

Aus der Poliklinik für Prothetik  
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)

im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

Identification and characterization of meniscal progenitor cells (MPCs) in  
Osteoarthritis

Identifizierung und Charakterisierung von Meniskus Progenitorzellen (MPCs)  
bei Osteoarthrose

## **INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Martin Krusche**

aus Jena

Göttingen 2013

**Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer**

**I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolai Miosge**

**II. Berichterstatter/in: PD Dr. rer. nat. Kaomei Guan-Schmidt**

**III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. dent. Rainer Mausberg**

**Tag der mündlichen Prüfung: 12.5.2014**

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs. Ethanol	absolutes Ethanol
APS	Ammonium Ethanol
AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CPC	chondrogene Progenitor Zelle
Ct-Wert	<i>threshold cycle</i> (Zyklus-Schwellenwert)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
et al.	und andere
g	Gramm
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
HCL	Salzsäure
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
Lsg.	Lösung
mg	Milligramm
min	Minute

mM	Millimolar
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
OA	Osteoarthrose
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pos.	positiv
RNA	Ribonukleinsäure
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SYBR Green	interkalierender Fluoreszenzfarbstoff zum DNA-Nachweis
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TEMED	Tetramethylethanediamine
UpM	Umdrehungen pro Minute

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1 Anatomische Ansicht des Kniegelenks	9
Abb. 2 Blutversorgung des Meniskus	10
Abb. 3 Faserverlauf im Meniskus	11
Abb. 4 Schemazeichnung des menschlichen Meniskus mit den verschiedenen Zellpopulationen und deren Verteilung im Gewebe	12
Abb. 5 Meniskusentwicklungsmodell	13
Abb. 6 Meniskuszonierung im schematischen Längsschnitt	19
Abb. 7 Koloniebildung der migrierten Meniskuszellen der Außenzone	40
Abb. 8 Koloniebildung der migrierten Meniskuszellen der Innenzone	41
Abb. 9 FACS-Analyse von CD 13	42
Abb. 10 FACS-Analyse von CD 29	42
Abb. 11 FACS-Analyse von CD 44	43
Abb. 12 FACS-Analyse von CD 73	43
Abb. 13 FACS-Analyse von CD 90	43
Abb. 14 FACS-Analyse von CD 105	44
Abb. 15 FACS-Analyse von CD 31	44
Abb. 16 FACS-Analyse von CD 45	45
Abb. 17 FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle im Vergleich von Meniskus Innen- & Außenzone	45
Abb. 18 CD29 PE Meniskus	47
Abb. 19 CD44 PE Meniskus	47
Abb. 20 CD73 PE Meniskus	47
Abb. 21 CD90 PE Meniskus	48
Abb. 22 CD105 FITC Meniskus	48
Abb. 23 mRNA-Gehalt der Meniskuszellen im Vergleich von Meniskus Innen- & Außenzone	49
Abb. 24 mRNA-Level der Meniskuszellen der Innen- & Außenzone in Relation zum Wert der CPCs	50
Abb. 25 adipogene Differenzierung	51
Abb. 26 LPL-FITC Meniskus	52
Abb. 27 Negativkontrolle für die adipogene Differenzierung	52
Abb. 28 osteoblastäre Differenzierung	53
Abb. 29 Osteocalcin-FITC Meniskus	54
Abb. 30 Negativkontrolle für die osteoblastäre Differenzierung	54
Abb. 31 RUNX-2 FITC Meniskus	55
Abb. 32 SOX-9 FITC Meniskus	55
Abb. 33 Col-1 FITC Meniskus	56
Abb. 34 mRNA-Gehalt der Meniskuszellen der chondrogenen Marker im Vergleich der Innen- & Außenzone	56
Abb. 35 mRNA-Level der Meniskuszellen der Innen- & Außenzone in Relation zum Wert der Chondrozyten	57
Abb. 36 FACS-Analyse: Kollagen-2 FITC Meniskus	58
Abb. 37 Schmelzkurve der qRt-PCR für Kollagen 2 der Innenzone	59
Abb. 38 Schmelzkurve der qRt-PCR für Kollagen 2 der Außenzone	60
Abb. 39 Western Blot SOX-9	61
Abb. 40 Western Blot Kollagen 1	61

Abb. 41 Western Blot RUNX-2	62
Abb. 42 Einwandern der MPCs über die Mikrogefäße	69
Abb. 43 Wachstum und Vermehrung der MPCs in der Stammzellnische	69
Abb. 44 Migration der MPCs zu den Meniskuläsionen	70

### **Tabellenverzeichnis**

Tab.1	verwendete Geräte	22
Tab.2	verwendete Puffer und Lösungen	22
Tab.3	verwendete Antikörper	25
Tab.4	verwendete Zellkultur-Medien	26
Tab.5	verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	27
Tab.6	Primertabelle	32

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1.	Anatomie des Meniskus	9
1.2.	Histologie des Meniskus	10
1.3.	Meniskusentwicklung	12
1.4.	Funktion des Meniskus	13
1.5.	Osteoarthrose im Kniegelenk	14
1.6.	Die Rolle des Meniskus bei Osteoarthrose	15
1.7.	Chondrogene Progenitorzellen und deren Rolle bei Reparaturprozessen im Meniskus	17
2.	Aufgabenstellung	19
3.	Material und Methoden	21
3.1.	Materialien und Geräte	21
3.1.1	Wichtige Geräte	21
3.1.2.	Puffer und Lösungen	21
3.1.3.	Antikörper	24
3.1.4.	Medien	25
3.1.5.	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	26
3.2.	Methoden	27
3.2.1.	Gewinnung des Meniskusgewebes	27
3.2.2.	Zellisolation und Kultivierung der Meniskusvorläuferzellen (MPC)	27
3.2.3.	Zellgewinnung	28
3.3.	Real-Time-PCR	28
3.3.1.	Allgemeines zur quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR)	28
3.3.2.	Vorbereitung für die quantitative Real-Time-PCR	30
3.3.3.	RNA- Isolation	30
3.3.4.	cDNA-Synthese	31
3.3.5.	Primertabelle	31
3.3.6.	Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	32
3.3.7.	Statistik	32
3.4.	Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz	34
3.4.1.	Allgemeines zum Verfahren der Immunfluoreszenz an adhärennten Zellen	34
3.4.2.	Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz	34
3.5.	Durchflusszytometrie	35
3.6.	Western Blot	36
3.6.1	Allgemeines zum Western Blot-Verfahren	36
3.6.2.	Durchführung des Western Blot	37
3.7.	Zelldifferenzierung	38
3.7.1.	Adipogene Differenzierung	39
3.7.2.	Osteoblastäre Differenzierung	39

4.	Ergebnisse	40
4.1.	Zellmigration und Wachstum	40
4.2.	Untersuchung des Progenitorcharakters der Meniskuszellen	41
4.2.1.	FACS-Analysen der mesenchymalen Stammzellmarker	41
4.2.2.	Immunfluoreszenz-Nachweis der mesenchymalen Stammzellmarker	46
4.2.3.	Untersuchung der mRNA-Expression der mesenchymalen Stammzellmarker in den Meniskuszellen	48
4.3.	Zelldifferenzierung	50
4.3.1.	Adipogene Differenzierung	51
4.3.2.	Osteoblastäre Differenzierung	52
4.4.	Evaluierung der chondrogenen Eigenschaften der Meniskuszellen	54
4.4.1.	Immunfluoreszenzuntersuchung der Meniskuszellen auf Kollagen 1, RUNX-2 und SOX-9	55
4.4.2.	Genanalyse der Meniskuszellen auf Kollagen 1, RUNX-2 und SOX-9	56
4.4.3.	FACS-Analyse der Meniskuszellen für Kollagen 2	58
4.4.4.	mRNA-Expression von Kollagen 2 der Meniskuszellen	59
4.4.5.	Western Blot-Nachweis von Kollagen1, RUNX-2 und SOX-9	60
4.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
5.	Diskussion	64
5.1.	Progenitorcharakter der Meniskuszellen	65
5.2.	Die chondrogenen Eigenschaften der MPCs	71
5.3.	MPCs im Kontext mit mesenchymalen Stammzellen	74
5.4.	Meniskus Tissue Engineering	76
5.5.	Klinische Relevanz	77
6.	Literaturverzeichnis	79
7.	Danksagung	89
8.	Lebenslauf	90

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Anatomie des Meniskus

Im Kniegelenk unterscheidet man zwischen lateralem und medialem Meniskus. Die Menisken liegen intraartikulär dem Tibiaplateau auf und haben in der Aufsicht die Form zweier Halbmonde (= lat. *meniscus*). Der Innenmeniskus (*Meniscus medialis*) ist sichelförmig und mit dem medialen Kollateralband verwachsen. Der Außenmeniskus (*Meniscus lateralis*) ist ringförmig und beweglicher als der Innenmeniskus, da er nicht mit dem lateralen Kollateralband verwachsen ist.

An den Meniskusenden befindet sich ein Vorder- und Hinterhorn. An diesen heften kurze Bänder an, über welche die Menisken an den *Areae intercondylaris anteriores* und *posteriores* verankert sind. Die Hinterhörner blockieren das Rückwärtsgleiten der Femurkondylen, wobei v.a. das Hinterhorn des Innenmeniskus durch seine enge Verbindung mit dem *Ligamentum popliteum obliquum* in Synergie mit dem vorderen Kreuzband das Rückwärtsrollen verhindert. Im anterioren Bereich sind beide Menisken über das *Ligamentum transversum genus* verbunden, dessen Funktion allerdings bisher noch nicht ausreichend untersucht wurde (Beaufils und Verdonk 2010). Ausgehend vom Hinterhorn des lateralen Meniskus ziehen zwei Bänder (*Ligamentum meniscofemorale anterius* und *posterius*) zum vorderen bzw. hinteren Kreuzband. Das *Ligamentum meniscofemorale anterius* (auch als Ligamentum Humphrey bezeichnet) verläuft *anterior* des hinteren Kreuzbandes, wohingegen das *Ligamentum meniscofemorale posterius* (auch Ligamentum Wrisberg genannt) *posterior* des hinteren Kreuzbandes liegt. Beide wirken wahrscheinlich als unterstützender Haltegurt für die hintere Schublade (Gupte et al. 2003).

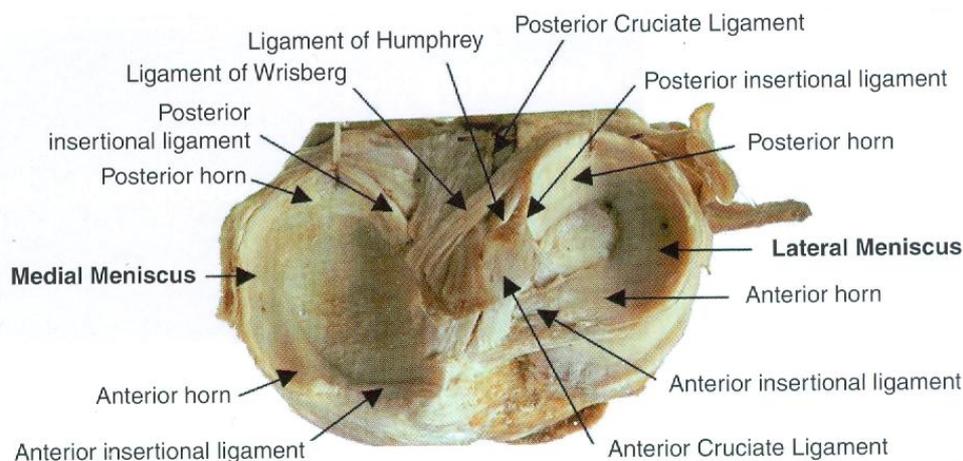


Abb. 1 Anatomische Ansicht des Kniegelenks nach Beaufils und Verdonk: The Meniscus (2010), S. 12

Peripher sind die Menisken über ihren konvexen äußeren Rand mit der Gelenkkapsel verwachsen und von Synovia bekleidet. Mit Blut werden die Menisken aus den oberen und unteren Ästen der *Arteria medialis* und *lateralis genus* versorgt. Außerdem erfolgt die Blutversorgung auch teilweise über die *Arteria media genus*, die mit den Synovialarterien in Verbindung steht (Arnoczky und Warren 1982).

Zum Zeitpunkt der Geburt ist der Meniskus zu 100% vaskularisiert (Peterson und Tillmann 1995). Allerdings entwickelt sich relativ schnell eine avaskuläre Innenzone. Beim Erwachsenen ist die Vaskularisierung der Menisken auf 10-25% beschränkt, was von Bedeutung für den Regenerationsprozess des Meniskus ist (Guisasola et al. 2002). Die Blutgefäße befinden sich nur in der Außenzone des Meniskus. Der innere Anteil der Menisken ist gefäßfrei und wird durch Diffusion der Synovialflüssigkeit ernährt (McDevitt et al. 2000).

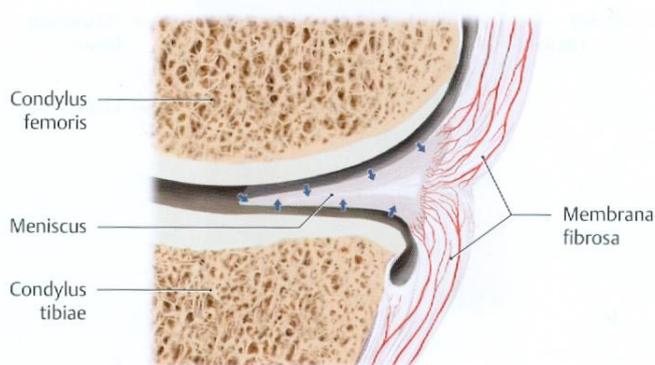


Abb. 2 Blutversorgung des Meniskus aus: Prometheus Lernatlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, S. 440, Abb.B

## 1.2. Histologie des Meniskus

Gesundes Meniskusgewebe besteht durchschnittlich zu 72% aus Wasser, 22% Kollagen, 0,8% Glykosaminoglykanen und 0,12% DNA (Herwig et al. 1984). Histologisch handelt es sich bei Meniskusgewebe um Faserknorpel, ein Netzwerk aus kollagenen Fasern mit eingestreuten Zellen und extrazellulärer Matrix, bestehend aus Proteoglykanen und Glykoproteinen. Aggrecan ist das Hauptproteoglykan der extrazellulären Matrix, (Krenn et al. 2010). Über 90% der Kollagenfasern bestehen aus Kollagen 1. In geringen Anteilen findet sich allerdings auch Kollagen 2, 3 und 4 (Eyre und Wu 1983) im Meniskus.

Der Meniskus ist durch ein komplexes kollagenes Fasernetzwerk aufgebaut: Die Faserstruktur ist im Bereich der Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia durch ein Netzwerk aus kleinen kollagenen Fibrillen (~30nm im Durchmesser) gekennzeichnet. In der

Hauptsubstanz des Meniskus sind die Kollagenfibrillen zirkulär angeordnet. (Ghadailly et al. 1983, Peterson und Tillmann 1995, Kambic und McDevitt 2005). Die zirkuläre Faseranordnung reduziert die einwirkende Spannung auf den Faserknorpel. Des Weiteren besitzt der Meniskus eine laminare, 150-200µm tiefe Superfizialschicht, in der die kollagenen Fasern radiär verlaufen. Auch in der Mittelzone des Meniskus finden sich radiär angeordnete Fasern, welchen den zirkulären Fasern als Verankerung dienen und somit ein longitudinales Einreißen der Fasern verhindern (Bullough et al. 1970).

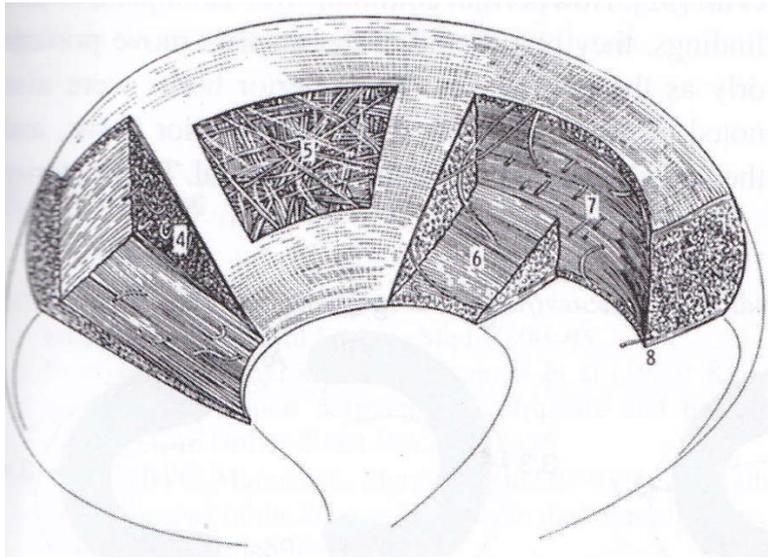


Abb. 3 Faserverlauf im Meniskus nach Beaufils und Verdonk: The Meniscus (2010), S. 15

Der Meniskus ist definiert als Faserknorpel aufgrund der runden oder ovalen Form der meisten Zellen und des fibrösen Aussehens der Fasern im Lichtmikroskop (Ghadailly et al. 1983). Im Meniskus finden sich drei verschiedene Zellarten:

Am häufigsten sind die Fibrochondrozyten, welche v.a. in der Innen- und Mittelzone des Meniskus vorkommen. Die Fibrochondrozyten liegen in einem Territorium und haben eine runde bis ovale Form. Überwiegend produzieren sie Kollagen 1. Die von Ihnen produzierte interterritoriale Matrix enthält außerdem kleine Mengen an Kollagen 2, 3 und 4.

In der Außenzone des Meniskus befinden sich überwiegend Fibroblasten-ähnliche-Zellen (*fibroblast-like cells*), welchen die perizelluläre Matrix fehlt. Die Zellen besitzen mehrere lange und dünne Zytoplasmafortsätze. Diese stülpen sich aus dem Zelleib aus und treten mit den anderen Zellen über Gap junctions in Kontakt. Außerdem verfügen die Fibroblasten-ähnlichen-Zellen über zwei Zentrosomen, von denen eines mit einem primären Zilium verbunden ist (Hellio Le Graverand et al. 2001).

Die Zellen der Superfizialschicht haben eine charakteristische fusiforme Form ohne Zellfortsätze. Sie liegen direkt unter der Geweboberfläche (Ghadially et al. 1983).

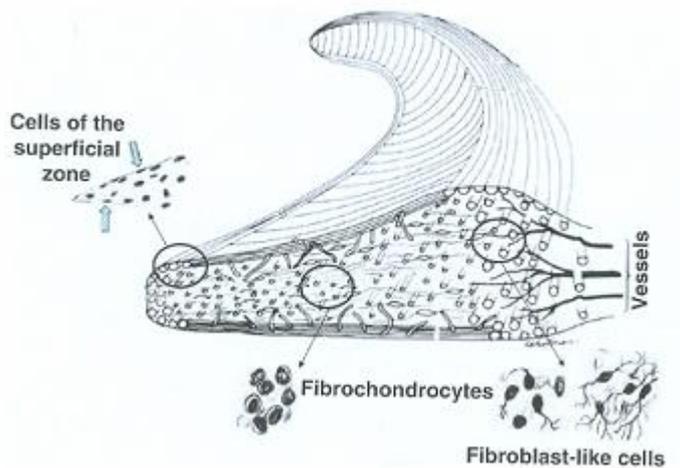


Abb. 4 Schemazeichnung des menschlichen Meniskus mit den verschiedenen Zellpopulationen und deren Verteilung im Gewebe aus Beaufils und Verdonk: The Meniscus (2010), S. 22

### 1.3. Meniskusentwicklung

Die Entwicklung synovialer Gelenke läuft in zwei Phasen ab: Zuerst differenzieren sich mesenchymale Zellen und bilden Knorpelblastome. Aus diesen entwickelt sich das Knorpelmodell für die späteren langen Röhrenknochen. Die gegenüberliegenden Skelettanlagen werden durch eine dünne Schicht mesenchymaler Zellen, die als Interzone bezeichnet wird, voneinander getrennt.

Diese ist aus drei Zellschichten aufgebaut: zwei Außenschichten aus chondrogenen Zellen, zwischen denen sich eine Zellschicht aus abgeflachten Zellen befindet. Die Zellen der Außenschicht überziehen die Knorpelanlagen und differenzieren sich zum späteren Gelenkknorpel (Koyama et al. 2008). Die genaue Funktion der Zellen aus der dünnen Innenschicht ist noch nicht abschließend geklärt, man vermutet aber, dass sie an der Bildung der intraartikulären Strukturen wie Bänder, Synovia und dem Meniskus beteiligt sind (Beaufils und Verdonk 2010).

Im Anschluss an die Bildung der Interzone kommt es zur Ausbildung des Gelenkspaltes, bei der sich die beiden gegenüberliegenden Knorpel-elemente voneinander trennen, um die jeweilige Gelenkoberfläche zu formen (Ito und Kida 2000). Für die Bildung und Aufrechterhaltung des Meniskus während der Embryogenese ist die mechanische Stimulation von großer Bedeutung. Mikic et al. (2000) konnten zeigen, dass ohne

funktionelle Muskelkontraktion die frühe Meniskusformation zwar stattfinden kann, dieser Meniskus allerdings im Anschluss daran schnell degeneriert und wieder verschwindet.

Für die Morphogenese des Meniskus wurden von der Arbeitsgruppe um Vicki Rosen (Pavlova et al. 2001) am Mausmodell vier Entwicklungsstufen identifiziert:

Im ersten Schritt kommt es zur Kondensation der mesenchymalen Zellen zwischen den Gelenkoberflächen der Tibia und des Femurs. Danach differenzieren sich meniskale Fibrochondroblasten zu einem rudimentären Meniskus. In der dritten Phase kondensieren die Zellen und beginnen mit der Bildung von extrazellulärer Matrix. In der letzten Phase reift die extrazelluläre Matrix des Meniskus aus.

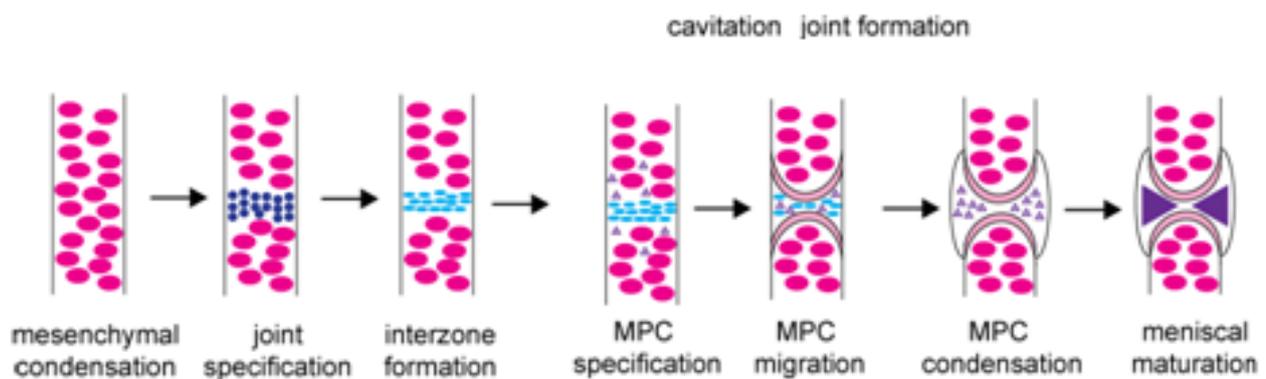


Abb. 5 Meniskusentwicklungsmodell (unveröffentlicht, mit Genehmigung von Prof. Vicki Rosen)

Der menschliche Meniskus ist erstmals 7,5 Wochen nach der Befruchtung identifizierbar (Gardener und O’Rahilly 1968). Während der pränatalen Entwicklung nimmt der Meniskus seine Form an. Bereits in der achten Woche nach Befruchtung ist er hoch zellreich und weist eine große Kern-Plasmarelation auf. Blutgefäße sind im gesamten fetalen Meniskus zu finden, wobei sich die größten Gefäße entlang der Kapsel und der Anheftungen befinden.

#### 1.4. Funktion des Meniskus

Die Menisken spielen eine wichtige Rolle bei der Kraftübertragung im Kniegelenk (Walker und Erkman 1975, Seedhom und Terayama 1976, Fukubayashi et al. 1982)

Durch die knöchernen Fixierung an der Tibia wirken die Menisken wie Ringe, die Zug bei radialer Belastung aufnehmen. Dadurch wird die auf das Kniegelenk einwirkende Kraft verteilt und die Gelenkkongruenz verbessert. Es werden 40-60% der auf das Knie einwirkenden Kraft auf die Menisken übertragen. (Mow et al. 1992, Levy et al. 1982). Durch

die innere Faserstruktur wandeln die Menisken den Druck in Zugkraft um, wofür v.a. die zirkulär angeordneten Kollagenfasern verantwortlich sind (Tissakht und Ahmed 1995).

Außerdem vergrößern die Menisken die Kontaktfläche zwischen Femur und Tibia (Levy et al. 1982). Dadurch verringern sie den Druck zwischen den knöchernen Kontaktflächen (Walker und Erkman 1975). Der laterale Meniskus bedeckt durchschnittlich 59% des lateralen Tibiaplateaus, wohingegen der mediale Meniskus 50% des medialen Tibiaplateaus bedeckt (Blöcker et al. 2011).

Der hohe Wasseranteil und die damit verbundenen viskösen Eigenschaften des Meniskus ermöglichen die Schockabsorption im Kniegelenk. Der auf den Faserknorpel einwirkenden Kraft steht der hydrostatische Druck im Gewebe entgegen. Die Gewebsflüssigkeit versucht zu entweichen, und die sich dabei entwickelnde Zugkraft absorbiert den Schock (Li et al. 2003).

Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Schockabsorption im Kniegelenk ohne Meniskus um ca. 20 % erniedrigt ist (Voloshin und Wosk 1983).

Außerdem spielen die Menisken eine wichtige Rolle als sekundäre Gelenkstabilisatoren. So begrenzen sie beispielsweise die Innen- und Außenrotation der Tibia (Wang und Walker 1974). Auch konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass das klinische Ergebnis bei vorderen Kreuzbandrekonstruktionen wesentlich durch das gleichzeitige Vorliegen von Meniskusverletzungen beeinträchtigt wird (Shoemaker und Markolf 1986).

### 1.5. Osteoarthrose im Kniegelenk

Osteoarthrose ist eine der häufigsten chronischen Gelenkerkrankungen (Peat et al. 2001, Schneider et al. 2005). Die am meisten davon betroffenen Gelenke sind die der Hüfte, der Hände und des Knies.

Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit dem Alter zu, wobei Frauen im Alter über 50 Jahren häufiger betroffen sind als gleichaltrige Männer (Lawrence et al. 2008). So konnte beispielsweise die so genannte Rotterdam-Studie (Dahaghin et al. 2005) zeigen, dass bei Personen über 80 Jahren 53% der Frauen und 33% aller Männer im radiologischen Bild eine Osteoarthrose im Kniegelenk aufweisen.

Klinische Symptome der Osteoarthrose im Kniegelenk sind langanhaltende Schmerzen im Kniegelenk, Krepitationen bei aktiven Gelenkbewegungen, Morgensteifigkeit (für weniger als 30 Minuten) und knöcherner Kniegelenksvergrößerung (Bijlsma 2011). Im radiologischen

Bild zeigen sich Gelenkspaltverkleinerung, Osteophyten an den Rändern des Gelenks und knöcherne Sklerose.

Als Risikofaktoren für die Entstehung und Progression von Osteoarthrose im Kniegelenk gelten Alter, weibliches Geschlecht, Inaktivität, exzessive Gelenkbelastungen und Übergewicht (Murphy et al. 2008).

### 1.6. Die Rolle des Meniskus bei Osteoarthrose

Einrisse in den Meniskus sind die häufigste Knieverletzung (Baker et al. 1985, Campbell et al. 2001). Die Menisken sind leicht verletzbar und schwer zu reparieren. Verletzungen des medialen und lateralen Meniskus sind häufig bei asymptomatischen Patienten und treten noch stärker gehäuft bei Patienten mit Osteoarthrose auf (Bhattacharyya et al. 2003).

