

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

**Vergleich der Expression einzelner Angiogenesefaktoren
zwischen Cokulturen aus HUVEC und Fibrochondrozyten
und reinen Fibrochondrozytkulturen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Viviane Alexandra Stark
aus
Stuttgart**

2008

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Rudert

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg

**gewidmet
meinen Eltern
und meinen Freunden**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Meniskus	1
1.1.1	Makroskopische Anatomie	1
1.1.2	Mikroskopische Anatomie	3
1.1.3	Blutversorgung der Menisci	6
1.1.4	Meniskusläsionen	8
1.1.5	Ziel der Studie	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Material	12
2.1.1	Apparate und Instrumente des Labors	12
2.1.2	Chemikalien	15
2.1.3	Primer Sequenzen	17
2.1.4	Antikörper	18
2.1.5	Humane Meniski aus OP-Material	18
2.1.6	HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	19
2.1.7	Zellkulturinserts	19
2.2	Methoden	21
2.2.1	Studienaufbau	21
2.2.2	Zellkultur	22
2.2.3	Zellernte	25
2.2.4	Bestimmung der Zellzahl	26
2.2.5	Anlegen der Cokultur	27
2.2.6	Coomassie-Färbung	30
2.2.7	Endostatin Sandwich-ELISA	30
2.2.8	Immunhistochemie	34
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38

3	Ergebnisse	46
3.1	Zellkultur	46
3.1.1	Fibrochondrozyten	46
3.1.2	HUVEC	48
3.1.3	Zellmorphologie	49
3.2	Zellcharakterisierung	50
3.2.1	RT PCR	50
3.2.2	Coomassie Färbung	58
3.2.3	Immunhistochemie	59
3.2.4	Endostatin ELISA	63
4	Diskussion	67
4.1	Zellkultur	67
4.1.1	Zellzahl der Primärkultur	67
4.1.2	Zellkulturmedium	67
4.1.3	Zellkulturinserts	68
4.1.4	Coomassie-Färbung	70
4.2	Zellcharakterisierung	70
4.2.1	RT-PCR	70
4.2.2	Endostatin ELISA	75
4.2.3	Immunhistochemie	76
4.2.4	Conclusio	77
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Danksagung	88
8	Curriculum vitae	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Craniale Ansicht des Tibiaplateaus (nach Schünke 2005)	2
Abbildung 2: Schema der Struktur des Meniskus (nach W. Petersen, B.Tillmann 1999).....	4
Abbildung 3: Kollagenfaseranordnung im Meniskus (nach W. Petersen, B. Tillmann, 1999).....	6
Abbildung 4: Vaskularisierung des humanen medialen Meniskus (Spatelholz-Technik) ⁵	7
Abbildung 5: Schematische Einteilung der Vaskularisierung.....	8
Abbildung 6: Rissformen der Menisci (aus Orthopädie / Helmut Rössler / Wolfgang Rüter / 1997)	9
Abbildung 7: Schematische Darstellung Insert / Cokultur (nach bd Biosciences)	20
Abbildung 8: Diagramm des Studienaufbaus	21
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Cokultur	29
Abbildung 10: Prinzip des Sandwich ELISA (nach R&D Systems).....	31
Abbildung 11: Herstellung der Endostatin Konzentrationsreihe (nach R&D Systems	32
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Immunhistochemie.....	35
Abbildung 13: Schematische Darstellung der PCR (nach Andy Vierstraete, 1999).....	39
Abbildung 14: Exponentielle Amplifikation.....	40
Abbildung 15: Prinzip der Gelelektrophorese	45
Abbildung 16: MP 2 zum Zeitpunkt 0	
Abbildung 17: MP 4 zum Zeitpunkt 0.....	46
Abbildung 18: Cokultur Zeitpunkt 1; MP 4	
Abbildung 19: Kontrolle ZP 1; MP 4	49
Abbildung 20: Kontrolle ZP 2; MP 6	
Abbildung 21: Cokultur ZP 2; MP 6	49
Abbildung 22: Ergebnisse GAPDH PCR	51
Abbildung 23: Angiopoietin 1, MP 3	52

Abbildung 24: Angiopoietin 1, MP 6	52
Abbildung 25: Angiopoietin 2, MP 2	53
Abbildung 26: Angiopoietin 2; MP 6	53
Abbildung 27: Thrombospondin 1, MP 1	54
Abbildung 28: Thrombospondin 1; MP 4	54
Abbildung 29: PCR Ergebnis VEGF MP 1	55
Abbildung 30: PCR Ergebnis VEGF MP 6.....	56
Abbildung 31: SMAD 4, MP 3.....	57
Abbildung 32: SMAD 4; MP 4.....	57
Abbildung 33: vWF; MP 2.....	58
Abbildung 34: vWF; MP 5.....	58
Abbildung 35: ZP 1 der Cokultur, MP 4	
Abbildung 36: ZP 2 der Cokultur, MP 4	59
Abbildung 37: Kollagen I (ZP 0, ZP 1, ZP 2).....	61
Abbildung 38: Kollagen II (ZP 0, ZP 1, ZP 2).....	61
Abbildung 39: vWF (ZP 0, ZP 1, ZP 2)	62
Abbildung 40: Negativkontrolle (ZP 0, ZP 1, ZP 2).....	62
Abbildung 41: Eichkurve Endostatin.....	63
Abbildung 42: Säulendiagramm der Endostatinkonzentrationen.....	65
Abbildung 43: HUVEC in EGM Vollmedium	
Abbildung 44: HUVEC in DMEM-Vollmedium	68
Abbildung 45: Fibrochondrozyten auf der Insertmembran.....	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patientendaten	19
Tabelle 2: Zellzahlen	28
Tabelle 3: PCR-Protokoll	44
Tabelle 4: Zellzahl der Primärkultur	47
Tabelle 5: Aufteilung der Fibrochondrozyten	47
Tabelle 6: Ergebnisse der RNA-Quantifizierung	48
Tabelle 7: Zellzahlbestimmung / Aufteilung der HUVEC	49
Tabelle 8: Legende der PCR Auswertung	50
Tabelle 9: PCR Auswertung Angiopoietin 1	51
Tabelle 10: PCR Auswertung Angiopoietin 2	53
Tabelle 11: PCR Auswertung Thrombospondin 1	54
Tabelle 12: PCR Auswertung VEGF	55
Tabelle 13: PCR Auswertung SMAD 4	56
Tabelle 14: PCR Auswertung vWF	58
Tabelle 15: Ergebnisse Immunhistochemie	61
Tabelle 16: Extinktionswerte der Endostatin Konzentrationreihe	63
Tabelle 17: Extinktionswerte des Endostatin ELISA	64
Tabelle 18: Endostatinkonzentration [ng/ml]	64

Abkürzungen

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ang.	Angiopoietin
BBE:	Bovine Brain Extract
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleintriphosphat
DPBS	Dulbecco`s Phosphat gepufferte Saline
E	Extinktion
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECGF	Endothelial Cell Growth Factor
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
F	female (weiblich)
FBS	Fetale Bovine Serum
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GA-1000	Gentamicin sulfat Amphotericin-B
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IHC	Immunhistochemie

ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
J	Jahre
Koll	Kollagen
KTP	Knietotalprothese
li.	links
Lig.	Ligamentum
M	Male (männlich)
MP	Meniskus des Patienten
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
ml	Milliliter
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
pH	Potentia hydrogenii
re.	rechts
rhEGF	recombinant human Epidermal Growth Factor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde bzw. Standardabweichung
SMAD	small mothers against decapentaplegic
TBE	Tris-Borsäure EDTA Lsg.
TGF	Tumor-growth-factor
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor
\bar{x}	Mittelwert

X

ZP	Zeitpunkt
Z	Zellzahl

1 Einleitung

Das Kniegelenk ist das größte und am meisten exponierte Gelenk des menschlichen Körpers. Die große Beweglichkeit (bis zu 160°) und die Stabilität sind dabei durch einen komplizierten Bandapparat aus Kreuzbändern und Seitenbändern gesichert. Weitere Stabilität verleihen die beiden Menisci dem Kniegelenk. Früher als sinnlose Rudimente eines Muskels verkannt¹⁵ weiß man heute, dass die Menisci für die Stabilität, Kraftübertragung und Schockabsorption im Kniegelenk von großer Bedeutung sind⁶. So hat sich auch die Therapie der Meniskusläsionen grundlegend geändert. Noch vor 40 Jahren galt bei einer Meniskusruptur, egal welchen Ausmaßes, die komplette Meniskektomie als Standardtherapie⁴⁰. Gerechtfertigt wurde dieser Eingriff durch Schmerzfreiheit und Zufriedenheit der Patienten sowie eine geringe Rezidivrate unmittelbar nach der Operation. Durch die erhöhte Inzidenz von Knorpeldegenerationen und Gonarthrose wurden die längerfristigen Folgen einer kompletten Meniskektomie allerdings bald offensichtlich, so dass man heutzutage eine minimal invasive, oft arthroskopische Meniskus erhaltende Therapie anstrebt^{40,80}.

1.1 Der Meniskus

1.1.1 Makroskopische Anatomie

Der menschliche Meniskus dient zur Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Ober- und Unterschenkelknochen, als Stabilisator des Kniegelenks und besitzt eine Pufferfunktion, indem er Stöße vom Oberschenkel auf den Unterschenkel absorbiert. Zusätzlich besitzen die Menisci eine wichtige Funktion für den Transport der Gelenkflüssigkeit im Kniegelenk und verbessern dadurch die Diffusionsvorgänge, die zur Ernährung des hyalinen Knorpels nötig sind⁴⁸.

Makroskopisch ist der Meniskus ein in der Transversalebene halbmondförmiger in der Sagittalebene keilförmiger Faserknorpel, der paarig im Gelenksplatt zwischen Tibiaplateau und Femurkondylen liegt. Hier bilden die Menisci mit dem Tibiaplateau eine konkave Fläche, welche die konvexen Femurkondylen

aufnimmt, so dass die beiden Gelenkflächen in jeder Stellung des Kniegelenks annähernd kongruent sind. Die dem Tibiaplateau aufliegende Seite des Meniskus ist dagegen eher plan.

Der größere mediale Meniskus ist auf dem Tibiaplateau nur eingeschränkt beweglich, da er mit dem tibialen Kollateralband verwachsen ist. Er hat im Gegensatz zum lateralen o-förmigen Meniskus eine eher c-förmige Gestalt. Der laterale Meniskus weist eine bessere Beweglichkeit auf, da er nicht mit dem fibularen Kollateralband verwachsen ist. Aufgrund seiner Form und der eingeschränkten Beweglichkeit ist der mediale Meniskus wesentlich häufiger von Verletzungen betroffen.

Beide Menisci werden anatomisch in drei Teile geteilt: das hintere Horn, die Pars intermedia und das vordere Horn, an welchem beide durch das Ligamentum transversum genus miteinander verbunden sind.

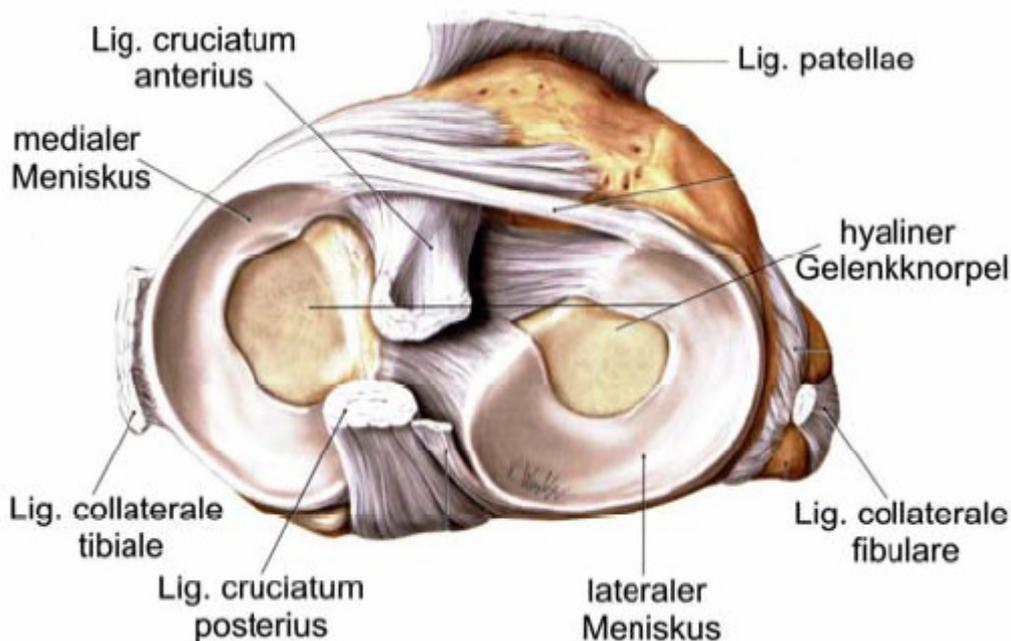


Abbildung 1: Craniale Ansicht des Tibiaplateaus (nach Schünke, 2005)

Am vorderen Horn sowie am hinteren Horn sind beide Menisci durch die Ligamenta meniscotibialia im Knochen der Area intercondylaris verankert.

1.1.2 Mikroskopische Anatomie

1.1.2.1 Histologie

Über die Morphologie und Funktion der Meniskuszellen war man sich lange Zeit nicht einig. Anfangs als Fibroblasten bzw. Fibrozyten deklariert, wurden die Meniskuszellen später den Chondrozyten zugeordnet³¹. Gerechtfertigt wurde dies durch die morphologische Ähnlichkeit der rund-ovalen Meniskuszellen mit den Chondrozyten. Zudem besitzen sowohl die Meniskuszellen als auch die Chondrozyten eine perizelluläre Matrix sowie eine extrazelluläre homogene hyaline Matrix. Trotz dieser Ähnlichkeit gibt es jedoch einen entscheidenden Unterschied. Während die Chondrozyten des hyalinen Knorpels vor allem Kollagen II exprimieren⁵⁰, bilden die Meniskuszellen ähnlich den Fibrozyten überwiegend Kollagen I. Um den morphologischen sowie den synthetischen Eigenschaften der Meniskuszellen gerecht zu werden, bezeichnet man sie heutzutage als Fibrochondrozyten⁸⁷.

Im menschlichen Meniskus werden oberflächliche und tiefe Fibrochondrozyten unterschieden. Die Fibrochondrozyten der oberflächlichen Zone der Menisci sind oval bzw. fusiform und besitzen kurze Zellausläufer. Durch ein eher reduziertes Zytoplasma wirken die Nuklei dieser Zellen groß und prominent. Zellorganelle wie Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Retikulum und Golgi Komplexe können nur selten identifiziert werden³¹. Dagegen haben die in der Mehrzahl vorkommenden tiefen Fibrochondrozyten eine eher runde polygonale Form und besitzen nur sehr wenige Zellausläufer. Diese Zellen kommen meistens solitär vor. Man kann aber auch einige Zell-Paare oder Zell-Triplets beobachten. Im Gegensatz zu den oberflächlichen Fibrochondrozyten sind die tiefen Fibrochondrozyten sehr gut mit rauhem endoplasmatischem Retikulum, Mitochondrien und Golgi Komplexen ausgestattet³¹.

Neben den Fibrochondrozyten findet man im vaskularisierten äußeren Drittel des Meniskus auch noch kapilläre Endothelzellen. Diese können mit Hilfe von Antikörpern gegen den Endothelzell spezifischen von Willebrand Faktor sichtbar gemacht werden und konnten in Kaninchen-Menisken auch schon erfolgreich isoliert und in Zellkulturen aufgenommen werden⁵¹. Endothelzellen kleiden

luminal in einer einlagigen Zellschicht das gesamte Blutgefäßsystem aus und gehören zusammen mit der Basalmembran zur Tunica intima der Blutgefäße. Während Kapillaren nur aus der Tunica intima und außen aufgelagerten Perizyten bestehen, sind Arterien und Venen noch von zwei weiteren Schichten, der Tunica media, einer glatten Muskelzellschicht sowie der Tunica adventitia, einer lockeren Bindegewebsschicht umgeben.

1.1.2.2 Struktur des Meniskus

Die Struktur des Meniskus lässt sich schematisch in drei verschiedene Zonen einteilen. In der inneren Zirkumferenz und den oberflächlichen Schichten besteht der Meniskus aus Faserknorpel (Zone I). In dieser Zone liegen einzelne oder in Gruppen zusammengelagerte Knorpelzellen zwischen den Kollagenfibrillenbündeln. Die äußere Zirkumferenz besteht dagegen vor allem aus straffem Bindegewebe (Zone III). In dieser Zone findet man überwiegend längliche Fibroblasten, die zwischen den zirkulär verlaufenden Kollagenfibrillen liegen. Zone II kann als Intermediärzone angesehen werden. Hier befinden sich neben typischen Fibroblasten des straffen Bindegewebes und Knorpelzellen auch Übergangsformen zwischen diesen beiden Zelltypen⁶⁴. (siehe Abbildung 2)

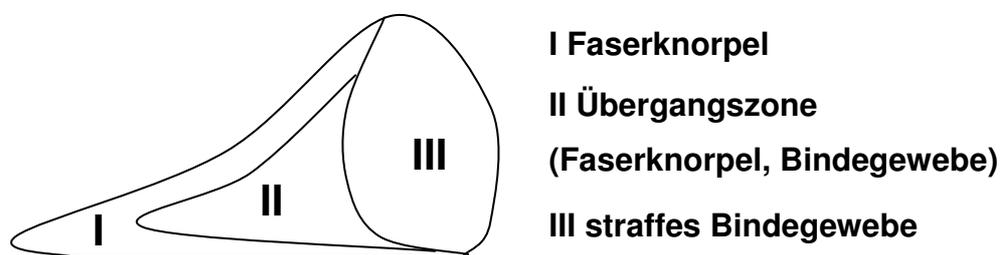


Abbildung 2: Schema der Struktur des Meniskus (nach W. Petersen, B.Tillmann 1999)

Die äußere Zirkumferenz des Meniskus wird hauptsächlich durch Zugkräfte beansprucht, während in der inneren Zirkumferenz neben geringen Zugkräften vor allem Kompressionskräfte vorherrschen. Nach der Theorie der kausalen Histiogenese⁶¹ führt hydrostatischer Druck zur Bildung von hyalinem Knorpel, Zugkräfte führen zur Entstehung von straffem Bindegewebe und abwechselnde Druck- und Zugbeanspruchung führt zur Entstehung von Faserknorpel. Die Anordnung von Faserknorpel und straffem Bindegewebe innerhalb des Meniskus ist somit durch diese Theorie erklärbar.

1.1.2.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix der Menisci besteht aus Kollagenen, Elastin, Proteoglykanen sowie zu 74% aus Wasser. Obwohl die Proteoglykane nur 3% der Trockenmasse ausmachen, speichern sie praktisch das gesamte Wasser im Gewebe. Durch das Elastin erhält der Meniskus eine gewisse Elastizität, so dass er nach Verformung durch mechanische Beanspruchung wieder seine gewöhnliche Form einnehmen kann. Dadurch ist der Meniskus sehr viel widerstandsfähiger und belastbarer. Den größten Anteil an der Trockenmasse haben mit über 75% jedoch die Kollagene, wobei im Meniskus neben Kollagen I auch geringe Mengen an Kollagen II, III, V und VI nachweisbar sind.

Die Kollagenfasern zeigen innerhalb des Meniskus einen der mechanischen Belastung entsprechenden Verlauf. Die Meniskusoberfläche ist von einem Netzwerk dünner Kollagenfibrillen bedeckt, die keine bevorzugte Ausrichtung aufweisen (Schicht 1). Unter diesem Netzwerk liegt eine 150 µm dicke Schicht die aus lamellenartigen sich in unterschiedlichen Winkeln überkreuzenden Kollagenfasern besteht (Schicht 2). Das Kernstück des Meniskus besteht aus zirkulär verlaufenden dicken Kollagenbündeln (Schicht 3), die nur in der inneren Zirkumferenz von ein paar radiär verlaufenden Kollagenlamellen durchzogen werden. Zwischen die zirkulären Kollagenbündel (Schicht 3) dringt von der Meniskusbasis aus lockeres Bindegewebe der Gelenkkapsel in den Meniskus ein und spaltet den Meniskus in diesem Bereich in zwei gleich aufgebaute Hälften.

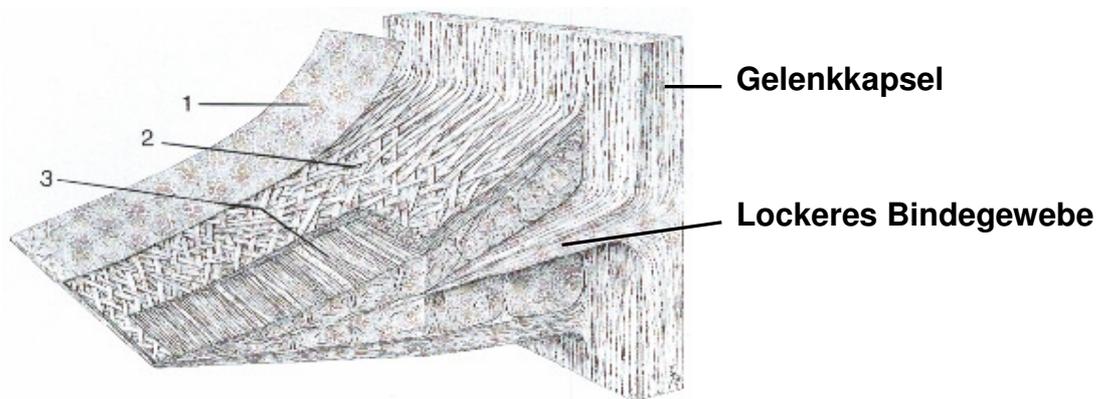


Abbildung 3: Kollagenfaseranordnung im Meniskus (nach W. Petersen, B. Tillmann, 1999)

1.1.3 Blutversorgung der Menisci

Die Menisci werden von der A. genus inferior, medialis und lateralis, die aus der A. poplitea hervorgehen, mit Blut versorgt. Die Gefäße sowie auch die Nervenfasern dringen von der Gelenkkapsel aus in den Meniskus ein. Während zum Zeitpunkt der Geburt noch der gesamte Meniskus vaskularisiert ist, werden im jungen Erwachsenenalter die zentralen und mittleren Anteile des Meniskus avaskulär¹⁹. Anatomische Studien belegen, dass nur 10-30% der Breite des medialen Meniskus und 10-25% der Breite des lateralen Meniskus von Gefäßen durchzogen sind⁵.

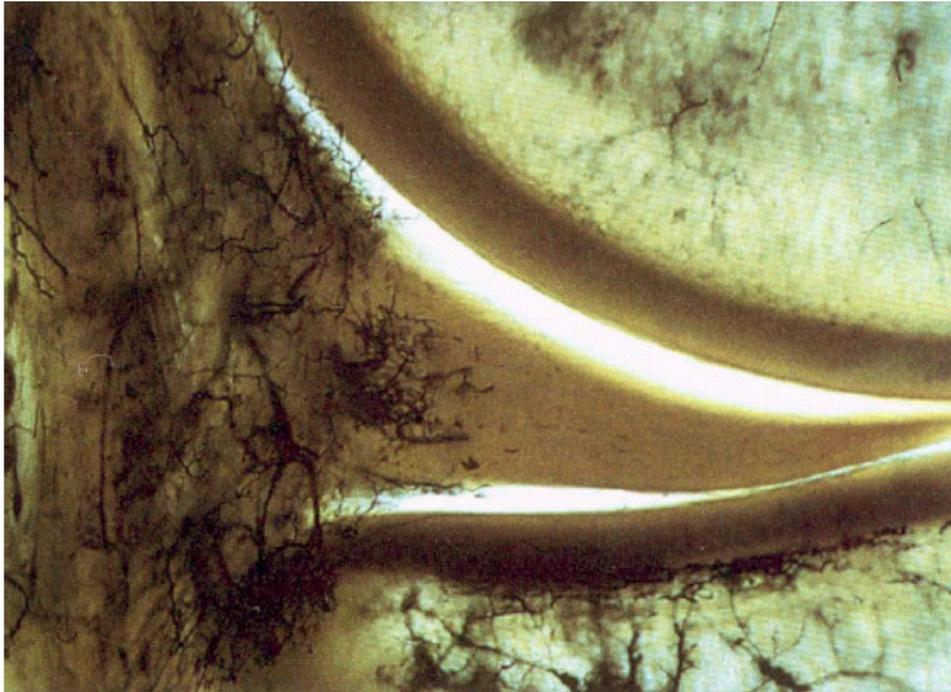


Abbildung 4: Vaskularisierung des humanen medialen Meniskus (Spatelholz-Technik)⁵

Da die zentralen Teile des Meniskus keine Blutversorgung besitzen, müssen sie durch Diffusionsvorgänge über die Gelenkflüssigkeit ernährt werden. Neben der reinen Diffusion spielen hierbei auch aktive Pumpvorgänge eine Rolle, die durch die Bewegungen des Kniegelenks ermöglicht werden⁶⁵. Über elektronenmikroskopisch im Meniskus nachgewiesene 10-200 μm große Poren werden durch diese aktiven Pumpvorgänge selbst die tiefen fibrinösen Schichten der Meniskusmatrix mit Nährstoffen versorgt¹⁴.

