

Aus der Poliklinik für Prothetik

(Prof. Dr. R. Bürgers)

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

Die Rolle des TGF- β -Signalwegs in humanen
Meniskusprogenitorzellen und im Meniskusgewebe

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Humanmedizin

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Julius Philipp Albert

aus

Marburg

Göttingen 2013

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

I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. N. Miosge

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Dieter Kube

III. Berichterstatter/in: PD Dr. Kaomei Guan-Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:	VI
1. Einleitung	1
1.1. Osteoarthritis	1
1.1.1. Epidemiologie und Grundlagen zur Entstehung von Osteoarthritis	1
1.1.2. Therapeutische Ansätze in der Osteoarthritisbehandlung	2
1.1.3. Zusammenhang zwischen Osteoarthritis und Meniskusschaden	3
1.2. Meniskus	4
1.2.1. Morphologie, Aufbau und Funktion des Meniskus	4
1.2.2. Blutversorgung und nervale Innervation	7
1.2.3. Histologischer Aufbau	10
1.3. Der Transforming Growth Factor β - Signalweg	13
1.3.1. Grundlagen und Bestandteile	13
1.3.2. TGF- β -Signalweg und Osteoarthritis	17
1.4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	22
2.1. Aufarbeitung und Isolierung von Meniskusgewebe und Meniskusprogenitorzellen (MPC)	22
2.2. Kultivieren von MPCs	23
2.3. Passagieren von MPCs	23
2.4. Lichtmikroskopie und Immunhistochemie	24
2.4.1. Fixierung, Entkalkifizierung, Dehydrierung, Einbettung und Anfertigung histologischer Schnitte von Meniskusgewebe	24
2.4.2. H.E.-Färbung von histologischen Meniskusschnitten	27
2.4.3. Immunhistochemische Darstellung von Meniskusgewebe	28
2.5. Western-Blot	31
2.5.1. Allgemein	31
2.5.2. Proteinprobenvorbereitung	32
2.5.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)	33
2.5.4. Immunoblot (Western-Blot)	35
2.5.5. Proteindetektion	35
2.5.6. Immunmarkierung	36
2.5.7. Verwendete Antikörper	37

2.6.	RNA-Isolation aus primären Zellen	39
2.7.	Synthese von cDNA	40
2.8.	Quantitative real-time- Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	40
2.8.1.	Allgemeines zur Methode	40
2.8.2.	RT-PCR-Protokoll	41
2.8.3.	Statistik/ Pfaffl	43
2.8.4.	Primerdesign	43
2.8.5.	Gradienten-PCR	44
2.8.6.	Verwendete Primer	46
2.9.	Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz/ Immunzytochemie	46
2.9.1.	Allgemeines zur Methode	46
2.9.2.	Protokoll der lichtmikroskopischen Immunfluoreszenz	47
2.10.	Überexpression von Smad1, Smad2 und Smad4	49
2.10.1.	Allgemeines zur Methode	49
2.10.2.	Klonierung der Expressionsvektoren	49
2.10.3.	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli DH5 α	50
2.10.4.	Transfektion von MPCs mit den Expressionsvektoren	51
3.	Ergebnisse	53
3.1.	Nachweis auf Gewebeebene: Immunhistochemie	53
3.1.1.	Beispiel für einen histologischen Schnitt eines gering erkrankten Meniskus	53
3.1.2.	Beispiel für einen histologischen Schnitt eines hoch erkrankten Meniskus	54
3.1.3.	Nachweis und Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle auf Gewebeebene	55
3.1.4.	Nachweis und Lokalisation der Smad2- und Smad3- Moleküle auf Gewebeebene	56
3.1.5.	Nachweis und Lokalisation der Smad4- Moleküle auf Gewebeebene	58
3.1.6.	Nachweis und Lokalisation von TGF- β 3 auf Gewebeebene	59
3.2.	Nachweis auf zellulärer Ebene: Immunzytochemie	60
3.2.1.	Zelluläre Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle	60
3.2.2.	Zelluläre Lokalisation der Smad2- und Smad3- Signalmoleküle	61
3.2.3.	Zelluläre Lokalisation der Smad4- Signalmoleküle	62
3.3.	Nachweis auf Genebene: real time-PCR	63
3.3.1.	Vergleichende Genexpressionsanalysen von hochgradig und gering erkrankten MPCs	63

3.4.	Nachweis auf Proteinebene: Western-Blot	64
3.4.1.	Nachweis der Smad1- Proteine in MPCs	64
3.4.2.	Proteinnachweis der Smad2- und Smad3- Moleküle in MPCs aus hochgradig und geringfügig erkranktem Meniskusgewebe	65
3.4.3.	Nachweis der Smad4- Moleküle in MPCs aus hochgradig und geringfügig erkranktem Meniskusgewebe	66
3.5.	Überexpression verschiedener Smad- Signalmoleküle	67
3.5.1.	Nachweis überexprimierter Smad1- Moleküle	67
3.5.2.	Nachweis überexprimierter Smad2- Signalmoleküle	68
3.5.3.	Nachweis überexprimierter Smad4- Signalmoleküle	69
3.5.4.	Auswirkungen der Überexpression auf die Kollagen I-Synthese	70
3.5.5.	Auswirkungen der Überexpression auf die Kollagen II-Synthese	71
4.	Diskussion	72
4.1.	Diskussion der Progenitorzellen innerhalb des Meniskusgewebes	72
4.2.	Diskussion der Ergebnisse auf Genebene	74
4.3.	Diskussion der Ergebnisse auf zellulärer Ebene	76
4.4.	Diskussion der Ergebnisse auf Gewebeebene	76
4.5.	Diskussion der Ergebnisse auf Proteinebene	77
4.6.	Diskussion des Überexpressionsexperiments	78
4.7.	Therapeutische Ausblicke und klinische Relevanz dieser Arbeit	80
5.	Zusammenfassung	82
6.	Anhang	83
6.1.	Tabellenverzeichnis	83
6.2.	Abbildungsverzeichnis	84
7.	Literaturverzeichnis	86

Abkürzungsverzeichnis:

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ADAMTS	Disintegrin und Metalloproteinase mit Thrombospondin- Motiv
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Ann	<i>Annealing</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
β 2M	β 2 Mikroglobulin
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Zytomegalievirus
cm ²	Quadratzentimeter
Co- Smad	<i>co expressor Smad</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	<i>chondrogenic progenitor cell</i>
ct	<i>cycle threshold</i>
°C	Grad Celsius

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Deutschland
DG	Deckglas
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's <i>modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Flouresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	<i>green flourescent protein</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H.E.	Hämatoxylin- Eosin
Hect	<i>homologous to the E carboxy terminus</i>
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
H ₂ O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
IL1	Interleukin1
I- Smad	inhibitory Smad
IT	Italien
JPN	Japan
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
KH_2HPO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lig.	Ligamentum
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MH1	MAD <i>homology1</i>
MH2	MAD <i>homology2</i>
ml	Milliliter
min	Minute
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger-</i> Ribonukleinsäure
N.	Nervus (Nerv)
NaCl_2	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
o.g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase- Kettenreaktion)
pmol	Piccomol
PVDF	Polyvinylidenflourid
R- Smad	Regulator- Smad
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RSPO2	<i>roof plate- specific spondin 2</i>

runx2	<i>runt- related transcription factor 2</i>
S.	Seite
sc	Santa Cruz
SFRP2	<i>secreted frizzled- related protein 2</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek.	sekundär
Smad	Kunstabgrieff, zusammengesetzt aus den beiden Begriffen „SMA“ (<i>small body protein</i>) und „MAD“ (<i>mother against decapentaplegic</i>)
Smurf	<i>Smad ubiquitination regulatory factor</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNF- Alpha	Tumornekrosefaktor- Alpha
TRIS	TRIS- (Hydroxymethyl)- Aminomethan
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1. Osteoarthritis

1.1.1. Epidemiologie und Grundlagen zur Entstehung von Osteoarthritis

Als Osteoarthritis bezeichnet man eine degenerative Gelenkerkrankung, welche die häufigste und am weitesten verbreitete Form der Arthritis darstellt. Mehr als 200 Millionen Menschen weltweit sind von dieser Erkrankung betroffen, und die Zahl wird voraussichtlich, bedingt durch eine höhere Lebenserwartung, noch steigen. Schon jetzt sind in den USA 10% aller Männer und 13 % aller Frauen im Alter über 60 Jahren von dieser Erkrankung betroffen und die Behandlungskosten der Gesundheitssysteme der westlichen Länder belaufen sich jährlich auf über sieben Milliarden Euro (Zhang und Jordan 2010).

Die Mehrzahl der über 65 Jahre alten Menschen weisen radiologische oder klinische Anzeichen einer Osteoarthritis auf. Die am häufigsten betroffenen Regionen sind die Knie, die Hände, die Hüftgelenke und die Wirbelsäule. Die Symptome der Osteoarthritis gehen meist einher mit Funktionseinschränkungen, Entzündungszeichen, Schmerzen, Steifigkeit und verminderter Mobilität der betroffenen Gelenke (Felson 2006). Der Verlauf der Beschwerden kann sehr variabel sein. Häufig klagen die Patienten über Anlauf- und belastungsabhängige Schmerzen. Allerdings kann die Erkrankung auch eine ganze Zeit symptomlos verlaufen, obwohl radiologisch eine Osteoarthritis diagnostiziert wurde. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen und den radiologischen Befunden besteht nicht (MacMullan und McCarthy 2010). Als weitere typische Symptome gelten die im Laufe der Erkrankung zunehmenden Deformitäten und Krepitationen, welche durch die fehlende Kongruenz der Gelenkflächen, aufgrund des Knorpelverschleißes, verursacht werden. Neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung spielen die bildgebenden Verfahren (Röntgen, Computerresonanztomographie, Magnetresonanztomographie) eine wesentliche Rolle in der Diagnostik der Osteoarthritis. Dabei können die Gelenkspaltverkleinerung und die subchondralen osteophytären Anbauprozesse,

welche als radiologische Zeichen einer Osteoarthrose gelten, besonders gut dargestellt werden (Wieland et al. 2005).