Man unterscheidet bei Meniskusläsionen zwischen traumatisch bedingten und degenerativen Prozessen (Poehling et al. 1990, Noble et al. 1975). Traumatische Läsionen treten v.a. bei jüngeren Patienten im Rahmen von Sportverletzungen und Knie-traumata auf. Außerdem sind häufiger männliche Patienten betroffen (Dandy 1990). Bei den Läsionen kommt es meist zu longitudinalen Meniskuseinrissen. In seltenen Fällen können auch radiale Risse auftreten. Die Einrisse sind meist symptomatisch und werden häufig operativ versorgt. Damit verbunden ist ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Osteoarthrose im Kniegelenk (Englund et al. 2004). So entwickelt sich beispielsweise nach einem großen Kniegelenkstrauma innerhalb von 10 Jahren Osteoarthrose. Es konnte bereits bei Teenagern im Alter von 15 Jahren gezeigt werden, dass diese nach einem Trauma bis zu ihrem 25. bis 30. Lebensjahr eine Osteoarthrose entwickelt hatten (Roos et al. 1995).

Degenerative Läsionen können horizontale Einfurchungen, schräge bis komplexe Einrisse oder Meniskusmazerationen sein. Diese sind altersassoziiert und finden sich häufig bei beginnender oder vorbestehender Osteoarthrose (Poehling et al. 1990, Noble und Hamblen 1975, Noble 1977).

Makroskopisch präsentieren sich degenerative Läsionen nicht rupturierter Menisken als gelbliche undurchsichtige Areale, an welche myxoide Läsionen, perimeniskale Zysten oder Kalzifikationen angrenzen können. Mikroskopisch zeigen sich azelluläre eosinophile Degenerationen, welche oft mit Fissuren oder horizontalen Läsionen verbunden sind. Außerdem können Mukusansammlungen (myxoide Degenerationen) vorhanden sein. Die

Degenerationen können, von außen nicht sichtbar, auch im Inneren des Meniskus auftreten, wie die Studie von Ferrer-Roca und Vilalta (1980) zeigte. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass in mehr als 50% der Fälle Menisken, welche in der äußerlichen Makroskopie als normal eingestuft wurden, mikroskopische Degenerationen aufwiesen (Ferrer-Roca und Vilalta 1980).

Im Zuge des Alterungsprozesses ändert sich die Proteinverteilung im Meniskus. So verringert sich das Verhältnis von kollagenen zu nicht kollagenen Proteinen im Alter, was zu einer Abnahme der Druckbelastbarkeit des Meniskus führt (Ingman et al. 1974).

Mit Hilfe von MRT-Untersuchungen konnte an einer Gruppe von 40 Probanden (Durchschnittsalter 71 Jahre), gezeigt werden, dass in 80% der untersuchten Menisken Läsionen vorhanden waren (Raunest et al. 1994). Bei Patienten mit manifester Osteoarthrose waren es sogar 91 % (Bhattacharyya et al. 2003).

Weiterhin konnten epidemiologische Studien zeigen, dass Meniskusextrusionen und Risse signifikant mit der Inzidenz und Progression von Osteoarthrose im Kniegelenk korrelieren (Englund et al. 2009; Hunter et al. 2006). Außerdem konnten Langzeitstudien belegen, dass Patienten nach Menisektomie ein 14-fach erhöhtes Risiko aufweisen, radiologische Zeichen von Osteoarthrose zu entwickeln (McDermott und Amis 2006).

In Kniegelenken von Osteoarthrosepatienten sind die Menisken zumeist nicht normal konfiguriert. In vielen Fällen findet man Zerreißen, Mazerationen oder total zerstörte Menisken. Dies zeigt, dass eine starke Assoziation zwischen Funktionsstörungen im Kniegelenk und dem Zustand des Menisken besteht (Hunter et al. 2006, Englund et al. 2008). Der Zusammenhang zwischen Meniskusschäden und Osteoarthrose ist allerdings komplex. So können Läsionen aufgrund der eingeschränkten Meniskusfunktion im gesunden Knie zu Osteoarthrose führen. Allerdings kann auch Osteoarthrose im Kniegelenk zu Meniskusschäden führen, welche dann wiederum den Krankheitsprozess beschleunigen können (Roos et al. 1995).

Radiologische Untersuchungen, die an Patienten im mittleren und hohen Alter durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass Patienten mit Meniskusveränderungen, aber ohne Knorpelläsionen ein höheres Erkrankungsrisiko für Osteoarthrose aufweisen als Patienten

mit intakten Menisken. Dieses Ergebnis legt nahe, dass im MRT sichtbare Meniskusläsionen bereits vor Gelenkknorpelveränderungen auftreten (Roemer et al. 2009).

Stressbelastung und frühe proteolytische Degeneration der Matrix können die Spannungskräfte des Meniskus herabsetzen. Meniskusrisse können das Ergebnis davon sein, dass der komprimierte Meniskus nicht mehr ausreichend in der Lage ist, die Druckbelastung während der Gelenkbewegung zu übertragen. Sie können spontan oder im Zuge von kleinen Knie-traumata auftreten. Der Funktionsverlust kann die biomechanische Gelenkstabilität herabsetzen, was wiederum das Fortschreiten der Osteoarthritis beschleunigen kann (Englund et al. 2009).

### 1.7. Chondrogene Progenitorzellen und deren Rolle bei Reparaturprozessen im Meniskus

Für die Heilung von Meniskusdefekten wird angenommen, dass die Vaskularisierung eine entscheidende Rolle spielt. Bereits 1936 wurde vermutet, dass Meniskusrisse, die mit Blutgefäßen verbunden sind, spontan repariert werden können (King 1936). Meniskusrisse, die auf die innere Zone beschränkt sind, können dies nicht (Petrosini und Sherman 1996).

Allerdings konnte gezeigt werden, dass verschiedene Zonen im Meniskus ein unterschiedliches Heilungspotenzial auch unabhängig von der aktiven Blutversorgung aufweisen (Kobayashi et al. 2004). In der Studie wurden Stücke aus der vaskularisierten Zone des Meniskus in frische Defekte der avaskulären Region verpflanzt. Diese Stücke integrierten sich besser in das Gewebe als Transplantate aus der avaskulären Zone. Das Ergebnis legt nahe, dass die endogene Zellkomposition des Meniskus auch eine wichtige Rolle bei lokalen Heilungsprozessen spielt.

Reparaturprozesse von endogenem Gewebe werden wahrscheinlich von Progenitorzellen, welche im Gewebe liegen, gesteuert. Diese können in die Verletzungsstelle einwandern, dort proliferieren und neue Zellmatrix produzieren (Barry 2003).

Dies konnte auch für hyalinen Gelenkknorpel bei Osteoarthritis gezeigt werden. Dort wurden chondrogene Progenitorzellen (CPC) isoliert und charakterisiert. Mithilfe von FACS-Analysen und Differenzierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Zellen Stammzellcharakter aufwiesen (Koelling et al. 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass

die chondrogenen Progenitorzellen aus gesundem Knorpelgewebe in defektes Knorpelgewebe migrieren können und in der Lage sind, bestimmte Bestandteile der Knorpelmatrix zu produzieren. Deshalb vermutet man, dass diesen Zellen eine besondere Rolle in der Regeneration des Gelenkknorpels zukommen könnte (Koelling und Miosge 2009).

Auch im Faserknorpel des Meniskus vermutet man Progenitorzellen, welche an Reparaturprozessen beteiligt sind. So konnte für Meniskusverletzungen am Kaninchenmodell gezeigt werden, dass *alpha-smooth-muscle-actin-positive* Zellen der Superfizialschichtzellen in die Wunde migrieren. Kambic et al. (2000) äußerten die Vermutung, dass es sich bei diesen Zellen eventuell um spezialisierte Progenitorzellen handelt, welche die Wundheilung einleiten können.

Auch die Arbeit von Mauck et al. (2007) bekräftigt die Vermutung, dass es im Meniskus Progenitorzellen gibt: Aus den Menisken drei bis sechs Monate junger gesunder Rinderkälber konnten Fibrochondrozyten isoliert werden, welche sich in verschiedene Zelllinien differenzieren ließen. Sowohl die Fibrochondrozyten der Außen- als auch der Innenzone wiesen ein multipotentes Differenzierungspotenzial auf. Allerdings war das Differenzierungspotenzial der Zellen der Innenzone im Hinblick auf die osteogene Differenzierung im Vergleich zu denen der Außenzone beschränkt.

Da bis heute medikamentöse Therapien bei Osteoarthrose nur der Symptomkontrolle dienen und immer noch in vielen Fällen eine Endoprothese die Ultima Ratio bei langjähriger Osteoarthrose im Kniegelenk darstellt, rücken mesenchymale Stammzellen immer mehr in den Fokus für regenerative Therapieansätze.

## 2. Aufgabenstellung

Das Ziel der Arbeit war es, Meniskuszellen von Osteoarthrose-Patienten zu charakterisieren und sie auf ihren potenziellen Progenitorcharakter zu untersuchen.

Dazu wurden zuerst Zellen aus Meniskusgewebe gewonnen und mittels Zellkultur angezüchtet. Vorher wurde der Meniskus in drei Zonen (Innen-, Mittel- und Außenzone) unterteilt und diese miteinander im Folgenden verglichen:

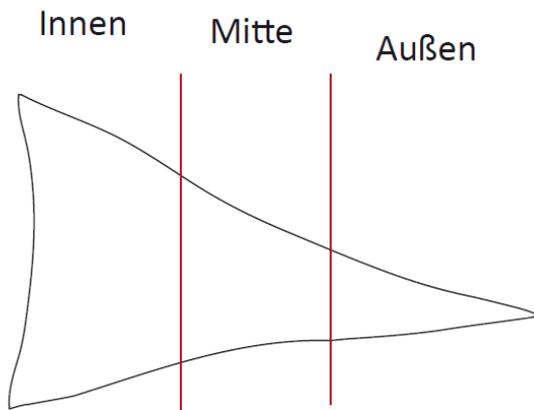


Abb. 6 Meniskuszonierung im schematischen Längsschnitt

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde beobachtet. Außerdem wurden die Form und das Aussehen der Meniskuszellen bestimmt.

Die Zellen wurden dann mit Hilfe von FACS-Analysen, qT-PCR und Immunfluoreszenz auf die mesenchymalen Stammzellmarker CD 13, 29, 44, 73, 90 und CD 105 sowie auf ihren Progenitorcharakter untersucht. Zur Negativkontrolle wurden die Zellen auf den Leukozytenmarker CD45 und auf den mit dem Knochenmarkstroma assoziierten Marker CD31 getestet.

Für die weiterführende Evaluierung des Progenitorpotenzials der Meniskuszellen wurden diese in osteoblastäre und adipogene Zellen differenziert. Die Zelldifferenzierung wurde mittels einer Histochemie nachgewiesen. Mittels Immunfluoreszenz wurden die differenzierten Zellen zusätzlich auf Osteocalcin für den Nachweis der osteoblastären Zelllinie bzw. LPL für die adipogene Zelllinie getestet.

Abschließend wurde zur genaueren Bestimmung des chondrogenen Charakters der Meniskuszellen auf Kollagen I und II sowie RUNX-2 und SOX-9 mittels Western Blot, qT-PCR, FACS-Analyse und Immunfluoreszenz untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material und Geräte

##### 3.1.1. Wichtige Geräte

Tab.1: verwendete Geräte.

Name	Hersteller
PCR Cycler	Mastercycler Realplex <sup>2</sup> S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zellbank	Herasafe
Röntgenkassette	Philips AMPLI 2 azuray
Filme	Amersham Hyperfilm™ECL
Biophotometer	Nanodrop (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Zellometer	Nexcelom Bioscience
Nassblotkammer	PeqLab Biotechnologie GmbH
Zentrifuge groß	Eppendorf Centrifuge 5810
Zentrifuge klein	Eppendorf Centrifuge 5415R
UV-Licht Mikroskop	Axiovert 40 CFL

##### 3.1.2. Puffer und Lösungen

Tab.2: verwendete Puffer und Lösungen.

Eingesetzt:	Name:	Zusammensetzung:
Western Blot	SDS-Probenpuffer	0,3M Tris 9 % SDS 22,5% Glycerin

		Spatelspitze Bromphenolblau
Western Blot	Polyacrylamid-Trenngel	1,4ml 1,5 M Trispuffer 55µl 10% SDS 5µl TEMED 2,78ml Acrylamid 1,62ml H <sub>2</sub> O 0,25ml 10% Ammonium peroxodisulfat
Western Blot	Polyacrylamid-Sammelgel	0,625ml 1,5 M Trispuffer 25µl 10% SDS 2,5µl TEMED 0,4ml Acrylamid 1,35ml H <sub>2</sub> O 0,1ml 10% Ammonium peroxodisulfat
Western Blot	Laufpuffer 5-fach	0,25 M Tris 30,3g 1,9M. Glycine 142,6g 10% SDS 50ml pH 8,7 ad 1000ml H <sub>2</sub> O
Western Blot	Laufpuffer 1-fach	Laufpuffer 5-fach 1:5 verdünnt
Western Blot	Transferpuffer	25 mM Tris 6.05g 192 mM Glycine 28.8g

		20% Methanol 400ml mit H <sub>2</sub> O auf 2000ml aufgefüllt pH 8,3
Western Blot	Coomassie-Brilliant-Blue-Färbelösung	0,1% Coomassie-Brilliant-Blue R 0,1g  50% Methanol 50ml  7% Essigsäure 7ml  ad auf 100ml mit H <sub>2</sub> O
Western Blot	Entfärber 1	50 % Methanol 50ml  7 % Essigsäure 7ml  ad auf 100ml mit H <sub>2</sub> O
Western Blot	Entfärber 2	90 % Methanol 90ml  10 % Essigsäure 10ml
Western Blot	Blocklösung	5% Milchpulver in TBS-T
Western Blot	TBS-T 10-fach	200 mM Tris 24,2g 1,5 M NaCl 87,6g  pH 7,4 mit H <sub>2</sub> O auf 1000ml aufgefüllt
Western Blot	TBS-T	TBS-T 100ml 10xTBS 0,05 % Tween 20 0,5g mit H <sub>2</sub> O auf 1000ml aufgefüllt
Osteoblastäre Differenzierung	Fixierlösung	25ml Citratlösung  65ml Aceton  8ml 37% Formaldehyd
Osteoblastäre Differenzierung	Alkalifarbstoffgemisch	1ml Natriumnitritlösung

		1ml FPB-Alkalilösung  45ml H <sub>2</sub> O  1ml Naphthol AS-BI Alkalilösung
--	--	---

### 3.1.3 Antikörper

Tab.3: verwendete Antikörper.

Eingesetzt:	Produktname:	Hersteller:
Immunfluoreszenz FACS	CD 13 R-PE conjugated mouse, anti- human monoclonal antibody	BD Bioscience (555394)
Immunfluoreszenz FACS	R-PE conjugated mouse anti- human CD 29 monoclonal antibody	BD Bioscience (555443)
Immunfluoreszenz FACS	PE anti-human CD 44	BioLegend ( 338808)
Immunfluoreszenz FACS	PE conjugated mouse anti -human CD 73	BD Bioscience (550257)
Immunfluoreszenz FACS	PE conjugated mouse anti -human CD 90	BioLegend (328109)
Immunfluoreszenz FACS	FITC anti-human CD 105	BioLegend (312403)
Immunfluoreszenz	Osteocalcin	Bio Trend (BT70-6015-15)
Immunfloreszenz	LPL	Acris (BM5512)
Western Blot	SOX-9	Santa Cruz (20095)

Immunfluoreszenz		
Western Blot Immunfluoreszenz	Mouse anti -RUNX2 monoclonal antibody	Millipore (10092)
Western Blot Immunfluoreszenz	Polyclonal antibody to collagen type I	Acris (R1038)

### 3.1.4. Medien

Tab.4: verwendete Zellkultur-Medien.

Eingesetzt:	Zusammensetzung:	Hersteller:
DMEM-Medium	DMEM + 20% FCS  + Penicilin/Streptomycin	Invitrogen
NH AdipoDiffMedium	NH AdipoDiffMedium + 0,5µM Hydrocortison+ 0,5µM Isobutylmethylxanthin + 60 µM Indomethazin	PromoCell (C-39011)
NH OsteoDiffMedium	NH OsetoDiffMedium +10nM Dexamethason+ 0,2mM Ascorbinsäure + 10mM beta-Glyzerolphosphat	PromoCell (C-39813)
Chondro-Medium	Chondro-Medium + 0,7 µM Dexamethason+ 50 µg/ml Ascorbate-2- Phosphat+ 40µg Proline+ 100µg/ml Sodiumpyruvat + 50mg/ml IST	PromoCell (C-39812)

### 3.1.5. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Tab.5: verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien.

<b>Produktname</b>	<b>Hersteller</b>
Syber-Green	Invitrogen, # 11733-046
PBS	Sigma (4417-100TAB)
DMEM	Gibcom (Art. 21885)
TEMED	Roth (Art. 2367.3)
Methanol	Roth (Art. 4627.2)
Ethanol	Fura AppliChem (EC-No: 2005786)
SDS	Fuka (71999)
Tris	Roth (Art. 5429.3)
Glyzine	Applichem (A3707,1000)
10% Ammonium peroxodisulfat	Roth (Art. At9592.2)
Acrylamid	Roth (Art. 3029.2)
Bromphenolblau	Roth (Art. T116.1)
10 % Essigsäure	ApliChem A0662,1000)
5% Milchpulver	Roth (Art. T145.2)
ETC™Plus System	GE Healthcare RPN2132
Kulturflaschen	Sarstedt
6-Well	Sarstedt
25% HCL	AppliChem (A0658,1000)
bovine Serumalbumin	Sigma (A9647-100G)
RLT-Puffer	Qiagen, (79216)

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, (63689)
RNA Shredder-Säule	Qiagen (1011711)
RNAeasy Mini Säule	Qiagen, (1011708)
RW1-Puffer	Qiagen, (1015763)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, ( 205313)
genomic DNA Wipeout Buffer	aus QuantiTect Reverse Transcription Kit
Reverse Transkriptase	aus QuantiTect Reverse Transcription Kit
Primer Mix	aus QuantiTect Reverse Transcription Kit
HCL	AppliChem (A0658,1000)
FCS	Gibso (10270)
2-Mercaptoethanol	Fluka (63689)
FACS-Röhrchen	Falcon (352058)
PageRuler™	#SM0661
Proteinleiter Westernblot	Fermentas (#SM0671)
Filme	Amersham Hyperfilm™ECL

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Gewinnung des Meniskusgewebes

Den Patienten mit Osteoarthrose, die ein künstliches Kniegelenk erhielten, wurde während der Knieoperation auch der defekte Meniskus entfernt. Nach der Entfernung wurde dieser direkt in einer 1:1 PBS/DMEM-Lösung aufgenommen. Vor der Operation wurden die Patienten über das Ziel der Studie aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung der Proben. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt (Antragsnummer: 25/12/10).

### 3.2.2. Zellisolation und Kultivierung der Meniskusvorläuferzellen (MPC)

Für die Isolation lebender Zellen wurde der Meniskus mit PBS gewaschen und in drei Zonen (Innen, Mitte, Außen) unterteilt und zerschnitten.

Das Meniskusgewebe der jeweiligen Zone wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in zirka 8-15mm<sup>3</sup> große Meniskusships kleingeschnitten. Dabei wurde vorher sorgsam darauf geachtet, dass Synovia und Fettgewebe großflächig vom Meniskusgewebe entfernt wurden. Danach wurden die Gewebestücke für 10 Tage in eine Kulturflasche gegeben und im DMEM-Medium (s.3.1.4) kultiviert. Anschließend wurden die Meniskusships aus der Kulturflasche entfernt und die ausgewanderten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80% weiter kultiviert. Es erfolgte mindestens eine Zellpassage der Zellen. Zweimal wöchentlich wurde das Kulturmedium gewechselt. Ferner erfolgte eine Aufteilung auf mehrere Kulturflaschen, bevor die Zellen für die Versuche herangezogen wurden.

### 3.2.3. Zellgewinnung

Nach mehrwöchiger Zellkultur (durchschnittlich drei Wochen) wurde für die Gewinnung der Zellen das Zellmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe von Trypsin-EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) aus der Kulturflasche gelöst. Die Zelllösung wurde daraufhin für 10min mit 300rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert. Mit dem Cellometer™ Auto T4 wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden je nach Fragestellung im Monolayer oder dreidimensionalen Alginatkugeln kultiviert bzw. als Zellpellet bei -80°C zur weiteren Analyse aufbewahrt.

## 3.3. Real-Time-PCR

### 3.3.1. Allgemeines zur quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) dient der Amplifikation bestimmter Nukleotidsequenzen eines zu untersuchenden Zielgens. Die Nukleotidsequenzen werden bei dem Verfahren kopiert. Anhand der Anzahl der Nukleotidkopien kann auf die Transkription und Expression des Zielgens in der Zelle zurückgeschlossen werden. Mithilfe einer

hitzestabilen Taq-Polymerase und dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (s.3.1.5.) wird die PCR durchgeführt.

In einem PCR-Zyklus laufen folgende Schritte ab:

1. Denaturierung: Die DNA wird auf 95°C erhitzt und trennt sich in ihre Einzelstränge.
2. Annealing: Es lagert sich ein Primer mit einer bestimmten Erkennungssequenz (s.3.3.5. Primertabelle) an den Einzelstrang an. Dies markiert den Startpunkt für die Amplifikation.

Für jeden Primer gibt es eine spezielle Annealingtemperatur, die zuvor ermittelt wurde (s.3.3.5. Primertabelle).

3. Synthetisierung: Der Komplementärstrang wird bei 72 °C durch die Taq-Polymerase synthetisiert. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green kann sich dann an die doppelsträngige DNA anlagern und dessen Fluoreszenz kann gemessen werden.

Die drei Schritte des Zyklus werden bis zu 40-mal wiederholt. Theoretisch verdoppelt sich bei jedem Zyklus die DNA. Durch die Einlagerung des SYBR-Green in die DNA kann die Amplifikation sichtbar gemacht und bestimmt werden. Die PCR-Maschine misst die Fluoreszenz und ist auf einen bestimmten Schwellenwert geeicht: Der Ct-Wert (= *cycle threshold*) gibt den Zyklus an, bei dem dieser Schwellenwert erreicht wird. Da die Fluoreszenz proportional zur DNA ist, kann über den Ct-Wert indirekt auf den DNA-Gehalt des Zielgens in der Zelle geschlossen werden. Das bedeutet, je mehr DNA-Moleküle, die das zu untersuchende Zielgen enthalten, in der Probe sind, desto eher wird der Ct-Wert erreicht. Ein kleiner Ct-Wert bedeutet also, dass viel DNA in der Probe vorhanden ist. Ein großer Ct-Wert deutet auf einen geringeren DNA-Gehalt der Probe hin.

Für den Vergleich verschiedener Ct-Werte muss außerdem der Ct-Wert eines *Housekeeping-Gens* ermittelt werden und diese Werte müssen ins Verhältnis gesetzt werden. Über diese ermittelte Verhältniszahl kann mithilfe der von Pfaffl beschriebenen Methode (Pfaffl 2001) die Untersuchungsprobe und eine Kontrollprobe wiederum ins Verhältnis gesetzt werden und der mRNA-Gehalt der Zellprobe kann bestimmt werden.

### 3.3.2. Vorbereitung für die quantitative Real-Time-PCR

Für die Durchführung der qRT-PCR musste zuerst RNA aus den zu untersuchenden Zellen isoliert werden (s.3.3.3). Anschließend musste diese in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Die Primer, die für die qRt-PCR verwendet wurden, wurden von uns selbst entworfen oder sind der Literatur entnommen. An jedem Primer wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, um dessen optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen. Außerdem wurde das PCR-Produkt durch eine Sequenzierung bestätigt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass jeder einzelne Primer bei optimalen Bedingungen eingesetzt werden kann und auch das gewünschte Zielgen amplifiziert.

### 3.3.3. RNA-Isolation

Die Meniskus-Progenitorzellen wurden in der Zellkultur vermehrt. Mit dem Cellometer™ Auto T4 wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen als Zellpellet eingefroren (s.3.2.3) oder direkt weiterverarbeitet. Ein Zellpellet enthielt ca. 500000 Zellen, aus denen, wie im Folgenden beschrieben, RNA isoliert wurde.

Die Zellen wurden in 350µL RLT-Puffer (s.3.1.5) und 3,5µL β-Mercaptoethanol (s.3.1.5) resuspendiert und anschließend für 2min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Suspension wurde dann auf der Qiagen Shredder-Säule (s. 3.1.5) für 2min mit 16000 UpM zentrifugiert. Dem Durchfluss wurde 350 µL 70% iger absoluter Ethanol zugegeben. Dieses Gemisch wurde auf eine RNAeasy Mini-Säule (s.3.1.5) pipettiert, kurz zentrifugiert und der Durchfluss dann verworfen. Durch die Bindung der RNA an eine Silikat-Membran lässt sich die RNA sehr einfach reinigen. Die folgenden Waschpuffer wurden mit aufsteigendem Elektrolytgehalt in die Säule pipettiert. Zuerst wurde mit 700 µl RW1-Puffer (Qiagen, # 1015763) und dann mit 500 µl RPE-Puffer (Qiagen, # 1018013) gewaschen. Beide Puffer wurden aufgetragen, zentrifugiert und der Durchfluss jeweils verworfen. Nach diesen Waschschrritten wurden die Säulen in ein neues Sammelröhrchen gegeben und diese 1min bei 14000 UpM trocken zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein Biopur 1,5ml-Eppendorfcup überführt. Direkt auf die Membran wurde 30 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O pipettiert und für 5min bei RT inkubiert. Dies führte zur Auflösung der Silicat-Membran und die RNA

lag dadurch wieder frei vor. Dann wurde 1min bei 14000 UpM zentrifugiert. Der dabei entstandene Durchfluss enthielt nun die isolierte RNA. Die Konzentration der RNA in der so gewonnenen RNA/H<sub>2</sub>O Lösung wurde dann mit einem Biophotometer (Nanodrop Eppendorf) spektroskopisch bestimmt. Hierbei wurden die RNA-Lösung bei einer Absorption von 260 und 280nm gemessen und deren RNA-Gehalt in ng/μl bestimmt.

### 3.3.4. cDNA-Synthese

Für die Analyse der Genexpression der einzelnen RNA-Proben wurde zuerst eine Transkription (RT) von RNA in cDNA mithilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (205313, Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Um potenzielle Verunreinigungen der Proben-RNA mit genomischer DNA zu entfernen, wurden die 200ng der Proben-RNA in 2μl Genomic-DNA-Wipeout-Buffer aufgenommen, auf 14μl aufgefüllt und für 2min bei 42°C inkubiert.

Anschließend wurde der RNA-Probe in 1μl RT-Primer-Mix und der 4μl Quantiscript RT-Buffer zugesetzt. Mithilfe einer reversen Transkriptase wurde die RNA für 15min bei 42°C inkubiert und in cDNA transkribiert. Es folgte eine Inkubation für 2min bei 95°C, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Danach wurde die cDNA-Lösung mit DEPC-Wasser auf die gewünschte Konzentration eingestellt und bei -20°C gelagert.