Anhand des Vaskularisierungsgrades kann man den Meniskus eines Erwachsenen in drei Zonen einteilen: die gut vaskularisierte kapselnahe Red-Red Zone, die wenig vaskularisierte mittlere Red-White-Zone und die zentral gelegene avaskuläre White-White-Zone⁶².

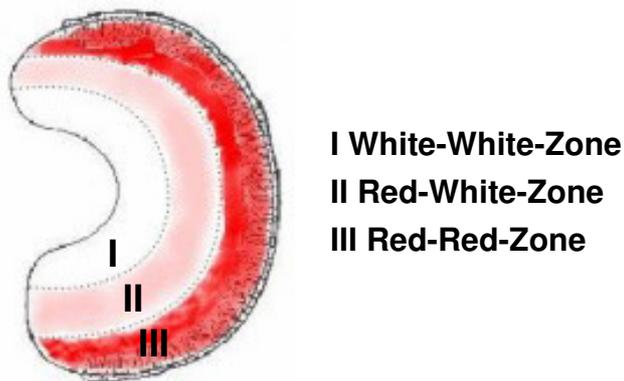


Abbildung 5: Schematische Einteilung der Vaskularisierung

In welcher dieser drei unterschiedlichen Vaskularisierungszonen ein Meniskustrauma (Riss, Quetschung) lokalisiert ist, ist von großer prognostischer Bedeutung. Während Risse im äußeren vaskularisierten Drittel in 90% der Fälle durch eine primäre Naht folgenlos ausheilen³⁵, weisen Traumata des mittleren und inneren Drittels sehr schlechte Heilungstendenzen auf⁵. Ist das Trauma im inneren avaskulären Drittel des Meniskus lokalisiert, bleibt deshalb in den meisten Fällen, häufig auch in Folge einer Einklemmungssymptomatik, nur die partielle oder komplette Meniskektomie. Durch diese radikale Therapie wird allerdings die Kontaktfläche zwischen Oberschenkelknochen und Unterschenkelknochen um bis zu 50%³, die Möglichkeit der Schockabsorption um bis zu 20% reduziert⁸⁵. Dies führt zu einer deutlich stärkeren Beanspruchung des Gelenkknorpels, wodurch es schließlich zu Knorpeldegeneration und früher Gonarthrose kommt^{4,22,41,80}

Kommen weitere Verletzungen des Kniegelenks wie die Ruptur eines der Kreuzbänder hinzu, so spielt der Verlust eines Teils oder des gesamten Meniskus bei der Entwicklung einer Kniegelenksarthrose eine noch bedeutendere Rolle⁷¹.

1.1.4 Meniskuläsionen

Die Menisci neigen aufgrund ihres anatomischen Baus, schlechter Blutversorgung und großer mechanischer Belastung zu degenerativen

Veränderungen wie Auffaserung und fettige Entartung. Der daraus resultierende Stabilitätsverlust ist bei Erwachsenen ab dem 40. Lebensjahr regelmäßig nachweisbar. Bei derart vorgeschädigten Menisci genügen geringe Krafteinwirkungen über den physiologischen Bereich hinaus, um Risse zu provozieren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass laut einer Studie des National Center for Health Statistics (USA) jährlich 600000 Operationen Folge von Meniskusschäden sind⁷⁸.

Meniskusverletzungen sind allerdings auch häufig Folge sportlicher Aktivität, weshalb oft jüngere Patienten davon heimgesucht werden. Der mediale Meniskus ist dabei aufgrund seiner stabileren Fixierung wesentlich häufiger betroffen. Je nach Lokalisation und Verlauf innerhalb des Meniskus werden verschiedene Rissformen unterschieden (siehe Abb. 6)

Die Therapie der Meniskusruptur besteht wenn möglich in einer Refixation des Meniskus mittels Naht, Staple oder Anker.

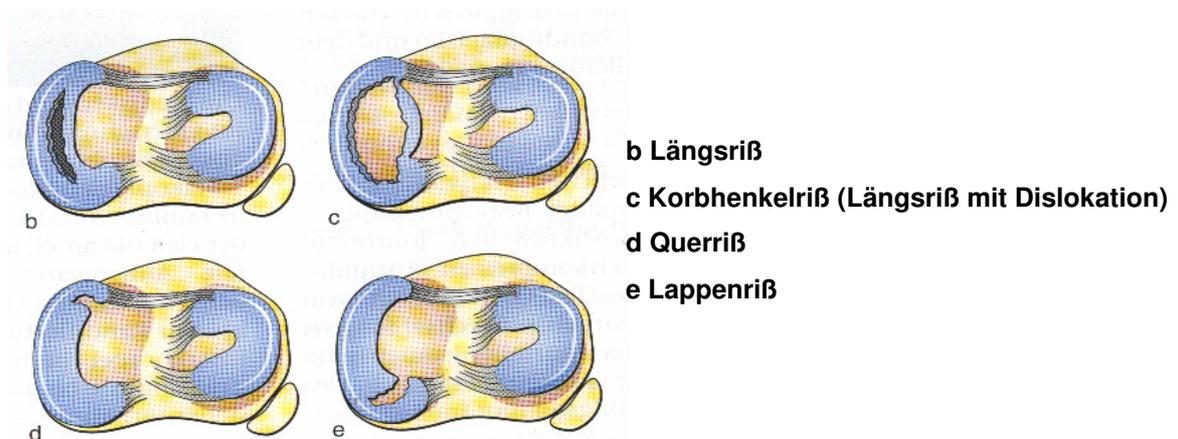


Abbildung 6: Rissformen der Menisci (aus Orthopädie / Helmut Rössler / Wolfgang Rüter / 1997)

Wie in Abb. 6 ersichtlich ist das avaskuläre innere Drittel des Meniskus sehr häufig von Verletzungen betroffen. Es ist deshalb schon seit einigen Jahren Ziel intensiver Forschungsbemühungen, die schlechten Heilungstendenzen in diesem Bereich des Meniskus zu verbessern. Der Versuch mit Hilfe von Periost- und Synoviatransplantationen eine Neovaskularisation im avaskulären

Bereich des Meniskus zu erzeugen, brachte dabei allerdings keine signifikante Verbesserung der Meniskusheilung^{5,35}. Dagegen konnte durch Einbringen eines Fibringerinnsels, das bekanntermaßen aus verschiedenen Wachstumsfaktoren besteht, eine bessere Heilungstendenz oder gar die vollständige Heilung einer Meniskusruptur im avaskulären Bereich des Hunde-Meniskus erzielt werden⁶. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in Tiermodellen die Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren (TGF β , PDGF, ECGF) auf Fibrochondrozyten überprüft. Dabei konnte ein stimulierender Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation und die Bildung kollagener und nicht-kollagener Matrixproteine der Fibrochondrozyten nachgewiesen werden^{13,20,32,87}

Des Weiteren spielt auch die Angiogenese, also die Bildung neuer Blutgefäße aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem bei der Wundheilung jeglicher Gewebeerletzung eine wesentliche Rolle⁷⁶. Heutzutage werden vier verschiedene Angiogenesemechanismen unterschieden⁶⁸. Die sprossende Angiogenese (sprouting angiogenesis) ist die Bildung neuer Gefäße durch primären Abbau des benachbarten Gewebes, anschließender Invasion, Migration und Proliferation von Endothelzellen in Richtung des angiogenen Stimulus und der abschließenden Ausreifung zu einem funktionsfähigen Blutgefäß. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der nicht sprossenden Angiogenese (Intussuszeption) eine Längsteilung der Gefäße durch Einstülpungen sich gegenüber liegender Endothelflächen. Weitere Mechanismen sind die Bildung transendothelialer Zellbrücken mit anschließender Auftrennung in mehrere Kapillaren sowie die Fusion mehrerer kleiner Blutgefäße zu einem großen Blutgefäß.

Aufgrund der intensiven Erforschung der Angiogenese im Rahmen der Entwicklung neuer Krebstherapien wird immer mehr über diesen komplexen, kaskadenartig ablaufenden Prozess und die daran beteiligten angiogenen und antiangiogenen Signalproteine bekannt. So kennt man heutzutage viele Angiogeneseaktivatoren wie z.B. die Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs), die nach einem Trauma in jeglichem Gewebe vermehrt exprimiert werden, um den für die Wundheilung nötigen Neovaskularisationsreiz zu

induzieren. Es sind aber auch einige Angiogeneseinhibitoren bekannt, die dem entgegen wirken.

1.1.5 Ziel der Studie

Endothelzellen bilden viele verschiedene Wachstums- und Angiogenesefaktoren und sind dadurch maßgeblich an den verschiedenen Heilungsvorgängen traumatisierter Gewebe beteiligt⁵³. Bei der Meniskusheilung ist eine deutlich bessere Tendenz in den gut vaskularisierten, äußeren Anteilen bekannt. Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit war es daher, den Einfluss von Endothelzellen auf die humanen Meniskus Fibrochondrozyten näher zu untersuchen. Hierzu wurden humane Fibrochondrozyten aus Cozellkulturen mit humanen Endothelzellen aus Nabelschnurmaterial sogenannte HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hinsichtlich der Expression einzelner Angiogeneseaktivatoren und -Inhibitoren mit Fibrochondrozyten aus Einzelzellkulturen verglichen. Es wurde eine Expressionsanalyse der Angiogenesefaktoren VEGF, Endostatin, Angiopoietin 1, Angiopoietin 2, Thrombospondin 1 und SMAD 4 durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Apparate und Instrumente des Labors

Absaugpumpe

Suc-O-Mat; Bachofer, Reutlingen/D

Brutschrank

CO₂ Auto Zero Inkubator, Heraeus, Hanau/D

Cell Culture Inserts

Falcon™, PET, Porengröße 1.0µm;

Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes/USA

Deckgläser

24x32mm; Langenbrinck, Emmendingen/D

Einmalskalpelle

Cutifix; Braun Medical AG, Melsungen/D

Eppendorf-Cups

0,5ml; Eppendorf, Hamburg/D

Feinwaage

Mettler P1210; Mettler Toledo, Giessen/D

Fotoapparat

Vario-Orthomat; Leitz, Wetzlar/D

Canon PowerShot S45, Tokio/Japan

Gefrierschrank

Bosch, Ditzingen/D

Gelkammer

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

Gewebekulturplatte 96-Well

Greiner GmbH, Nürtingen/D

Gewebekulturplatte 6-Well

Greiner GmbH, Nürtingen/D

HUVEC, Pooled (Lot Number 3F0096)

Cambrex Bio Science, Walkersville/USA

Insulinspritzen

1ml; Braun Medical AG, Melsungen/D

Kanülen

Sterican 0.9 x 70mm;

Braun Medical AG, Melsungen/D

Kühlschrank

Bosch, Ditzingen/D

Kulturflaschen

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

Lichtmikroskop

Fluovort FS Mikroskop; Leitz, Wetzlar/D

Magnetrührer

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

Mikrowelle

Bosch, Ditzingen/D

Objektträger

Super Frost plus, 25x75x1,0mm; Langenbrinck, Emmendingen/D

PCR-Block

Thermocycler UNO II; Biometra, Göttingen/D

Perfusorspritzen

50ml; Braun Medical AG, Melsungen/D

Petrischalen

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

Pinzetten

Fa. Aesculap, Tuttlingen/D

Pipetten

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

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

Combitips Biopur; Eppendorf, Hamburg/D

Power Pack P25 (Gelelektrophorese)

Biometra; Göttingen/D

Scheren

Aesculap, Tuttlingen/D

Schüttler

Ika MTS 4; Bachofer, Reutlingen/D

Spectrophotometer

Jasco V530; Jasco, Groß Umstadt/D

Sterilarbeitsbank

Gelaire Laminar Air Flow; BDK, Sonnenbühl/D

Sterilfilter

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

Stickstofftank

Taylor Wharton Cryogenetics;

Bachofer, Reutlingen/D

Test-Röhrchen

PP Test tubes 50ml; Greiner, Nürtingen/D

Wasserbad

Memmert GmbH, Schwabach/D

Daglef Patz, Wankendorf/D

Zentrifuge

Centrifuge 5804 R; Eppendorf, Hamburg/D

Zentrifuge 5412; Eppendorf, Hamburg/D

2.1.2 Chemikalien

β - Mercaptoethanol

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Agarose

SeaKem LE Agarose;

Bio Whittaker Molecular Applications, Rockland/USA

Borsäure

Merck, Darmstadt/D

Bovines Serumalbumin

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

cDNA-Synthese-Kit

Advantage RT-for-PCR Kit; Clontech, Palo Alto/USA

Collagenase Typ XI

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Coomassie® Brilliant Blue R-250

Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA

Desinfektionslösung

Antifect Liquid; Schülke & Mayr, Norderstedt/D

DNA-Eichmarker

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

Dulbecco´s MEM / NUT Mix F12 (Ham)

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Endothelial Growth Medium EGM™ (Clonetics®)

Cambrex Bio Science, Walkersville/USA

EGM™ SingleQuots® (Clonetics®)

Enthält: FBS, GA-1000, Hydrocortisone, rhEGF und BBE

Cambrex Bio Science, Walkersville/USA

Essigsäure

Merck, Darmstadt/D

Ethanol

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

Ethidiumbromid

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Färbekit / Immunhistochemie

AEC Substrate Kit for peroxidase; Vector Laboratories, Burlingame/USA

Fötale Kälberserum (FCS)

Seromed / Biochrom KG, Berlin/D

Fungizone (Amphotericin B)

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

H₂O dest.

Universitätsapotheke Tübingen

HUVEC, Pooled (Lot Number 3F0096)

Cambrex Bio Science, Walkersville/USA

Human Endostatin Immunoassay, Quantikine

R&D Systems, Minneapolis/USA

Insulin-Transferrin-Selenium

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Methanol

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

PBS-Puffer

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

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

PCR-Kit

Taq DNA-Polymerase; Boehringer Mannheim/D

Penicillin-Streptomycin

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

Phenylhydrazin

Merck, Darmstadt/D

RNA-Extraktionskit

RNeasy Minikit (250); Qiagen, Hilden/D

Trypanblau 0.4%

Sigma Aldrich, St. Louis/USA

Trypsin EDTA (1x)

Gibco/Invitrogen Corporation, Rockville/USA

Vectastain AEC-Substrate-Kit for Peroxidase

Vector Laboratories, Burlingame/USA

Vectastain Universal Elite ABC-Kit

Vector Laboratories, Burlingame/USA

Vitamine

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

Wasserdeseinfektion

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

2.1.3 Primer Sequenzen

Angiopoietin 1 up	5' TTT CTA TTC TTG GTG GCT TC 3'
Angiopoietin 1 low	5' TTT CAT TTC TCA AAC CCA G 3'
Angiopoietin 2 up	5' AAT GGC ACG TTT CTG TTG A 3'
Angiopoietin 2 low	5' TTT GGA AAA ACA GTT AGT GCA 3'
GAPDH up	5' TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT 3'
GAPDH low	5' CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'
SMAD 4 up	5' TCA AGC TTG ATG ATC TCT CAG GAT TAA CAC 3'
SMAD 4 low	5' TAG CGG CCG CGA ACA CCA ATA CTC AGG AGC AG 3'
Thrombospondin 1 up	5' TCC TAG AAC GTG CGA CCT G 3'
Thrombospondin 1 low	5' AGA TGC TTT TTC AAA AGG AAA CC 3'
VEGF up	5' GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC 3'
VEGF low	5' CTC CTG CCC GGC TCA CCG CCT CGG CTT 3'
Von Willebrand Faktor up (vWF)	5' TGT ACC ATG AGG TTC TCA ATG C 3'

Von Willebrand Faktor low (vWF)	5' TTA TTG TGG GCT CAG AAG GG 3'
--	----------------------------------

Hergestellt von MWG-Biotech AG, Ebersberg/ Germany

2.1.4 Antikörper

Endostatin	Maus IgG; R&D Systems, Minneapolis/USA
Koll. I	Ziege IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA
Koll. II	Ziege IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA
vWF	Hase IgG; Oncogene Research Products, San Diego/USA

2.1.5 Humane Menisci aus OP-Material

Alle Menisci, die für die Zellkulturen verwendet wurden, stammten von Patienten, die sich an der Universitätsklinik Tübingen einer Knieoperation unterzogen. Indikation für diese Operation war stets eine Gonarthrose, die mit einer Knieprothese versorgt wurde.

Alle verwendeten Menisci waren makroskopisch unauffällig, weshalb man davon ausgeht, dass sich die verwendeten Meniskuszellen hinsichtlich ihres Verhaltens in den weiteren Untersuchungen nicht von "normalen" Meniskuszellen unterscheiden^{10,44,84}

Das Patientenkollektiv bestand aus 6 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 66 Jahren. Fünf Patienten waren weiblich und einer männlich. Nähere Patientendaten sind in folgender Tabelle aufgelistet. Die Namen der Patienten werden aus Datenschutzgründen nicht genannt.

Patient	Alter	Geschlecht	Diagnosen	Therapie
MP 1	75 J	F	Gonarthrose links	KTP li.
MP 2	79 J	F	Gonarthrose links , Z.n. KTP rechts 10/03	KTP li.
MP 3	59 J	F	Gonarthrose rechts, Adipositas permagna	KTP re.
MP 4	56 J	F	Gonarthrose rechts	KTP re.
MP 5	61 J	F	Valgusgonarthrose rechts	KTP re.
MP 6	65 J	M	Gonarthrose links	KTP li.

MP: Meniskus – Patient, KTP: Knie totalprothese

Tabelle 1: Patientendaten

2.1.6 HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Die für die Cokultur verwendeten HUVEC stammten aus verschiedenen Nabelschnüren Neugeborener. Die Zellen wurden auf Trockeneis gelagert verschickt. Ein Teil wurde sofort aufgetaut und verarbeitet, der andere Teil für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff gelagert. In mehreren Vorversuchen zeigte sich, dass das Zellmedium der Meniskuszellen für Endothelzellen nicht geeignet ist. Daher wurde zusätzlich das speziell für Endothelzellen entwickelte Endothelial Cell Basal Medium (EBM) bestellt. Alle Versuche zur Cokultur wurden in diesem Medium durchgeführt, da auch die Meniskuszellen in diesem Medium sehr gut proliferierten.

2.1.7 Zellkulturinserts

Für die Cokultur wurden die HUVEC in Inserts ausgesiedelt (siehe Abb. 7). Diese Inserts wurden bei der Firma Falcon bestellt und konnten in 6 Well Platten eingebracht werden, in welchen zuvor die Fibrochondrocyten ausgesiedelt worden waren. An der Unterseite hatten die Inserts eine porenhaltige Membran. Die Porengröße betrug 1 µm, was eine Migration der Zellen von einem Kompartiment ins andere verhindert. Somit befanden sich

HUVEC und Fibrochondrozyten in zwei voneinander getrennten Kompartimenten, konnten sich aber trotzdem gegenseitig beeinflussen, da die Membran für das Medium und darin enthaltene von den Zellen produzierte Stoffe permeabel ist.

Die Membran an der Unterseite der Inserts war aus durchsichtigem Material. Dies hatte den Vorteil, die unter dieser Membran liegenden Fibrochondrozyten im Mikroskop erkennen zu können.

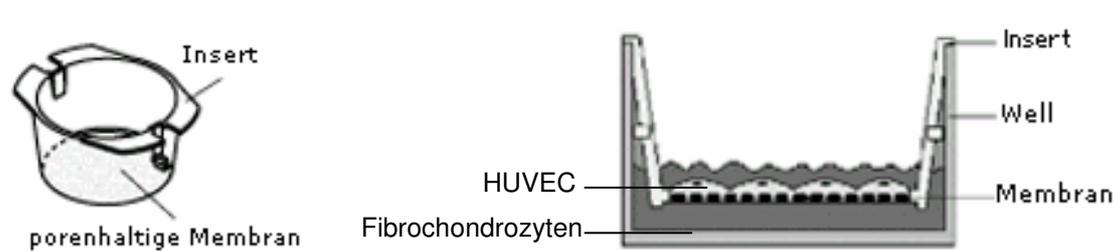


Abbildung 7: Schematische Darstellung Insert / Kocultivierung (nach bd Biosciences)

2.2 Methoden

2.2.1 Studienaufbau

Die aus den Operationen erhaltenen Menisci sowie die HUVEC wurden in Zellkulturen aufgenommen (Primärkultur). Nach einer gewissen Proliferationszeit wurden die HUVEC und die Fibrochondrozyten geerntet und mit einem Teil der Fibrochondrozyten eine Expressionsanalyse bezüglich der zu untersuchenden Angiogenesefaktoren und eine Immunhistochemie durchgeführt (Zeitpunkt 0). Die restlichen Fibrochondrozyten wurden in 6 Well Platten ausgesiedelt und entweder als reine Fibrochondrozytenkultur (Kontrolle) oder zusammen mit den HUVEC kultiviert (Cokultur). Sowohl die Fibrochondrozyten der Cokultur als auch der Kontrolle wurden nach 4 Tagen (Zeitpunkt 1) sowie nach 10 Tagen (Zeitpunkt 2) geerntet und es wurden weitere Expressionsanalysen mittels PCR durchgeführt (siehe Abbildung 8).

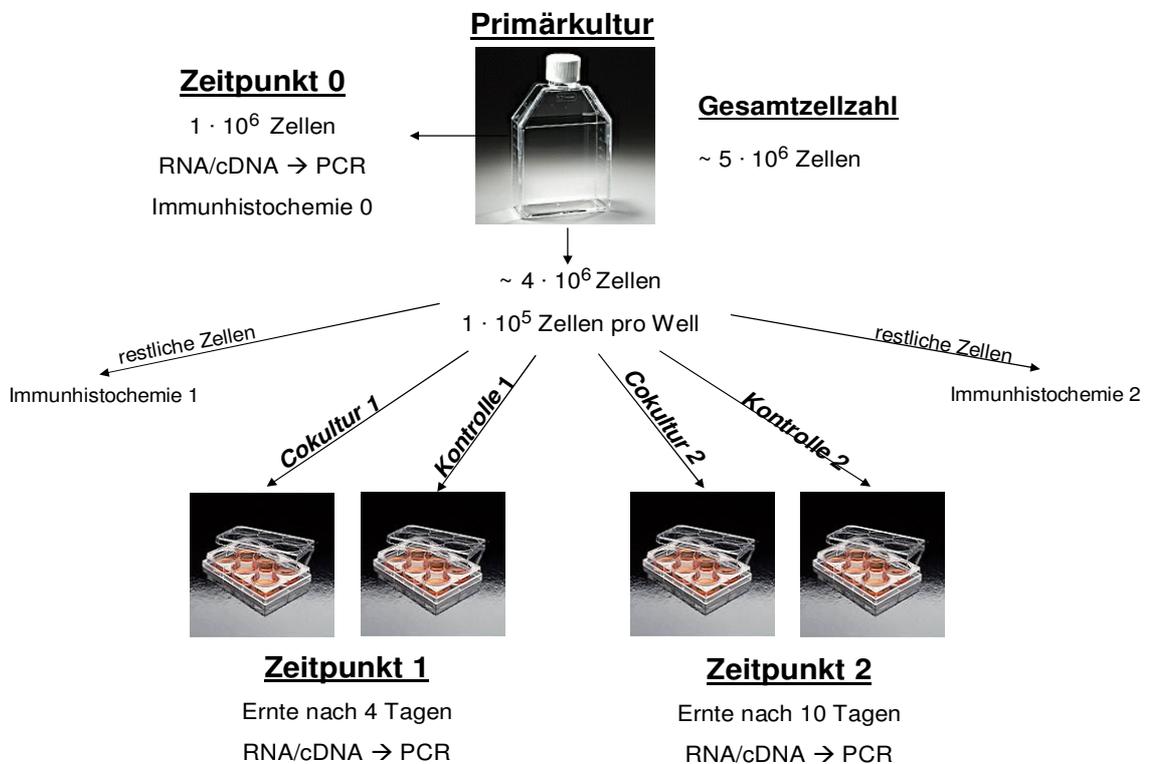


Abbildung 8: Diagramm des Studienaufbaus

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Arbeitsplatz

Alle Arbeitsschritte, die mit der Zellkultur zu tun hatten, wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Zellen mit Mikroorganismen zu verhindern.