Osteoarthrose ist gekennzeichnet durch Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels, durch eine lokale intraartikuläre Entzündung mit Synovitis und durch subchondrale osteophytäre Veränderungen. Der Gelenkknorpel bedeckt die am Gelenk beteiligten Anteile des Knochens und gewährleistet eine leichte und schmerzfreie Bewegung der Gelenkflächen. Durch eine Degeneration dieses hyalinen Gelenkknorpels kommt es zu einem direkten Kontakt der beiden am Gelenk beteiligten Knochenenden. Für die Pathogenese der Osteoarthrose sind mehrere verschiedene Faktoren bekannt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die mechanische Beanspruchung bzw. Belastung, die Effekte des Alterns auf die Struktur und Matrixzusammensetzung des Gelenkknorpels sowie genetische Faktoren. In den frühen Stadien der Osteoarthrose weisen die Chondrozyten (Knorpelzellen) im hyalinen Knorpel eine vermehrte Zellproliferation und eine verstärkte Synthese von Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren, Proteinasen und Zytokinen auf, weshalb der Chondrozyt als der zellulärer Mediator in der Pathogenese der Osteoarthrose angesehen wird. Bei der Entstehung der Osteoarthrose spielen jedoch ebenfalls andere Zellen und Gewebe innerhalb des Gelenks eine wichtige Rolle. Die Osteoarthrose ist folglich keine Erkrankung, die ausschließlich auf den Gelenkknorpel beschränkt ist, sondern eine Erkrankung des gesamten Gelenks. Auch die Progression der Osteoarthrose wird multifaktoriell beeinflusst, z.B. durch Gelenkfehlstellungen, Adipositas, Ablagerungen von intraartikulären Kristallen, zunehmendes Alter, Muskelschwäche oder periphere Neuropathien (Goldring und Goldring 2007).

1.1.2. Therapeutische Ansätze in der Osteoarthrosebehandlung

Die aktuellen Therapieansätze bei der Behandlung der Osteoarthrose zielen hauptsächlich auf eine Schmerzlinderung und auf eine möglichst lange Aufrechterhaltung der Gelenkmobilität ab. Ein Behandlungsplan für einen an Osteoarthrose erkrankten Patienten beinhaltet meist eine Kombination aus Gewichtsreduktion, Physiotherapie und Schmerzmedikation. (Buckwalter et al. 2004, Dougados 2001). Die Gewichtsreduktion ist wichtig, um die physikalische Belastung der betroffenen Gelenke zu minimieren und somit

möglicherweise die Progression der Gelenksdegeneration zu verlangsamen. Die physiotherapeutischen Maßnahmen und die Schmerzmedikation sind ein Versuch, die Mobilität der betroffenen Gelenke möglichst lange zu gewährleisten und somit die Alltagsbewältigung der Patienten für längere Zeit aufrechtzuerhalten. Da keine der oben genannten Therapieformen die durch die Osteoarthrose degenerierten Gelenkstrukturen regenerieren bzw. die Progression der Erkrankung der Osteoarthrose aufhalten kann, ist der endoprothetische Gelenkersatz meist erforderlich, um eine anhaltende Gelenksfunktion und Schmerzfreiheit zu ermöglichen (Schroepfel et al. 2011).

1.1.3. Zusammenhang zwischen Osteoarthrose und Meniskusschaden

Das Kniegelenk ist einer der häufigsten Manifestationsorte der Osteoarthrose. Die Kniegelenkosteoarthrose gehört zu den fünf häufigsten Behinderungsursachen im höheren Alter (Starke et al. 2009). In dieser Population ist das Risiko, an einer Kniegelenkosteoarthrose zu erkranken, genauso hoch wie das Risiko, eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden. Insgesamt, unabhängig von dem Alter, sind 97% aller Knie-Totalendoprothese (TEP)-Operationen in den USA auf eine Kniegelenkosteoarthrose zurückzuführen. Dies entspricht über 50% aller endoprothetischen Gelenkersätze (Andersson et al. 2008)

Die Kniegelenkosteoarthrose ist nicht auf den hyalinen Gelenkknorpel beschränkt, sondern eine Erkrankung des gesamten Gelenks. In der Pathogenese und in der Progression der Kniegelenksarthrose sind alle wichtigen Komponenten des Kniegelenks beteiligt wie z.B. der Gelenkknorpel, die Synovialis und der Meniskus. (MacMullen und McCarthy 2010).

Der Meniskus ist eine fibrocartilaginöse Struktur, welche sich keilförmig zwischen den beiden angrenzenden Gelenkflächen im Kniegelenk befindet. Er spielt eine zentrale protektive Rolle, da er während der Belastung des Kniegelenks die einwirkenden Kräfte aufnimmt, gleichmäßig über das Kniegelenk verteilt und diesem Stabilität verleiht (Starke et al. 2009). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass der Meniskus im Kniegelenk während des osteoarthrotischen Erkrankungsprozesses mehr als nur eine passive Rolle spielt. In Studien, bei denen Personen mit radiologischen Anzeichen einer Osteoarthrose und

Knieschmerzen bzw. Bewegungseinschränkungen im Kniegelenk auf Meniskusdefekte untersucht wurden, wurde festgestellt, dass 63% dieser Personen Einrisse in einem Meniskus aufwiesen, jedoch nur 23% in der Vergleichsgruppe, welche keine radiologische Anzeichen einer Osteoarthritis besaßen (Englund et al. 2008). Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Meniskusdefekten und Osteoarthritis im Kniegelenk besteht und diese zu einer Gelenkspaltverschmälerung führen (Hunter et al. 2006). Zudem wurde in der Vergangenheit beobachtet, dass eine Meniscektomie, wie sie früher bei Meniskusschäden durchgeführt wurde, in späteren Jahren eine Kniegelenksosteoarthritis zur Folge hat (Jorgensen et al. 1987). Diese Ergebnisse und Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der Meniskus eine entscheidende und wichtige Rolle bei der Entstehung bzw. bei dem Fortschreiten der Osteoarthritis im Kniegelenk spielt, und sie haben dazu geführt, dass die Meniscektomie heutzutage nur noch in Ausnahmefällen eine Therapieoption in der Behandlung von Meniskusschäden darstellt.

1.2. Meniskus

1.2.1. Morphologie, Aufbau und Funktion des Meniskus

Die Menisken sind zwei sichelförmige, fibrocartilaginöse Strukturen, welche sich innerhalb eines jeden Knies zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau befinden. Im Querschnitt besitzen die Menisken eine Keilform, an deren peripherer konvexer Seite sie an der Gelenkkapsel anhaften. Diese Stelle des Anhaftens an der Gelenkkapsel wird oft auch als Ligamentum coronarium bezeichnet. Die beiden Menisken sind an ihrer kranialen Seite konkav geformt und an ihrer kaudalen Seite flach. Jeder Meniskus wird in Meniskuskörper und Meniskushörner unterteilt, wobei es jeweils ein Vorder- und ein Hinterhorn gibt. Die Menisken sind an ihrem Vorderhorn über kurze Bänder im Knochen der Area intercondylaris anterior und an ihrem Hinterhorn in der Area intercondylaris posterior der Tibia verankert. Diese Verankerungen sind wichtig für die gleichmäßige Verteilung der einwirkenden Kräfte über das Kniegelenk. Ohne diese würden die Menisken der axialen Belastung ausweichen, was eine unphysiologische Belastung zur Folge hätte. Der Außenmeniskus besitzt in der Aufsicht die Form eines nahezu geschlossenen Rings,

der Innenmeniskus dagegen ist eher sichelförmig. Dieser ist insgesamt weniger beweglich als der Außenmeniskus, da seine Verankerungen im Knochen weiter voneinander entfernt liegen und er zusätzlich mit dem medialen Kollateralband verwachsen ist. Dadurch kann der mediale Meniskus bei forcierter Belastung und Außenrotation schlecht nachgeben und ist somit im Vergleich zum Außenmeniskus anfälliger für Defekte. Der Außenmeniskus ist nicht mit dem lateralen Kollateralband verwachsen und ist daher beweglicher. Das Vorderhorn des lateralen und das Vorderhorn des medialen Meniskus sind über das Ligamentum (Lig.) transversum genus miteinander verbunden. Das Hinterhorn des lateralen Meniskus ist über die meniskofemorale Ligamente mit der lateralen Fläche des medialen Femurkondylus verbunden. Das anteriore meniskofemorale Ligament verläuft ventral des hinteren Kreuzbands und wird als Humphrey-Ligament bezeichnet. Das posteriore meniskofemorale Ligament wird als Wrisberg-Ligament bezeichnet und verläuft dorsal des hinteren Kreuzbands (Kohn und Moreno 1995).