### 3.3.5. Primertabelle

Tab.6 zeigt die in der qRt-PCR verwendeten Primersequenzen mit deren Annealing-Temperaturen

Zielgen	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz	Annealing-Temperatur
Collagen I	Ttccccagccacaaagagtc	cgatcatcgcaaacacct	61°C
Collagen II	Ctcctggagcatctggagac	accacgatcacccttgactc	63°C
RUNX-2	Ttccagaccagcagcactc	cagcgtcaacaccatcatt	63°C
SOX-9	Caggctttgcgatttaagga	ccgttttaaggctcaagggtg	60°C

CD 13	Tggtcaatgaggctgacaag	ggacaaagtcccagaccaga	61,5°C
CD29	Ctgattggctggaggaatg	tttctggacaaggtgagca	56°C
CD 44	Gtgaagattggacagga	gtgtgtgggtaatgagagg	59°C
CD 73	Aaggaaggggaagaacag	gaagaaagaggacagagg	56°C
CD 105	Tgtctcacttcatgcctcc	gcgcaacaagctctttctt	56°C
HPRT-1	Tgctcgagatgtgatgaagg	Tcccctgtgactggtcatt	63°C

### 3.3.6. Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRt-PCR)

Die quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde nach den oben beschriebenen Vorbereitungsschritten mit der in 3.3.4. gewonnenen cDNA und den Primern (s.3.3.5) durchgeführt. Jede der cDNA-Proben wurde pro Versuchsdurchlauf in drei Wells pipettiert. Dieses Vorgehen wurde an drei unterschiedlichen Tagen wiederholt. Die Aufbereitung der Proben erfolgte wie im Protokoll dargestellt.

#### Protokoll

Zuerst wurde für den PCR-Versuch ein Mastermix für jeden Primer angesetzt.

Der verwendete Primer-PCR- Mix beinhaltet sowohl den entsprechenden Forward wie auch den Reverse-Primer in einer Konzentration von jeweils 10pmol/μl.

	Pro Well	Mastermix (10x)
Primer-PCR-Mix	2μl	20μl
50	5μl	50μl
RNAse-freies Wasser	2μl	20μl

Auf die 96-Well-Platte wurden pro Well 9µl des Mastermix mit dem entsprechenden Primer pipettiert und dazu jeweils 1µl der cDNA gegeben. Die Wells wurden mit einem Optical Flat Cap verschlossen und die Platte für 10sek zentrifugiert.

Nach folgendem Protokoll wurde die qRT-PCR mit dem Mastercycle Realplex S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt:

Initiale Denaturierung	3min	95°C	
Denaturierung	20sek	95°C	
Annealing	20sek	Primer-spezifisch	40 Zyklen
Verlängerung/Messpunkt	20sek	72°C	
Denaturierung	20sek	95°C	
Schmelzkurve	20sek	aufsteigend um je 0,2°C bis 95°C	
Ende			

Der gesamte PCR-Zyklus wurde 40mal wiederholt. Die Primerbindung konnte mithilfe der Schmelzkurve gezeigt werden.

Die Auswertung der Versuchsdaten geschah wie folgt:

### 3.3.7. Statistik

Die Ct-Werte der jeweiligen Probenriplets wurden miteinander verglichen. Es wurden die Mittelwerte berechnet und die Bestimmung der Standardabweichung ergab Abweichungen der Ct-Werte von weniger als 0,5 Ct-Punkten. Damit konnte sichergestellt werden, dass sowohl die Intratest- und als auch die Intertest-Variabilitätsbreite weniger als 1% betrug.

Für die Normalisierung der PCR-Daten wurden diese mit einem Housekeeping-Gen nach der Pfaffl-Methode (Pfaffl 2001) verglichen. Als *Housekeeping-Gen* für die Meniskuszellen wurde HPRT-1 (Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1) verwendet und dessen Ct-Werte wurden bestimmt. Mithilfe einer Standardverdünnungsreihe konnte die Effizienz der Primer exemplarisch für Kollagen 1 bestimmt werden. Die Effizienz betrug 1,87. Die Ct-Werte des *Housekeeping-Gens* und die Primereffizienz ( $E=1,87$ ) wurden für die Berechnung nach Pfaffl verwendet (Pfaffl 2001).

Aus dem Vergleich der Ct-Werte von Meniskusprogenitorzellen und chondrogenen Vorläuferzellen (CPC), die als Kontrolle dienten, konnte die Ratio berechnet werden. Diese gibt den Faktor im Verhältnis zu der als 1 gesetzten Kontrolle an. Durch den Vergleich konnten Unterschiede zwischen der Probe und Kontrolle in Bezug auf Transkription und Syntheseleistung bestimmt werden.

### 3.4. Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz

#### 3.4.1. Allgemeines zum Immunfluoreszenzverfahren an adhärennten Zellen

Durch die lichtmikroskopische Immunfluoreszenz können an adhärennten Zellen Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Nach Antikörperbindung an das Zielprotein wird der Antikörper von einem sekundären Antikörper gebunden. Dieser ist fluoreszenzgekoppelt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurde Fluorescein Isothicyanate (FITC) oder Phycoerythrin (PE) verwendet. Unter UV-Licht werden diese Fluoreszenzfarbstoffe kontinuierlich angeregt und geben konstant Lumineszenz ab. Diese kann mithilfe eines UV-Licht-Mikroskops sichtbar gemacht und fotografiert werden.

Zur Kontrolle der Methode wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich in die kleine Furche der DNA ein und markiert somit den Zellkern. Über den Vergleich bzw. die Bilderüberlagerung der mit DAPI gefärbten Zellkerne und den fluoreszenzmarkierten Proteinen kann auf die Proteinverteilung der Zellen rückgeschlossen werden.

#### 3.4.2. Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz

Für den Versuch werden Meniskuszellen auf ein Glasdeckplättchen in einem 6-Well ausgesät. Vorher wurden die Deckplättchen mit abs. Ethanol sterilisiert. Pro Well wurden 10000 Zellen gegeben und in 2ml DMEM-Medium aufgenommen. Die Zellen hefteten sich in den darauf folgenden Tagen an die Glasoberfläche. Anschließend konnte der Versuch durchgeführt werden.

### Versuchsprotokoll:

Zu Beginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 70% Ethanol für 5min fixiert. Dann wurde erneut mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde mit dem Primärantikörper (s. 3.1.3 AK-Liste), der im Verhältnis 1:50 in 250 µl PBS gemischt wurde, für 60min bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für 20min mit dem Sekundärantikörper (s. 3.1.3 AK-Liste), der im Verhältnis 1:100 mit in 250µl PBS verdünnt wurde, inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und die Glasdeckplättchen mit den Zellen vorsichtig aus der 6 Well-Platte gelöst. Dieses wurde dann auf einen Glasobjektträger gegeben. Auf den Objektträger wurde zuvor 100µl VECTASHIELD®Hard-Set™ Mounting Medium gegeben. Das Mounting Medium verhindert zum einen den schnellen Fluoreszenzverlust, es enthält aber auch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI für die Verfärbung der Zellkerne. Im Dunkeln wurden die Deckplättchen für eine Stunde ausgehärtet. Unter ultraviolettem Licht konnte anschließend mit dem Mikroskop die Lumineszenz der Zellen sichtbar gemacht und fotografiert werden.

### 3.5. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird zur Fluoreszenz-aktivierten Zellanalyse (FACS) verwendet. Sie kann zum Nachweis spezifischer Zelloberflächenantigene und intrazellulärer Antigene mit Hilfe von Antikörpern eingesetzt werden.

Dafür wurden die Meniskuszellen in der Zellkultur kultiviert und nach ausreichender Konfluenz mithilfe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt.

Für die Analyse von Oberflächenmarkern wurden je  $10^5$  Zellen pro Aliquot zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100µl PBS resuspendiert und mit einem unmarkierten oder PE- oder FITC-markierten Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 für 30min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Bei ungekoppelten Antikörpern erfolgte eine zweite Inkubation für 30min mit einem sekundären FITC- oder PE-gekoppelten Antikörper, der im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde. Nach dem

Waschen wurde das Pellet in 500µl PBS gelöst und in das FACS-Röhrchen für die anschließende Durchflusszytometrie pipettiert.

Für die Analyse intrazellulärer und intranukleärer Antigene wurde zusätzlich zur Antikörperinkubation auch das Fix & Perm<sup>®</sup>-Kit verwendet. Zuerst wurden die Zellpellets in Zellsuspensionen mit 100µl der Fixierlösung (Reagenz A) für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte ein Waschschriff mit PBS und das Zellpellet wurde zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100µl der 1:50 verdünnten Antikörperlösung resuspendiert und 100µl der Permeabilitätslösung (Reagenz B) zugesetzt. Der Versuchsansatz wurde für 20min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Die nicht direkt Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper mussten noch einmal für 20min mit einem passenden markierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert werden.

Die antikörpermarkierten Zellen wurden danach mit dem FACS-Scanner (Becton Dickinson, Mountain View, CA) analysiert. Für die Analyse wurden mindestens  $10^4$  Zellen gescannt. Die Erhebung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der WINMDiv2.9 Software. Mit Hilfe der Cell Quest Pro 2000 Software wurden sie analysiert und grafisch dargestellt.

### 3.6. Western Blot

#### 3.6.1. Allgemeines zum Western Blot-Verfahren

Der Western Blot ist ein Nachweisverfahren für Proteine mittels einer Immunreaktion, die über Antikörpern vermittelt wird. Durch eine Elektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine aufgetrennt und anschließend durch einen Nassblot auf eine PVDF-Membran transferiert. Auf der PVDF-Membran können die Proteine dann mit Antikörpern und einem Detektionssystem auf einem Film sichtbar gemacht. Die Elektrophorese trennt die Proteine nach ihrer Größe auf. Vorher wird die Ladung der Aminosäuren durch das SDS blockiert. Daher entscheidet allein die Porengröße des Elektrophorese-Gels im Verhältnis zur Proteingröße über die mögliche Laufstrecke des Proteins im Gel. Aus dem Gel werden die Proteine mittels Ladungsgradienten auf eine PVDF-Membran übertragen. Auf der Membran können dann mittels Immunreaktion, die über Antikörperbindung funktioniert, die Proteine

nachgewiesen werden. Der Antikörper bindet an das Zielprotein und anschließend wird dieser mit einem zweiten Antikörper konjugiert. Dieser kann dann mit einem Detektionssystem sichtbar gemacht werden. Parallel zur Untersuchungsprobe wird ebenfalls eine Proteinleiter mit auf das Gel aufgetragen. Die Leiter ist auf bestimmte Proteingrößen geeicht und dient der Abschätzung der Proteingröße des markierten Proteins.

### 3.6.2. Durchführung des Western Blot

Für den Western Blot wurden die Zellpellets wie in 3.2.3 beschrieben aufbereitet. Nach dem Auftauen wurden diese in SDS-Probenpuffer (s. 3.1.2. Puffer und Lösungen) suspendiert und für 5min bei 95°C erhitzt. Pro Ansatz wurden antikörperabhängig 25 oder 30µl der Probenlösung aufgetragen.

Für die Elektrophorese wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu untersuchenden Proteins ein 8% oder 10% Polyacrylamid-Trenngel (s. 3.1.2. Puffer und Lösungen) gegossen, zwischen 2 Glasplatten mit Gummidichtung (Eigenbau der Labortechnik der Universitätsklinik Göttingen) gegeben und mit 100% abs. Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde der Ethanol abgeschüttet und das Sammelgel (s. Puffer und Lösungen) über das Trenngel gegossen. Mittels eines Kamms wurden die Taschen freigehalten. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisierte wurde der Kamm entfernt und das SDS-Gel konnte für Elektrophorese verwendet werden. Das fertige Gel wurde in eine mit Lauffpuffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (Eigenbau der Labortechnik der Universitätsklinik Göttingen) eingespannt. Die Proben und eine Proteinleiter (s. 3.1.5. Verbrauchsmittel und Reagenzien) wurden in die Geltaschen aufgetragen. Die Proteine wurden bei 20-25mA aufgetrennt. Sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

Anschließend erfolgte der Nassblot, bei dem die Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran transferiert wurden. Dazu wurde das Gel mit den Proteinen in eine Blotkammer (s. Geräte 3.1.1.), die von Transferpuffer umgeben war (s. Puffer und Lösungen 3.1.2.), gegeben und für 90min bei 350mA auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurde die PCDF-Membran zur Darstellung der Proteinbanden mit Coomassie-Brilliant-Blue-R (s. Puffer und Lösungen 3.1.2) gefärbt und die Membran wurde zur Dokumentation eingescannt. Nach dem Scan wurde die Membran mithilfe von Entfärber 1 und Entfärber 2 (s. Puffer und

Lösungen 3.1.2) behandelt und zweimal für 2min mit TBS-T (s. 3.1.2 Puffer und Lösungen) gewaschen. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocklösung (s. 3.1.2 Puffer und Lösungen) geblockt. Die Milchproteine der Blocklösung binden an unspezifische Proteinbindungsstellen. Dadurch wird eine unspezifische Proteinbindung durch den Antikörper verhindert. Nach dem Blocken wurden die Antikörper für Kollagen 1, RunX-2 und SOX-9 (s. 3.1.3 Antikörperliste) in der Blocklösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt und 4ml auf die PVDF- Membran gegeben. Der Versuchsansatz wurde bei 4°C über Nacht auf einer Wippe inkubiert. Dann wurde fünfmal mit TBS-T gewaschen, und danach für 1,5-2h mit einem Sekundärantikörper inkubiert: Für RunX-2 wurde der sekundäre Anti-Maus Antikörper (s. 3.1.3 Antikörperliste) in Blocklösung mit einer Konzentration von 1:40000 angesetzt. Für SOX-9 und Collagen 1 wurde der sekundäre Anti-Rabbit-Antikörper (s. 3.1.3 Antikörperliste) mit einer Konzentration von 1:100000 angesetzt. Bei Raumtemperatur wurde der sekundäre Antikörper für mindestens 2h auf der PVDF-Membran inkubiert. In der Zeit bindet der sekundäre Antikörper an den primären. Im Anschluss daran wurde erneut fünfmal mit TBS-T gewaschen, danach erfolgte die Detektion mit dem ECL™ Plus System (s. 3.1.5 verwendete Materialien). Dafür wurde Reagenz A und B des ECL™ Plus Systems im Verhältnis 50:1 gemischt, auf die Membran aufgetragen und für 5min und inkubiert. Die in der ECL™ Plus-Mischung enthaltenen Substrate wurden durch das an den sekundären Antikörper konjugierte Enzym oxidiert. Die daraus entstandenen Produkte lumineszieren. Das Lumineszenzprodukt färbt so den in der Röntgenfilmkassette (s. 3.1.1 Geräte) auf die Membran aufgelegten Film (s. 3.1.5. verwendete Materialien). Der Film wurde antikörperabhängig in der Röntgenfilmkassette für 2 -30min belichtet und in der Dunkelkammer entwickelt. Anhand der Proteinleiter konnte auf die Größe des nachgewiesenen Proteins geschlossen werden. Wurde die Proteinbande an der für den Antikörper passenden Stelle identifiziert, so konnte das Vorhandensein des Proteins in der Zelle bestätigt werden.

### 3.7. Zelldifferenzierung

Für die weitere Stammzellcharakterisierung der Meniskuszellen wurden diese auf multipotente Differenzierbarkeit untersucht. Die Zellen wurden adipogen und osteoblastär differenziert.

### 3.7.1. Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden je 5000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden in NH AdipoDiffMedium aufgenommen und für drei Wochen kultiviert. Das Differenzierungsmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Nach Ablauf der Differenzierung wurden die Zellen auf typische Adipozytencharakteristika untersucht. Mittels Oil-Red-O Färbung konnten Fettvakuolen in den Zellen nachgewiesen werden.

Dafür wurde das Medium aus dem Well abgesaugt und zweimal mit je 1ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und für 15min bei 37°C inkubiert. Erneut wurden die Zellen zweimal mit 1ml PBS gewaschen. Pro Well wurden die Zellen dann mit je 1ml Oil-Red-O (Sigma Aldrich N6264-50ML) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und gefärbt. Die Farblösung wurde dann abgesaugt und viermal wurde mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit 0,5ml PBS bedeckt und die Fettvakuolen der Zellen konnten unter dem Mikroskop fotografiert werden.

### 3.7.2. Osteoblastäre Differenzierung

Für die osteoblastäre Differenzierung wurden ebenfalls je 5000 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden in NH OsetoDiffMedium (Miltenyi Biotec) mit 10nM Dexamethason, 0,2mM Ascorbinsäure und 10mM beta-Glyzerolphosphat aufgenommen und für 7 bis 10 Tage unter Mikroskopkontrolle inkubiert.

Mithilfe des alkalische Phosphatase-Kit (Sigma-Aldrich 86C-1KT) konnte über eine enzymatisch vermittelte Farbreaktion die Differenzierung der Zellen zu Osteoblasten nachgewiesen werden. Dafür wurden die Zellen zuerst mittels einer Fixierlösung (s.3.1.2 Puffer und Lösungen) für 30sek fixiert. Pro Well wurde 1ml Fixierlösung verwendet. Die fixierten Zellen wurden für 45sek mit destilliertem Wasser gespült und im Anschluss für 15min mit 22°C warmen Alkalifarbstoffgemisch (s.3.1.2 Puffer und Lösungen) gefärbt. Pro Well wurden 1ml von dem Farbstoffgemisch eingesetzt. Danach wurde erneut für 2min mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Zellen für 2min mit 1ml pro Well mit der Neutral Red Lösung (Sigma-Aldrich N6264-50ML) gefärbt. Die Zellen wurden dann nochmals gespült, mit 0,5ml Wasser bedeckt und mikroskopiert. Die durch die alkalische Phosphatase katalysierte Blaufärbung der zu Osteoblasten differenzierten Zellen wurde unter dem Mikroskop fotografiert.

## 4. Ergebnisse

In der Arbeit wurden Meniskuszellen aus der Innen-, Mittel- und Außenzone von drei Patienten mit Osteoarthrose miteinander verglichen. Die Zellen wurden in die Zellkultur aufgenommen und dort unter gleichen Bedingungen kultiviert und anschließend auf ihren Progenitorcharakter untersucht.

Neben der Untersuchung des Progenitorcharakters auf m-RNA und Proteinebene wurden die Zellen unter standardisierten Bedingungen in adipogene und osteoblastäre Richtung differenziert.

Die Versuche lieferten folgende Ergebnisse:

### 4.1. Zellmigration und Wachstum

Nach der Aufteilung und Zerkleinerung des Meniskusgewebes wurden die Meniskus chips für 10 Tage in die Zellkultur gegeben (s.3.2.2). Für jede der drei Zonen zeigte sich, dass Zellen aus den Meniskus chips migrierten. In den Abb. 7 und 8 sind die Zellen der Innen- und Außenzone in einer Vergrößerung von 5:1 fotografiert.

Die migrierten Zellen vermehrten sich schnell und lagerten sich zu Gruppen/ Kolonien zusammen. Die Populationsverdoppelung dauerte durchschnittlich sechs bis zehn Tage.

In der Zellkultur weisen die Meniskuszellen einen ovalen Zelleib mit einzelnen länglichen Zellfortsätzen auf. In ihrem Aussehen ähneln sie Fibroblasten.

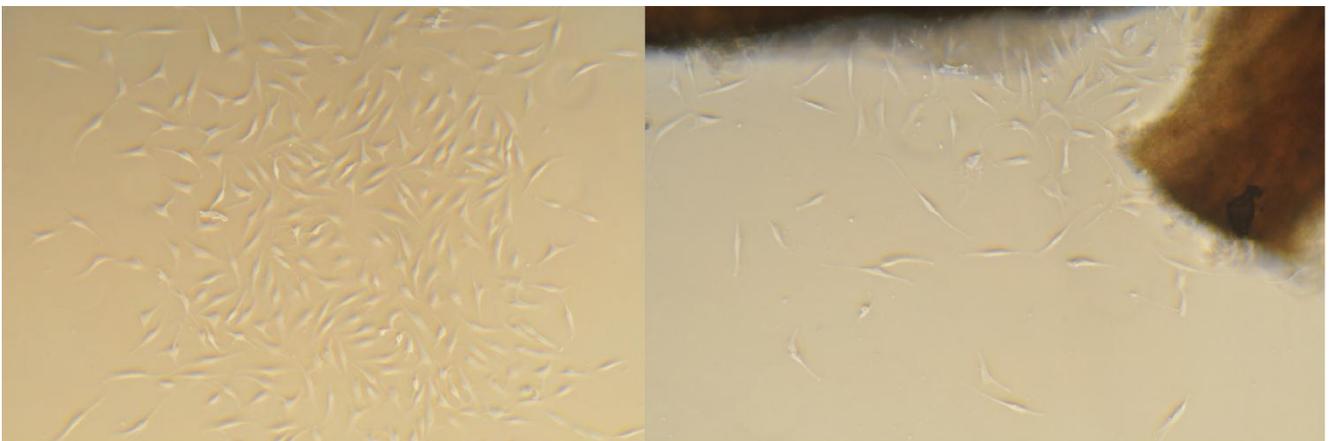


Abb.7 zeigt auf dem linken Bild die sich zu Kolonien zusammenlagernden Meniskuszellen der Außenzone. Das rechte Bild zeigt die direkt aus dem Meniskusgewebe migrierenden Zellen.

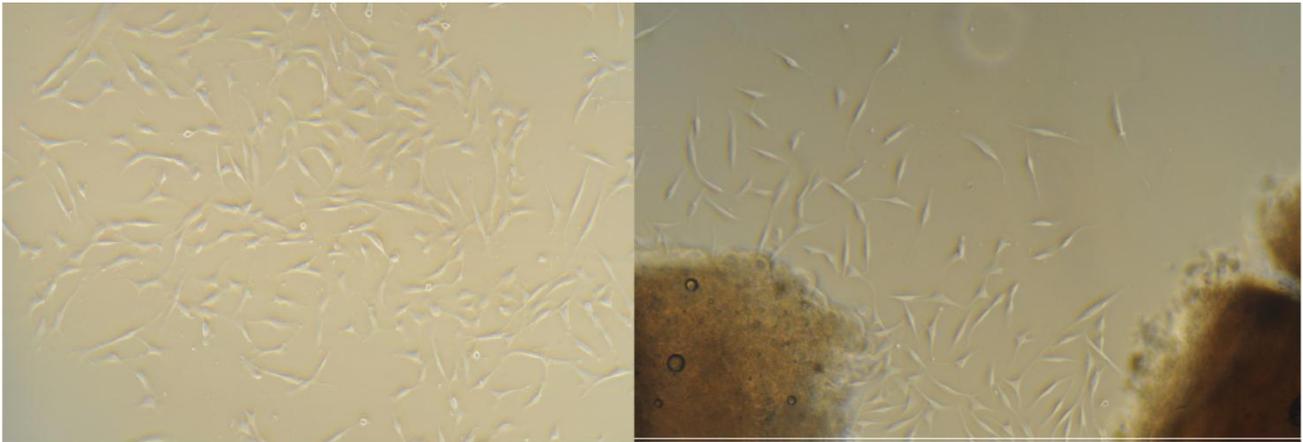


Abb.8 zeigt auf dem linken Bild die Zusammenlagerung der Meniskuszellen der Innenzone. Das rechte Bild zeigt Meniskuszellen, welche direkt aus dem Gewebe migrieren.

## 4.2. Untersuchungen des Progenitorcharakters der Meniskuszellen

Für die Untersuchung des Progenitorcharakters wurden die Zellen mittels FACS-Analysen und Immunfluoreszenz auf ihre Oberflächenmoleküle hin untersucht. Getestet wurden die Zellen auf die mesenchymalen Stammzellmarker CD 13, 29, 44, 73, 90 und CD 105. Als Negativkontrolle dienten die hämatopoetischen Markermoleküle CD 31 und 45.

Zur weiteren Genanalyse wurden die Zellen auch mittels qRt-PCR für die Stammzellmarker getestet.

### 4.2.1. FACS-Analysen der mesenchymalen Stammzellmarker

Zuerst wurden die kultivierten Zellen geerntet und anschließend mittels FACS-Analyse (s.3.5.) je  $10^5$  Zellen auf den entsprechenden Oberflächenmarker hin untersucht. Es wurden drei Patienten untersucht und jeweils die einzelnen Zonen miteinander verglichen.

Es zeigte sich, dass unabhängig von der jeweiligen Zone bei allen Patienten die Meniskuszellen positiv für die mesenchymalen Stammzellmarker CD 13, 29, 44, 73, 90 und CD 105 waren. Es sollen hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Ergebnisse der Innen- und Außenzone dargestellt werden:

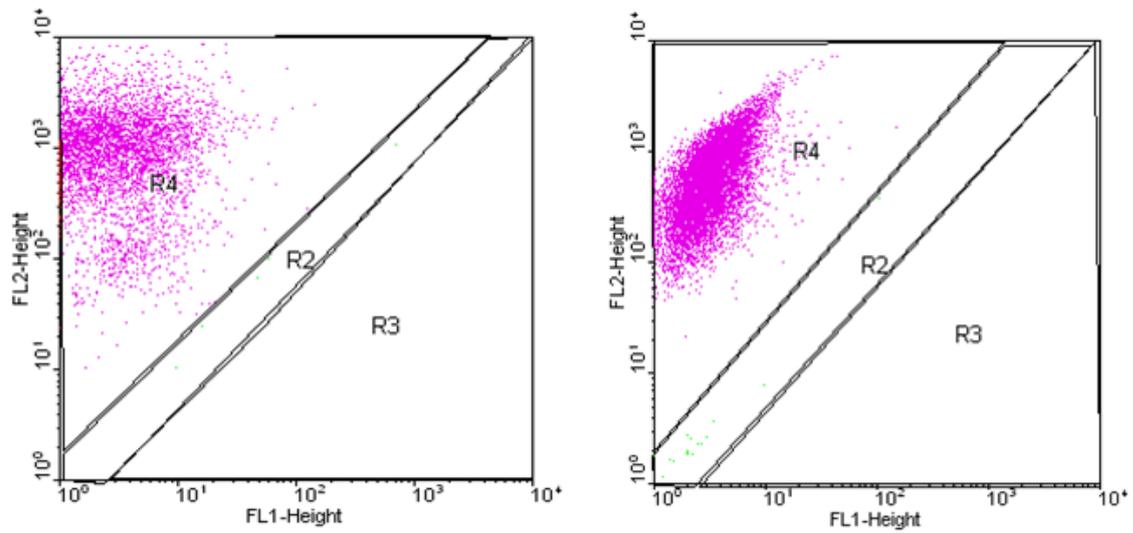


Abb. 9 FACS-Analyse von CD 13 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

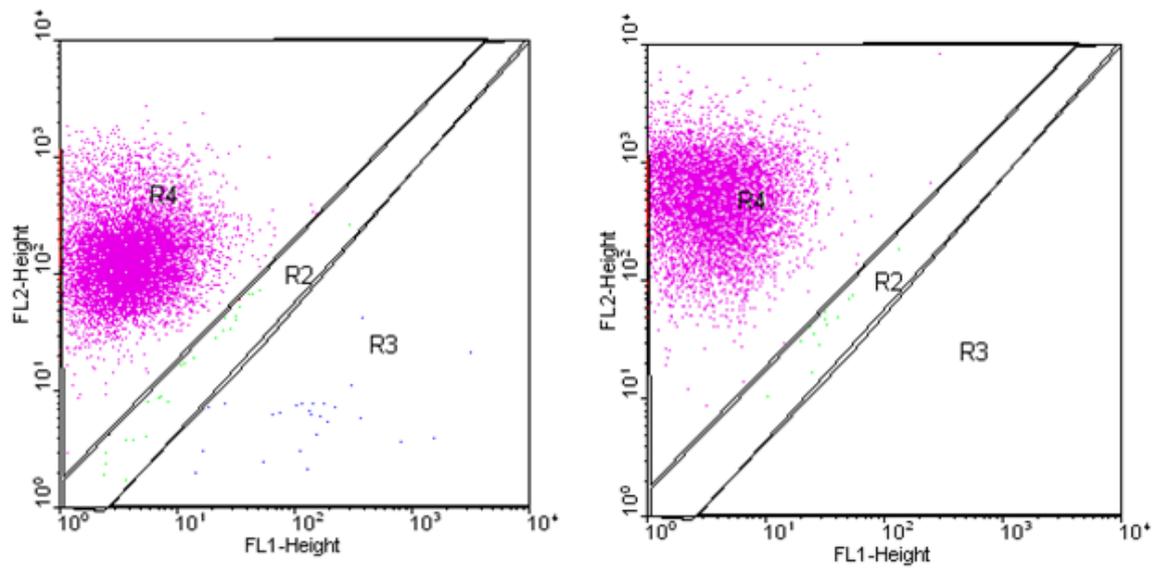


Abb. 10 FACS-Analyse von CD 29 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