Zu diesen sterilen Arbeitsbedingungen gehörte das Arbeiten unter einer Sterilbank, die stets vor der Arbeit mit Antifect liquid desinfiziert und 10 min mit UV Licht bestrahlt wurde. Dadurch wurde die Keimzahl minimiert. Während des Arbeitens sorgte ein permanenter Luftstrom von 4 m/s dafür, Staubpartikel und andere Verunreinigungen der Luft gering zu halten. Außerdem wurden stets desinfizierte Einmalhandschuhe und sterile Instrumente benutzt. Alle für die Zellkulturarbeit verwendeten Flüssigkeiten wurden stets unter der Sterilbank geöffnet und gegebenenfalls sterilfiltriert.

2.2.2.2 Herstellung des Fibrochondrozyten Vollmediums

Zur primären Proliferation der Fibrochondrozyten wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Nutrient Mix/F12 als Grundmedium verwendet. Um daraus das Vollmedium zu fertigen, wurden die 500 ml des Grundmediums mit 10ml Penicillin/Streptomycin, 50ml Fötalem Kälberserum (FCS), 6ml Fungizone (Amphotericin B), 12ml MEM Vitaminlösung und 0,5ml Insulin Transferrin Selenium (ITS) versetzt. Außer ITS wurden diese Ingredienzen alle bei -20°C aufbewahrt und erst vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. ITS, das Grundmedium, sowie das gebrauchsfertige Vollmedium lagerten bei 4°C im Kühlschrank und wurden ebenfalls vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

Das FCS war zusätzlich vor der Aufbewahrung bei -20°C 30min lang bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert, und anschließend mit 1g Aktivkohle versetzt und 1h auf dem Schüttler ausgeschüttelt worden. Die Aktivkohle dient dazu unerwünschte Bestandteile des fötalen Kälberserums zu binden. Nach anschließender Sterilfiltration war das FCS gebrauchsfertig.

2.2.2.3 Herstellen des HUVEC Vollmediums

Für die primäre Proliferation der HUVEC sowie für die späteren Cokulturen wurde EBM als Grundmedium verwendet. Das Grundmedium sowie das fertige Vollmedium wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und erst kurz vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Den 500ml des Grundmediums wurden 10ml Fetal Bovine Serum (FBS), 0,5ml Gentamicin-Amphotericin B (GA-1000), 0,5ml Hydrocortisone, 0,5ml rekombinant human Epidermal Growth Factor (rhEGF) und 2ml Bovine Brain Extract (BBE) zugefügt, um das gebrauchsfertige Vollmedium zu erhalten. Alle Zusätze wurden bei -20°C gelagert und erst vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.2.4 Anlegen der humanen Meniskuszellkultur

Alle verwendeten Menisken stammten aus Operationen der Universitätsklinik Tübingen, wobei die Patienten vorher aufgeklärt worden sind und ihr Einverständnis gegeben haben. Eine Genehmigung der Ethikkommission lag vor (192 / 2003 U).

Der entnommene Meniskus wurde zum Transport und bis zur Verarbeitung in steriler Kochsalzlösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Mit Hilfe zweier Skalpelle und einer Pinzette wurde der Meniskus in einer Petrischale geschält und zerkleinert. Das Schälen des Meniskus war nötig, um einerseits meniskusfremdes Gewebe wie zum Beispiel Fett und Synovia zu entfernen und andererseits die eigenen Endothelzellen des im Randbereich gut vaskularisierten Meniskus in der Zellkultur möglichst gering zu halten. Anschließend wurde der Meniskus zu einer breiartigen Konsistenz zerkleinert, um für den Enzymverdau mit 0,4% iger Kollagenaselösung eine möglichst große Angriffsfläche zu haben. Um eine Austrocknung während dieses Vorgangs zu verhindern, wurde gelegentlich Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline (DPBS) zugegeben.

Der Meniskusbrei wurde anschließend mit ausreichend DPBS in ein 50ml Röhrchen überführt und zweimal bei 4°C und 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Zentrifugieren diente dem Waschen des Gewebebreis,

weshalb jeweils nach dem Zentrifugieren der Überstand, bestehend aus DPBS, Fett- und Blutanteilen, abgesaugt wurde. Um die unerwünschte Interzellulärsubstanz zu entfernen, wurde der Meniskusbrei mit 6ml 0,4% iger Kollagenaselösung versetzt und für 4h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend folgte die zweimalige Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Diese Waschschrirte wurden mit DMEM durchgeführt, um die Kollagenase und die verdaute Interzellulärsubstanz zu entfernen. Das Zellpellet wurde nun in Vollmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen der Firma Falcon (75 cm²) überführt. Für eine Zellkulturflasche wurden 9ml Vollmedium und 5ml der Zellsuspension verwendet. Pro Patient ergaben sich daraus, abhängig von der Größe des OP-Materials, 3-4 Zellkulturflaschen, die bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre im Brutschrank inkubiert wurden.

2.2.2.5 Anlegen der HUVEC Zellkultur

Die HUVEC wurden bei der Firma Cambrex bestellt und bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert. Es handelte sich hierbei um gepoolte, das heißt aus den Nabelschnüren verschiedener Neugeborener gewonnene Zellen.

Um die Zellen aufzutauen, wurden sie immer wieder mit EBM Vollmedium umspült. Die bereits im Medium gelösten Zellen wurden dabei vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in eine Zellkulturflasche überführt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis alle Zellen aufgetaut waren. Alle Zellkulturflaschen wurden anschließend mit weiterem Vollmedium auf 14ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.6 Mediumwechsel

Der erste Mediumwechsel der neu angelegten Zellkulturen fand erst nach 5 Tagen statt, um den Zellen Zeit zu geben sich am Boden der Zellkulturflasche anzuheften. Im weiteren Verlauf der Zellkultur wurde das Medium alle 4 Tage gewechselt, um das Nährstoffangebot und den ph-Wert für die Zellen relativ konstant zu halten. Dem DMEM Vollmedium der Fibrochondrozyten war

außerdem ein Farbindikator beigemischt. So bekam das Medium durch den Verbrauch vieler Nährstoffe und somit sinkendem pH-Wert eine gelbliche Farbe und bei steigendem pH-Wert (z.B. durch unzureichende CO₂ Zufuhr) eine violette Farbe. Stellte sich eine derartige Verfärbung des Mediums ein, wurde dieses umgehend gewechselt.

Für den Mediumwechsel wurde das alte Medium mit einer Pipette abgesaugt und die Zellen in der Zellkulturflasche mit 14ml, in der 6 Well Platte mit 3ml und im Zellkulturinsert mit 2ml frischem Vollmedium versorgt.

2.2.3 Zellernte

Damit die Fibrochondrozyten und HUVEC zur Extraktion der RNA und für die Versuche der Cokultur verwendet werden konnten, mussten sie aus den Zellkulturflaschen beziehungsweise den 6 Well Platten abgeerntet werden.

Die Zellernte der Primärkultur der Fibrochondrozyten erfolgte, sobald die Zellen eine Monolayer am Boden der Zellkulturflasche ausgebildet hatten, was je nach Patient 6-8 Wochen dauerte. Aus den 6 Well Platten wurden die Fibrochondrozyten nach 4 Tagen (Zeitpunkt 1) und nach 10 Tagen (Zeitpunkt 2) geerntet (siehe Abb.8).

Für die Zellernte wurde das Vollmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dies war nötig, um Proteine heraus zu waschen, die den anschließenden Ablösevorgang mittels Trypsin-Lösung erschwert hätten. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-Lösung bedeckt und für kurze Zeit im Brutschrank bei 37°C inkubiert, da das Trypsin bei dieser Temperatur sein Temperaturoptimum besitzt und somit am besten wirken kann. Das Ablösen der Zellen wurde zusätzlich durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche aktiv unterstützt.

Der Ablösevorgang konnte unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Nach Ablösen möglichst aller Zellen vom Boden der Zellkulturflasche bzw. 6 Well Platte wurde der Trypsin-Zellsuspension sofort Vollmedium zugefügt, um das Trypsin zu inaktivieren und den Zellen nicht zusätzlich zu schaden.

Die so erhaltenen Zellsuspensionen aus 3-4 Zellkulturflaschen eines Patienten wurden nun in ein gemeinsames 50ml Röhrchen überführt (poolen der Zellen). Dieses Poolen war notwendig, um eine Auswirkung eventueller Differenzen zwischen den Zellen der einzelnen Zellkulturflaschen auf die Ergebnisse der Cokultur zu reduzieren. Die Zellsuspension wurde anschließend in der Zentrifuge 4min lang bei 4°C und 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 40ml Vollmedium resuspendiert. Bei dieser Resuspension wurden die Fibrochondrozyten, denen für die primäre Proliferation in der Zellkulturflasche DMEM Vollmedium zugefügt worden war, in EBM Vollmedium überführt, da für die Cokultur für beide Zellarten das gleiche Vollmedium verwendet werden musste.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Zellen wurden hierfür mit Hilfe von Trypanblau im Verhältnis Zellsuspension : Trypanblau = 1 : 1 gefärbt. Tote Zellen stellen sich in dieser Färbung dunkelblau dar, da das Trypanblau durch defekte Zellmembranen ungehindert eindringen kann.

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

Die Zellsuspension wurde vor der Probenentnahme zur Zellzahlbestimmung durch auf- und abpipettieren noch einmal gut durchmischt. Anschließend wurde mit einer Glaskapillare eine kleine Probe entnommen. Diese Probe wurde an beide Enden des Deckglases der Neubauer-Zählkammer pipettiert und durch dort herrschende Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen.

Durch Auszählen der vier großen Eckquadrate und das Einsetzen des Ergebnisses n in folgende Formel

$$Z = n/4 \cdot 10^4 \cdot 2$$

konnte die Zellzahl (Z) pro ml ermittelt werden.

Das Zählergebnis n wurde hierbei mit dem Faktor $1 \cdot 10^4$ multipliziert, um die Zellzahl im Flüssigkeitsvolumen eines Eckquadrates von 0,1µl auf die Zellzahl

pro ml umzurechnen. Zusätzlich wurde das Zählergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert, um die Verdünnung Zellsuspension : Trypanblau = 1 : 1 zu berücksichtigen.

Aufgrund der Resuspension des Zellpellets in 40ml Vollmedium musste die Zellzahl pro ml mit dem Faktor 40 multipliziert werden, um die totale Zellzahl zu erhalten.

2.2.5 Anlegen der Cokultur

2.2.5.1 Vorversuche

Um für die Cokultur die optimale Zellzahl an Fibrochondrozyten und HUVEC zu ermitteln, wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Die Fibrochondrozyten wurden hierfür in unterschiedlicher Anzahl von $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ Zellen in jeweils zwei Wells einer 6 Well Platte ausgesiedelt. Anschließend wurden die HUVEC, die in unterschiedlicher Anzahl von $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ Zellen in jeweils zwei Inserts ausgesiedelt worden waren, der 6 Well Platte hinzugefügt. Die 6 Well Platte wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert und die Zelldichte der Fibrochondrozyten und HUVEC direkt nach Aussaat, nach 4 Tagen (Zeitpunkt 1) und nach 10 Tagen (Zeitpunkt 2) beurteilt.

Bei den Fibrochondrozyten konnte die Bestimmung der Zelldichte unter dem Mikroskop stattfinden. Dies war bei den HUVEC nicht möglich da sie auf der porenhaltigen Membran des Inserts, wahrscheinlich durch an diesen Poren entstehende Lichtreflexe, im Mikroskop nur sehr schlecht zu erkennen waren. Die HUVEC wurden deshalb für die Bestimmung der Zelldichte mit einer Coomassie Färbung angefärbt. Nach dieser Färbung standen die HUVEC für die Cokultur nicht weiter zur Verfügung, weshalb für die beiden verschiedenen Zeitpunkte (nach 4 Tagen und nach 10 Tagen) zwei der oben beschriebenen 6 Well Platten angesetzt wurden.

Die optimale Zelldichte wurde nach zwei Kriterien bestimmt. Einerseits sollte es nach der Aussaat schon einige Zellkontakte zwischen den Zellen geben, damit die Zellen besser proliferieren, andererseits sollte frühestens nach 10 Tagen ein

kompletter Zellrasen entstanden sein, damit die Zellen bis zum Abschluss der Cokultur die Möglichkeit haben, auf Einflüsse der jeweils anderen Zellen zu reagieren.

2.2.5.2 Aussiedelung der Fibrochondrozyten

Die primär in Zellkulturflaschen proliferierten und abgeernteten Fibrochondrozyten wurden für die Cokultur in 6 Well Platten überführt. Pro Well wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesiedelt. Durch die Zellzahlbestimmung konnte berechnet werden, wieviel ml der Zellsuspension $1 \cdot 10^5$ Zellen enthalten. Die Anzahl der ml wurde für jeden Patienten individuell berechnet und in das Well überführt (nähere Angaben siehe Tabelle 2). Anschließend wurde jedes Well mit EBM Vollmedium auf 3ml aufgefüllt.

Die 6 Well Platten wurden anschließend über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dies war nötig, um den Fibrochondrozyten schon eine gewisse Adhärenz zum Boden der 6 Well Platte zu gewähren, um nicht bei Zugabe der Inserts die sonst frei im Medium schwimmenden Zellen durch die Poren der Insertmembran zu drücken.

	MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5	MP 6	Huvec
Zellen / ml	$0.58 \cdot 10^5$	$1.11 \cdot 10^5$	$0.84 \cdot 10^5$	$1.53 \cdot 10^5$	$1.67 \cdot 10^5$	$1.35 \cdot 10^5$	$1.25 \cdot 10^5$
ml / Well	1.7	0.9	1.2	0.7	0.6	0.7	0.2

Tabelle 2: Zellzahlen

2.2.5.3 Zugabe der Inserts und HUVEC

Die Inserts waren steril verpackt und wurden unter der Sterilbank vorsichtig geöffnet und mit einer sterilen Pinzette in das Well überführt. In das Insert kamen anschließend $2,5 \cdot 10^4$ HUVEC. Die Bestimmung der Zellzahl und die Berechnung der Anzahl der ml der Zellsuspension erfolgten hier genauso wie bei den Fibrochondrozyten. Anschließend wurde das Insert mit EBM

Vollmedium auf 2ml aufgefüllt. Folgende Abbildung zeigt ein Well der fertigen Cokultur im Querschnitt.

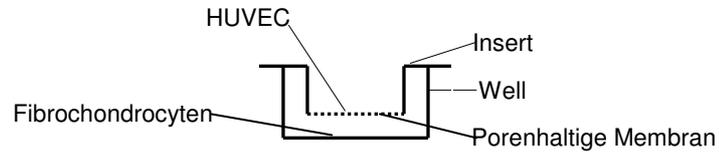


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Cokultur

Pro Patient wurden 2 solcher Cokulturen angelegt. Eine 6 Well Platte für die Zellernte nach 4 Tagen (Zeitpunkt 1) und eine für die Zellernte nach 10 Tagen (Zeitpunkt 2) siehe auch Abb.8.

2.2.5.4 Reine Fibrochondrocytenkultur als Kontrolle

Um den Einfluss der HUVEC auf die Fibrochondrozyten beurteilen zu können, wurde zusätzlich zur Cokultur als Kontrolle eine reine Fibrochondrozytenkultur angelegt. Auch hier wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Well ausgesiedelt. Pro Patient gab es zwei solcher Kontrollkulturen, die auch jeweils nach 4 Tagen (Zeitpunkt 1) und nach 10 Tagen (Zeitpunkt 2) geerntet wurden. Für die Cokultur und die Kontrollkultur herrschten während des gesamten Versuchszeitraumes die gleichen Bedingungen.

Zusätzlich wurden für jeden Patienten noch zwei 6 Well Platten für eine Immunhistochemie zum Zeitpunkt 1 und zum Zeitpunkt 2 angelegt. Hierbei wurde der Rest der aus der Zellernte der Primärkultur erhaltenen Zellsuspension verwendet. Somit war die Anzahl der verwendeten Zellen bei den einzelnen Patienten unterschiedlich, was für die Immunhistochemie allerdings nicht relevant ist.

2.2.6 Coomassie-Färbung

2.2.6.1 Herstellung der Coomassie Färbelösung

Für die Coomassie staining solution wurden 50ml Methanol, 0,5mg Coomassie Brillant Blue R-250, 10ml Acetessigsäure und 40ml H₂O bidest. in einem Gefäß gemischt. Zusätzlich wurde eine Waschlösung hergestellt, die bis auf Coomassie Brillant Blue die gleichen Ingredienzien in gleicher Menge enthielt.

2.2.6.2 Durchführung der Coomassie Färbung

Für die Färbung wurden die Inserts zunächst unter sterilen Bedingungen aus den 6 Well Platten herausgehoben, das Medium wurde mit einer Pipette abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die HUVEC auf dem Insert fixiert. Hierzu wurden sie mit 100% Ethanol bedeckt und für 10 min bei -20°C gelagert. Das Ethanol wurde abgesaugt, und pro Insert wurde 1ml der Coomassie staining solution hinzugefügt. Um ein gute Färbung zu erzielen, verweilten die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur in dieser Lösung. Danach wurden sie zuerst mit der Waschlösung und dann 5 min lang mit H₂O bidest. gewaschen.

Nach der Färbung waren die HUVEC unter dem Mikroskop sehr gut sichtbar und die Zellzahl und Zelldichte konnte beurteilt werden.

2.2.7 Endostatin Sandwich-ELISA

2.2.7.1 Allgemeines und Prinzip

ELISA steht für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Bei diesem Verfahren macht man sich das Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper Bindung zu Nutze. Mittels ELISA kann ein bestimmtes Antigen sehr sensitiv und auch quantitativ in einer Probe nachgewiesen werden.

Beim Sandwich ELISA ist ein für das nachzuweisende Antigen spezifischer monoklonaler Primärantikörper an einer Festphase gebunden (gecoatete Antikörper). Nach Zugabe der Probe, bindet jegliches in dieser Probe

enthaltene spezifische Antigen an diesen immobilisierten Primärantikörper nach dem Schlüssel-Schloß Prinzip.

Es folgt der erste Waschschrift, um alle nicht gebundenen Substanzen aus der Probe zu entfernen. Anschließend wird ein monoklonaler Sekundärantikörper, an den ein Enzym gebunden ist, hinzugefügt. Dieser bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen allerdings an ein anderes Epitop als der Primärantikörper.

Daraufhin folgt der zweite Waschschrift, um nicht gebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Das anschließend hinzugefügte Substrat wird durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym in ein farbiges Produkt umgewandelt.

Die Anwesenheit des Antigens wird somit durch einen Farbumschlag sichtbar und kann durch photometrische Messung der Farbintensität auch quantifiziert werden. Schematische Darstellung siehe Abbildung 10.

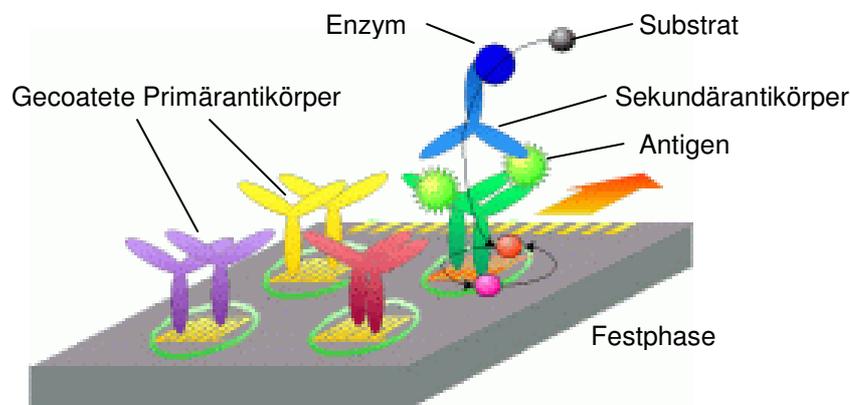


Abbildung 10: Prinzip des Sandwich ELISA (nach R&D Systems)

2.2.7.2 Durchführung des Endostatin ELISA

Da man Endostatin im Speichel des Menschen nachweisen kann, wurde während der gesamten Versuche ein Mundschutz und Einmalhandschuhe

getragen, um eine Kontamination und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

Zunächst wurde eine Endostatin Konzentrationsreihe mit vorgegebenen Endostatin Konzentrationen hergestellt, um später durch Photometrische Messung der Farbintensität der einzelnen Konzentrationen eine Eichkurve anfertigen zu können. Hierzu wurde dem bereits im bestellten Endostatin ELISA Kit enthaltenen Endostatin Standard 1ml destilliertes Wasser hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15min lang vorsichtig geschüttelt, bis sich der Endostatin Standard vollständig im destillierten Wasser gelöst hatte. Die fertige Lösung hatte eine Endostatin Konzentration von 100ng/ml. Um unterschiedliche Endostatin Konzentrationen zu erhalten wurde anschließend eine sechsteilige Verdünnungsreihe angesetzt. In ein erstes Reagenzglas wurden 100 μ l des hergestellten Endostatin Standards mit 900 μ l des im Kit enthaltenen Calibrator Diluent RD5P gemischt. Hieraus ergab sich eine Endostatin Konzentration von 10ng/ml. In jedem weiteren Verdünnungsschritt wurden 500 μ l der zuvor hergestellten Lösung mit weiteren 500 μ l des Calibrator Diluent RD5P gemischt, so dass sich die Endostatin Konzentration von Schritt zu Schritt halbierte (siehe Abbildung 11).

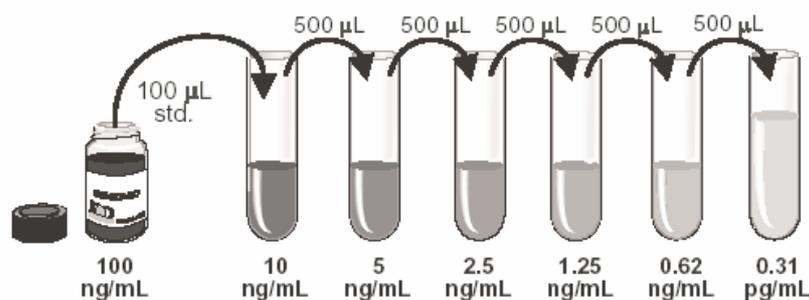


Abbildung 11: Herstellung der Endostatin Konzentrationsreihe (nach R&D Systems)

Jedem Well der im Endostatin ELISA Kit enthaltenen 96 Well Platte mit gecoateten Endostatin Primärantikörpern wurde zu Beginn 100 μ l Assay Diluent RD1W hinzugefügt. Anschließend wurden je 50 μ l der unterschiedlichen Proben,

die zur Bestimmung der Endostatinkonzentration herangezogen wurden, in die einzelnen Wells pipettiert. Bei diesen Proben handelte es sich einerseits um die unterschiedlichen Konzentrationen des Endostatin Standards für die spätere Eichkurve und andererseits um die Zellüberstände der einzelnen Patienten. Diese Zellüberstände waren während der Zellkultur gesammelt und bei -20°C gelagert worden. Von jedem Patienten wurden die Zellüberstände aus den primären Zellkulturflaschen, die Überstände zum Zeitpunkt 1 und 2 der Cokultur und die Überstände zum Zeitpunkt 1 und 2 der Kontrolle für den Endostatin ELISA herangezogen. Die Endostatinkonzentration der einzelnen Proben wurden stets doppelt oder sogar dreifach bestimmt, um aus den gemessenen Extinktionswerten Durchschnittswerte ermitteln zu können und somit genauere Ergebnisse zu erhalten.

Nachdem alle Proben in die Wells pipettiert worden waren, wurde die 96 Well Platte für 2h auf dem Schüttler bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Überstände aus den Wells abpipettiert und jedes Well viermal mit der im Kit enthaltenen Waschlösung gewaschen. Bei diesen Waschvorgängen wurde in jedes Well jeweils 400 μl Waschlösung pipettiert und dann wieder vollständig abgesaugt.

Anschließend wurde in jedes Well 200 μl des Sekundärantikörpers (Endostatin Conjugate) pipettiert. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen Maus Antikörper gegen Endostatin, an den das Enzym Peroxidase gebunden ist.

Nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde die 96 Well Platte abermals für 2h auf dem Schüttler bei 500 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Überstände abgesaugt und die einzelnen Wells wie beim ersten Waschvorgang gewaschen.

In jedes Well wurden anschließend 200 μl Substrate Solution pipettiert und die Platte dann für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym des Sekundärantikörpers reagierte nun mit dem zugefügten Substrat, was sich durch einen Farbumschlag bemerkbar machte. Nach 30 min wurde diese Reaktion gestoppt, indem in jedes Well 50 μl Stop Solution pipettiert wurde. Anschließend wurde in einem ELISA Reader die Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm in jedem einzelnen Well gemessen.

2.2.8 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden die Fibrochondrozyten zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 der Zellkultur angefärbt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, eine Kontamination der Zellkulturen mit anderen Zelltypen wie Endothelzellen oder Makrophagen, die auch Bestandteil des humanen Meniskus sind, auszuschließen.

