moon et al. 1984).

Kollagen Typ-I ist eine extrazelluläre Matrixkomponente, die in synovialen Fibroblasten enthalten ist (Riquet et al. 2000; Hunter et al. 1984). Hollander et al. (1995) fanden heraus, dass es im Zuge des Alterns und im Rahmen des Arthroseprozesses ausgehend von den Chondrozyten zur progredienten Schädigung von Kollagen Typ-II kommt und dieses fast ausschließlich von Chondrozyten synthetisiert wird (Prockop and Kivirikko 1984).

Ein Hauptunterschied zwischen den synovialen Fibroblasten und den Fibrochondrozyten bestand nach unseren Untersuchungen daher darin, dass synoviale Fibroblasten kein Kollagen Typ-II exprimieren.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit stand der phänotypische Vergleich zwischen synovialen Fibroblasten und Fibrochondrozyten aus Meniskuszellen im Vordergrund.

Da die Synovialis aus anatomischer Sicht dem Meniskus - vor allem hinsichtlich der oberflächlichen Schichten - sehr eng benachbart ist, sollte ausgeschlossen werden, dass bei der Anzucht von Meniskuszellen auch synoviale Fibroblasten enthalten sind. Bereits im OP wurde die Synovialmembran vom Meniskusgewebe des Resektates eines jeden Patienten getrennt. Nach der Aufbereitung im Labor wurden beide Zelllinien angezüchtet.

Ein Vergleich der Primär- mit der 1.Subkultur auf mRNA-Ebene wurde durchgeführt. Bei der 1.Subkultur fand eine Unterteilung in eine Negativkontrolle und Induktion mit Wachstumsfaktoren wie IL-1 β , TNF- α und TGF- β statt. Pro Patient wurden jeweils fünf Proben für Meniskus- und fünf Proben für Synovialiszellen gewonnen, bei welchen eine PCR mit folgenden Primern durchgeführt wurde:

Kollagen Typ-I und -II als Matrixkomponenten, BMP-2 und TGF- β als chondrogene Faktoren, IL-1 β , IL-6, IL-18 und TNF- α als Entzündungsfaktoren und MMP-1 bis MMP-3 als matrixabbauende Komponenten.

Es ergab sich ein vergleichsweise ähnliches Genexpressionsmuster aller Patienten.

Bei den synovialen Fibroblasten kam es bei allen Patienten zu einer verstärkten IL-18 Expression, was auf eine Synovitis hinweist.

Eine Kollagen Typ-II-Expression konnte bei den Zellen der Synovialis nicht nachgewiesen werden. In diesem Punkt unterscheiden sich synoviale Fibroblasten grundlegend von Fibrochondrozyten aus Meniskuszellen, weil nur die Fibrochondrozyten Kollagen Typ-II exprimieren.

Aus immunzytochemischer Sicht gab es keine signifikanten Unterschiede im Färbeverhalten zwischen Fibroblasten der Synovialis und Fibrochondrozyten. Die Färbungen mit den verwendeten Antikörpern AS02, Thy-1 und Kollagen

IV. Diskussion

Typ- I fielen jeweils sowohl für Meniskus- als auch für Synovialisgewebe positiv aus.

V. Schlussbetrachtung

Im Rahmen dieser Dissertation ist es gelungen, synoviale Fibroblasten eindeutig von Fibrochondrozyten aus Menisken zu unterscheiden. Durch die Genexpression von IL-18 und Kollagen Typ-II kann eine Differenzierung dieser unterschiedlichen Zellarten vorgenommen werden.

Hierdurch ist es möglich geworden, eine bessere Einschätzung für die Besiedlung von trägergestützten Materialien mit Fibrochondrozyten durchzuführen.

Bei der Herstellung von Meniskusersatzgewebe ist es nun möglich, durch eine klare Abgrenzung zu synovialen Fibroblasten nur noch Fibrochondrozyten als Grundlage für die Therapie zur Verfügung zu stellen. Dadurch kann vermieden werden, dass eine Besiedlung des Trägermaterials mit synovialen Fibroblasten stattfindet, welche dem Druck im Kniegelenk im Gegensatz zu Fibrochondrozyten nur bedingt standhalten können.

Die hierdurch eintretende Qualitätsverbesserung des Regeneratgewebes vor der Implantation bewirkt eine stärkere Annäherung des Regenerats an das ursprüngliche Zielgewebe in phänotypischer und vor allem auch in funktioneller Hinsicht.