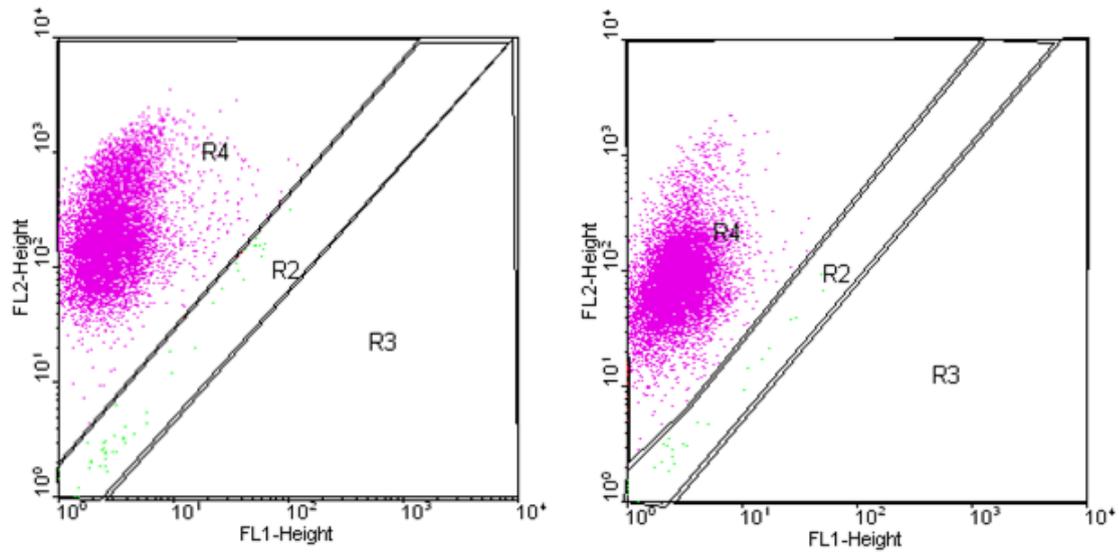


Abb. 11 FACS-Analyse von CD 44 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

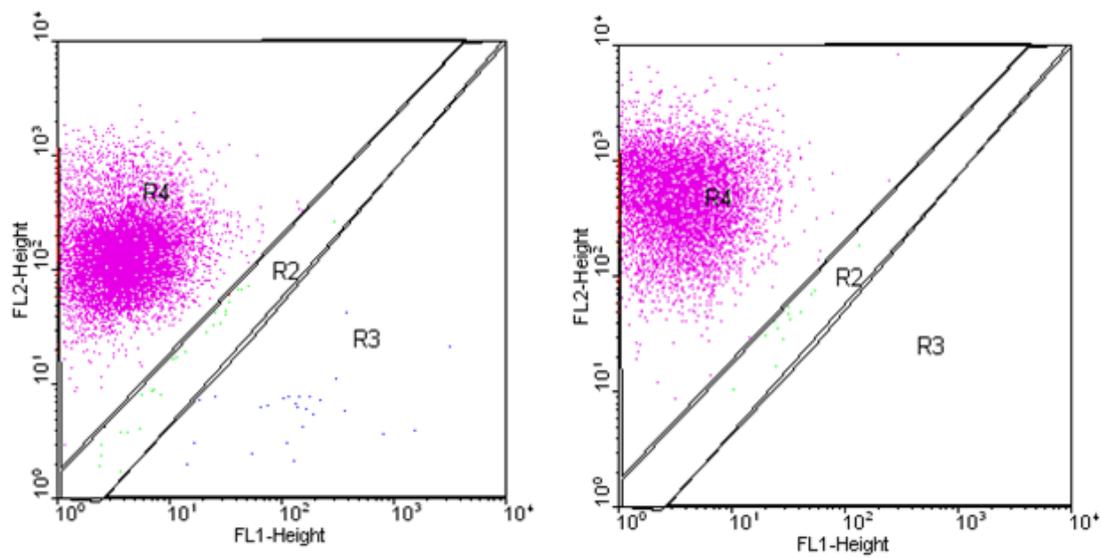


Abb. 13 FACS-Analyse von CD 73 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

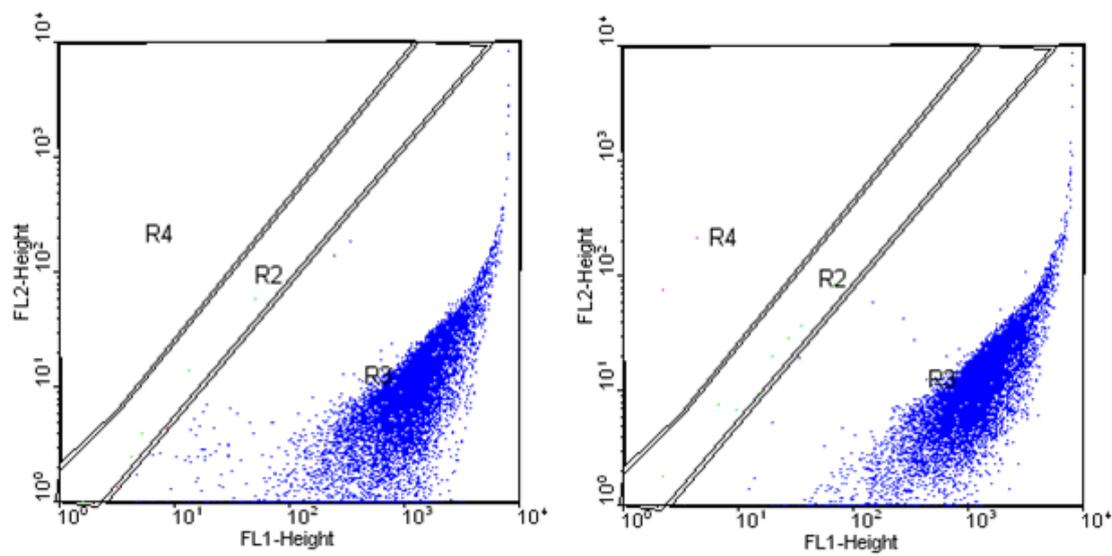


Abb. 12 FACS-Analyse von CD 90 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone rechts)

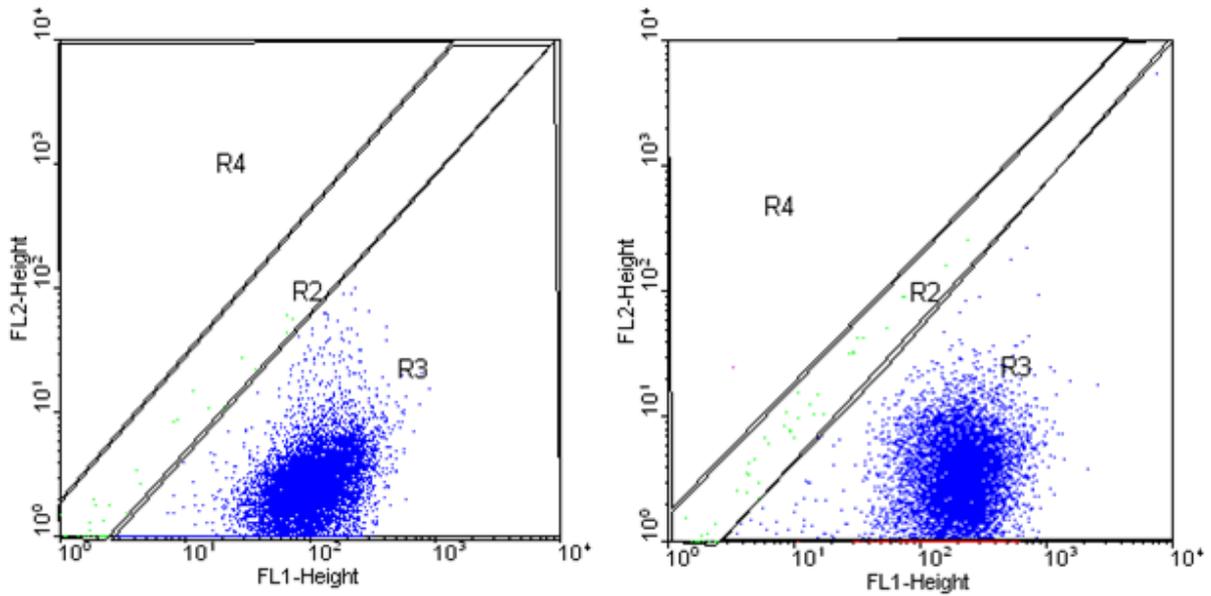


Abb. 14 FACS-Analyse von CD 105 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

Die Abb.15 und 16 zeigen die Ergebnisse der FACS-Analyse für CD 31 und CD45. Für die beiden hämatopoetischen Markermoleküle stellte sich heraus, dass die Meniskuszellen für diese negativ waren:

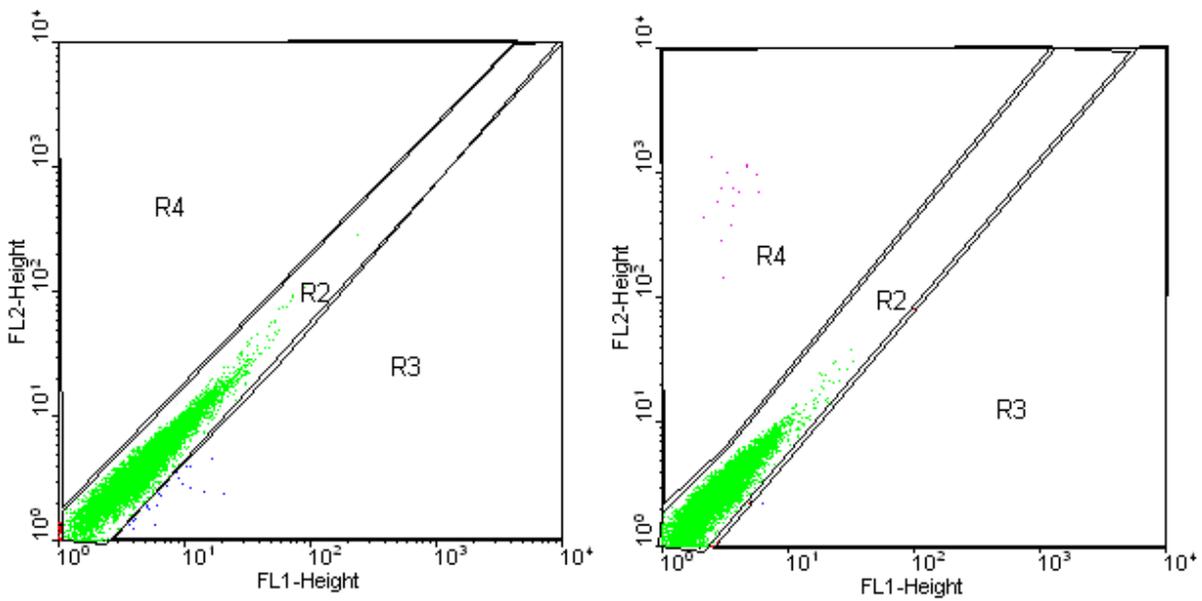


Abb. 15 FACS-Analyse von CD 31 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

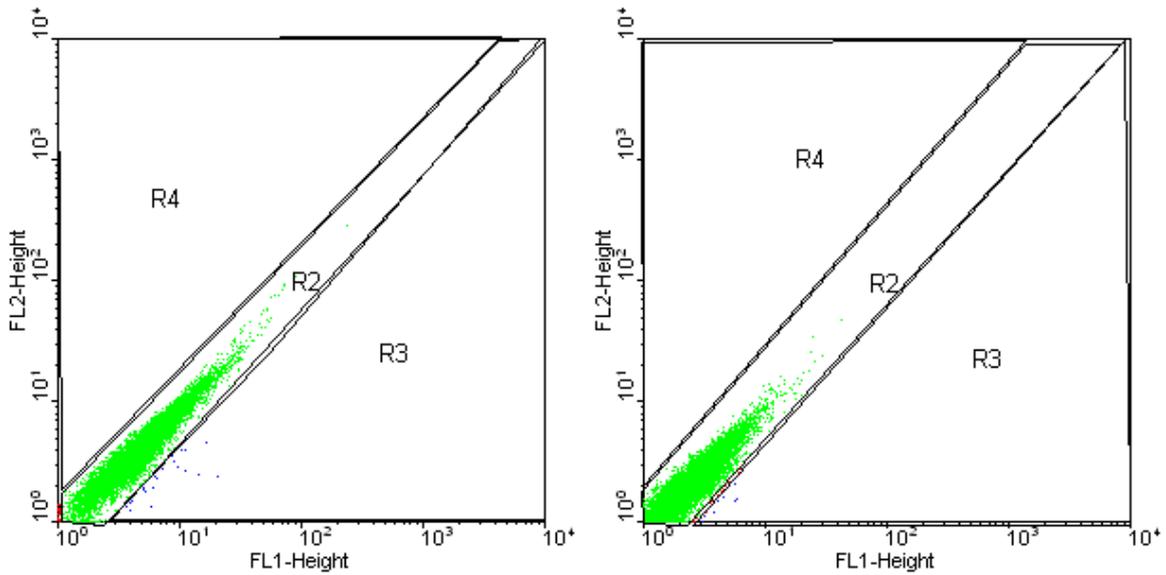


Abb. 16 FACS-Analyse von CD 45 der Meniskus Innenzone (links) und Außenzone (rechts)

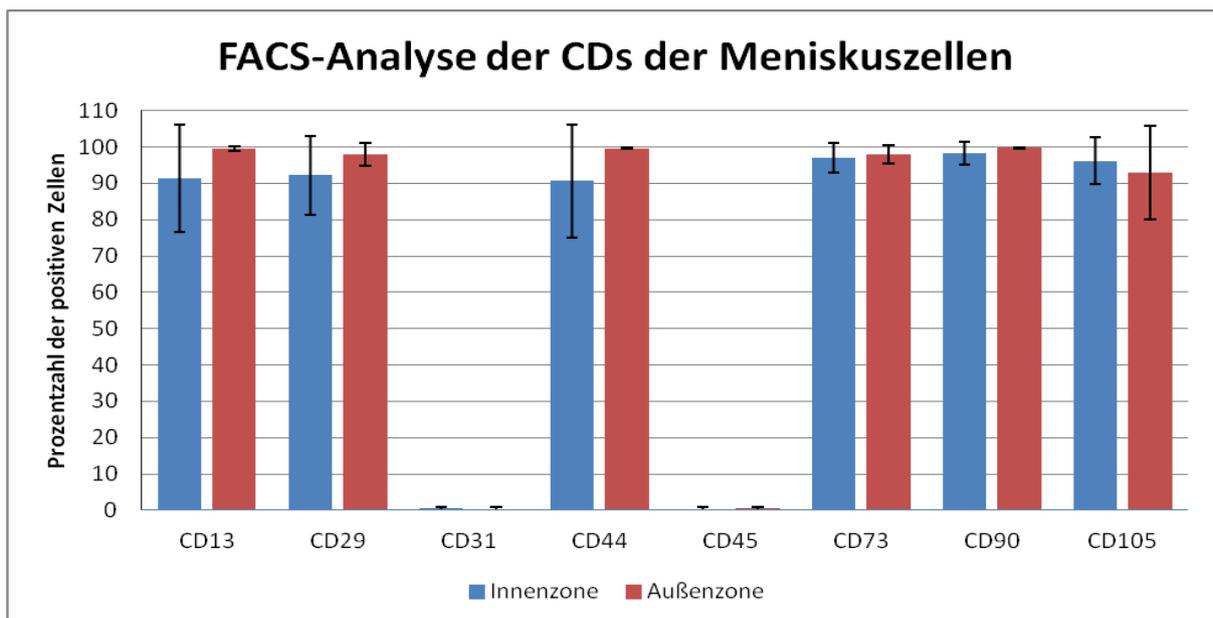


Abb. 17 FACS-Analyse der Oberflächenmoleküle im Vergleich von Meniskus Innen- und Außenzone als Mittelwert mit Standardabweichung von drei unterschiedlichen Patienten.

Abb.17 zeigt eine Übersicht der FACS-Analysen, mit Angabe der Prozentzahl der für den Untersuchungsmarker positiven Meniskuszellen. Verglichen wurden die FACS-Ergebnisse der Innen- und Außenzone. Es wurden je drei Patienten untersucht und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung grafisch dargestellt.

Dabei zeigten die FACS-Ergebnisse im Mittel folgende Ergebnisse: CD 13 Innenzone 91,32% +/-14,69%, CD 13 Außenzone 99,56% +/-0,57%; CD 29 Innenzone 92,23% +/- 10,87%, CD 29 Außenzone 97,96% +/- 3,12%; CD 31 Innenzone 0,43% +/-0,37, CD31 Außenzone 0,38% +/- 0,48%; CD44 Innenzone 90,62% +/-15,66%, CD44 Außenzone 99,64% +/-0,12%; CD45 Innenzone 0,39% +/-0,38%, CD45 Außenzone 0,44% +/-0,49%; CD 73 Innenzone 96,91% +/- 3,97%, CD73 Außenzone 98,06% +/-2,60%; CD90 Innenzone 98,32% +/-3,02%, CD90 Außenzone 99,75% +/-0,13%; CD105 Innenzone 96,21% +/- 6,38%, CD105 Außenzone 92,96% +/-12,93%.

#### 4.2.2. Immunfluoreszenz-Nachweis der mesenchymalen Stammzellmarker

Für die Immunfluoreszenz wurden je 10000 Zellen auf ein Glasplättchen gegeben, die dann darauf festwuchsen und anschließend mittels Antikörperreaktion auf die mesenchymalen Stammzellmarker CD 29, CD 44, CD 73, CD 90 und CD 105 getestet wurden (s. 3.4.2.).

Die Bilder sind mit Vergrößerungen von 1:20 aufgenommen worden und zeigen das Immunfluoreszenzbild der Zellen mit dem darunter liegendem DAPI-Kontrollbild. Die DAPI-Kontrollbilder zeigen die markierten Zellkerne der im Ausschnitt liegenden Meniskuszellen. Der Vergleich der Zellkerne mit dem jeweiligen Fluoreszenzbild verdeutlicht, dass jedem in der DAPI-Färbung markierten Zellkern eine durch den entsprechenden Untersuchungsantikörper markierte fluoreszierende Zelle zugeordnet werden kann. Durch die Überlagerung der beiden Bilder wird dies veranschaulicht.

Verglichen wurden die Proben der Innen- und Außenzone von drei Patienten. Die Abb. 18-22 veranschaulichen, dass sowohl die Meniskuszellen der Innen-als auch Außenzone für die untersuchten mesenchymalen Stammzellmarker positiv waren.

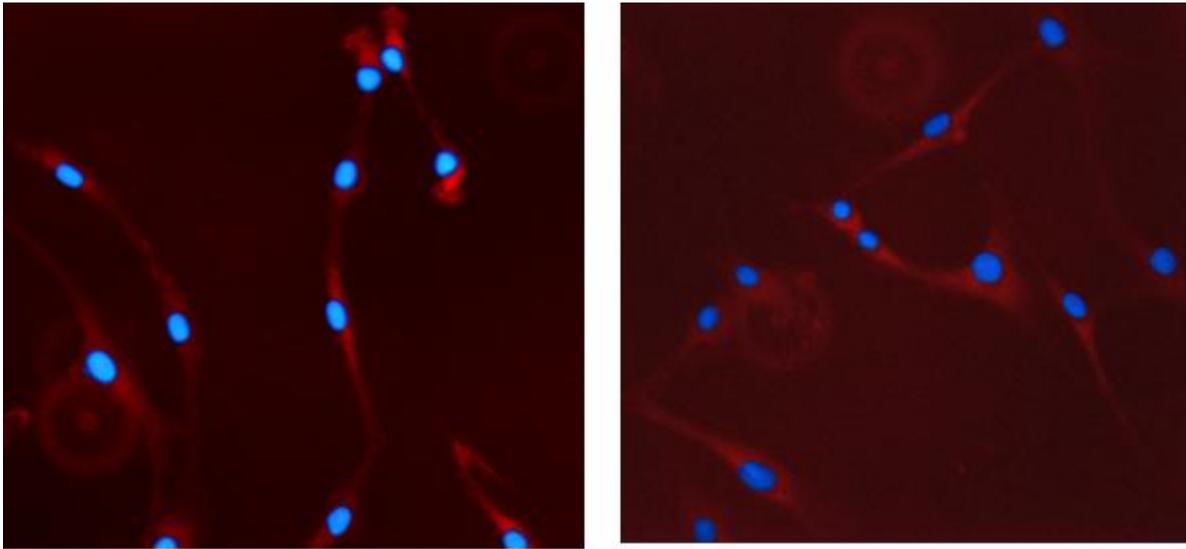


Abb. 18 CD29 PE Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

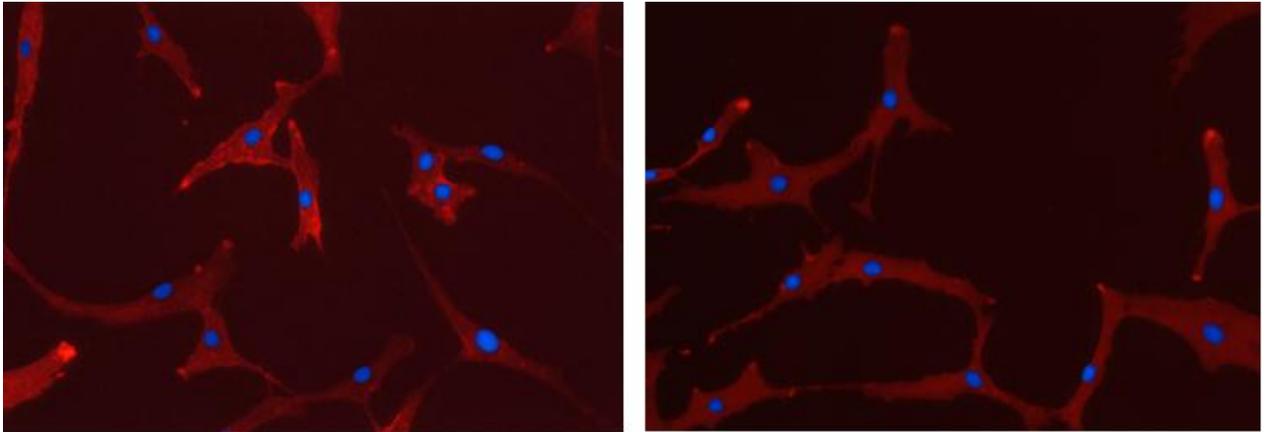


Abb. 19 CD44 PE Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

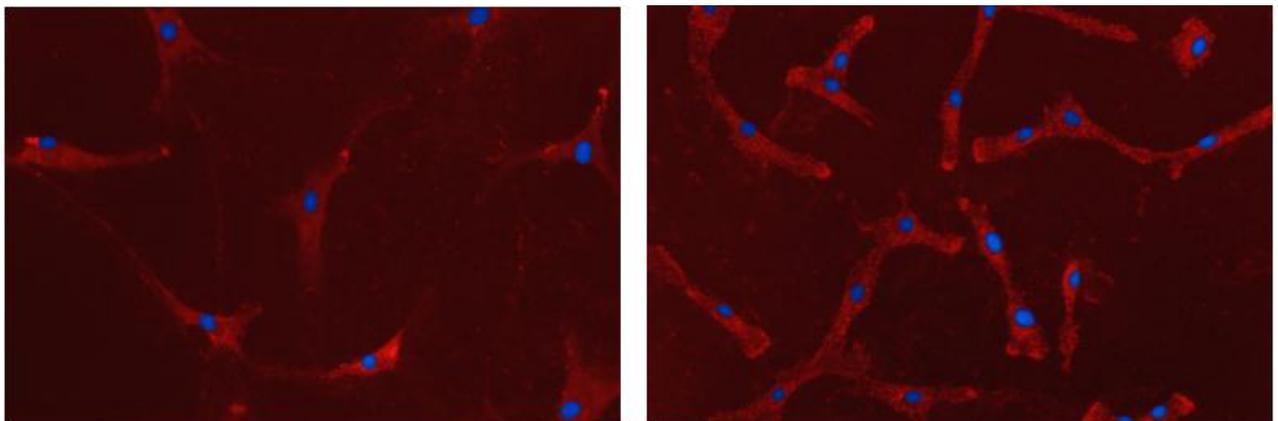


Abb. 20 CD73 PE Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

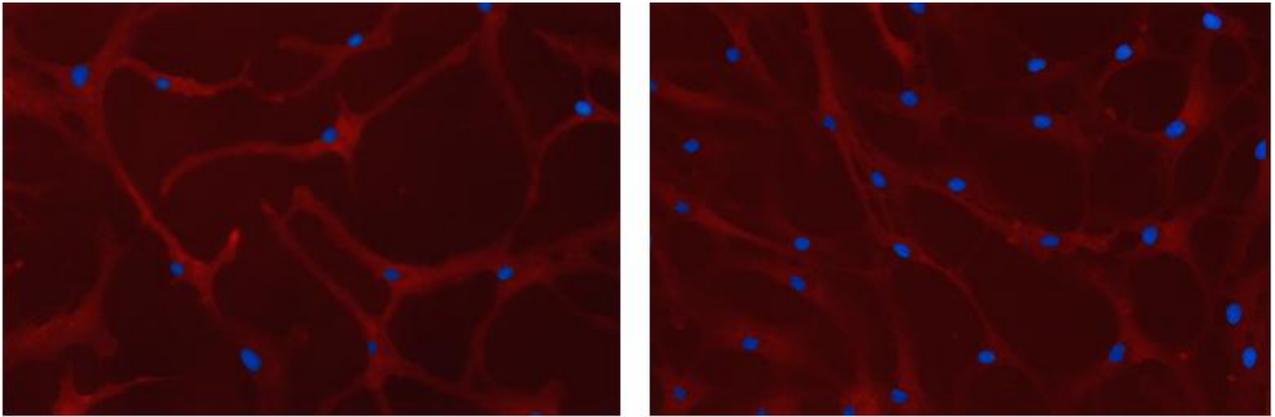


Abb. 21 CD90 PE Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

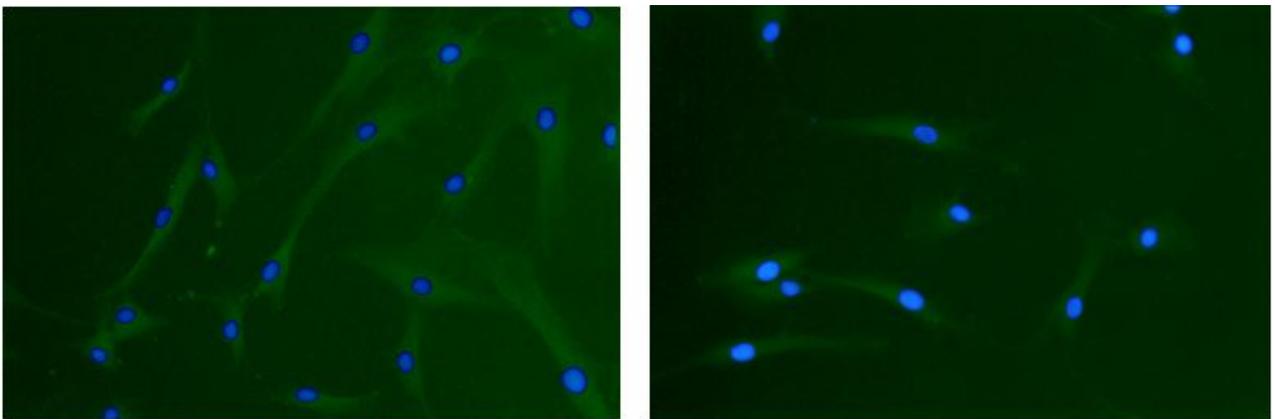


Abb. 22 CD105 FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

#### 4.2.3. Untersuchung der mRNA-Expression der mesenchymalen Stammzellmarker in den Meniskuszellen

Für die Analyse der mRNA-Expression der mesenchymalen Stammzellmarker CD 13, 29, 44, 73 und CD 105 wurde aus den Meniskuszellen der Innen- und Außenzone RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der qRT-PCR untersucht (s.3.3). Jeder PCR-Wert wurde in drei unabhängigen Läufen, an drei unterschiedlichen Tagen bestätigt und an je drei Patienten mit Osteoarthritis wiederholt.

