

Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik
Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Histologische Klassifikation für degenerativ geschädigte
Menisken – die Wnt-Signalwegsmodulatoren
RSPO2 und SFRP2 in humanem Meniskusgewebe**

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

vorgelegt von
Moritz Roth
aus Mainz

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. N. Miosge (Betreuer)

2. Berichterstatter/in: PD Dr. Martin Wachowski (Koreffferent)

3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Rainer Mausberg (Promotor-Vertretung)

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Klinische Grundlagen der Arthrose</i>	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Kernsymptome, Diagnose und Therapie	1
1.2 <i>Meniskus</i>	3
1.2.1 Anatomische und funktionelle Aspekte.....	3
1.2.2 Blut- und Nervenversorgung.....	4
1.2.3 Faserknorpel und Kollagenfasersystem	7
1.2.4 Extrazellulärmatrix des Meniskus	9
1.2.5 Zelltypen des Meniskus	9
1.3 <i>Degeneration des Meniskus</i>	11
1.3.1 Überblick und aktueller Stand der Forschung.....	11
1.3.2 Veränderungen der extrazellulären Matrix.....	12
1.3.3 Scoring-Systeme für Knorpelveränderungen.....	15
1.4 <i>Rolle des Wnt-Signalwegs in der Erforschung der Arthrose</i>	17
1.4.1 Wnt-Signalweg	17
1.4.2 Modulatoren des Wnt-Signalwegs RSPO2 und SFRP2	18
1.5 <i>Zielsetzung und eigene Fragestellung dieser Arbeit</i>	21
2 Material und Methoden	23
2.1 <i>Material</i>	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Medium und Reagenziensätze	24
2.1.2.1 Medium	24
2.1.2.2 Reagenziensätze.....	24
2.1.3 Stammlösungen, diverse Lösungen und Puffer	25
2.1.3.1 Stammlösungen	25

2.1.3.2	Diverse Lösungen	26
2.1.3.3	Pufferlösungen	27
2.1.4	Photochemikalien und Filtermembranen	28
2.1.5	Färbungen	28
2.1.6	Antikörper	29
2.1.6.1	Primärantikörper.....	29
2.1.6.2	Sekundärantikörper	30
2.1.7	Primer	30
2.1.7.1	Primerdesign	30
2.1.7.2	Primerliste	31
2.1.8	Geräte und Gebrauchswaren	31
2.1.9	Patientenkollektiv.....	32
2.1.10	Gewinnung des Probenmaterials.....	33
2.2	<i>Methoden</i>	34
2.2.1	Histologische Darstellungen	34
2.2.1.1	Präparation des Meniskusgewebes für die Histologie	34
2.2.1.2	Entwicklung des Degenerationsscores.....	37
2.2.1.3	Immunhistochemische Markierung von RSPO2 und SFRP2	37
2.2.2	Genexpressionsanalysen	38
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.2.2	RNA-Isolierung aus Meniskusgewebe.....	40
2.2.2.3	Umschreiben von RNA in cDNA.....	41
2.2.2.4	Meniskus-Housekeeping-Gen-Analyse	41
2.2.2.5	Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen.....	42
2.2.3	Proteinanalysen.....	42
2.2.3.1	Western Blot.....	42
2.2.3.2	Proteinisolierung aus Meniskusgewebe	43
2.2.3.3	SDS-PAGE.....	44
2.2.3.4	Blot.....	45
2.2.3.5	Proteinfärbung.....	46
2.2.3.6	Immunmarkierung	46
3	Ergebnisse	48

3.1	<i>Ergebnisse der histologischen Darstellungen</i>	48
3.1.1	Histologische Merkmale	51
3.1.1.1	Zeichen gering geschädigter Menisken	51
3.1.1.2	Zeichen schwer geschädigter Menisken	53
3.1.2	Degenerationsscore	55
3.1.3	Immunhistochemische Markierung von RSPO2 und SFRP2.....	57
3.2	<i>Ergebnisse der Genexpressionsanalysen</i>	58
3.2.1	Meniskus-Housekeeping-Gen-Analyse	58
3.2.2	Differenzierung zwischen gering und schwer geschädigten Menisken	60
3.3	<i>Ergebnisse der Proteinanalysen</i>	66
3.3.1	Nachweis der Proteine mittels Western Blot.....	66
4	Diskussion	69
4.1	<i>Diskussion der histologischen Darstellungen</i>	69
4.2	<i>Diskussion der Genexpressionsanalysen</i>	74
4.3	<i>Diskussion der Proteinanalysen</i>	78
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	80
7	Abbildungsverzeichnis	86
8	Anhang	88
8.1	<i>Patientenkollektiv</i>	88

Abkürzungsverzeichnis

α 2Makro	α 2-Makroglobulin
β 2Mikro	β 2-Mikroglobulin
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
Agg	Aggrekan
ANKH	<i>ankylosis progressive homolog</i>
APC	<i>adenomatous-polyposis-coli-protein</i>
APS	Ammonium-peroxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Axin	<i>axis inhibition protein</i>
BCP	<i>biphasic calcium phosphate</i>
BMI	<i>body-mass-index</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	Casein Kinase
col	Kollagen
CPPD	<i>calcium pyrophosphate dihydrat deposition</i>
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
e.V.	eingetragener Verein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENPP1	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1</i>
et al.	und andere
EZM	Extrazellulärmatrix
FCJ	<i>fibrocartilage junction</i>
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
GSK	Glykogen-Synthase-Kinase 3
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
HPRT1	Hypoxantin-Phosphoribosyltransferase-1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IHC	Immunhistochemie
k	Kilo
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton
LaA	Lamin-A
lat	lateral
LDL-Rezeptor	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
Lig.	Ligamentum
LRP	<i>LDL-receptor-related-protein</i>
LSAB-Methode	<i>labeled-strept-avidin-biotin-method</i>
M	Molar
m	männlich
M.	Musculus
mA	Milliampere
MAPK1	mitogen aktivierte Proteinkinase 1
med	medial
mg	Milligramm

MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSC	mesenchymale Stammzelle
N.	Nervus
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Octoxinol 9
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	Perimeniskaler Kapillarplexus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonukleinase
RPL13A	Ribosomales Protein L13a
RSPO2	<i>roof plate-specific spondin 2</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Realtime-PCR</i>
Runx-2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
S.	Seite
s.	siehe
SDHA	Succinat Dehydrogenase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek	Sekunde
SFRP2	<i>secreted frizzled-related protein 2</i>
SLRP	<i>small leucin-rich proteoglycan</i>
Sox-9	<i>sex determining region Y-box 9</i>

SYBR Green	Fluoreszenzfarbstoff
syn.	Synonym
TBS-T	<i>tris-buffered saline Tween</i>
TCF	T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEP	Total-Endoprothese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
vgl.	vergleiche
w	weiblich
wnt	Kunstwort aus „ <i>wingless</i> “ und „ <i>INT-1</i> “
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlagen der Arthrose

1.1.1 Überblick

„Die Arthrose ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung des erwachsenen Menschen“ (Michael et al. 2010). Eine Studie, welche in über 100 deutschen Städten Personen im Alter zwischen 18 und 79 Jahren medizinisch untersuchte und befragte, ergab, dass bei 27,7 % eine Arthrose mindestens einer Gelenkregion bestand. Als bedeutendste Risikofaktoren der Arthrose zeigten sich das Alter, Adipositas und die beruflichen Belastungsfaktoren der Personen (Schneider et al. 2005). Dass die Arthrose im Kniegelenk eine entscheidende Rolle spielt, belegte eine Mitgliederumfrage der Arthrose-Hilfe e.V. im Jahr 2000. Sie besagte, dass die durch Arthrose bedingten Beschwerden zu über 60 % im Knie lokalisiert sind (Engelhardt 2003).

Die Behandlungskosten der Arthrose belasten die Gesundheitssysteme westlicher Länder jährlich mit über sieben Milliarden Euro. Die Wahrscheinlichkeit, an einer Arthrose zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter, und in den USA tritt Arthrose bei 10 % aller Männer und 13 % aller Frauen im Alter über 60 Jahren auf (Zhang und Jordan 2010). Durch den demographischen Wandel in Deutschland muss daher mit steigendem Behandlungsbedarf gerechnet werden, da der Krankheitsprozess bisher nicht effektiv aufgehalten werden kann.

1.1.2 Kernsymptome, Diagnose und Therapie

Die Arthrose ist eine Erkrankung, welche das gesamte Gelenk mit all seinen Geweben betrifft (Goldring 2012). Grundlegend werden zwei Formen der nicht-entzündlichen Arthrose (syn. Arthrosis deformans, Osteoarthrose, degenerative Arthropathie, angloamerikanisch: *osteoarthritis*, *degenerative arthritis*) unterschieden. Die primäre Arthrose ist eine idiopathische Eigenerkrankung des Gelenks und beschreibt eine anlagebedingte Belastungsschwäche des Gelenkknorpels ohne bestimmte Vor- oder Grunderkrankungen. Es besteht ein Missverhältnis zwischen

Belastbarkeit und effektiver Belastung des Gelenks. Die sekundäre Arthrose zeichnet sich durch metabolische oder endokrinologische Ursachen, gelenksnahe Frakturen in der Anamnese oder durch angeborene Fehlstellungen (z.B. eine Varus- oder Valgusfehlstellung des Knies) aus. Die Folge ist ein chronisch degenerativer Knorpelverschleiß bzw. eine Knorpelzelldegeneration mit sekundärer Knochenläsion. Grundsätzlich kann jedes Gelenk betroffen sein, aber gehäuft tritt Arthrose an den Händen, Knien, Hüft- und Wirbelsäulengelenken auf.

Typische Beschwerden, welche sich im Laufe der Erkrankung manifestieren, sind ein anlauf- und belastungsabhängiger Schmerz. Die Arthrose kann allerdings vor dem Auftreten erster Beschwerden auch lange symptomlos verlaufen. Eine ausreichende Korrelation zwischen radiologischem Befund und Schmerz mit dem Fortschritt der Arthrose besteht nicht (Mallen et al. 2007). Anzeichen einer Arthrose im Endstadium können sich als Deformitäten, Gelenkergüsse (sekundär aktivierte Arthrose) oder Krepitationen widerspiegeln. Diagnostisch kommen daher neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung vor allem bildgebende Verfahren wie Röntgen, Computertomographie und Magnetresonanztomographie zum Einsatz. Wegweisend für die Diagnosestellung sind unter anderem Osteophytenbildungen, subchondrale Sklerosierungen und ein verschmälertes Gelenkspalt (Ashraf et al. 2011).

Primärprophylaxe kann der Entstehung des Knorpelschadens entgegenwirken oder diesen sogar ganz verhindern. Scheitert diese, stehen für die Behandlung der Arthrose zahlreiche Therapiekonzepte wie Krankengymnastik, symptomatische Schmerztherapie, Knorpeltransplantation, arthroskopische Techniken bis zum operativen Einsatz einer TEP (Total-Endoprothese) des geschädigten Gelenks zur Verfügung. In der Pathogenese der Kniearthrose (Gonarthrose) sind mit dem Knochen, dem Gelenkknorpel, der Synovialis und dem Meniskus alle wichtigen Komponenten des Kniegelenks beteiligt (MacMullan und McCarthy 2010). Die Menisken spielen aufgrund ihrer physiologischen Funktion eine Schlüsselrolle sowohl in der Entstehung als auch in der Progression einer Gonarthrose (Englund et al. 2012). Die früher bei Verletzung des Meniskus routinemäßig durchgeführte Meniskektomie führt Jahre später zu Gonarthrose (Jorgensen et al. 1987). Daher sollte sie heutzutage keine Therapieoption darstellen.

1.2 Meniskus

1.2.1 Anatomische und funktionelle Aspekte

Die Menisken sind c-förmige elastische Scheiben und befinden sich zwischen Femur und Tibiaplateau. Sie gleichen die mangelnde Kongruenz und Kontaktfläche zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau aus. Im Querschnitt sind sie keilförmig. Neben der verbesserten Gewichtsverteilung sorgen sie auch für Stabilität und Stoßdämpfung im Kniegelenk (Verdonk et al. 2005). Aufgrund ihrer Funktion können sie als bewegliche Gelenkpfannen beschrieben werden. In jedem Kniegelenk befindet sich ein lateral und ein medial gelegener Meniskus, wobei der laterale Meniskus eine stärkere Krümmung und erhöhte Beweglichkeit während der Knieflexion aufweist. Der Meniskuskörper liegt zwischen Vorder- und Hinterhorn. Sowohl der mediale als auch der laterale Meniskus sind über Bandstrukturen am Tibiaplateau, die Vorderhörner an der Area intercondylaris anterior, die Hinterhörner an der Area intercondylaris posterior fixiert (Kapandji 2009). An ihrem konvexen Rand sind sie mit der Gelenkkapsel verbunden. Diese Verbindung wird auch als Ligamentum coronare bezeichnet. Der mediale Meniskus besitzt an dieser Region zusätzlich eine Beziehung zum medialen Kollateralband, was ihn bei forcierten Außenrotationstraumata mit Valgusstress erheblich gefährdet. Das Ligamentum transversum genu verbindet die Vorderhörner des medialen und des lateralen Meniskus (Sintzoff et al. 1992). Die Ligamenta meniscofemoralia ziehen vom Hinterhorn des lateralen Meniskus zur medialen Femurkondyle. Dabei setzt das sogenannte Wrisberg-Band (Lig. meniscofemorale posterius) dorsal und das sogenannte Humphrey-Band (Lig. meniscofemorale anterius) ventral des hinteren Kreuzbandes an (Beaufils und Verdonk 2010). Sie fungieren synergistisch mit dem hinteren Kreuzband, jedoch ist ihre Ausprägung variabel. Für die Lage der Menisken innerhalb des Knies s. Abbildung 1.

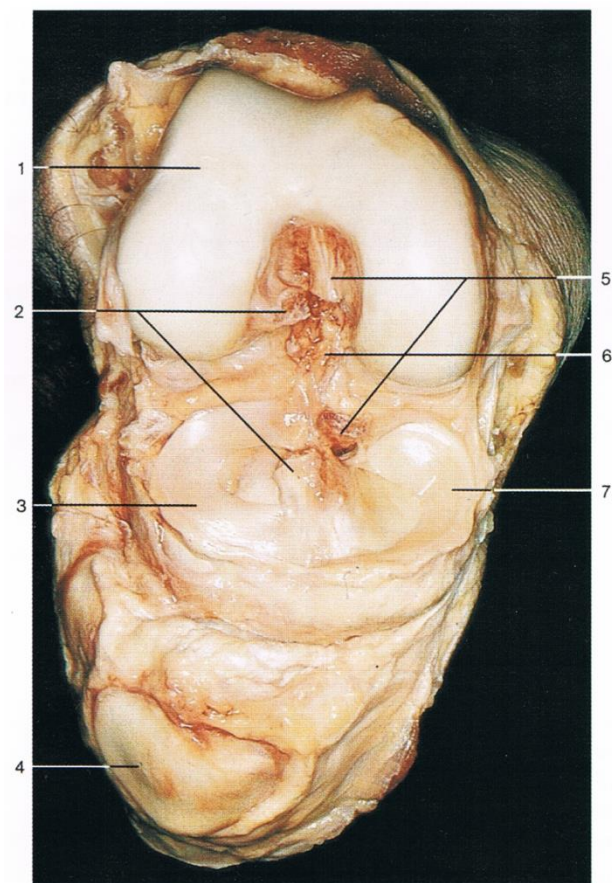


Abbildung 1: Kniegelenk in Beugestellung

Die Abbildung zeigt ein menschliches Kniegelenk im natürlichen Präparat in Flexionsstellung, woraus die Lage des medialen [7] und lateralen [3] Meniskus ersichtlich wird.

1 = Femur, 2 = Ligamentum cruciatum anterius, 3 = Meniscus lateralis, 4 = Patella, 5 = Ligamentum cruciatum posterius, 6 = Lig. meniscofemorale posterius, 7 = Meniscus medialis. Modifiziert nach Rohen (2006), S. 447

1.2.2 Blut- und Nervenversorgung

Petersen und Tillmann haben gezeigt, dass kurz nach der Geburt die Menisken noch vollständig durchblutet sind. Dies ändert sich mit zunehmendem Alter und bereits mit anderthalb Jahren kann ein innerer, avaskulärer Bereich abgegrenzt werden. Dieser breitet sich von innen nach außen aus und bei Erwachsenen resultiert lediglich eine äußere, vaskularisierte Zone (Petersen und Tillmann 1995). Diesem Sachverhalt nach folgt die Einteilung des Meniskus in eine innere (weiße), mittlere (rot-weiße) und äußere (rote) Zone, s. Abbildung 2.

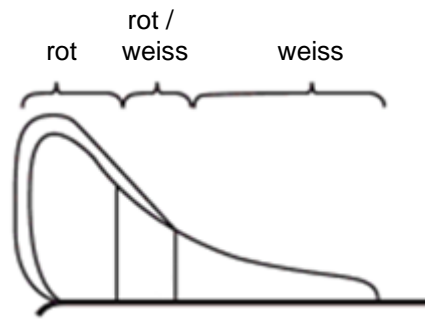


Abbildung 2: Zonale Einteilung des Meniskus anhand der Blutversorgung

Schematische Übersicht eines Meniskus im Querschnitt. Die Vaskularisierung nimmt von außen (rot) nach innen (weiß) stetig ab. Modifiziert nach Beaufils und Verdonk (2010), S. 22

Der Rückgang der Durchblutung scheint ein Tribut an die Last des Körpergewichts und der Kniebewegungen zu sein (Arnoczky und Warren 1982). Eine Studie von King an Hundemenisken konnte zeigen, dass Verletzungen in durchbluteten Regionen der Menisken sich positiv auf deren Heilungschancen auswirken (King 1990). Die avaskulären Zonen werden über Diffusion aus den Gefäßen sowie durch Konvektion über die Synovia ernährt (Petersen und Tillmann 1999). Die Grenze, bis zu welcher die Blutversorgung nach innen zieht, wird auch als FCJ (*fibrocartilage junction*) bezeichnet (Ashraf et al. 2011). Das Blut erreicht die Menisken über die A. poplitea bzw. deren Nebenäste (A. genus media, Aa. superiores et inferiores laterales genus und die Aa. superiores et inferiores mediales genus). Diese Nebenäste bilden einen äußeren perimeniskulären Plexus, welcher auch mit der Gelenkkapsel kommuniziert. Ein markanter avaskulärer Bereich der äußeren Zone findet sich am lateralen Meniskus im Bereich des Ursprungs der Sehne des M. popliteus. Einen Überblick über die Vaskularisierung eines Meniskus im Querschnitt zeigt Abbildung 3. Für einen Seitenvergleich beider Menisken s. Abbildung 4.

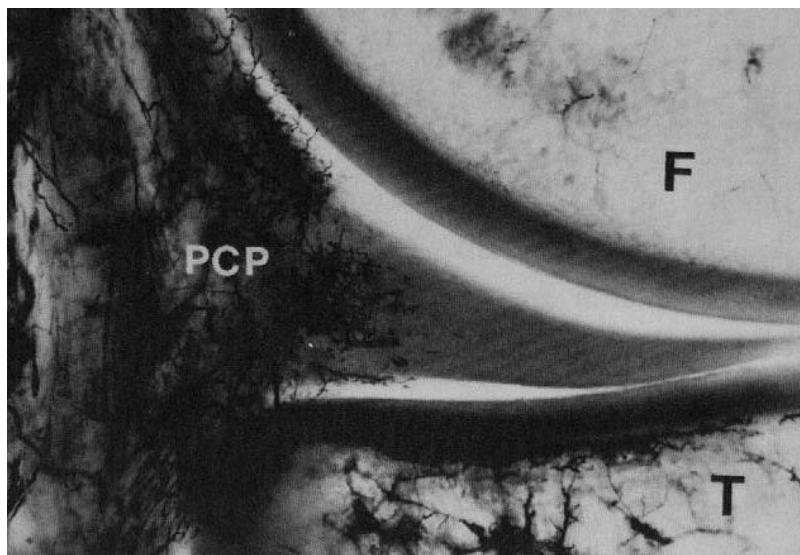


Abbildung 3: Querschnitt durch das mediale Kompartiment eines Knies

Die Abbildung zeigt einen 5 mm dicken Frontalschnitt aus einem Autopsiepräparat des Kniegelenks. Die arterielle Gefäßanfärbung erfolgte durch *India ink*.

PCP = perimeniskaler Kapillarplexus, F = Femur, T = Tibia. Modifiziert nach Arnoczky und Warren (1982)

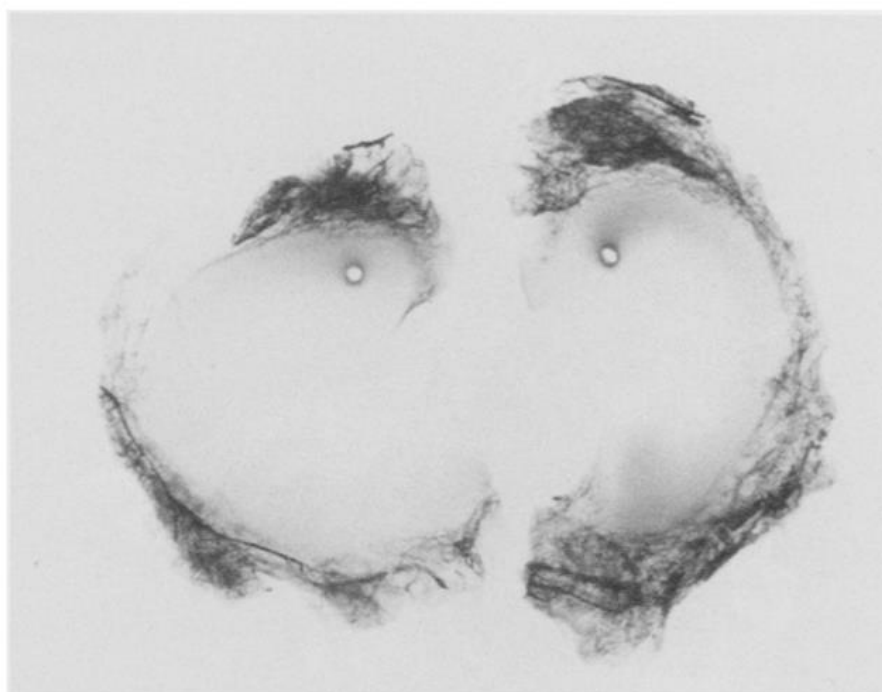


Abbildung 4: Blutversorgung

In der Abbildung sind ein lateraler (links) und ein medialer Meniskus (rechts) eines Erwachsenen dargestellt. Es fällt die stärkere Krümmung des lateralen Meniskus sowie die avaskuläre Zone im Bereich des Ursprungs des M. popliteus auf. Modifiziert nach Day et al. (1985)

Den Ursprung der nervalen Versorgung des Knies bilden der N. obturatorius, N. tibialis und der N. peroneus communis. Die Versorgung der Menisken verläuft vorwiegend in deren Peripherie und ist an den Verlauf der Gefäße assoziiert. Vereinzelt ziehen auch Axone radiär von außen nach innen und es findet sich eine erhöhte nervale Versorgung im Bereich der Meniskushörner. Die inneren zwei Drittel der Menisken sind nicht innerviert (Day et al. 1985). Auch Mechanorezeptoren und Golgi-Rezeptoren können im perimeniskalen Bereich nachgewiesen werden (Kennedy et al. 1982). Die Lymphversorgung folgt im Wesentlichen dem Lauf der Gefäße (Petersen und Tillmann 1995).

1.2.3 Faserknorpel und Kollagenfasersystem

Knorpelgewebe bildet zusammen mit Knochengewebe das Stützgewebe des menschlichen Körpers. Je nach Zusammensetzung der Extrazellulärsubstanz und des Faseranteils wird zwischen hyalinem, elastischem oder faserigem Knorpel unterschieden (Kuettner 1992). Im menschlichen Körper befindet sich Faserknorpel an Stellen, an denen enorme Scherkräfte wirken wie z.B. im Anulus fibrosus des Discus intervertebralis, der Symphysis pubica oder dem Meniskus. Faserknorpel besitzt kein Perichondrium und ist ein straffes, druckfestes Gewebe. Er kann als eine Art Übergangsgewebe von hyalinem Knorpel und straffem Bindegewebe angesehen werden (Benjamin und Evans 1990). Charakteristisch ist eine im Vergleich zu hyalinem Knorpel höhere Anzahl an Zellen sowie eine höhere Dichte an Kollagenfibrillen. Der Gehalt an Kollagen-Typ I liegt mit mindestens 80 % signifikant höher verglichen mit anderen Knorpelgeweben. Die Orientierung der Kollagenfasern lässt Rückschlüsse auf deren Funktion zu, da laut der Pauwel'schen Theorie die Struktur eines Gewebes in unmittelbarem Zusammenhang zu dessen Beanspruchung steht. So führt hydrostatischer Druck zu Bildung von hyalinem Knorpel, Dehnung und Zugbelastung induziert die Entstehung von straffem kollagenfaserigem Bindegewebe (Pauwels 1960). Bei intermittierender Druck- und Schubbeanspruchung entsteht Faserknorpel (Petersen und Tillmann 1999). Der Faserverlauf der Kollagenfibrillen innerhalb des Meniskus ist komplex. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen von Bullough wurden von Aspden durch Röntgendiffraktion sowie später durch rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse auch von Petersen bestätigt (Aspden et al. 1985; Bullough et al. 1970; Petersen und

Tillmann 1999). Die Meniskusoberfläche wird von feinen netzartig verlaufenden Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 10-20 nm bedeckt, welchen keine eindeutige Richtung zugewiesen werden kann. Darunter liegt zentral der Hauptteil der Kollagenfibrillen, die sich zu 120 µm dicken lamellenartigen straffen Faserbündeln zusammenlagern und in der inneren als auch in der äußeren Zirkumferenz zirkulär verlaufen. Sie nehmen die axial wirkende Kraft von Femur zu Tibia auf und werden in der inneren und mittleren Zirkumferenz teilweise von radiär verlaufenden Fasersystemen durchbrochen (Petersen und Tillmann 1999). Entsprechend diesen Faserverläufen lässt sich das Auftreten von den in der äußeren Zirkumferenz vorkommenden Meniskuslängs- und Korbhenkelrissen und den innen vorkommenden Radiärrissen erklären. Der Faserverlauf der Kollagenfibrillen des Meniskus wird aus Abbildung 5 ersichtlich.