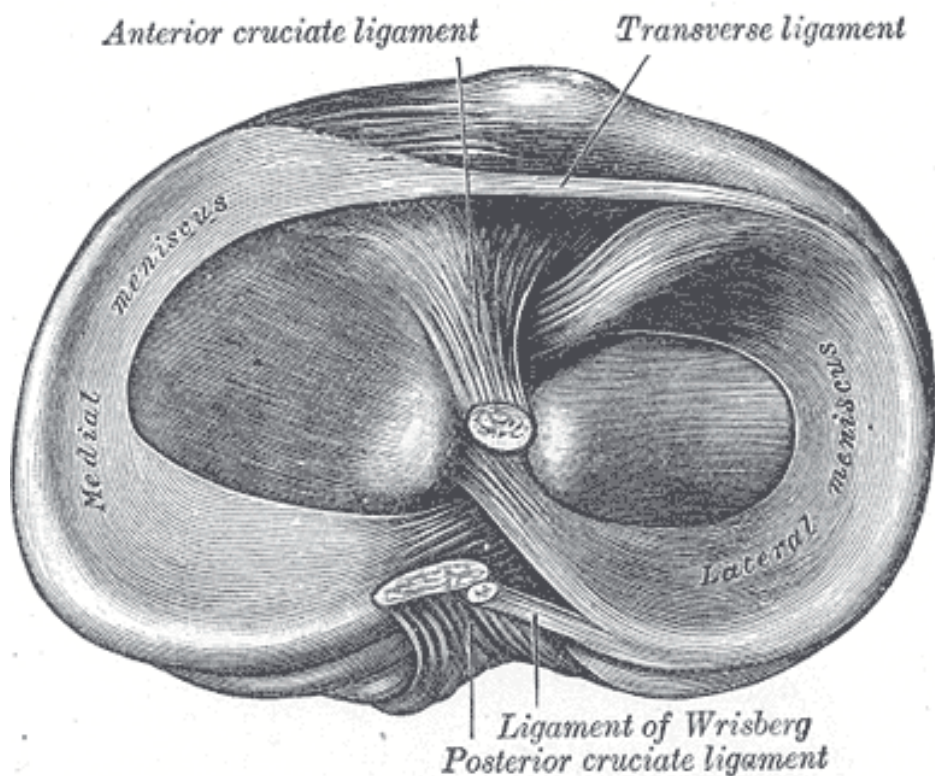


Abbildung 1: Kraniale Darstellung des Kniegelenks. Gekennzeichnet sind medialer und lateraler Meniskus, vorderes und hinteres Kreuzband sowie das Lig. transversum genus und das Wrisberg-Ligament. Modifiziert nach Gray's Anatomy

Die zentralen bzw. inneren zwei Drittel des Meniskus bestehen aus Faserknorpel, das äußere Drittel aus straffem Bindegewebe. Die Kollagenfaserbündel des Meniskus sind sowohl im Faserknorpel als auch im straffen Bindegewebe zirkulär angeordnet. Diese Anordnung ist kohärent zu den hohen Zugspannungen, welche innerhalb der Menisken bei Belastung auftreten (Pauwels 1960). Allerdings ist der Faserverlauf der Kollagenfibrillen nicht überall zirkulär, sondern variiert abhängig von der Region und deren Funktion (Bullough et al. 1970). Die Oberfläche des Meniskus wird durch netzartig angeordnete Kollagenfibrillen gebildet, welche keine einheitliche Ausrichtung aufweisen. In der darunter liegenden Schicht befindet sich der Hauptteil der Kollagenfasern. Sie sind zu Kollagenbündeln formiert, welche zirkulär angeordnet sind und eine innere und eine äußere Zirkumferenz bilden (Petersen und Tillmann 1999). Durch diese zirkuläre Anordnung der Kollagenfasern können besonders die axial einwirkenden Kompressionskräfte gepuffert werden.

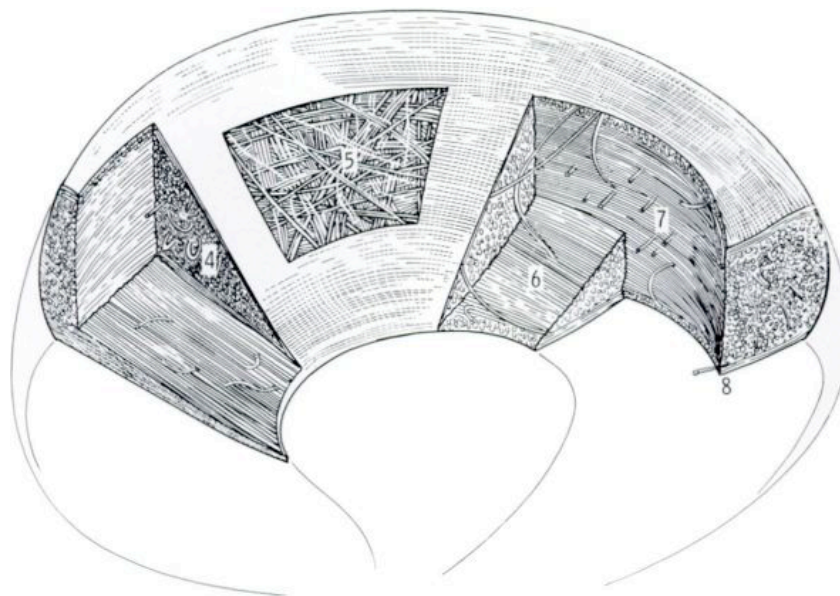


Abbildung 2: Rekonstruktion der Faseranordnung innerhalb des Meniskus (Bullough et al.1970, S. 565). 4: Zirkulärer Kollagenfaserbündelverlauf, 5: oberflächliche netzartig angeordnete Kollagenfibrillen, 6: zirkulär verlaufende Kollagenfasern, 7: zirkulär verlaufende Kollagenfaserbündel, 8: einzelne radiär verlaufende Kollagenfasern.

Der Meniskus gleicht mit seiner Form die Inkongruenz zwischen den walzenförmigen Femurkondylen und dem nahezu planen Tibiaplateau aus und vergrößert signifikant die Kontaktfläche des femotibialen Gelenks. Dadurch wird der axiale Stress, welcher auf den tibialen Knorpel einwirkt, erheblich reduziert (Kettelkamp und Jacobs 1972, Walker und Erkman 1975). Diese Fähigkeit, die einwirkenden Kompressionskräfte über das Kniegelenk zu verteilen, wird durch die starke Verankerung der Menisken im tibialen Knochen gewährleistet. Die einwirkenden axialen Kräfte führen zu einem Zug an den Verankerungsstellen und an den zirkumferent angeordneten Kollagenfasern der Menisken. Somit wird ein Teil der Kompressionskräfte in Zugkraft umgewandelt, welche hauptsächlich von der Peripherie der Menisken aufgenommen und abgepuffert wird. Ein Abriss bzw. Ausriss der Verankerungsstellen würde zu einem kompletten Versagen dieser Puffer- und Kräfteverteilungsfunktion führen, was wiederum den axialen Stress auf den tibialen Gelenkknorpel erhöhen würde, ähnlich wie eine komplette Meniskektomie (Paletta et al. 1997).

Die Adaption der Femurkondylen und des Tibiaplateaus, bedingt durch die dazwischenliegenden Menisken, wird auch bei Knieflexion und -rotation durch Bewegung der Menisken gewährleistet. Während der Knieflexion und der Knieextension bewegt sich der laterale Meniskus um 10 mm auf dem Tibiaplateau, während sich der mediale Meniskus nur um circa 5 mm bewegt. Während der Kniebewegung verändert sich auch die Form der Menisken, da das Vorderhorn sich freier bewegen kann als das Hinterhorn (Thompson et al. 1991).

1.2.2. Blutversorgung und nervale Innervation

Schon in der 22ten Gestationswoche wurden erste Blutgefäße innerhalb des Meniskus beobachtet. Zum Zeitpunkt der Geburt ist nahezu der gesamte Meniskus von Gefäßen durchzogen. Schon während des zweiten Lebensjahres entwickelt sich in der inneren Zone des Meniskus ein avaskulärer Bereich. Dieser Bereich breitet sich radiär von zentral zur Peripherie aus, sodass schon in der zweiten Lebensdekade nur noch das äußere Drittel des Meniskus vaskulär versorgt ist. Es wird vermutet, dass dieser stetig fortschreitende Prozess des Vaskularitätsverlusts in Zusammenhang mit der Belastung und Bewegung

des Kniegelenks steht (Petersen und Tillmann 1995). Das äußere, gut durchblutete Drittel des Meniskus wird von den Arteriae (Aa) interarticulares inferior medialis und lateralis versorgt, welche aus der Arteria (A) poplitea hervorgehen (Arnoczky und Warren 1982). Aus diesen Interartikulararterien entspringt ein den Meniskus umgebendes Kapillargeflecht, von welchem aus radiale Äste in das äußere Drittel des Meniskus einsprießen.