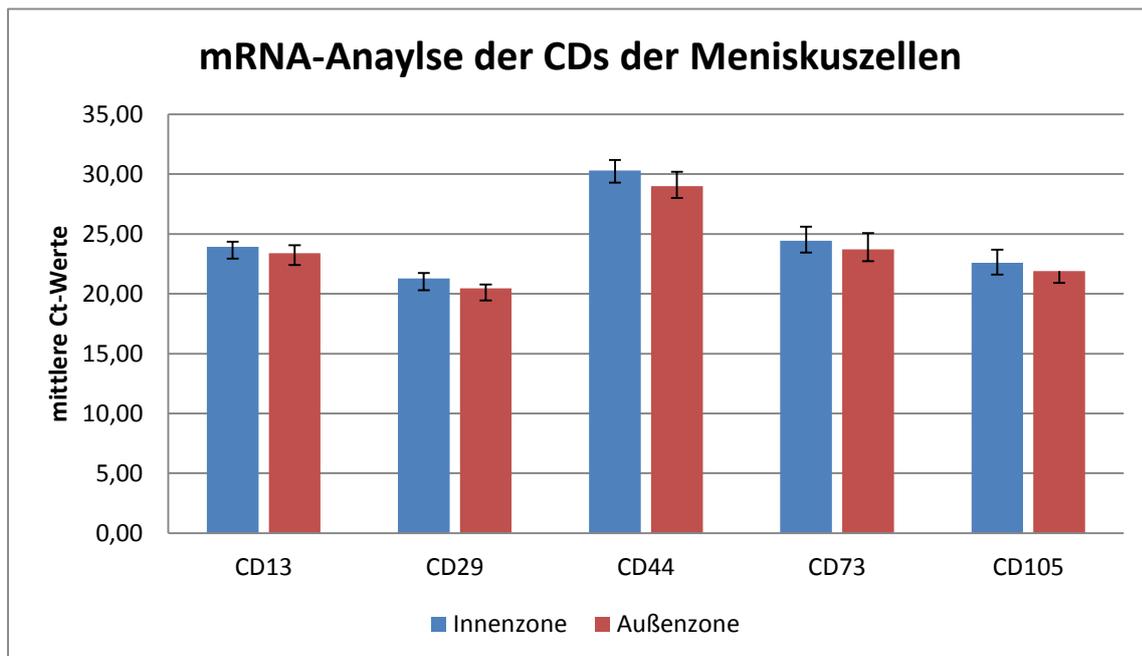


Abb. 23 m-RNA-Gehalt der Meniskuszellen im Vergleich von Meniskus Innen-und Außenzone als Mittelwert mit Standardabweichung von drei unterschiedlichen Patienten.

Es zeigte sich, dass die Zellen der Innen-und Außenzone die jeweiligen Untersuchungsgene exprimieren. Ein kleiner Ct-Wert kommt auf grund des qRT-PCR-Verfahrens jeweils einem hohen mRNA-Level gleich und ein hoher Ct-Wert einem niedrigerem mRNA-Level. Wie in Abb.23 zu sehen ist zeigte sich, dass die mittleren Ct-Werte für die Außenzone für alle untersuchten Marker CD 13, CD 29, CD 44, CD 73 und CD 105 jeweils niedriger sind als die der Innenzone. Dies spricht dafür, dass in der Außenzone jeweils mehr mRNA produziert wird.

Um weiterhin die Innenzone mit der Außenzone zu vergleichen und eventuelle Unterschiede in der relativen Genexpressionsratio der mesenchymalen Stammzellmarker festzustellen, wurden die qRT-PCR-Ergebnisse der Meniskuszellen noch mit einer Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrolle dienten CPCs. Nach der Umrechnung der Versuchsergebnisse nach Pfaffl (s. 3.3.7) konnte das Verhältnis der Innen- und Außenzone für das jeweilige Untersuchungsgen als Verhältniszahl (Ratio) zur als 1 gesetzten Kontrollgruppe chondrogener Vorläuferzellen gezeigt werden (s. Abb.24).

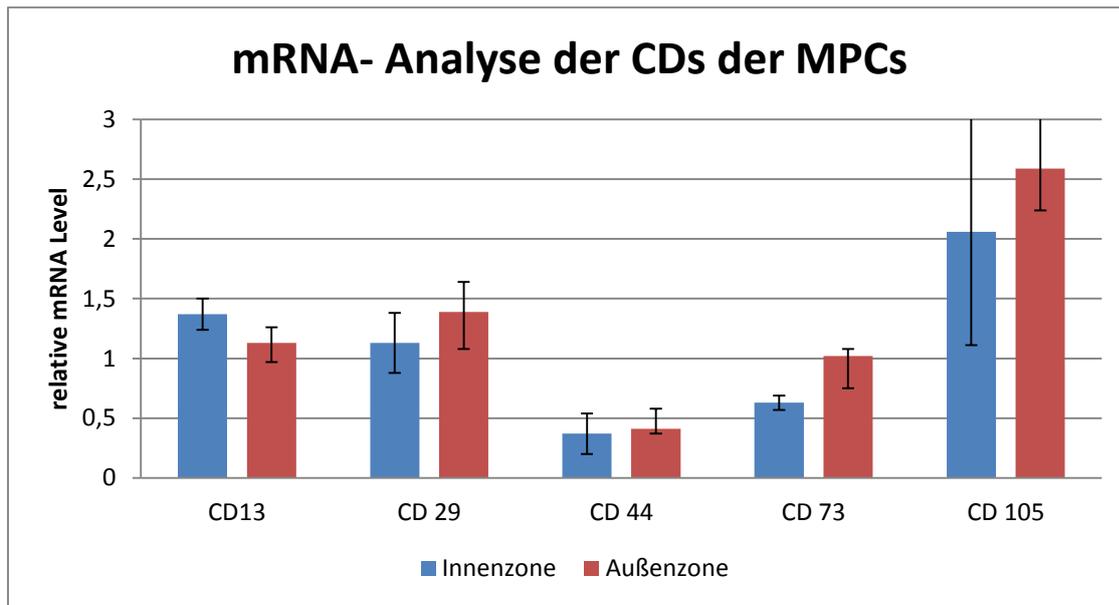


Abb. 24 m-RNA-Level der *in vitro* Meniskuszellen der Innen und Außenzone in Relation zum Wert der CPCs.

Im Vergleich mit den CPCs fällt auf, dass die MPCs den Marker CD 44 in beiden Zonen geringer exprimieren. Für alle anderen Marker ergibt sich eine Ratio von größer 1.

Im direkten Vergleich der beiden Zonen miteinander ist festzuhalten, dass Außenzone mit Ausnahme für den Marker CD 13, für den Innenzone eine Ratio von 1,37 +/-0,13 und die Außenzone von nur 1,13 +/- 0,16 aufweist, für alle anderen CDs eine höhere Ratio zeigt:

CD 29 Innenzone 1,13 +/-0,25 ;CD 29 Außenzone 1,38 +/-0,31; CD 44 Innenzone 0,37 +/- 0,17; CD 44 Außenzone 0,41 +/-0,04; CD 73 Innenzone 0,63+/-0,06, CD 73 Außenzone 1,02+/-0,27; CD 105 Innenzone 2,06 +/- 0,95, CD 105 Außenzone 2,59 +/-0,35.

#### 4.3. Zelldifferenzierung

Zur Evaluation des Stammzellcharakters der Meniskuszellen wurden diese auf ihre multipotente Differenzierbarkeit untersucht. Die Zellen wurden sowohl adipogen als auch osteoblastär differenziert. Verglichen wurden dabei die Zellen der Innen- und Außenzone dreier Patienten.

#### 4.3.1. Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die Meniskuszellen für drei Wochen im NH AdipoDiffMedium kultiviert und anschließend mit 2% Paraformaldehyd fixiert und mittels Oil-Red-O gefärbt (s.3.7.1.).

Die Zellen, welche sich adipogen differenziert hatten, bildeten Fettvakuolen in ihrem Zytoplasma aus. Durch das Oil-Red-O färbten sich diese Vakuolen in den differenzierten Zellen rötlich an. Unabhängig von der Zone zeigte sich in den Versuchen, dass durchschnittlich ca. ein Drittel der Zellen Fettvakuolen ausbildeten. Diese Vakuolen befanden sich perinukleär in der differenzierten Zelle (s. Abb. 25).

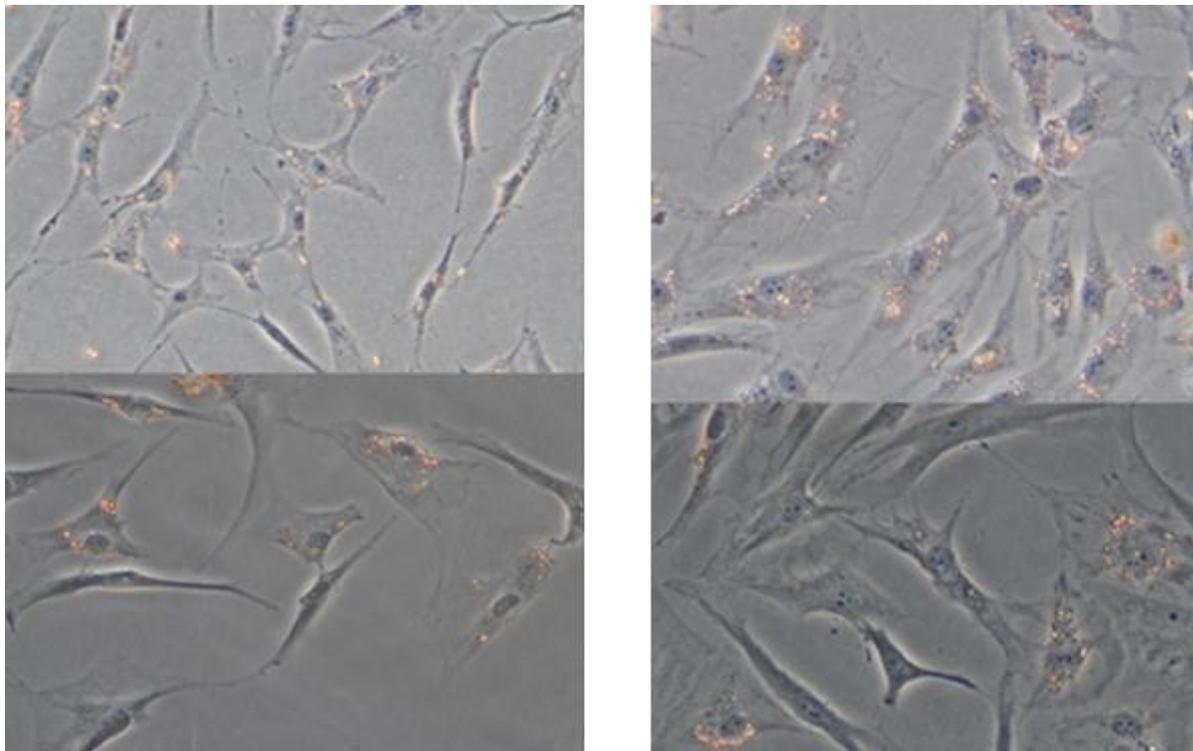


Abb. 25 zeigt die adipogene differenzierten Zellen der Innenzone (links) und Außenzone (rechts) im lichtmikroskopischen Bild unter 20facher Vergrößerung. Man sieht auf allen Bildern die perinukleären rötlich gefärbten Fettvakuolen in den Zellen.

Für die weitere Analyse des Differenzierungsverhaltens wurden die Meniskuszellen nach drei Wochen zusätzlich mittels Immunfluoreszenz auf den Adipozytenmarker LPL getestet (s.3.4). Die Abb. 26 zeigt, dass die differenzierten Zellen beider Zonen für den Adipozytenmarker LPL positiv waren.

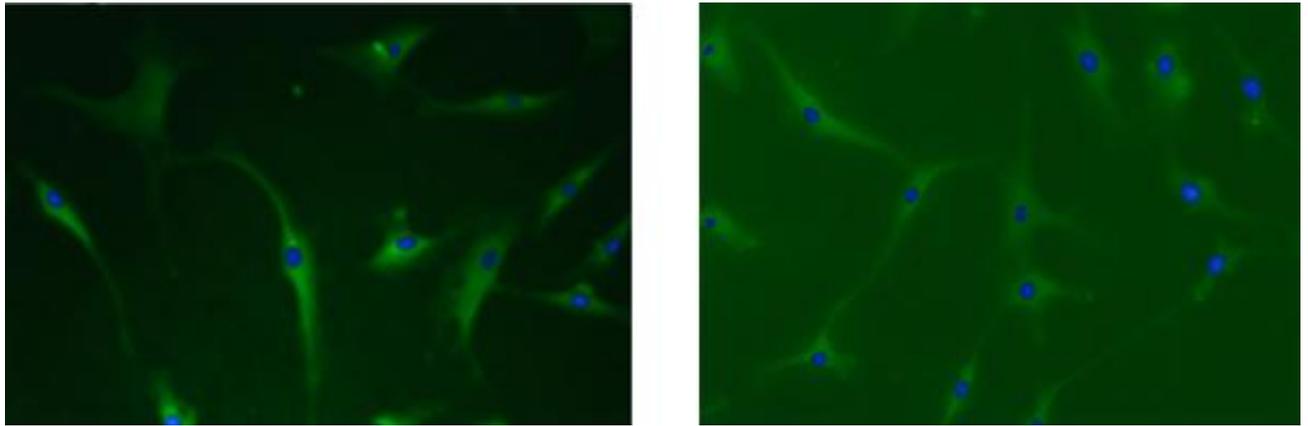


Abb. 26 LPL-FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone(rechts).

Parallel zu dem Differenzierungsansatz wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Die Zellen der Negativkontrolle wurden im normalen DMEM-Medium für drei Wochen kultiviert und anschließend ebenfalls mittels Oil-Red-O Färbung getestet und per Immunfluoreszenz auf LPL getestet. Beide Untersuchungen zeigten ein negatives Ergebnis, was in Abb. 27 exemplarisch für beide Zonen gezeigt wird.

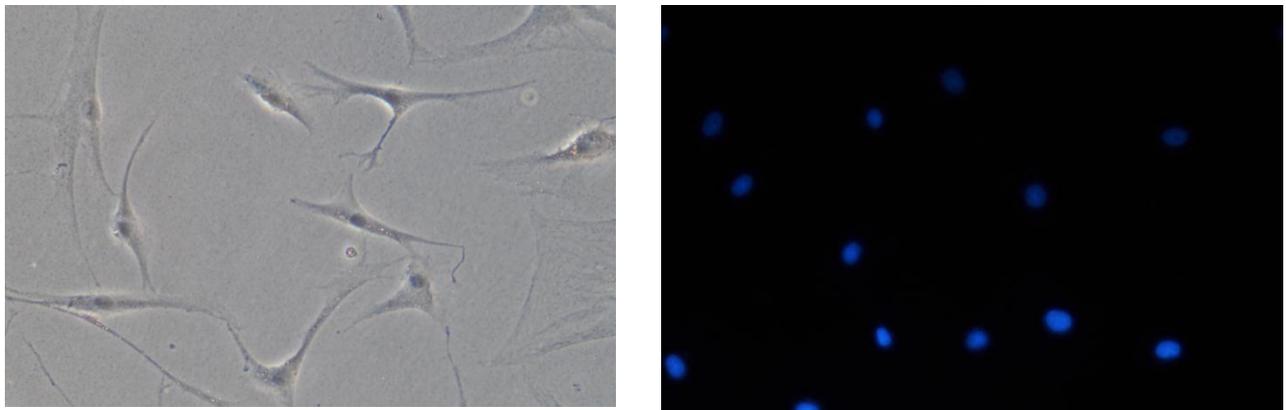


Abb. 27 Negativkontrolle für die adipogene Differenzierung: links das lichtmikroskopische Bild, recht das Immunfluoreszenzbild für LPL-FITC.

#### 4.3.2. Osteoblastäre Differenzierung

Nachdem die Meniskuszellen für 7 bis 10 Tage im OsteoDiffMedium kultiviert wurden, wurde die osteoblastäre Differenzierung einiger Zellen mittels alkalischer Phosphatasefärbung getestet (s.3.7.2). Die Meniskuszellen, welche sich zu Osteoblasten

differenziert hatten, konnten durch die blaue Farbstoffreaktion, die durch die knochenspezifische alkalische Phosphatase katalysiert wurde, nachgewiesen werden.

Wie in Abb. 28 zu sehen ist, hatte sich außerdem die Zellmorphologie der Meniskuszellen durch die Differenzierung verändert. Die zu Osteoblasten differenzierten Zellen zeigten einen verbreiterten asymmetrischen Zelleib mit vielen unregelmäßigen und spitzen Fortsätzen. Insgesamt differenzierten sich pro Versuchsansatz, sowohl in der Außen- als auch in der Innenzone, ca. 20-30% aller Meniskuszellen zu Osteoblasten.

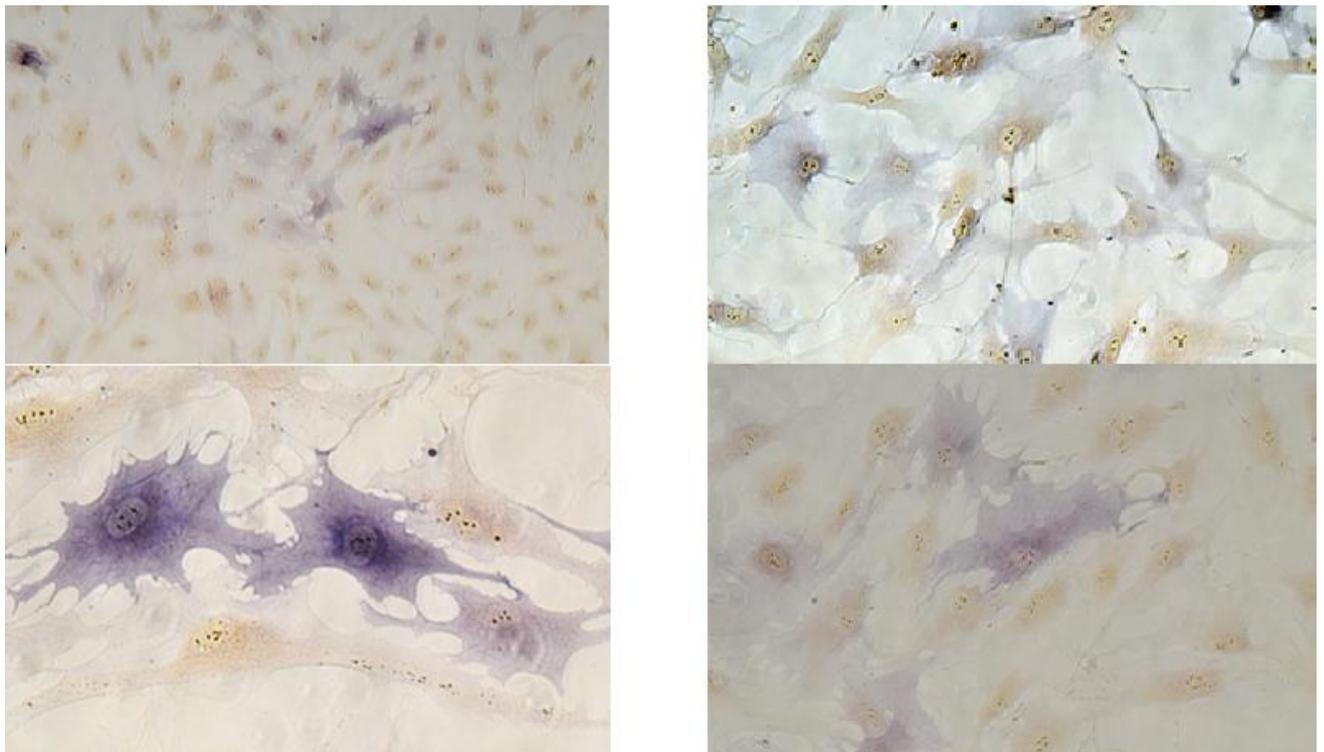


Abb. 28 zeigt das lichtmikroskopische Bild der osteoblastären Differenzierung der Meniskuszellen der Innenzone (rechts) und Außenzone (links). Die obere Aufnahme zeigt die Zellen in der Vergrößerung von 5:1 und die untere von 20:1.

Für die weitere Analyse des Differenzierungsverhaltens wurden die Meniskuszellen außerdem mittels Immunzytochemie auf den Osteoblastenmarker Osteocalcin getestet (s.3.4). Abbildung 29 zeigt, dass die differenzierten Zellen der Innen- und Außenzone für den Marker positiv waren.

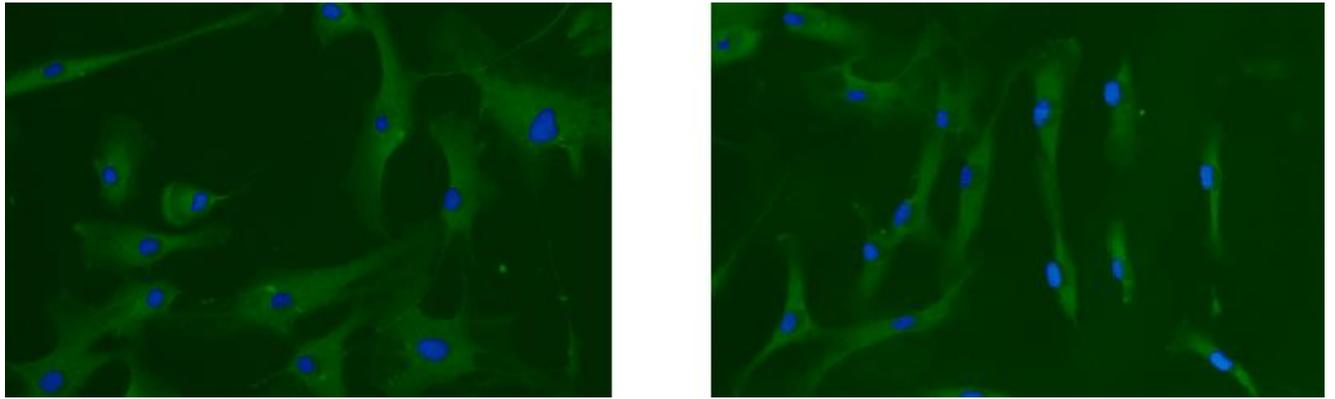


Abb. 29 Osteocalcin-FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone(rechts).

Parallel zu dem Differenzierungsansatz wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Die Zellen der Negativkontrolle wurden im normalen DMEM-Medium für 7 Tage kultiviert und anschließend ebenfalls mittels Farbreaktion auf alkalische Phosphatase und per Immunfluoreszenz auf Osteocalcin getestet. Beide Untersuchungen zeigten ein negatives Ergebnis, was in Abb.30 exemplarisch für beide Zonen dargestellt ist.

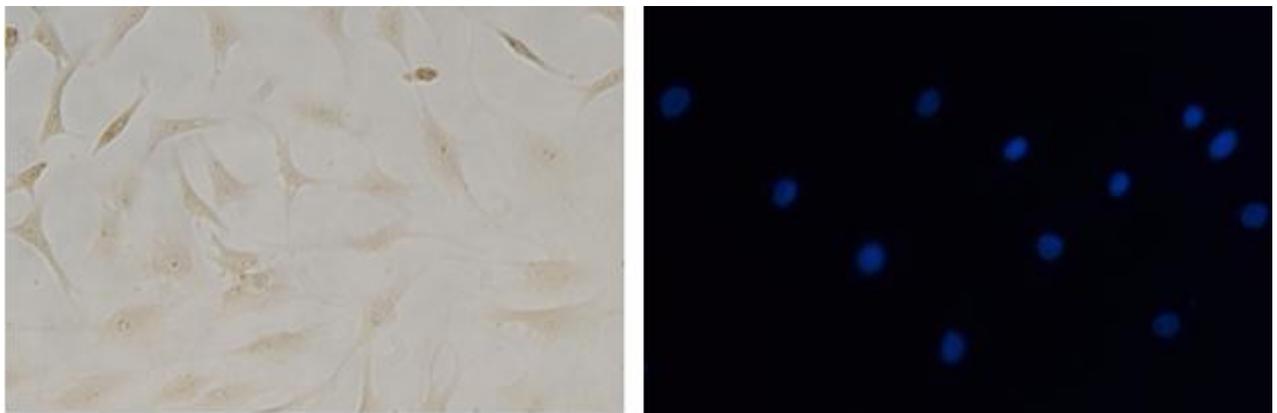


Abb. 30 Negativkontrolle für die osteoblastäre Differenzierung: links das lichtmikroskopische Bild, rechts Immunfluoreszenzbild für Osteocalcin-FITC.

#### 4.4. Evaluierung der chondrogenen Eigenschaften der Meniskuszellen

Für die genauere Untersuchung der chondrogenen Eigenschaften der Meniskuszellen wurden die Zellen der Innen- und Außenzone untersucht und miteinander verglichen.

Die Zellen wurden auf Kollagen 1 und 2, sowie den wichtigen osteoblastären Transkriptionsfaktor RUNX-2 und den chondrogenen Transkriptionsfaktor SOX-9 mittels Immunfluoreszenz, FACS-Analyse, qRT-PCR und Western-Blot untersucht.

#### 4.4.1. Immunfluoreszenzuntersuchung der Meniskuszellen auf Kollagen 1, RUNX-2 und SOX-9

Für die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden pro Untersuchungsansatz 10000 Zellen auf ein Glasplättchen gegeben, die darauf festwuchsen und anschließend mittels Antikörperreaktion auf Kollagen 1 sowie auf RUNX-2 und SOX-9 getestet wurden. Verglichen wurden die Meniskuszellen der Innen- und Außenzone von drei Patienten.