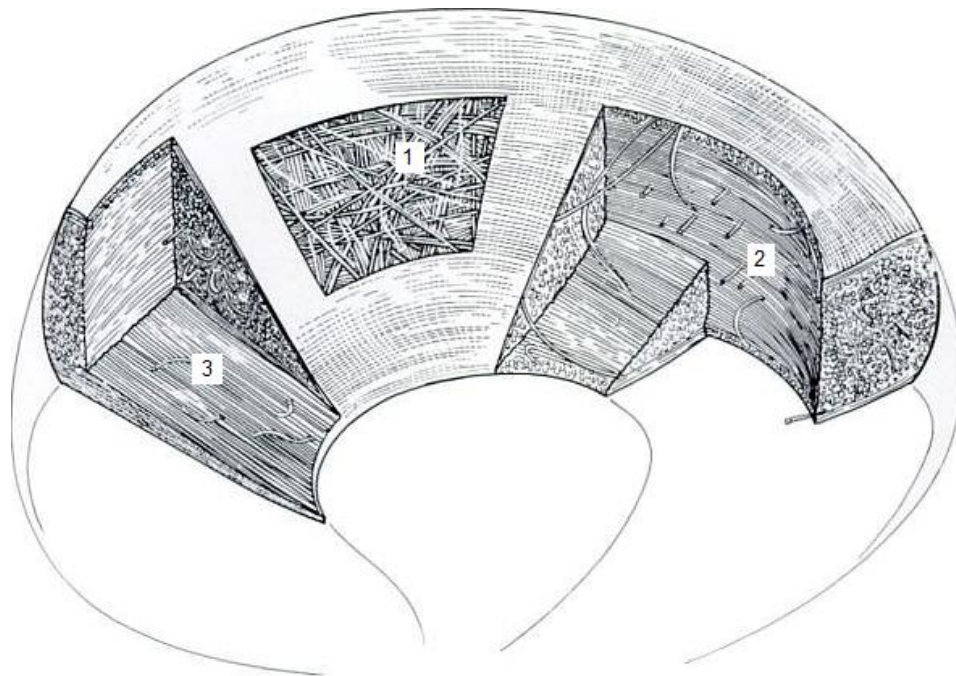


Abbildung 5: Faserverlauf innerhalb des Meniskus

Die Abbildung zeigt den unterschiedlichen Faserverlauf der Kollagenfibrillen eines Meniskus.

1 = oberflächliche Fasern ohne klare Orientierung, 2 = zirkulärer Verlauf lamellenartiger Faserbündel, 3 = radial verlaufende Fasern. Modifiziert nach Bullough et al. (1970), s.565.

1.2.4 Extrazellulärmatrix des Meniskus

Über die exakte Zusammensetzung und Funktion der Extrazellulärmatrix und deren Wandel mit dem Alter ist wenig bekannt. Der Meniskus wird als Faserknorpel bezeichnet, da er die Charaktere von Knorpel und faserigem Bindegewebe vereint. Die biochemische Zusammensetzung des Meniskus weist 72 % Wasser und 28 % organisches Material auf, welches vorrangig aus EZM (Extrazellulärmatrix) und Zellen besteht. Der organische Bestand lässt sich weiter in 75 % Kollagene, 17 % GAG's (Glykosaminoglykane), ca. 2 % DNA (Desoxyribonukleinsäure), unter 1 % Adhäsionsproteine und unter 1 % Elastin unterteilen. Auch wenn geringe Mengen an Kollagen-Typ II, III, IV und XVIII gemessen werden können, überwiegt Kollagen-Typ I mit 80 % des organischen Trockengewichts (Makris et al. 2011). Kollagen besteht aus einer rechtsgängigen Triplehelix, welche durch Zusammenlagerung von drei linksgängigen Kollagen- α -Ketten gebildet wird. Kollagen ist das häufigste Protein im menschlichen Körper und der fibrilläre Kollagen-Typ I ist Bestandteil des Knochens, des straffen Bindegewebes und des Faserknorpels. Glykosaminoglykane bzw. saure Mukopolysaccharide sind lange Kohlenhydratketten, welche ein großes Wasserbindungspotenzial haben. Somit verleihen sie dem Knorpel Druck- und Stoßfestigkeit. Proteoglykane machen ca. 2-3 % des Trockengewichts aus und konzentrieren sich in der inneren Zone des Meniskus (Mauck et al. 2007). Zu den wesentlichen Proteoglykanen des Knorpels zählen Aggrekan, Dekorin, Biglykan und Fibromodulin. Das dominierende Aggrekan ist über Linker-Proteine mit Hyaluronan verknüpft und besitzt Chondroitinsulfat- und Keratansulfat-Seitenketten. Aggrekan spielt eine entscheidende Rolle im Erhalt der Elastizität, der Stoßfestigkeit und der Gewebehydratation des Meniskus (Verdonk et al. 2005).

1.2.5 Zelltypen des Meniskus

Im Meniskus befinden sich vorwiegend drei Zelltypen, s. Abbildung 6. Zunächst fallen die länglichen ovalen bis fusiformen Zellen im vaskulären äußeren Drittel auf. Sie ähneln Fibroblasten und vermutlich nehmen sie diese längliche Form aufgrund der Zugkrafteinwirkung auf den Meniskus ein (Hoberg et al. 2006). Sie produzieren hauptsächlich Kollagen-Typ I und stehen über zahlreiche Projektionen mit der Umgebung in Kontakt (Mauck et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass diese

Zellen neben Gap-junctions auch den für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Marker CD34 exprimieren sowie die Proteasen MMP-2 und MMP-3 (Sanchez-Adams und Athanasiou 2009).

Im Vergleich dazu sind die Zellen im Inneren des Meniskus rund bis rund-oval mit einer großen Menge an endoplasmatischem Retikulum und EZM. In diesem avaskulären Bereich des Meniskus sitzen sie vereinzelt oder in Kleingruppen in Lakunen (Verdonk et al. 2005). Im Gegensatz zur äußeren Region wirken dort besonders Kompressionskräfte (Hoberg et al. 2006). Überwiegend lassen sich Kollagen-Typ I und Kollagen-Typ II sowie GAGs nachweisen, was den Merkmalen von hyalinem Knorpel ähnelt. Zell-Zell-Kontakte existieren nicht (Sanchez-Adams und Athanasiou 2009). Da diese Zellen die Eigenschaften von Fibroblasten und Chondrozyten vereinen, werden sie als Fibrochondrozyten bezeichnet (Webber et al. 1985).

Der dritte, schmale bis spindelförmige Zelltyp, findet sich entlang der Oberfläche und steht somit in Kontakt zur Gelenksflüssigkeit (Hoberg et al. 2006). Diese Zellen der Oberflächenzone besitzen ebenfalls keine Gap-junctions (Sanchez-Adams und Athanasiou 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Zellen des Meniskus in ihrer Form und Proteinbildung an ihre Umgebung und an die an sie gestellten Anforderungen anpassen. Eine Analyse der zellulären Biomechanik ergab, dass die Steifigkeit sowohl der inneren als auch der äußeren Meniskuszellen der Steifigkeit von Tenozyten gleichen. In Bezug auf ihre Druckeigenschaften zeigten sich Ähnlichkeiten zwischen den inneren Meniskuszellen und Zellen des Gelenkknorpels sowie den äußeren Meniskuszellen und Tenozyten (Sanchez-Adams und Athanasiou 2012).

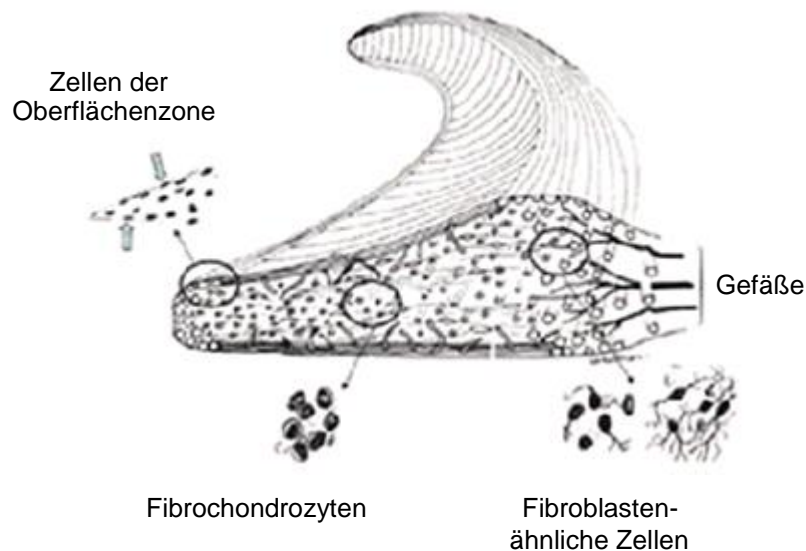


Abbildung 6: Zelltypen des Meniskus

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung eines Meniskus im Querschnitt. Zu erkennen sind die drei Zelltypen des Meniskus mit ihrer typischen Lokalisierung.

In der Außenzone liegen längliche fibroblastenähnliche Zellen mit fusiformer Gestalt. Im Inneren des Meniskus finden sich die rund-ovalen Fibrochondrozyten. Die Zellen der Oberfläche sind schmal bis spindelförmig. Modifiziert nach Beaufils und Verdonk (2010), S. 22

1.3 Degeneration des Meniskus

1.3.1 Überblick und aktueller Stand der Forschung

Die Menisken spielen sowohl als Stoßdämpfer als auch in der Gewichtsverteilung eine entscheidende Rolle für den Schutz des Kniegelenks. Eine progrediente Meniskusdegeneration führt zu einem Funktionsverlust dieser notwendigen Schutzfunktion und geht mit multiplen Veränderungen der Mechanik und der molekularen Zusammensetzung des Meniskusgewebes einher (Brindle et al. 2001). Die Meniskusdegeneration stellt eine frühe Veränderung des Krankheitsprozesses der Arthrose dar und ist ein prädisponierender Faktor dieser (Sun und Mauerhan 2012). Allerdings wirft die Meniskusdegeneration bisher ungeklärte Fragen auf. Sind die asymptomatischen Meniskusrisse, welche unter MRT-Studien bei Patienten mittleren und fortgeschrittenen Alters gefunden werden können, Folge eines degenerativen Prozesses oder folgt auf ein Trauma die Degeneration (Englund et al. 2009)? Eine degenerationsbedingte Verletzung bei beginnender Gonarthrose sollte eine ursachengerechte und zielgerichtete Therapie zur Folge haben (Englund 2008).

2005 bewies Christoforakis in einer 497 Patienten umfassenden Studie den Zusammenhang von Gelenkknorpeldegeneration und Verletzung des Meniskus. Komplexe und horizontale Meniskusrisse waren stark mit degenerativen Schäden des Gelenkknorpels assoziiert (Christoforakis et al. 2005). Eine abschließende Antwort auf diese Frage ist noch ausstehend.

Ein Ziel der modernen Wissenschaft ist es, frühe Anzeichen einer Erkrankung z.B. mittels Biomarkern zu ermöglichen. In einer Studie durch Melrose wurde ein Anstieg der Fragmentierung von SLRP's (*small leucin-rich proteoglycans*) in Verbindung mit der Degeneration von Gelenkknorpel und Meniskus berichtet. Diese SLRP's spielen unter anderem eine Rolle in der Gewebeorganisation, Zellproliferation und Matrixadhäsion. Ebenso schützen sie die Kollagenfibrillen vor deren Abbau. Melrose und seine Arbeitsgruppe postulierten, dass diese Dekorin-Kern-Fragmente als Biomarker für Arthrose in Frage kämen und die Enzyme, welche diese produzierten, als Ziel für Therapien dienen könnten (Melrose et al. 2008). Auch Dankof und Krenn stellten die Frage nach Arthrosemarkern und konnten in einer Studie das Protein C4d und CD68-positive Makrophagen an Orten mit degenerativen Anzeichen nachweisen (Dankof und Krenn 2006).

1.3.2 Veränderungen der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix ist eine komplexe und strukturierte Ansammlung von Grundsubstanz und Fasern. Für den Meniskus gilt, dass die Degradation bereits *einer* Komponente zur Degeneration führt (Krenn et al. 2010). Die pathophysiologischen Vorgänge dieses Geschehens sind bisher nicht hinreichend verstanden und werden in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert. Eine zentrale Rolle spielt sicherlich der Umsatz des Aggrekans. Aggrekan ist das führende Proteoglykan des Meniskus und dient der Elastizität und der Kompressionsstabilität. Es wird durch die Aggrekanase ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) und durch MMP's (Matrix-Metalloproteinasen) gespalten. McAlinden konnte in einer Studie demonstrieren, dass die Synthese und der Umsatz an Aggrekan und Dekorin im Meniskus vom Alter beeinflusst werden. Dekorin ist ein kleines, leucinreiches Proteoglykan mit nur wenigen GAG-Seitenketten. Unterhalb des 20. Lebensjahres war die allgemeine Proteoglykansynthese höher verglichen mit

Erwachsenen, und Dekorin stellte das häufigste Proteoglykan dar. Mit zunehmendem Alter stieg der Anteil des Aggrekans an. Die Präparate dieser Studie stammten aus einem Patientenkollektiv, welches aufgrund von Knochentumoren operiert wurde und sich makroskopisch als unauffällig darstellte (McAlinden et al. 2001). Ein vermeintlicher Schutz vor Schädigungen durch die stoßdämpfende Funktion des Aggrekans könnte also auch bei kniegesunden im Alter vorhanden sein. Diese These unterstützt eine Untersuchung von Majumdar im Jahr 2007. Ein doppelter Knock-out der Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 konnte dort in einem Mausmodell belegen, dass der damit verbundene geringere Proteoglykanabbau innerhalb des Gelenkknorpels einen Schutz vor Osteoarthrose bot (Majumdar et al. 2007). Auch die Arbeiten von Krenn 2010 und Lark 1997 wiesen darauf hin, dass es beim Pathomechanismus der Arthrose des Gelenkknorpels sowie des Meniskus zu einem gesteigerten Aggrekansmetabolismus kommt (Krenn et al. 2010; Lark et al. 1997).

Die Degradation des Faserknorpels bei gleichzeitiger Zunahme der mukoiden Grundsubstanz, bestehend aus Glykoprotein und Mukoprotein, wird auch als mukoide Degeneration bezeichnet. Es wurde beschrieben, dass es zu einem exzessiven Anstieg von Proteoglykanen im Interstitium kommt. Ferrer-Roca und Vilalta sahen in der mukoiden Degeneration eine Antwort auf mechanische Belastungen und erklärten diese Form zu einer unspezifischen Antwort auf Verletzungen im Sinne der physiologischen Folge von Belastung (Ferrer-Roca und Vilalta 1980). Ähnlich sehen es McDevitt und Muir und beschrieben einen Anstieg der Proteoglykane als Reaktion auf die mechanische Beanspruchung (McDevitt und Muir 1976). Boya hielt diese Form nicht für eine physiologische Degeneration, da seine Studie keine Korrelation zum Alterungsprozess ergab (Boya et al. 2004).

Einen weiteren Hinweis zur Pathophysiologie der Degeneration des Meniskus könnten Runx-2 (*runt-related transcription factor 2*) und Sox-9 (*sex determining region Y-box 9*) geben. Runx-2 ist ein Transkriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung und somit auch des Kollagen-Typs I. Es induziert die Expression von Matrixkomponenten, welche für die Knochenbildung wichtig sind (Komori 2005). Sox-9, als Mitglied der Sox-Familie, ist ein Transkriptionsfaktor der chondrogenen Differenzierung und des Kollagen-Typs II (Ikeda et al. 2005). Für den Gelenkknorpel

des Knies konnte gezeigt werden, dass mit Progression der Arthrose nicht nur vermehrt mRNA für Kollagen-Typ II, sondern auch für Kollagen-Typ I produziert wird (Miosge et al. 2004). Hierbei muss beachtet werden, dass der Hauptbestandteil des hyalinen Gelenkknorpels Kollagen-Typ II und nicht wie im Faserknorpel des Meniskus Kollagen-Typ I ist. Sollte jedoch die Pathophysiologie der Arthrose des Gelenkknorpels auf den Meniskus übertragbar sein, wäre es denkbar, dass eine gesteigerte Bildung von Kollagen-Typ I mit Fortschritt der Arthrose für den Meniskus protektiv ist. Neben der Untersuchung des Kollagens ist es daher von Interesse, wie sich die beiden Transkriptionsfaktoren Runx-2 und Sox-9 in gesundem und degenerativem Meniskusgewebe präsentieren.

Um eine beginnende Arthrose zu simulieren, durchtrennte die Arbeitsgruppe um Hellio Le Graverand 2001 die vorderen Kreuzbänder von Kaninchen und untersuchte die Auswirkungen auf deren Menisken. Es kam zur Bildung zelloser Areale und Zellclustern des medialen Meniskus. Die immunhistochemische Untersuchung ergab einen Anstieg der Kollagen-Typen I und III in beiden Menisken und einen Anstieg des Kollagen-Typs II lediglich im medialen Meniskus (Hellio Le Graverand et al. 2001). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam Pauli. Pauli prüfte über 100 humane Menisken und stellte eine mit zunehmendem Alter und beginnender Degeneration einhergehende Verschiebung des Meniskusgewebes von fibrocartilaginär zu chondrogen fest. Entscheidende Veränderungen waren einerseits gesteigerte Anfärbbarkeit mit Safranin-O, andererseits eine Verringerung der Zellzahl mit azellulären Bereichen. Ebenso fiel eine mukoide Degeneration mit einem Verlust der Kollagenfaserarchitektur auf. Besonders bei Menisken aus arthrotischen Knien konnten Risse, Fibrillationen und Kalzifikationen gefunden werden (Pauli et al. 2011).

Ein weiteres Zeichen der Degeneration des Meniskus ist die Kalzifikation. Sun und Mauerhahn verglichen 2012 in einer Studie gesunde Meniskuszellen mit Zellen aus krankem Meniskusgewebe. Die kultivierten Zellen aus dem erkrankten Gewebe wiesen eine signifikant höhere Generierung von Kalziumkristallen auf. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Gene, welche bereits mit der Kalzifikation des Gelenkknorpels in Verbindung gebracht wurden, entsprechend hochreguliert waren, wie z.B. ANKH (*ankylosis progressive homolog*) und ENPP1 (*ectonucleotide*

pyrophosphatase/phosphodiesterase 1) (Sun und Mauerhan 2012). Bei den Kristallen, welche im Meniskus gefunden werden können, handelt es sich laut Krenn um CPPD (*calcium pyrophosphate dihydrat deposition*) (Krenn et al. 2010), laut Sun jedoch um BCP (*biphasic calcium phosphate*) (Sun und Mauerhan 2012). Ein Anstieg des Kalziumgehalts des Meniskus bei Progression der Arthrose wird auch 2001 von Habata beschrieben (Habata et al. 2001).

1.3.3 Scoring-Systeme für Knorpelveränderungen

Valide Daten über die Anwendung und Funktionalität histologischer Scoringssysteme bei degenerativen Meniskusveränderungen fehlen derzeit. Aussagekräftige Bewertungsschemata stellen jedoch die Grundlage für die Vergleichbarkeit von Forschungsergebnissen dar (Longo et al. 2012). Ein einheitlicher Score zur Abschätzung arthrosebedingter degenerativer Veränderungen für Menisken ist erforderlich, wenn mehr über die Pathophysiologie der Arthrose in Erfahrung gebracht werden soll. In der Vergangenheit wurde mangels eines geeigneten Scores auf verschiedene, teilweise modifizierte Bewertungssysteme, welche ursprünglich für den Gelenkknorpel entwickelt wurden, zurückgegriffen.

Mankin legte 1971 bei seinem für den Gelenkknorpel gedachten Schema, besonderes Augenmerk auf die Knorpelstruktur, die Zellverteilung, eine Safranin-O-Färbung und die Integrität der Tidemark. Punkte gab es von 0 bis 14, wobei 14 die höchstmögliche Schädigung darstellte (Mankin et al. 1971). Der Score wurde in modifizierter Form zur Bewertung des Meniskus herangezogen. Ochiai verwendete beispielsweise diesen Score, um Meniskusschäden, hervorgerufen durch oxidativen Stress, bei Mäusen zu analysieren (Ochiai et al. 2008).

Copenhaver erstellte 1978 eine lichtmikroskopische Klassifikation zur Bewertung des Ausmaßes der Degeneration des Gelenkknorpels mit Hilfe einer HE-Färbung (Bailey et al. 1978). Eine für den Meniskus modifizierte Abwandlung dieses Scores beruhte auf der Beurteilung der Anfärbung, des Grades der muzinösen, myxoiden und hyalinen Degeneration, der Zellularität und der Separation der Kollagenbündel. Ausgegeben wurde eine Bewertung von vier Schweregraden und genutzt wurde

dieser Score zum Beispiel von Habata (Habata et al. 2001) oder Boya (Boya et al. 2004).

Im Jahr 2000 entwickelte Rodeo einen Score, um die Zelltypen des Meniskus nach einer Meniskus-Allograft-Transplantation zu evaluieren (Rodeo et al. 2000). Vermutlich mangels Alternativen verwendete Mesiha diese Studie, um Aussagen über die Zellen in der Umgebung von verschiedenen Meniskusrissen zu treffen (Mesiha et al. 2007).

Der Score von Papadopoulos funktioniert im Sinne eines Gradings und wurde für diskoide Menisken entwickelt. Diskoide Menisken sind eine anatomische Variante, welche bei Symptombefreiheit ohne Therapie belassen werden. Beurteilt wurde mittels einer Van-Gieson-Färbung die Organisation des Kollagenfasersystems. Je höher die Wertung, desto besser der Aufbau des Kollagennetzwerks (Papadopoulos et al. 2009).

2011 entwickelte Pauli speziell für den Meniskus einen Score, welcher unter anderem eine zonale Bewertung der Degeneration des Meniskus miteinschloss. Entscheidende Kriterien waren hier die Oberflächenintegrität, Zellularität, Matrix- und Kollagenfaserorganisation und Intensität einer Safranin-O-Färbung. Werte von 0 – 18 Punkten konnten erreicht werden, welche wiederum in Grade 1-4 unterteilt wurden (Pauli et al. 2011).

Auch Krenn entwickelte 2010 einen Score. Im Wesentlichen wurden hier die eosinophile Grundsubstanz, Zellularität, und Matrix beurteilt. Ebenfalls konnte hier die Bewertung in vier Schwergraden ausgegeben werden. Als zusätzlichen Parameter nannte er extrazelluläres NITEGE, ein Hexapeptid und Spaltprodukt des Aggrecans, welches er mit der Degeneration in Verbindung brachte. Es ging jedoch nicht in die Bewertung des Scores mit ein (Krenn et al. 2010).

1.4 Rolle des Wnt-Signalwegs in der Erforschung der Arthrose

1.4.1 Wnt-Signalweg

Der Begriff Wnt ist ein Kunstwort aus den Wörtern „wg“ für „wingless“ und „nt“ für „Int-1“. Ein mutiertes wg-Gen löst bei *Drosophila-melanogaster* eine flügellose Variante aus. Das Int-Gen fördert die Entwicklung von Brustkrebs bei der Maus.

Wnt-Proteine sind sezernierte Glykoproteine bzw. Signalmoleküle, welche als lokale Botenstoffe und Morphogene wirken. Sie erfüllen verschiedene Aufgaben bei der Kontrolle der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Genexpression während der Entwicklung, aber auch in ausgereiften Geweben (Alberts et al. 2008). Durch ihre Mitwirkung an der Stammzellproliferation sind sie auch Bestandteil der Forschung im Bereich des *tissue engineering*s (Willert et al. 2003). In ihrer biochemischen Struktur tragen sie eine Fettsäurekette, welche sie zur Bindung an Rezeptoren der Zelloberfläche, sogenannten Frizzled-Rezeptoren, befähigt und wodurch sie eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Beim Menschen sind 19 verschiedene Wnt-Proteine bekannt, die mindestens über drei verschiedene Arten intrazelluläre Signalproteine aktivieren können. Diese Arten sind der Wnt/ β -catenin-Weg (kanonischer Wnt-Signalweg), der planare Polaritäts-Signalweg und der Wnt/Ca²⁺-Weg.

Die zentrale Rolle des kanonischen Signalwegs spielt β -catenin, welches genregulierend wirkt. In Abwesenheit eines aktivierenden Wnt-Signals, s. Abbildung 7A, ist β -catenin im Zytosol von einem Abbaukomplex aus APC (*adenomatous polyposis coli-protein*), Axin (*axis inhibition protein*), GSK 3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) und CK (Casein-Kinase) gebunden. Dies bewirkt eine Phosphorylierung und Ubiquitinierung des β -catenins und resultiert in dessen Abbau durch Proteasomen.