2.2.8.1 Allgemeines und Prinzip

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität von Antikörpern um Antigene sichtbar zu machen, die nach Möglichkeit für ein Gewebe oder einen Zelltyp charakteristisch sein sollten. So kann man mit Hilfe der Färbung verschiedene Zelltypen voneinander unterscheiden.

Um die Fibrochondrozyten der Zellkultur anzufärben, wurden Antikörper gegen die für Meniskus spezifischen Antigene Kollagen I und Kollagen II verwendet. Außerdem wurde eine Färbung mit einem Antikörper gegen den klassischerweise von Endothelzellen exprimierten von Willebrand Faktor durchgeführt, um den Anteil an Endothelzellen in der Fibrochondrozytenkultur abschätzen zu können.

Für die Immunhistochemie werden in der Regel zwei Antikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das von der Zelle exprimierte Antigen (siehe Abbildung 11, **I**). Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugefügt, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet. Der im nächsten Schritt zugefügte Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex enthält Avidin, das vier Biotin Bindungsstellen aufweist. An zwei bis drei dieser Bindungsstellen ist bereits ein Biotin Peroxidase Komplex gebunden. Mit den noch freien Bindungsstellen bindet das Avidin an den biotinylierten Sekundärantikörper (siehe **II**). Das an den Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex gebundene Enzym Peroxidase wandelt den letztlich zugefügten Indikatorstoff 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in einen roten Farbstoff um (siehe **III**).

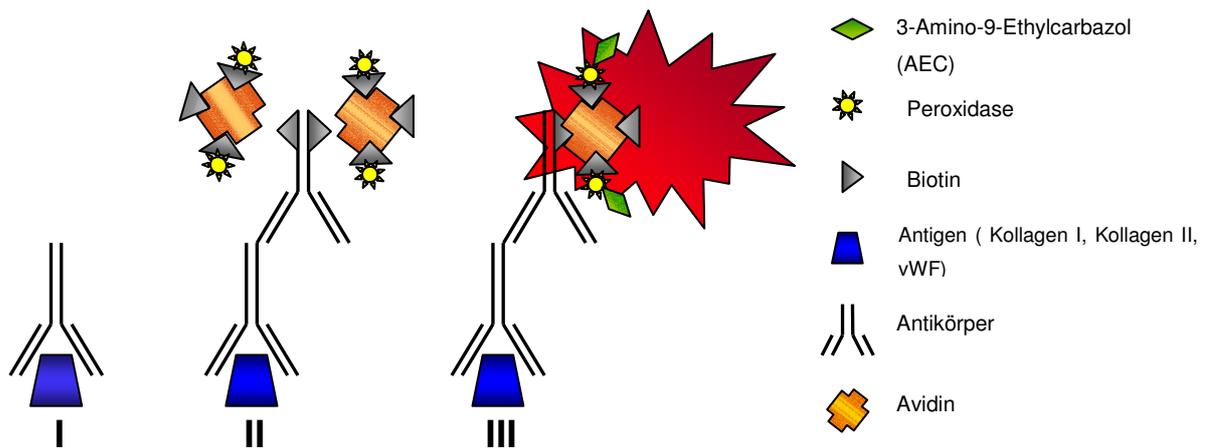


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Immunhistochemie

Nach Zugabe der Antikörper muss die Kultur jedes Mal gründlich gewaschen werden, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und somit nur Zellen anzufärben, die das Antigen wirklich exprimieren.

2.2.8.2 Herstellung der Reagenzien

PBS-Puffer:	<i>1 PBS-Tablette (Invitrogen), 500 ml H₂O bidest.</i>
0.1% Phenylhydrazin-Lösung:	<i>0.01 ml Phenylhydrazin, 10 ml PBS-Puffer</i>
1% BSA-Lösung:	<i>0.5 g bovines Albumin, 50 ml PBS-Puffer</i>
Sekundär-Antikörper-Lösung:	<i>2.5 ml PBS-Puffer, 1 Tropfen Normal-Blocking-Serum, 1 Tropfen biotinylierter Antikörper</i>
ABC-Komplex-Lösung:	<i>2.5 ml PBS-Puffer, 1 Tropfen Lösung A, 1 Tropfen Lösung B (Vectastain Universal Elite ABC-Kit)</i>
AEC-Chromogen-Lösung:	<i>5 ml H₂O bidest., 2 Tropfen Pufferlösung (pH 5.3), 3 Tropfen AEC-Lösung, 2 Tropfen H₂O₂ (Vectastain AEC-Substrate-Kit for Peroxidase)</i>

2.2.8.3 Vorbereitung

Nach Aufteilung der Fibrochondrozyten aus der Primärkultur auf die Cokultur und die Kontrollkultur wurden die restlichen Zellen für die immunhistochemischen Färbungen in 6 Well Platten überführt. Auch die Immunhistochemie wurde jeweils zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 durchgeführt. Da die Zellen gerade erst geerntet worden waren, war die Färbung zum Zeitpunkt 0 nicht sofort möglich. Die Zellen wurden deshalb über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um ihnen eine gewisse Adhärenz zum Boden der Zellkulturflasche und eventuelle Zellteilungen zu ermöglichen. Die Färbungen der Zeitpunkte 1 und 2 fanden wie gewohnt nach 4 bzw. 10 Tagen statt.

Um die Zellen für die Färbung vorzubereiten, wurden sie anfangs zwei Mal mit PBS-Puffer gewaschen, um Stoffwechsel- und Abfallprodukte die im Überstand enthalten sind zu entfernen. Hierzu wurde das Medium vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und den Zellen 1ml PBS zugefügt. Anschließend wurde die 6 Well Platte für 2 min auf einem Schüttler geschwenkt.

Um die Zellen auf der Platte zu fixieren, wurden sie mit 100% Ethanol bedeckt und für 10 min bei -20° C im Gefrierschrank inkubiert. Nachdem das Ethanol abgesaugt und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie zur Inaktivierung endogener Peroxidasen mit 0.1% Phenylhydrazin-Lösung bedeckt. Diese Lösung wurde nach einer Inkubationszeit von 30min bei Raumtemperatur wieder abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1% bovine Serumalbumin-Lösung (BSA-Lösung) für 1h bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, welche ebenfalls ein falsch positives Ergebnis hätten vortäuschen können.

2.2.8.4 Zugabe der Antikörper

Vor Gebrauch wurden die Primärantikörper zuerst mit 1% BSA-Lösung im Verhältnis von 1:100 verdünnt. Nun wurden 0,5ml des jeweiligen Primärantikörpers in die einzelnen Wells pipettiert und die Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde bei diesem Schritt absichtlich

so niedrig gewählt, um eine höhere Spezifität der Antigen-Antikörper Bindung zu erreichen. Nach etwa 12h wurde die Antikörperlösung vorsichtig abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS 5min lang gründlich gewaschen. Dies war notwendig, um alle nicht gebundenen Primärantikörper sorgfältig zu entfernen und somit ein falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Im nächsten Schritt wurde nun der biotinylierte Sekundärantikörper, der an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet, zugefügt und die Zellen bei 37°C für 1h in den Brutschrank gestellt. Es folgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS, um die nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die ABC-Komplex Lösung zugefügt und die Zellen für 30min bei 37°C inkubiert. Durch die zugeführte Lösung bildet sich ein Avidin Biotin Peroxidase Komplex, indem das in der ABC-Komplex Lösung enthaltene Avidin an das an den Sekundärantikörper gebundene Biotin irreversibel bindet. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit PBS konnte die Färbung durchgeführt werden.

2.2.8.5 Färbung

Für die endgültige Färbung wurden die Zellen für 30 min mit AEC-Chromogen-Lösung bedeckt, wobei durch das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Peroxidase, unter Beteiligung von Wasserstoffperoxid, das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zu einem roten Farbstoff oxidiert wird und ausfällt. Dieses Reaktionsprodukt ist außerordentlich stabil und lagert sich in unmittelbarer Nähe des Antigens ab, so dass eine genaue lichtmikroskopische Zuordnung möglich ist.

Abschließend wurden die Zellen abermals mit PBS und H₂O bidest. gewaschen. Die Ergebnisse der Färbung wurden unter dem Mikroskop ausgewertet und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.9.1 Allgemeines und Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ist ein erstmals von K. Mullis und Mitarbeitern (1984) beschriebenes biochemisches Verfahren zur selektiven Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist man in der Lage spezifische Transkriptionsprodukte, also mRNA einer Zelle, nach reverser Transkription in cDNA so zu amplifizieren, dass sie mittels Gelelektrophorese nachweisbar sind. Um einen spezifischen Genabschnitt zu amplifizieren, werden zwei Primer verwendet, die komplementär zur cDNA bzw. deren Gegenstrang sind und den gewünschten Genbereich umspannen.

Amplifiziert wird dieser Genbereich mithilfe einer Taq-Polymerase (DNA-Polymerase) aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, da dieses Enzym hitzestabil ist und somit auch bei höheren Temperaturen nicht denaturiert. Zusätzlich sind für die PCR noch verschiedene Pufferlösungen zur Stabilisation und Nukleotide als Substrate der DNA-Polymerase erforderlich.

Während eines PCR Zyklus wird die DNA erst bei 94 °C denaturiert. Dann wird das Reaktionsgemisch auf die für den spezifischen Primer optimale Bindungstemperatur, welche von dessen Basenzusammensetzung abhängt, heruntergekühlt (*annealing temperature*). Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 72 °C dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erhitzt, um optimale Bedingungen für die DNA-Synthese zu schaffen (*Extension*) (siehe Abbildung 12).

Die präzise Einstellung der unterschiedlichen Temperaturen während eines PCR-Zyklus erreicht man mit Hilfe eines Thermocyclers, der außerdem durch einen beheizbaren aufliegenden Deckel die Verdunstung des Reaktionsgemisches verhindert.

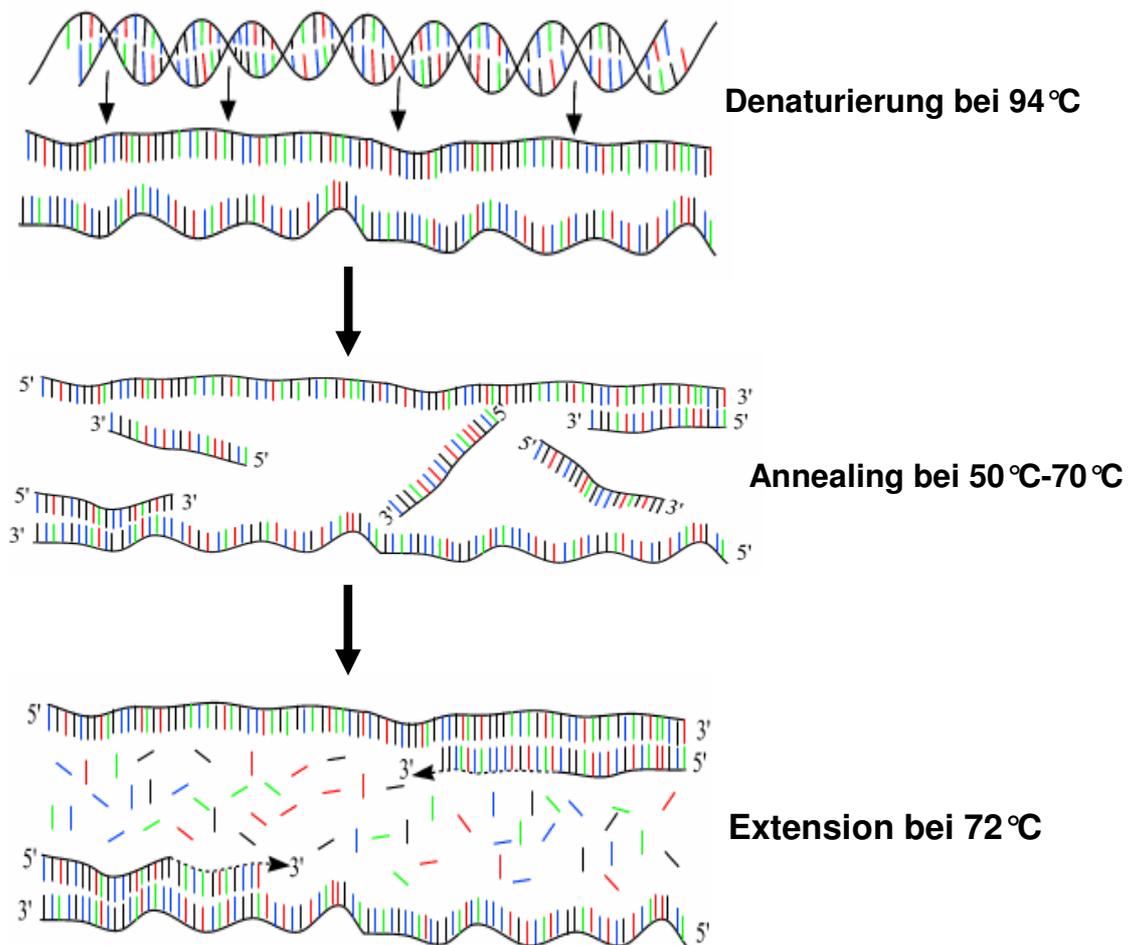


Abbildung 13: Schematische Darstellung der PCR (nach Andy Vierstraete, 1999)

Durch mehrfache Wiederholung eines in Abbildung 13 dargestellten PCR-Zyklus wird das gewünschte DNA Fragment exponentiell amplifiziert (siehe Abbildung 14).

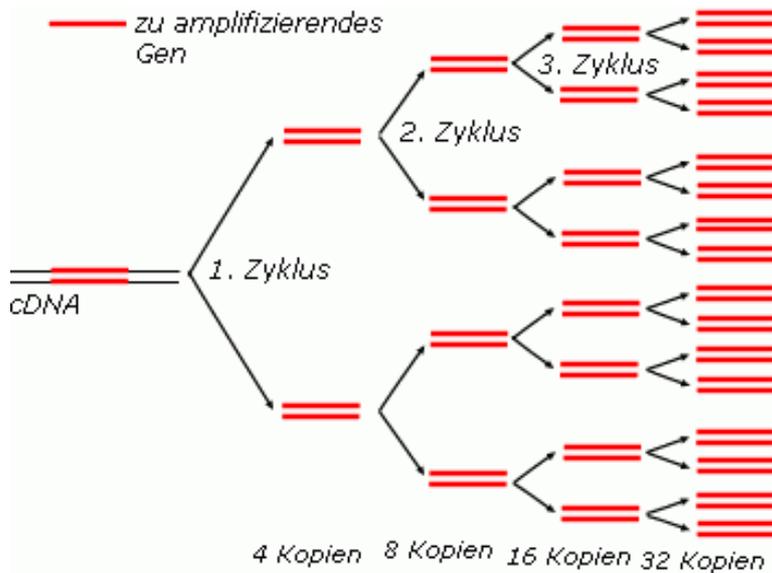


Abbildung 14: Exponentielle Amplifikation

2.2.9.2 RNA-Extraktion

Um die in der späteren PCR zu amplifizierende cDNA zu erhalten, wurde aus den Fibrochondrozyten zunächst die mRNA isoliert. Dies erfolgte im Anschluss an die Zellernte mit Hilfe eines RNeasy-Minikits der Firma Qiagen. Vor Beginn wurde 1ml des im Kit enthaltenen RLT-Puffers mit 10µl Mercaptoethanol versetzt und der RPE-Puffer mit 100% Ethanol verdünnt.

Die Zell-Vollmedium Suspension aus der Zellernte wurde bei 4°C und 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde dann in 1ml PBS resuspendiert und abermals bei 4°C und 1500 U/min für 10min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Im nächsten Schritt wurde dem Zellpellet 350µl RLT-Pufferlösung und 350µl 70% Ethanol zugefügt, um die Zellen zu lysieren. Mit Hilfe einer Insulinspritze wurde die Suspension so lange homogenisiert bis keine Zellklümpchen mehr zu sehen waren. Das gesamte Volumen wurde nun auf eine Säule (Spin Column) des Minikits übertragen und bei 10000 U/min 15s lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. In den Spin Columns wird die RNA aufgrund von Ionenaustauscheffekten gebunden, so dass man alle anderen Zellbestandteile abzentrifugieren und somit die RNA der Zelle isolieren kann.

Anschließend wurden 350µl RW1-Puffer aufgetragen und die Säule bei Raumtemperatur und 10000 U/min 15s lang zentrifugiert und das Eluat verworfen. Durch Zugabe von 10µl DNase Stocksolution und 70 µl RDD-Puffer auf die Säulenmitte und einer Inkubationszeit von 15 min wurde nun die nicht erwünschte DNA zerkleinert. In den folgenden Waschschrritten zuerst mit 350µl RW1-Puffer und dann zweimal mit je 500µl RPE-Puffer konnte die DNA dann eliminiert werden. Im Gegensatz zu den Zentrifugationen nach den ersten zwei Waschschrritten unter oben genannten Bedingungen wurde die Säule beim zweiten Auftragen des RPE-Puffers für 2min mit 20000 U/min zentrifugiert. Um die Säule zu trocknen und auch das restliche Ethanol aus der Säule zu entfernen, wurde diese nach Verwerfen des Eluates aus den einzelnen Waschschrritten nochmals 15s bei 20000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert.

Nun konnte die RNA aus der Säule eluiert werden. Hierzu wurde die Säule vorab in ein Eppendorf-Cup gestellt und 40µl RNase-freies ddH₂O aufgetragen. Nach 1min Zentrifugation bei 10000 U/min befand sich die RNA-H₂O-Suspension im Eppendorf-Cup.

Aus dieser Suspension wurde ein Teil für die RNA-Quantifizierung entnommen und der Rest bis zur Umschreibung in cDNA maximal 3h bei -20°C gelagert. Diese schnelle Umschreibung war notwendig, da die RNA nicht sehr stabil ist und ansonsten von der ubiquitär vorkommenden RNase innerhalb kurzer Zeit zerstört worden wäre.

2.2.9.3 RNA-Quantifizierung

Für die RNA-Quantifizierung wurden 4µl RNA-H₂O-Suspension mit 196µl Ampuwa-Wasser versetzt (Verdünnung 1:50) und die Extinktion gegen reines Ampuwa Wasser bei 260nm und 280nm gemessen. Möglich war dies mit Hilfe eines Photometers (Jasco V530).

Die Extinktion beschreibt hierbei die Absorption des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge durch die RNA und ist daher proportional zur Menge der RNA. Da die RNA bei 260nm ein Extinktionsmaximum hat, also Licht dieser Wellenlänge

bevorzugt von RNA und nur geringfügig von anderen Substanzen absorbiert wird, ist dies die Wellenlänge der Wahl für die Quantifizierung. Bei einer Wellenlänge von 280nm dagegen absorbieren hauptsächlich Proteine das Licht. Der Quotient E_{260nm} / E_{280nm} beschreibt daher die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1.5 und 2.0 liegen.

Mithilfe der folgenden Formel

$$R = E_{260nm} \cdot 40 \text{ (Extinktionskoeffizient)} \cdot 50 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

kann man die Menge der RNA (R) in der Einheit μg berechnen.

2.2.9.4 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurde die aus den Zellen isolierte Einzelstrang RNA in eine komplementäre Doppelstrang DNA umgeschrieben. Alle hierfür benutzten Reagenzien stammten aus dem RT-for-PCR-Kit der Firma Clontech.

Dieses Kit wurde stets bei -20°C gelagert und die Reagenzien nur vor Gebrauch schonend auf Eis aufgetaut.

Für die eigentliche Umschreibung wurden $25\mu\text{l}$ RNA- H_2O -Suspension mit $8\mu\text{l}$ Oligo(dT)primer in einem Eppendorf-Cup gemischt und 2min bei 72°C inkubiert. Dies war erforderlich, um die RNA zu strecken und die Anlagerung des Oligo(dT)primers an den Poly-A-Schwanz der RNA zu ermöglichen. Anschließend wurde das Eppendorf-Cup sofort auf Eis gestellt, damit sich die RNA nicht wieder zusammenziehen konnte.

Für die eigentliche Synthese des DNA Stranges wurden schließlich $8\mu\text{l}$ eines 5xReaktionspuffers für stabile pH-Verhältnisse, $2\mu\text{l}$ dNTP-Mix als Grundbausteine der DNA, $1\mu\text{l}$ rekombinanter RNase-Inhibitor zum Schutz der RNA und $2\mu\text{l}$ MMLV-Reverse-Transkriptase, als Enzym für die DNA-Synthese, dem Gemisch hinzugefügt. Die Mischung wurde zuerst für 1h bei 42°C und abschließend, um einen Synthesestop zu erzielen, für 4min bei 94°C inkubiert.

Die fertige DNA wurde dann bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Nach der Extraktion der RNA aus den Fibrochondrozyten und der Umschreibung in cDNA wurde bei jeder der gewonnenen Proben eine PCR für die Glycerinphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Da dieses Gen in

jeder Zelle vorkommt, ist dies ein Nachweis dafür, dass die Extraktion der RNA und die Umschreibung in cDNA erfolgreich waren.

2.2.9.5 Durchführung der PCR

Die von der Firma Böhlinger-Mannheim hergestellten für die PCR verwendeten Reagenzien wurden stets bei -20 °C gelagert und erst vor Gebrauch langsam auf Eis aufgetaut. Auch während des Gebrauchs lagerten die Reagenzien auf Eis.

Für die PCR wurden 26 µl RNase freies Wasser, 2 µl Taq-Polymerase, 5 µl 10xPCR-Puffer zur Stabilisation der pH-Verhältnisse, 9 µl Magnesiumchlorid (25 mM) als Stabilisator der Taq Polymerase, 1 µl 10mM dNTP-Mix als Substrate der Taq-Polymerase, sowie je 1 µl Upper- und Lower-Primer, um den zu amplifizierenden Genbereich einzugrenzen, in einem sterilen 0,5 ml Eppendorf Cup gemischt. Anschließend wurde diesem Gemisch noch 5 µl cDNA hinzugefügt und das ganze gut durchmischt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in einen vorgewärmten PCR-Block überführt (Warmstart) und das Programm gestartet.

Um die Ergebnisse der PCR zu optimieren, wurde in zahlreichen Vorversuchen die Menge an 10xPCR-Puffer, Magnesiumchlorid sowie die annealing Temperatur variiert. Die für die endgültigen Versuche verwendeten Mengen und Temperaturen sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Gen	Länge [bp]	Denaturierung	Annealing	Extension	Zyklen	Puffer ohne MgCl ₂ / MgCl ₂ [µl]
GAPDH	983	94 °C/1 min	60 °C/1 min	72 °C/10min	34	5/9
Angiopoietin 1	242	94 °C/1 min	56 °C/1 min	72 °C/10min	34	7,5/6,5
Angiopoietin 2	300	94 °C/1 min	55 °C/1 min	72 °C/10min	34	7,5/6,5
Thrombospondin 1	132	94 °C/1 min	64 °C/1 min	72 °C/10min	34	5/9
VEGF	180/311/ 384	94 °C/1 min	55 °C/2 min	72 °C/10min	34	5/9
SMAD 4	551	94 °C/1 min	64 °C/2 min	72 °C/10min	34	4/10

vWF	176	94 °C/1 min	56 °C/1 min	72 °C/10min	34	7,5/6,5
-----	-----	-------------	-------------	-------------	----	---------

Tabelle 3: PCR-Protokoll

Da Smad 4 von den Fibrochondrozyten nur schwach exprimiert wird, war es mit diesen Zellen nicht möglich, die PCR Bedingungen zu optimieren. Cao et al verwendeten die gleichen Smad 4 Primer an HL-60 Zellen (Promyelozyten Leukämie Zelllinie), welche deshalb zur Optimierung herangezogen wurden¹⁷. Auch für die Optimierung der PCR Bedingungen der Angiogenesefaktoren Angiopoietin 1 und Angiopoietin 2, die nur schwach von Fibrochondrozyten exprimiert werden, wurde aus HUVEC und Tumorzellen (CRL) gewonnene cDNA verwendet.

Zusätzlich wurde die Expression des Endothelzell-spezifischen von Willebrand Faktors analysiert, um zu überprüfen ob eine Kontamination der Fibrochondrozyten mit Meniskus eigenen Endothelzellen vorlag.

2.2.9.6 Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 6g Agarose in 400 ml 10xTBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle für 10min bei 600W aufgeköcht. Anschließend wurden 30µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gemisch mit Hilfe eines Magnetrührers solange gerührt, bis es auf ca. 60 °C abgekühlt war. 150 ml des abgekühlten Gels wurden in die Gelkammer gegossen und dann solange gewartet bis das Gel ausgehärtet war. Anschließend wurde die Gelkammer mit TBE-Puffer geflutet.