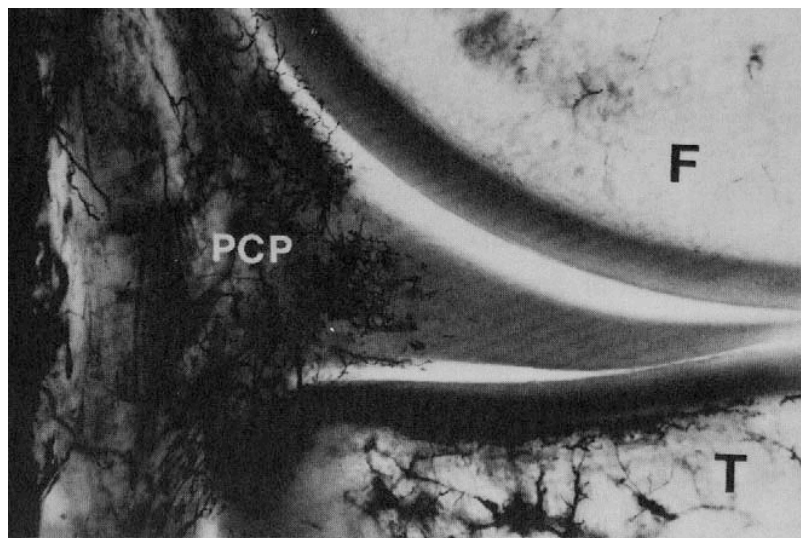


Abbildung 3: 5mm dicker Schnitt durch das mediale Kompartement des Knies. Gefäßversorgung des medialen Meniskus. Färbung der Gefäße mit India Ink (Arnoczky und Warren 1982, S. 91). F: Femur, T: Tibia, PCP: Perimeniskaler Kapillarplexus

Am besten versorgt werden dabei das Vorder- und Hinterhorn eines Meniskus (Day et al. 1985). Die zentralen zwei Dritteln des Meniskus, welche aus Faserknorpel bestehen, sind gefäßfrei und werden ausschließlich durch die Synovialflüssigkeit per Diffusion ernährt. Der Übergang zwischen den zentralen avaskulären zwei Dritteln und dem peripheren Drittel des Meniskus werden in der Literatur als *fibrocartilage junction* beschrieben (Ashraf et al. 2011).

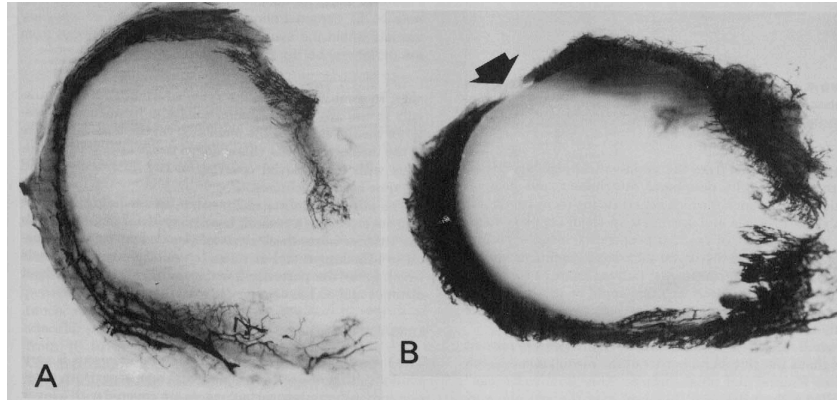


Abbildung 4: Gefäßdarstellung des medialen (A) und lateralen (B) Meniskus mittels India Ink Färbung (Arnoczky und Warren 1982, S.91).

Da die Wundheilung im Gewebe durch bestimmte Mediatoren, welche über Blutgefäße zum Ort der Läsion gelangen, gesteuert wird, ist die Wundheilungskapazität im peripheren Bereich des Meniskus gut, wohingegen sie in den zentralen zwei Dritteln stark vermindert ist.

Die nervale Innervation der Menisken erfolgt über Äste des Nervus (N.) tibialis, des N. obturatorius und des N. peronaeus. Im Meniskusgewebe konnten Ruffini-Körperchen, Paccini-Körperchen, Golgi-Sehnen-Organ und freie Nervenendigungen nachgewiesen werden. Wie auch bei der Gefäßversorgung ist die nervale Versorgung in der Peripherie der Menisken am besten. In den äußeren zwei Dritteln und im Bereich der Vorder- und Hinterhörner ist die Sensordichte am höchsten. Im Bereich der *fibrocartilage junction* lassen sich noch vereinzelt freie Nervenendigungen nachweisen, wohingegen das zentrale Drittel der Menisken aneural ist (Zimny et al. 1988). Insgesamt nimmt die Anzahl der freien Nervenendigungen im Meniskusgewebe mit zunehmendem Alter ab (Assimakopoulos et al. 1992). Die Anwesenheit von Mechanorezeptoren innerhalb des Meniskusgewebes lässt vermuten, dass der Meniskus eine zentrale Rolle in der Propriozeption des Kniegelenks spielt.

1.2.3. Histologischer Aufbau

1.2.3.1. Zelluläre Bestandteile

Der Meniskus wird in der Literatur als fibrocartilaginöses Gewebe beschrieben, da die meisten Zellen eine runde bzw. ovale Form aufweisen und die extrazelluläre Matrix unter dem Lichtmikroskop teilweise ein fibröses Erscheinungsbild aufweist (Ghadially et al. 1983). Es gibt drei verschiedene Zelltypen, die im Meniskusgewebe vorkommen. Fibrochondrozyten, Fibroblast-ähnliche Zellen und Zellen der superfizialen Zone. Als Fibrochondrozyten werden runde bzw. ovale Zellen beschrieben, welche hauptsächlich Kollagen Typ I und Glykosaminoglykane (GAG) synthetisieren. Sie weisen eine perizelluläre Matrix auf, die der perizellulären Matrix der Chondrozyten ähnelt (McDevitt und Webber 1990). Diese Zellen befinden sich überwiegend in den inneren zwei Dritteln des Meniskus, in welchen die höchsten Kompressionskräfte einwirken. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Bildung der extrazellulären Matrix, und sie tragen somit einen maßgeblichen Anteil zur gleichmäßigen Verteilung der beschriebenen Kompressionskräfte über das Kniegelenk bei. Charakteristisch für diese Zellen ist eine erhöhte Konzentration an rauhem endoplasmatischem Retikulum. Die Fibroblast-ähnlichen Zellen des Meniskus befinden sich im äußeren Bereich des Meniskus und ähneln morphologisch, wie der Name schon sagt, den Fibroblasten. Diese Zellen besitzen mehrere längliche zytoplasmatische Ausläufer, über welche sie in Form von *gap-junctions* mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix in Kontakt stehen. Die Matrix, welche diese Zellen umgibt, besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und zu geringeren Anteilen aus Kollagen Typ III, Kollagen Typ V und Glykoproteinen (Melrose et al. 2005). Aufgrund ihrer Lage und ihrer Zellkontakte wird vermutet, dass die Fibroblast-ähnlichen Zellen sich an die mechanischen Anforderungen (Kompressions- und Zugbelastung) der Umgebung anpassen können (Helliö Le Graverand et al. 2001). Die Zellen der superfizialen Zone weisen eine charakteristische spindelförmige Form auf und sitzen direkt unterhalb der Oberfläche des Gewebes. Sie stehen in Kontakt zur Synovialflüssigkeit, besitzen allerdings keine Zell-Zell-Kontakte (Hoberg et al. 2006).

Innerhalb dieser Arbeitsgruppe belegen noch nicht veröffentlichte Studien das Vorhandensein von Zellen innerhalb des Meniskusgewebes, welche multipotent sind und Stammzellcharakter aufweisen. Zu den beobachteten Stammzellcharakteristika zählen zum einen das Migrationspotenzial dieser Zellen und zum anderen das Vorliegen bestimmter Stammzellmarker wie z.B. Cluster of Differentiation (CD) 105, CD73, CD44, CD90. Diese Zellen werden als Meniskusprogenitorzellen (MPC) bezeichnet und gelten als Residuen mesenchymaler Stammzellen aus der embryonalen Entwicklung.

Insgesamt sind Morphologie und Funktionen der verschiedenen Zelltypen innerhalb des Meniskus an die mechanischen Anforderungen adaptiert. Lage und Morphologie der Zellen innerhalb des Meniskus zeigt die Abbildung 5 (Makris et al. 2011).

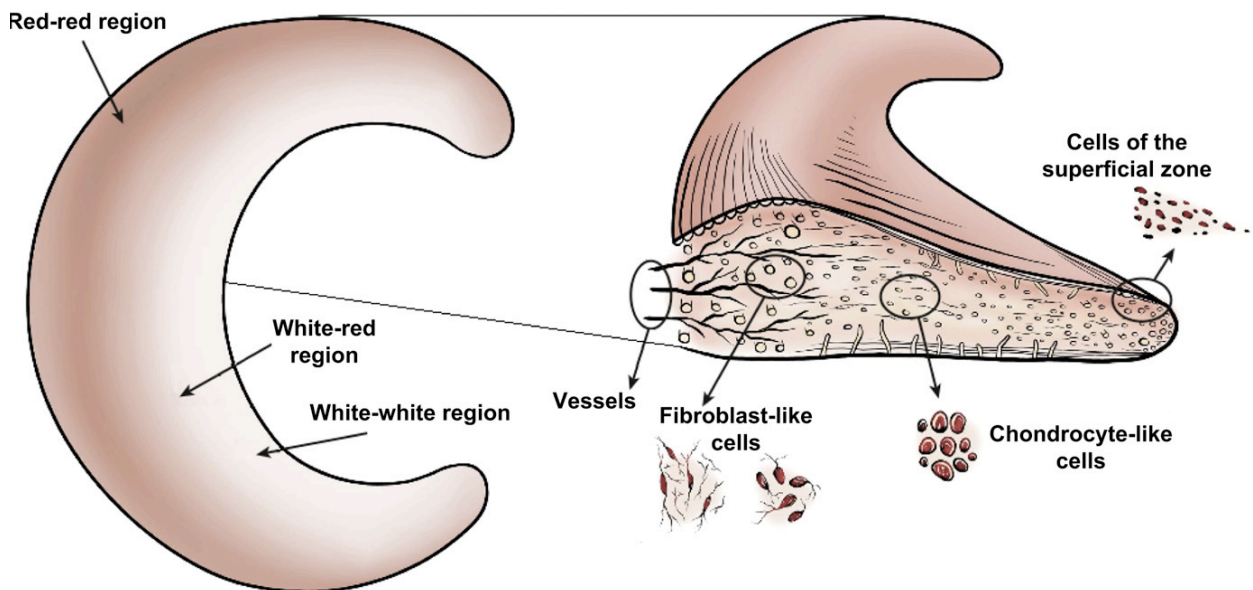


Abbildung 5: (Makris et al., S.7413) Regionale Unterschiede der Vaskularisierung und Zellpopulationen innerhalb des Meniskus. Rechts: Die red-red-Region ist besser vaskularisiert als die white-red-Region. Die white-white-Region ist avaskulär. Links: Die Zellen des äußeren Drittels erscheinen Fibroblasten-ähnlich, während die Zellen in den zentralen zwei Dritteln Chondrozyten-ähnlich erscheinen. Die Zellen der superfizialen Zone sind klein und abgeflacht.