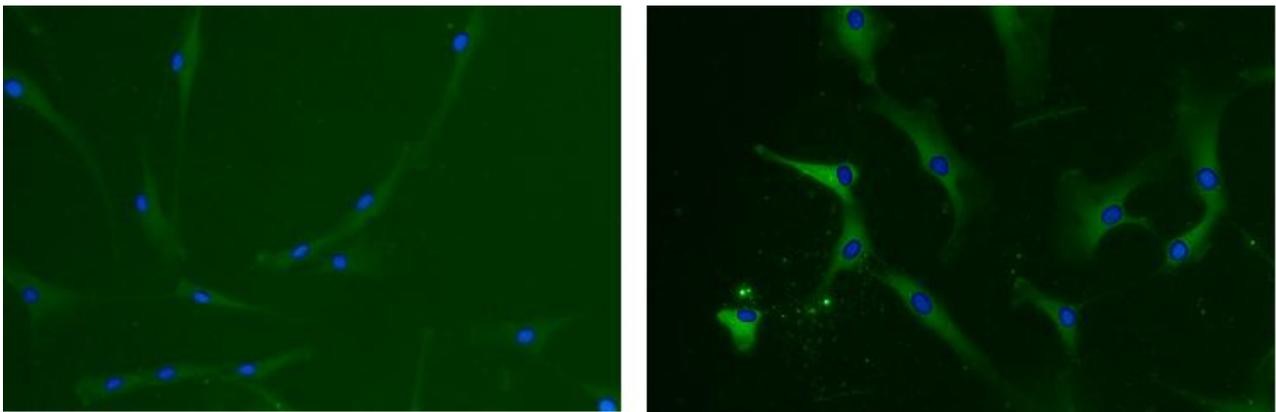


Abb. 31 RUNX-2 FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

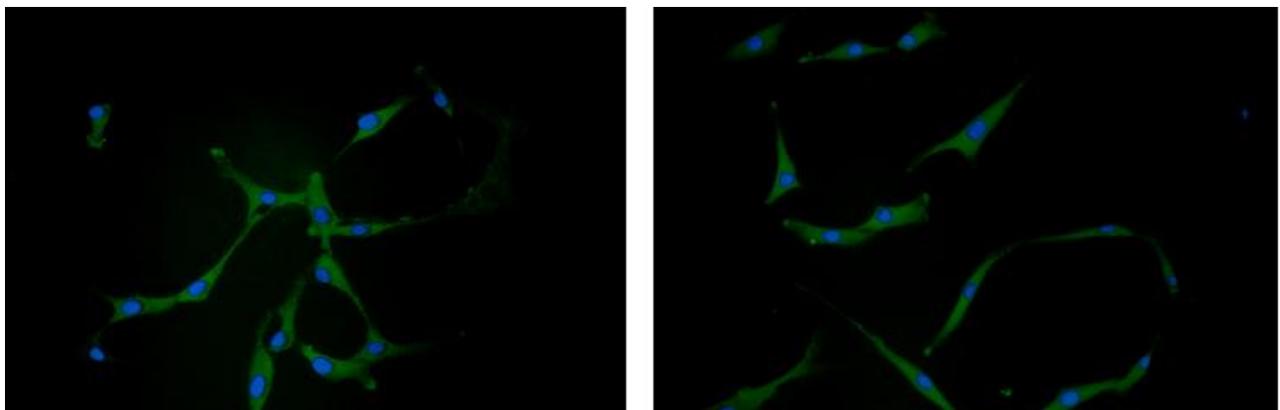


Abb. 32 SOX-9 FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

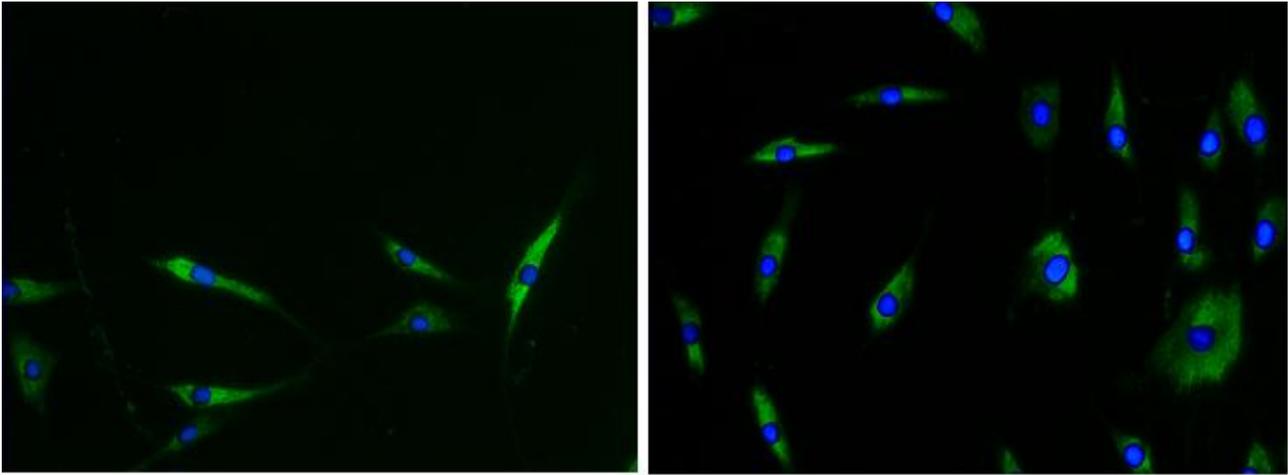


Abb. 33 Col-1 FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

#### 4.4.2 Genanalyse der Meniskuszellen auf Kollagen 1, RUNX-2 und SOX-9

Unter Verwendung der qRT-PCR wurde die Genexpression der Meniskuszellen von Kollagen 1, RUNX-2 und SOX-9 bestimmt. Dafür wurden wieder drei Patienten getestet und die Innen- mit der Außenzone verglichen.

Nach Isolation der RNA und deren Umschreiben in cDNA wurde diese mit der qRT-PCR untersucht. Pro Patient und jeweiliger Zone wurden drei Wells an je drei aufeinander folgenden Tagen analysiert.

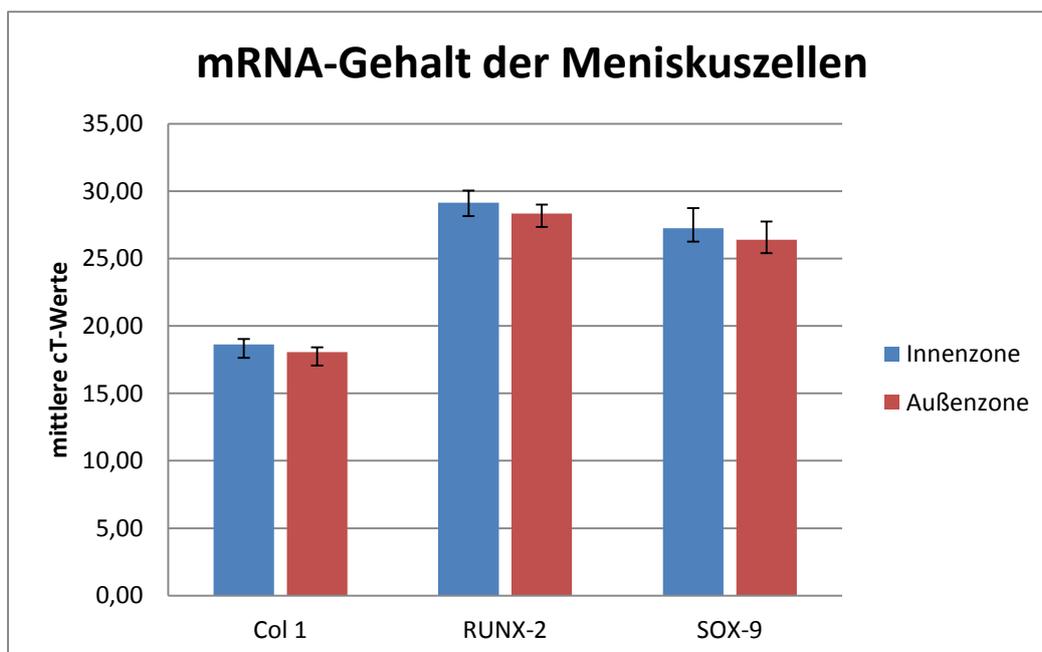


Abb. 34 mRNA-Gehalt der Meniskuszellen im Vergleich von Meniskus Innen-und Außenzone als Mittelwert mit Standardabweichung von drei unterschiedlichen Patienten.

Es zeigte sich, dass die Zellen der Innen- und Außenzone die jeweiligen Untersuchungsgene exprimieren. Ein kleiner Ct-Wert kommt aufgrund des qRT-PCR-Verfahrens jeweils einem hohen mRNA-Level gleich und ein niedriger Ct-Wert einem niedrigeren mRNA-Level. Wie in Abb.34 zu sehen ist, zeigte sich, dass die mittleren Ct-Werte für die Außenzone für alle untersuchten Marker jeweils niedriger sind als die der Innenzone. Dies spricht dafür, dass in der Außenzone die entsprechenden Gene jeweils stärker exprimiert werden.

Für die weiterführende Evaluation der chondrogenen Eigenschaften der Zellen und deren Vergleich untereinander im Hinblick auf die relative Genexpressionsratio, wurden die qRT-PCR-Ergebnisse der Meniskuszellen noch mit einer Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrolle dienten Chondrozyten. Nach der Umrechnung der Versuchsergebnisse nach Pfaffl (s. 3.3.7) konnte das Verhältnis der Innen- und Außenzone des jeweiligen Untersuchungsgens als Verhältniszahl (Ratio) zur als 1 gesetzten Kontrollgruppe der gesunden Chondrozyten gezeigt werden.

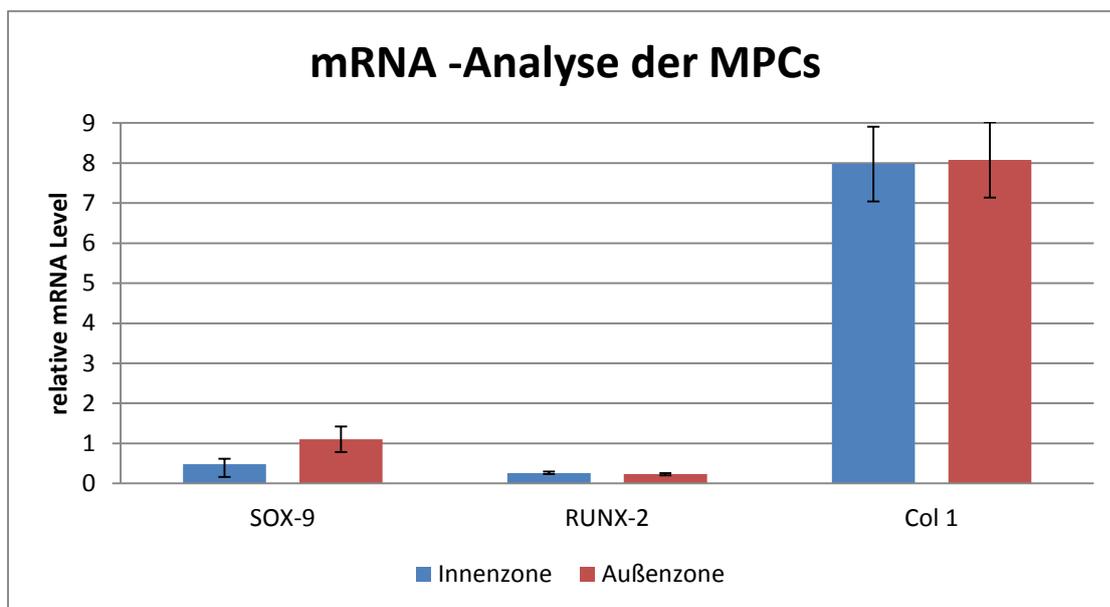


Abb. 35 mRNA-Level der Meniskuszellen der Innen- und Außenzone in Relation zum Wert der Chondrozyten.

Die Abb.35 zeigt die mRNA-Analyse der MPCs in Relation zu gesunden Chondrozyten. Dabei sind zuerst zwei Dinge auffällig. Zum einen weisen die MPCs eine sehr große Ratio für Kollagen 1 auf. Für die Innenzone beträgt diese  $7,98 \pm 0,93$  und für die Außenzone  $8,08 \pm 0,94$ . Zum anderen ist auffällig, dass die MPCs anscheinend sowohl für RUNX-2 als auch für

SOX-9 (mit Ausnahme der Außenzone, die für SOX-9 eine Ratio von 1,1 +/- 0,32 aufweist) Werte von kleiner 1 aufweisen, was bedeutet, dass die beiden Faktoren weniger stark in den MPCs expremiert werden als in gesunden Chondrozyten.

Im Vergleich der beiden Zonen untereinander ist festzuhalten, dass sie für RUNX-2 fast identische Ratios aufweisen: Für die Innenzone 0,26 +/- 0,04 und für die Außenzone 0,23 +/- 0,03. Unterschiede gibt es allerdings für den SOX-9, das vermehrt in der Außenzone gefunden wird 1,1 +/- 0,32, wohingegen in der Innenzone die Ratio nur 0,48 +/- 0,14 beträgt.

#### 4.4.3. FACS-Analyse der Meniskuszellen für Kollagen 2

Nach dem Ernten der kultivierten Zellen wurden  $10^5$  Zellen auf den entsprechenden Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse (s.3.5.) untersucht. Es wurden drei Patienten getestet und die Innen- mit der Außenzone verglichen.

Die Abb 36 zeigt, dass die kultivierten Zellen unabhängig von der Zone negativ für Kollagen 2 waren.

Im Mittel waren nur 0,39% (Standartabweichung +/-0,24%) der Zellen der Innenzone und 1,52% (Standartabweichung +/-1,81%) der Außenzone für Kollagen 2 positiv.

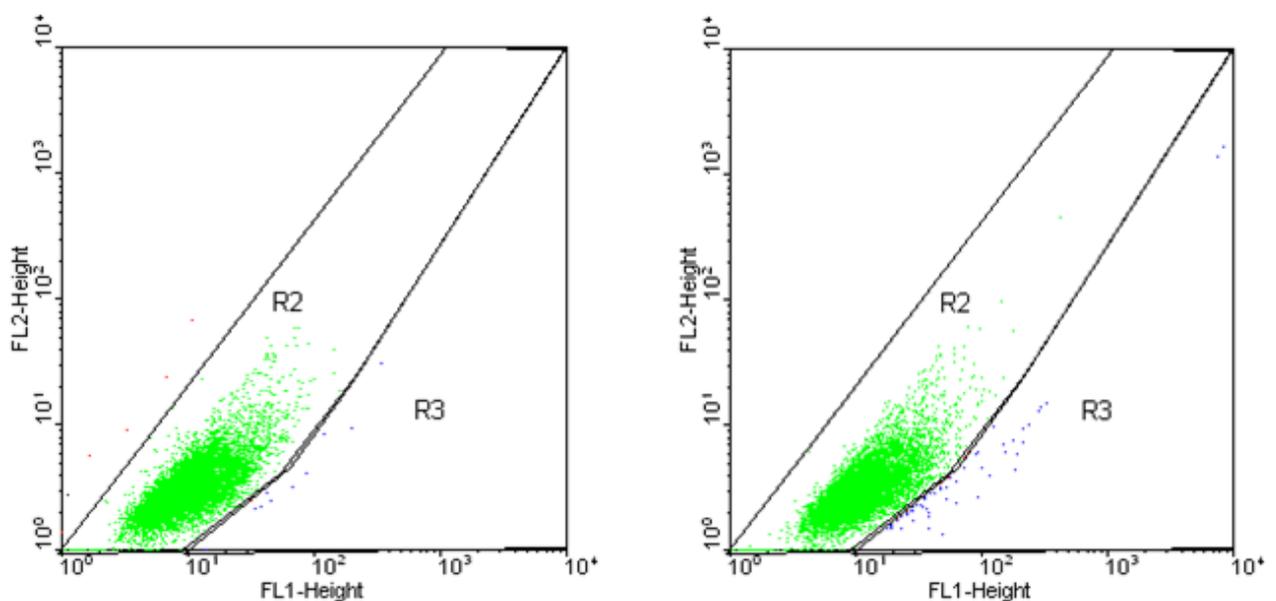


Abb. 36 FACS-Analyse: Kollagen-2 FITC Meniskus Innenzone (links), Außenzone (rechts).

#### 4.4.4. mRNA-Expression von Kollagen 2 der Meniskuszellen

Für die Analyse der mRNA-Expression von Kollagen 2 wurden die Meniskuszellen mittels qRT-PCR untersucht. Dafür wurden wieder drei Patienten getestet und die Innen- mit der Außenzone verglichen.

Nach Gewinnung der Untersuchungs-RNA und deren Umschreiben in cDNA wurde diese mit der qRT-PCR untersucht. Pro Patient und jeweiliger Zone wurden drei Wells an je drei aufeinanderfolgenden Tagen analysiert.

Dabei zeigt sich, dass die Meniskuszellen keine Expression für Kollagen 2 aufweisen. Die Abb. 37 und 38 zeigen exemplarisch die Schmelzkurvenanalyse für Kollagen 2 eines qRT-PCR Durchlaufs. Man sieht in der Schmelzkurve den kontinuierlichen Abfall der gemessenen Fluoreszenz pro Zyklus. Der Primer für Kollagen 2 kann nicht an die cDNA der Meniskuszellen binden und diese amplifizieren, da die Zellen die mRNA Sequenz nicht aufweisen.

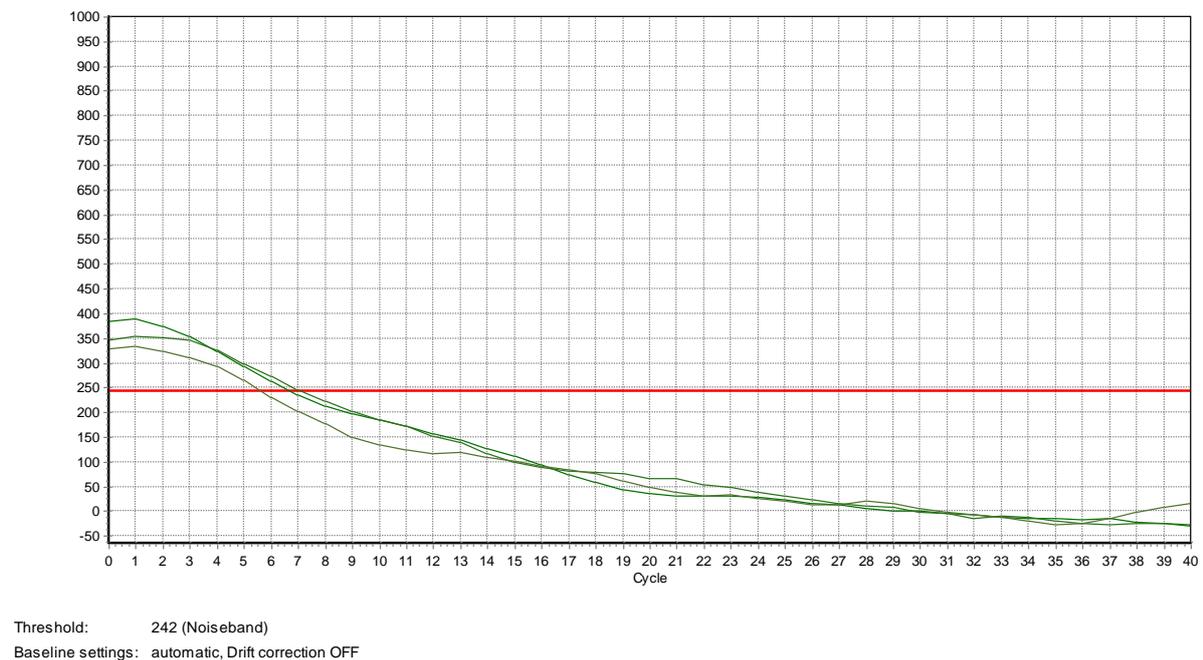
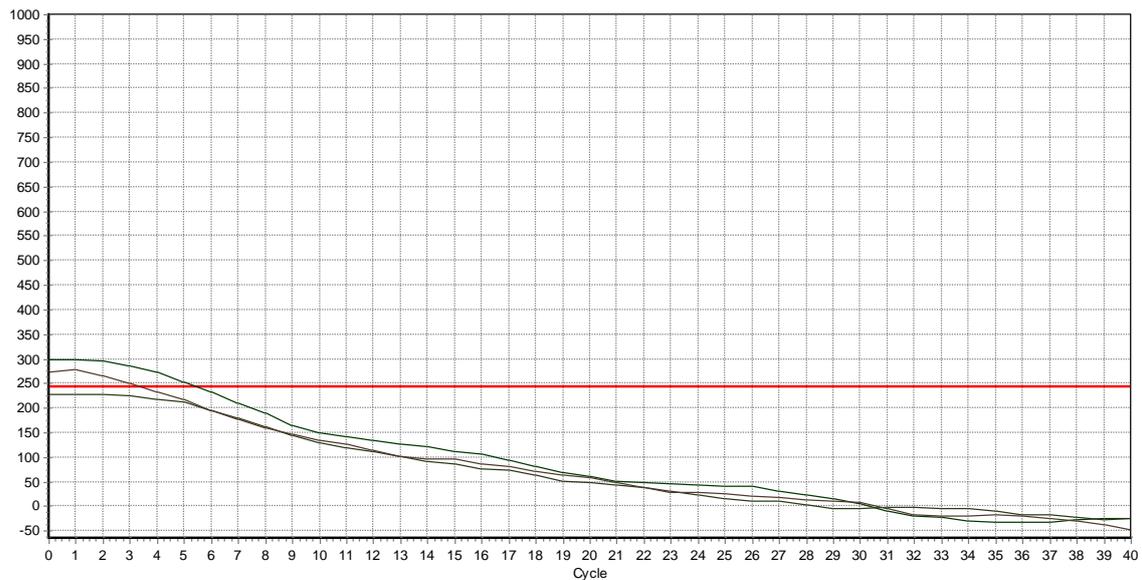


Abb. 37 Schmelzkurve der qRt-PCR für Kollagen 2 der Innenzone.



Threshold: 242 (Noiseband)  
 Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

Abb. 38 Schmelzkurve der qRt-PCR für Kollagen 2 der Außenzone.

#### 4.4.5. Western Blot-Nachweis von Kollagen1, RUNX-2 und SOX-9

Nachdem die Meniskuszellen auf genetischer Ebene mittels qRt-PCR auf Kollagen1, RUNX-2 und SOX-9 getestet wurden, sollten mit dem Western Blot Verfahren die Ergebnisse ein weiteres Mal auf Proteinebene bestätigt werden. Außerdem sollte Gehalt der zu untersuchenden Proteine der Innen- und der Außenzone miteinander verglichen werden.

Die Abb. 39-41 zeigen die positive Antikörperbindung für das zu untersuchende Protein, sowie die gefärbten Proteinbanden, der Comassie-Brilliant-Blue-Membran, und die entsprechenden Proteinleiter. Die Proteinfärbungen mit Comassie-Brilliant-Blue zeigte, dass an den gefärbten Stellen Proteine auf der Membran zu finden sind.

Im Vergleich der jeweiligen markierten Proteinbanden mit der Proteinleiter bestätigte sich die zu erwartende Größe der Proteine: für Kollagen 180kD, RUNX-2 55kD und für SOX-9 70kD.

Außerdem zeigte sich im Western Blot Verfahren für alle drei getesteten Proteine kein wesentlicher Unterschied zwischen der Innen- und Außenzone.

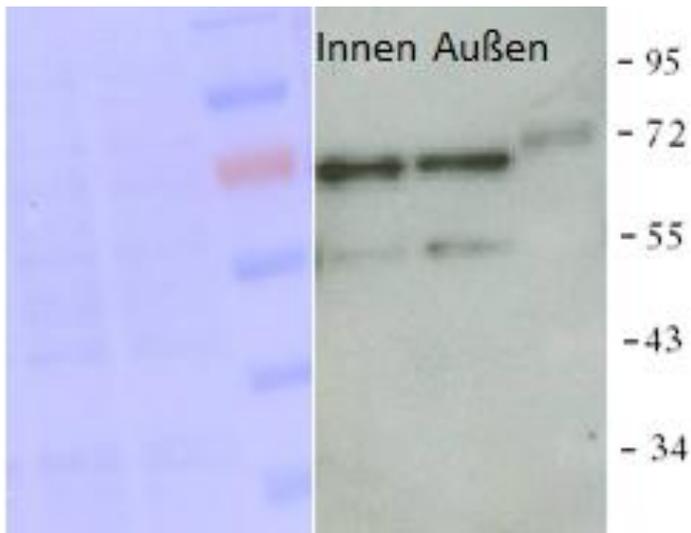


Abb. 39 zeigt die entwickelten Bilder des Western Blots mit dem human-SOX-9 Antikörper und die dazugehörige Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue. Verwendet wurde ein Zelllysat aus 300.000 Meniskuszellen. Der Vergleich mit der Proteinleiter bestätigt Größe des markierten SOX-9 Proteins von 70kD, für welches die Zellen der Innen-und Außenzone ohne Unterschied positiv sind.

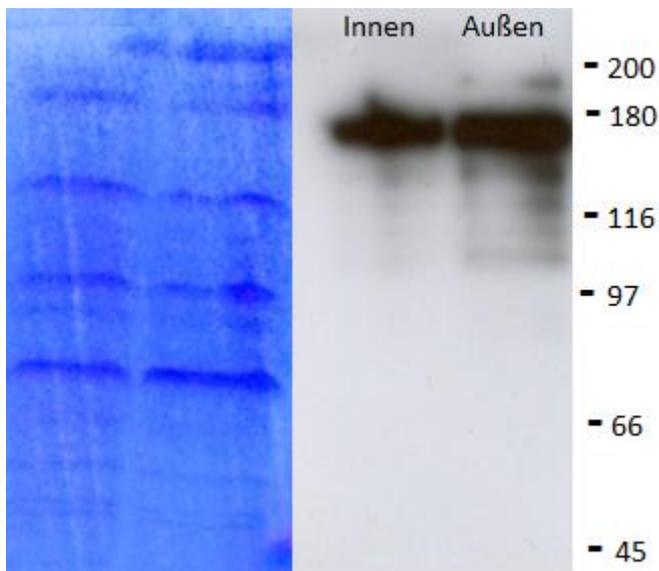


Abb. 40 zeigt die entwickelten Bilder des Western Blots mit dem human-Col1 Antikörper und die dazugehörige Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue. Verwendet wurde ein Zelllysat aus 300.000 Meniskuszellen. Der Vergleich mit der Proteinleiter bestätigt Größe des markierten Kollagen 1-Proteins von 180kD, für welches die Zellen der Innen-und Außenzone ohne Unterschied positiv sind.

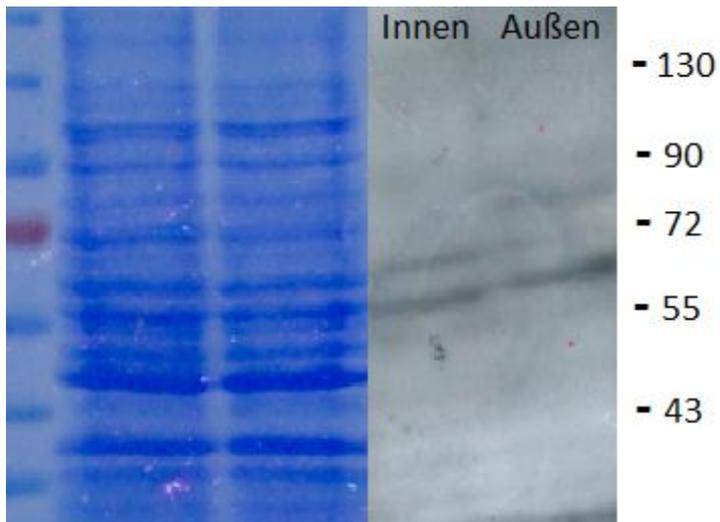


Abb. 41 zeigt die entwickelten Bilder des Western Blots mit dem human-RUNX-2 Antikörper und die dazugehörige Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue. Verwendet wurde ein Zelllysat aus 300.000 Meniskuszellen. Der Vergleich mit der Proteinleiter bestätigt Größe des markierten RUNX-2 Proteins von 55kD, für welches die Meniskuszellen der Innen-und Außenzone positiv sind. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Zonen.

#### 4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1) Die Meniskuszellen migrieren aus den Meniskus chips in der Zellkultur, lagern sich zu Kolonien zusammen und vermehren sich.
- 2) Die FACS-Analyse bestätigte das Vorhandensein der mesenchymalen Stammzellmarker CD 13, 29, 44, 73, 90 und 105 auf den Meniskuszellen. Dies konnte außerdem mittels Immunfluoreszenz unter Mikroskopdarstellung der einzelnen Meniskuszellen für die verschiedenen Zonen gezeigt werden.
- 3) Mittels qRT-PCR wurde die mRNA der Meniskuszellen untersucht. So konnte zusätzlich auch auf Genebene die Expression der Stammzellmarker nachgewiesen werden.
- 4) Im Vergleich der beiden Zonen miteinander zeigte sich, dass sowohl quantitativ mehr Zellen in der Außenzone positiv für die Stammzellmarker waren (vgl. FACS-Ergebnisse), als auch qualitativ die relative Genexpression dieser Marker in der Außenzone größer war (vgl. mRNA-Analyse).
- 5) Die Meniskuszellen wurden adipogen und osteoblastär differenziert. Die Differenzierung wurde mittels Histochemie gezeigt, sowie mit Immunfluoreszenz für die Marker LPL bzw. Osteocalcin nachgewiesen.
- 6) Bei der Evaluierung des chondrogenen Potenzials der Meniskuszellen in Kultur war auffällig, dass die Meniskuszellen in der Zellkultur sowohl auf Proteinebene (vgl. FACS-Ergebnisse) als auch für die Genexpression (vgl. qRT-PCR-Ergebnisse) kein Kollagen 2 aufweisen.
- 7) Mittels Immunfluoreszenz, Western-Blot und qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Meniskuszellen positiv für Kollagen 1 und den Osteoblastenmarker RUNX-2 und den Knorpelmarker SOX-9 waren. Im Vergleich der Innen- mit der Außenzone zeigte sich, dass es bis auf eine Ausnahme quantitativ keine wesentlichen Unterschiede für die untersuchten Proteine gibt (vgl. Western Blot). Für den Knorpelmarker SOX-9 konnten allerdings gezeigt werden, dass dieser vermehrt in der Außenzone exprimiert wird (vgl. mRNA-Analyse) und dort auch im Vergleich mit den gesunden Chondrozyten eine Ratio größer 1 besitzt.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten Meniskuszellen von Patienten mit Osteoarthrose identifiziert werden und im Hinblick auf ihren Stammzellcharakter untersucht, sowie ihre chondrogenen Eigenschaften beschrieben werden. Speziell wurden Unterschiede und Gemeinsamkeiten (im Hinblick auf Progenitorcharakter der Zellen und deren chondrogene Eigenschaften) mit dem hyalinen Gelenkknorpel getestet. Im hyalinen Gelenkknorpel von Patienten mit Osteoarthrose konnten bereits chondrogene Vorläuferzellen (CPCs) nachgewiesen werden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass diese Zellen erkranktes Knorpelgewebe infiltrieren und dort vermutlich an Reparaturprozessen beteiligt sind (Koelling et al. 2009).