Bindet jedoch ein Wnt-Protein an einen Frizzled-Rezeptor, s. Abbildung 7B, und den Korezeptor LRP (*LDL-receptor-related-protein*) wird der Abbaukomplex an der Plasmamembran gebunden und inaktiviert (Alberts et al. 2008). Dies geschieht über

Dishevelled, welches die GSK3 inhibiert (Lodish et al. 2000). Die Ubiquitinierung wird gehemmt, sodass β -catenin akkumulieren kann und sich in den Zellkern verlagert. Dort hat β -catenin die Fähigkeit das Gentranskriptionsmuster zu verändern. Durch Bindung des C-Terminus des β -catenins an LEF-1/TCF-Proteine werden Korepressorproteine der Groucho-Familie verdrängt. β -catenin fungiert als Koaktivator und leitet die Transkription der entsprechenden Wnt-Zielgene ein (Alberts et al. 2008).

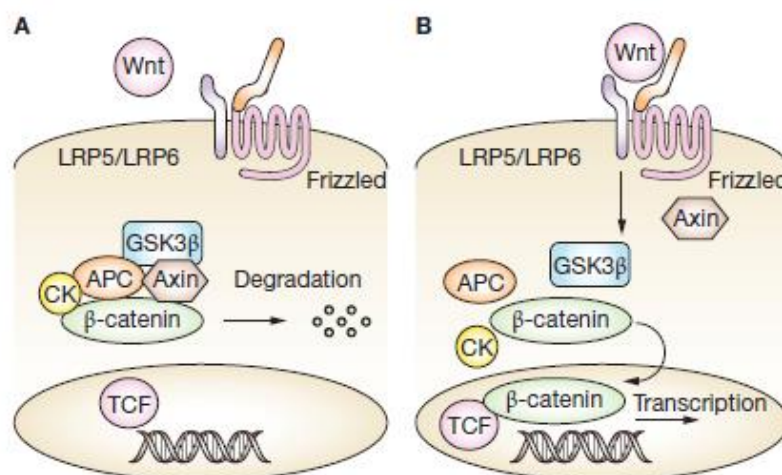


Abbildung 7: Wnt-Signalweg

Die Abbildung zeigt schematisch den inaktiven (A) und aktiven Wnt-Signalweg (B).

A: Inaktiver Wnt-Signalweg. In Abwesenheit des Wnt-Signals ist β -catenin im Abbaukomplex gebunden

B: Aktiver Wnt-Signalweg. Ein Wnt-Protein ist an den Frizzled-Rezeptor gebunden. Das β -catenin akkumuliert und verlagert sich in den Zellkern. Es resultiert die Transkription der Zielgene. Modifiziert nach Corr (2008), S. 552.

1.4.2 Modulatoren des Wnt-Signalwegs RSPO2 und SFRP2

Defekte im Wnt-Signalweg spielen in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle bei menschlichen bzw. tierischen Erkrankungen. Dazu zählen unter anderem Fehlbildungen in der Entwicklung (Nam et al. 2007), die Genese maligner Erkrankungen (Lodish et al. 2000) und eine bisher nicht vollständig verstandene Mitwirkung bei der Entstehung und Progression der Arthrose. Wnt-Proteine, Secreted frizzled-related Proteine, Dickkopf und LDL-Rezeptor-related Proteine und deren Genfamilie beeinflussen den Erhalt von Knochen, Knorpel und Gelenken. Ein aktiver Wnt-Signalweg und damit einhergehende hohe Werte an β -catenin konnten in

degenerativem Knorpel beobachtet werden, was vermuten lässt, dass eine fehlende Entschleunigung des Wnt-Signalwegs den Knorpelschwund fördert. Auch reagiert der Wnt-Signalweg auf mechanische Überlastung des Knorpels (Corr 2008; Dell'Accio et al. 2006). Knorpelzellen aus Kaninchen, welche in Wnt3a-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigten einen deutlichen Anstieg an Gelatinase-Aktivität, MMP 3- und 13 sowie den Proteasen ADAMTS 4- und 5. Dies lässt auf einen Wechsel von anabolem Charakter hin zu kataboler Aktivität, wie es typischerweise bei der Arthrose beobachtet werden kann, schließen. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte an Meerschweinchen zeigen, dass bei älteren Tieren ein höheres Level an β -catenin und damit auch an Wnt-Signalaktivität zu finden ist, als bei den jungen, kniegesunden Tieren. Dies demonstriert den starken Zusammenhang zwischen dem aktiven Wnt-Signalweg und der Arthrose (Yuasa et al. 2008). Der Wnt-Signalweg reduziert bei Mäusen in Zeiten der Entwicklung zusätzlich die Transkription von Sox-9, einem Transkriptionsfaktor, welcher bedeutend in der Chondrogenese und Bildung von Kollagen-Typ II ist (Luyten et al. 2009).

Roof plate-specific spondin 2 (syn. R-Spondin 2, RSPO2) und *Secreted frizzled-related protein 2* (syn. SFRP2, FRZB2) sind Modulatoren des Wnt-Signalwegs. RSPO2 wirkt verstärkend auf die Transkription der Zielgene, wohingegen SFRP2 deren Gentranskription bremst.

RSPO2 ist ein Sekretprotein und greift über extrazelluläre Rezeptormechanismen in den Wnt-Signalweg ein. Es existieren vier Typen (RSPO1-4), welche zu ca. 60 % Sequenzhomologie und gleiche Organisation ihrer Domänen aufweisen, wobei RSPO2 und RSPO3 die vermutlich stärksten Aktivatoren des Wnt-Signalweges sind. Ihre biochemische Struktur besteht aus einer cystein-reichen Domäne am N-Terminus, gefolgt von einer Thrombospondin-Domäne und einem basischen C-Terminus (Kim et al. 2008). Auf welchem Weg die RSPO-Familie den Wnt-Signalweg beeinflusst ist bisher kaum verstanden. Vermutlich agieren sie synergistisch mit WNT3a und stimulieren die Akkumulation von β -catenin und der TCF-bedingten Transkription sowie die Inhibition von DKK1 (Kim et al. 2006). Friedmann fand 2009 heraus, dass RSPO2 auch eine entscheidende Funktion in der Osteoblastereifung und Mineralisierung spielt. Ein Knock-down von RSPO2 führte zu einer nahezu

vollständigen Blockierung der Mineralisierung, sodass RSPO2 auch als osteogener Faktor bezeichnet werden kann (Friedman et al. 2009). Eine embryologische Relevanz veranschaulicht eine Studie aus den USA, in welcher Mäuse mit inaktiviertem RSPO2-Gen an einer fehlerhaften Gelenksentwicklung, vorrangig der Hinterläufe, litten (Nam et al. 2007).

Die Proteine der *secreted frizzled-related*-Familie (SFRP1-4) tragen eine Region mit hoher Homologie zur cystein-reichen Bindungsdomäne der Frizzled-Rezeptoren des Wnt-Signalwegs, was den Ursprung ihres Namens erklärt. Neben dieser Signalsequenz existiert noch eine hydrophile carboxy-terminale Domäne (Rattner et al. 1997). SFRP2 scheint mesenchymale Stammzellen vor Apoptose zu schützen sowie die chondrogene und osteogene Differenzierung zu inhibieren. Auch eine mögliche Regulierung von Runx-2 durch Blockierung des Wnt-Signalwegs sowie des BMP- (*bone morphogenic protein*) Signalweges wurde beschrieben (Alfaro et al. 2010). Runx-2 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung und Bildung von Kollagen-Typ I. Eine Studie mit über 600 Patienten zwischen 50 und 86 Jahren mit diagnostizierter Kniearthrose konnte zeigen, dass ein Polymorphismus im Gen der SFRP-Familie besteht. Auch im Zusammenhang mit der Arthrose der Hüfte konnte dies festgestellt werden. Der Wildtyp dieses Gens zeichnete sich dagegen durch einen protektiven Charakter aus. Beides konnte jedoch nur bei weiblichen Patientinnen bestätigt werden (Valdes et al. 2007). Aufgrund der Beziehung von SFRP2 zur Arthrose untersuchte Lories Mäuse, deren SFRP-Gene künstlich ausgeschaltet wurden. Diese Knock-out Mäuse offenbarten, unter artifizieller Induktion einer Arthrose, einen Verlust an Gelenkknorpel. Dieser war assoziiert mit einer erhöhten Aktivität des Wnt-Signalwegs, MMP Expression und Aktivität. Ebenso fielen sie durch eine erhöhte kortikale Knochenmasse und Dichte sowie eine gesteigerte anabole Antwort auf mechanische Belastung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen auf (Lories et al. 2007). SFRP kann MMPs, vermutlich durch seine Netrin-Domäne, inaktivieren, was die bei den Knock-out-Mäusen gesteigerte Aktivierung erklärt (Luyten et al. 2009). Ein weiteres Charakteristikum der Entwicklung der Arthrose ist die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten. Proteine aus der Familie der SFRP wurden als natürliche Bremse dieser Zellveränderung beschrieben, gemeinsam mit GREM1 und DKK1 (Leijten et al.

2012). Ob die verminderte ektope Kalzifizierung und effektivere Reparatur durch SFRP2 stimulierte MSC an Herzgewebe, wie sie Alfaro beschreibt, einen vergleichbaren Effekt auf Knorpelgewebe hat, ist noch ungeklärt, aber denkbar (Alfaro et al. 2010).

1.5 Zielsetzung und eigene Fragestellung dieser Arbeit

Im Vorwort des Buches „Der Meniskus“ von Beaufils und Verdonk heißt es zu Beginn „der Meniskus wurde vergessen“. In der Tat hat sich die Wissenschaft und Medizin über lange Zeit nur sporadisch dem Meniskus gewidmet, wobei die biomechanische Bedeutung des Meniskus für das Kniegelenk enorm ist. Zu leichtfertig wurde viele Jahre bei Meniskusverletzungen eine Totalexstirpation durchgeführt, wodurch die resultierenden unphysiologischen Belastungen Jahre später zur Gonarthrose führten (Jorgensen et al. 1987). Vor 1950 wurde davon ausgegangen, dass es sich beim Meniskus um ein Relikt eines Muskels handelt, welcher ohne größeren Schaden entfernt werden kann. In den 70er Jahren war die Meniskusexzision die übliche Therapie des Meniskusschadens, denn es wurde vermutet, dass sich ein neuer Meniskus bilden würde (Ghosh und Taylor 1987). Heute sind weitreichende Langzeitschäden bewiesen und der größtmögliche Erhalt des Meniskus ist das Ziel. Weitere Therapieoptionen wie Transplantate oder die Gabe von Wachstumsfaktoren und Signalmolekülen zeigen ansprechende Ergebnisse, aber sind von einer klinischen Etablierung weit entfernt. Der Gedanke dahinter ist die mangelhafte Selbstheilungstendenz des Meniskus durch Aktivierung der vorhandenen Progenitorzellen zu steigern.

Eine Idee zu dieser Arbeit entstand aus der Kollaboration dieser Arbeitsgruppe mit Prof. Dr. Vicki Rosen aus der Abteilung Entwicklungsbiologie der „*Harvard School of Dental Medicine*“ in Boston, USA. Eine Hypothese ihrer Forschungsarbeit ist, dass sich das Signalmuster während der embryologischen Kniegelenksentstehung von den Signalmustern anderer Gelenke unterscheidet, in denen kein Meniskus gebildet wird. Dazu wurden in Untersuchungen die Genexpressionsmuster der meniskusformenden Zellen von Mäusen in den entsprechenden Entwicklungsstadien

(E14, E15, E16) kurz vor und während der Meniskusbildung analysiert. Als Gegenstück wurde das Ellenbogengelenk herangezogen, welches bei der Entwicklung viele Gemeinsamkeiten mit dem Kniegelenk zeigt. Ein Vergleich der Genexpressionsprofile zwischen Ellenbogen (kein Meniskus) und Knie (Meniskus vorhanden) während der Entstehungszeit des Meniskus ermögliche den Rückschluss auf die für die Meniskusentstehung entscheidenden Gene. Eine mit genau dieser Fragestellung durchgeführte Microarray-Analyse ergab 20 Gene, welche eine mindestens zweifache Erhöhung im Vergleich Knie gegen Ellenbogen zum Zeitpunkt E15 auswies. Zwei dieser Gene von besonderem Interesse waren RSPO2 und SFRP2 (Pazin et al. 2012). Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es erstmals den Nachweis über die Existenz dieser Wnt-Signalkaskade modulierenden Proteine RSPO2 und SFRP2 in humanem Faserknorpel zu erbringen. Dieser Nachweis soll sowohl auf molekularer Ebene als auch auf Genexpressionsanalyse erbracht werden. In wie weit sich die hier gewonnenen Ergebnisse dieser für den Meniskus spezifischen Gene zur Detektion, Klassifikation, Prognoseabschätzung oder sogar zur Therapie in der Arthrose-Forschung nutzen lassen, bleibt abzuwarten.

Um durch Arthrose geschädigte Menisken miteinander vergleichen zu können, bedarf es zuerst eines festen Bewertungsschemas. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein histopathologischer Score entwickelt, welcher die globalen Veränderungen des Gewebes bewertet. Dieser umfasst unter anderem die Beurteilung der Meniskusform und Anfärbeintensität, die Meniskusoberfläche, das Vorhandensein typischer Regenerationszeichen und das Auftreten von Verkalkungen. All dies soll dazu beitragen die Pathogenese bzw. Auswirkung der Arthrose auf den Meniskus besser verstehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth	Karlsruhe, DE
Aluminiumsulfat	AppliChem	Darmstadt, DE
Alzianblau	AppliChem	Darmstadt, DE
Ameisensäure	Roth	Karlsruhe, DE
Ammonium-peroxodisulfat (APS)	Roth	Karlsruhe, DE
Brilliant-Blau R250	Roth	Karlsruhe, DE
Bromphenol Blau	Roth	Karlsruhe, DE
Chloroform	Roth	Karlsruhe, DE
DEPC	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
EDTA	Roth	Karlsruhe, DE
Eosin	Roth	Karlsruhe, DE
Essigsäure	AppliChem	Darmstadt, DE
Ethanol absolut	AppliChem	Darmstadt, DE
Formaldehyd	Roth	Karlsruhe, DE
Glycerin	Roth	Karlsruhe, DE
Glycin	AppliChem	Darmstadt, DE
HCl	Merck	Darmstadt, DE
Isopropylalkohol	Roth	Karlsruhe, DE
KCl	Merck	Darmstadt, DE
Kernechtrot	AppliChem	Darmstadt, DE
KH_2HPO_4	Merck	Darmstadt, DE
Methanol	Roth	Karlsruhe, DE
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, DE
Na_2HPO_4	AppliChem	Darmstadt, DE
NaCl	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
NP-40	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Paraffin	Thermo scientific	Cheshire, UK

Paraplast Plus	Roth	Karlsruhe, DE
PBS	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
SDS-Pellets	Roth	Karlsruhe, DE
TEMED	Roth	Karlsruhe, DE
TriFast peqGold	Peqlab	Erlangen, DE
Tris	Roth	Karlsruhe, DE
Tween	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE
Xylol	Roth	Karlsruhe, DE
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, DE

2.1.2 Medium und Reagenziensätze

2.1.2.1 Medium

DMEM Medium

Gibco by life technologies Corporation

DMEM (1x) + GlutaMax

Paisley, United-Kingdom

2.1.2.2 Reagenziensätze

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

GE Healthcare

Buckinghamshire, UK

Dako REAL Detection System

Dako Denmark A/S

DK-2600 Glostrup, Denmark

HotStarTaq Plus DNA Polymerase Kit

Qiagen

Hilden

RNeasy Mini Kit

Qiagen

Hilden

QuantiTect Reverse Transcription Kit

Qiagen

Hilden

2.1.3 Stammlösungen, diverse Lösungen und Puffer

2.1.3.1 Stammlösungen

PBS 10 %

81,8 g NaCl

2,0 g KCL

16,0 g Na₂HPO₄

2,0 g KH₂HPO₄

mit aq. dest. auf 1 l auffüllen

pH 7,4

TBS 10 x

24,2 g Tris 200 mM

87,6 g NaCl 1,5 M

mit H₂O auf 1 l auffüllen

pH 7,4

TBS-T

0,5 g Tween 0,05 %

100 ml TBS 10 x

mit H₂O auf 1 l auffüllen

2.1.3.2 Diverse Lösungen

Blocklösung

Milchpulver 5 % in TBS-T

Entfärbelösung 1

50 ml Methanol 50 %

7 ml Essigsäure 7 %

mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Entfärbelösung 2

90 ml Methanol 90 %

10 ml Essigsäure 10 %

mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Entkalkungslösung 1

Ameisensäure 10 %

Formaldehyd 2 %

Entkalkungslösung 2

EDTA 20 %

Färbelösung

0,1 g Brilliant-Blau R250 0,1 %

50 ml Methanol 50 %

7 ml Essigsäure 7 %

mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Fixierlösung

Formaldehyd 4%

Sörensen Puffer

2.1.3.3 Pufferlösungen

Laufpuffer 5 x

30,3 g Tris 0,25 M

142,6 g Glycin 1,9 M

50 ml SDS 10 %

mit H₂O auf 1 l auffüllen

Pierce-Lysepuffer

Tris 25 mM

NaCl 150 mM

EDTA 1 mM

NP-40 1 %

Glycerin 5 %

pH 7,4

Sammelgelpuffer

15,1 g Tris 0,5 M

250 ml H₂O

mit HCl auf pH 6,8

SDS-Laemmli-Puffer 5 x

500 mM Tris, pH 6.8

37,5 % Glycerin

15 % SDS

0,05 % Bromphenol Blau

Sörensen-Puffer 0,3 M (18,2 ml Lsg. A + 81,8 ml Lsg B)

Lösung A:

41.37g KH₂PO₄

mit aq. dest. auf 1 l auffüllen

*Lösung B:**42.58g Na₂HP0₄**mit aq. dest. auf 1 l auffüllen*

Transferpuffer

*6,05 g Tris 25 mM**28,8 g Glycin 192 mM**400 ml Methanol 20 %**Mit H₂O auf 2 l auffüllen**pH 8,3*

Trenngelpuffer

*45,4 g 1,5 M Tris**250 ml H₂O**mit HCl auf pH 8,9*

2.1.4 Photochemikalien und Filtermembranen

Entwicklerlösung	Kodak	Rochester, USA
Fixiererlösung	Kodak	Rochester, USA
PVDF – Membran	Millipore	Darmstadt, DE
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK

2.1.5 Färbungen

Alzianblau

*1 g Alzianblau 8GS**100 ml Essigsäure 3 %*

Kernechtrot

5 g Aluminiumsulfat

100 ml H₂O

0,1 g Kernechtrot

Meyer's Hämalaun Färbelösung

Merck

Darmstadt, DE

Eosin Färbelösung

1 g Eosin

1000 ml Aqua dest.

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

Polyklonaler Kaninchen-IgG
Antikörper gerichtet gegen
humanes Kollagen-Typ I

ACRIS-Antibodies
R1038

Herford, DE

Polyklonaler Kaninchen-IgG
Antikörper gerichtet gegen
humanes Sox-9

Santa Cruz
Biotechnology, Inc.
Sc-20095

Santa Cruz, USA

Monoklonaler Maus-IgG
Antikörper gerichtet gegen
humanes Runx-2

Millipore
clone AS110

Billerica, USA

Polyklonaler Kaninchen-IgG
Antikörper gerichtet gegen
humanes RSPO2

Abcam
ab73761

Cambridge, UK

Polyklonaler Kaninchen-IgG Antikörper gerichtet gegen humanes SFRP2	Assay Biotechnology Company C18484	Sunnyvale, CA
---	--	---------------

2.1.6.2 Sekundärantikörper

An Peroxidase gekoppelter IgG Antikörper gewonnen aus Ziege, gerichtet gegen Kaninchen	Sigma-Aldrich A0545	Steinheim, DE
--	------------------------	---------------

An Peroxidase gekoppelter IgG Antikörper gewonnen aus Ziege, gerichtet gegen Maus	Sigma-Aldrich A9917	Steinheim, DE
---	------------------------	---------------

2.1.7 Primer

2.1.7.1 Primerdesign

Die für die PCR- (Polymerase-Kettenreaktion) Analyse erforderlichen Primer für die Zielgene RSPO2 und SFRP2 wurden mit Hilfe der Software Primer3 erstellt (Rozen und Skaletsky 2000). Diese konnten über die Datenbank von NCBI Blast hinsichtlich ihrer Spezifität überprüft und bestätigt werden. Die Produktion übernahm Operon Biotechnologies GmbH (Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland). Um die für die Anlagerung der Primer ideale Temperatur zu ermitteln wurde eine Gradienten-PCR mit cDNA aus Meniskusgewebe und acht verschiedenen Temperaturschritten durchgeführt. Durch eine abschließende Sequenzierung der PCR-Produkte wurde sichergestellt, dass das Produkt dem gesuchten Zielgen entspricht. Diese Sequenzierung wurde durch Sequence Laboratories Göttingen GmbH übernommen. Alle verwendeten Primersequenzen samt Anlagerungstemperaturen können der Primerliste entnommen werden.

2.1.7.2 Primerliste

Zielgen	vorwärts (5' → 3')	rückwärts (5' → 3')	Anlagerungs- Temperatur
α1 Kollagen-Typ I	ttccccagccacaaagagtc	cgatcatgcacacacct	61°C
α1 Kollagen-Typ II	ctctggagcatctggagac	accacgatcacccttgactc	63°C
α2-Makroglobulin	tggtctctggcttcattcc	gcaaactcatccgtctcgta	60°C
Aggrekan	acagctggggacat	gtggaatgcagagg	60°C
β2-Mikroglobulin	tgctgtctccatgtttgatgtatct	tctctgtccccacctctaa	61°C
HPRT1	tgctcgagatgtgatgaagg	tcccctgttgactggctcatt	63°C
LaA	ggctcactggaaaggggaga	ttgcttggggaggagaga	60°C
MAPK1	ccaccatctctggagcagt	cagtcctctgagccctgtc	59°C
MMP-13	ctatggtccaggagatgaa	agagtcttgctgtatcct	63°C
PPIA	atggcaagaccagcaagaag	gggaacaaggaaaacatgga	60°C
RPL13A	tctggaccgtctcaagggtg	gctgtcactgctggctactc	60°C
RSPO2	aggcgaaggagaagaggaac	ataacacaggggcatgct	63°C
Runx-2	ttccagaccagcagcactc	cagcgtcaacaccatcatt	63°C
SDHA	tggaacaagagggcatctg	ccaccactgcatcaaattcatg	60°C
SFRP2	ccccagcatttctgagtta	agtttgggccacagagaaaa	60°C
Sox-9	caggctttgcgatttaagga	ccgttttaaggctcaagggtg	60°C

2.1.8 Geräte und Gebrauchswaren

Autoklav-FNR 4353E	Tecnomara	Fernwald, DE
Einbettmaschine-Shandon-Elliot Automatic Duplex Tissue Processor	Shandon- Southern- Instruments, Inc	Pittsburgh, USA
Elektrophoresekammer (Nachbau)		
Färbeautomat – DiaPath Stainix	DiaPath	Martinengo, IT
Heizblock – Thermocycler comfort	Eppendorf	Hamburg, DE

Microseal B Adhesive	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
Mikrotom – Jung Biocut 2035	Leica	Solms, DE
Optical flat caps	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
PCR Mastercycler Gradient S	Eppendorf	Hamburg, DE
Photometer – Nanodrop 1000	Peqlab	Erlangen, DE
Power supply für Elektrophorese	Peqlab	Erlangen, DE
Proteinleiter	Thermo scientific	Cheshire, UK
Ultraturrax – T8.01	IKA – Werke	Staufen, DE
Wärmeschrank – B 5042	Heraeus	Hanau, DE
Well-Platte (96)	Biozym	Hessisch Oldendorf, DE
Zentrifuge – Centrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, DE

2.1.9 Patientenkollektiv

Die untersuchten Menisken stammten aus der orthopädischen Abteilung des Krankenhauses Neu-Mariahilf in Göttingen. Patienten, denen aufgrund fortgeschrittener Osteoarthrose eine totale Knie-Endoprothese eingesetzt wurde, überließen, nach sorgfältiger Aufklärung und Dokumentation, das Probenmaterial zur wissenschaftlichen Untersuchung in unserer Abteilung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Uni Göttingen genehmigt. Der Ethikantrag ist unter der Nummer 25/12/10 hinterlegt. Insgesamt wurden Proben von 30 Patienten untersucht. Das Durchschnittsalter lag bei 70,9 Jahre, wobei der Anteil

männlicher Patienten 33,3 % und der Anteil weiblicher Patienten 66,6 % betrug. Der BMI (*body-mass-index*) lag im Mittel bei 29,47 kg/m².