1.2.3.2. Extrazelluläre Matrix

Meniskusgewebe besteht zu circa 72% aus Wasser. Die restlichen 28% bestehen aus organischem Material, zu welchem hauptsächlich die extrazelluläre Matrix und die zellulären Komponenten gehören (Herwig et al. 1984). Dieser organische Bestandteil setzt sich zum größten Teil aus Kollagenen (75%) zusammen, beinhaltet jedoch auch GAGs (17%), Desoxyribonukleinsäure (DNA) (2%), Adhesionsglykoproteine (<1%) und Elastin (<1%). Die prozentuale Zusammensetzung kann, abhängig von Alter, Belastung und Pathologien, beträchtlich variieren (McDevitt und Webber 1990, Sweigart und Athanasiou 2001). In der extrazellulären Matrix des Meniskus existieren verschiedene Kollagentypen, deren Konzentration und Konstellation in den verschiedenen Regionen des Meniskus variieren. In dem peripheren Drittel des Meniskus dominiert das Vorliegen von Kollagen-Typ- I mit circa 80% des Trockengewichts. Andere Kollagentypen, z.B. Kollagen II, III, IV, VI und XVIII sind mit weniger als 1% des Trockengewichts kaum vorhanden. In der zentralen Zone des Meniskus machen die Kollagene circa 70% des Trockengewichts des Gewebes aus, wobei 60% davon als Kollagen Typ II und 40% als Kollagen Typ I vorliegen (Cheung 1987). Glykosaminoglykane, auch Mucopolysaccharide genannt, sind saure Polysaccharide, die die Fähigkeit besitzen, Wasser zu binden und somit dem Meniskusgewebe eine gewisse Elastizität verleihen, welche notwendig für die Absorption und Verteilung einwirkender Kräfte ist. Eine weitere Gruppe der glykosilierten Glykoproteine stellen die Proteoglykane dar, welche circa 2-4% des Trockengewichts des Meniskus ausmachen. Das konzentrationsmäßig dominierende große Proteoglykan innerhalb des Meniskusgewebes ist Aggrecan, wohingegen Biglykan und Decorin die beiden Hauptvertreter der kleinen Proteoglykane darstellen (Scott et al. 1997). Diese Moleküle weisen eine höhere Konzentration in den zentralen zwei Dritteln des Meniskus, und eine niedrigere Konzentration im peripheren Drittel auf. Die Hauptaufgabe der Proteoglykane ist die Absorption von Wasser und dadurch die Pufferung von Kräften. Dies erklärt auch die höhere Konzentration in den zentralen Bereichen, da dort die einwirkenden axialen Kräfte am höchsten sind (Adams und Muir 1981).

1.3. Der *Transforming Growth Factor* β - Signalweg

1.3.1. Grundlagen und Bestandteile

Die transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β)-Superfamilie besteht aus mehreren (beim Menschen 30-40) sezernierten dimeren Proteinen, welche alle strukturell miteinander verwandt sind. Diese Proteine dienen als Botenstoffe (Hormone) der Steuerung eines weiten Bereichs biologischer Funktionen bei verschiedenen Lebewesen. Während der embryonalen Entwicklung steuern sie die Musterbildung, und sie erfüllen bestimmte Aufgaben bei der Proliferation, der Differenzierung, der Bildung von extrazellulärer Matrix und während des Zelltods (Apoptose). In adulten Individuen spielen sie hauptsächlich eine Rolle bei der Gewebereparatur und bei der Steuerung des Immunsystems (Massague und Chen 2000, Patterson und Padgett 2000). Die Superfamilie besteht aus der TGF- β /Activin-Familie und aus der großen Familie der *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs). Alle diese Proteine binden als Liganden an enzymgekoppelte-Rezeptoren. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Einpfad- Transmembranproteine, welche auf der zytosolischen Seite am C- terminalen Ende eine Serin-/ Threonin- Kinase- Domäne besitzen. Man unterscheidet zwei Klassen dieser Rezeptor- Serin-/ Threonin- Kinasen, Typ I und Typ II, welche strukturell ähnliche Homodimere sind. Jedes Mitglied der TGF- β -Superfamilie bindet an eine für sich charakteristische Kombination von Typ I- und Typ II- Rezeptordimeren (Shi und Massague 2003). Durch diese Bindung entsteht ein tetramerer Rezeptorkomplex, wodurch die beiden Kinasedomänen der Rezeptordimere zusammengebracht werden, sodass der konstitutiv aktive Typ II- Rezeptor den Typ I- Rezeptor phosphorylieren und somit aktivieren kann (Derynck und Zhang 2003). Der aktivierte Typ I- Rezeptor bindet an ein latentes Genregulatorprotein der Smad- Familie (R-Smad), welches sich im Zytosol befindet, und phosphoryliert dieses (Kretzschmar et al. 1997, Macias-Silva et al. 1996).

Man unterscheidet 8 verschiedene Smad-Proteine, die sich in drei unterschiedliche funktionelle Klassen einteilen lassen: Rezeptor- regulierte Smads (R-Smad), Co-Mediator-Smads (Co-Smad) und Inhibitor- Smads (I-Smad). Der Begriff Smad setzt sich zusammen aus den beiden ersten identifizierten Mitgliedern dieser Familie: Sma in *Caenorhabditis*

elegans und Mad in *Drosophila* (Derynck et al. 1996, Sekelsky et al. 1995). Zu der Gruppe der R-Smads gehören Smad1-3, Smad5 und Smad8. Smad4 ist das einzige Co-Smad und die Smads 6 und 7 gehören zu der Gruppe der I-Smads.

Die R-Smads und Smad4 weisen eine Länge von circa 500 Aminosäuren (AS) auf. Sie bestehen aus einer MH1 (MAD homology 1)- Domäne am N- terminalen Ende und einer MH2 (MAD homology 2)- Domäne am C- Terminus, welche über eine *linker Sequence* miteinander verbunden sind. Die I-Smads hingegen weisen nur eine MH2- Domäne auf. Die MH1-Domäne der Smad- Proteine dient der Interaktion mit der DNA, spielt vermutlich eine Rolle beim Import in den Nukleus, und hemmt die Funktion der MH2-Domäne. Die MH2-Domäne, welche in allen Smad- Proteinen vorhanden ist, ist verantwortlich für die Rezeptorinteraktion, für die Bildung von homomeren und heteromeren Smad-Komplexen und tritt, während des nukleozytoplasmatischen Shuttles, in direkten Kontakt mit den Kernporenkomplexen. Nur die R-Smad- Proteine besitzen zusätzlich an ihrem C- terminalen Ende ein sog. SXS- Motiv, welches für die Phosphorylierung durch den aktivierten Typ I- Rezeptor benötigt wird (Qin et al. 2001, Shi 2001). Auch die *linker Sequence*, die sich zwischen den MH1- und den MH2-Domänen befindet, besitzt mehrere Phosphorylierungs-stellen, welche einen *Crosstalk* mit anderen Signalwegen gewährleisten. Zudem enthält diese Sequenz ein PY-Motiv, wodurch eine mögliche Interaktion mit *Smad ubiquitination regulatory factor proteins* (Smurf 1- und Smurf 2- Proteine) stattfinden kann. Smurf1 und Smurf2 sind E3 Ubiquitin- Ligasen, welche zu den Proteinen der Hect- Familie gehören. Sie spielen eine zentrale Rolle bei dem Abbau von Smads und TGF- β -Rezeptoren durch Proteasomen. Die oben beschriebene Struktur der Smad- Moleküle ist der Abbildung 6 zu entnehmen.