Dies wiederum stellt in Zukunft eine optimierte Vorgehensweise bei der Behandlung der Kniegelenksarthrose in Folge einer Meniskusverletzung in Aussicht.

VI. Literaturverzeichnis

Aigner T., McKenna L.

Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage CMLS
Cell Mol.
Life Sci 59: 5-18, 2002.

Arnoczky S.P., Warren R.F., Spivak J.M.

Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in
dogs.
Am J Bone Joint Surg 70: 1209-1217, 1988.

Arnoczky S.P.

Building a meniscus.
Clin Orthop 367 (Suppl.): 254-272, 1999.

Aspenberg P., Forslund C.

Bone morphogenetic proteins and tendon repair.
Scand J Sci Sports 10: 372-375, 2000.

Baker P., Coggon D., Reading I., Barrett D., McLaren M., Cooper C.

Sports injury, occupational physical activity, joint laxity and meniscal
damage.
J Rheumatol 29 (3): 557-563, 2002.

Benedetto K.P., Ellermann A., Große C.

Expertenmeinung: Meniskusrefixation.
Arthroskopie 14: 276-290, 2001.

**Bhargava M.M., Attia E.T., Murrell G.A., Dolan M.M., Warren R.F.,
Hannafin J.A.**

The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine
meniscal cells.
Am J Sports Med 27: 636-643, 1999.

Breul R.

Allgemeiner Aufbau des Kniegelenks.
Deutsche Zeitschrift für Osteopathie 1: 16-20, 2003.

Cannon W.D., Vittori J.M.

The incidence of healing in arthroscopic meniscal repairs in anterior
cruciate ligament reconstructed knees versus stable knees.
Am J Sports Med 20: 176-181, 1992.

**Caron J.P., Fernandes J.C., Martel- Pelletier J., Tardif G., Mineau F.,
Geng C., Pelletier J.P.**

Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin- 1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase- 1 expression .
Arthritis Rheum 39: 1535-1544, 1996.

Carter T.R.

Meniscal allograft transplantation.
Sports Med Arthrosc Rev 7: 51-62, 1999.

Chatain F., Adeleine P., Chambat P., Neyret P. And Société Francaise d'Arthroscopie.

A comparative study of medial versus lateral arthroscopic partial meniscectomy on stable knees: 10 year minimum follow- up.
Arthroscopy 19 (8): 842-849, 2003.

Chen M., Lin Z., Hong W.

Expression of adhesion molecules beta 1 integrin on the surface of fibroblasts in wound healing.
Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi 15(1): 59-61, 1999.

Cheung H.S.

Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci.
Connect Tissue Res. 16(4): 343-356, 1987.

Collier S., Ghosh P.

Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee meniscus.
Osteoarthritis Cartilage 3: 127-138, 1995.

Debrunner, A.M.

I.A Der Bewegungsapparat, S. 116
In: Debrunner, A.M.: Orthopädie, Orthopädische Chirurgie, 4. Aufl.
Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, 2002.

Dehaven K.E., Lohrer W.A., Lovelock J.E.

Long term results of open meniscal repair.
Am J Sports Med 23: 524-530, 1995.

Edwards J.C.

The origin of type A synovial lining cells.
Immunobiology 161(3-4): 227-231, 1982.

Eyre D.R., WU J.J.

Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus.
FEBS Lett. 158(2):265- 70, 1983.

Fairbank T.J.

Knee changes after meniscectomy.
J Bone Joint Surg 30B (4): 664-670, 1948.

Felson D.T.

Epidemiology of hip and knee osteoarthritis.
Epidemiol Rev 10: 1-28, 1988.

Felson D.T., Zhang Y.

An update of the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention.
Arthritis Rheum 41: 1343-1355, 1998.

Felson D.T., Lawrence R.C., Dieppe P.A.

Osteoarthritis: new insights, part 1: the disease and its risk factors.
Ann Intern Med 133: 635-646, 2000.

Fosang A.J., Last K., Gardiner P., Jackson D.C., Brown L.

Development of a cleavage- site- specific monoclonal antibody for detecting metalloproteinase- derived aggrecan fragments: detection of fragments in human synovial fluids.
Biochem. J. 310(Pt.1): 337-343, 1995.

Fosang A.J., Last K., Maciewicz R.A.

Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that MMPs and aggrecanase activities can be independent.
J Clin Invest. 98(10): 2292-2299, 1996.