2.1.10 Gewinnung des Probenmaterials

Unter sterilen Bedingungen wurden leere und zuvor autoklavierte Plastikbehälter mit jeweils 50 ml Medium (DMEM + GlutaMAX, GIBCO, Invitrogen) und 50 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gefüllt, gekennzeichnet und in das Krankenhaus Neu-Mariahilf transportiert. Dort wurden sie bis zu ihrer Verwendung kühl gelagert. Nach der operativen Versorgung des entsprechenden Patienten wurden die Kniepräparate in die Behältern gegeben und durch einen Transportdienst in das Universitätsklinikum Göttingen gebracht. Einzig Alter, Gewicht und Geschlecht des Patienten wurden entsprechend der Vorgaben des Ethikantrags dokumentiert. Unter der Sterilbank wurden die Plastikbehälter erstmals geöffnet und sorgfältig begutachtet. Bewertungskriterien des allgemeinen Kniezustandes und des arthrotischen Schadens waren der Knorpelabrieb der artikulierenden Gelenkflächen und die Osteophytenbildung. Die Menisken wurden auf Vollständigkeit, Farbe, Konsistenz, sichtbare Kalk- oder Fettablagerungen untersucht und die Ergebnisse dokumentiert. War aufgrund der Form eine eindeutige Identifikation des Meniskus als medialer oder lateraler Meniskus möglich, wurde dies ebenso vermerkt. Für weiterführende Experimente wurden mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells vertikal herausgeschnittene Gewebestücke aus dem mittleren Drittel des Meniskus gewonnen. Vorder- bzw. Hinterhorn wurden verworfen. Von diesem mittleren Stück des Meniskus wurden drei Querschnitte genommen. Ein Stück wurde zur Erstellung eines histologischen Befundes in ein Gefäß (50 ml) gegeben und mit frisch angesetzter Fixierlösung versetzt. Zwei weitere Stücke wurden jeweils in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei -80°C eingefroren, für spätere RNA- bzw. Proteinisolierungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Darstellungen

2.2.1.1 Präparation des Meniskusgewebes für die Histologie

Das frisch gewonnene Meniskusgewebe wurde in ein 50 ml Gefäß mit Fixierlösung gegeben, um die sofort einsetzende Autolyse bzw. Heterolyse zu stoppen. Diese Fixierlösung bestand aus einer 4 % Formaldehydlösung und Sörensen Puffer. Die Probe wurde für 72 h bei 4°C in einem Kühlschrank aufbewahrt und das Röhrchen wurde aufgrund des lichtsensiblen Formaldehyds mit Alufolie umwickelt. Um bestehende Kalkansammlungen im Meniskus auszuwaschen, welche das spätere Schneiden mit dem Mikrotom behindern würden, wurde die Probe in zwei Schritten entkalkt. Zuerst wurde sie in 10 % Ameisensäure mit 2,5 % Formaldehydlösung gegeben und erneut im Kühlschrank für 48 h belassen. Für den zweiten Schritt wurde EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) verwendet, welches Komplexe mit Kalziumionen eingeht. In der EDTA-Lösung wurde das Präparat für weitere 72 h bei RT (Raumtemperatur) auf eine Wippe gelegt und die Lösung täglich gewechselt. Bevor die Probe im Paraffin eingebettet werden konnte, musste sie nach folgendem Protokoll mit Hilfe einer Einbettmaschine dehydriert werden.

Protokoll des Einbettautomaten

Position 1	70 % Ethanol	3 h
Position 2	80 % Ethanol	1 h
Position 3	90 % Ethanol	1 h
Position 4	96 % Ethanol	1 h
Position 5	100 % Ethanol	2 h
Position 6	100 % Ethanol	2 h
Position 7	Isopropylalkohol	2 h
Position 8	Isopropylalkohol	1,5 h
Position 9	Xylol	30 min
Position 10	Xylol	45 min
Position 11	Xylol	45 min
Position 12	Paraplast Plus	6 h bei 52°C
Position 13	Paraplast Plus	7 h bei 56°C

Schließlich wurden die Proben unter Berücksichtigung der späteren Schnittrichtung in kleine Metallformen gelegt und mit flüssigem Paraffin umgeben, welches dann über Nacht aushärten konnte. Am nächsten Tag wurden mit einem Mikrotom Serienschritte des Knorpels angefertigt und die Objektträger in einem Wärmeschrank bei 37°C getrocknet. Zur Färbung der Knorpelproben wurde neben einer HE-Färbung auch eine Zweifachfärbung bestehend aus Alzianblau und Kernechtrot gewählt. Das Alzianblau, als spezielle Anfärbung, dient der Darstellung saurer Mukosubstanzen, wie zum Beispiel Glykosaminoglykanen und Aggrekan. Das Kernechtrot stellt, im Sinne einer Gegenfärbung, Zellkerne leuchtend rot dar. Um später anhand der Färbintensität aussagekräftige Angaben treffen zu können, wurden die Färbungen standardisiert mit Hilfe eines Färbeautomaten durchgeführt. Das folgende Protokoll zeigt die Schritte der HE- und Alzianblau-Kernechtrotfärbung.

HE-Färbung

Schritt 1	Xylol	5 min
Schritt 2	absol. Ethanol	2 min
Schritt 3	80 % Ethanol	2 min
Schritt 4	Aqua dest.	2 min
Schritt 5	Hämalaun	4 min
Schritt 6	Aqua dest.	1 min
Schritt 7	fließendes Wasser	15 min
Schritt 8	Eosin	7 min
Schritt 9	Aqua dest.	1 min
Schritt 10	60 % Ethanol	1 min
Schritt 11	80 % Ethanol	1 min
Schritt 12	absol. Ethanol	2 min
Schritt 13	Xylol	3 min

Alzianblau-Kernechtrotfärbung

Schritt 1	Xylol	5 min
Schritt 2	absol. Ethanol	2 min
Schritt 3	80 % Ethanol	2 min
Schritt 4	Aqua dest.	2 min
Schritt 5	PBS	1 min
Schritt 6	Essig 3 %	2 min
Schritt 7	Alzianblau	5 min
Schritt 8	fließendes Wasser	2 min
Schritt 9	Kernechtrot	5 min
Schritt 10	fließendes Wasser	1 min
Schritt 11	80 % Ethanol	1 min
Schritt 12	absol. Ethanol	2 min
Schritt 13	Xylol	3 min

2.2.1.2 Entwicklung des Degenerationsscores

Anhand der gefärbten Meniskusschnitte wurden Erfahrungen in der Histopathologie des Meniskus gesammelt. Diese dienten als Grundlage, um einen Score zur Bewertung degenerativ geschädigter Menisken zu entwickeln.

2.2.1.3 Immunhistochemische Markierung von RSPO2 und SFRP2

Die IHC (Immunhistochemie) ist ein Verfahren, welches zum Nachweis und zur Lokalisierung ausgewählter Proteine oder Strukturen eines Gewebes genutzt wird. Der Nachweis beruht auf Antigen-Antikörper-Reaktionen und folgender Enzym-Substrat-Umsetzung. Die IHC wurde in dieser Arbeit für die Darstellung von RSPO2, SFRP2 und Kollagen-Typ I verwendet. Ein gegen das Zielprotein gerichteter Kaninchenantikörper konnte mit Hilfe des Dako REAL Detection Systems, welches auf der LSAB-Methode (*labeled-strept-avidin-biotin-method*) beruht, abgebildet werden. Zu Beginn wurden die auf dem Objektträger befindlichen paraffineingebetteten Gewebequerschnitte aus Meniskus für 45 min in 70 % Methanol und 30 % H₂O₂ gelegt. Dies beugte unspezifischen Proteinbindungen vor. Nach einem Reinigungsschritt in PBS wurden die Präparate in einer Wärmekammer bei 60°C mit Protasq inkubiert. Nach einem erneuten Reinigungsschritt wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer mit nacheinander Protease 24 % und PBS/BSA für jeweils 10 min inkubiert. Nun konnte der in PBS verdünnte Primär-AK zugegeben werden und an das Zielprotein binden. Dem erneuten Waschschrift folgte anschließend der mehrfach biotinylierte Sekundärantikörper aus dem DAKO Real Detection System mit zwei bis drei Tropfen je Präparat für 15 min. Nach einem erneuten Waschschrift wurde mit der Streptavidin Alkaline Phosphatase gleich verfahren. Das Glykoprotein Streptavidin zeigt enorme Affinität zu Vitamin Biotin und es entsteht ein Komplex aus Primärantikörper, mehrfach biotinmarkiertem Brückenantikörper und Streptavidin mit gebundenem Enzymkomplex bestehend aus Alkaline Phosphatase. Jedes Biotinmolekül steht als Bindungspartner für das Streptavidin zur Verfügung, wodurch eine Signalamplifikation erreicht wird. Mit der frisch angesetzten und in dem Kit enthaltenden Substrat-Arbeitslösung aus Chromogen Red und Alkalischen Phosphatase Substratpuffer konnte die Reaktion

bzw. der Primärantikörper sichtbar gemacht werden. Als Gegenfärbung wurde eine Hämalaunfärbung gewählt.

2.2.2 Genexpressionsanalysen

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Allgemeines zur Methode

Die RT-PCR (*Realtime-PCR*) ist eine etablierte Methode zur exponentiellen Amplifizierung von Nukleinsäuresequenzen und deren sofortige Quantifizierung, wodurch eine Aussage über den Grad der Genexpression getroffen werden kann. Das Prinzip beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion und der proportionalen Zunahme des Fluoreszenzfarbstoffes Sybr Green. Sybr Green ist ein mit der DNA interkalierender Cyanin-Farbstoff, der bei Bindung an doppelsträngige Nukleinsäuren deutlich stärker fluoresziert, als bei Bindung an Einzelstränge. Der Verlauf der PCR beginnt in einem Thermocycler mit der Aktivierung der thermostabilen DNA Polymerase (HotStarTaq Plus Polymerase) durch Erwärmung auf 95°C für fünf Minuten. Anschließend folgt die Denaturierung, welche die doppelsträngige DNA separiert und die Anlagerung der ausgewählten Primer (Oligonukleotide) ermöglicht. Die Primer sind komplementär zu den Randbereichen der zu untersuchenden DNA-Sequenz und die für die Anlagerung erforderliche Temperatur liegt primerabhängig bei ca. 60-63°C. Jetzt kann die hitzestabile DNA-Polymerase bei 72°C den Strang verlängern und der erste Zyklus ist beendet. Diese drei Schritte aus Denaturierung, Anlagerung/Primerhybridisierung und Elongation werden insgesamt 40 mal durchlaufen und das gewünschte DNA-Fragment wird exponentiell vermehrt, wobei die proportionale Zunahme der Fluoreszenz des Sybr Greens detektiert wird.

Protokoll der PCR

Gearbeitet wurde mit dem HotStarTaq DNA Polymerase Kit von Qiagen. Zu Beginn wurde ein Mastermix erstellt, welcher alle erforderlichen Reagenzien, ausschließlich der Template cDNA, enthielt. In dem verwendeten Sybr Green (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix) waren bereits die HotStarTaq Plus DNA Polymerase, die dNTP (10 mM) und der 10x PCR Puffer (15 mM MgCl₂) enthalten. Alle Komponenten

wurden wie in dem folgenden Protokoll dargestellt zum Erstellen des Mastermixes in ein Reagenzgefäß pipettiert. Um Pipettierungenauigkeiten ausgleichen zu können wurden 140 % des benötigten Mastermixes erstellt.

Mastermix pro Well	100 %	140 %
Sybr Green	5 µl	7 µl
Primer (vorwärts + rückwärts)	2 µl	2x 1,4 µl
DEPC-Wasser	2 µl	2,8 µl
Totalvolumen	9 µl	12,6 µl

Eine 96-Well-Platte wurde mit Microseal B Adhesive Folie abgeklebt und nur die benötigten Wells mit einem Skalpell freigeschnitten. In diese Wells wurden jeweils 9 µl des Mastermixes und 1 µl der zu untersuchenden cDNA gegeben, sodass ein Totalvolumen von 10 µl resultierte. Verschlossen wurden die Wells mit Optical Flat Caps Strips. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Platte in einen Mastercycler von Eppendorf platziert, die PCR-Software (Realplex) am Computer aufgerufen und das Programm mit folgendem Protokoll gestartet.

PCR-Protokoll

Initiale Aktivierung 95°C 5 min

3-Schritt Zyklus:

Denaturierung 95°C 15 sek

Primerhybridisierung 60-63°C 15 sek

Elongation 72°C 20 sek

Anzahl der Zyklen 40

Finale Extension 72 °C 10 min

Ab einer bestimmten Anzahl an Zyklen, wurde das akkumulierte Produkt, aufgrund der gesteigerten Fluoreszenz, detektierbar. Dieser Punkt wird als CT-Wert (*cycle threshold*) angegeben und beschreibt den erstmaligen Überstieg der Fluoreszenz

über den Hintergrundwert und den Beginn des exponentiellen Anstiegs der Kurve. Dies lässt Rückschlüsse auf die vorliegende Genexpression zu. Je niedriger der CT-Wert, desto größer war die ursprünglich vorliegende mRNA-Menge der Probe und umgekehrt.

2.2.2.2 RNA-Isolierung aus Meniskusgewebe

Nach der Exzision eines Meniskusstücks konnte sofort mit der RNA-Isolierung begonnen werden. Sollte die RNA-Isolierung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, musste die Gewebeprobe bei -80°C aufbewahrt werden. Zu Beginn wurde das Meniskusstück für einige Minuten in einem zuvor autoklavierten Mörser regelmäßig mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistill zu Pulver zerstoßen. Dieses Pulver wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt, gewogen und dies dokumentiert. Für die RNA-Extraktion wurde 1 ml des gebrauchsfertigen Reagenz peqGOLD TriFast zugegeben. Es besteht aus Phenol und Guanidinthiocyanat und deren Funktion beruht auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Durch eine 5 min Zentrifugation wurden Verunreinigungen durch Proteine, Fette und Polysaccharide minimiert. Anschließend wurde 200 μl Chloroform in das Reaktionsgefäß gegeben und es entstand eine milchige Trübung, die 2 min bei RT belassen wurde. Die erneute Zentrifugation führte zur Trennung der Probe in drei Phasen. In der oberen, farblosen, wässrigen Phase befand sich die RNA. Durch die zweimalige Wiederholung von Chloroformzugabe und Zentrifugation wurde eine Aufreinigung gewährleistet. Diese oberste Phase wurde in eine RNeasy Säule übernommen und je 100 μl mit 350 μl RLT (enthält Thiocyanat, welches RNasen inaktiviert), 3,5 μl β -Mercaptoethanol und 450 μl Ethanol 70 % ergänzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Probe mit RW1 Puffer (Ethanol) und RPE Puffer (Waschpuffer) aufgereinigt und in ein RNeasy Mini spin Reaktionsgefäß gegeben, sodass nach Zentrifugation die RNA an der Membran nur noch mit RNase- freiem Wasser abgelöst werden musste. Mit Hilfe eines Photometers konnte die Menge und Qualität der RNA ermittelt werden.

2.2.2.3 Umschreiben von RNA in cDNA

Um mittels PCR den Grad der Genexpression zu bestimmen, musste die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, welche an den RNA-Strang einen cDNA Strang hybridisierte. Der ursprüngliche RNA-Strang wurde anschließend durch einen RNAase-Teil des Enzyms wieder beseitigt. Während des gesamten Vorgangs wurde auf Eis gearbeitet, um eine RNA-Degradation zu vermeiden. In dem verwendeten QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen waren die benötigten Reagenzien enthalten. Zu Beginn wurde die restliche genomische DNA durch die in dem gDNA Wipeout-Buffer enthaltenen DNAsen eliminiert. Dafür wurde die Probe für 2 min bei 42°C mit dem gDNA Wipeout-Buffer und DEPC- (Diethylidcarbonat) Wasser auf einem Heizblock platziert. Für die Reaktion der Reversen Transkriptase wurde ein Mastermix aus Reverser Transkriptase, Quantiscript RT Buffer und Primer Mix erstellt und zum Schluss die RNA zugegeben. Für die cDNA-Synthese wurden 15 min bei 42°C berechnet. Durch eine 3 min Erhitzung auf 95°C wurde die Reaktion schließlich beendet, da dies die Reverse Transkriptase inaktiviert. Je nach Menge der eingesetzten RNA wurde DEPC-Wasser zugefügt, sodass am Ende eine cDNA-Konzentration von 1 ng/µl vorlag, davon ausgegangen, dass der Umsatz der Reversen Transkriptase von RNA zu cDNA bei 1:1 liegt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt und konnte nun für die RT-PCR verwendet werden.

2.2.2.4 Meniskus-Housekeeping-Gen-Analyse

Housekeeping-Gene (Haushalts-Gene) gehören zu einer Gruppe an Genen, welche für essentielle Zellfunktionen konstant exprimiert werden. Idealerweise unterliegen sie keinen regulatorischen Einflüssen. Quantitative Genexpressionsanalysen können somit gegen die Werte dieser Kontrollgene normalisiert werden. Um ein geeignetes Housekeeping-Gen für die Studie zu ermitteln, wurden acht gängige Gene an vier verschiedenen cDNA-Proben aus Meniskusgewebe mit jeweils 2 Ansätzen gemessen. Hierzu wurde bei der PCR eine Anlagerungs-Temperatur von 60°C gewählt. Eine Normalisierung der Ergebnisse, wie bei den übrigen PCR-Ergebnissen, erfolgte nicht.

2.2.2.5 Statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen

Die Expressionsergebnisse der PCR wurden mittels relativer Quantifizierung nach Pfaffl normalisiert (Pfaffl 2001). Hierzu wird die Expression eines Zielgens auf ein nicht-reguliertes Housekeeping-Gen (hier β 2-Mikroglobulin) bezogen. Die Vorteile dieser Methode liegen in einer Reduktion der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der PCR gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping-Gen betreffen. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens wird weiter auf ein Kontrollprobenmaterial (hier chondrogene Progenitorzellen aus hyalinem Knorpelgewebe des Kniegelenks) bezogen und über die sog. $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet. Der relative Expressionsunterschied der Proben zwischen krank / gesund und den Kontrollzellen, normalisiert zum Housekeeping-Gen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Pfaffl 2001).

2.2.3 Proteinanalysen

2.2.3.1 Western Blot

Allgemeines zur Methode

Der Western Blot oder auch Immunblot, ist ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Detektion eines Proteins. Dazu wird ein Proteingemisch mittels Gelelektrophorese entsprechend seiner Größe aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (geblottet) und somit immobilisiert. Durch Primär- und Sekundärantikörper wird das gewünschte Zielprotein samt zugehörigem Molekulargewicht nachgewiesen. Durch die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden vor dem eigentlichen Blot die Proteine separiert. Das Proteingemisch wandert in einem elektrischen Feld durch die Poren einer Polyacrylamid-Gelmatrix, welche in unterschiedlichen Konzentrationen und der somit bedingten unterschiedlichen Porengröße angesetzt werden kann. Das im Überschuss angebotene SDS erfüllt die Funktion die Eigenladung der Proteine zu überdecken und so die Auftrennung entsprechend des spezifischen Molekulargewichts zu ermöglichen. Es schafft eine globale negative Ladung und die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine geht verloren. Durch die Diskontinuität der pH-Werte der

Puffer wird der Auftrennungseffekt noch weiter verstärkt. Ob die Auftrennung erfolgreich war, kann mit Hilfe einer Brilliant-Blau-Färbung kontrolliert werden. Sind die Proteine entsprechend aufgetrennt, wird mit dem Transfer vom Gel auf die Membran begonnen. In einem mit Puffer gefüllten Tank werden mit Hilfe eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes die Proteine auf die Membran übertragen. Dort haften sie aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen fest. Der Erfolg kann mittels Brilliant-Blau-Färbung demonstriert werden. Zur Detektion des gewünschten Proteins wird eine indirekte Immunreaktion genutzt. Zuerst wird ein unkonjugierter Primärantikörper, welcher zu dem Zielprotein spezifisch ist, mit der Membran inkubiert. Anschließend bindet ein peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Der Nachweis des Proteins geschieht durch eine chemolumineszente Reaktion des an den Sekundärantikörper gebundenen Enzyms mit einem zugegebenen Substrat, welches mit der Entwicklung eines Films in einer Dunkelkammer dokumentiert wird. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Schritte, die für den Western Blot erforderlich sind, beschrieben. Diese umfassen die Gewinnung des Proteingemischs aus dem Meniskusgewebe, die Gelelektrophorese, den eigentlichen Blot (Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran) und die Proteinfärbung mit Immunmarkierung.

2.2.3.2 Proteinisolierung aus Meniskusgewebe

Für die Analyse wurde ein Meniskusstück, welches bis dahin bei -80°C aufbewahrt wurde, in einen Mörser gelegt und gänzlich mit flüssigem Stickstoff übergossen. Unter ständigem Nachfüllen des schnell verdampfenden Stickstoffes, wurde das ca. 200 mg schwere Knorpelgewebe vorsichtig mit einem Pistill zu sehr feinem Pulver zerstoßen. Während der gesamten Proteinisolierung war darauf zu achten, dass die Probe sich nicht erwärmte und somit das Protein nicht degradierte. Das Pulver wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 μl Lysepuffer versetzt. Die Probe wurde 60 sek auf einem Vortex durchmischt und anschließend für 55 min in Eis inkubiert. Hierauf folgte eine erneute Durchmischung mit einem Ultraturrax, für 2 mal 5 Sekunden. Durch eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 16000 g konnten die festen Bestandteile von den Gelösten getrennt werden. Der so gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, wobei das Volumen dokumentiert wurde. Mit Hilfe eines Photometers konnte bei 280 nm die

Proteinkonzentration bestimmt und notiert werden. Um intra- und intermolekulare Disulfidbrückenbindungen der Proteine zu verhindern, wurden pro 20 µl Volumen der Probe 5 µl eines vorher erhitzten 5x SDS Laemmli Puffers dazugegeben. Zum Schluss wurde der Ansatz auf einem Heizblock bei 95°C erhitzt und regelmäßig alle zwei Minuten auf einem Vortex kurz durchmischt. Das gewonnene Protein konnte nun für die SDS-PAGE verwendet oder bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.3.3 SDS-PAGE

Bevor mit der Herstellung des Polyacrylamid-Gels begonnen werden konnte, mussten die zwei später aneinander liegenden Glasplatten mit 100 % Ethanol gereinigt, zusammengebaut und mit der Gummidichtung und den Klammern auf ihre Passgenauigkeit und somit Funktionstüchtigkeit überprüft werden. Die spätere Linie, an welcher das Sammelgel in das Trenngel übergehen soll, wurde auf einer Glasseite mit einem Filzstift markiert und befand sich circa 6 cm vom unteren Rand entfernt. Anschließend konnte mit dem Pipettieren des Trenngels entsprechend den Angaben im Protokoll begonnen werden. Da die Konzentration des Acrylamids in den Gelen für die spätere Porengröße verantwortlich ist, wurde für das Trenngel eine hohe Konzentration (kleinporig) und für das Sammelgel eine niedrige Konzentration (großporig) verwendet. Das APS (Ammonium-peroxodisulfat) wurde als letztes dazugegeben, da wenige Sekunden nach Zugabe die Polymerisation beginnt. Das Trenngel wurde bis zur vorher angebrachten Markierung zwischen den Glasplatten gefüllt und mit 100 % Ethanol überschichtet, um Luftbläschen und andere Störfaktoren zu minimieren. Nach circa 10 min war das Trenngel polymerisiert und der Ethanol konnte wieder abgegossen werden. Mit dem Sammelgel wurde gleich verfahren und es wurde von oben auf das Trenngel geschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, der die späteren Taschen zum Einfüllen der Proteine in das Gel gewährleistete. Für die Elektrophorese wurde ein Nachbau der Biometra Elektrophoresekammer verwendet, dessen Kammern mit 1x Laufpuffer gefüllt werden können. Kamm und Dichtungsgummi wurden von dem vorbereiteten Gel entfernt und das Gel in der Kammer fixiert. Nun konnten die Proben eingefüllt werden, wobei mindestens in einer Tasche eine Proteinleiter mitlaufen musste, um später Rückschlüsse auf das Molekulargewicht äußern zu können. Das Probenvolumen betrug je nach Proteinkonzentration zwischen 5 µl und 20 µl pro

Tasche, nur das Volumen der Proteinleiter ist mit 4 μ l standardisiert. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde eine Stromstärke von 10 mA angelegt, erst danach wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht. Der Endpunkt war erreicht, wenn die Aufteilung der Proteinleiter über das gesamte Gel sichtbar war. Die folgende Übersicht zeigt die Zusammensetzung der Gele.

Gelzusammensetzungen:

Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
<i>1,4 ml Trenngelpuffer</i>	<i>1,25 ml Sammelgelpuffer</i>
<i>55 μl SDS 10 %</i>	<i>50 μl SDS 10 %</i>
<i>5 μl TEMED</i>	<i>5 μl TEMED</i>
<i>1,85 ml Acrylamid</i>	<i>0,8 ml Acrylamid</i>
<i>2 ml H₂O</i>	<i>2,7 ml H₂O</i>
<i>0,25 ml APS 10 %</i>	<i>0,2 ml APS 10 %</i>

2.2.3.4 Blot

Der Blot ist die Übertragung der auf dem Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran). Bevor mit dem Aufbau der Blotkassette begonnen werden konnte, mussten pro Gel sechs Filterpapiere und eine Transfermembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten werden. Anschließend wurde die PVDF-Transfermembran für 15 sek in Methanol und zwei Minuten in Wasser gelegt, um danach zusammen mit den Filterpapieren und zwei Schwämmen für mindestens 15 min in gekühltem Transferpuffer eingeweicht zu werden. Der Aufbau der Blotkassette sollte in einer Wanne mit Transferpuffer geschehen, da Luftblasen zu vermeiden sind. Begonnen wurde anodenseitig mit einem Schwamm, gefolgt von drei Filterpapieren und der Transfermembran. Auf die Transfermembran wurde nun das Gel luftblasenfrei platziert und mit weiteren drei Filterpapieren und einem Schwamm bedeckt. Jetzt konnte die Kassette geschlossen und mit Gummibändern fixiert werden. Nach dem Einsetzen der Kassette in den Tank wurde dieser maximal mit Transferpuffer gefüllt. Ein magnetischer Rührfisch am Boden des Tanks und ein Kühlwasserzulauf gewährleisteten eine gleichmäßige Temperatur und

Ionenkonzentration während des Blots. In den 90 min bei 350 mA wanderten die Proteine von dem Gel auf die Membran.