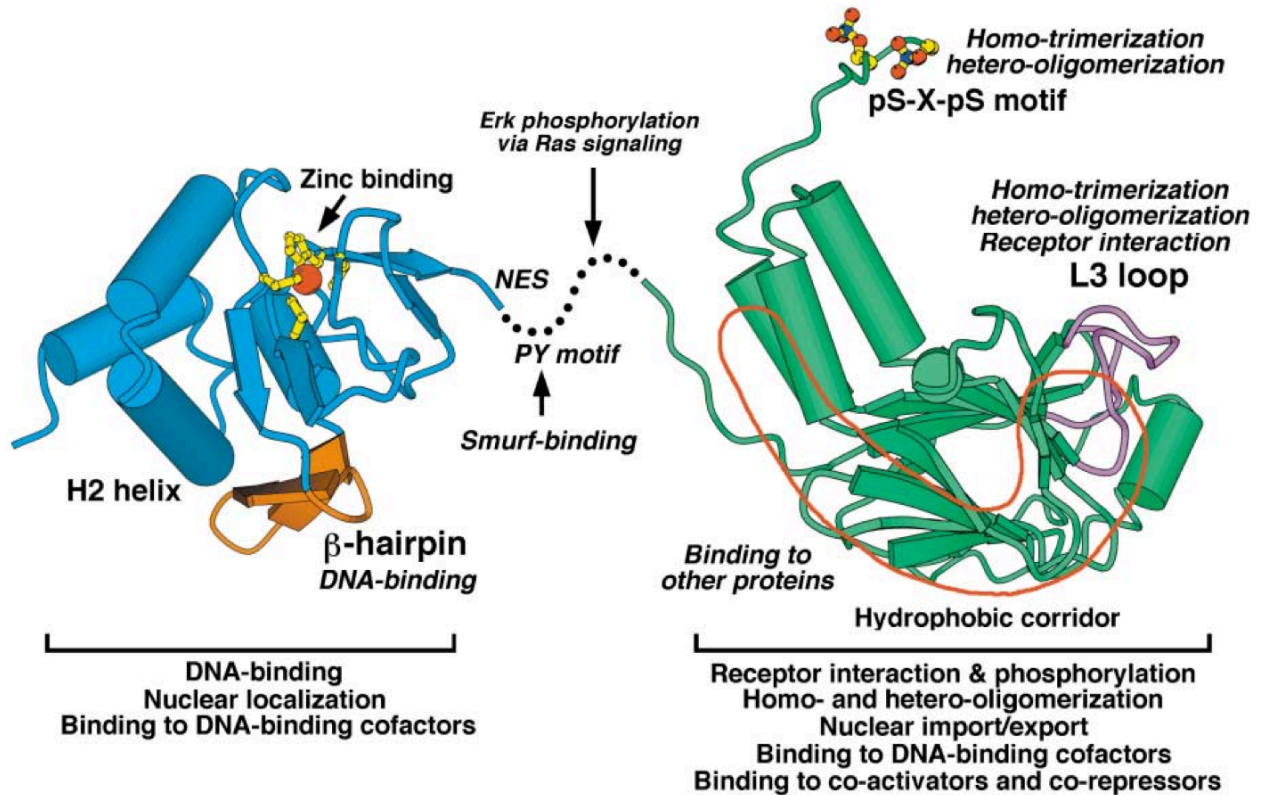


Abbildung 6: Struktur eines R-Smad-Proteins modifiziert nach Shi und Massague 2003, S. 690. Die MH1-Domäne des Moleküls ist blau und die MH2-Domäne ist grün gekennzeichnet. Die DNA-Bindungsstelle ist in orange dargestellt. Der L3-Loop der MH2-Domäne ist lila gekennzeichnet. Das C-terminale pSer-X-pSer (SXS)-Motiv ist durch gelbe und orange ballförmige Motive dargestellt worden.

Alle R-Smad-Moleküle werden durch zuvor aktivierte Typ I Rezeptoren phosphoryliert. Smad2 und Smad3 werden durch aktivierte TGF- β -Typ I Rezeptoren phosphoryliert, während Smad1, Smad5 und Smad8 durch aktivierte BMP-Typ I Rezeptoren phosphoryliert werden. Sobald eines dieser rezeptoraktivierten Smads (R-Smad) phosphoryliert worden ist, ändert es seine Konformität, dissoziiert von dem Rezeptor und bindet an das Co-Smad, Smad4, welches in der Lage ist, mit jedem beliebigen dieser 5 R-Smads einen Komplex zu bilden (Wu et al. 2001). Dieser oligomerisierte Smad-Komplex verlagert sich in den Zellkern, wo er mit anderen Genregulatorproteinen assoziiert und die Transkription bestimmter Zielgene reguliert. Diese Genregulatorproteine im Zellkern variieren je nach Zellart und Zustand der Zelle. Somit sind jeweils unterschiedliche Gene betroffen (Moustakas et al. 2001, Shi und Massague 2003).

Die Smad-Signalmoleküle pendeln während der Signalantwort ununterbrochen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her. Nach der Assoziation mit der DNA werden sie im Zellkern dephosphoryliert und im Anschluss ins Zytoplasma exportiert, wodurch aktivierte Typ I Rezeptoren erneut phosphoryliert werden können. Somit ist die auf die Zielgene ausgeübte Wirkung sowohl abhängig von der Konzentration des extrazellulären Liganden, als auch von der Zeit, während der der Ligand auf die extrazellulären Domänen der Rezeptoren einwirkt. Zellen, die der Aktivierung durch ein bestimmtes Hormon ausgesetzt sind, entweder in hoher Konzentration oder über einen längeren Zeitraum, werden einen bestimmten Satz von Genen anschalten; wohingegen Zellen, die einen kürzeren oder weniger intensiven Kontakt zum Hormon hatten, einen anderen Satz von Genen anschalten werden (Dyson und Gurdon 1998, Wilson et al. 1997).

Der TGF- β -Signalweg unterliegt dem Mechanismus der negativen Rückkopplung, welcher der Verhinderung einer möglichen Überstimulierung des Signalwegs dient. Unter den Zielgenen, die durch den Smad-Komplex aktiviert werden, befinden sich unter anderem solche, die für die beiden Inhibitor-Smads Smad6 und Smad7 codieren. Diese I-Smads können auf 3 verschiedene Weisen die Signaltransduktion hemmen. Zum einen über den Mechanismus der kompetitiven Hemmung, indem sie mit den R-Smads um die Rezeptorbindungsstelle konkurrieren und somit die Phosphorylierung von R-Smads verringern. Zum anderen sind sie in der Lage Ubiquitin-Ligasen namens Smurf zu aktivieren, welche durch Ubiquitinierung den Abbau der Smads und der TGF- β -Rezeptoren fördern (Lo und Massague 1999). Als dritten Mechanismus können die I-Smads eine Proteinphosphatase rekrutieren, die den Rezeptor dephosphoryliert und somit inaktiviert. Zudem sind sie in der Lage an das Co-Smad, Smad4, zu binden und somit dessen Bindung an die R-Smads zu verhindern.

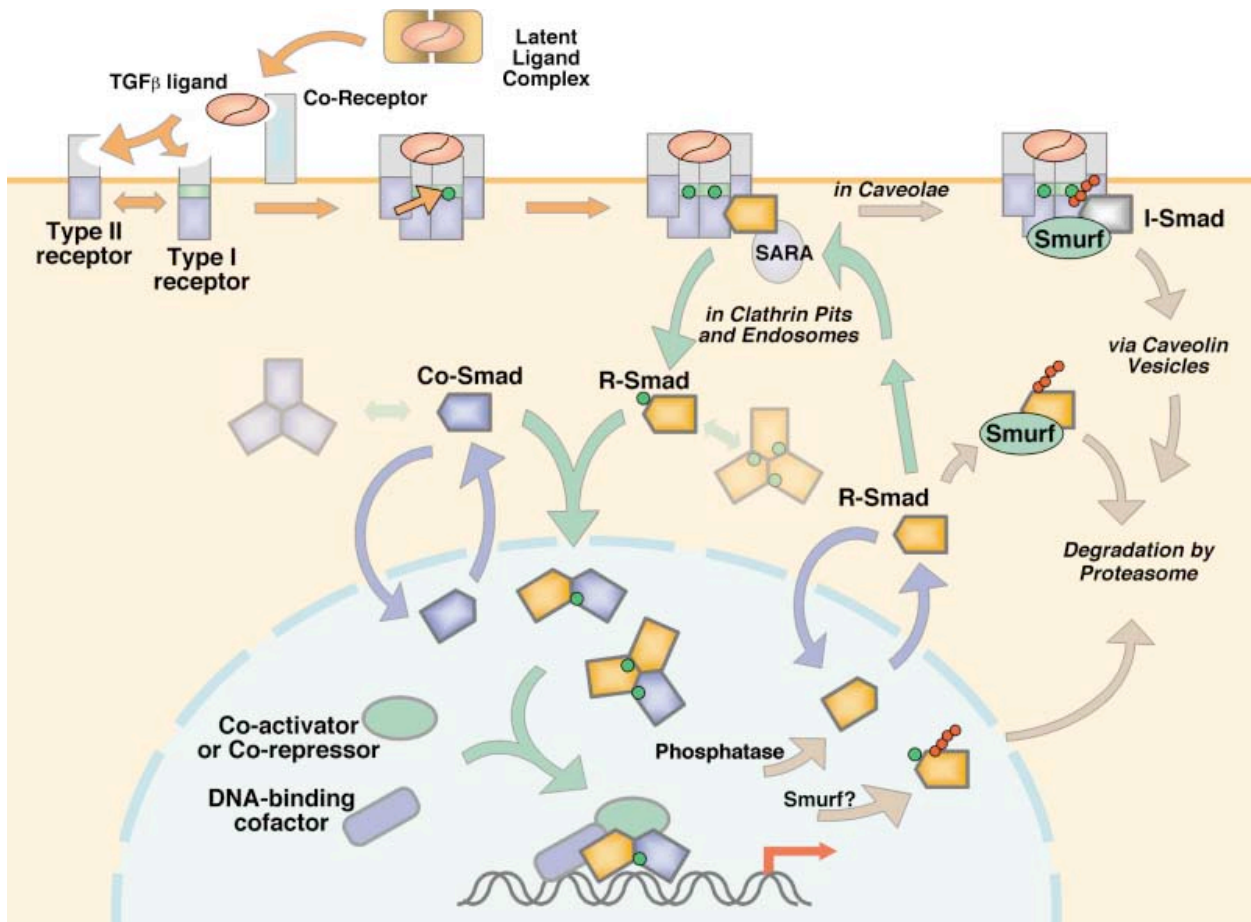


Abbildung 7: Schematische Darstellung des TGF- β -Signals von der Zellmembran zum Nukleus, modifiziert nach Shi und Massague 2003, S. 686. Die Pfeile zeigen den Signalfluss und sind farblich kodiert: Orange steht für Ligand- und Rezeptoraktivierung, grau für Smad- und Rezeptorinaktivierung, grün für Smadaktivierung und Bildung eines Transkriptionskomplexes und blau für den nukleozytoplasmatischen Shuttle. Phosphatgruppen und Ubiquitin sind jeweils durch grüne und rote Kreise gekennzeichnet.