Fowler M.J. Jr., Neff M.S., Borghaei R.C., Pease E.A., Mochan E., Thornton R.D.

Induction of BMP-2 by IL-1 in human fibroblasts.
Biochem Biophys Res Commun 248(3): 450-453, 1998.

Fox J.M., Rintz K.G., Ferkel R.D.

Trephination of incomplete meniscal tears.
Arthroscopy 9(4): 451-455, 1993.

Fukui N., Zhu Y., Maloney W.J., Clohisy J., Sandell L.J.

Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α in normal and osteoarthritic chondrocytes.
J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 3: 59-66, 2003.

Ghadially F.N., Lalonde J.M., Wedge J.H.

Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint.
J Anat 136: 773-791, 1983.

Gracie J.A., Forsey R.J., Chan W.L., Gilmour A., Leung B.P., Greer M.R., Kennedy K., Carter R., Wei X.Q., Xu D., Field M., Foulis A., Liew F.Y., McInnes I.B.

A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis.
J Clin Invest 104: 1393-1401, 1999.

Gravallese E.M., Darling J.M., Ladd A.L., Katz J.N., Glimcher L.H.
In situ hybridization studies in stromelysin and collagenase mRNA
expression in rheumatoid synovium.
Arthritis Rheum 34(9): 1076- 1084, 1991.

Groß A.-F., Fickert S., Günther K.P.
Übergewicht und Arthrose.
Orthopäde 34: 638-644, 2005.

Guerne P.A., Zuraw B.L., Vaughan J.H., Carson D.A., Lotz M.
Synovium as a source as interleukin-6 in vitro: Contribution to local and
systemic manifestations of arthritis.
J Clin Invest 83: 585-592, 1989.

Günther K.P., Stürmer T., Trepte C.T., Naumann T., Kinzl L., Puhl W.
Häufigkeit gelenkspezifischer Risikofaktoren bei Patienten mit
fortgeschrittenen Cox- und Gonarthrosen in der Ulmer Osteoarthrose-
Studie.
Z Orthop Ihre Grenzgeb 137: 468-473, 1999.

Hashimoto J., Kurosaka M., Yoshiya S., Hirohata K.
Meniscal repair using fibrin sealant and endothelial cell growth factor.
An experimental study in dogs.
Am J Sports Med 20: 537-541, 1992.

Herwig J., Egnér E., Buddecke E.
Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of
degeneration.
Ann Rheum Dis. 43(4): 635-640, 1984.

Hollander A.P., Pidoux I., Reiner A., Rorabeck C., Bourne R., Poole A.R.
Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the
articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the
cartilage with progressive degeneration.
J Clin Invest 96(6): 2859-2869, 1995.

Hunter G.K., Rogakou C.C., Pritzker K.P.
Extracellular matrix synthesis by articular chondrocytes and synovial
fibroblasts in long-term monolayer culture.
Biochem Biophys Acta 804(4): 459-465, 1984.

Hunziker E.B.
Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review
of the current status and prospects.
Osteoarthritis Cartilage 10: 432-463, 2002.

Ignotz R.A., Massague J.

Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix.
J Biol Chem 261: 4337-4345, 1986.

Jackson J.R., Minton J.A.L., Ho M.L., Wei N., Winkler J.D.

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Synovial Fibroblasts is induced by hypoxia and IL 1 β .
J Rheumatol 24: 1253-1259, 1997.

Jaureguito J., Elliot T., Lietner T., Dixon L.B., Reider B.

The effects of arthroscopic partial lateral meniscectomy in an otherwise normal knee: a retrospective review of functional, clinical and radiographic results.
Arthroscopy 11: 29-36, 1995.

Jüni P.

Einblick in die klinische Epidemiologie der Arthrose.
Ther Umsch 59: 501-507, 2002.

Klippel J.H., Dieppe P.A.

Rheumatoid arthritis and other synovial disorders.
Mosby- Wells Medical Communications, 1998.

Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., Ferrara N.

VEGF is a secreted angiogenetic mitogen.
Science 246: 1306–1309, 1989.

Lindl T., Bauer J.

In: Zell- und Gewebekultur, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1989.

Löffler, Petrides

Endokrine Funktionen II: Zytokine, S. 814
In: Heinrich, P.C., Schaper, F., Timmermann, A., Martens, A.S., Lehmann, U.: Biochemie & Pathobiochemie; 7. Aufl.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokyo, 2003.