Für die Gelelektrophorese wurden 20µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 5µl Ladepuffer gemischt und in die einzelnen Taschen des Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurden 10µl eines Eichmarkers in eine der Agarosegel-Taschen pipettiert, um die Basenpaarlänge der einzelnen PCR-Produkte ermitteln zu können. Die Gelelektrophorese erfolgte schließlich bei einer Spannung von 60mV und einer Stromstärke von 40-60mA. Die negativ geladene DNA wandert dabei im elektrischen Feld in Richtung Plus-Pol. Aufgrund des Polysaccharid Netzes innerhalb des Agarosegels können kleinere DNA-Moleküle in der

gleichen Zeit im elektrischen Feld weiter wandern als größere DNA-Moleküle, wodurch man einzelne DNA Fragmente ihrer Größe (Basenpaarlänge) entsprechend, auftrennen kann (siehe Abbildung 15).

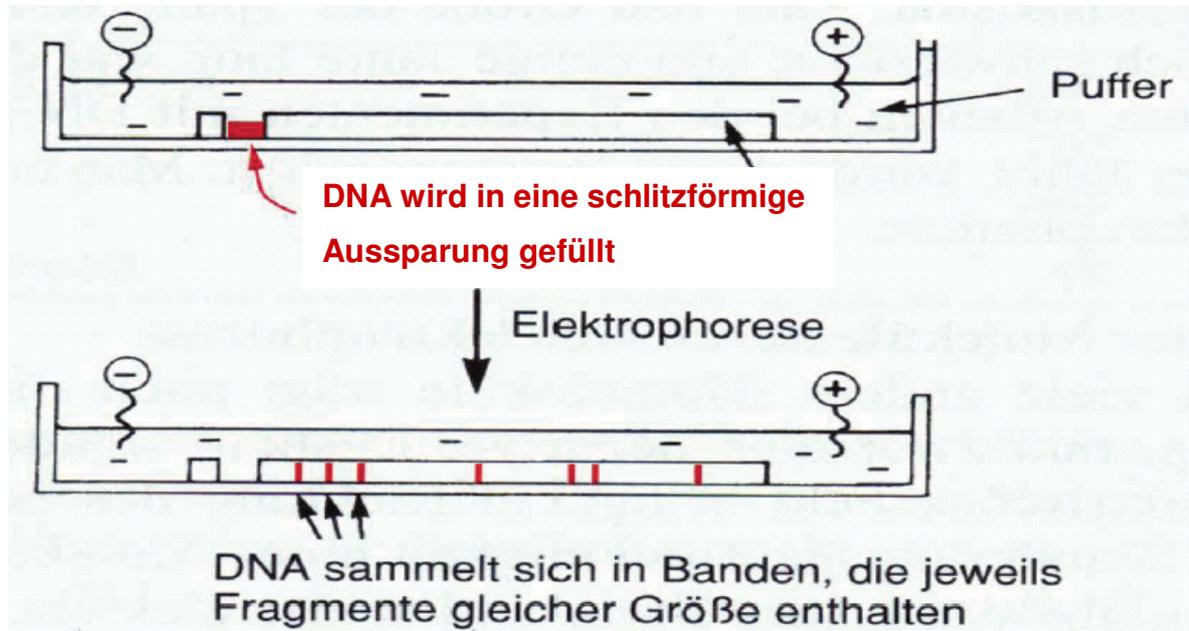


Abbildung 15: Prinzip der Gelelektrophorese

Mit Hilfe des Ethidiumbromids, das an die DNA bindet und im UV Licht fluoresziert, konnten die einzelnen DNA Banden mit UV Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Fibrochondrozyten

Es wurden Fibrochondrozyten-Primärkulturen von sechs Patienten (MP1 - MP6) angelegt. Je nach Inokulationsmenge dauerte es zwischen 6-8 Wochen bis sich ein geschlossener Zellrasen gebildet hatte. Nach durchschnittlich 48.5 Tagen ($s = 5,05$) wurden die Zellen geerntet.

Hauptkriterium für den Zeitpunkt der Ernte war ein geschlossener Zellrasen wie in Abbildung 16 und 17 zu sehen.

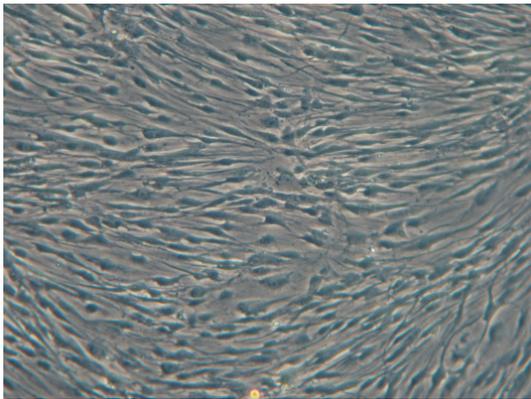


Abbildung 16: MP 2 zum Zeitpunkt 0

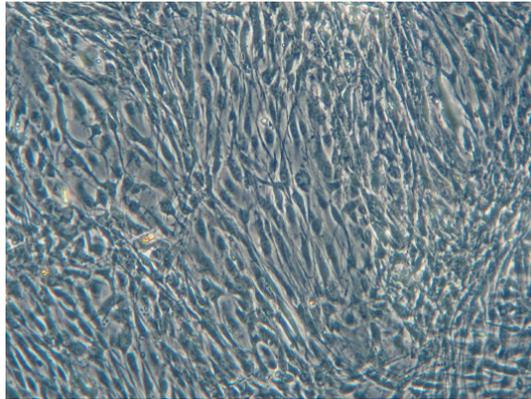


Abbildung 17: MP 4 zum Zeitpunkt 0

3.1.1.1 Zellzahl

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

Patient	Gesamt-Zellzahl	Gewebekulturflaschen
MP1	$3.5 \cdot 10^6$	3
MP2	$4.4 \cdot 10^6$	3
MP3	$3.8 \cdot 10^6$	3

MP4	$6.1 \cdot 10^6$	4
MP5	$6.7 \cdot 10^6$	4
MP6	$5.4 \cdot 10^6$	3
$\bar{x} = 4,98 \cdot 10^6$ $s = 1,28 \cdot 10^6$		

MP: Meniskus - Patient

Tabelle 4: Zellzahl der Primärkultur (Zeitpunkt 0)

Durchschnittlich wurden $4.98 \cdot 10^6$ Zellen pro Patient gezählt, bei einer Standardabweichung von $s = 1,28 \cdot 10^6$ Zellen/Patient.

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

Patient	Cokultur ZP1 + ZP 2	Kontrollkultur ZP1 + ZP 2	PCR ZP 0	IHC ZP 0 + ZP1 + ZP 2
MP1	pro Well $1 \cdot 10^5$ Zellen	pro Well $1 \cdot 10^5$ Zellen	jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen	je $3.3 \cdot 10^4$ Zellen
MP2				je $3.3 \cdot 10^5$ Zellen
MP3				je $1.3 \cdot 10^5$ Zellen
MP4				je $9.0 \cdot 10^5$ Zellen
MP5				je $1.1 \cdot 10^6$ Zellen
MP6				je $6.7 \cdot 10^5$ Zellen

MP: Meniskus – Patient; IHC: Immunhistochemie, ZP: Zeitpunkt

Tabelle 5: Aufteilung der Fibrochondrozyten

3.1.1.2 RNA-Quantifizierung

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

Die Reinheit der RNA wurde aus dem Quotient E_{260nm} / E_{280nm} von MP 1-3 beispielhaft berechnet, wobei der Quotient einen Wert zwischen 1.5 und 2.0 einnehmen sollte, was in den Messungen bestätigt wurde.

Patient / ZP	E _{260nm}	E _{280nm}	RNA-Menge [µg]	E _{260nm} / E _{280nm}
MP1 / ZP0	0,0511	0,0247	4,09	2,07
MP1 / ZP1	0,1123	0,0642	8,98	1,75
MP1 / ZP2	0,1532	0,0835	12,26	1,83
MP2 / ZP0	0,2187	0,1391	17,49	1,57
MP2 / ZP1	0,1645	0,0973	13,16	1,69
MP2 / ZP2	0,1381	0,0758	11,05	1,82
MP3 / ZP0	0,2603	0,1322	20,82	1,97
MP3 / ZP1	0,1443	0,0830	11,54	1,74
MP3 / ZP2	0,2332	0,1543	18,656	1,51
			$\bar{x} = 13,12$ s = 5,19	$\bar{x} = 1,77$ s = 0,18

MP: Meniskus – Patient; ZP: Zeitpunkt; E: Extinktion;

Tabelle 6: Ergebnisse der RNA-Quantifizierung

Es ergab sich eine durchschnittliche RNA-Menge von 13,12 µg bei einer Standardabweichung von s = 5,19.

Der Quotient E_{260nm} / E_{280nm} lag im Mittel bei 1,77 (s = 0,18).

3.1.2 HUVEC

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

3.1.2.1 Zellzahl

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

Gesamt-Zellzahl	Gewebekulturflasche	Zellmenge pro Insert
$5.3 \cdot 10^6$	1	$2.5 \cdot 10^4$

Tabelle 7: Zellzahlbestimmung / Aufteilung der HUVEC

3.1.3 Zellmorphologie

Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden die Cokultur und die Kontrolle regelmäßig unter dem Mikroskop beobachtet, um die Proliferation, Morphologie und Adhäsion der Zellen beurteilen und vergleichen zu können. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen der Cokultur sowie der Kontrolle sich stets adhäsiv darstellten und ähnlich schnell proliferierten. Auch hinsichtlich der Morphologie wiesen die Zellen der einzelnen Patienten keine Differenzen auf.

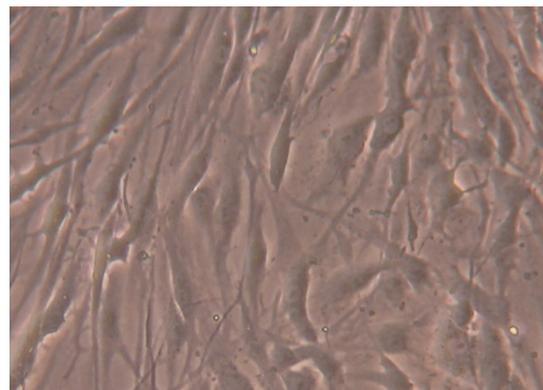
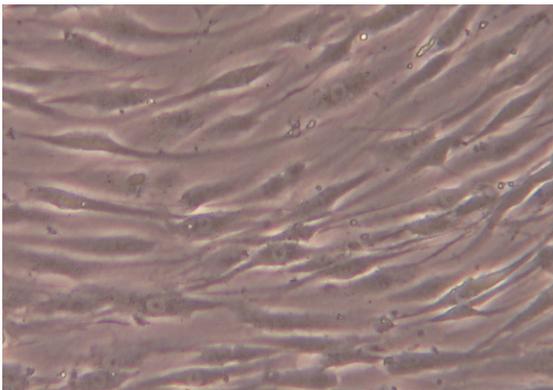


Abbildung 18: Cokultur Zeitpunkt 1; MP 4

Abbildung 19: Kontrolle ZP 1; MP 4

ZP: Zeitpunkt; ZP 1: nach 4 Tagen Kultur; ZP 2: nach 10 Tagen Kultur; MP: Meniskus - Patient

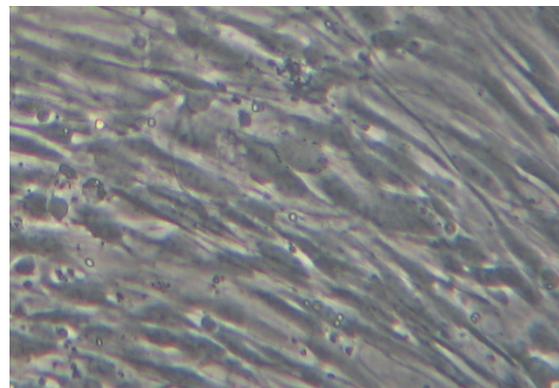
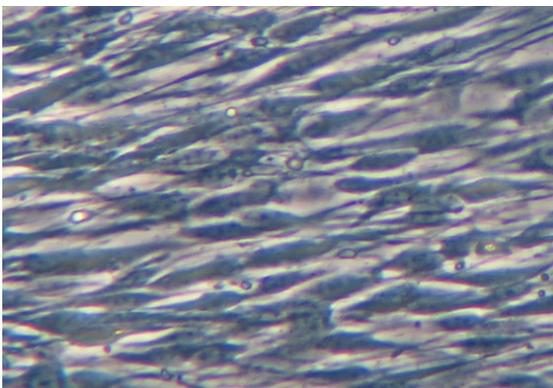


Abbildung 20: Kontrolle ZP 2; MP 6

Abbildung 21: Cokultur ZP 2; MP 6

3.2 Zellcharakterisierung

3.2.1 RT PCR

3.2.1.1 Standardisierung

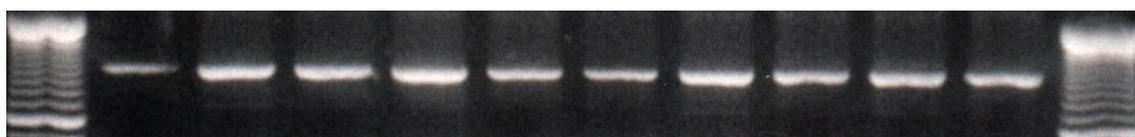
Mit Hilfe der PCR für die Glycerinphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) konnte bewiesen werden, dass die Extraktion der RNA und die Umschreibung in cDNA bei allen Patienten erfolgreich war.

Zusätzlich konnte aufgrund ähnlich starker Banden bei allen Patienten zu allen Zeitpunkten darauf geschlossen werden, dass sich der RNA bzw. cDNA Gehalt der einzelnen Proben nicht wesentlich unterscheidet (siehe Abbildung 22).

Im Allgemeinen wurden für die Auswertung der PCR die Bandenintensitäten beurteilt und in verschiedene Kategorien eingeteilt (siehe Tabelle 8).

Zeichen	-	+/-	+	++	+++
Bedeutung	Keine Bande	Bande kaum erkennbar	Schwache Bande	Mittelstarke Bande	Starke Bande

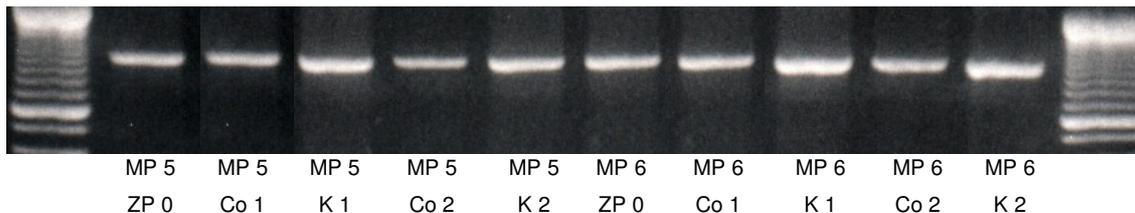
Tabelle 8: Legende der PCR Auswertung



MP 1 MP 1 MP 1 MP 1 MP 1 MP 2 MP 2 MP 2 MP 2 MP 2
 ZP 0 Co 1 K 1 Co 2 K 2 ZP 0 Co 1 K1 Co 2 K 2



MP 3 MP 3 MP 3 MP 3 MP 3 MP 4 MP 4 MP 4 MP 4 MP 4
 ZP 0 Co 1 K 1 Co 2 K 2 ZP 0 Co 1 K 1 Co 2 K 2



MP: Meniskus – Patient; ZP 0: Zeitpunkt 0 (nach Ende der Primärkultur); Co1: Cokultur zum Zeitpunkt 1 (Ernte nach 4 Tagen); Co2: Cokultur zum Zeitpunkt 2 (Ernte nach 10 Tagen); K1: Kontrolle zum Zeitpunkt 1 (Ernte nach 4 Tagen); K2: Kontrolle zum Zeitpunkt 2 (Ernte nach 10 Tagen)

Abbildung 22: Ergebnisse GAPDH PCR

3.2.1.2 Angiopoietin 1

Es zeigte sich stets eine Bande von 242 bp Länge. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten bestanden in der Intensität der Banden kaum Unterschiede. Dagegen zeigten sich im Vergleich zwischen der Cokultur und der Kontrolle Differenzen in der Intensität der Banden, die allerdings bei den einzelnen Patienten unterschiedlich waren. Zusätzlich fiel auf, dass es zwischen den einzelnen Patienten erhebliche Unterschiede in der Ausprägung der Banden gab. Während MP 1, MP 3 und MP 5 hauptsächlich starke Banden aufwiesen, waren die Banden der restlichen Patienten wesentlich schwächer ausgeprägt.

	Zeitpunkt 0	Cokultur 1	Kontrolle 1	Cokultur 2	Kontrolle 2
MP 1	+/-	++	+/-	++	+
MP 2	+	+	+/-	+	+/-
MP 3	++	++	++	++	+
MP 4	-	+/-	+/-	+/-	+/-
MP 5	+	++	++	+	++
MP 6	-	+/-	+	+	+

Tabelle 9: PCR Auswertung Angiopoietin 1

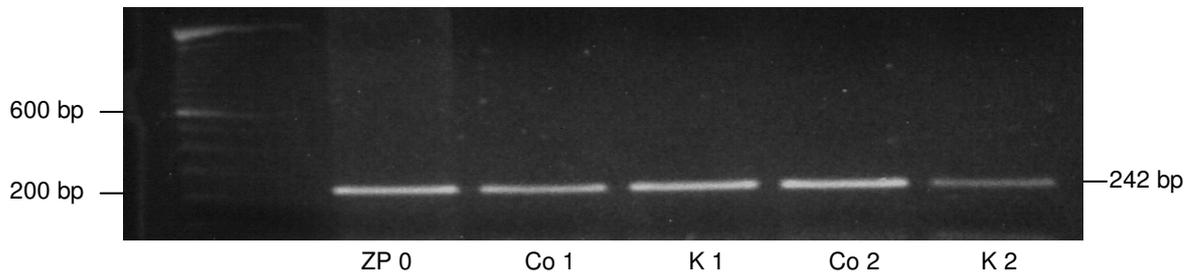


Abbildung 23: Angiopoietin 1, MP 3

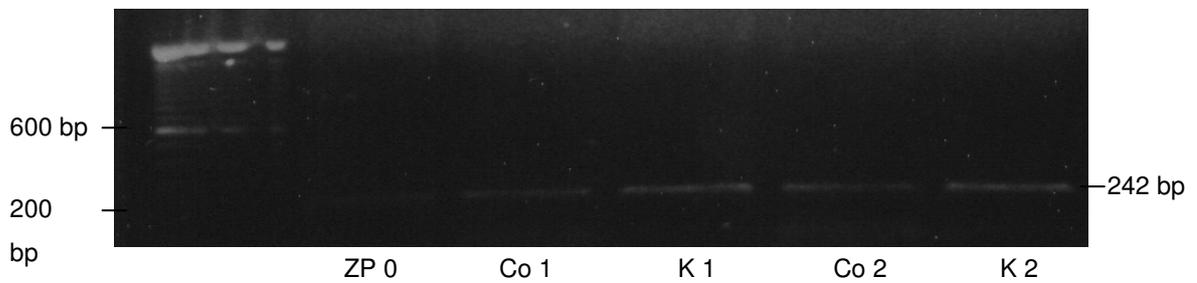


Abbildung 24: Angiopoietin 1, MP 6

3.2.1.3 Angiopoietin 2

Dieser Faktor wies im Allgemeinen eine 300 bp lange Bande sehr schwacher Intensität bis gar keine Bande auf. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Cokultur und Kontrolle sowie zwischen den einzelnen Zeitpunkten ersichtlich.

	Zeitpunkt 0	Cokultur 1	Kontrolle 1	Cokultur 2	Kontrolle 2
MP 1	-	+/-	+/-	+/-	-
MP 2	-	+/-	+	+/-	-

MP 3	+/-	+/-	+	+	+/-
MP 4	+/-	+/-	+/-	-	+
MP 5	-	+	+/-	-	+
MP 6	-	+/-	+	+/-	+

Tabelle 10: PCR Auswertung Angiopoietin 2

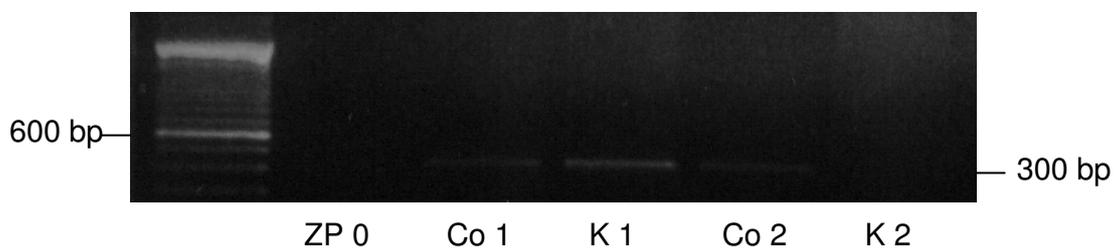


Abbildung 25: Angiopoietin 2, MP 2

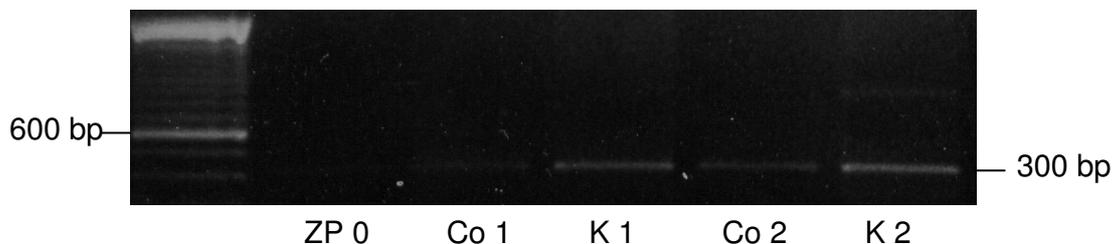


Abbildung 26: Angiopoietin 2; MP 6

3.2.1.4 Thrombospondin 1

In der PCR Auswertung des Thrombospondin 1 lies sich stets eine Bande von 132 bp Länge nachweisen. Zwischen den einzelnen Patienten bestanden allerdings Unterschiede. MP 1-3 wiesen in der Expression von Thrombospondin 1 zwischen den einzelnen Zeitpunkten sowie zwischen Cokultur und Kontrolle kein Unterschied auf. Lediglich die Intensität der Banden war

patientenspezifisch. Bei MP 4-6 zeigte sich dagegen eine deutliche Differenz zwischen der Cokultur und der Kontrolle, wobei die Cokultur stets eine geringere Bandenintensität als die Kontrolle aufwies.

	Zeitpunkt 0	Cokultur 1	Kontrolle 1	Cokultur 2	Kontrolle 2
MP 1	++	++	++	++	++
MP 2	+/-	+	+	+	+
MP 3	++	++	++	++	++
MP 4	++	+	++	+	++
MP 5	++	+	++	+/-	++
MP 6	+	+/-	+	+/-	+

Tabelle 11: PCR Auswertung Thrombospondin 1

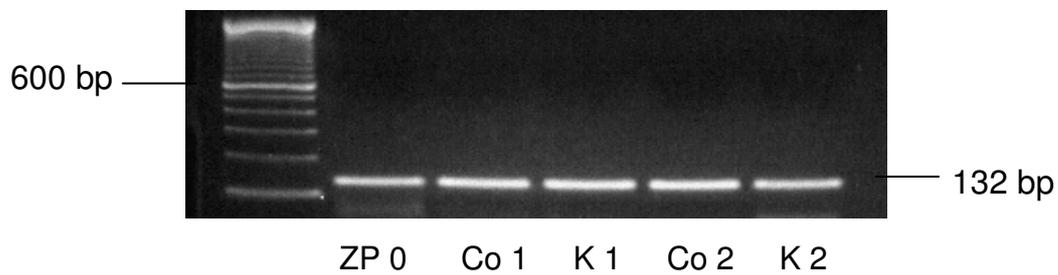


Abbildung 27: Thrombospondin 1, MP 1

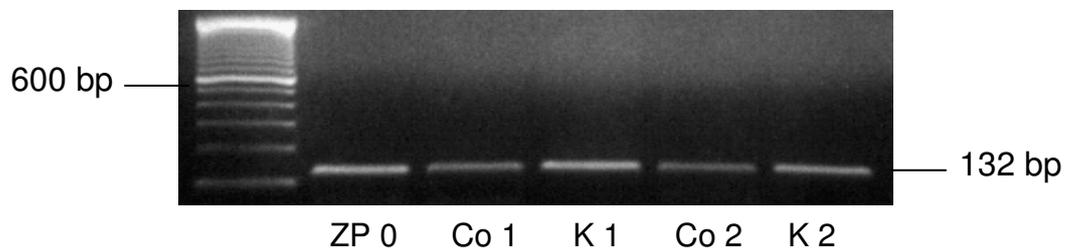


Abbildung 28: Thrombospondin 1; MP 4

3.2.1.5 Vaskular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Das PCR Ergebnis des VEGF war sehr einheitlich. Es konnten jeweils 3 Banden mit einer Länge von 180 bp, 311 bp und 384 bp nachgewiesen werden. Dies kam zustande, da die verwendeten Primer drei verschiedene Spleißvarianten des VEGFs erfassen⁵⁹. Insgesamt zeigte sich eine starke Expression von VEGF, wobei zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten sowie zwischen der Cokultur und der Kontrolle keine erheblichen Unterschiede bestanden. Die VEGF Expression der Fibrochondrozyten wurde durch die Endothelzellen der Cokultur somit weder gefördert noch supprimiert.