Die Rezeptor-Serin-/ Threonin-Kinasen arbeiten hauptsächlich über den oben beschriebenen Smad-Signalweg. Allerdings können sie auch andere Signalwege beeinflussen. Es ist jedoch auch möglich, dass Signalproteine aus anderen Signalwegen Smad-Proteine phosphorylieren und somit auf den Smad-Signalweg einwirken.

1.3.2. TGF- β -Signalweg und Osteoarthritis

Dysfunktionen innerhalb des TGF- β -Signalwegs spielen sowohl beim Menschen, als auch bei Tieren eine wichtige Rolle hinsichtlich verschiedener Erkrankungen. Neben einem Mitwirken bei embryonalen Fehlentwicklungen und diversen Tumorerkrankungen, wurden

Dysfunktionen dieses Signalwegs auch mit der Entstehung und der Progression der Osteoarthritis in Verbindung gebracht. Der TGF- β -Signalweg und dessen Signalmoleküle haben Einfluss auf Regeneration und Erhalt von Bestandteilen des muskuloskeletalen Systems, z.B. im Knochen- und Knorpelgewebe. Ein aktivierter TGF- β -Signalweg in Knorpelzellen wirkt über eine Stimulation der extrazellulären Matrixproduktion, den katabolen Prozessen, welche bei der Osteoarthritis vorherrschen, entgegen. Somit besitzt er eine protektive Funktion innerhalb des Knorpelgewebes. Zudem ist TGF- β ein Gegenspieler von Interleukin 1, welches als kataboler Mediator des osteoarthrotischen Gelenkschadens angesehen wird (Redini et al. 1993). Es stimuliert die chondrozytäre Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Aggrecanasen (ADAMTS) und hemmt die Aggrecan- und Kollagensynthese (Goldring et al. 1994). Im gesunden Knorpelgewebe werden diese katabolen Prozesse durch TGF- β induzierte Matrixproduktion kompensiert. Im osteoarthrotischen Knorpelgewebe dagegen ist dieses Gleichgewicht zu Gunsten der katabolen Prozesse verschoben, was eine Knorpeldegeneration zur Folge hat. Es konnte jedoch im initialen Stadium der Osteoarthritis eine erhöhte TGF- β -Genexpression und eine vermehrte Synthese von Matrixproteinen festgestellt werden.

An einem osteoarthrotischen Mausmodell wurde gezeigt, dass sowohl der TGF- β -Rezeptor, als auch dessen Signalproteine in alten Mäusen, welche einer hohen Gelenkbelastung ausgesetzt waren, stark vermindert sind (Blaney Davidson et al. 2005). Zudem beschrieb dieselbe Arbeitsgruppe, dass eine Hemmung von endogenem TGF- β im Mausmodell zu vermehrten Knorpelschäden führt. Im Umkehrschluss wurde in anderen Untersuchungen in vitro und in vivo gezeigt, dass eine Stimulation des TGF- β -Signalwegs durch die vermehrte Proteoglykan- und Kollagen Typ II-Synthese, sowie durch Runterregulierung der Expression von knorpeldegenerierenden Enzymen (MMPs, ADAMTS), positive Effekte auf die Aufrechterhaltung und Regeneration des Knorpelgewebes hat (van Beuningen et al. 1994). Nach TGF- β -Injektion in arthrotische Kniegelenke von Mäusen konnten Reparaturprozesse innerhalb des Knorpelgewebes und sogar eine Regeneration von degenerierten Knorpeldefekten beobachtet werden (Hunziker 2001). Untersuchungen an einer Smad3-Knockout-Maus zeigten die Entwicklung einer degenerativen Gelenkerkrankung und eine Degeneration der Bandscheiben, was

zusätzlich die Relevanz des TGF- β -Signalwegs in Bezug auf die Osteoarthroseprotektion unterstreicht.

Auch an isolierten Zellen aus Meniskusgewebe konnte eine dosisabhängige, erhöhte Proteoglykansynthese durch TGF- β -Stimulation nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass der Meniskus Zellen enthält, welche sich ähnlich wie Chondrozyten im Knorpelgewebe verhalten (Tanaka et al. 1999).

1.4. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Lange Zeit wurde der Meniskus als Relikt eines Muskels angesehen, welches verzichtbar für die Funktion des Kniegelenks ist. Dies führte dazu, dass schon bei geringfügigen Verletzungen großzügig der gesamte Meniskus entfernt wurde, in der Annahme, dass der Meniskus sich erneut bildet. Die daraus entstandene, ungleichmäßige und übermäßige Belastung des Gelenkknorpels führte zu einer osteoarthrotischen Gelenkdegeneration (Jorgensen et al. 1987). Heute sind die Funktionen des Meniskus als Bestandteil des Kniegelenks weitestgehend bekannt, was dazu geführt hat, dass bei einer Meniskusoperation stets der größtmögliche Erhalt des Meniskusgewebes angestrebt wird. Eine Operation, egal welcher Art, kann jedoch nicht die Struktur und Funktion des nativen Meniskusgewebes wiederherstellen. Folglich werden neue Strategien benötigt, welche die Meniskusregeneration verbessern. Eine dieser neuen Strategien zur verbesserten Meniskusregeneration besteht darin, die Meniskusregeneration durch Wachstumsfaktoren zu stimulieren und somit die Heilungskapazität des Meniskus zu steigern. Ein potenter Wachstumsfaktor, welcher unter anderem eine Rolle in der Matrixbildung des Meniskus spielt, ist TGF- β 3 (Collier und Ghosh 1995). Ziel der erwähnten Therapiestrategie ist es, Meniskusprogenitorzellen, welche als Residuen mesenchymaler Stammzellen der Embryonalentwicklung angesehen werden, zur Produktion von nativem Meniskusgewebe anzuregen. Insgesamt sind jedoch die Informationen über Meniskusprogenitorzellen sehr begrenzt, und sowohl Herkunft, als auch Regulation von Proliferations- und Differenzierungsmechanismen dieser Zellen sind unzureichend bekannt.

In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung und Lokalisation des TGF- β -Signalwegs und dessen Smad-Signalmoleküle innerhalb der Meniskusprogenitorzellen, aber auch innerhalb des Meniskusgewebes, genauer untersucht werden. Diese Meniskus-progenitorzellen werden sowohl aus histologisch hoch erkranktem, als auch aus histologisch weniger erkranktem Meniskusgewebe gewonnen, um mögliche Unterschiede in der Regenerationsaktivität unterschiedlich stark degenerierter Menisken feststellen zu können. Die histologische Beurteilung wurde mit Hilfe des histopathologischen Bewertungsscores von Moritz Roth (Doktorand dieser Arbeitsgruppe; Dissertation: Histologische Klassifikation degenerativ erkrankter Menisken - Die Signalwegsmodule RSPO2 und SFRP2 in humanem Meniskusgewebe) durchgeführt, welcher unter anderem die Beurteilung der Meniskusoberfläche, Färbung der extrazellulären Matrix sowie Vorhandensein von Degenerationszeichen berücksichtigte.

Die Idee der vorliegenden Arbeit entwickelte sich aus der wissenschaftlichen Zusammenarbeit dieser Arbeitsgruppe mit Prof. Dr. Vicki Rosen von der „Harvard School of Dental Medicine“ aus Boston. In teilweise nicht veröffentlichten Studien konnte die Arbeitsgruppe um Vicki Rosen, anhand eines Mausmodells zeigen, dass der TGF- β -Signalweg eine zentrale Rolle in der Entstehung des Meniskus spielt. In diesen Studien wurden vergleichende Microarrayanalysen am Knie- und Ellenbogengewebe von Mausembryonen am 15. und 16. Entwicklungstag durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TGF- β im sich entwickelnden Kniegelenkgewebe 2.62-fach größer ist als im sich entwickelnden Ellenbogengelenkgewebe (Pazin et al. 2012). Da sich der Meniskus aus mesenchymalen Stammzellen entwickelt und MPCs als Residuen solcher angesehen werden, wäre ein nächster wichtiger Schritt, die Rolle des TGF- β -Signalwegs innerhalb der MPCs genauer zu untersuchen. Dies könnte zu neuen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Meniskusregeneration führen.

In dieser Arbeit ist der Schwerpunkt die Untersuchung der Smad-Signalmoleküle des TGF- β -Signalwegs, welche den zentralen Signalmechanismus dieses Signalwegs darstellen. Um die Bedeutung und Lokalisation des TGF- β -Signalwegs und insbesondere dessen Smad-Signalmoleküle detaillierter beschreiben zu können, sollte der Nachweis sowohl auf molekularer Ebene als auch auf Gewebeebene erfolgen. Zudem sollten die Effekte einer

Stimulation dieses Signalwegs auf die MPCs untersucht werden um nähere Erkenntnisse über die Funktion des TGF- β -Signalwegs innerhalb der MPCs zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die Regenerationskapazität und Regenerationsaktivität von MPCs zu erhalten, welche in Zukunft einen möglichen Ansatzpunkt in der Behandlung von Meniskusdefekten darstellen könnten.