2.2.3.5 Proteinfärbung

Die nun auf der PVDF-Membran befindlichen Proteine wurden durch eine Färbung dargestellt. Die Färbelösung bestand aus Brilliant-Blau, Methanol und Essigsäure und konnte durch Entfärbelösungen bestehend aus Methanol und Essigsäure wieder ausgewaschen werden. Zum Färben wurde die PVDF-Membran, welche mit den Proteinen benetzt war, in einer kleinen Wanne in Färbelösung gelegt und auf einer Wippe geschwenkt, bis die blauen Banden gut sichtbar waren. Die Entfärbelösungen kamen nacheinander zum Einsatz und verminderten die Hintergrundfärbung. Die Zugabe der Entfärbelösung geschah unter Beobachtung, da das Zeitfenster der besten Bandendarstellung mitunter sehr kurz sein konnte. Die gefärbte Membran wurde beschriftet, eingescannt und die Datei gespeichert. Zum Schluss wurde die Membran zweimal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen.

2.2.3.6 Immunmarkierung

Die Immunreaktion diente der Detektion des Zielproteins. Bevor jedoch der Primärantikörper inkubiert wurde, mussten die freien Proteinbindungsstellen für die Dauer von einer Stunde bei Raumtemperatur geblockt werden. Die entsprechende Blocklösung bestand aus 5 % Milchpulver in TBS-T und wurde frisch angesetzt. Das Blocken reduzierte unspezifische Antikörperbindungen und sorgte so für eine höhere Sensitivität. Der Primärantikörper wurde gemäß den Angaben des dazugehörigen Datenblatts bzw. den Erfahrungswerten der Labormitarbeiter in Blocklösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation geschah über Nacht auf einer Wippe bei 4°C. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran fünfmal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschen konnte der Sekundärantikörper, ebenfalls entsprechend in Blocklösung verdünnt, für 1 h bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben werden. Der nun verwendete HRP- (*horseradish peroxidase*) gekoppelte Sekundärantikörper musste gegen den Primärantikörper gerichtet sein, also spezifisch gegen den Wirt aus dem der Primärantikörper gewonnen wurde. Erneut folgten fünf Waschschritte zu je 5 min. Mit Hilfe des Amersham ECL Prime Western

Blotting Detection Reagents konnte die chemolumineszente Reaktion ausgelöst werden. Dies ist ein Kit, welches speziell zur Detektion von immobilisierten spezifischen Antigenen, welche mit HRP-konjugiert wurden, verwendet wird. Die in diesem Kit enthaltenen Lösungen A und B wurden im Verhältnis 40 zu 1 gemischt und auf den Blot gegeben. Der Reaktion wurde 5 min Zeit gegeben und der Einfluss von Licht war zu vermeiden. Nach Ablauf der Zeit wurde mit einer Pipette der Blot von Flüssigkeit befreit und die Membran in eine Röntgenfilmkassette luftblasenfrei zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Ab jetzt musste in einer Dunkelkammer gearbeitet werden. In der Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm auf Membrangröße zurechtgeschnitten, auf die Membran gelegt und die Kassette geschlossen. Je nach Proteinmenge und Stärke der chemolumineszenten Reaktion musste der Film zwischen einer Minute und einer Stunde auf der Membran belassen werden. Anschließend wurde er einige Sekunden in eine Wanne mit Entwickler gelegt, kurz in Wasser gewaschen und schließlich für 15 min in einer Wanne mit Fixierlösung belassen. Anhand der Höhe der Banden im Vergleich zu der Proteinleiter konnte das Molekulargewicht abgelesen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der histologischen Darstellungen

In der hier vorliegenden Arbeit wurden durch die Untersuchung zahlreicher Präparate Erfahrungswerte in der Meniskusmorphologie gesammelt und die bedeutendsten Regionen zur histologischen Bewertung herausgearbeitet. Anhand histopathologischer Zeichen, welche durch eine Alzianblau-Kernechtrottfärbung erkennbar waren, wurde ein meniskusspezifisches Bewertungsschema entwickelt. Die schematische Darstellung eines Meniskus im Querschnitt zeigt die für die histologische Beurteilung relevantesten Zonen, s. Abbildung 8.

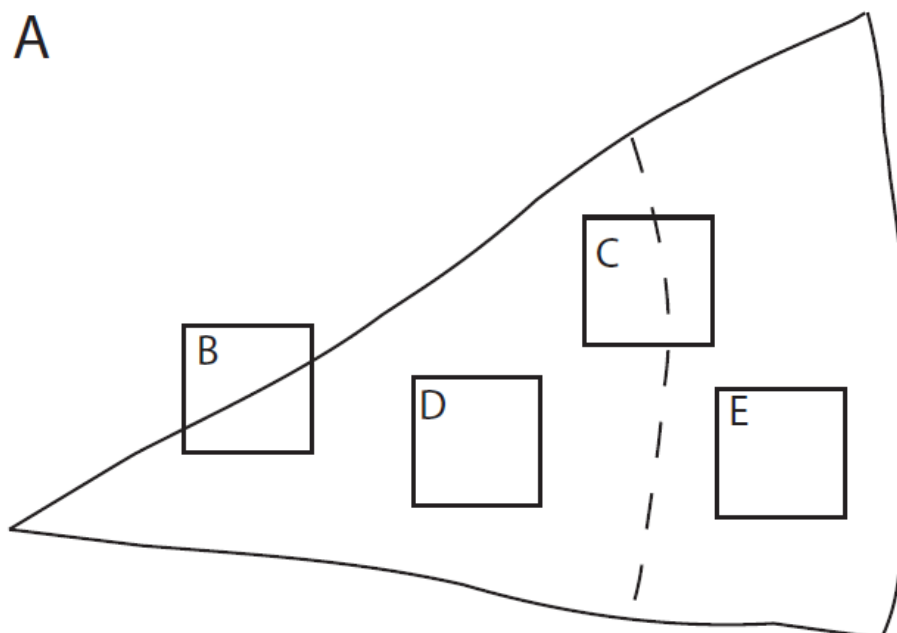


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Meniskus im Querschnitt

Benennung der histologisch wichtigsten Regionen.

A: Übersicht eines Meniskusquerschnitts

B: Oberfläche

C: FCJ (*fibrocartilage junction*) Grenze der sichtbaren Gefäßausprägung

D: Innenzone

E: Außenzone

In der im Schema mit A gekennzeichneten Übersicht des Meniskusquerschnitts, s. Abbildung 8, kann die Form und die Intensität der Alzianblaufärbung des Meniskus beurteilt werden, die Form ggf. auch mit Hilfe einer HE-Färbung. Eine sichelförmige Vertiefung einer oder beider Längsseiten oder eine beschädigte Meniskusspitze fanden sich vor allem bei degenerativen Menisken, s. Abbildung 19. Dagegen überzeugte ein Meniskus mit geringem Schaden durch einen geraden und kontinuierlichen Verlauf der Längsseiten sowie einer erhaltenen Meniskusspitze, s. Abbildung 10. In der Beurteilung der Farbtintensität zeigten Menisken mit geringen Schäden, s. Abbildung 9, eine deutlich kräftigere Blaufärbung als Menisken mit schweren Schäden, s. Abbildung 18. Die Differenzen in der immunhistochemischen Analyse des Kollagen-Typs I zwischen gering und schwer geschädigten Menisken fielen geringer aus als erwartet. Ein mehr oder weniger homogen positiver Nachweis für Kollagen-Typ I war bei beiden Gruppen nachweisbar, vgl. Abbildung 11 und Abbildung 20. Weiterhin fielen in der Übersicht des Meniskusquerschnitts bereits vereinzelt Bereiche mit fettiger Degeneration, s. Abbildung 23, oder Residuen der ausgewaschenen Verkalkungen, s. Abbildung 25, auf.

Der Ausschnitt B der Schemazeichnung, s. Abbildung 8, zeigt die Meniskusoberfläche, welche auf ihre Beschaffenheit und auf die Morphologie der dortigen Zellen hin untersucht wurde. Ein ebener Verlauf, s. Abbildung 12, mit vereinzelt länglichen Zellen, s. Abbildung 13, war ein Hinweis auf eine gut erhaltene Meniskusoberfläche. Schädigungen waren durch Risse, s. Abbildung 24, oder Fibrillationen, s. Abbildung 21, erkennbar. In der Umgebung solcher Schäden fanden sich gehäuft reaktive Zellen, s. Abbildung 22 und Zellcluster, s. Abbildung 26.

Die Zone, welche im Schema mit C markiert ist, s. Abbildung 8, wird FCJ (*fibrocartilage junction*) genannt und stellt das Ende der sichtbaren Gefäßausprägung dar, s. Abbildung 15. Hier konnten keine Unterschiede zwischen Menisken mit geringen oder schweren Schäden gefunden werden, sodass diese Zone keine Berücksichtigung bei der Bewertung durch den Score erhielt.

In der im Schema mit D markierten Innenzone, s. Abbildung 8, fanden sich in beiden Gruppen rundlich-ovale Zellen, s. Abbildung 14. Sie traten vereinzelt oder in

Kleingruppen auf. Die Alzianblaufärbung war dort besonders bei Menisken mit geringen Schäden sehr kräftig, s. Abbildung 16.

Zuletzt wurde auch die Außenzone begutachtet. Sie ist im Schema mit E gekennzeichnet, s. Abbildung 8. Dort zeigte sich in sämtlichen Präparaten lockeres Bindegewebe mit zahlreichen spindelförmigen fibroblasten-ähnlichen Zellen, s. Abbildung 17, sodass auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen dokumentierbar waren.

3.1.1 Histologische Merkmale

3.1.1.1 Zeichen gering geschädigter Menisken

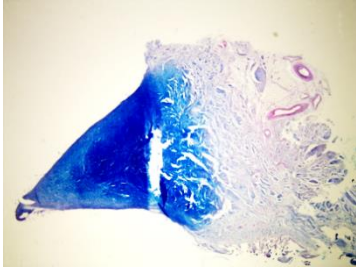


Abbildung 9: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit Alcianblau-Kernechtrot

Kräftige Alcianblaufärbung. Dezent Matrixdegenerationszeichen der Innenzone mit Riss/Schnittartefakt. Veränderungen an der Meniskusspitze.

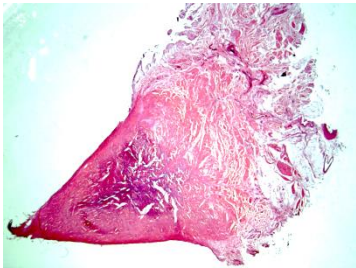


Abbildung 10: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit HE

Die Innenzone fällt durch eine dunklere Farbe sowie dezente Matrixunregelmäßigkeiten auf.

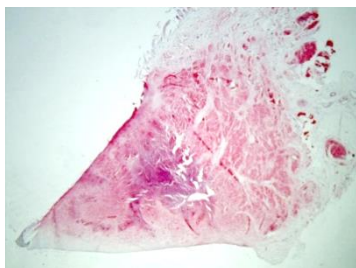


Abbildung 11: Meniskusquerschnitt, IHC für Kollagen-Typ I

Relativ homogener Nachweis für Kollagen-Typ I. Es fällt ein negativer Bereich für Kollagen-Typ I an der Unterseite des Präparats auf sowie leichte zentrale Unregelmäßigkeiten.

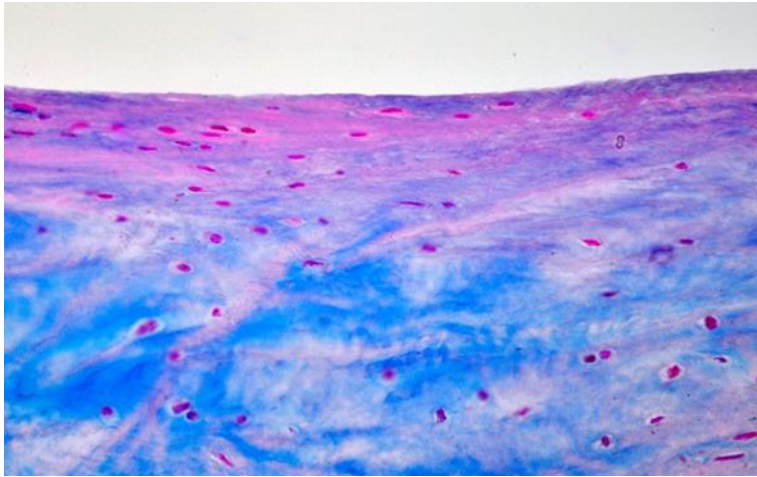


Abbildung 12: Meniskusoberfläche ohne Zeichen einer degenerativen Schädigung

Angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot. Es fällt die glatte Beschaffenheit der Oberfläche mit zahlreichen länglichen Zellen auf (s. Abbildung 13). Weiter innen gelegen finden sich vereinzelt ovale Zellen mit chondrozytärer Erscheinung (s. Abbildung 14).

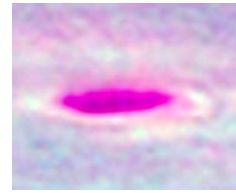


Abbildung 13: Längliche Zelle der Meniskusoberfläche

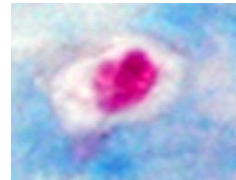


Abbildung 14: Runder Fibrochondrozyt

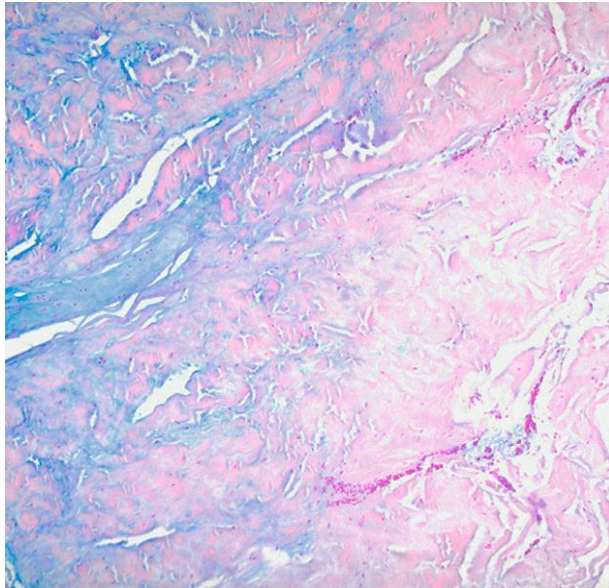


Abbildung 15: Alzianblau-Kernechtrotfärbung der FCJ

Innenzone (links) und Außenzone (rechts) eines Meniskus. Grenze bzw. Ende der sichtbaren Gefäßversorgung an der fibrocartilaginären Grenze (FCJ). Von rechts können zwei Gefäße dargestellt werden, welche bis zur Bildmitte ziehen. Links dieser Grenze deutlich stärkere Alzianblaufärbung.

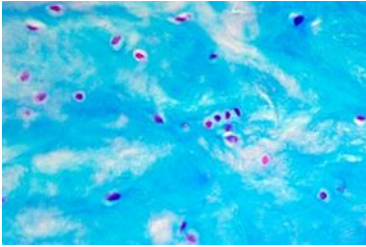


Abbildung 16: Innenzone eines Meniskus, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot

Rundlich-ovale Zellen, welche vereinzelt oder in Kleingruppen vorliegen.

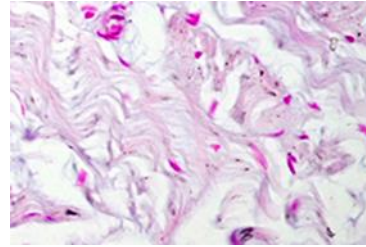


Abbildung 17 Außenzone eines Meniskus, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot

Lockeres Bindegewebe mit schlanken und fibroblasten-ähnlichen Zellen.

3.1.1.2 Zeichen schwer geschädigter Menisken

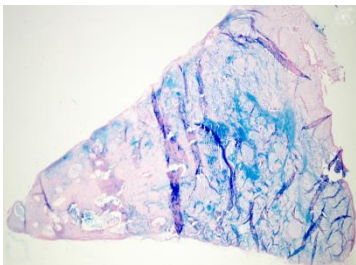


Abbildung 18: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot

Fehlende bis schwache und inhomogene Blaufärbung der Innenzone. Rundliche bis ovale Residuen ausgewaschener Kalzifizierungen an der Meniskusspitze.

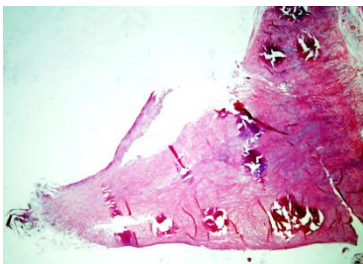


Abbildung 19: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit HE

Schwere Schädigung der Oberfläche sowie der Meniskusspitze. Zusätzlich degenerative Zeichen im Sinne von multiplen, großen ausgewaschenen Kalzifizierungen.

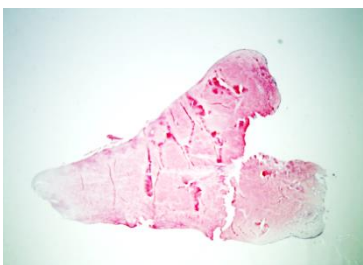


Abbildung 20: Meniskusquerschnitt, IHC für Kollagen-Typ I

Schwach homogener Nachweis für Kollagen-Typ I. Negative Bereiche für Kollagen-Typ I an der Spitze und der Außenzone des Präparats.

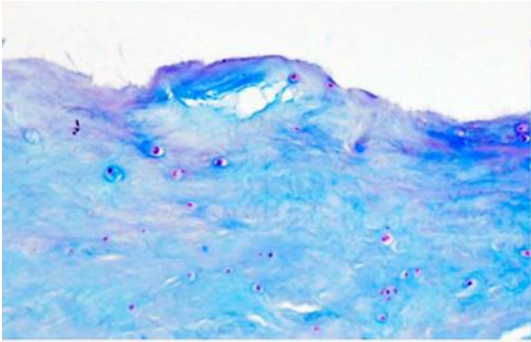


Abbildung 21: Meniskusoberfläche mit Zeichen degenerativer Schädigungen

Unregelmäßige Oberfläche ohne Zellen mit länglichem Charakter. Zellen unterschiedlichster Größe mit verschobener Kern/Plasma-Relation s. Abbildung 22.

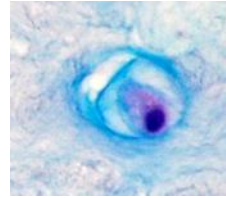


Abbildung 22: Reaktiver Fibrochondrozyt

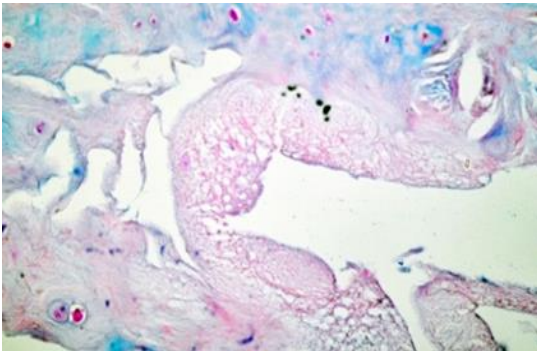


Abbildung 23: Fettige Degeneration eines Meniskus

Ausgewaschene Fettvakuolen in der Nähe einer Meniskusspitze

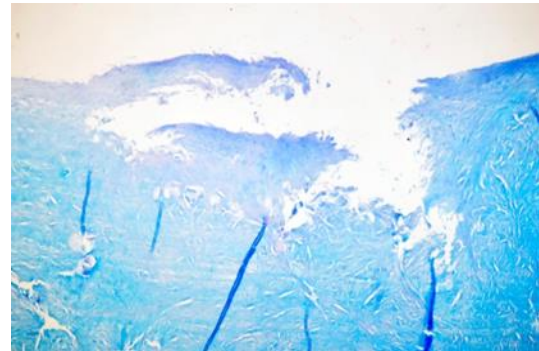


Abbildung 24: Oberflächlicher Riss eines degenerativ geschädigten Meniskus.

In der Umgebung des Risses ist eine Aufhellung der Matrix angedeutet.

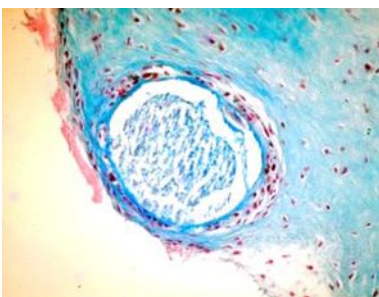


Abbildung 25: Residuum einer Verkalkung

Zeichen der Degeneration des Meniskus. Die Kalkkristalle wurden im Rahmen der Aufbereitung des Präparats ausgewaschen.

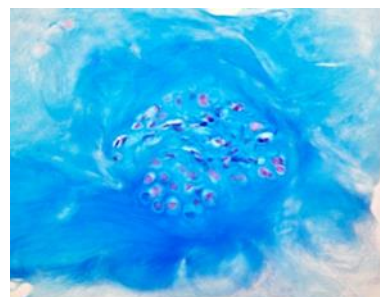


Abbildung 26: Zellcluster

Ansammlung von Zellen zu einem Zellnest

3.1.2 Degenerationsscore

Durch die gewonnenen Erkenntnisse aus den histologischen Begutachtungen der Alzianblau-Kernechtrotfärbungen in den Meniskusquerschnitten, konnte der nachfolgende Score zur Bewertung degenerativer Schäden eines Meniskus entwickelt werden, s. Abbildung 27. Kriterien der Beurteilung wurden die Form des Meniskusquerschnitts samt der Intensität der Alzianblau-Kernechtrotfärbung, die Oberflächenbeschaffenheit unter Berücksichtigung der Morphologie der dortigen Zellen und weitere Zeichen der Degeneration wie z.B. reaktive Zellen, Bildung von Zellclustern oder von fettigen Degenerationen. Zuletzt wurde auch auf Hinweise für Verkalkungen geachtet, welche einen besonders schwerwiegenden Einschnitt in die Integrität des Gewebes bedeuten. Die ersten drei Kriterien konnten mit 1-3 Punkten, das Vierte nur mit 0 oder 3 Punkten bewertet werden. Die Summe der einzelnen Punkte spiegelte den Grad der Schädigung wider. Erreichte das Präparat eine Punktzahl von neun oder mehr, so lag eine geringe Schädigung des entsprechenden Meniskus vor. Präparate mit niedrigeren Punktwerten zeigten deutliche Hinweise auf degenerative Schäden. Eine Übersicht der mittels Degenerationsscore bewerteten Präparate sowie weiterer Details zu dem Patientenkollektiv befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

·Degenerationsscore·			
Histologische Merkmale			
Form des Meniskusquerschnitts & Intensität der Alzianblaufärbung in der Meniskusübersicht	3	2	1
Oberflächenbeschaffenheit des Meniskus samt länglicher Zellmorphologien	3	2	1
Abwesenheit typischer Zeichen der Degeneration (reaktive Zellen, Zellcluster, fettige Degenerationen) im gesamten Präparat	3	2	1
Keine Verkalkungen bzw. keine Residuen einer Verkalkung	3	0	0
	=		

Abbildung 27: Score zur Bewertung eines Meniskus

Neu entwickelter Degenerationsscore zur Bewertung degenerativ geschädigter Menisken. Dieser wurde anhand der histologischen Merkmale von gering und schwer geschädigten Menisken des Patientenkollektivs generiert. Hohe Punktwerte von ≥ 9 sprechen für einen gering geschädigten Meniskus. Eine Punktzahl < 9 beschreibt einen Meniskus mit umfangreichem Schaden.

3.1.3 Immunhistochemische Markierung von RSPO2 und SFRP2

RSPO2 und SFRP2 sind Modulatoren des Wnt-Signalwegs, welcher möglicherweise eine größere Rolle bei der Pathogenese der Arthrose spielt als bisher angenommen. Insgesamt wurden 16 verschiedene Präparate auf das Vorhandensein dieser Proteine untersucht. Für beide Proteine konnte in sämtlichen Proben ein positiver Nachweis in humanem Meniskusgewebe erbracht werden. Allerdings offenbarten sich Differenzen in deren Lokalisierung. Für RSPO2 fiel eine stark positive Reaktion der EZM und eine nur sehr schwache des Zytoplasmas einiger Zellen auf, s. Abbildung 28. Die Oberfläche präsentierte sich besonders farbintensiv. Im Gegensatz dazu zeigte sich die EZM für SFRP2 zart homogen und das Zytoplasma der Zellen kräftig rot, s. Abbildung 29. Die Oberfläche wies keine verstärkt positive Reaktion auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen gering und schwer geschädigten Menisken konnte für beide Wnt-Modulatoren nicht nachgewiesen werden.

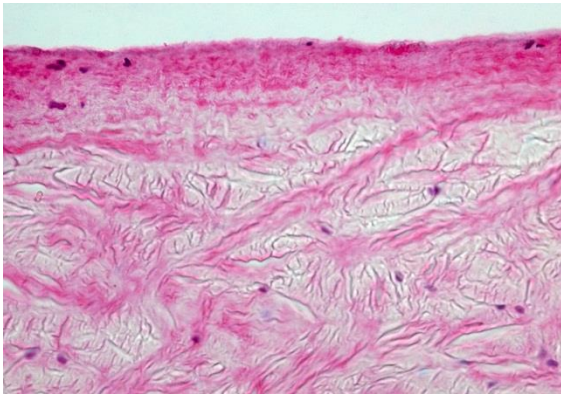


Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von RSPO2

Darstellung einer Meniskusoberfläche. Es zeigt sich eine positive Reaktion für RSPO2 der EZM mit Betonung entlang der Oberfläche des Meniskus. Das Zytoplasma scheint nur schwach markiert zu sein. Gegenfärbung mit Hämalaun.