	Zeitpunkt 0	Cokultur 1	Kontrolle 1	Cokultur 2	Kontrolle 2
MP 1	++	++	++	++	++
MP 2	+	++	++	++	++
MP 3	++	++	++	++	++
MP 4	++	++	++	+	++
MP 5	++	++	++	+	++
MP 6	+	+	+	+	++

Tabelle 12: PCR Auswertung VEGF

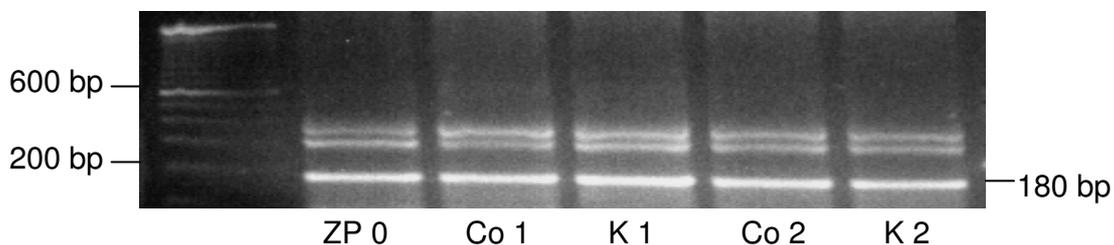


Abbildung 29: PCR Ergebnis VEGF MP 1

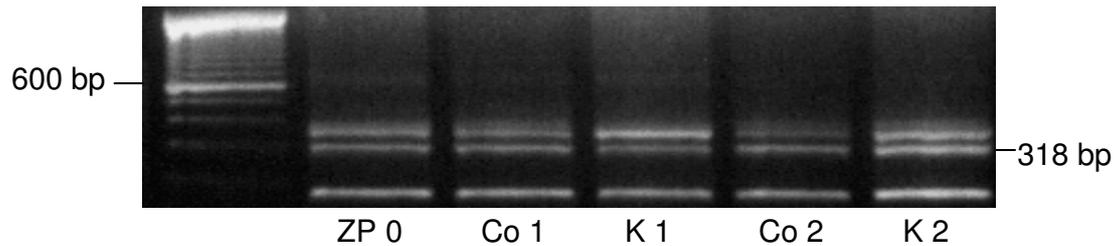


Abbildung 30: PCR Ergebnis VEGF MP 6

Trotz der allgemein starken Expression zeigten sich allerdings Patientenspezifische Unterschiede in der Intensität der Banden. (Abbildung 29 und Abbildung 30)

3.2.1.6 SMAD 4

In den PCR Bildern konnte eine Bande von 551 bp Länge nachgewiesen werden. Insgesamt war das Ergebnis der einzelnen Patienten uneinheitlich. MP 3 zeigte sehr starke Banden zu beiden Zeitpunkten der Cokultur und Banden schwacher Intensität in beiden Kontrollen. Dagegen wiesen MP 4-6 ein umgekehrtes aber auch sehr einheitliches Bild auf. Hier war die Intensität der Banden der Cokultur stets schwächer ausgeprägt als die der Kontrolle.

	Zeitpunkt 0	Cokultur 1	Kontrolle 1	Cokultur 2	Kontrolle 2
MP 1	-	++	++	++	++
MP 2	+/-	++	+	-	++
MP 3	-	+++	-	+++	+
MP 4	+	+/-	+	+/-	+
MP 5	+	+/-	+	+/-	+
MP 6	+	+/-	+	+	+

Tabelle 13: PCR Auswertung SMAD 4

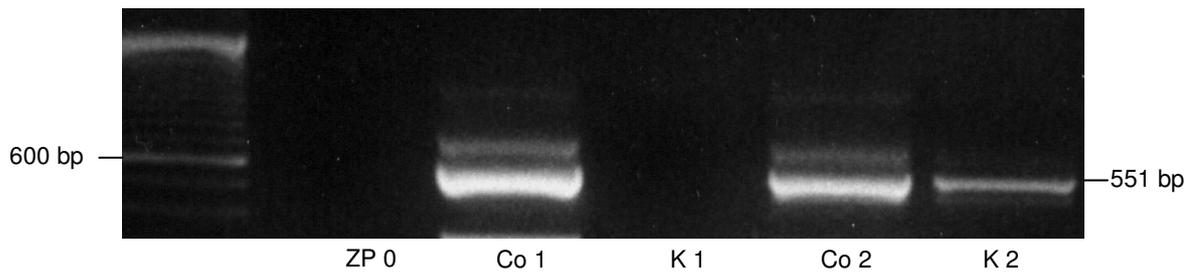


Abbildung 31: SMAD 4, MP 3

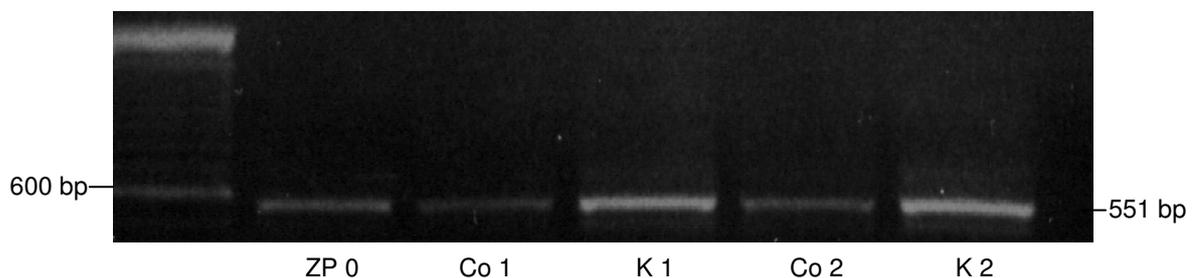


Abbildung 32: SMAD 4; MP 4

3.2.1.7 Von Willebrand Faktor (vWF)

Es war eine Bande von 176 bp Länge nachweisbar. Zum ZP 0 zeigte sich bei allen Patienten stets die schwächste Bande. Im Vergleich zwischen Cokultur und Kontrolle war bei fast allen Patienten eine Bande stärkerer Intensität in der Cokultur zu verzeichnen. Zwischen den einzelnen Patienten gab es Unterschiede in der Intensität der Banden, wobei MP 4-6 schwächere Banden als MP 1-3 aufwiesen.

	Zeitpunkt 0	Cokultur 1	Kontrolle 1	Cokultur 2	Kontrolle 2
MP 1	+/-	++	++	++	++
MP 2	-	++	+	++	+
MP 3	+	+	+	++	+/-

MP 4	-	+/-	+/-	+/-	-
MP 5	+/-	+	-	+/-	+/-
MP 6	-	+/-	-	-	+

Tabelle 14: PCR Auswertung vWF

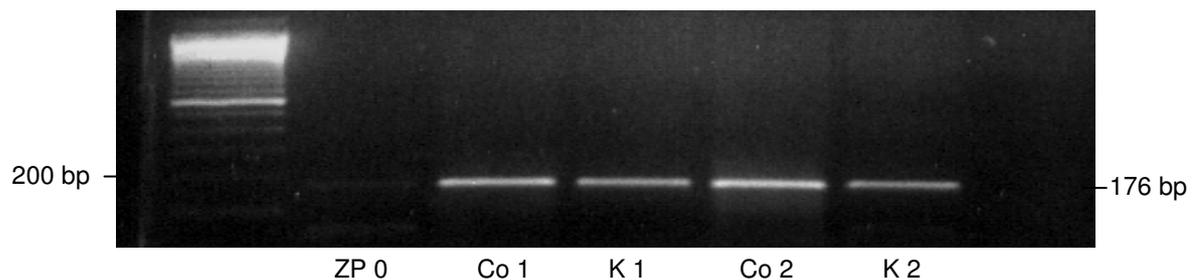


Abbildung 33: vWF; MP 2

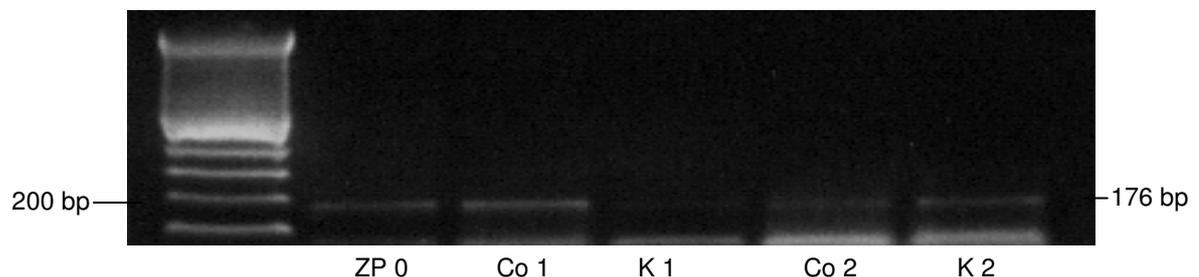


Abbildung 34: vWF; MP 5

3.2.2 Coomassie Färbung

Die HUVEC waren auf der Porenmembran der Inserts unter normalen Bedingungen im Lichtmikroskop nicht sichtbar. Um die Zellzahl, Zelldichte und die Adhärenz der Zellen zur Insertmembran und Proliferationstendenzen dennoch einschätzen zu können, wurden die HUVEC mittels Coomassie Färbung angefärbt. Auf diese Weise konnte in Vorversuchen die optimale Zellzahl von $2.5 \cdot 10^4$ HUVEC für die Versuche der Cokultur ermittelt werden. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nach der Aussiedlung auf die Inserts

schon viele Zellen vorhanden sind, diese allerdings während der Versuche der Cokultur noch genügend Platz haben, um zu proliferieren.

Zusätzlich wurden die HUVEC eines jeden Patienten zum Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 2 der Cokultur gefärbt, um Differenzen zwischen den einzelnen Patienten feststellen zu können. Hierbei ergab sich für alle Patienten ein ähnliches Bild. Während sich zum Zeitpunkt 2 der Cokultur (nach 10 Tagen) annähernd eine Monolayer aus HUVEC auf dem Insert gebildet hatte, zeigten sich zum Zeitpunkt 1 der Cokultur (nach 4 Tagen) deutlich weniger Zellen. Die HUVEC proliferierten somit während der Versuche der Cokultur deutlich. (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36)

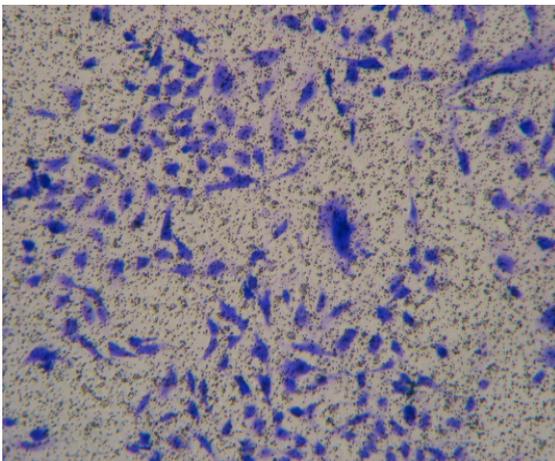


Abbildung 35: ZP 1 der Cokultur, MP 4

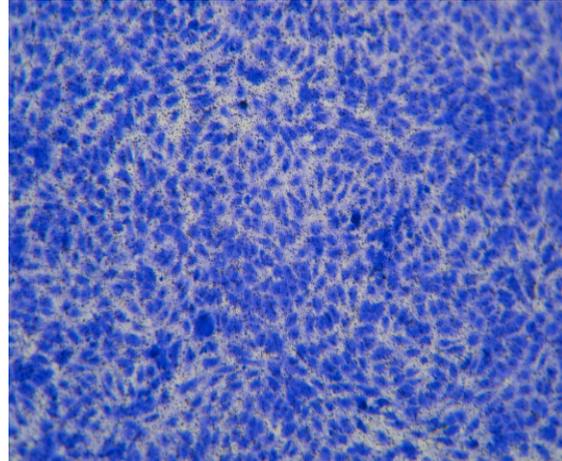


Abbildung 36: ZP 2 der Cokultur, MP 4

3.2.3 Immunhistochemie

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

Die immunhistochemischen Färbungen mit Kollagen I und Kollagen II Antikörpern dienten dabei der Charakterisierung der Fibrochondrozyten, da diese Kollagen I stark, Kollagen II hingegen nur schwach exprimieren. Durch

den Endothelzell-spezifischen von Willebrand Faktor sollte dagegen eine Verunreinigung der Fibrochondrozytkulturen mit Meniskus-eigenen Endothelzellen ausgeschlossen werden.

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

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

Ergebnisse

MP6	ZP0	+	-	-/+	-
	Co1	+	-	-/+	-
	K1	+	-	-/+	-
	Co2	+	-	-/+	-
	K2	+	-	-/+	-

Tabelle 15: Ergebnisse Immunhistochemie

-	negativ				
+	positiv	Co1:	Cokultur ZP1	K1:	Kontrollkultur ZP1
-/+	falsch positiv	Co2:	Cokultur ZP2	K2:	Kontrollkultur ZP2

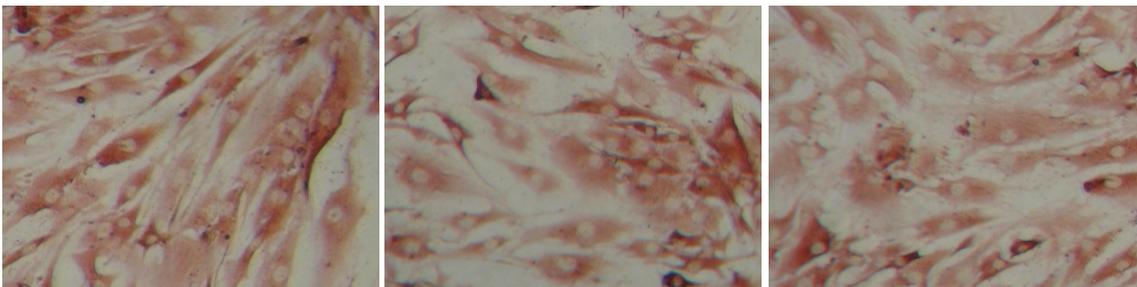


Abbildung 37: Kollagen I (ZP 0, ZP 1, ZP 2)

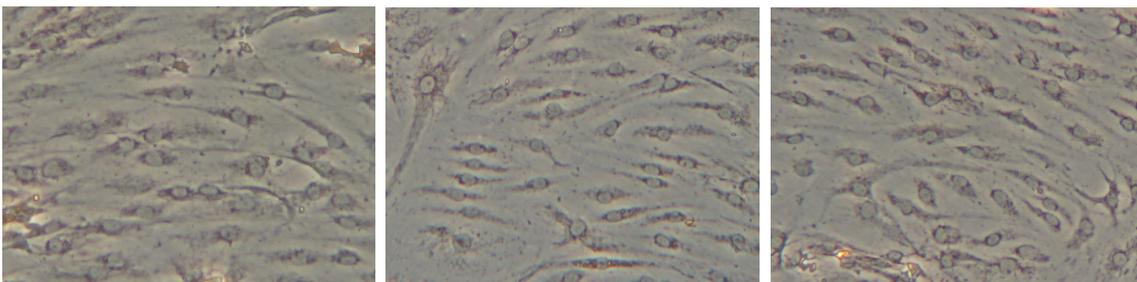


Abbildung 38: Kollagen II (ZP 0, ZP 1, ZP 2)

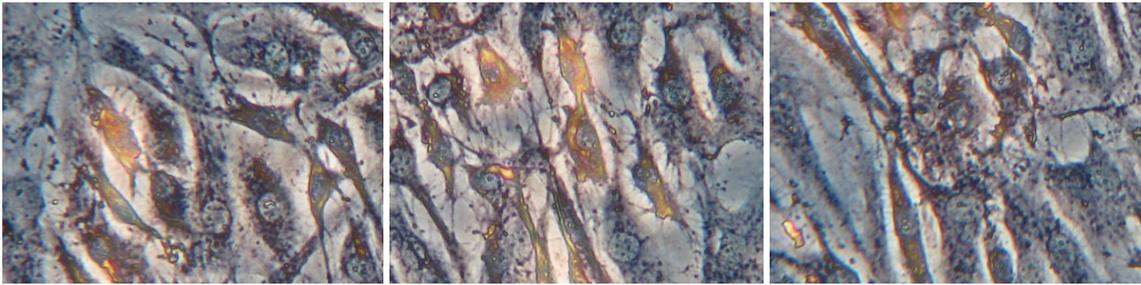


Abbildung 39: vWF (ZP 0, ZP 1, ZP 2)



Abbildung 40: Negativkontrolle (ZP 0, ZP 1, ZP 2)

Die immunhistochemischen Färbungen aller drei Faktoren zeigten zwischen den einzelnen Zeitpunkten keine wesentlichen Unterschiede. Auch zwischen den einzelnen Patienten konnten keine erheblichen Unterschiede festgestellt werden.

In der Kollagen I Färbung zeigen sich die Zellen einheitlich rötlich gefärbt, während sich die Bereiche der Zellkerne ungefärbt darstellen. Die Ergebnisse wurden als positiv gewertet.

Die Kollagen II Färbung weist hingegen keine Rotfärbung auf. Das Ergebnis der Kollagen II Färbung wurde daher als negativ gewertet.

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

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

Die beschriebenen Färbeergebnisse zeigen während des gesamten Versuchszeitraums das für Fibrochondrozyten typische Expressionsmuster. Somit konnten etwaige Entdifferenzierungen der Fibrochondrozyten ausgeschlossen werden. Die Frage ob eine Kontamination der Zellkulturen mit Meniskus-eigenen Endothelzellen vorliegt, kann mit den Ergebnissen der Immunhistochemie nicht eindeutig beantwortet werden. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse des vWF mittels RT-PCR weisen allerdings auf eine Kontamination hin.

3.2.4 Endostatin ELISA

Durch Messung der Extinktion der einzelnen bekannten Konzentrationen der hergestellten Endostatin Konzentrationsreihe (siehe 2.2.7.2) konnte eine Eichkurve angefertigt werden.

Endostatin Konzentration [ng/ml]	0	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10	20
Extinktion	0	0,084	0,129	0,18	0,342	0,846	1,746	3,442

Tabelle 16: Extinktionswerte der Endostatin Konzentrationsreihe

Bei den in der Tabelle aufgeführten Extinktionswerten handelt es sich um Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung. Aus diesen Messwerten ergab sich folgende Eichkurve.

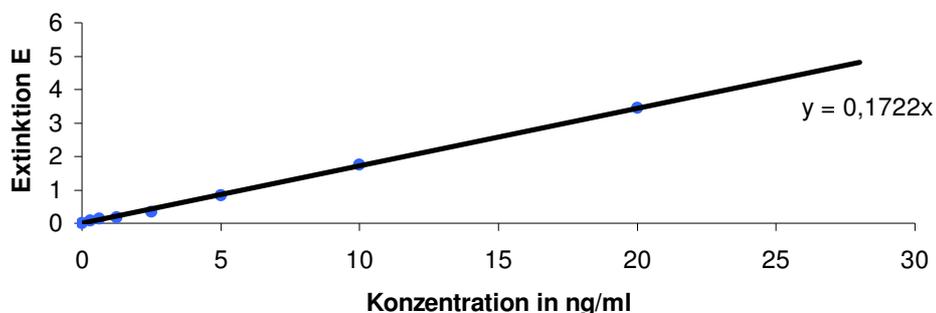


Abbildung 41: Eichkurve Endostatin

Diese Eichkurve ist eine Regressionsgerade und stellt einen linearen Zusammenhang zwischen der Endostatin Konzentration und der gemessenen Extinktion her. So war es möglich, aus den gemessenen Extinktionen der einzelnen Proben die Endostatin Konzentration mit Hilfe der ermittelten Regressionsgeradengleichung

$$y (\text{Extinktion}) = 0,1772 \cdot (\text{Endostatinkonzentration})$$

zu berechnen.

Die gemessenen Extinktionswerte der einzelnen Proben sind in Tabelle 9 aufgeführt. Es handelt sich um Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung. Aufgrund dieser Mehrfachbestimmung reichte die 96 Well Platte nicht für alle 6 Patienten. Deshalb wurde mit den Zellüberständen von Patient MP6 kein Endostatin ELISA durchgeführt.

	MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5
Überstand	3,377	1,362	1,032	4,454	0,306
Zeitpunkt 0	0,088	0,102	0,178	1,624	1,806
Cokultur 1. Zeitpunkt	0,836	1,284	2,242	2,333	3,202
Kontrolle 1. Zeitpunkt	1,478	2,129	3,264	2,832	2,936
Cokultur 2. Zeitpunkt	3,458	3,405	4,360	4,278	3,409
Kontrolle 2. Zeitpunkt	0,253	0,428	0,807	1,949	2,455

Tabelle 17: Extinktionswerte des Endostatin ELISA

Aus diesen Extinktionswerten konnte die Endostatinkonzentration der einzelnen Proben berechnet werden.

	MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5
Überstand	19,611	7,909	5,990	25,862	1,777
Zeitpunkt 0	0,511	0,589	1,034	9,431	10,488
Cokultur 1. Zeitpunkt	4,853	7,456	13,022	13,546	18,593
Kontrolle 1. Zeitpunkt	8,585	12,362	18,953	16,444	17,050
Cokultur 2. Zeitpunkt	20,079	19,772	25,319	24,843	19,797
Kontrolle 2. Zeitpunkt	1,467	2,487	4,688	11,320	14,257

Tabelle 18: Endostatinkonzentration [ng/ml]

Abbildung 42 zeigt ein Balkendiagramm der Endostatin Konzentrationen der verschiedenen Patienten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten.

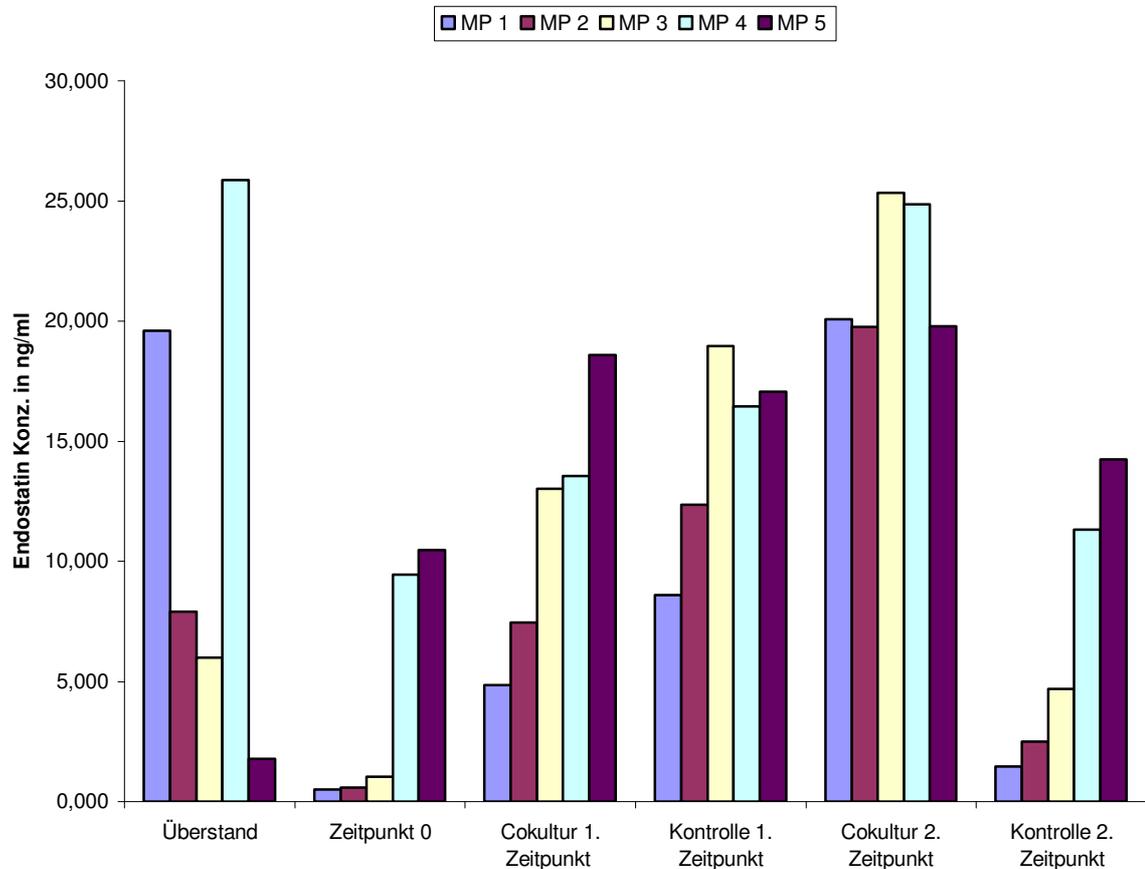


Abbildung 42: Säulendiagramm der Endostatinkonzentrationen

Aus diesem Diagramm ist ersichtlich, dass die Endostatinkonzentrationen im Überstand der Primärkulturen recht unterschiedlich sind. Kurz nach der Übersiedlung in die 6 Well Platten zum Zeitpunkt 0 werden sehr geringe Konzentrationen an Endostatin im Überstand gemessen. Zum Zeitpunkt 1 (nach 4 Tagen) ist die Konzentration in der Cokultur sowie in der Kontrolle im Vergleich zum Zeitpunkt 0 gestiegen. Allerdings zeigt sich bei fast allen Patienten in den Überständen der Kontrolle eine höhere Konzentration.