Lories R.J., Derese I., Ceuppens J.L., Luyten F.P.

BMP-2 and -6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis.
Arthritis Rheum 48(10): 2807-2818, 2003.

Maletius W., Messner K.

The effect of partial meniscectomy on the long- term prognosis of knees with localized, severe chondral damage. A twelve- to- fifteen year follow- up.

Am J Sports Med 24 (3): 258-262, 1996.

Marui T., Niyibizi C.

Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts.
J Orthop Res 15:18-23, 1997.

McCachren S.S., Haynes B.F., Niedel J.E

Localisation of collagenase mRNA in rheumatoid arthritis synovium by
in situ hybridization histochemistry.
J Clin Immunol 10(1): 19-27, 1990.

McDevitt C.A., Webber R.J.

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

Molloy T., Wang Y., Murrell G.

The roles of growth factors in tendon and ligament healing.
Sports Medicine 33(5): 381-394, 2003.

Montesano R., Orci L.

Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction
by fibroblasts: implications for wound healing.
Proc Natl Acad Sci USA 85: 4894-4897, 1988.

Moon M.S., Kim J.M., OK I.Y.

The normal and regenerated meniscus in rabbits. Morphologic and
histologic studies.
Clin Orthop 182: 264-269, 1984.

Müller-Rath R., Mumme T., Miltner O., Andreyas S., Schneider U.

Meniscus replacement: current aspects in tissue engineering.
Z Orthop 142: 540-545, 2004.

Muellner T., Egkher A., Nikolic A., Funovics M., Metz V.

Open meniscal repair: clinical and magnetic resonance imaging findings
after twelve years.
Am J Sports Med 27: 16-20, 1999.

Nabeshima Y., Kurosaka M., Yoshiy S., Mizuno K.

Effect of fibrin glue and endothelial cell growth factor on the early
healing response of the transplanted allogenic meniscus: a pilot study.
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 3: 34-38, 1995.

**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 391: 208-218, 2001.

Nietfeld J.J., Wilbrink B., Helle M., van Roy J.L., den Otter W., Swaak A.J., Huber-Bruning O.

Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 33: 1695-1701, 1990.

Pitsillides A.A., Wilkinson L.S., Mehdizadeh S., Bayliss M.T., Edwards J.C.

Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell.

Int J Exp Pathol 74(1): 27-34, 1993.

Platzer W.

Knochen, Bänder, Gelenke: Das Kniegelenk, S. 202

In: Taschenatlas der Anatomie, Band 1: Bewegungsapparat

Thieme Verlag, Stuttgart, 1991.

Port J., Simon T.M., Jackson D.W.

Preparation of exogenous fibrin clot.

Arthroscopy 11: 332-337, 1996.

Prockop D.J., Kivirikko K.I.

Heritable diseases of collagen.

N Engl J Med 311: 376-386, 1984.

Reddi, A.H.

Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration.

Nat Biotechnol 16: 247-252, 1998.

Riquet F.B., Lai W.F., Birkhead J.R., Suen L.F., Karstenty G., Goldring M.B.

Suppression of type I collagen gene expression by prostaglandins in fibroblasts is mediated at the transcriptional level.

Mol Med. 6(8): 705-719, 2000.

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

Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.

Proc Natl Acad Sci U S A., 83(12):4167- 4171, 1986.

Rockborn P., Gillquist J.

Results of open meniscus repair. Long-term follow-up study with a matched uninjured control group.

J Bone Joint Surg Br 82: 494-498, 2000.

Rodeo S.A., Seneviratne A., Suzuki K., Felker K., Wickiewicz T.L., Warren R.F.

Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report.

J Bone Joint Surg Am 82: 1071-1082, 2000.

Rodkey W.G., Steadman J.R., Li S.T.

A clinical study of collagen meniscus implants to restore the injured meniscus.

Clin Orthop 367 (Suppl.): 281-292, 1999.

Rubman M.H., Noyes F.R., Barber- Westin S.D.

Arthroscopic repair of meniscal tears that extend into the avascular zone: a review of 198 single and complex tears.

Am J Sports Med 26: 87-95, 1998.

Saalbach A., Anderegg U., Bruns M., Schnabel E., Herrmann K., Hausteil U.F.

Novel fibroblast-specific monoclonal antibodies: properties and specificities.

J Invest Dermatol. 106(6): 1314-1319, 1996.

Saha N.

Interleukin-1 α -converting enzyme/ caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1 α and interleukin-18.