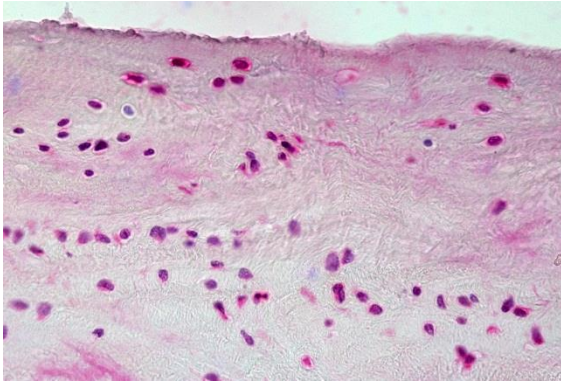


Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von SFRP2

Darstellung einer Meniskusoberfläche. Es zeigt sich eine schwache und homogene positive Reaktion für SFRP2 der EZM. Auffällig ist das deutlich positive Zytoplasma einiger Zellen. Gegenfärbung mit Hämalaun.

3.2 Ergebnisse der Genexpressionsanalysen

3.2.1 Meniskus-Housekeeping-Gen-Analyse

Für diese Arbeit wurden β 2Mikro, HPRT1, SDHA, RPL13A, PPIA, MAPK1, LaA und α 2Makro als denkbare Housekeeping-Gene für Meniskusgewebe analysiert. Die Ergebnisse sind aus Gründen der Übersicht in zwei Abbildungen, s. Abbildung 30 und Abbildung 31, dargestellt. Für die Untersuchung wurden vier verschiedene cDNA-Proben aus Meniskusgewebe (M1-4) mit jeweils 2 identischen Ansätzen (a und b) verwendet. Sämtliche Gene zeigten in der Genexpressionsanalyse relativ konstante Werte und wären somit geeignete Kandidaten, um als Housekeeping-Gen für den Meniskus etabliert zu werden.

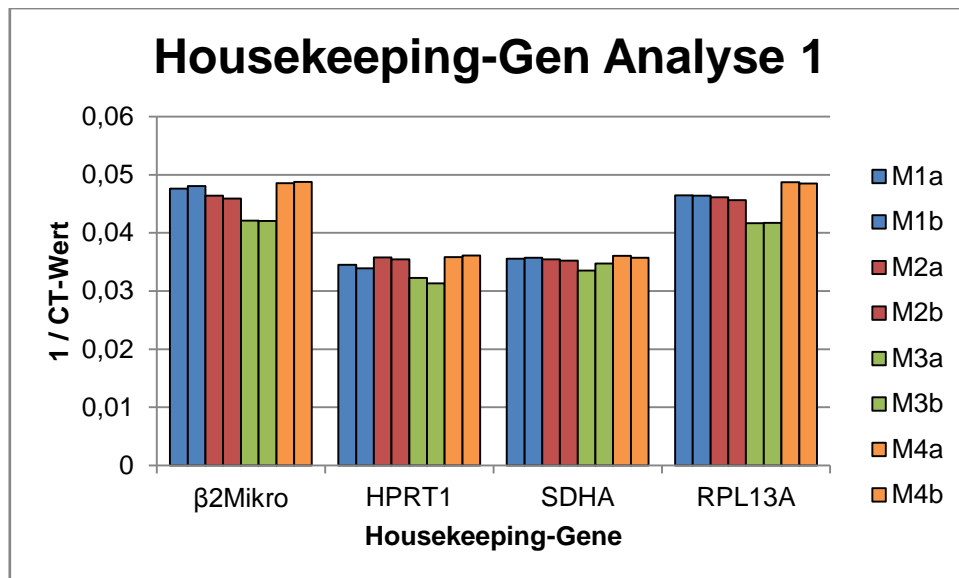


Abbildung 30: Realtime-PCR 1 zur Analyse der Housekeeping-Gene

Als denkbare Housekeeping-Gene wurden β2Mikro, HPRT1, SDHA und RPL13A untersucht. Die cDNA stammt von 4 verschiedenen Meniskuspräparaten (M1-4). Es wurden jeweils zwei identische Ansätze (a und b) gemessen.

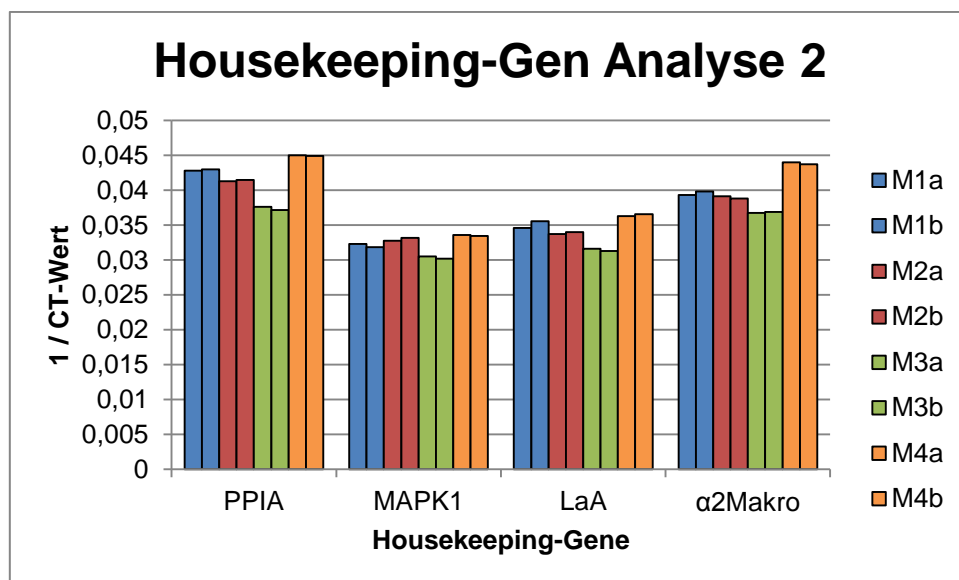


Abbildung 31: Realtime-PCR 2 zur Analyse der Housekeeping-Gene

Als denkbare Housekeeping-Gene wurden weiterhin PPIA, MAPK1, LaA und α2Makro untersucht. Die cDNA stammt von 4 verschiedenen Meniskuspräparaten (M1-4). Es wurden jeweils zwei identische Ansätze (a und b) gemessen.

3.2.2 Differenzierung zwischen gering und schwer geschädigten Menisken

Die Genexpression der beiden Gruppen, gering und schwer geschädigter Menisken, wurde mittels RT-PCR untersucht und ausgewertet. Es wurden insgesamt sechs verschiedene cDNA-Proben aus Meniskusgewebe für die Analyse herangezogen. Anhand des entwickelten Degenerationsscores wurden drei schwer geschädigte Menisken (rote Gruppe: 513, 514med, 515med) und drei gering geschädigte (blaue Gruppe: 524med, 527med, 515lat) für die Untersuchungen ausgewählt. Von Patient Nr. 515 konnte demnach sowohl der mediale als auch der laterale Meniskus für die Untersuchung gewonnen werden. Interessanterweise konnte der mediale Meniskus der geschädigten und der laterale Meniskus der gesunden Seite zugeordnet werden. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde hier der Begriff gesund für die Menisken mit geringen degenerativen Schäden verwendet.

Die Ergebnisse aus der Analyse der Genexpression für Kollagen-Typ I zeigten, dass Menisken mit geringen degenerativen Anzeichen, blaue Gruppe, einen höheren Gehalt an mRNA für Kollagen-Typ I aufwiesen, als dies für schwer geschädigte Menisken mit niedrigem Score der Fall war, s. Abbildung 32. Meniskus Nr. 524med erreichte den höchsten Wert. Dabei ist anzumerken, dass Meniskus Nr. 524med mit einem Score von 11 ebenfalls führend unter den sechs untersuchten Präparaten war.

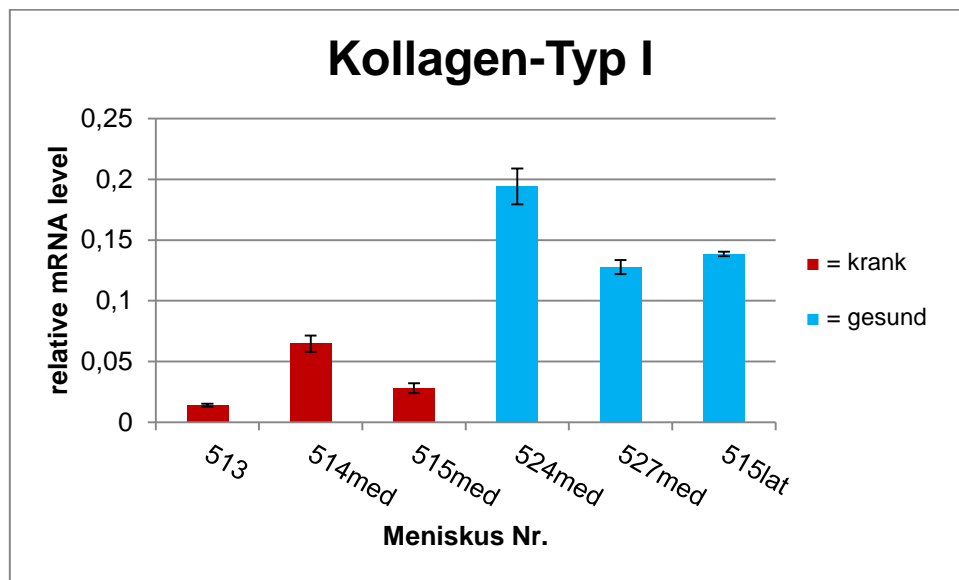


Abbildung 32: Realtime-PCR zum Vergleich der Genexpression an Kollagen-Typ I

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Genexpression zwischen kranken und eher gesunden Menisken. Die kranken Menisken sind in der Abbildung in Rot dargestellt (513 mit Degenerationsscore 4, 514med mit Degenerationsscore 4 und 515med mit Degenerationsscore 5). In Blau sind die eher gesunden Menisken dargestellt (524med mit Degenerationsscore 11, 527med mit Degenerationsscore 10 und 515lat mit Degenerationsscore 9). Normalisiert nach Pfaffl (2001).

Für die Bewertung der Genexpression des Kollagen-Typs II ergaben sich bei den schwer geschädigten Menisken einheitlich sehr niedrige Werte. In der blauen, der Gruppe der eher gering geschädigten Menisken, zeigten sich dagegen deutlich stärkere Expressionshinweise, wenn auch von unterschiedlicher Intensität, s. Abbildung 33. Hier lag das Expressionsergebnis für Meniskus Nr. 527med deutlich am höchsten, wohingegen 524med und 515lat ähnliche Werte aufwiesen.

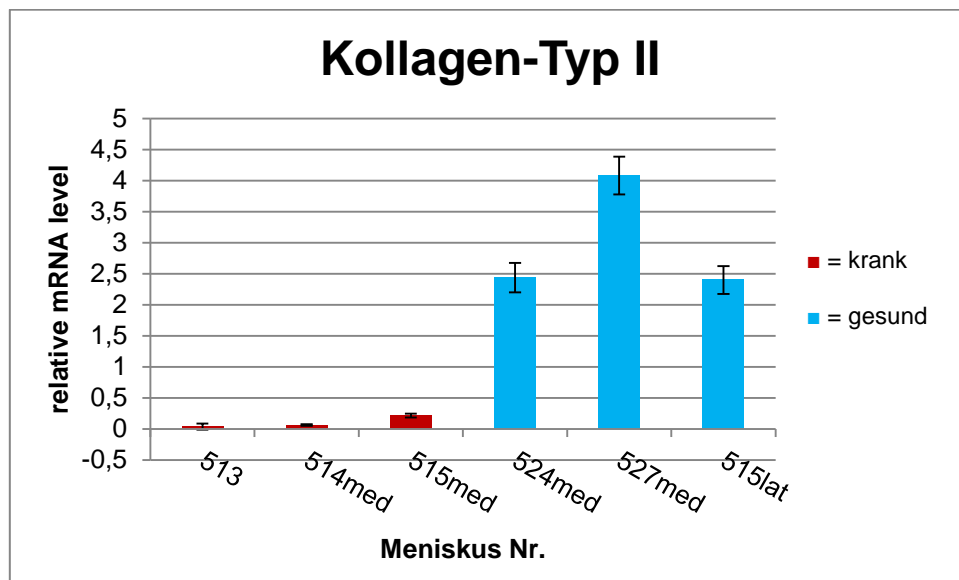


Abbildung 33: Realtime-PCR zum Vergleich der Genexpression an Kollagen-Typ II

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Genexpression zwischen kranken und eher gesunden Menisken. Die kranken Menisken sind in der Abbildung in Rot dargestellt (513 mit Degenerationsscore 4, 514med mit Degenerationsscore 4 und 515med mit Degenerationsscore 5). In Blau sind die eher gesunden Menisken dargestellt (524med mit Degenerationsscore 11, 527med mit Degenerationsscore 10 und 515lat mit Degenerationsscore 9). Normalisiert nach Pfaffl (2001).

Auch die relativen mRNA-Level für Aggrekan zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen roter und blauer Gruppe. In der blauen Gruppe lag die Genexpression für Aggrekan markant über der Genexpression der roten Gruppe, s. Abbildung 34. Meniskus Nr. 527med und 515lat zeigten eine höhere Genexpression für Aggrekan als 524med.

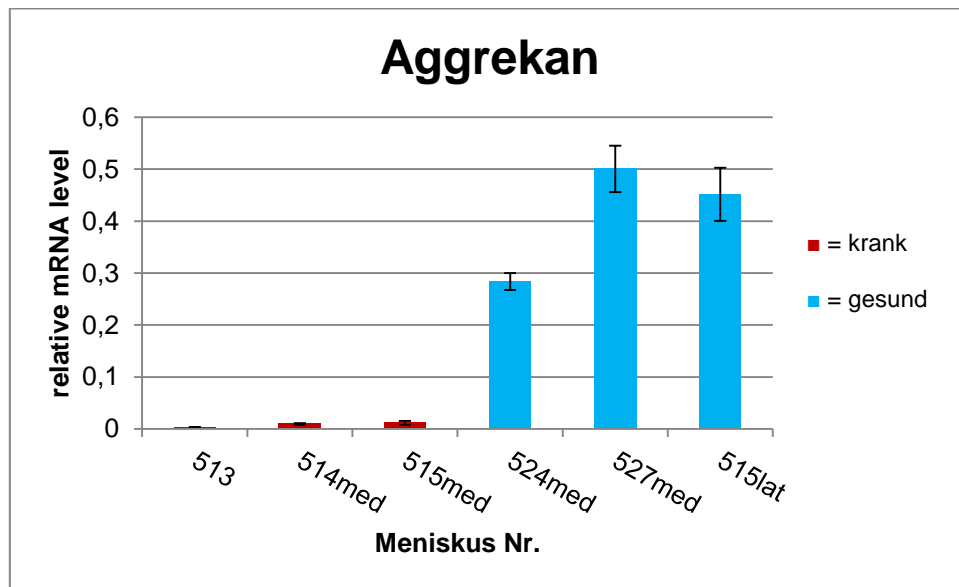


Abbildung 34: Realtime-PCR zum Vergleich der Genexpression an Aggrekan

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Genexpression zwischen kranken und eher gesunden Menisken. Die kranken Menisken sind in der Abbildung in Rot dargestellt (513 mit Degenerationsscore 4, 514med mit Degenerationsscore 4 und 515med mit Degenerationsscore 5). In Blau sind die eher gesunden Menisken dargestellt (524med mit Degenerationsscore 11, 527med mit Degenerationsscore 10 und 515lat mit Degenerationsscore 9). Normalisiert nach Pfaffl (2001).

Runx-2 und Sox-9 sind wesentliche Transkriptionsfaktoren für Kollagen-Typ I bzw. Kollagen-Typ II. Für Runx-2, welches für die Transkription von Kollagen-Typ I steht, gab es keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Gruppen. Sox-9, als Transkriptionsfaktor des Kollagen-Typs II, war in der blauen Gruppe gering erhöht und nur bei Meniskus Nr. 527med deutlich, s. Abbildung 35. Eine denkbare Korrelation der Ergebnisse von Kollagen-Typ I und Runx-2 als dessen Transkriptionsfaktor war nicht möglich. Die hohe Genexpression der gesunden Gruppe für Kollagen-Typ I wurde hier nicht von einer hohen Expression von Runx-2 begleitet. Dagegen ähnelten die Verhältnisse der Genexpressionwerte für Kollagen-Typ II den Messungen für Sox-9. Für Meniskus Nr. 527med konnte sowohl für Kollagen-Typ II als auch für Sox-9 der höchste Wert gemessen werden.

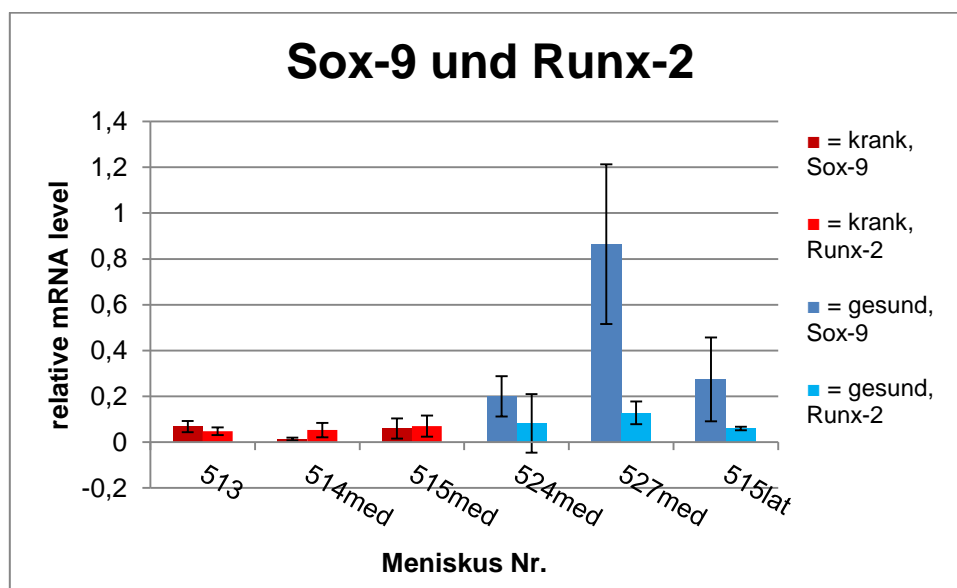


Abbildung 35: Realtime-PCR zum Vergleich von Sox-9 und Runx-2

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Genexpression zwischen kranken und eher gesunden Menisken. Die kranken Menisken sind in der Abbildung in Hellrot und Dunkelrot dargestellt (513 mit Degenerationsscore 4, 514med mit Degenerationsscore 4 und 515med mit Degenerationsscore 5). In Hellblau und Dunkelblau sind die eher gesunden Menisken dargestellt (524med mit Degenerationsscore 11, 527med mit Degenerationsscore 10 und 515lat mit Degenerationsscore 9). Normalisiert nach Pfaffl (2001).

RSPO2 und SFRP2 sind Modulatoren des Wnt-Signalweges, wobei RSPO2 eine aktivierende und SFRP2 eine deaktivierende Funktion erfüllt. Meniskus Nr. 527med zeigte im Vergleich zu allen anderen Menisken die stärkste Genexpression für RSPO2. Die Expression von SFRP2 schien in der blauen Gruppe im Vergleich zur roten Gruppe erhöht, wobei auch Meniskus Nr. 513 einen hohen relativen mRNA-Level demonstrierte. Meniskus 515med, als Vertreter aus der Seite der geschädigten Menisken, und 515lat, aus der gesunden Seite, lagen mit ihrem mRNA-Level für RSPO2 ähnlich hoch, wobei anzumerken ist, dass diese aus einem Patientenknien stammen. SFRP2 war bei diesem Patienten dagegen auf der gesunden Seite deutlich höher. Bei fünf der sechs untersuchten Menisken überwog im individuellen Vergleich SFRP2 gegenüber RSPO2, s. Abbildung 36.

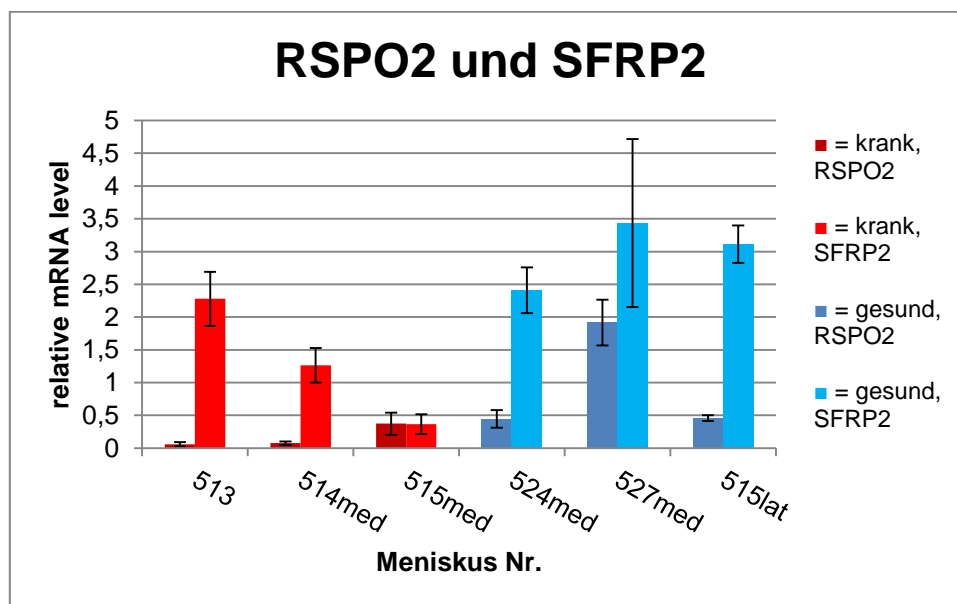


Abbildung 36: Realtime-PCR zum Vergleich von RSPO2 und SFRP2

Das Diagramm zeigt den Vergleich der Genexpression zwischen kranken und eher gesunden Menisken. Die kranken Menisken sind in der Abbildung in Hellrot und Dunkelrot dargestellt (513 mit Degenerationsscore 4, 514med mit Degenerationsscore 4 und 515med mit Degenerationsscore 5). In Hellblau und Dunkelblau sind die eher gesunden Menisken dargestellt (524med mit Degenerationsscore 11, 527med mit Degenerationsscore 10 und 515lat mit Degenerationsscore 9). Normalisiert nach Pfaffl (2001).

3.3 Ergebnisse der Proteinanalysen

3.3.1 Nachweis der Proteine mittels Western Blot

Neben dem Nachweis der untersuchten Proteine im histologischen Präparat sowie der dazugehörigen Genexpression, gehört der Nachweis eines Proteins mittels Western Blot. Zu beachten ist, dass hier Meniskusgewebe zur Analyse herangezogen wurde und keine aufgereinigten Zellysate. Auf der linken Seite ist jeweils die Proteinleiter abgebildet, um Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ziehen zu können. RSPO2 konnte zwischen einer Bandenhöhe von 50 kDa bis 65 kDa detektiert werden. Es waren drei Banden abgrenzbar, s. Abbildung 37. Auch für SFRP2 gelang ein positiver Nachweis, jedoch waren ebenfalls mehrere Banden sichtbar, s. Abbildung 38. Der Haupttranskriptionsfaktor des Kollagen-Typs II Sox-9, s. Abbildung 39, sowie der Haupttranskriptionsfaktor des Kollagen-Typs I Runx-2, s. Abbildung 40, konnten ebenfalls auf Proteinbasis nachgewiesen werden. Quantitative Unterschiede zwischen gering geschädigten und schwer geschädigten Menisken ließen sich nicht dokumentieren.

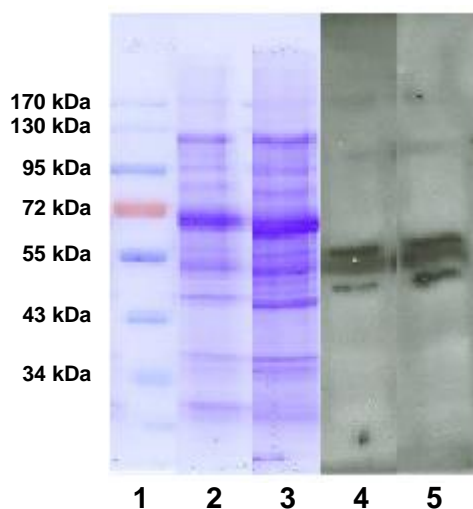


Abbildung 37: Western Blot für RSPO2

Proteingemisch aus Meniskusgewebe. Linie 1 zeigt die Proteinleiter zur Orientierung des Molekulargewichts. Brilliant-Blau-Proteinfärbung (Linie 2 und 3). Linie 4 (Pat. Nr. 511; Score 10 Pkt.) und 5 (Pat. Nr. 509; Score 5 Pkt.) demonstrieren den positiven Nachweis von RSPO2 in Meniskusgewebe. Es lassen sich 3 Banden voneinander abgrenzen bei einer Masse zwischen 48 kDa und 65 kDa. Zusammengesetztes Bild.

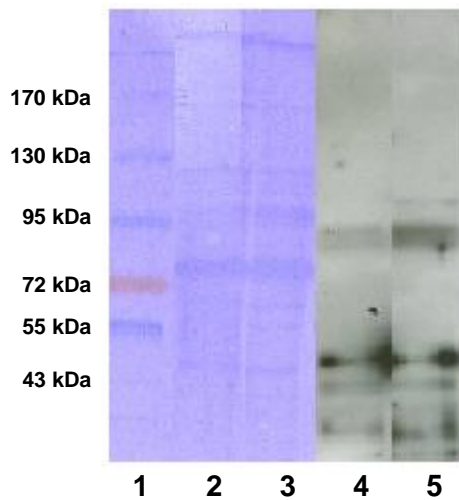


Abbildung 38: Western Blot für SFRP2

Proteingemisch aus Meniskusgewebe. Linie 1 zeigt die Proteinleiter zur Orientierung des Molekulargewichts. Brilliant-Blau-Proteinfärbung (Linie 2 und 3). Linie 4 (Pat. Nr. 511; Score 10) und Linie 5 (Pat. Nr. 513; Score 4) demonstrieren den positiven Nachweis von SFRP2 in Meniskusgewebe. Es lassen sich mehrere Banden voneinander abgrenzen. Zusammengesetztes Bild.