Nach 4 Tagen wurde das Medium der Cokultur 2 und der Kontrollkultur 2 gewechselt, so dass die zum Zeitpunkt 2 (nach 10 Tagen) gemessene Endostatinkonzentration der Synthese von Tag 5 bis Tag 10 der Versuche

entspricht. Zum Zeitpunkt 2 weisen die Zellüberstände aller Patienten in der Cokultur eine höhere Endostatinkonzentration als in der Kontrolle auf.

4 Diskussion

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellzahl der Primärkultur

Die Fibrochondrozyten der Primärkultur wurden nach durchschnittlich 48,5 Tagen geerntet und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die durchschnittliche Zellzahl betrug dabei $4,98 \cdot 10^6$ Zellen bei einer Standardabweichung von $1,28 \cdot 10^6$ Zellen. Diese hohe Standardabweichung ist durch die große Differenz der Zellzahlen der einzelnen Patienten zu erklären. Grund dieser Differenzen ist unter anderem die unterschiedliche Größe der uns durch die KTP Operationen zur Verfügung stehenden Patienten-Menisci.

Die nach der primären Proliferation der Fibrochondrozyten geerntete Zellmenge war jedoch bei allen Patienten für die weiteren Untersuchungen stets ausreichend.

Da sich durch eine längere Kulturzeit, vor allem bei Monolayer-Kulturen, die Gefahr der Dedifferenzierung der Zellen erhöht⁷⁴, bleibt zu bedenken, die Inkubationszeit der Primärkultur zu verkürzen. Bereits nach 5 Wochen hatte sich schon ein annähernd dichter Zellrasen ausgebildet, und die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt wäre für die weiteren Untersuchungen ebenfalls ausreichend gewesen. Zudem weisen die MP 1-3, die im Vergleich zu den MP 4-6 einer durchschnittlich 7 Tage längeren Inkubationszeit ausgesetzt waren, hinsichtlich der Expression einzelner Angiogenesefaktoren Unterschiede auf. Eine beginnende Dedifferenzierung der Fibrochondrozyten dieser Patienten könnte an diesen unterschiedlichen Ergebnissen ursächlich beteiligt sein.

4.1.2 Zellkulturmedium

Für die primäre Proliferation der Fibrochondrozyten wurde DMEM Vollmedium verwendet. Es war allerdings nicht möglich die Primärkultur der HUVEC sowie die Cokultur ebenfalls in diesem Vollmedium durchzuführen, da die HUVEC in

diesem Medium nicht proliferierten. Nach einigen Tagen Inkubationszeit in DMEM Vollmedium kam es sogar zum Adhäsionsverlust der HUVEC, was als ein Zeichen der Avitalität gewertet werden kann. Für die Primärkultur der HUVEC sowie für die Cokultur wurde deshalb das speziell für humane Endothelzellen entwickelte EBM Vollmedium verwendet, in welchem auch die Fibrochondrozyten sehr gut proliferierten. Das EBM Vollmedium enthält im Vergleich zum DMEM Vollmedium zusätzlich rhEGF (recombinant human Epidermal Growth Factor) und Hydrokortison als Zusatzstoffe, die von den HUVEC offensichtlich zur Proliferation benötigt werden.

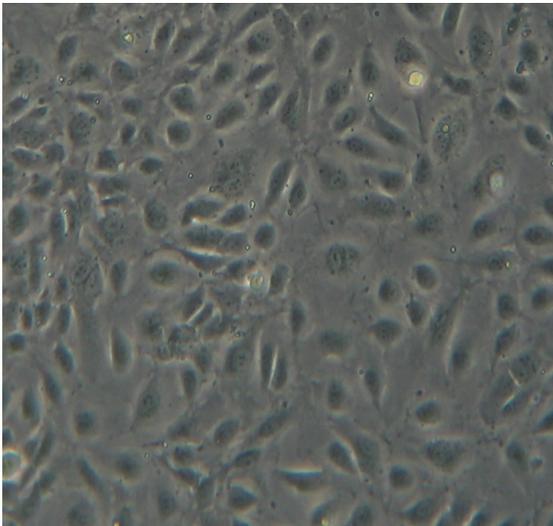


Abbildung 43: HUVEC in EGM Vollmedium

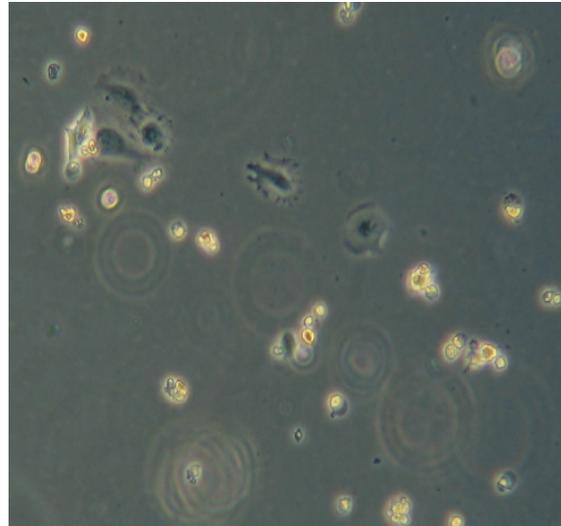


Abbildung 44: HUVEC in DMEM-Vollmedium

4.1.3 Zellkulturinserts

Für die Cokultur wurden Zellkulturinserts der Firma Falcon mit einer Porengröße von 1 μm bestellt. Laut Herstellerinformation ist bei einer solchen Porengröße keine Zellmigration vom unteren Kompartiment ins obere Kompartiment der Cokultur möglich. Dennoch ließen sich nach der Coomassie Färbung bei zwei Patienten vereinzelte Fibrochondrozyten auf der Insertmembran nachweisen. In Abbildung 45 sind die länglichen Fibrochondrozyten zwischen den eher runden HUVEC auf der Insertmembran zu erkennen.

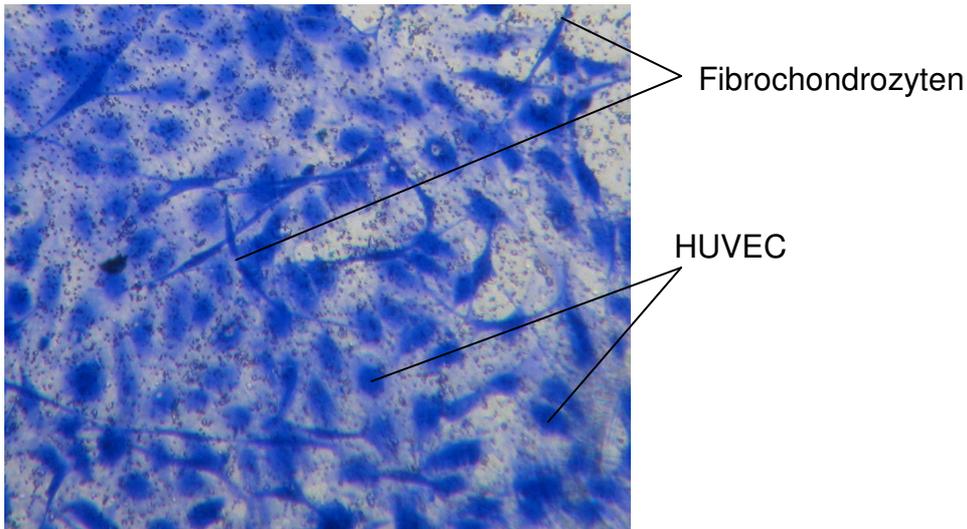


Abbildung 45: Fibrochondrozyten auf der Insertmembran

Die Entstehung einer solchen Mischkultur aus Fibrochondrozyten und HUVEC auf der Insertmembran kann mehrere Gründe haben. Einerseits ist zu überlegen, die Adhäsionszeit, die den Fibrochondrozyten nach Aussiedlung in die 6 Well Platten gewährt wurde, zu verlängern, da eventuell noch nicht adhäsive Zellen beim Einbringen der Inserts durch die Poren der Insertmembran gespült wurden. Andererseits könnten die Fibrochondrozyten auch durch den Mediumwechsel oder von den HUVEC produzierten chemotaktischen Stoffen in das obere Kompartiment der Cokultur gelangt sein. Um eine bessere Trennung der Zellen während der Untersuchungen der Cokultur zu gewährleisten, könnte man Inserts mit einer kleineren Porengröße verwenden. Es bleibt aber zu bedenken, dass die Insertmembran bei einer Porengröße von weniger als 1 μm für von den Zellen produzierte Makromoleküle eventuell nicht mehr ausreichend permeabel ist. Die gegenseitige Beeinflussung der Zellen wäre dann vermutlich nur noch eingeschränkt möglich.

4.1.4 Coomassie-Färbung

Die HUVEC waren auf dem Insert wahrscheinlich durch Lichtreflexe an den Poren der Insertmembran im Lichtmikroskop nicht direkt erkennbar. Mit Hilfe der Coomassie Färbung konnten die Zellen erfolgreich angefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Allerdings konnten die HUVEC nach der Färbung für den weiteren Versuchsverlauf nicht mehr verwendet werden, weshalb eine solche Färbung nur zum Zeitpunkt 1 und 2 der Cokultur, also nach der Ernte der Fibrochondrozyten möglich war. Die Adhärenz, Proliferation und Zellzahl der HUVEC während des Versuchzeitraums konnte daher nur eingeschränkt beurteilt werden. Es bleibt deshalb zu überlegen, die HUVEC mit anderen Methoden sichtbar zu machen oder andere Inserts zu verwenden, die ein solches Problem nicht aufweisen.

4.2 Zellcharakterisierung

4.2.1 RT-PCR

Zu den drei Zeitpunkten (ZP 0, ZP 1, ZP 2) wurde bei allen Patienten eine Expressionsanalyse der Angiogenesefaktoren Angiopoietin 1, Angiopoietin 2, VEGF, Thrombospondin 1, SMAD 4 und vWF mittels RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde die Expression zwischen den einzelnen Zeitpunkten, der Cokultur und der Kontrolle, sowie zwischen den einzelnen Patienten verglichen. Zu allen Ergebnissen ist allerdings zu sagen, dass es sich bei der RT-PCR höchstens um eine semi-quantitative Methode handelt, die nur relative Angaben zur mRNA Menge geben kann. Quantitative Aussagen erfordern andere Methoden wie zum Beispiel die Light-Cycler PCR. Außerdem handelt es sich bei der PCR um eine Methode, die die verschiedenen Produkte des Zellstoffwechsels auf mRNA also Transkriptstionsebene nachweist. Ob die nachgewiesene mRNA auch wirklich in ein funktionsfähiges Protein translatiert wird, kann man mittels PCR nicht beurteilen.

4.2.1.1 Angiopoietin 1

Angiopoietin 1 wird in vielen menschlichen Geweben permanent exprimiert und spielt eine wesentliche Rolle beim Erhalt und der Stabilisation des Gefäßsystems^{49,86}. Der endothelzell-spezifische Tyrosinkinase Rezeptor Tie 2 wird durch die Bindung von Angiopoietin 1 aktiviert, wodurch periendotheliale Zellen angelockt werden. Diese Zellen sorgen für eine bessere Stabilität der Gefäße und begünstigen das Überleben der Endothelzellen^{30,33,34,43,60}.

Kommt es zur Co-Expression von Angiopoietin 1 und VEGF, so wird durch die Kooperation dieser zwei Faktoren die Angiogenese gesteigert^{18,63,67,82}. Ob Angiopoietin 1 selbst allerdings als Angiogeneseaktivator oder eher als Angiogeneseinhibitor angesehen werden kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert^{1,2,18,34,73,77}. Angiopoietin 1 ist jedoch ein wichtiger Regulator der Neovaskularisation, ohne dessen Expression eine erfolgreiche Angiogenese nicht möglich ist^{7,67}.

Die Expressionsanalyse von Angiopoietin 1 ergab bei den einzelnen Patienten ein sehr uneinheitliches Bild. Tendenziell scheinen die Endothelzellen der Cokultur die Expression von Angiopoietin 1 in den Fibrochondrozyten eher zu fördern als zu supprimieren, was sich bei zwei Patienten durch stärkere Banden in den Cokulturen zeigte. Allerdings wird Angiopoietin 1 wie auch VEGF von allen Patienten zu allen Zeitpunkten exprimiert, was dafür spricht, dass ein Neovaskularisationsreiz von den Fibrochondrozyten der Cokultur sowie der Kontrolle ausgehen müsste. Die Expression dieser Angiogeneseaktivatoren ist allerdings auch immer in Relation zur Expression der Angiogeneseinhibitoren zu sehen.

4.2.1.2 Angiopoietin 2

Angiopoietin 2 ist der physiologisch vorkommende Gegenspieler des Angiopoietin 1. Genauso wie Angiopoietin 1 bindet mit ähnlicher Affinität auch Angiopoietin 2 an den Endothelzell-spezifischen Tyrosinkinase Rezeptor Tie 2, wodurch dieser blockiert und eine Destabilisation der Gefäßwände induziert

wird⁴⁹. Vermutlich wird durch diese instabilen Gefäßwände das Sprossen neuer Gefäße erleichtert und infolgedessen die Angiogenese gefördert^{2,37,38,75,79}.

Angiopoietin 2 wird von den Fibrochondrozyten sehr schwach bis gar nicht exprimiert. Auch zwischen Cokultur und Kontrolle lässt sich kein Unterschied erkennen, was jedoch auch durch die allgemein sehr geringe Expression des Angiopoietin 2 bedingt sein könnte.

4.2.1.3 Thrombospondin 1

Thrombospondin 1 ist ein 420 kDa großes Glykoprotein, das von vielen Zellen des menschlichen Körpers synthetisiert und in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird⁵⁵. Thrombospondin 1 reguliert die Adhäsion und Migration von Thrombozyten und anderen Zellen während der Wundheilung und lässt sich daher nach Verletzungen im Gewebe vermehrt nachweisen^{8,46}. Viele Studien zeigen, dass Thrombospondin 1 antiangiogenetische Eigenschaften besitzt, welche wahrscheinlich durch die Inhibition der perizellulären Proteolyse bedingt sind, die für die Proliferation und Migration von Endothelzellen nötig ist^{9,56,81}. Zudem inhibiert Thrombospondin 1 die durch dFGF vermittelte Chemotaxis und Proliferation der Endothelzellen²⁴.

Hinsichtlich der Thrombospondin 1 Expression bestehen bei den Fibrochondrozyten der einzelnen Patienten Unterschiede. Während bei MP 1-3 keine Differenzen zwischen den einzelnen Zeitpunkten, sowie zwischen Cokultur und Kontrolle bestehen, weisen bei MP 4-6 die Fibrochondrozyten der Cokultur im Vergleich zur Kontrolle stets eine geringere Expression des Thrombospondin 1 auf. Grund der Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten könnte die längere Primärkulturzeit der MP 1-3 sein, die vielleicht zu einer beginnenden Dedifferenzierung der Fibrochondrozyten geführt hat.

Die HUVEC der Cokultur scheinen bei MP 4-6 die Thrombospondin 1 Expression der Fibrochondrozyten zu supprimieren. Die durch den Einfluss der Endothelzellen verminderte Expression des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin 1 könnte die Angiogenese fördern und dadurch auch einen stärkeren Neovaskularisationsreiz während der Wundheilung induzieren. Dieser

Einfluss der Endothelzellen auf die Fibrochondrozyten könnte einer der Gründe für die besseren Heilungstendenzen im vaskularisierten Bereich des Meniskus sein.

4.2.1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist ein hochpotentes dimeres Glykoprotein, das an die Endothelzell-spezifischen VEGF Rezeptoren 1 und 2 bindet und dadurch Tyrosinkinasen aktiviert. Dies führt zu Wachstum und Proliferation der Endothelzellen, sowie zu einer gesteigerten Angiogenese^{21,27-29}. Zusätzlich steigert VEGF die Permeabilität der Gefäße und ist dadurch maßgeblich an Wundheilungs- und Entzündungsprozessen beteiligt^{21,25,26,72}. Es sind bisher vier VEGF Transkripte mit einer Länge von 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren bekannt, die durch alternatives Spleißen der mRNA eines VEGF Gens entstehen^{39,42,47,83}. Mit den von uns verwendeten Primern wurden die drei Spleißvarianten VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ mittels der PCR-Produkte von 180, 311 und 384 Basenpaaren Länge nachgewiesen⁵⁹.

VEGF wird von den Zellen aller Patienten sehr stark exprimiert. Dabei zeigten sich bei keinem der Patienten Unterschiede zwischen der Cokultur und der Kontrolle oder zwischen den einzelnen Zeitpunkten. Die Endothelzellen scheinen also keinerlei Einfluss auf die Expression des potenten Angiogeneseaktivators VEGF zu haben. Becker et al. konnten sogar zeigen, dass es in der avaskulären inneren Zirkumferenz des Kaminchen-Meniskus nach Trauma zu einer stärkeren VEGF Expression als im äußeren vaskularisierten Bereich kommt¹². Trotz dieser stärkeren VEGF Expression blieb die Angiogenese in der inneren avaskulären Zirkumferenz und somit die Heilung im Gegensatz zum äußeren vaskulären Bereich aus. Becker et al. folgerten daraus, dass die schlechte Heilungstendenz im inneren Bereich des Meniskus nicht in der fehlenden Stimulation der Angiogenese durch die Fibrochondrozyten begründet liegen muss. Weitere Untersuchungen von Pufe et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Produktion von Angiogeneseinhibitoren

vor allem von Endostatin für die ausbleibende Wirkung des VEGF verantwortlich sein könnte⁶⁶.

4.2.1.5 SMAD 4

Der Name SMAD leitet sich ab von MAD, einem Drosophila-Protein (mothers against decapentaplegic) und von SMA (smaller worms), einem Gen aus *Caenorhabditis elegans*. Heutzutage sind neun verschiedene SMADs bekannt, die als Tumorsuppressoren und Transkriptionsfaktoren fungieren^{52,88}. Die SMAD Proteine dienen der Signalübertragung von über dreißig TGF β -artigen Zytokinen in der Zelle, indem sie die durch diese Faktoren vermittelte Transkription durch direkte Bindung an DNA-Promotoren aktivieren^{23,45}. TGF β kann ein sehr potenter Wachstumsinhibitor von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und neuronalen Zellen sein und gilt als Inhibitor der Angiogenese^{11,54}. Als Signalmediatoren des TGF β können den SMAD Proteinen die gleichen Funktionen zugeschrieben werden.

Die SMAD 4 Expressionen der einzelnen Patienten weisen Differenzen auf. Bei den MP 4-6 zeigt sich allerdings, dass die Endothelzellen die Expression des Angiogeneseinhibitors SMAD 4 supprimieren. Somit könnte durch den Einfluß der Endothelzellen die Angiogenese gefördert werden.

4.2.1.6 Von Willebrand Faktor (vWF)

Der hauptsächlich von Endothelzellen exprimierte von Willebrand Faktor spielt in der Blutgerinnung eine bedeutende Rolle, indem er die Interaktionen der Thrombozyten untereinander, sowie mit der defekten Gefäßwand reguliert. Zusätzlich fungiert der vWF als Trägerprotein des für die Blutgerinnung wichtigen Faktor VIII im Plasma, wodurch dieser stabilisiert und vor frühzeitigem unspezifischem Abbau geschützt wird.

Der nur von Endothelzellen exprimierte von Willebrand Faktor ist bei allen Patienten nachweisbar. Es ist daher davon auszugehen, dass alle Fibrochondrozyt-Zellkulturen mit Meniskus-eigenen Endothelzellen kontaminiert waren. Die stets geringste Expression des vWFs zum Zeitpunkt 0 könnte ein

Indiz dafür sein, dass neben den Fibrochondrozyten auch die Meniskus-eigenen Endothelzellen während des Versuchszeitraums proliferierten. Die stärkere Expression des vWFs der MP 1-3 im Vergleich zu den MP 4-6 könnte durch die längere Primärkulturzeit dieser Patienten bedingt sein. Bei fast allen Patienten zeigt sich eine stärkere Expression des vWFs in der Cokultur. Es ist daher anzunehmen, dass die Meniskus-eigenen Endothelzellen unter dem Einfluß der HUVEC vermehrt vWF exprimieren und vielleicht auch besser proliferieren.

4.2.2 Endostatin ELISA

Da Endostatin ein enzymatisches Spaltprodukt des Kollagen XVIII ist, das erst nach der Translation abgespalten wird, konnte es auf mRNA Ebene mittels PCR nicht isoliert nachgewiesen werden⁷⁰. Deshalb wurde das fertige Protein mittels ELISA Test im Zellüberstand nachgewiesen. Durch die Analyse der Endostatin-Konzentration im Zellüberstand könnten die Ergebnisse der Cokultur mit den Ergebnissen der Kontrolle nicht uneingeschränkt vergleichbar sein. Während im Zellüberstand der Kontrolle nur das von den Fibrochondrozyten synthetisierte Endostatin nachweisbar ist, könnte in der Cokultur die Summe des von den Endothelzellen und den Fibrochondrozyten synthetisierten Endostatins in der Messung erfasst werden. In der Literatur gibt es allerdings Hinweise darauf, dass Endostatin im Zellüberstand kultivierter HUVEC nicht nachweisbar ist, weshalb man davon ausgehen kann, dass in unseren Messungen ausschließlich das von den Fibrochondrozyten synthetisierte Endostatin gemessen wurde⁵⁷.

Endostatin inhibiert die Proliferation von Endothelzellen und ist einer der potentesten Inhibitoren der Angiogenese^{36,70}. Viele Studien weisen darauf hin, dass die durch Tumore induzierte Angiogenese durch systemische Therapie mit Endostatin annähernd vollständig unterdrückt werden kann^{16,58}.

Die Endostatin Konzentrationen im Zellüberstand weisen bei allen Patienten ein sehr ähnliches Bild auf. Zum Zeitpunkt 0 wird bei allen Patienten eine sehr geringe Endostatin Konzentration gemessen, was dadurch bedingt sein dürfte,

dass die Probe kurz nach der Übersiedlung der Fibrochondrozyten in die 6 Well Platten entnommen wurde und die Zellen daher nicht viel Zeit hatten, Endostatin zu synthetisieren.

Zum Zeitpunkt 1 weisen die Überstände der Cokultur bei allen Patienten bis auf MP 5 eine geringere Endostatin Konzentration auf als die Überstände der Kontrolle. Die Endothelzellen scheinen also bis zum Zeitpunkt 1 (nach 4 Tagen) einen inhibierenden Einfluß auf die Synthese des Angiogeneseinhibitors Endostatin in den Fibrochondrozyten zu haben. Auch Pufe et al. konnten zeigen, dass der potente Angiogeneseinhibitor Endostatin im avaskulären Bereich des Meniskus stärker exprimiert wird als im vaskulären Bereich⁶⁶. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die starke Endostatin Expression für die sich nach der Geburt entwickelnde und dann bestehende Avaskularität im inneren Bereich des Meniskus verantwortlich sein könnte.

Zum Zeitpunkt 2 (nach 10 Tagen) zeigt sich allerdings ein einheitliches aber umgekehrtes Bild. Hier weisen alle Patienten im Zellüberstand der Cokultur eine höhere Endostatin Konzentration als in der Kontrolle auf. Ob die Endothelzellen somit die Expression des Angiogeneseinhibitors Endostatin in den Fibrochondrozyten eher supprimieren oder fördern, lässt sich aufgrund der kontroversen Ergebnisse nicht beurteilen.