Aufgrund des unterschiedlich ausgeprägten Vaskularisierungsgrades (Arnoczky und Warren 1982) wurde der Meniskus zu Beginn der Untersuchungen zunächst in drei Zonen (Außen, Mitte, Innen) unterteilt (vgl. Kapitel 2.). Aus diesen Zonen wurde Meniskusgewebe entnommen, daraus Zellen isoliert und deren Eigenschaften untersucht und miteinander verglichen.

Dabei fiel auf, dass die Menisken der einzelnen Patienten in Größe und Konsistenz bzw. Härte verschieden waren. Trotz der Konsistenzunterschiede wurde versucht, auf gleichgroße Chips zu achten. Ursache für die Verschiedenheiten der Konsistenz sind wahrscheinlich Kalzifizierungsprozesse, die im Rahmen von Osteoarthrose im Meniskus beschrieben sind (Sun und Mauerhan 2012). Weil die exakte Zonenunterteilung v.a. im Übergang zur Mittelzone nicht immer eindeutig möglich war, sollen in dieser Arbeit nur die Ergebnisse des Vergleichs der vaskularisierten Außenzone mit denen der Innenzone beschrieben werden.

Sämtliche untersuchten Menisken der Osteoarthrosepatienten wiesen makroskopische Degenerationen, wie eine unebene, aufgeraute Oberfläche, gelbliche Verfärbungen und myxoide Läsionen auf (Ferrer-Roca und Vilalta 1980, Pauli et al. 2011). Allerdings war makroskopisch nicht immer sicher festzustellen, ob es sich bei dem jeweiligen Präparat um den Innen-oder Außenmeniskus gehandelt hat. Wie bereits erwähnt, gab es individuelle Unterschiede im makroskopischen Degenerationsgrad und der Konsistenz der Menisken. Es gibt noch immer keinen ausreichend aussagekräftigen Degenerationsscore für Osteoarthrosemenisken. Es ist daher davon auszugehen, dass die untersuchten Menisken

sich teilweise in unterschiedlichen Stadien der Osteoarthrose befanden. Inwieweit dies das Vorkommen von Progenitorzellen und deren Funktion beeinflusst, bedarf weiterer Untersuchungen. In der Arbeit wurde sich zuerst darauf beschränkt, den Progenitorcharakter der Meniskuszellen zu untersuchen.

### 5.1. Progenitorcharakter der Meniskuszellen

Für den Nachweis des mesenchymalen Stammzellcharakters müssen folgende drei Kriterien erfüllt werden: Das Migrationsvermögen der Zellen, das Vorhandensein von entsprechenden Stammzellmarkern und die Multidifferenzierbarkeit der Zellen (Caplan 1991, Pittenger et al. 1999; Zuk et al. 2001). Alle diese drei Kriterien wurden von den Meniskuszellen erfüllt.

Nach Präparation der Meniskuschiips konnten erstens Migration und Koloniebildung der Zellen beobachtet werden. Zellmorphologisch zeigten die ausgewanderten Zellen einen ovalen Zellleib mit einzelnen länglichen Zellfortsätzen.

Der Vorteil der verwendeten Methode zur Zellgewinnung ist, dass direkt und ohne weitere Fremdeinwirkung die potenziellen Meniskus Progenitorzellen aus dem Meniskusgewebe migrieren konnten. Die Zellen sind damit ohne weiteren exogenen Fremdeinfluss gewonnen worden.

Auf einen Kollagenaseverdau zur Zellgewinnung wurde aufgrund möglicher zellschädigender Wirkung verzichtet. Außerdem gewinnt man durch diese Methode eine heterogene Gruppe an Zellen, bei denen es sich nicht nur um potenzielle Progenitorzellen handelt (Verdonk et al. 2005). Man kann folglich davon ausgehen, dass durch die in der Arbeit verwendete Methode eine relativ homogene Gruppe an Zellen gewonnen werden konnte, die keinen weiteren exogenen Veränderungen unterlagen. Diese Meniskuszellen erfüllten somit eindeutig das Stammzellkriterium der Migration und der Bildung von Kolonien.

Auch die mesenchymalen Stammzellmarker CD 13, CD 29, CD 44, CD 73, CD 90 und CD 105 konnten zweitens mittels mehrerer Methoden sowohl auf Protein- als auch auf Genexpressionsebene nachgewiesen werden (Schaffler und Buchler 2007, De Schauwer et al. 2011). Mittels Immunfluoreszenz konnten die für die jeweiligen Marker positiven Zellen direkt dargestellt werden. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mittels FACS-Analyse für die

Zellen der Innen- und Außenzone bestätigt werden. Die Methode ermöglicht eine quantitative Aussage über das Vorhandensein der Oberflächenmarker und somit einen genauen Vergleich zwischen Innen- und Außenzone, da je  $10^5$  Zellen analysiert wurden.

Bei dem Vergleich zeigte sich, dass die Zellen beider Zonen negativ für die Marker CD 31 und 45 sind und somit davon auszugehen ist, dass sie nicht hämatopoetischen Ursprungs sind. Dies entspricht einem weiteren Stammzellkriterium für die Definition von humanen mesenchymalen Stammzellen durch die International Society for Cellular Therapy (Dominici et al. 2007).

Für alle getesteten mesenchymalen Marker war festzustellen, dass über 90% der Zellen der Innen- und Außenzone für diese jeweils positiv waren. Auffällig war aber, dass im Vergleich der beiden Zonen die Außenzone für alle Marker, mit Ausnahme von CD 105, eine größere Anzahl an positiven Zellen aufwies als die Innenzone: Besonders markant war dies für die Marker CD 13 und CD 44; wo die Unterschiede 91,32% positive Zellen für Innen- und 99,56% Außenzone für CD 13 und 90,62% Innenzone gegen 99,64% Außenzone waren.

Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR und unter Zuhilfenahme der Pfaffl-Methode (Pfaffl 2001). Auch hier konnte die Expression der mesenchymalen Marker in beiden Zonen nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich der beiden Zonen fällt auf, dass die Zellen der Außenzone mit einer Ausnahme, für den Marker CD 13, für alle anderen CDs eine höhere Ratio zeigen.

Zusammenfassend lässt sich für die MPCs festhalten, dass die mesenchymalen Stammzellmarker auf den Zellen der Außenzone sowohl in der quantitativen FACS-Analyse als auch in der qualitativen Betrachtung der mRNA mittels qRT-PCR durchschnittlich etwas vermehrt vorkommen als in der Innenzone: Dies wäre durch die wahrscheinliche Lokalisation der Stammzellnische in der Außenzone erklärbar.

Im Hinblick auf die Multidifferenzierbarkeit konnte drittens gezeigt werden, dass sich die ursprünglich aus Faserknorpel stammenden Meniskuszellen unabhängig von ihrer Ursprungszone auch adipogen und osteoblastär differenzieren lassen.

Nach dreiwöchiger Inkubation im adipogenen Differenzierungsmedium bildeten die ursprünglichen Meniskuszellen Fettvakuolen in ihrem Zytoplasma aus. Dies konnte mittels Oil-Red-O Färbung gezeigt werden. Unabhängig von der Zone konnte dies bei ca. 30% der

Zellen beobachtet werden. Weiterhin wurde mittels Immunhistochemie der Adipozytenmarker LPL auf den differenzierten Meniskuszellen nachgewiesen.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass sich Meniskuszellen zu Osteoblasten differenzieren lassen. Nach 7 bis 10 tägiger Inkubation im Spezialmedium konnte mittels Farbreaktion mit alkalischer Phosphatase die Differenzierung von Knorpel zu Osteoblasten nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich im mikroskopischen Bild eine Veränderung der Zellmorphologie. Der Zelleib hatte sich asymmetrisch verbreitert und die Zellfortsätze waren spitz und unregelmäßig geworden. Unabhängig von der Ursprungszone differenzierten sich auch hier ca. 20-30% aller Meniskuszellen zu Osteoblasten.

Zusammengefasst zeigte sich: Da die untersuchten Meniskuszellen bei Patienten mit Osteoarthrose alle Kriterien für mesenchymale Stammzellen, wie Migrationsvermögen, Vorhandensein der entsprechenden Oberflächemarkern und Multidifferenzierbarkeit, aufweisen (Caplan 1991), ist davon auszugehen, dass es sich bei den Zellen um Progenitorzellen handelt. Die Zellen können daher als Meniskus Progenitorzellen (kurz MPCs) bezeichnet werden. Das Vorkommen dieser MPCs konnte darüber hinaus in sämtlichen Zonen nachgewiesen werden und nicht -wie ursprünglich vermutet- nur in der vaskularisierten Außenzone.

Aus diesen Ergebnissen leiten sich drei Fragen ab.

Erstens: Kommen die Progenitorzellen nur im kranken Faserknorpel von Osteoarthrosepatienten vor, oder auch im Meniskus von Gesunden?

Eine Zellpopulation aus gesundem Meniskus, welche als Kontrolle von Interesse gewesen wäre, war nicht realisierbar. Die Gewinnung von gesunden humanen Menisken ist in der klinischen Praxis schwer. Selbst Menisken von toten Patienten scheinen nicht ausreichend osteoarthrosefrei zu sein. So weisen MRT-Untersuchungen zufolge über 80% aller durchschnittlich 71jährigen Meniskusläsionen auf (Raunest et al. 1994).

Im Hinblick auf die Multidifferenzierbarkeit von Meniskuszellen konnte gezeigt werden, dass bei Rinderkälbern im Alter von 3-6 Monaten Meniskuszellen aller Zonen eine Kapazität zur Multidifferenzierbarkeit haben, v.a. im Hinblick auf Chondro- und Adipogenese (Mauck et al. 2007). Außerdem wurde beschrieben, dass die Zellen der Außenzone am plastischsten im

Hinblick auf die Multidifferenzierbarkeit sind. Die Ergebnisse von Mauck et al. (2007) decken sich mit denen dieser Arbeit. Allerdings ist festzuhalten, dass es sich dabei um die Menisken von Rinderkälbern handelt, deren Wachstum noch nicht abgeschlossen war. Auch ist der Vaskularisierungsgrad dieser jungen Menisken nicht bekannt.

Für die Bildung von Stammzellkolonien konnte die Arbeit von Furumatsu et al. (2012) für sechs makroskopisch intakte laterale Menisken zeigen, dass die gewonnenen Zellen in der Zellkultur keine Kolonien bilden. Es ist also zu vermuten, dass im potenziell gesunden Meniskus keine MPCs vorhanden sind, die Kolonien bilden können.

Zweitens: Wo genau kommen die Stammzellen her und wo ist Stammzellnische der MPCs lokalisiert?

Der Lokalisation der Stammzellnische sind noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen (Fuchs et al. 2004, Jones und Wagers 2008). Auch über den Grund für das Vorkommen der Zellen kann man nach dem momentanen Wissensstand noch keine eindeutigen Aussagen treffen. Es ist aber durchaus anzunehmen, dass die Zellen ähnlich wie die CPCs im hyalinen Knorpel an Reparaturprozessen im Meniskus beteiligt sind.

Allerdings bleibt weiterhin unklar, ob die MPCs als Reaktion auf einen vorangegangenen Meniskusschaden auftreten, der die Osteoarthrosebildung fördert, oder erst im Zuge einer bereits vorhandenen Osteoarthrose auftreten. Außerdem stellt sich die Frage, ob die MPCs direkt aus einer mesenchymalen Stammzellpopulation hervorgehen, oder transdifferenzierte Chondrozyten sind, welche im Spätstadium mit Osteoarthrose assoziiert sind.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die MPCs migrieren und tendenziell etwas vermehrt in der Außenzone vorkommen. Für CPCs konnte bereits gezeigt werden, dass diese wahrscheinlich über das Knochenmark in Risse der Tidemark des hyalinen Knorpels einwandern (Koelling et al. 2009). Ähnlich könnte es auch im Meniskus sein. Die MPCs könnten als mesenchymale Stammzellen über die Mikrogefäße der Außenzone in den Meniskus einwandern. In dieser haben sie eventuell auch ihre Stammzellnische, in welcher sie sich vermehren können. Von dort ausgehend können sie in die anderen Zonen des Meniskus migrieren und an Reparaturprozessen beteiligt sein:

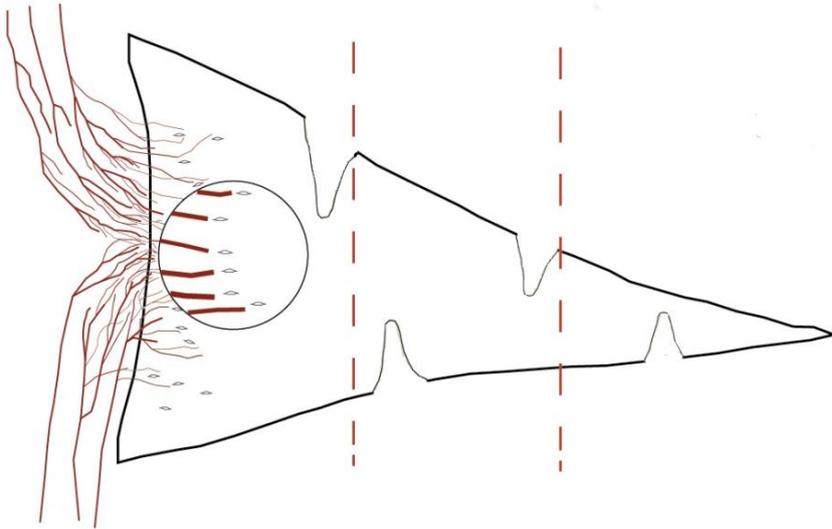


Abb. 42 Einwandern der MPCs über die Mikrogefäße.

Diese Hypothese wird in der Abb. 42 schematisch dargestellt. Im ersten Bild sieht man einen Meniskus im Längsschnitt mit mehreren Läsionen. Über die Blutgefäße wandern einzelne Progenitorzellen in die Außenzone ein.

In der zweiten Abbildung (Abb. 43) sieht man wie sich diese Zellen dann in ihrer Stammzellnische in der Außenzone in der Nähe der Mikrogefäße vermehrt haben.

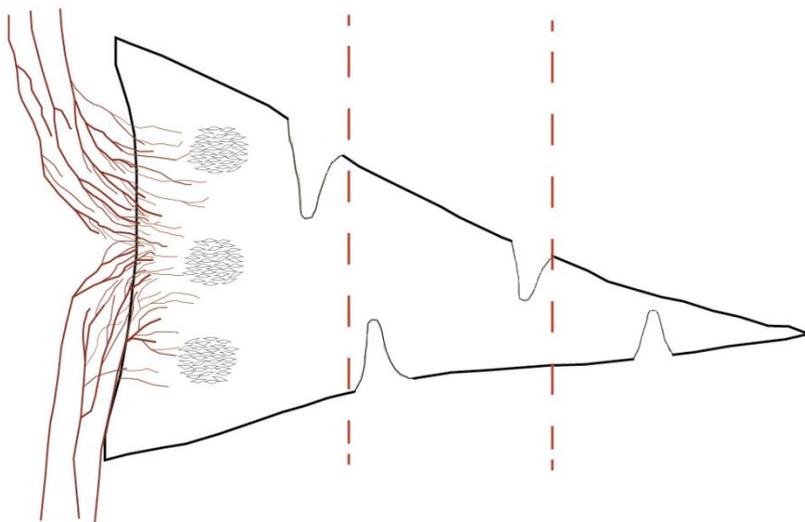


Abb. 43 Wachstum und Vermehrung der MPCs in der Stammzellnische.

Abschließend ist in der dritten Abbildung zu sehen, wie ausgehend von der potenziellen Stammzellnische, die MPCs zu den einzelnen Läsionen migrieren. Dort lagern sie sich an die Läsionsränder an und sind an Reparaturprozessen beteiligt.

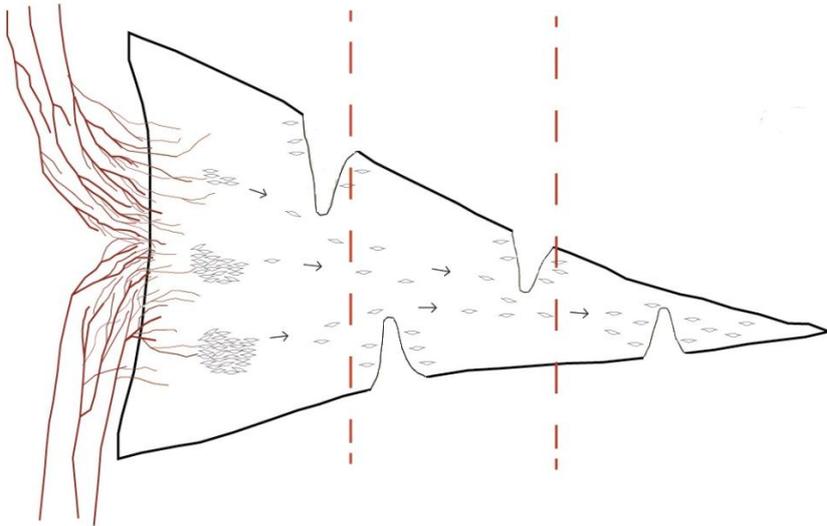


Abb. 44 Migration der MPCs zu den Meniskuläsionen.

Bereits vorhergehende Arbeiten zu Meniskusverletzungen unterstützen das Modell, der von außen einwandernden Progenitorzellen und deren Rolle bei der Geweberegeneration.

Diese Überlegung wird u.a. von Kambic et al. (2000) geäußert, der zeigen konnte, dass bei Meniskusverletzungen im Kaninchenmodell *alpha-smooth muscle actin-positive* Zellen der Superfizialschichtzellen in das Verletzungsareal migrieren. In der Arbeit wurde bereits die Vermutung geäußert, dass es sich bei diesen Zellen um spezialisierte Progenitorzellen handeln könnte, die Reparaturprozesse einleiten.

Diese Vermutung wird außerdem durch die klinische Erfahrung im Umgang mit Meniskusverletzungen gestützt. Es ist bekannt, dass Meniskusverletzungen der vaskularisierten Außenseite besser heilen als jene der Innenseite (Petrosini und Sherman 1996). Auch die Arbeit von Kobayashi et al. (2004) stützte diese Vermutung, da Stücke aus der vaskularisierten Zone des Meniskus bei der Verpflanzung in frische Defekte der avaskulären Region sich besser reintegrieren als anders herum. Eventuell ist es auch dort so, dass Progenitorzellen aus der vaskularisierten Außenseite direkt in der gefäßfreien Innenseite zur Defektheilung beitragen.

Drittens: Inwieweit weisen die MPCs *in vivo* ein Regenerationspotenzial auf und welche Rolle spielen sie bei Reparaturprozessen?

Die Arbeit beschränkt sich auf den Nachweis der MPCs und ihr Verhalten in der Monokultur. Weiterhin gilt es zu klären, wie sich die Zellen in der 3D-Kultur verhalten, inwieweit sie in der Lage sind, extrazelluläre Matrix zu produzieren. Gunja und Athansiou konnten für

Fibrochondrozyten aus bovinen Menisken (2007) zeigen, dass diese in Monokultur ihren Phenotyp weitestgehend verlieren und es zu einer Herunterregulierung der extrazellulären Matrix kommt. Für das Regenerationspotenzial der Zellen ist außerdem zu klären von welchen Faktoren, wie z.B. dem Vaskularisierungsgrad des Gewebes, oxydativer Stress oder mechanische Belastung, dies abhängig ist.

## 5.2. Die chondrogenen Eigenschaften der MPCs

Da im Meniskus verschiedene Zelltypen vorkommen, war es interessant festzustellen, inwieweit es sich bei den MPCs eher um Fibroblasten-ähnliche-Zellen (fibroblast-like cells) oder um Fibrochondrozyten handelt (Ghadially et al. 1983) und ob es zonenspezifische Unterschiede gibt. Insbesondere die Frage, inwieweit die MPCs einen chondrogenen Charakter aufweisen, sollte geklärt werden.

Morphologisch zeigte sich, dass die ausgewanderten Meniskuszellen beider Zonen einen ovalen Zelleib mit einzelnen länglichen Zellfortsätzen aufwiesen. Dies entspricht dem Aussehen der Fibroblasten-ähnlichen-Zellen, die ohnehin vermehrt in der Außenzone des Meniskus vorkommen.

Im Hinblick auf die chondrogenen Eigenschaften von Meniskuszellen konnten Furumatsu et al. (2012) zeigen, dass Zellen von intakten humanen Menisken der Innenzone einen ausgeprägteren chondrogenen Phänotyp ausbilden als die Zellen der Außenzone. Vor allem die Synthese von Kollagen 2 und die Genexpression von SOX-9 sind in der Innenzone erhöht. Allerdings handelte es sich bei dieser Untersuchung um Zellen von intakten Menisken, die außerdem mittels Kollagenaseverdau gewonnen wurden.

Auffällig war, dass für die ursprünglich direkt aus dem Meniskus migrierten Progenitorzellen beider Zonen in der 2D-Monokultur gerade kein Kollagen 2 nachgewiesen werden konnte. Dies konnte sowohl mittels FACS-Analyse als auch mit der qRT-PCR auf Protein- und Genebene gezeigt werden.

Dieses Ergebnis stimmt auch weitgehend mit dem von anderen Untersuchungen an Chondrozyten überein, die einen sehr starken Rückgang von Kollagen 2 in der 2D-Monokultur beschrieben haben (Darling und Athanasiou 2005, Lin et al. 2008). Dasselbe

Phänomen konnte bereits bei CPCs gezeigt werden, die bei der FACS-Analyse ebenso wie die MPCs kein Kollagen 2 aufweisen (Koelling et al. 2009).

Im Hinblick auf Kollagen 1 waren die Zellen beider Zonen positiv für das Protein. Mittels Immunfloreszenz konnte Kollagen 1 direkt auf den Zellen nachgewiesen werden. Im Western Blot zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Zonen. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR. Auch hier konnte die Expression von Kollagen 1 nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich der beiden Zonen miteinander zeigte sich, dass die Ratio der MPCs für Kollagen annähernd gleich war (Innenzone 7,98 +/- 0,93 und für die Außenzone 8,08 +/- 0,94). Da die Ct-Werte der Zellen mittels Pfaffl-Methode noch mit denen von gesunden Chondrozyten verglichen wurden, ist bemerkenswert, dass die MPCs eine viel höhere Ratio als die Chondrozyten aufwiesen, deren Vergleichsratio mit 1 festgelegt war.

Für die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen gibt es eine Vielzahl von Signalmechanismen. Ein Hauptinitiator dieses Vorgangs ist der Transkriptionsfaktor SOX-9, der für die mesenchymale Kondensation und Differenzierung der Knorpelvorläuferzellen wichtig ist (de Crombrughe et al. 2001). Außerdem ist SOX-9 wichtig für die Expressionsregulation von RUNX-2, das wiederum für die Initiation der osteogenen Differenzierung wichtig ist (Cheng und Genever 2010). Daher sollten diese beiden Faktoren für die MPCs untersucht werden. Mittels Immunfluoreszenz konnten beide Proteine auf den Meniskuszellen nachgewiesen werden. Im Vergleich der beiden Zonen über den Western Blot zeigte sich, dass quantitativ keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Zonen bestehen.

Die Genexpressionsanalyse für die beiden Faktoren erfolgte mittels qRT-PCR. Auch hier konnte die Expression von RUNX-2 und SOX-9 in beiden Zonen nachgewiesen werden. Bei der Analyse mit gesunden Chondrozyten mittels Pfaffl-Methode zeigte sich allerdings, dass sowohl für RUNX-2 als auch SOX-9 (mit Ausnahme von der Außenzone, die für SOX-9 eine Ratio von 1,1 +/- 0,32 aufweist) die MPCs Werte von kleiner 1 aufweisen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass in gesunden Chondrozyten beide Gene stärker exprimiert werden.

Für RUNX-2 sind die Werte für die Innen- und Außenzone annähernd identisch. Bemerkenswerte Ausnahme ist allerdings die Außenzone des Meniskus, in der SOX-9 mit

einer Ratio von 1,1 weit über der der Innenzone liegt (0,48 +/- 0,14) und sogar etwas mehr exprimiert wird als in den gesunden Chondrozyten.

Im Hinblick auf den chondrogenen Charakter lässt sich zusammenfassen, dass die MPCs eher Fibroblast-ähnlichen-Zellen entsprechen als Fibrochondrozyten. Sie ähneln den Fibroblast-ähnlichen-Zellen morphologisch. Außerdem weisen sie im Gegensatz zu Chondrozyten mehr Kollagen 1 auf, sind dafür aber negativ für Kollagen 2. Bei der Betrachtung der Kollagenbildungskapazität der MPCs sollte allerdings bemerkt werden, dass die Versuche nur für Meniskuszellen in 2D-Monokultur durchgeführt wurden. Für CPCs konnte beispielweise gezeigt werden, dass diese in 3D-Kultur Kollagen 2 exprimieren können (Koelling et al. 2009). Für weiterführende Analysen des chondrogenen Potenzials mesenchymaler Stammzellen (und MPCs im Speziellen) sollte auch der Einfluss von dreidimensionalen Systemen und der Einfluss der extrazellulären Matrix in Betracht gezogen werden (Gerter et al. 2012).

Die Fibroblast-ähnlichen Zellen kommen beim Gesunden im Normalfall nur in der Außenzone vor (Hellio Le Graverand et al. 2001). Dass Fibroblast-ähnliche-Zellen in Form von MPCs beim Erkrankten in allen Zonen des Meniskus zu finden sind, spricht auch dafür, dass diese Zellen mittels Migration von außen nach innen durch den Meniskus zu den Defektzonen wandern könnten (wie in 5.1. vorgeschlagen).

Für die Regeneration und Aufrechterhaltung des Knorpelgewebes ist ein komplexes Zusammenspiel der Zellen untereinander mit der extrazellulären Matrix und der Einfluss von Entzündungsmediatoren von Bedeutung. Für den Faserknorpel sind die Einzelfaktoren für den Pathomechanismus der Osteoarthritis noch nicht ausreichend bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass gewisse Analogien zum hyalinen Gelenkknorpel bestehen. Für die Bildung der extrazellulären Matrix sind die Faktoren RUNX-2 und SOX-9 von Bedeutung. Dass die MPCs in der Außenzone mehr SOX-9 exprimieren als Chondrozyten ist erstaunlich und könnte für den Versuch der MPCs sprechen, die (Faser) Knorpelmatrix des Meniskus aufrecht zu erhalten bzw. zu regenerieren. Die Zellen der Innenzone weisen erniedrigte SOX-9 Level auf. Eventuell sind sie aufgrund der größeren Entfernung zur Blutversorgung weniger in der Lage, Kollagen zu produzieren. Dies würde auch durch die klinische Erkenntnis unterstützt, dass Meniskusdefekte der Außenzone besser heilen, als die der Innenzone (Kobayashi et al. 2004).