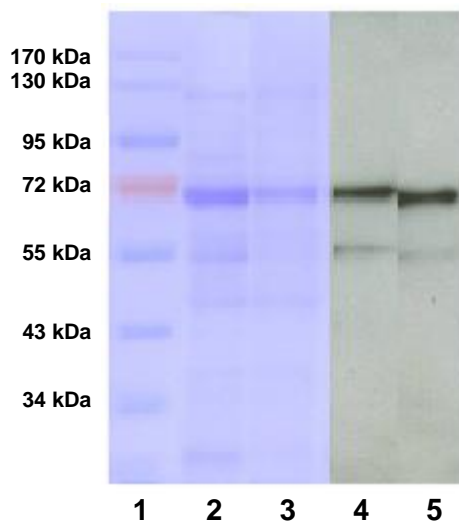


Abbildung 39: Western Blot für Sox-9

Proteingemisch aus Meniskusgewebe. Linie 1 zeigt die Proteinleiter zur Orientierung des Molekulargewichts. Brilliant-Blau-Proteinfärbung (Linie 2 und 3). Linie 4 (Pat. Nr. 505; Score 10) und 5 (Pat. Nr. 504; Score 6) demonstrieren den positiven Nachweis von Sox-9 in Meniskusgewebe. Es zeigen sich deutlich positive Signale bei 70 kDa und leicht positive Signale bei 55 kDa. Zusammengesetztes Bild.

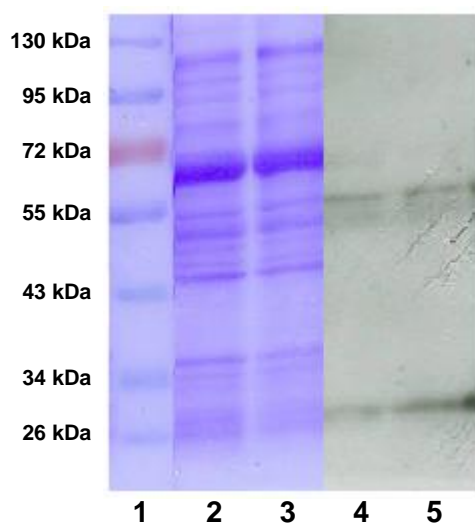


Abbildung 40: Western Blot für Runx-2

Proteingemisch aus Meniskusgewebe. Linie 1 zeigt die Proteinleiter zur Orientierung des Molekulargewichts. Brilliant-Blau-Proteinfärbung (Linie 2 und 3). Linie 4 (Pat. Nr. 511; Score 10) und 5 (Pat. Nr. 513; Score 4) demonstrieren den positiven Nachweis von Runx-2 in Meniskusgewebe. Entsprechende Signale bei 30 kDa und 55 kDa. Zusammengesetztes Bild.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der histologischen Darstellungen

Die Qualität des Meniskus ist wesentlich für dessen Funktion (Longo et al. 2012). Die histologische Analyse eines Gewebes lässt Rückschlüsse auf dessen Qualität und somit auch auf dessen Funktionsfähigkeit zu. Ziel dieser Arbeit war es, ein Bewertungsschema für den Grad des degenerativen Schadens speziell für den Meniskus zu entwickeln. Dabei war es wichtig möglichst objektive Kriterien zu finden, welche untersucherunabhängig reproduzierbare Ergebnisse liefern. Ebenso war es erforderlich, von den zahlreichen Veränderungen die relevantesten und somit aussagekräftigsten Merkmale der Degeneration zu ermitteln. Das Ergebnis sollte in Form von Punkten ausgegeben werden können.

Das erste Kriterium des Degenerationsscores bewertet die gesamte Form des Meniskusquerschnitts, welche idealerweise keilförmig ist. Ebenso zum ersten Kriterium zählt die Intensität der Färbung durch das Alzianblau-Kernechtrot. Ist die Form des Meniskus gut erhalten, kann dies ein Hinweis auf eine weitgehend erhaltene Zusammensetzung der EZM und eine intakte Kollagenfaserarchitektur sein. Für die Alzianblaufärbung gilt, je stärker die Farbe, desto höher der Gehalt an Proteoglykan und somit die Fähigkeit des Meniskus, Stöße abfedern zu können. Jedoch kann im Rahmen der mukoiden Degeneration die Grundsubstanz und damit der Gehalt an Proteoglykan sehr weit steigen (Boya et al. 2004) und dadurch der Meniskus an Zugfestigkeit verlieren. Ebenso kann der Gehalt so stark sinken, dass die Stoßdämpferfunktion und somit der Schutz für das Kniegelenk verloren gehen. Das Gleichgewicht von Fasergehalt und Grundsubstanz sollte exakt an die Ansprüche des Meniskus angepasst sein. Die farbliche Beurteilung und der Vergleich einzelner Menisken waren nur möglich, da durch die Benutzung einer Färbemaschine eine Gleichbehandlung bezüglich Färbesubstanz und Dauer des Eintauchvorgangs aller Meniskuspräparate gewährleistet war. Die in der Literatur beschriebene mukoiden Degeneration (Boya et al. 2004) konnte in einigen histologischen Präparaten der gering geschädigten Menisken auch in dieser Studie

erkannt werden. Hinweisend darauf war die dunklere Farbgebung der HE-Färbung als auch der Alzianblaufärbung im Zentrum des Meniskus, s. Abbildung 10. Bei den schwer geschädigten Menisken konnte dies so nicht beobachtet werden und das Zentrum sowie alle anderen Anteile des Meniskus wirkten eher blass und gering angefärbt. Dies lässt auf einen immensen Verlust an Matrixbestandteilen bzw. Proteoglykan schließen. Möglich wäre, dass bei weit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium sich eine bereits vor Jahren bestandene mukoide Degeneration mit erhöhtem Proteoglykangehalt zum Zeitpunkt der Total-Endoprothese bereits in einem Proteoglykanverlust gewandelt hat. Verliert ein Meniskus seinen Proteoglykangehalt, so kann er mutmaßlich auch seine stoßdämpfende Funktion nicht aufrechterhalten. Dies könnte den Übergangspunkt von einem gering zu einem schwer geschädigten Meniskus darstellen. Sun beschrieb 2012 eine stärkere Alzianblaufärbung mit einem Anstieg des Aggrekangehalts bei arthroseerkrankten Menisken im Vergleich zu gesunden Menisken (Sun et al. 2012). Beides wird von dieser Arbeit sowohl von den histologischen als auch den Genexpressionsanalysen nicht gestützt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren, welche einen Anstieg der Aggrekanasen 1 und 2 (Ishihara et al. 2009) bzw. einem Anstieg des Aggrekanspaltprodukts NITEGE und letztendlich einen Aggrekanverlust (Krenn et al. 2010) im Zusammenhang mit der Meniskusdegeneration sahen.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Beschaffenheit der Oberfläche des Meniskus dar. Hier fiel bei Menisken mit geringen Schäden auf, dass sich die Oberfläche glatt, kontinuierlich und mit vereinzelt länglichen Zellen darstellte. So lange sie erhalten war, traten in der Umgebung keine größeren Schäden oder Degenerationszeichen des Meniskus auf. Wahrscheinlich stellt die Oberfläche eine Art Schutzfunktion dar. Schwer geschädigte Menisken zeigten dagegen einen unregelmäßigen Verlauf der Oberfläche, Risse und Fibrillationen. Auch Pauli erkannte dies als Zeichen der Schädigung des Meniskus (Pauli et al. 2011). In diesen Bereichen waren die Zellen teilweise vergrößert, aufgetrieben und wurden als reaktive Zellen bezeichnet. Möglicherweise ähneln sie den „aktivierten Zellen, wie Goldring und Marcu die phänotypisch veränderten Chondrozyten in arthritischem Gelenkknorpel des Kniegelenks nannten. Diese Zellen fielen neben ihrer

morphologischen Veränderung durch Zellproliferation, Bildung von Zellclustern und vermehrte Matrixproduktion auf (Goldring und Marcu 2009).

Das dritte Kriterium des Degenerationsscores repräsentierte allgemeine Zeichen degenerativer Veränderungen des Meniskus und war keiner speziellen Region zugeordnet. Auffälligkeiten, wie die Bildung von Zellnestern, sogenannten „Clustern“, oder fettige Degenerationen konnten in der vorliegenden Studie dokumentiert und bewertet werden. Zellcluster sind ein histologisches Kennzeichen der Arthrose und stehen im Verdacht dedifferenzierte Chondrozyten oder Progenitorzellen zu sein. Auf ihnen wurden Stammzellmarker nachgewiesen. Auch wird vermutet, dass sie die Matrixdegeneration sowie die Verkalkungen des Gewebes unterstützen (Lotz et al. 2010). Hellio konnte bei Kaninchenmenisken die Entstehung von Zellclustern nach Induktion einer Arthrose nachweisen (Hellio Le Graverand et al. 2001).

Für das vierte und letzte Kriterium war entscheidend, ob der Meniskus Anzeichen einer vor der Präparation vorhandenen Verkalkung zeigte. Sun und Mauerhahn sahen 2012 in der Verkalkung bzw. Kalzifizierung des Meniskus einen frühen Erkrankungshinweis und ein für die Arthrose prädisponierender Faktor, welcher mit der Meniskusdegeneration positiv assoziiert ist (Sun und Mauerhan 2012). Pauli dagegen dokumentierte Verkalkungen erst ab Grad 3-4 der Arthrose (Pauli et al. 2011). Auch MacMullan und McCarthy beschrieben Kalziumkristallablagerungen im Endstadium der Arthrose des Meniskus und dokumentierten einen Anstieg an entsprechenden Genen (MacMullan und McCarthy 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass Verkalkungen eher zu einem späten Erkrankungszeitpunkt auftreten, so wie Pauli, MacMullan und McCarthy es beschrieben. Jedoch gilt dies nur für bereits histologisch erkennbare Verkalkungen und weiterführende zellspezifische Untersuchungen wären nötig, um einen früheren Zeitpunkt der Kalziumgenerierung zu detektieren. Eine direkte Darstellung der Verkalkung war aufgrund der Aufbereitung des Gewebes mit der zwingend erforderlichen Entkalkung nicht möglich. Es konnten jedoch die ehemals verkalkten und im Präparat ausgewaschenen Regionen histologisch mutmaßlich identifiziert werden. Abzugrenzen waren hiervon pseudozystische Veränderungen durch die Separation der Matrix im Rahmen der mukoiden Degeneration. Weitere Bereiche von

histologischem Interesse waren die Außenzone und die Grenzzone der Vaskularisierung (FCJ) des Meniskus. Hier konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den gering geschädigten und den schwer geschädigten Menisken festgestellt werden, sodass diese Regionen zwar nach Auffälligkeiten gesichtet werden mussten, aber keiner gesonderten Bewertung im Score unterlagen. Eine Zu- oder Abnahme der Gefäßbildung, welche mit dem Schweregrad der Schädigung hätte korrelieren können, konnte nicht beobachtet werden. Auch in der Literatur sind hier keine Veränderungen beschrieben. Die Zellularität wurde von Seiten einiger Autoren in verschiedene Scores eingearbeitet (Mankin et al. 1971) (Pauli et al. 2011). Da während der Entwicklung des Scores dieser Arbeit keine eindeutigen Hinweise auf eine generelle Zellvermehrung oder generellen Zellverlust gefunden werden konnten und in der Literatur der Meniskusdegeneration sowohl diffuse Hypo- als auch Hyperzellularität beschrieben wurde, konnte auf dieses Kriterium verzichtet werden.

Die Kritik an dieser Arbeit könnte auf die lokale Beschränkung der histologischen Untersuchung auf wenige Meniskusausschnitte pro Präparat zielen. Für die Begutachtung wurden Schnitte aus dem Mittelteil des Meniskuskörpers entnommen und somit können Aussagen letztendlich nur für diesen Teil getroffen werden. Eine morphologische Auffälligkeit, wie beispielsweise Bildung von Zellclustern, welche weiter ventral oder dorsal in Richtung der Meniskushörner lag, entging somit der Bewertung. Ebenso fielen bei einigen Präparaten unterschiedliche Erkrankungsgrade zwischen Innen- und Außenmeniskus auf. Dies könnte damit erklärt werden, dass die über Jahre bestehende Belastung des Außen- bzw. Innenmeniskus in besonderem Maße von der Achsstellung der Kniegelenke abhängig ist, welche mitunter sehr verschieden sein können. Es kann festgehalten werden, dass die Bewertung mittels diesem Degenerationsscore nur einen Hinweis auf den Schweregrad der Erkrankung und auf die bestehenden globalen Matrixveränderungen liefert. Für einen klinischen Nutzen ist der Score in dieser Art und Weise nicht geeignet, da für die Untersuchung die Entfernung des Meniskus obligat ist. Es wurden insgesamt 21 Menisken anhand des neu entwickelten Scores durch eine Alzianblaufärbung bewertet. Bei insgesamt vier Patienten konnten sowohl der mediale als auch der laterale Meniskus zur Analyse herangezogen werden. Bei nur einem Paar fiel der Score identisch aus, die

anderen lagen mit zwei, vier und fünf Punkten auseinander. Somit bleibt festzuhalten, dass keineswegs Aussagen anhand eines Meniskuscores über den kontralateralen Partner gemacht werden können, da selbst innerhalb eines Knies Unterschiede bestehen können. Auch die Präparate mit hoher Punktzahl sollten keineswegs als gesund oder unbeschadet betrachtet werden, wie es beispielsweise bei einem Meniskus eines Jugendlichen zu vermuten wäre, denn schließlich basiert die Entwicklung dieses Scores auf Untersuchungsergebnissen, welche ausschließlich aus Meniskusproben älterer Patienten stammen, die sich einer endoprothetischen Versorgung ihres Knies unterzogen.

Insgesamt wurden 16 Meniskuspräparate mittels immunohistochemischer Färbung auf das Vorhandensein der Proteine RSPO2 und SFRP2 hin untersucht. In sämtlichen Proben konnten positive Reaktionen nachgewiesen werden, sodass erstmalig der Nachweis beider Proteine für Meniskusgewebe erbracht wurde. Auch wenn für beide Proteine antagonistische Wirkungen in der Modulation des Wnt-Signalweges bekannt sind, scheinen sie im Meniskus parallel translatiert zu werden. Dies könnte für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts sprechen.

SFRP's sind extrazelluläre Modulatoren des Wnt-Signalweges (Galli et al. 2006). Eine derart starke Anfärbung des intrazellulären Bereichs war nicht zu erwarten. Auch die von den Modulatoren beeinflussten Wnt-Proteine befinden sich im extrazellulären Bereich und agieren über Frizzled-Rezeptoren der Zellmembran. Die immunohistochemischen Analysen anderer Autoren zeigen ebenso den Nachweis von SFRP2 im Zytoplasma. So wies O'Hurley SFRP2 im Zytoplasma von Epithelzellen der Prostata (O'Hurley et al. 2011) sowie Kawamoto im Zytoplasma von Zellen des Nierengewebes nach (Kawamoto et al. 2008). Möglicherweise ist das in den Zellen produzierte SFRP2 noch nicht sezerniert, sodass es sich im Zytosol befindet und dort angefärbt wird.

RSPO2 ist ein Aktivator des kanonischen Wnt-Signalweges und dieser spielt nicht nur in der embryologischen Entwicklung des Menschen eine Rolle, sondern auch in der Krebsentstehung und der Knochenhomöostase (Baron und Kneissel 2013). In der Literaturrecherche ließen sich keine vergleichbaren Arbeiten bezüglich RSPO2

und Meniskus finden. Auch immunhistochemische Analysen zum Vergleich mit anderen Geweben sind nicht vorhanden. Über den Grund, warum sich besonders die Oberfläche in dieser Studie positiv für RSPO2 darstellte lässt sich nur spekulieren. Die Oberfläche ist enormen Belastungen und Scherkräften ausgesetzt. Da bekannt ist, dass der Wnt-Signalweg von mechanischen Belastungen aktiviert werden kann (Corr 2008; Dell'Accio et al. 2006), wäre dies eine denkbare Erklärung.

4.2 Diskussion der Genexpressionsanalysen

Anhand der PCR-Daten zur Ermittlung eines geeigneten Housekeeping-Gens für die Meniskusuntersuchung wurde sich für β 2Mikro (β 2-Mikroglobulin) entschieden. β 2Mikro ist Bestandteil des MHC (*major histocompatibility complex*) der Klasse I und somit in fast allen kernhaltigen Zellen enthalten. In den Ergebnissen wies es eine kräftige und weitgehend konstante Expressierung auf. Dies macht es zu einem geeigneten Housekeeping-Gen für die Untersuchungen dieser Arbeit. Auch die anderen getesteten Housekeeping-Gene entsprachen diesen Kriterien und wären mögliche Kandidaten gewesen.

Kollagen-Typ I ist mit 80 % ein Hauptbestandteil des Faserknorpels und erfüllt im gesunden Zustand wesentliche Stütz- und Zugfunktionen. Den Erwartungen entsprechend fanden sich in dieser Studie bei den geringer geschädigten Menisken höhere Genexpressionswerte für Kollagen-Typ I als bei der Gruppe der schwer geschädigten Menisken. Dies steht im Einklang mit dem in der Literatur beschriebenen Kollagenverlust und der schlechteren Organisation kollagener Fasern bei fortschreitender Degeneration des Meniskus (Sun et al. 2012). Der gleiche Effekt kann auch für die PCR-Ergebnisse des Kollagen-Typs II festgestellt werden, denn auch hier liegen die Werte der Gruppe mit geringen Schädigungen klar über der mit hohen Schädigungen. Trotz der stärkeren Genexpression beider genannten Kollagene geht diese Arbeitsgruppe davon aus, dass es zu keinem Zeitpunkt zu einer Erhöhung der Expression mit Progression der Arthrose kommt, wie es beispielsweise für den Gelenknorpel beschrieben wurde (Miosge et al. 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass es mit dem Fortgang der

Erkrankung zu einer allgemeinen Abschwächung der Genexpression kommt, zumindest für die in dieser Arbeit untersuchten Gene. Auffallend und die Aussagekraft des Degenerationsscores unterstützend war die deutliche Differenz der Genexpression zwischen den eher gering geschädigten und den schwer geschädigten Menisken. Diese Differenz fand sich zum Beispiel bei der Analyse der Genexpression des Aggrekans. Dies entsprach den histologischen Untersuchungsbefunden dieser Arbeit. Bei gering geschädigten Menisken konnte eine höhere Genexpression für Aggrekkan nachgewiesen werden, als bei den schwer geschädigten. Gleichbedeutend rechtfertigt dieses Ergebnis das Kriterium die Intensität der Alzianblau-Kernechtrotfärbung in den Score zu integrieren, denn ein hoher Aggrekangehalt führt zu einer kräftigen Alzianblaufärbung. McAlindens Ergebnisse von 2001 stützen die These, dass es mit der Degeneration und steigendem Alter zu einem Verlust an Aggrekkan kommt (McAlinden et al. 2001). Mit fortschreitender Degeneration wies Ishihara einen Anstieg der inneren, chondrozyten-ähnlichen Zellen nach, welche MMP's und Aggrekkanasen exprimieren und somit zum Abbau des Aggrekans beitragen (Ishihara et al. 2009). In der Literatur sind zu dieser Theorie durchaus geteilte Meinungen vertreten. Sowohl Ferrer-Roca und Vilalta 1980 als auch Boya 2004 sahen mit dem Fortgang der Erkrankung eine stetige Proteoglykananreicherung innerhalb des Meniskus im Rahmen der mukoiden Degeneration (Ferrer-Roca und Vilalta 1980; Boya et al. 2004). Unter Betrachtung der histologischen Ergebnisse und der Genexpressions-Analysen kann diese Auffassung nur bedingt von den Ergebnissen dieser Arbeit getragen werden. In der Tat mag der Proteoglykangehalt mit Beginn und langsamen Fortgang der Erkrankung leicht ansteigen, was die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls vermuten lassen, allerdings zeichnete sich der Endpunkt der Erkrankung durch einen erheblichen Verlust an Proteoglykan und weiterer Matrixbestandteile aus.

Runx-2 und Sox-9 sind die Transkriptionsfaktoren für Kollagen-Typ I bzw. Kollagen-Typ II und waren somit ebenfalls attraktiv für die Untersuchung. Sox-9, der Transkriptionsfaktor des Kollagen-Typs II, wies in der Gruppe mit geringeren Schäden eine leicht höhere Expression auf als bei der Gruppe mit schweren Schäden. Lediglich für Meniskus Nr. 527med konnte eine hohe Expression gemessen werden. Dies passt zu dem am höchsten gemessenen Wert an Kollagen-

Typ II bei diesem Meniskus. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es mit zunehmender Degeneration auch zu einem Absinken der Expression des Transkriptionsfaktors Sox-9 kommt. Die Expression des Transkriptionsfaktors Runx-2 für Kollagen-Typ I zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen und liegt konstant niedrig. Möglicherweise findet hier eine frühzeitige Verringerung der Genexpression des für die Nachbildung des Kollagen-Typs I nötigen Transkriptionsfaktors Runx-2 statt, welche zu dem gemessenen Zeitpunkt bereits vollendet ist. Bisher ist in der Literatur kein Zusammenhang zwischen Runx-2 und Sox-9 mit der Degeneration des Meniskus beschrieben worden, wohingegen zahlreiche Autoren einen Zusammenhang dieser Transkriptionsfaktoren mit der Arthrose des Gelenkknorpels des Knies sehen. Kamekura 2006 und Orfanidou 2009 berichteten über einen erhöhten Level an Runx-2 in Chondrozyten aus arthritischem Gelenkknorpel im Vergleich zu gesundem Gelenkknorpel (Kamekura et al. 2006; Orfanidou et al. 2009). Diese gesteigerte Transkription von Runx-2, welche bei gleicher Pathophysiologie ggf. die Bildung des Kollagen-Typs I des Meniskus erhöhen würde, konnte in dieser Arbeit für den Meniskus nicht nachgewiesen werden. Eine künstlich herbeigeführte Steigerung der Genexpression für Runx-2 könnte ein denkbares Therapieziel darstellen, um den Verlust des Kollagen-Typs I zu verringern. Für Sox-9 ist bekannt, dass es die Fähigkeit besitzt Runx-2 in mesenchymalen Vorläuferzellen zu unterdrücken (Zhou et al. 2006). Da aber sowohl im arthrotischem Gelenkknorpel Sox-9 erniedrigt (Orfanidou et al. 2009) als auch die Ergebnisse dieser Arbeit auf diese Erniedrigung hindeuten, scheint dies kein geeigneter Therapieansatz zu sein.

RSPO2 und SFRP2 konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals in humanem Faserknorpel nachgewiesen werden und spielen eine bisher nicht verstandene Rolle bei der Pathogenese der Arthrose. Möglicherweise sind sie entscheidend für die Bildung eines Meniskus bei der Entwicklung des Menschen (Pazin et al. 2012). Daher waren eine Untersuchung ihrer Genexpression und der Vergleich zwischen den schwer geschädigten und den gering geschädigten Menisken von Interesse. Eine offene Frage der vorliegenden Arbeit ist, welche Auswirkung ein von RSPO2 positiv oder von SFRP2 negativ beeinflusster Wnt-Signalweg im Meniskus hat. Einen möglichen Hinweis nennt Guo 2004. Guo zeigte, dass ein aktiver Wnt-Signalweg die

Differenzierung von mesenchymalen Progenitorzellen zu Chondrozyten inhibiert (Guo et al. 2004). Dies weiterführend bewies Day 2005, dass der Wnt-Signalweg während der Skelletogenese für die Entscheidung, ob sich mesenchymale Progenitorzellen zu Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren, bestimmend ist (Day et al. 2005). Ein Charakteristikum der Fibrochondrozyten des Meniskus ist, dass sie trotz ihres chondrogenen Phänotyps Kollagen-Typ I produzieren. Dies wiederum wirft die Frage auf, welchen Weg der Differenzierung, chondrogen oder osteoblastär, die Fibrochondrozyten durchlaufen und welcher Weg dem Schutz oder der Therapie der Arthrose dienen könnte. Die Expression von RSPO2 war nur bei einem der sechs untersuchten Menisken leicht erhöht. RSPO2 steht für einen aktiven Wnt-Signalweg und die damit einhergehenden erhöhten Level an β -catenin wurden bei der Degeneration von Gelenkknorpel beobachtet (Corr 2008). Die Genexpression für SFRP2 ließ auf ein höheren Level bei gering geschädigten Menisken als bei schwer geschädigten schließen. Es bremst den Wnt-Signalweg und fungiert dadurch als Gegenspieler zu RSPO2. Bei fünf der sechs Menisken der untersuchten Gruppe überwog SFRP2 der Expression an RSPO2, wodurch gefolgert werden könnte, dass ein mögliches Gleichgewicht zugunsten der Inhibierung des Wnt-Signalweges liegt. Alfaro postulierte 2010 eine mögliche Runterregulierung von Runx-2 durch eine Blockierung des Wnt-Signalweges sowie des BMP-Signalweges über SFRP2 in mesenchymalen Stammzellen (Alfaro et al. 2010). Dies wäre auch eine denkbare Erklärung für die erniedrigte Runx-2-Genexpression in dem degenerativen Meniskusgewebe. Eine Aufrechterhaltung des hohen Gehalts an Kollagen-Typ I, wie er für funktionalen Faserknorpel essentiell ist, ist ohne ausreichend Runx-2 vielleicht nicht möglich. Ebenso könnte es sich bei der Inhibierung des Wnt-Signalweges um einen natürlichen Versuch zum Schutz vor Apoptose handeln, wie ihn Alfaro für MSC vermutet (Alfaro et al. 2010). Auch Zhang schreibt SFRP2 eine anti-apoptotische Funktion zu, welche er an Rattenmyokardzellen unter hypoxischem Stress nachwies. Zhang beschrieb einen in-vivo protektiven Effekt von SFRP2 durch Blockade von Wnt3a (Zhang et al. 2009). Im Vergleich zu den doch deutlichen Unterschieden, welche sich zwischen den Gruppen gesund und krank in den übrigen Ergebnissen der PCR-Analysen zeigten, wagt die Arbeitsgruppe keine abschließende Aussage bezüglich der unterschiedlichen Expression von RSPO2 und SFRP2 im Zusammenhang mit dem Fortschritt der Arthrose.