Arthritis Rheum 42: 1577-1587, 1999.

Schmidt- Olsen S., Jorgensen U., Kaalund S., Sorensen J.

Injuries among young soccer players.

Am J Sports Med 19 (3): 273-275, 1991.

Schneider S., Schmitt G., Mau H., Schmitt H., Sabo D., Richter W.

Prävalenz und Korrelate der Osteoarthrose in der BRD.

Orthopäde 34: 782-790, 2005.

Schultz G.S., White M., Mitchell R., Brown G., Lynch J., Twardzik D.R., Todaro G.J.

Epidermal wound healing enhanced by TGF β 1 and vaccinia growth factor.

Science 235: 350-352, 1987.

Seil R., Rupp S., Tempelhof S., Kohn D.

Sports injuries in team handball. A one- year prospective study of sixteen men´s senior teams of a superior nonprofessional level.

Am J Sports Med 26 (5): 681-687, 1998.

Seil R., Rupp S., Jurecka C., Georg T., Kohn D.

Réparation méniscale par fixations biodégradables: étude biomécanique comparative.

Rev Chir Orthop 89: 35-43, 2003.

Shuler F.D., Geogescu H.I., Niyibizi C., Studer R.K., Mi Z., Johnstone B., Robbins R.D., Evans C.H.

Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor beta 1 gene into articular chondrocytes. J Orthop Res 18: 585-592, 2000.

Sommerlath K.G.

Results of meniscal repair and partial meniscectomy in stable knees. Int Orthop. 15(4): 347-350, 1991.

Statistisches Bundesamt

Gesundheitsbericht für Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 1998.

Stollsteimer G.T., Shelton W.R., Dukes A., Bomboy A.L.

Meniscal allograft transplantation: a 1- to 5-year follow-up of 22 patients. Arthroscopy 16(4): 343-347, 2000.

Stürmer T., Günther K.P., Brenner H.

Obesity, overweight and pattern of osteoarthritis: the Ulm Osteoarthritis Study. J Clin Epidemiol 53: 307-313, 2000.

Sweigart M.A., Athanasiou K.A.

Toward tissue engineering of the knee meniscus. Tissue Eng. 7(2): 111-129, 2001.

Tanaka T., Fujii K., Kumagae Y.

Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 7(2): 75-80, 1999.

Theiler R.

Arthrose. Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation. Schweiz Med Forum 23: 555-561, 2002.

Theofilopoulos A.N., Carson D.A., Tavassoli M., Slovin S.F., Speers W.C., Jensen F.B.

Evidence for the presence of receptors for C3 and IgG Fc on human synovial cells. Arthritis Rheum 23(1): 1-9, 1980.

Van Arkel E.R., De Boer H.H.

Survival analysis of human meniscal transplantations. J Bone Joint Surg Br 84: 227-231, 2002.

Van de Loo F.A.J., Joosten L.A., van Lent P.L., Arntz O.J., van den Berg W.B.

Role of interleukin-1, tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan- induced arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 164-172, 1995.

Varga J., Rosenbloom J., Jimenez S.A.

Transforming growth factor beta causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem J* 247: 597-604, 1987.

Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Roberts A.B., Sporn M.B.

Transforming growth factor beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5788-5792, 1987.

Webber R.R., Harris M.G., Hough A.J.

Cell culture of rabbit meniscal chondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res.* 3(1): 36-42, 1985.

Webber R.J., Zitaglio T., Hough A.J. Jr.

In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex. *Arthritis Rheum* 29: 1010-1016, 1986.

Webber R.J., York J.L., Vanderschelden J.L., Hough A.

An organ culture model for assaying wound repair of the fibrocartilaginous knee joint meniscus. *Am J Sports Med* 17: 393-400, 1989.

Willauschus W., Herrmann J., Wirtz P., Weseloh G.

Die Früerfassung der Arthrose aus klinischer Sicht. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 133: 507-513, 1995.

Wirth C.J., Peters G., Milachowski K.A., Weismeyer K.G., Kohn D.

Long- term results of meniscal allograft transplantation. *Am J Sports Med* 30: 174-181, 2002.

World Health Organization

Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity, Geneva, 1997.

Yamamura M., Kawashima M., Tani M., Yamauchi H., Tanimoto T., Kurimoto M., Morita Y., Ohmoto Y., Makino H.