## MPCs im Kontext mit mesenchymalen Stammzellen bei Osteoarthritis

Mesenchymale Stammzellen können Immunreaktionen modulieren und das Mikromilieu von Stammzellen positiv beeinflussen, die bereits im erkrankten Gewebe vorhanden sind. Durch direkte Zell-Zellinteraktion und Sekretion verschiedener Faktoren können mesenchymale Stammzellen endogene Geweberegeneration im Osteoarthritis-befallenen Gelenk initiieren und Entzündungsprozesse unterdrücken (Qi et al. 2012).

Mesenchymale Stammzellen sind multipotent und können sich in verschiedene Gewebe wie Knochen, Knorpel, Fett, Muskel, Knochenmark, Sehnen, Bänder und andere Bindegewebsarten differenzieren (Prockop 1997). Aus den verschiedenen Gewebearten können sie im Umkehrschluss auch wieder isoliert werden. Auch bei Osteoarthritis scheinen mesenchymale Stammzellen bzw. Zellen mit Progenitorcharakter eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte beispielsweise im hyalinen Knorpel das Vorkommen von chondrogenen Progenitorzellen gezeigt werden (Koelling et al. 2009) und auch in der Synovialflüssigkeit, dem Hoffaschen Fettkörper und im subkutanen Fettgewebe von Osteoarthritispatienten konnten Progenitorzellen nachgewiesen werden (Alegre-Aguaron et al. 2012). Diese sind besonders im Hinblick auf ihr chondrogenes Potenzial von großem Interesse für die Forschung an Osteoarthritis. So konnten Dudics et al. (2009) zeigen, dass mesenchymale Stammzellen von Osteoarthritispatienten dasselbe chondrogene Differenzierungspotenzial besitzen wie die Zellen der gesunden Vergleichsgruppe.

Im Hinblick auf die Herkunft der mesenchymalen Stammzellen und deren Potenzial zur Chondrogenese konnte Kern et al. (2006) zeigen, dass im Vergleich humaner mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark, Periost, Synovia, Muskel- und Fettgewebe, die mesenchymalen Stammzellen der Synovia das größte Potenzial zur Chondrogenese aufwiesen. Anscheinend ist also auch die Herkunft der jeweiligen Progenitorzellen entscheidend für deren spezifisches Differenzierungspotenzial, was die MPCs noch stärker in den Fokus für den Pathomechanismus und Regenerationsansätze für Osteoarthritis im Meniskus und Kniegelenk rückt.

Für die Regeneration von Meniskusgewebe bei Ratten mit massiven Meniskusdefekten, wurden intraartikulär aus der Synovia gewonnene Stammzellen ins Kniegelenk injiziert. Es wurde demonstriert, dass die Stammzellen an die Läsion adhärirten, sich zu Meniskuszellen

differenzierten und die Regeneration des Gewebes förderten (Horie et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse für die Prävention und Progression von Osteoarthritis durch intraartikuläre Stammzellinjektionen erzielten Murphy et al. (2003) im Tiermodell. Bei Ziegen, denen durch totale mediale Menisektomie und Resektion des vorderen Kreuzbandes Osteoarthritis induziert wurde, konnten nach Stammzellinjektion im Gelenk Zeichen einer Meniskusregeneration gefunden werden, und die implantierten Zellen wurden im sich neu gebildeten Gewebe nachgewiesen.

Im Hinblick auf klinische Studien gibt es auch erste Versuchsergebnisse für die Behandlung von Knorpeldefekten bei Osteoarthritis auf der experimentellen Basis von mesenchymalen Stammzellbehandlungen.

Wakitani et al. (2002) untersuchten in einer Studie den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen, die aus Knochenmark gewonnen wurden und in Kollagen-1-Hydrogels eingebettet waren. Die Hydrogels mit den Stammzellen wurden 24 Patienten mit Osteoarthritis und Knorpeldefekten ins Kniegelenk transplantiert. Nach 42 Wochen waren die Defekte mit weißem Bindegewebe bedeckt. Sowohl in der Arthroskopie als auch in der histologischen Bewertung schnitten die Patienten der zelltransplantierten Gruppe angeblich besser als die Vergleichsgruppe ab. Jedoch war in der Studie keine Verbesserung der klinischen Symptome im Vergleich mit der Kontrollgruppe feststellbar. Ähnliche Ergebnisse an kleinen Patientenkollektiven erzielten Davatchi et al. (2011) und Centeno et al. (2008). Bei einem Patienten konnten Centeno et al. nach autologer mesenchymaler Stammzelltransplantation, welche aus dem Knochenmark gewonnen worden war, sechs Monate nach Transplantation allerdings im MRT signifikantes Wachstum von Gelenkknorpel und Regeneration von Meniskusgewebe zeigen.

Für die Behandlung von Osteoarthritis stellen mesenchymale Stammzellen einen vielversprechenden Ansatz für die Geweberegeneration und die Verhinderung der Krankheitsprogression dar. Weitere umfangreiche präklinische und klinische Studien werden in der Zukunft nötig sein, um die Frage nach einer geeigneten Zellquelle zu klären. Dabei könnten auch MPCs eine interessante Alternative für die Gewinnung und Verwendung von autologem Zellmaterial für die Behandlung von Meniskusdefekten und Osteoarthritis-assoziierten Knorpelveränderungen sein. Da sie bereits direkt im von Osteoarthritis befallenen Meniskus vorhanden sind, könnten sie auch eine Möglichkeit für die

chondrogene Stimulation des Gewebes darstellen, die nur ein minimal invasives Eingreifen voraussetzen würde.

### 5.3. Meniskus-Tissue-Engineering

Tissue-Engineering stellt eine Möglichkeit für die Behandlung von Meniskusdefekten dar. Es soll nach Möglichkeit die physiologische Biomechanik im Knie wiederhergestellt und somit die Progression der Gelenksknorpeldestruktion verhindert werden.

Für das Tissue-Engineering des Meniskus gibt es mehrere Ansätze:

Zum einen die Allograft-Transplantation des Meniskus. Wirth et al. (2002) konnten zeigen, dass Allograft-transplantierte Menisken bis zu 15 Jahre bestehen können, Schmerzen lindern und die Beweglichkeit im Kniegelenk verbessern. Allerdings sind die Aussagen über die Immunreaktivität für dieses Verfahren uneindeutig. Einige Studien besagen, dass durch die Transplantation keine Immunreaktion hervorgerufen wird, andere Arbeiten legen nahe, dass es doch zu einer langsamen Immunreaktion gegen das fremde Gewebe kommt, was zu einem Transplantatversagen führen kann (Tucker et al. 2012). Weitere Probleme dieser Methode sind die Übertragung infektiöser Krankheiten, langsames Transplantatremodelling und die Verfügbarkeit von passenden Menisken.

Alternativ werden als Ansatz seit geraumer Zeit Gewebegerüste für den Meniskus getestet, welche die eben genannten Nachteile der Allograft-Transplantation nicht aufweisen würden.

Für die Herstellung von Gewebegerüsten existieren bereits mehrere Möglichkeiten: Es gibt Gewebegerüste aus Seidenfasern (Mandal et al. 2011), bioabsorbierbarer Poly-L-Laktatsäure (Cook und Fox 2007), Gerüste aus Hyaluronestern und Gelatine (Angele et al. 2008), oder aber auch kollagene Meniskusimplantate, die aus Kollagen-1-Fasern von Rindersehnen gewonnen wurden (Stone et al. 1992). Auch die Azellularisierung von Meniskusgewebe wurde bereits getestet. Sandmann et al. (2009) konnten zeigen, dass die Azellularisierung humaner Menisken mittels Sodiumdodecylsulphat möglich ist und diese keine Unterschiede zu normalen Menisken in Bezug auf Komprimierbarkeit und Festigkeit aufweisen.

Entscheidend für die Funktion der Biogerüste ist das Zusammenspiel der Fasern mit den Zellen. Diese bauen die weitere Matrix auf, die die Meniskusstruktur ausmacht und deren Funktion unterstützt. So konnte beispielsweise für die Kollagenimplantate gezeigt werden, dass diese Gerüste die Migration von Fibrochondrozyten in die Biogewebe ermöglichen (Stone et al. 1992). In anderen Methoden wurden direkt adulte humane Chondrozyten oder primäre dermale Fibroblasten für die Modellierung des Gewebegerüsts verwendet (Mandal et al. 2011). Sogar Gewebegerüste mit humanen Knochenmarksstammzellen, die chondrogen differenziert wurden, wurden zur Behandlung von Meniskusdefekten eingesetzt. Dort konnten später Meniskus-ähnlicher Faserknorpel und fast komplette Defektreintegration nachgewiesen werden (Angele et al. 2008).

Für das Tissue-Engineering des Meniskus könnten in Zukunft auch die MPCs eine interessante Alternative für die Herstellung und den Einsatz von Gewebegerüsten darstellen. Die MPCs sind leicht aus vorhandenem Meniskusgewebe zu gewinnen, zur Migration in der Lage und teilungsaktiv, so dass die Zellen relativ leicht verfügbar wären. Da sie selber ursprünglich aus dem Meniskus stammen, ist zu vermuten, dass MPCs auch *in vivo* in der Lage sind, sich im Gewebegerüst zu verteilen und zu vermehren. Allerdings gilt es weiterhin zu klären, inwieweit die MPCs wirklich in der Lage sind, eine suffiziente Knorpelmatrix zu generieren, die es dauerhaft vermag den Beanspruchungen des Kniegelenks standzuhalten.

#### 5.4. Klinische Relevanz

Da Meniskusverletzung sowie Degenerationen direkt mit Osteoarthritis im Kniegelenk assoziiert sind (Raunest et al. 1994, Hunter et al. 2006, Englund et al. 2009), hat die Regeneration des Meniskusgewebes eine wichtige Bedeutung für die Prävention und Progression dieser Erkrankung.

Die Arbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung und Charakterisierung von Meniskus-Progenitorzellen bei Osteoarthritis. Es konnte gezeigt werden, dass MPCs bei Osteoarthritis in allen Meniskuszonen vorkommen. Die Zellen sind sehr teilungsaktiv und in der Lage zu migrieren. Es ist anzunehmen, dass sie an Reparaturprozessen im osteoarthritis-kranken Meniskus beteiligt sind.

Deshalb stellen die MPCs im Hinblick auf autologe Knorpeltransplantationen, direkte intraartikuläre Zellinjektionen oder Tissue-Engineering eine potenziell interessante Alternative zu primären Chondrozyten, Fibrochondrozyten oder mesenchymalen Stammzellen dar. (Wobei dafür wahrscheinlich die Zellen der Außenzone des Meniskus interessanter als Zellquelle seien könnten, da sie sowohl quantitativ als auch qualitativ mehr von den Stammzellmarkern aufweisen und im Zonenvergleich erhöhte mRNA SOX-9 Level zeigen). Vorteil dieser Methode wäre, dass die MPCs aus dem nativen Meniskusgewebe bereits den passenden Phänotyp besäßen, autolog gewonnen werden könnten und somit auch keine Immunreaktionen zu befürchten wären.

Allerdings bleibt dafür noch eine Reihe von Fragen zu klären.

Es bleibt offen, inwieweit die MPCs in der Lage sind, eine extrazelluläre Matrix zu produzieren, die die Eigenschaften von gesundem Faserknorpel und dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischem Stress hat. Der gesunde Meniskus hat eine heterogene Struktur mit verschiedenen Zellarten und Kollagenverteilungsmustern, entsprechend der einzelnen Zonen (Son und Levenston 2012). Ob die MPCs in der Lage sind, diese heterogene Struktur suffizient zu reproduzieren, bedarf weiterer Untersuchungen. So stellt beispielsweise die mechanische Belastung auf die Meniskus Innenzone wahrscheinlich ein Hindernis für die Migration und suffiziente Gewebsregeneration durch multipotente Progenitorzellen dar (Mauck et al. 2007).

## 6. Literaturverzeichnis

Alegre-Aguaron E, Desportes P, Garcia-Alvarez F, Castiella T, Larrad L, Martinez-Lorenzo MJ (2012): Differences in surface marker expression and chondrogenic potential among various tissue-derived mesenchymal cells from elderly patients with osteoarthritis. *Cells Tissues Organs* 196, 231-240

Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, Yoo J (2008): Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A* 85, 445-455

Arnoczky SP, Warren RF (1982): Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 10, 90-95

Baker BE, Peckham AC, Puppato F, Sanborn JC (1985): Review of meniscal injury and associated sports. *Am J Sports Med* 13, 1-4

Barry FP (2003): Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 250-256

Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber (2011): OA Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377, 2115-2126

Beaufils P, Verdonk R: *The Meniscus*, 1.Auflage; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2010

Bernstein P, Sperling I, Corbeil D, Hempel U, Fickert S (2012): Progenitor cells from cartilage-No osteoarthritis-grade-specific differences in stem cell marker expression. *Biotechnol Prog*

Bhattacharyya T, Gale D, Dewire P, Totterman S, Gale ME, McLaughlin S, Einhorn TA, Felson DT (2003): The clinical importance of meniscal tears demonstrated by magnetic resonance imaging in osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 85-A, 4-9

Bloeker K, Wirth W, Hudelmaier M, Burgkart R, Frobell R, Eckstein F(2011): Morphometric Differences between the Medial and Lateral Meniscus in Healthy Men - A Three-Dimensional Analysis Using Magnetic Resonance Imaging. *Cells Tissues Organs*;195(4):353-64

Bullough PG, Munuera L, Murphy J, Weinstein AM (1970): The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg Br* 52, 564-567

Campbell SE, Sanders TG, Morrison WB (2001): MR imaging of meniscal cysts: incidence, location, and clinical significance. *AJR Am J Roentgenol* 177, 409-413

Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D (2008): Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 11, 343-353

Cheng A, Genever PG (2010): SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* 25, 2680-2689

Cook JL, Fox DB (2007): A novel bioabsorbable conduit augments healing of avascular meniscal tears in a dog model. *Am J Sports Med* 35, 1877-1887

Dahaghin S, Bierma-Zeinstra SM, Ginai AZ, Pols HA, Hazes JM, Koes BW (2005): Prevalence and pattern of radiographic hand osteoarthritis and association with pain and disability (the Rotterdam study). *Ann Rheum Dis* 64, 682-687

Dandy DJ (1990): The arthroscopic anatomy of symptomatic meniscal lesions. *J Bone Joint Surg Br* 72, 628-633

Darling EM, Athanasiou KA (2005): Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res* 23, 425-432

Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, Shahram F, Nikbin B (2011): Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *Int J Rheum Dis* 14, 211-215

De Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K (2001): Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13, 721-727

De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom (2011): A Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology* 75, 1431-1443

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal

stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317

Dudics V, Kunstar A, Kovacs J, Lakatos T, Geher P, Gomor B, Monostori E, Uher F (2009): Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: measurements in a microculture system. *Cells Tissues Organs* 189, 307-316

Englund M, Lohmander LS (2004): Risk factors for symptomatic knee osteoarthritis fifteen to twenty-two years after meniscectomy. *Arthritis Rheum* 50, 2811-2819

Englund M, Guermazi A, Lohmander LS (2009): The meniscus in knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 35, 579-590

Englund M, Guermazi A, Gale D, Hunter DJ, Aliabadi P, Clancy M, Felson DT (2008): Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. *N Engl J Med* 359, 1108-1115

Eyre DR, Wu JJ (1983): Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett* 158, 265-270

Ferrer-Roca O, Vilalta C (1980): Lesions of the meniscus. Part I: Macroscopic and histologic findings. *Clin Orthop Relat Res* 289-300

Forriol F (2009): Growth factors in cartilage and meniscus repair. *Injury* 40 Suppl 3, S12-16

Fuchs E, Tumber T, Guasch G (2004): Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116, 769-778

Fukubayashi T, Torzilli PA, Sherman MF, Warren RF (1982): An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation, and torque. *J Bone Joint Surg Am* 64, 258-264

Furumatsu T, Kanazawa T, Yokoyama Y, Abe N, Ozaki (2012): Inner meniscus cells maintain higher chondrogenic phenotype compared with outer meniscus cells. *Connect Tissue Res* 52, 459-465

Gardner E, O'Rahilly R (1968): The early development of the knee joint in staged human embryos. *J Anat* 102, 289-299

Ghadially FN, Lalonde JM, Wedge JH (1983): Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 136, 773-791

Guisasola I, Vaquero J, Forriol F (2002): Knee immobilization on meniscal healing after suture: an experimental study in sheep. *Clin Orthop Relat Res* 227-233

Gunja NJ, Athanasiou KA (2007): Passage and reversal effects on gene expression of bovine meniscal fibrochondrocytes. *Arthritis Res Ther* 9, R93

Gupte CM, Bull AM, Thomas RD, Amis AA (2003): The meniscofemoral ligaments: secondary restraints to the posterior drawer. Analysis of anteroposterior and rotary laxity in the intact and posterior-cruciate-deficient knee. *J Bone Joint Surg Br* 85, 765-773

Hellio Le Graverand MP, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hart D, Natsume T, Rattner JB (2001): The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat* 198, 525-535

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

Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E (2009): Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 27, 878-887

Hunter DJ, Zhang YQ, Niu JB, Tu X, Amin S, Clancy M, Guermazi A, Grigorian M, Gale D, Felson DT (2006): The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 54, 795-801

Hunter DJ, Zhang YQ, Tu X, Lavalley M, Niu JB, Amin S, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson DT (2006): Change in joint space width: hyaline articular cartilage loss or alteration in meniscus *Arthritis Rheum* 54, 2488-2495

Ingman AM, Ghosh P, Taylor TK (1974): Variation of collagenous and non-collagenous proteins of human knee joint menisci with age and degeneration. *Gerontologia* 20, 212-223

Ito MM, Kida MY (2000): Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat* 197 Pt 4, 659-679

Jones DL, Wagers AJ (2008): No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 11-21

Kambic HE, McDevitt CA (2005): Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus. *J Orthop Res* 23, 142-149

Kambic HE, Futani H, McDevitt CA (2000): Cell, matrix changes and alpha-smooth muscle actin expression in repair of the canine meniscus. *Wound Repair Regen* 8, 554-561

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301

King (1936): The function of semilunar cartilages. *J Bone Joint Surg Am* 18-B:1069-1076

Kobayashi K, Fujimoto E, Deie M, Sumen Y, Ikuta Y, Ochi M (2004): Regional differences the healing potential of the meniscus-an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium. *Knee* 11, 271-278

Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4, 324-335

Koelling S, Miosge N (2009): Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1399-1405

Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, Okabe T, Ochiai T, Kamiya N, Rountree RB (2008): A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol* 316, 62-73

Krenn V, Kurz B, Krukemeyer MG, Knoess P, Jakobs M, Poremba C, Mollenhoff G (2010): Histopathological degeneration score of fibrous cartilage. Low- and high-grade meniscal degeneration. *Z Rheumatol* 69, 644-652

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG (2008): Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58, 26-35

Levy IM, Torzilli PA, Warren RF (1982): The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 64, 883-888

Li L, Shirazi-Adl A, Buschmann MD (2003): Investigation of mechanical behavior of articular cartilage by fibril reinforced poroelastic models. *Biorheology* 40, 227-233

Lin Z, Fitzgerald JB, Xu J, Willers C, Wood D, Grodzinsky AJ, Zheng MH (2008): Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J Orthop Res* 26, 1230-1237

Mandal BB, Park SH, Gil ES, Kaplan DL (2011): Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. *Biomaterials* 32, 639-651

Mauck RL, Martinez-Diaz GJ, Yuan X, Tuan RS (2007): Regional multilineage differentiation potential of meniscal fibrochondrocytes: implications for meniscus repair. *Anat Rec (Hoboken)* 290, 48-58

McDermott ID, Amis AA (2006): The consequences of meniscectomy. *J Bone Joint Surg Br* 88, 1549-1556

Mikic B, Johnson TL, Chhabra AB, Schalet BJ, Wong M, Hunziker EB (2000): Differential effects of embryonic immobilization on the development of fibrocartilaginous skeletal elements. *J Rehabil Res Dev* 37, 127-133

Miller RR, McDevitt CA (1991): Thrombospondin in ligament, meniscus and intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta* 1115, 85-88

Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR (1992): Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* 13, 67-97

Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP (2003): Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48, 3464-3474

Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, Dragomir A, Kalsbeek WD, Luta G, Jordan JM (2008): Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 59, 1207-1213

Noble J (1977): Lesions of the menisci. Autopsy incidence in adults less than fifty-five years old. *J Bone Joint Surg Am* 59, 480-483

Noble J, Hamblen DL (1975): The pathology of the degenerate meniscus lesion. *J Bone Joint Surg Br* 57, 180-186

Pavlova A, Garmer L, Cox K, Celeste R, Rosen V (2001): Developmental expression of BMPs and matrix proteins during meniscal morphogenesis. *Transactions*, vol.26,

Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK, D'Lima (2011): Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1132-1141

Peat G, McCarney R, Croft P (2001): Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann Rheum Dis* 60, 91-97

Petersen W, Tillmann B (1995): Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand* 66, 308-312

Petrosini AV, Sherman OH (1996): A historical perspective on meniscal repair. *Clin Sports Med* 15, 445-453

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147

Poehling GG, Ruch DS, Chabon SJ (1990): The landscape of meniscal injuries. *Clin Sports Med* 9, 539-549

Prockop DJ (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74

Qi Y, Feng G, Yan W (2012): Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis. *Mol Biol Rep* 39, 5683-5689

Raunest J, Hotzinger H, Burring KF (1994): Magnetic resonance imaging (MRI) and arthroscopy in the detection of meniscal degenerations: correlation of arthroscopy and MRI with histology findings. *Arthroscopy* 10, 634-640

Roemer FW, Guermazi A, Hunter DJ, Niu J, Zhang Y, Englund M, Javaid MK, Lynch JA, Mohr A, Torner J (2009): The association of meniscal damage with joint effusion in persons without radiographic osteoarthritis: the Framingham and MOST osteoarthritis studies. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 748-753

Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS (1995): Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartilage* 3, 261-267

Rosenberg TD, Paulos LE, Parker RD, Harner CD, Gurley WD (1987): Discoid lateral meniscus: case report of arthroscopic attachment of a symptomatic Wrisberg-ligament type. *Arthroscopy* 3, 277-282

Sandmann GH, Eichhorn S, Vogt S, Adamczyk C, Aryee S, Hoberg M, Milz S, Imhoff AB, Tischer T (2009): Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 91, 567-574

Schaffler A, Buchler C (2007): Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 25, 818-827

Schneider S, Schmitt G, Mau H, Schmitt H, Sabo D, Richter W (2005): [Prevalence and correlates of osteoarthritis in Germany. Representative data from the First National Health Survey]. *Orthopade* 34, 782-790

Schünke M, Schulte E, Schumacher U: Prometheus Lernatlas der Anatomie: Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2007, 440-443

Seedhom BB, Terayama K (1976): Knee forces during the activity of getting out of a chair with and without the aid of arms. *Biomed Eng* 11, 278-282

Shoemaker SC, Markolf KL (1986): The role of the meniscus in the anterior-posterior stability of the loaded anterior cruciate-deficient knee. Effects of partial versus total excision. *J Bone Joint Surg Am* 68, 71-79

Son M, Levenston ME (2012): Discrimination of meniscal cell phenotypes using gene expression profiles. *Eur Cell Mater* 23, 195-208

Spindler KP, Miller RR, Andrish JT, McDevitt CA (1994): Comparison of collagen synthesis in the peripheral and central region of the canine meniscus. *Clin Orthop Relat Res* 256-263

Stone KR, Rodkey WG, Webber R, McKinney L, Steadman JR (1992): Meniscal regeneration with copolymeric collagen scaffolds. In vitro and in vivo studies evaluated clinically, histologically, and biochemically. *Am J Sports Med* 20, 104-111

Tissakht M, Ahmed AM (1995): Tensile stress-strain characteristics of the human meniscal material. *J Biomech* 28, 411-422

Tucker B, Khan W, Al-Rashid M, Al-Khateeb H (2012): Tissue engineering for the meniscus: a review of the literature. *Open Orthop J* 6, 348-351

Verdonk PC, Forsyth RG, Wang J, Almqvist KF, Verdonk R, Veys EM, Verbruggen G (2005): Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 548-56

Voloshin AS, Wosk J (1983): Shock absorption of meniscectomized and painful knees: a comparative in vivo study. *J Biomed Eng* 5, 157-161

Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M (2002): Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 199-206

Walker PS, Erkman MJ (1975): The role of the menisci in force transmission across the knee. Clin Orthop Relat Res 184-192

Wang CJ, Walker PS (1974): Rotatory laxity of the human knee joint. J Bone Joint Surg Am 56, 161-170

Wirth CJ, Peters G, Milachowski KA, Weismeier KG, Kohn D (2002): Long-term results of meniscal allograft transplantation. Am J Sports Med 30, 174-181

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7, 211-228

## 7. Danksagung

Ich möchte sehr herzlich bei Herrn Prof. Miosge für die Möglichkeit der Promotion in seinem Labor und die sehr gute Betreuung bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Boguslawka Sadowski für ihre Geduld und die vielen hilfreichen Tipps in Bezug auf die Laborarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Dr. rer.nat Preuß für seine vielen Ratschläge und die Unterstützung bei der Gliederung der Arbeit herzlich bedanken.

## 8. Lebenslauf

Am 16. Januar 1987 wurde ich in Jena als Sohn von Katharina-Maria Krusche, geborene Günther, (Gymnasiallehrerin) und Dr. med. Ingo Krusche (Arzt) geboren. Von 1993 bis 1997 besuchte ich die 5.Grundschule in Eisenach und wechselte dann auf das Ernst-Abbe-Gymnasium in Eisenach, das ich bis 1999 besuchte. Ein Umzug im Jahr 1999 nach Erfurt machte einen erneuten Schulwechsel auf das Edith-Stein-Gymnasium nötig. Das Schuljahr 2003-2004 verbrachte ich in Großbritannien, wo ich die Chenderit School in Middleton Cheney, Oxfordshire, besuchte. Im Anschluss daran absolvierte ich die Oberstufe des Edith-Stein-Gymnasiums und legte dort 2006 mein Abitur ab.

Nach Vollendung des Abiturs leistete ich den Zivildienst in der Notaufnahme des Helios-Klinikum Erfurt (2006-2007). Im Anschluss daran nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Im Jahr 2009 schloss ich dort das erste Staatsexamen mit der Gesamtnote „gut“ ab. Im Rahmen des klinischen Studiums famulierte ich in den Fachbereichen Anästhesiologie (2010: Helios-Klinikum in Erfurt), Radiologie (2010: Royal Jordan Hospital in Amman, Jordanien), Unfallchirurgie (2011: Universitätsklinikum in Jena), Nephrologie (2012: Royal London Hospital in London, Großbritannien) und Innere Medizin (2012: Korle-Bu Hospital in Accra, Ghana). Im Sommersemester 2012 absolvierte ich ein Auslandssemester an der Medizinischen Universität Wien. Seit Februar 2013 bin ich im Praktischen Jahr. Mein erstes Tertial im Fach Neurologie leiste ich an der Universitätsmedizin Göttingen ab.

Die Arbeit zur Anfertigung der Promotion mit dem Thema „Identifizierung und Charakterisierung von Meniskus Progenitorzellen (MPCs)“ begann ich im August 2010 in der Arbeitsgruppe von Prof. Miosge. Für die Durchführung der Experimente nahm ich mir 9 Monate Zeit, für die ich mich vom Lehrbetrieb an der Universität befreien ließ.

Während meiner Studienzeit war ich in der Fachschaft Medizin aktiv und habe dort über mehrere Jahre verschiedene ehrenamtliche Ämter innegehabt (Mitglied des Fachschaftsparlamentes und der Studienkommission von 2009 bis 2013, Mitglied in mehreren Berufungsverfahren). Außerdem habe ich an verschiedenen Lehrkonzepten

mitgewirkt (Anatomietutorien 2008-2012, STÄPS-Tutor für Sonografie und klinisch neurologische Untersuchung 2012-2013, seit 2013 POLEMA Tutor).

Für meine studentischen Leistungen und außerstudentisches Engagement erhielt ich im Jahr 2010 das MWK-Stipendium des Landes Niedersachsen.