4.2.3 Immunhistochemie

Neben der RT-PCR wurden die Fibrochondrozyten aller Patienten zu den drei Zeitpunkten mit Hilfe der Immunhistochemie charakterisiert. Dabei wurden Antikörper gegen Kollagen I, Kollagen II und den Endothelzell spezifischen vWF verwendet.

Zwischen den einzelnen Zeitpunkten sowie zwischen den einzelnen Patienten gab es in den immunhistochemischen Färbeergebnissen keine wesentlichen Unterschiede. Die Kollagen I Färbung konnte stets positiv gewertet werden, während sich die Kollagen II Färbung stets negativ darstellte. Da sich das Expressionsmuster der Fibrochondrozyten während des gesamten

Versuchszeitraumes nicht ändert, erscheint eine Entdifferenzierung der Zellen unwahrscheinlich⁶⁹.

Die immunhistochemische Färbung des vWF zeigte ein sehr unspezifisches Färberegebnis, das wahrscheinlich durch eine Kreuzreaktivität des Antikörpers bedingt ist. Die Ergebnisse wurden daher als falsch positiv gewertet. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass es sich bei der Immunhistochemie vor allem durch Kreuzreaktivität und unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers sowie Maskierungen des Zielproteins um ein sehr störanfälliges Verfahren handelt. Daher kommt es häufig zu einer erschwerten Interpretation der Ergebnisse.

4.2.4 Conclusio

Das vorrangige Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Endothelzellen auf Fibrochondrozyten näher zu untersuchen, um daraus Erkenntnisse über die Ursache der schlechten Heilungstendenzen im avaskulären Bereich des Meniskus zu gewinnen. Hierzu wurden Cokulturen aus HUVEC und Fibrochondrozyten hinsichtlich der Expression der Angiogenesefaktoren Angiopoietin 1, Angiopoietin 2, Thrombospondin 1, SMAD 4, Endostatin und VEGF mit Kontrollkulturen aus reinen Fibrochondrozyten verglichen.

Zusätzlich wurde zu den Erntezeitpunkten der Fibrochondrozyten jeweils eine Immunhistochemie durchgeführt, um die Zellen zu charakterisieren. Hierbei zeigte sich, dass die verwendeten Zellen während des gesamten Versuchszeitraumes als Fibrochondrozyten charakterisiert werden konnten.

Die Expressionsanalyse der untersuchten Angiogeneseaktivatoren ergab keine erheblichen Unterschiede zwischen der Cokultur und der Kontrollkultur. Es ließ sich allerdings sowohl in der Cokultur als auch in der Kontrolle zu allen Zeitpunkten eine ausreichende Expression vor allem des Angiogeneseaktivators VEGF nachweisen. Die Expression der untersuchten Angiogeneseinhibitoren in den Fibrochondrozyten wurde durch den Einfluß der Endothelzellen dagegen tendenziell eher supprimiert. Dies galt vor allem für die Angiogeneseinhibitoren Thrombospondin 1 und SMAD 4. Die ausbleibende

Suppression der Angiogeneseinhibitoren durch fehlende Endothelzellen im avaskulären Bereich des Meniskus könnte einer der Gründe für die dort ausbleibende Neovaskularisierung und somit schlechte Heilungstendenz nach einem Trauma sein. Auch die bestehende Avaskularität im inneren Drittel des Meniskus könnte durch die fehlende supprimierende Wirkung der Endothelzellen und die dadurch gesteigerte Expression von Angiogeneseinhibitoren durch die Fibrochondrozyten in diesem Bereich bedingt sein. Andererseits könnte man aber auch annehmen, dass die Endothelzellen im mittleren und äußeren Drittel des Meniskus durch die Suppression der Angiogeneseinhibitoren die Angiogenese fördern und die Vaskularisierung verbessern müssten. Wahrscheinlich ist der Erfolg der Angiogenese letztendlich davon abhängig in welchem Ausmaß die Endothelzellen ihre supprimierende Wirkung auf die Expression der Angiogeneseinhibitoren in den Fibrochondrozyten ausüben können. Während diese supprimierende Wirkung im gut vaskularisierten äußeren Bereich ausreichend ist um einen Neovaskularisationsreiz nach einem Trauma zu induzieren und die Angiogenese zu fördern ist dies in den weiter innen gelegenen Bereichen in immer geringerem Maße der Fall.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass der schlechte Neovaskularisationsreiz nach Trauma im inneren Drittel des Meniskus wahrscheinlich nicht durch eine mangelnde Induktion der Angiogenese durch Produktion von Angiogeneseaktivatoren, sondern eher durch eine physiologisch gesteigerte Produktion von Angiogeneseinhibitoren in diesem Bereich bedingt sein könnte.

5 Zusammenfassung

Der menschliche Meniskus dient der Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Ober- und Unterschenkelknochen, als Stabilisator des Kniegelenks und besitzt eine Pufferfunktion, indem er Stöße vom Oberschenkel auf den Unterschenkel absorbiert. Aufgrund der lebenslangen hohen mechanischen Belastung des Kniegelenks kommt es häufig zu degenerativen oder auch traumatischen Schäden der Menisci, wodurch die Entstehung einer Gonarthrose begünstigt wird. Die Heilung solcher Meniskusschäden ist also von hoher Relevanz aber aufgrund der schlechten Vaskularisierung vor allem des mittleren und inneren Drittels des Meniskus bisher oft nicht möglich. Lediglich im äußeren gut vaskularisierten Drittel des Meniskus führt die primäre Naht eines Risses zur Heilung.

Ziel unserer wissenschaftlichen Untersuchungen war es daher, den Einfluss der Endothelzellen auf die Fibrochondrozyten näher zu untersuchen, um daraus Erkenntnisse über die möglichen Ursachen der schlechten Heilungstendenz im inneren avaskulären Bereich des Meniskus zu gewinnen. Hierzu wurden Cokulturen aus HUVEC und Fibrochondrozyten hinsichtlich der Expression der Angiogenesefaktoren Angiopoietin 1, Angiopoietin 2, Thrombospondin 1, Endostatin, SMAD 4 und VEGF mit Kontrollkulturen aus reinen Fibrochondrozyten verglichen.

Die Expressionsanalyse zeigte, dass bei den untersuchten Angiogeneseaktivatoren keine großen Unterschiede zwischen Cokultur und Kontrollkultur bestehen, während durch den Einfluss der Endothelzellen die Expression der Angiogeneseinhibitoren in den Fibrochondrozyten tendenziell eher supprimiert wird. Die schlechte Vaskularisierungspotenz und somit schlechte Heilungstendenz in den avaskulären Bereichen des Meniskus ist somit wahrscheinlich nicht durch eine mangelnde Induktion der Angiogenese durch ungenügende Produktion von Angiogeneseaktivatoren, sondern eher durch eine gesteigerte Produktion von Angiogeneseinhibitoren in diesem Bereich bedingt.

6 Literaturverzeichnis

1. **Ahmad, S. A.; Liu, W.; Jung, Y. D.; Fan, F.; Reinmuth, N.; Bucana, C. D.; and Ellis, L. M.:** Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis. *Cancer*, 92(5): 1138-43, 2001.
2. **Ahmad, S. A.; Liu, W.; Jung, Y. D.; Fan, F.; Wilson, M.; Reinmuth, N.; Shaheen, R. M.; Bucana, C. D.; and Ellis, L. M.:** The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res*, 61(4): 1255-9, 2001.
3. **Ahmed, A. M., and Burke, D. L.:** In-vitro measurement of static pressure distribution in synovial joints--Part I: Tibial surface of the knee. *J Biomech Eng*, 105(3): 216-25, 1983.
4. **Allen, P. R.; Denham, R. A.; and Swan, A. V.:** Late degenerative changes after meniscectomy. Factors affecting the knee after operation. *J Bone Joint Surg Br*, 66(5): 666-71, 1984.
5. **Arnoczky, S. P., and Warren, R. F.:** The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med*, 11(3): 131-41, 1983.
6. **Arnoczky, S. P.; Warren, R. F.; and Spivak, J. M.:** Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 70(8): 1209-17, 1988.
7. **Asahara, T.; Chen, D.; Takahashi, T.; Fujikawa, K.; Kearney, M.; Magner, M.; Yancopoulos, G. D.; and Isner, J. M.:** Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*, 83(3): 233-40, 1998.
8. **Asch, A. S., and Nachman, R. L.:** Thrombospondin: phenomenology to function. *Prog Hemost Thromb*, 9: 157-76, 1989.
9. **Bagavandoss, P., and Wilks, J. W.:** Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun*, 170(2): 867-72, 1990.
10. **Bagnolesi, P.; Cilotti, A.; Campassi, C.; Battolla, L.; Zampa, V.; Pinto, F.; Gibilisco, G.; and Bartolozzi, C.:** [The radiological assessment of the knee in the meniscectomy patient]. *Radiol Med (Torino)*, 90(3): 194-201, 1995.

11. **Barnard, J. A.; Lyons, R. M.; and Moses, H. L.:** The cell biology of transforming growth factor beta. *Biochim Biophys Acta*, 1032(1): 79-87, 1990.
12. **Becker, R.; Pufe, T.; Kulow, S.; Giessmann, N.; Neumann, W.; Mentlein, R.; and Petersen, W.:** Expression of vascular endothelial growth factor during healing of the meniscus in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*, 86(7): 1082-7, 2004.
13. **Bhargava, M. M.; Attia, E. T.; Murrell, G. A.; Dolan, M. M.; Warren, R. F.; and Hannafin, J. A.:** The effect of cytokines on the proliferation and migration of bovine meniscal cells. *Am J Sports Med*, 27(5): 636-43, 1999.
14. **Bird, M. D. T., Sweet, M.B.E.:** Canals in the semilunar meniscus. Brief report. *J. Bone Joint Surg. [Br]* 70: 839-839, 1988.
15. **Bland, S. J.:** Ligaments their nature and morphology. 2 edition, London, 1897.
16. **Boehm, T.; Folkman, J.; Browder, T.; and O'Reilly, M. S.:** Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390(6658): 404-7, 1997.
17. **Cao, Z.; Flanders, K. C.; Bertolette, D.; Lyakh, L. A.; Wurthner, J. U.; Parks, W. T.; Letterio, J. J.; Ruscetti, F. W.; and Roberts, A. B.:** Levels of phospho-Smad2/3 are sensors of the interplay between effects of TGF-beta and retinoic acid on monocytic and granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Blood*, 101(2): 498-507, 2003.
18. **Chae, J. K.; Kim, I.; Lim, S. T.; Chung, M. J.; Kim, W. H.; Kim, H. G.; Ko, J. K.; and Koh, G. Y.:** Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(12): 2573-8, 2000.
19. **Clark, C. R., and Ogden, J. A.:** Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg Am*, 65(4): 538-47, 1983.
20. **Collier, S., and Ghosh, P.:** Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*, 3(2): 127-38, 1995.
21. **Connolly, D. T.; Heuvelman, D. M.; Nelson, R.; Olander, J. V.; Eppley, B. L.; Delfino, J. J.; Siegel, N. R.; Leimgruber, R. M.; and Feder, J.:** Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, 84(5): 1470-8, 1989.

22. **Cox, J. S.; Nye, C. E.; Schaefer, W. W.; and Woodstein, I. J.:** The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. *Clin Orthop Relat Res*, (109): 178-83, 1975.
23. **Datto, M., and Wang, X. F.:** The Smads: transcriptional regulation and mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev*, 11(1-2): 37-48, 2000.
24. **Donoviel, D. B.; Amacher, S. L.; Judge, K. W.; and Bornstein, P.:** Thrombospondin gene expression is associated with mitogenesis in 3T3 cells: induction by basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, 145(1): 16-23, 1990.
25. **Dvorak, H. F.:** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26): 1650-9, 1986.
26. **Dvorak, H. F.; Harvey, V. S.; Estrella, P.; Brown, L. F.; McDonagh, J.; and Dvorak, A. M.:** Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest*, 57(6): 673-86, 1987.
27. **Ferrara, N.:** Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res*, 55: 15-35; discussion 35-6, 2000.
28. **Ferrara, N., and Davis-Smyth, T.:** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1): 4-25, 1997.
29. **Ferrara, N., and Keyt, B.:** Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *Exs*, 79: 209-32, 1997.
30. **Fujikawa, K.; de Aos Scherpenseel, I.; Jain, S. K.; Presman, E.; Christensen, R. A.; and Varticovski, L.:** Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp Cell Res*, 253(2): 663-72, 1999.
31. **Ghadially, F. N.; Thomas, I.; Yong, N.; and Lalonde, J. M.:** Ultrastructure of rabbit semilunar cartilages. *J Anat*, 125(3): 499-517, 1978.
32. **Hashimoto, J.; Kurosaka, M.; Yoshiya, S.; and Hirohata, K.:** Meniscal repair using fibrin sealant and endothelial cell growth factor. An experimental study in dogs. *Am J Sports Med*, 20(5): 537-41, 1992.
33. **Hayes, A. J.; Huang, W. Q.; Mallah, J.; Yang, D.; Lippman, M. E.; and Li, L. Y.:** Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res*, 58(3): 224-37, 1999.

34. **Hayes, A. J.; Huang, W. Q.; Yu, J.; Maisonpierre, P. C.; Liu, A.; Kern, F. G.; Lippman, M. E.; McLeskey, S. W.; and Li, L. Y.:** Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer*, 83(9): 1154-60, 2000.
35. **Henning, C. E.; Lynch, M. A.; and Clark, J. R.:** Vascularity for healing of meniscus repairs. *Arthroscopy*, 3(1): 13-8, 1987.
36. **Hohenester, E.; Sasaki, T.; Olsen, B. R.; and Timpl, R.:** Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *Embo J*, 17(6): 1656-64, 1998.
37. **Holash, J.; Maisonpierre, P. C.; Compton, D.; Boland, P.; Alexander, C. R.; Zagzag, D.; Yancopoulos, G. D.; and Wiegand, S. J.:** Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, 284(5422): 1994-8, 1999.
38. **Holash, J.; Wiegand, S. J.; and Yancopoulos, G. D.:** New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, 18(38): 5356-62, 1999.
39. **Houck, K. A.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; and Leung, D. W.:** The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 5(12): 1806-14, 1991.
40. **Jackson, J. P.:** Degenerative changes in the knee after meniscectomy. *Br Med J*, 2(604): 525-7, 1968.
41. **Johnson, R. J.; Kettelkamp, D. B.; Clark, W.; and Leaverton, P.:** Factors effecting late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 56(4): 719-29, 1974.
42. **Keck, P. J.; Hauser, S. D.; Krivi, G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; and Connolly, D. T.:** Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246(4935): 1309-12, 1989.
43. **Kwak, H. J.; So, J. N.; Lee, S. J.; Kim, I.; and Koh, G. Y.:** Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett*, 448(2-3): 249-53, 1999.
44. **Lafeber, F. P.; Vander Kraan, P. M.; Van Roy, J. L.; Huber-Bruning, O.; and Bijlsma, J. W.:** Articular cartilage explant culture; an appropriate in vitro system to compare osteoarthritic and normal human cartilage. *Connect Tissue Res*, 29(4): 287-99, 1993.

45. **Lagna, G.; Hata, A.; Hemmati-Brivanlou, A.; and Massague, J.:** Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*, 383(6603): 832-6, 1996.
46. **Lahav, J.:** The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta*, 1182(1): 1-14, 1993.
47. **Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; and Ferrara, N.:** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935): 1306-9, 1989.
48. **MacConaill, M. A.:** The functions of intra-articular fibro-cartilages with special reference to the knee and inferior radio-ulnar joints. *J. Anat.* 66: 210-227, 1932.
49. **Maisonpierre, P. C. et al.:** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(5322): 55-60, 1997.
50. **McDevitt, C. A., Miller R.R., Spindler, K.P.:** The cells and cell matrix interactions of the meniscus. *In: Knee meniscus: Basic and clinical foundations:* 29-36, 1992.
51. **Miller, R. R., and Rydell, P. A.:** Primary culture of microvascular endothelial cells from canine meniscus. *J Orthop Res*, 11(6): 907-11, 1993.
52. **Miyazono, K.; Kusanagi, K.; and Inoue, H.:** Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol*, 187(3): 265-76, 2001.
53. **Molloy, T.; Wang, Y.; and Murrell, G.:** The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33(5): 381-94, 2003.
54. **Moses, H. L.; Yang, E. Y.; and Pietenpol, J. A.:** TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell*, 63(2): 245-7, 1990.
55. **Mosher, D. F.:** Physiology of thrombospondin. *Annu Rev Med*, 41: 85-97, 1990.
56. **Murphy-Ullrich, J. E.; Schultz-Cherry, S.; and Hook, M.:** Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell*, 3(2): 181-8, 1992.

57. **Nasu, K.; Fujisawa, K.; Nishida, Y.; Kai, S.; Sugano, T.; Miyakawa, I.; and Tateishi, Y.:** Expression of collagen XVIII mRNA and protein in human umbilical vein and placenta. *Reprod Fertil Dev*, 15(1-2): 107-14, 2003.
58. **O'Reilly, M. S. et al.:** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2): 277-85, 1997.
59. **Ollivier, V.; Bentolila, S.; Chabbat, J.; Hakim, J.; and de Prost, D.:** Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood*, 91(8): 2698-703, 1998.
60. **Papapetropoulos, A.; Garcia-Cardena, G.; Dengler, T. J.; Maisonpierre, P. C.; Yancopoulos, G. D.; and Sessa, W. C.:** Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest*, 79(2): 213-23, 1999.
61. **Pauwels, F.:** [A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure.]. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 121: 478-515, 1960.
62. **Peretti, G. M.; Caruso, E. M.; Randolph, M. A.; and Zaleske, D. J.:** Meniscal repair using engineered tissue. *J Orthop Res*, 19(2): 278-85, 2001.
63. **Peters, K. G.:** Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins: working together to build a better blood vessel. *Circ Res*, 83(3): 342-3, 1998.
64. **Petersen, W., and Tillmann, B.:** [Structure and vascularization of the knee joint menisci]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 137(1): 31-7, 1999.
65. **Proctor, C. S.; Schmidt, M. B.; Whipple, R. R.; Kelly, M. A.; and Mow, V. C.:** Material properties of the normal medial bovine meniscus. *J Orthop Res*, 7(6): 771-82, 1989.
66. **Pufe, T.; Petersen, W. J.; Miosge, N.; Goldring, M. B.; Mentlein, R.; Varoga, D. J.; and Tillmann, B. N.:** Endostatin/collagen XVIII--an inhibitor of angiogenesis--is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biol*, 23(5): 267-76, 2004.
67. **Ray, P. S.; Estrada-Hernandez, T.; Sasaki, H.; Zhu, L.; and Maulik, N.:** Early effects of hypoxia/reoxygenation on VEGF, ang-1, ang-2 and their receptors in the rat myocardium: implications for myocardial angiogenesis. *Mol Cell Biochem*, 213(1-2): 145-53, 2000.

68. **Risau, W.:** Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626): 671-4, 1997.
69. **Roberts, S.; McCall, I. W.; Darby, A. J.; Menage, J.; Evans, H.; Harrison, P. E.; and Richardson, J. B.:** Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther*, 5(1): R60-73, 2003.
70. **Sasaki, T.; Fukai, N.; Mann, K.; Gohring, W.; Olsen, B. R.; and Timpl, R.:** Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *Embo J*, 17(15): 4249-56, 1998.
71. **Schmitz, M. A.; Rouse, L. M., Jr.; and DeHaven, K. E.:** The management of meniscal tears in the ACL-deficient knee. *Clin Sports Med*, 15(3): 573-93, 1996.
72. **Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, V. S.; and Dvorak, H. F.:** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587): 983-5, 1983.
73. **Shim, W. S.; Teh, M.; Mack, P. O.; and Ge, R.:** Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by an antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in immunodeficient mice. *Int J Cancer*, 94(1): 6-15, 2001.
74. **Stokes, D. G.; Liu, G.; Dharmavaram, R.; Hawkins, D.; Piera-Velazquez, S.; and Jimenez, S. A.:** Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*, 360(Pt 2): 461-70, 2001.
75. **Stratmann, A.; Risau, W.; and Plate, K. H.:** Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol*, 153(5): 1459-66, 1998.
76. **Sullivan, D. C., and Bicknell, R.:** New molecular pathways in angiogenesis. *Br J Cancer*, 89(2): 228-31, 2003.
77. **Suri, C.; McClain, J.; Thurston, G.; McDonald, D. M.; Zhou, H.; Oldmixon, E. H.; Sato, T. N.; and Yancopoulos, G. D.:** Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282(5388): 468-71, 1998.
78. **Sweigart, M. A., and Athanasiou, K. A.:** Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng*, 7(2): 111-29, 2001.

79. **Tanaka, S.; Mori, M.; Sakamoto, Y.; Makuuchi, M.; Sugimachi, K.; and Wands, J. R.:** Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest*, 103(3): 341-5, 1999.
80. **Tapper, E. M., and Hoover, N. W.:** Late results after meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*, 51(3): 517-26 passim, 1969.
81. **Taraboletti, G.; Roberts, D.; Liotta, L. A.; and Giavazzi, R.:** Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol*, 111(2): 765-72, 1990.
82. **Thurston, G.; Suri, C.; Smith, K.; McClain, J.; Sato, T. N.; Yancopoulos, G. D.; and McDonald, D. M.:** Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 286(5449): 2511-4, 1999.
83. **Tischer, E.; Mitchell, R.; Hartman, T.; Silva, M.; Gospodarowicz, D.; Fiddes, J. C.; and Abraham, J. A.:** The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266(18): 11947-54, 1991.
84. **Verdonk, P. C.; Forsyth, R. G.; Wang, J.; Almqvist, K. F.; Verdonk, R.; Veys, E. M.; and Verbruggen, G.:** Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(7): 548-60, 2005.
85. **Voloshin, A. S., and Wosk, J.:** Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng*, 5(2): 157-61, 1983.
86. **Ward, E. G.; Grosios, K.; Markham, A. F.; and Jones, P. F.:** Genomic structures of the human angiopoietins show polymorphism in angiopoietin-2. *Cytogenet Cell Genet*, 94(3-4): 147-54, 2001.
87. **Webber, R. J.; Harris, M. G.; and Hough, A. J., Jr.:** Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res*, 3(1): 36-42, 1985.
88. **Zhang, L.; Duan, C. J.; Binkley, C.; Li, G.; Uhler, M. D.; Logsdon, C. D.; and Simeone, D. M.:** A transforming growth factor beta-induced Smad3/Smad4 complex directly activates protein kinase A. *Mol Cell Biol*, 24(5): 2169-80, 2004.

7 Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn PD Dr. Maximilian Rudert, ltd. Oberarzt der Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen und Herrn Dr. Maik Hoberg, Assistenzarzt Universitätsklinik Tübingen. Für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung, die kompetenten Ratschläge und die Geduld möchte ich beiden herzlich danken.

Weiterer Dank gilt dem Leiter des zellbiologischen Labors, Herrn Prof. Dr. Wilhelm Aicher, der mit seiner großen Kompetenz und Erfahrung stets eine Lösung für alle Probleme hatte.

Besonderer Dank gilt auch Frau Anita Hack, die maßgeblich an der Planung der Experimente beteiligt war, mit viel Geduld alle Techniken des Laboralltags erklärte und stets ein offenes Ohr für Probleme hatte.

Weiterer Dank gilt Edda Schmid für die gemeinsame Durchführung vieler Experimente und die vielen Stunden die wir zusammen im Labor verbracht haben.

Außerdem danke ich Frau Elisabeth Kienzle, Frau Tanja Abruzzesse und Frau Dr. Dorothea Alexander für wertvolle Tipps und die Bereitstellung einiger Labormaterialien.

Weiterer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden.

8 Curriculum vitae

Name	Viviane Alexandra Stark
Geburtsdatum	* 30. 08. 1982
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Dr. Ing. habil. Klaus Stark Dagmar Stark
Geschwister	Anselm Stark, Wilko Stark, Eike-Christian Stark
 Schulbildung	
08/1988 – 07/1992	Grundschule Pestalozzi Gerlingen
08/1992 – 06/2001	Gymnasium Gerlingen
03/1998 – 05/1998	Austauschschülerin an der Oak Park and River Forest High School, Chicago, USA
06/2001	Abitur
 Studium	
seit 10/2001	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls Universität Tübingen
September 2003	Physikum
 Famulaturen	
September 2004	Strahlen-Onkologie, Braunschweig
April 2005	Anästhesiologie, BG Unfallklinik, Tübingen
August 2005	Dermatologie, Universitätsklinik, Tübingen

Promotion

Februar 2004

Beginn der Experimente im Orthopädischen Labor
der Universitätsklinik Tübingen

Oktober 2005

Abschluss der Experimente

30. Mai 2008

Ärztliche Prüfung

Interessen

Skifahren, Inline Skaten, Tennis, Musik, Kino