VI. Literaturverzeichnis

Interferon- γ -inducing activity of IL-18 in the joint with rheumatoid arthritis.
Arthritis Rheum 44: 275-285, 2001.

VII. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
bp	Basenpaare
BMP	bone morphogenetic protein
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
cDNA	complementary DNA
CRP	C- reaktives Protein (Entzündungsparameter)
ddH ₂ O	DEPC- Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat (RNAse- Inhibitor)
DMEM	Dulbecco´s Modification Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor (=ECGF)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase
gf	growth factor
HKB	hinteres Kreuzband
IL	Interleukin
ITS	Insulin- Transferrin- Selenium
l	Liter
Lig.	Ligamentum
M.	Musculus
mA	Milliampère
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mM	Millimolar
MMP	matrix metalloproteinase
N	Newton
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
PDGF	platelet- derived growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen/ min
RT	Raumtemperatur
RT/PCR	Reverse Transkriptase/PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Taq	Termophilus Aquaticus
TNF α	tumor necrosis factor α
TGF β	transforming growth factor β
VEGF	vascular endothelial growth factor
VKB	vorderes Kreuzband

aus Rneasy Mini Kit von Qiagen:

RLT- Puffer

Lysis- Puffer

RPE- Puffer

Waschpuffer

RW1- Puffer

Waschpuffer

Publikationen

Dr. med. M. Hoberg, G. Uzunmehmetoglu, L. Sabic, S. Reese, PD Dr. rer. nat.
W. K. Aicher, PD Dr. med. M. Rudert
Charakterisierung von humanen Meniskuszellen.
Z Orthop 144: 164-171, 2006.

Kongressbeiträge:

M. Hoberg, G. Uzunmehmetoglu, L. Sabic, B. Lembeck, W. Aicher, M. Rudert
Untersuchungen zur Expression und Wirkung von Wachstumsfaktoren und
Matrixproteinen in humanen Meniskuszellen.
52. Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden, Baden- Baden,
2004.

Dr. M. Hoberg, G. Uzunmehmetoglu, L. Sabic, Dr. B. Lembeck, PD Dr. W.
Aicher, PD Dr. M. Rudert
Expressionsanalysen verschiedener Wachstumsfaktoren und Matrixproteine in
humanen Fibrochondrozyten des Meniskus.
DGOOC, Berlin 21.-23.10.2004.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. M. Rudert der Universitätsklinik Tübingen, Abt. Orthopädie für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung, Organisation der humanen Biopsien sowie für die Hilfe bei der Fertigstellung der Dissertation.

Herrn PD Dr. W. Aicher danke ich, der maßgeblich an der Umsetzung dieser experimentellen Doktorarbeit mitgewirkt hat und mir stets zur Seite stand mit zahlreichen Tipps, kritischen Beiträgen und Ratschlägen.

Herrn Dr. M. Hoberg danke ich für die Unterstützung bei der Literaturrecherche und die kritischen Diskussionen des Projektes.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Gülseren Uzunmehmetoglu für ihre freundliche Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit im Labor. Außerdem danke ich Frau Anita Hack für ihr Engagement und ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente.

Den operierenden Ärzten, MTA's und den OP- Schwestern der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen danke ich für die Bereitstellung der Menisken und der Synovialis.

Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern bedanken, die mir eine Universitätsausbildung ermöglicht haben und mich immer unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Verlobten Human Behforouzi und meiner Schwester Aleksandra Sabic, die mir immer zur Seite standen.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Lidia Sabic
Geburtsdatum, -Ort	15. Oktober 1979, Heilbronn
Familienstand	ledig

BILDUNGSGANG

2007	Promotion in der Orthopädischen Klinik der Universität Tübingen bei Prof. Dr. M. Rudert - Thema: „Phänotypischer Vergleich zwischen synovialen Fibroblasten und Fibrochondrozyten aus Menisken“
seit 04/2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
08/1990 – 08/1999	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm
08/1986 – 07/1990	Johannes-Häussler-Grundschule, Neckarsulm

PRAKTISCHE ERFAHRUNG

08/2005-12/2005	Stipendium für die Brown University, Prov., RI (USA) Famulaturen am Rhode Island Hospital: - Neurology - Emergency Medicine - Orthopaedic Surgery - Plastic Surgery
09/2004	Chermside, Australien Famulatur am Prince-Charles-Hospital: - Cardiology

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

seit 12/2004	Akupunktur (A-Diplom)
27.11.2007	Ärztliche Prüfung