Besonders interessant in diesem Teil der Arbeit war Meniskus Nr. 515, denn hier konnte der laterale Meniskus der gesunden Seite und der mediale Meniskus der kranken Seite zugeordnet werden. Die Ergebnisse zeigen die gleichen Differenzen zwischen den Gruppen, wie sie auch für die anderen Präparate dokumentiert wurden. Somit kann festgehalten werden, dass innerhalb eines Knies Unterschiede hinsichtlich der Erkrankungsschwere bestehen können.

Abschließend bleibt anzumerken, dass bei den PCR-Analysen insgesamt nur sechs Patienten miteinander verglichen wurden. Diese Anzahl ist zu gering, um endgültige Aussagen über ein größeres Kollektiv treffen zu können. Viel eher müssen die Ergebnisse als Hinweise für weiterführende Untersuchungen gesehen werden.

4.3 Diskussion der Proteinanalysen

Erstmalig konnte nachgewiesen werden, dass humanes Meniskusgewebe im Endstadium der Arthrose Wnt-Modulatoren der R-Spondin-Gruppe sowie der Secreted frizzled-related-Gruppe aufweist. RSPO2 konnte zwischen einer Bandenhöhe von 50 kDa bis 65 kDa detektiert werden. Es sind drei Banden abgrenzbar, wofür es mehrere Gründe geben könnte. Da insgesamt vier Typen dieses Sekretproteins bekannt sind, welche zu ca. 60 % Sequenzhomologie aufweisen (Kim et al. 2008), könnte es zu einer ungewollten Markierung eben dieser gekommen sein. Auch eine *in vivo* vorkommende Methylierung, Acetylierung oder Glykosylierung und somit Veränderung des Molekulargewichts könnte zum Auftreten mehrerer Banden geführt haben. Auch die Proteinnachweise für SFRP2 lassen mehrere Banden voneinander abgrenzen. Hier stehen die gleichen Vermutungen im Raum, denn auch von SFRP's gibt es vier Typen (Rattner et al. 1997). Der entscheidende Haupttranskriptionsfaktor des Kollagen-Typs II, Sox-9, sowie der Haupttranskriptionsfaktor des Kollagen-Typs I, Runx-2, konnten ebenfalls auf Proteinbasis nachgewiesen werden. Quantitative Unterschiede zwischen gering geschädigten und schwer geschädigten Menisken ließen sich auf Proteinbasis nicht nachweisen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein histopathologischer Degenerationsscore zur Bewertung degenerativer Schädigungen an humanen Menisken entwickelt. Es wurden Erfahrungswerte in der Meniskusmorphologie und Pathologie gesammelt und die für die Degeneration des Meniskus entscheidenden Regionen herausgearbeitet. Der Score soll die Grundlage bilden für weitergehende Untersuchungen, um die Rolle des Meniskus an der Pathogenese der Arthrose besser verstehen zu können. Die Aussagekraft des Degenerationsscores wird durch die deutlichen Differenzen in der Genexpressionsanalyse zwischen kranken und eher gut erhaltenen Menisken gestützt. Bei schwer degenerativ geschädigten Menisken konnte nachweislich eine Genexpressionsminderung für Kollagen-Typ I, Kollagen-Typ II und Aggrecan gemessen werden, wohingegen die Menisken mit geringerem Schaden diese Gene stärker exprimierten. Durch den Verlust wichtiger Matrixkomponenten verliert der Meniskus seine biomechanische Schutzfunktion für das Kniegelenk und trägt weiter zur Progression der Arthrose bei. Der Wnt-Signalweg spielt eine bisher nicht verstandene Rolle bei der Pathogenese der Arthrose. Die Wnt-Modulatoren RSPO2 und SFRP2 konnten bei einer Studie als mögliche entscheidende Kandidaten zu Entstehung der Menisken ermittelt werden (Pazin et al. 2012). Die hier vorliegende Arbeit wies RSPO2 und SFRP2 erstmals in adultem humanem Meniskusgewebe nach, sowohl auf Proteinbasis mittels IHC und Western Blot als auch auf Genexpressionsebene. Aussagekräftige Unterschiede zwischen gering und stark geschädigten Menisken fanden sich jedoch nicht. Es liegt die Vermutung nahe, dass der Meniskus einen größeren Beitrag zur Progression der Arthrose im Kniegelenk leistet, als es bisher vermutet wurde. Dies steht im Einklang mit den aktuellen Therapiekonzepten, einen verletzten Meniskus möglichst lang zu erhalten und nicht primär operativ zu entfernen.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Signaling pathways dependent on regulated proteolysis of latent gene regulatory proteins; in: Molecular biology of the cell, Fifth Edition, hrsg. v. Garland Science, New York 2008, S. 946-954
- Alfaro MP, Vincent A, Saraswati S, Thorne CA, Hong CC, Lee E, Young PP (2010): sFRP2 suppression of bone morphogenic protein (BMP) and Wnt signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *J Biol Chem* 285, 35645-35653
- Arnoczky SP, Warren RF (1982): Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 10, 90-95
- Ashraf S, Wibberley H, Mapp PI, Hill R, Wilson D, Walsh DA (2011): Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 70, 523-529
- Aspden RM, Yarker YE, Hukins DW (1985): Collagen orientations in the meniscus of the knee joint. *J Anat* 140 (Pt 3), 371-380
- Bailey FR, Copenhaver WM, Kelly DE, Wood RL: The connective tissues: Cartilage and bone in: Bailey's textbook of histology, Band XVII, hrsg. v. Williams & Wilkins, Baltimore 1978, S. 170-178
- Baron R, Kneissel M (2013): WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19, 179-192
- Beaufils P, Verdonk R: Cellular Composition of Meniscal Tissue in: The Meniscus, Band I, hrsg. v. Springer Verlag, Heidelberg 2010, S. 20-22
- Benjamin M, Evans EJ (1990): Fibrocartilage. *J Anat* 171, 1-15
- Boya H, Pinar H, Gulay Z, Oktay G, Ozer E (2004): Clinical and arthroscopic features of meniscal tears and a search for the role of infection in histologically confirmed meniscal mucoid degeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 12, 294-299
- Brindle T, Nyland J, Johnson DL (2001): The meniscus: review of basic principles with application to surgery and rehabilitation. *J Athl Train* 36, 160-169
- 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
- Christoforakis J, Pradhan R, Sanchez-Ballester J, Hunt N, Strachan RK (2005): Is there an association between articular cartilage changes and degenerative meniscus tears? *Arthroscopy* 21, 1366-1369
- Corr M (2008): Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4, 550-556
- Dankof A, Krenn V (2006): C4d deposits mark sites of meniscal tissue disintegration. *Virchows Arch* 449, 230-233
- Day B, Mackenzie WG, Shim SS, Leung G (1985): The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1, 58-62
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005): Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8, 739-750
- Dell'Accio F, De Bari C, El Tawil NM, Barone F, Mitsiadis TA, O'Dowd J, Pitzalis C (2006): Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury. *Arthritis Res Ther* 8, R139

- Engelhardt M (2003): Epidemiologie der Arthrose in Westeuropa. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 6, 171-175
- Englund M (2008): The role of the meniscus in osteoarthritis genesis. *Rheum Dis Clin North Am* 34, 573-579
- Englund M, Guermazi A, Lohmander SL (2009): The role of the meniscus in knee osteoarthritis: a cause or consequence? *Radiol Clin North Am* 47, 703-712
- Englund M, Roemer FW, Hayashi D, Crema MD, Guermazi A (2012): Meniscus pathology, osteoarthritis and the treatment controversy. *Nat Rev Rheumatol* 8, 412-419
- Ferrer-Roca O, Vilalta C (1980): Lesions of the meniscus. Part I: Macroscopic and histologic findings. *Clin Orthop Relat Res* 146, 289-300
- Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD (2009): Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem* 284, 14117-14125
- Galli LM, Barnes T, Cheng T, Acosta L, Anglade A, Willert K, Nusse R, Burrus LW (2006): Differential inhibition of Wnt-3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. *Dev Dyn* 235, 681-690
- Ghosh P, Taylor TK (1987): The knee joint meniscus. A fibrocartilage of some distinction. *Clin Orthop Relat Res* 224, 52-63
- Goldring MB (2012): Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4, 269-285
- Goldring MB, Marcu KB (2009): Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11, 224
- Guo X, Day TF, Jiang X, Garrett-Beal L, Topol L, Yang Y (2004): Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 18, 2404-2417
- Habata T, Ohgushi H, Takakura Y, Tohno Y, Moriwake Y, Minami T, Fujisawa Y (2001): Relationship between meniscal degeneration and element contents. *Biol Trace Elem Res* 79, 247-256
- Hellio Le Graverand MP, Sciore P, Eggerer J, Rattner JP, Vignon E, Barclay L, Hart DA, Rattner JB (2001): Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. *Arthritis Rheum* 44, 1808-1818
- Hoberg M, Uzunmehmetoglu G, Sabic L, Reese S, Aicher WK, Rudert M (2006): Characterisation of human meniscus cells. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 144, 172-178
- Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, Ikegawa S, Chung UI (2005): Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 23, 337-340
- Ishihara G, Kojima T, Saito Y, Ishiguro N (2009): Roles of metalloproteinase-3 and aggrecanase 1 and 2 in aggrecan cleavage during human meniscus degeneration. *Orthop Rev (Pavia)* 1, e14
- Jorgensen U, Sonne-Holm S, Lauridsen F, Rosenklint A (1987): Long-term follow-up of meniscectomy in athletes. A prospective longitudinal study. *J Bone Joint Surg Br* 69, 80-83
- Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G (2006): Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 54, 2462-2470

- Kapandji IA: Menisci des Kniegelenks in: Funktionelle Anatomie der Gelenke. Schematisierte und kommentierte Zeichnungen zur menschlichen Biomechanik, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2009, S. 92
- Kawamoto K, Hirata H, Kikuno N, Tanaka Y, Nakagawa M, Dahiya R (2008): DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 123, 535-542
- Kennedy JC, Alexander IJ, Hayes KC (1982): Nerve supply of the human knee and its functional importance. *Am J Sports Med* 10, 329-335
- Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, Abo A, Tomizuka K, Funk WD (2006): R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* 5, 23-26
- Kim KA, Wagle M, Tran K, Zhan X, Dixon MA, Liu S, Gros D, Korver W, Yonkovich S, Tomasevic N (2008): R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell* 19, 2588-2596
- King D (1990): The healing of semilunar cartilages. *Clin Orthop Relat Res* 252, 4-7
- Komori T (2005): Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95, 445-453
- Krenn V, Knoss P, Ruther W, Jakobs M, Otto M, Krukemeyer MG, Heine A, Mollenhoff G, Kurz B (2010): Meniscal degeneration score and NITEGE expression : immunohistochemical detection of NITEGE in advanced meniscal degeneration. *Orthopade* 39, 475-485
- 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
- Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155-163
- Lark MW, Bayne EK, Flanagan J, Harper CF, Hoerrner LA, Hutchinson NI, Singer II, Donatelli SA, Weidner JR, Williams HR (1997): Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest* 100, 93-106
- Leijten JC, van Blitterwijk CA, Karperien M, Emons J, van Gool S, Wit JM, Sticht C, Decker E, Rappold G, Uitterlinden A (2012): GREM1, FRZB and DKK1 are key regulators of human articular cartilage homeostasis. *Arthritis Rheum* 64, 3302-3312
- Lodish HF, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: Tissue Patterning by Hedgehog and Wingless; in: *Molecular Cell Biology*, Fourth Edition, hrsg. v. W.H. Freeman and Company, New York 2000, S. 1013-1018
- Longo UG, Loppini M, Romeo G, Maffulli N, Denaro V (2012): Histological scoring systems for tissue-engineered, ex vivo and degenerative meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*
- Lories RJ, Peeters J, Bakker A, Tylzanowski P, Derese I, Schrooten J, Thomas JT, Luyten FP (2007): Articular cartilage and biomechanical properties of the long bones in Frzb-knockout mice. *Arthritis Rheum* 56, 4095-4103
- Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D (2010): Cartilage cell clusters. *Arthritis Rheum* 62, 2206-2218
- Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ (2009): Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone* 44, 522-527
- MacMullan PA, McCarthy GM (2010): The meniscus, calcification and osteoarthritis: a pathologic team. *Arthritis Res Ther* 12, 116

- Majumdar MK, Askew R, Schelling S, Stedman N, Blanchet T, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS (2007): Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56, 3670-3674
- Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA (2011): The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 32, 7411-7431
- Mallen CD, Peat G, Porcheret M (2007): Chronic knee pain. *BMJ* 335, 303
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A (1971): Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 53, 523-537
- 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
- McAlinden A, Dudhia J, Bolton MC, Lorenzo P, Heinegard D, Bayliss MT (2001): Age-related changes in the synthesis and mRNA expression of decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 33-41
- McDevitt CA, Muir H (1976): Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 58, 94-101
- Melrose J, Fuller ES, Roughley PJ, Smith MM, Kerr B, Hughes CE, Caterson B, Little CB (2008): Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. *Arthritis Res Ther* 10, R79
- Mesiha M, Zurakowski D, Soriano J, Nielson JH, Zarins B, Murray MM (2007): Pathologic characteristics of the torn human meniscus. *Am J Sports Med* 35, 103-112
- Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P (2010): The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 107, 152-162
- Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R (2004): Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 122, 229-236
- Nam JS, Park E, Turcotte TJ, Palencia S, Zhan X, Lee J, Yun K, Funk WD, Yoon JK (2007): Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Dev Biol* 311, 124-135
- O'Hurley G, Perry AS, O'Grady A, Loftus B, Smyth P, O'Leary JJ, Sheils O, Fitzpatrick JM, Hewitt SM, Lawler M (2011): The role of secreted frizzled-related protein 2 expression in prostate cancer. *Histopathology* 59, 1240-1248
- Ochiai S, Mizuno T, Deie M, Igarashi K, Hamada Y, Ochi M (2008): Oxidative stress reaction in the meniscus of Bach 1 deficient mice: potential prevention of meniscal degeneration. *J Orthop Res* 26, 894-898
- Orfanidou T, Iliopoulos D, Malizos KN, Tsezou A (2009): Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 regulation in osteoarthritic chondrocytes. *J Cell Mol Med* 13, 3186-3194
- Papadopoulos A, Kirkos JM, Kapetanios GA (2009): Histomorphologic study of discoid meniscus. *Arthroscopy* 25, 262-268

- Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK, D'Lima DD (2011): Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1132-1141
- Pauwels F (1960): A new theory on the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue. The tenth contribution to the functional anatomy and causal morphology of the supporting structure. *Z Anat Entwicklungsgesch* 121, 478-515
- Pazin DE, Gamer LW, Cox KA, Rosen V (2012): Molecular profiling of synovial joints: Use of microarray analysis to identify factors that direct the development of the knee and elbow. *Dev Dyn* 241, 1816-1826
- Petersen W, Tillmann B (1995): Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand* 66, 308-312
- Petersen W, Tillmann B (1999): Structure and vascularization of the knee joint menisci. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 137, 31-37
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45
- Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J (1997): A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2859-2863
- Rodeo SA, Seneviratne A, Suzuki K, Felker K, Wickiewicz TL, Warren RF (2000): Histological analysis of human meniscal allografts. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 82-A, 1071-1082
- Rohen JW, Yokochi C, Lütjen-Drecoll E: Bandapparat des Kniegelenks in: *Anatomie des Menschen: Fotografischer Atlas der systematischen und topografischen Anatomie*, 5. Auflage, hrsg. v. Schattauer, Stuttgart, New York 2006, S. 447
- Rozen S, Skaletsky H (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132, 365-386
- Sanchez-Adams J, Athanasiou KA (2009): The knee Meniscus: A Complex Tissue of Diverse Cells. *Cellular and Molecular Bioengineering* 2, 332-340
- Sanchez-Adams J, Athanasiou KA (2012): Biomechanics of meniscus cells: regional variation and comparison to articular chondrocytes and ligament cells. *Biomech Model Mechanobiol* 11, 1047-1056
- Schneider S, Schmitt G, Mau H (2005): Prävalenz und Korrelate der Osteoarthrose in der BRD. *Der Orthopäde* 34, 782-790
- Sintzoff SA, Jr., Stallenberg B, Gillard I, Gevenois PA, Matos C, Struyven J (1992): Transverse geniculate ligament of the knee: appearance and frequency on plain radiographs. *Br J Radiol* 65, 766-768
- Sun Y, Mauerhan DR (2012): Meniscal calcification, pathogenesis and implications. *Curr Opin Rheumatol* 24, 152-157
- Sun Y, Mauerhan DR, Kneisl JS, James Norton H, Zinchenko N, Ingram J, Hanley EN, Jr., Gruber HE (2012): Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *Open Rheumatol J* 6, 24-32
- Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD (2007): Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 56, 137-146
- 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, 548-560

- Webber RJ, Harris MG, Hough AJ, Jr. (1985): Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes: proliferative and synthetic response to growth factors and ascorbate. *J Orthop Res* 3, 36-42
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R (2003): Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452
- Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M (2008): Wnt/beta-catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest* 88, 264-274
- Zhang Y, Jordan JM (2010): Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 26, 355-369
- Zhang Z, Deb A, Pachori A, He W, Guo J, Pratt R, Dzau VJ (2009): Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *J Mol Cell Cardiol* 46, 370-377
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006): Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19004-19009

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kniegelenk in Beugstellung	4
Abbildung 2: Zonale Einteilung des Meniskus anhand der Blutversorgung	5
Abbildung 3: Querschnitt durch das mediale Kompartiment eines Knies	6
Abbildung 4: Blutversorgung.....	6
Abbildung 5: Faserverlauf innerhalb des Meniskus	8
Abbildung 6: Zelltypen des Meniskus	11
Abbildung 7: Wnt-Signalweg.....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Meniskus im Querschnitt	48
Abbildung 9: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot	51
Abbildung 10: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit HE	51
Abbildung 11: Meniskusquerschnitt, IHC für Kollagen-Typ I.....	51
Abbildung 12: Meniskusoberfläche ohne Zeichen einer degenerativen Schädigung	52
Abbildung 13: Längliche Zelle der Meniskusoberfläche.....	52
Abbildung 14: Runder Fibrochondrozyt	52
Abbildung 15: Alzianblau-Kernechtrotfärbung der FCJ.....	52
Abbildung 16: Innenzone eines Meniskus, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot	53
Abbildung 17 Außenzone eines Meniskus, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot....	53
Abbildung 18: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit Alzianblau-Kernechtrot	53
Abbildung 19: Meniskusquerschnitt, angefärbt mit HE	53
Abbildung 20: Meniskusquerschnitt, IHC für Kollagen-Typ I.....	53
Abbildung 21: Meniskusoberfläche mit Zeichen degenerativer Schädigungen.....	54
Abbildung 22: Reaktiver Fibrochondrozyt.....	54
Abbildung 23: Fettige Degeneration eines Meniskus.....	54
Abbildung 24: Oberflächlicher Riss eines degenerativ geschädigten Meniskus.	54
Abbildung 25: Residuum einer Verkalkung.....	54
Abbildung 26: Zellcluster	54
Abbildung 27: Score zur Bewertung eines Meniskus.....	56
Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von RSPO2.....	57
Abbildung 29: Immunhistochemischer Nachweis von SFRP2	58
Abbildung 30: Realtime-PCR 1 zur Analyse der Housekeeping-Gene	59
Abbildung 31: Realtime-PCR 2 zur Analyse der Housekeeping-Gene	59
	86

Abbildung 32: Realtime-PCR zum Vergleich der Genexpression an Kollagen-Typ I	61
Abbildung 33: Realtime-PCR zum Vergleich der Genexpression an Kollagen-Typ II	62
Abbildung 34: Realtime-PCR zum Vergleich der Genexpression an Aggrekan.....	63
Abbildung 35: Realtime-PCR zum Vergleich von Sox-9 und Runx-2.....	64
Abbildung 36: Realtime-PCR zum Vergleich von RSPO2 und SFRP2.....	65
Abbildung 37: Western Blot für RSPO2.....	66
Abbildung 38: Western Blot für SFRP2	67
Abbildung 39: Western Blot für Sox-9.....	67
Abbildung 40: Western Blot für Runx-2	68

8 Anhang

8.1 Patientenkollektiv

Patient Nr.	Geschlecht	Alter (Jahren)	Größe (cm)	Gewicht (Kg)	BMI (Kg/m ²)	Degene- rationsscore
471	m	64	175	74	24,44	kein Score ermittelt
473	w	81	163	72	27,1	11
477	w	62	167	106	38,01	kein Score ermittelt
478	w	80	156	68	27,94	7
480	w	71	151	69	30,26	kein Score ermittelt
481	w	61	156	72	29,59	8
482	w	76	165	70	25,71	kein Score ermittelt
485	w	83	172	71	24	kein Score ermittelt
486	w	74	155	78	32,47	kein Score ermittelt
488	w	72	172	80	27,04	kein Score ermittelt
492	m	70	174	99	32,7	kein Score ermittelt
504	w	73	165	74	27,2	6
505	w	75	168	90	31,89	10
506	w	76	160	68	26,56	9
509	m	73	186	93	26,88	5
510	w	79	160	70	27,34	10
511	w	75	148	62	28,31	10

512	m	59	182	115	34,72	kein Score ermittelt
513	w	80	152	65	28,13	4
514 med.	w	76	160	84	32,81	4
514 lat.						4
515 med.	m	79	170	73	25,26	5
515 lat.						9
516	m	51	192	120	32,55	kein Score ermittelt
518	w	76	163	78	29,36	kein Score ermittelt
521	m	45	190	115	31,86	kein Score ermittelt
522	w	54	175	78	25,47	8
523	m	51	192	120	32,55	9
524 med.	m	83	165	78	28,65	11
524 lat.						6
527 med.	w	79	160	70	27,34	10
527 lat.						8
530	w	78	152	75	32,46	kein Score ermittelt
532	m	70	168	100	35,43	10

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. N. Miosge für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie für sein ständiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Vielen Dank, dass Sie das wissenschaftliche Interesse in mir geweckt haben. Es hat mir immer Freude bereitet in Ihrem Labor an meiner Dissertation zu arbeiten.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der AG „Orale Biologie und Geweberegeneration“ für die stets tolle Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Dr. med. dent. Boris Schminke und M. Sc. Hayat Muhammad möchte ich besonders für ihre Zeit zum wissenschaftlichen Diskutieren, zu fachlichen Erläuterungen und für ihre Freundschaft danken.

Weiterhin gilt mein Dank Christa Bode und Boguslaw Sadowski, ohne deren grenzenlose Hilfsbereitschaft, praktische Ratschläge und Kompetenz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Kathrin Jakob danke ich für ihre stetige Unterstützung und besonders für ihre Fähigkeit, mich zu motivieren und den Fortgang dieser Arbeit voranzutreiben.

Lebenslauf

Am 12.08.1986 wurde ich, Moritz Roth, als zweites Kind des Arztes Dr. med. Rainer Karl Roth und der Krankenschwester Gisela Maria Roth in Mainz geboren. Mein älterer Bruder Felix kam am 02.07.1984 zur Welt. Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Grund- und Hauptschule Mainz-Finthen. Im Anschluss war ich Schüler am Gymnasium Mainz-Gonsenheim, an welchem ich 2006 die Allgemeine Hochschulreife erlangte. Im Rahmen des Zivildienstes von 2006 bis 2007 legte ich die Prüfung zum Rettungssanitäter ab und arbeitete bis zum Ende des Zivildienstes für das Deutsche Rote Kreuz in Mainz. Seit 2003 bin ich ehrenamtlicher Mitarbeiter für die Sportjugend Rheinland-Pfalz und habe mehrere Jugendfreizeiten innerhalb und außerhalb Deutschlands betreut. Die Wartezeit auf meinen Studienplatz überbrückte ich mit einer Reise nach Australien von Februar bis Mai 2007. Seit dem Wintersemester 2007 studiere ich an der Georg-August Universität Göttingen Medizin und im September 2009 absolvierte ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Im Sommersemester 2011 begann ich in der Arbeitsgemeinschaft „Orale Biologie und Geweberegeneration“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Miosge mit den Experimenten zu meiner Dissertation, wofür ich ein Freisemester investierte. Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe nahm ich im August 2011 an einer einwöchigen Summer School mit dem Thema: „The Functions of Stem Cells in Development and Regeneration of Oral and Maxillofacial Tissues“ in der chinesischen Stadt Xi'an teil. Im Oktober 2011 stellte ich auf dem SFB492 Final Symposium „Extracellular Matrix and Cellular Interactions in Tissue Development, Function and Pathology“ in Münster ein Poster zu aktuellen Ergebnissen unserer Forschungsgruppe vor. Neben dem Studium habe ich im Wintersemester 2011/2012 an der Physiotherapieschule Hessisch-Lichtenau das Fach Allgemeine Krankheitslehre unterrichtet. Den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung werde ich voraussichtlich im Frühjahr 2014 ablegen.