2. Material und Methoden

2.1. Aufarbeitung und Isolierung von Meniskusgewebe und Meniskusprogenitorzellen (MPC)

Das operativ gewonnene Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in einen Behälter gegeben, welcher zuvor in unserem Labor autoklaviert und mit 50 ml Medium (DMEM (Dulbecco's *Modified Eagle Medium*) + GlutaMAX, GIBCO, Invitrogen, Paisley, UK) und 50 ml PBS (Sigma- Aldrich, Steinheim, DE) versetzt wurde. Entsprechend der Vorgaben des Ethikantrages wurden lediglich Alter, Gewicht und Geschlecht der Patienten mit einem Aufkleber auf den Behältnissen vermerkt. Der Ethikantrag ist unter der Nummer 25/12/10 hinterlegt. Im Labor wurde das operativ gewonnene Gewebe unter sterilen Bedingungen an der Zellbank inspiziert. Bei der Inspektion wurden die Menisken auf Vollständigkeit, Konsistenz, Farbe und degenerative Veränderungen untersucht. Um diese Gewebestücke vor dem Austrocknen zu bewahren, wurde der Boden der Petrischale mit PBS benetzt.

PBS 10%: 81,8 g NaCl
 16,0 g Na₂HPO₄ (AppliChem, Darmstadt, DE)
 2,0 g KCl
 2,0 g KH₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, DE)
 auffüllen auf 1 Liter mit dest. H₂O
 pH 7,4

Mit Pinzette und Skalpell (Feather, Osaka, Japan) wurden durch eine vertikale Schnittführung die mittleren Anteile der Menisken isoliert. Die Vorder- und Hinterhörner der Menisken wurden verworfen. Von diesen mittleren Meniskusanteilen wurde ein Teil für die spätere histologische Beurteilung in einem Falcon Tube mit 50 ml Fixierlösung eingelegt. Anschließend erfolgte bei den restlichen Anteilen des isolierten mittleren Meniskusabschnittes die Entfernung von den beiden Superfizialschichten, der äußeren vaskularisierten Zone und der Meniskusspitze mit Hilfe eines Skalpells. Nach dieser Entfernung bestand das Meniskusgewebestück nur noch aus der inneren Zone des Meniskus. Dieses Gewebestück wurde mit einem Skalpell zu circa 2 x 2 Millimeter (mm)

kleinen Stücken (Chips) zerkleinert. Im folgenden wird in der vorliegenden Arbeit für diese zerkleinerten Meniskusgewebestücke der Begriff „Meniskus-Chips“ verwendet. Diese Meniskus-Chips (12-15 Stück) wurden mit der Skalpellspitze in eine 75 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt, Newton, USA) befördert, welche 10 ml DMEM Nährmedium enthielt. Das verwendete DMEM Nährmedium wurde stets mit fetalem Kälberserum (FCS) (GIBCO, Paisley, UK) und Gentamycin (PromoCell, Heidelberg, DE) versetzt. Anschließend wurde die Zellkulturflasche mit den Meniskus-Chips für 10-14 Tage in einem 37°C warmen und 5% CO₂ haltigen Brutschrank (Heraeus, Hanau, DE) inkubiert. Danach wurden die Meniskus-Chips, je nach Migration der MPCs, entfernt und das Medium gewechselt.

2.2. Kultivieren von MPCs

Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen mit frischem Nährmedium (DMEM) versetzt. Diese Kultivierung dient der Vermehrung der Zellen. Da aufgrund der operativen Gewinnung und der unterschiedlichen degenerativen Prozesse in dem Meniskusgewebe die Zellzahlen der migrierten MPCs bei den verschiedenen Patienten stark schwanken, ist es wichtig, genügend Zellen heranzuzüchten, um später bei verschiedenen Untersuchungsmethoden genügend Zellen zu besitzen.

Vor dem Wechsel des Mediums wurden zunächst, unter dem Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, DE), die Ausbreitung der Zellen am Boden der Zellkulturflaschen beurteilt. Dies ist notwendig um zu kontrollieren, dass die Zellkulturflaschen nicht zu voll wachsen, da sich sonst die Zellen differenzieren könnten und dies die Untersuchungen verfälschen würde.

2.3. Passagieren von MPCs

Nachdem der Boden einer Zellkulturflasche zu 90% konfluent mit Zellen bewachsen war, erfolgte das Ernten der MPCs mit Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, DE). Hierzu wurde zunächst das Medium abpipettiert. Danach folgte das zweimalige Waschen der adhärennten Zellen mit PBS, um eine Blockierung der Trypsinierung durch Proteinreste der Nährlösung zu vermeiden. Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml Trypsin pro

Zellkulturflasche überschichtet und für 3-5 min in dem Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nicht abgelöste Zellen konnten durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche mobilisiert werden. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Falcon Tube Röhrchen pipettiert, welches 2 ml DMEM enthielt, identisch zu der Menge an Trypsin in der Flasche. Zellrückstände wurden durch Spülung der Zellkulturflasche mit DMEM mobilisiert und dem oben beschriebenen 50 ml Falcon Tube Röhrchen zugeführt. Dieses Röhrchen wurde anschließend 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand verworfen und das am Boden haftende Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Mit Hilfe eines Zellometers (Cellometer Auto T4 Cell Counter) der Firma Nexcelom Bioscience (Lawrence, USA) wurde die Zellzahl pro ml bestimmt. Anschließend beimpfte man die Zellkulturflaschen wieder mit 7×10^4 Zellen pro Flasche, versetzte diese mit 10 ml DMEM Nährmedium und zentrifugierte die restlichen in PBS resuspendierten Zellen. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet nach Dokumentation von Zellzahl, Passage und Datum bei -81°C eingefroren. Die Zellen in den neu beimpften Zellkulturflaschen befanden sich durch die Behandlung mit Trypsin in der nächsthöheren Passage.

2.4. Lichtmikroskopie und Immunhistochemie

2.4.1. Fixierung, Entkalkifizierung, Dehydrierung, Einbettung und Anfertigung histologischer Schnitte von Meniskusgewebe

Sofort nach dem Zurechtschneiden eines Meniskusgewebestücks aus dem mittleren Drittel des Meniskus (oben beschrieben) wurde dieses für 72 Stunden bei 4°C in 50 ml 4%igem Formalinpuffer fixiert. Diese Lösung, bestehend aus 4% Formaldehyd und Sörensenpuffer, stoppt die einsetzende Autolyse und Fäulnis der Gewebeproben durch eine Proteinvernetzung und sorgt dadurch für eine dauerhafte Haltbarkeit des Gewebes. Da dieser Formalinpuffer sehr photosensibel ist, wurde das 50 ml Falcon Tube Röhrchen mit der Lösung mit Alufolie umwickelt.

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

Lösung A: 41,37 g KH_2PO_4
mit dest. H_2O auf 1 Liter auffüllen

Lösung B: 42,58 g Na_2HPO_4
mit dest. H_2O auf 1 Liter auffüllen

Fixierlösung: 32,4 ml 37% Formalin (Roth, Karlsruhe, DE)
18,2 ml Sörensen- Puffer A
81,8 ml Sörensen- Puffer B
mit dest. H_2O auf 300 ml auffüllen

Für die Gewebeerweichung bzw. –entkalkifizierung wurde das Meniskusgewebe anschließend für 48 Stunden in 10% Ameisensäure mit 2,5% Formalin bei 4° C eingelegt. Als zweiter, entkalkifizierender Schritt folgte die Erweichung in 20% EDTA Lösung (Roth, Karlsruhe, DE) für 72 Stunden auf einer Wippe bei Raumtemperatur. EDTA ist ein Chelator, der Komplexe mit den Kalziumionen eingeht. Durch das tägliche Austauschen mit frischer EDTA Lösung wurden wieder neue Bindungsstellen für die Kalziumionen frei und das Meniskusgewebe wurde weiter entkalkifiziert. Die Entkalkifizierung und Erweichung des Gewebes ermöglicht bzw. erleichtert das spätere Schneiden des Präparates.

Entkalkungslösung: 10% Ameisensäure in 2,5% Formalin

20,2 ml 37% Formalin
18,2 ml Sörensen- Puffer A
81,8 ml Sörensen- Puffer B
mit dest. H_2O auf 300 ml auffüllen

Nach der Gewebeerweichung erfolgte die Dehydrierung des Meniskusgewebes mit Hilfe eines Einbettautomaten (Duplex Processor, Shandon Elliot, Cheshire, UK), nach folgendem Protokoll:

Tabelle 1: Protokoll des Einbettautomaten:

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

Nachdem das Meniskusgewebe dehydriert war, konnte es in Paraffin (ThermoScientific, Cheshire, UK) eingebettet werden. Dazu wurden die nun fixierten, entkalkifizierten und dehydrierten Meniskusgewebestücke vorsichtig in ein Metallförmchen gelegt und mit heißem, flüssigen Paraffin übergossen. Anschließend ließ man die Metallförmchen mit dem flüssigen Paraffin für 24 Stunden aushärten, ehe man die in einem Paraffinblock fixierten Meniskusgewebestücke schneiden konnte.

Das Schneiden dieser Paraffinblöcke in 6-7 µm dünne Schnitte erfolgte mit einem Mikrotom (Leica, Nusslock, DE). Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Pinsels in ein 37° C warmes Wasserbad gelegt, indem sich die noch leicht gewellten Schnitte

glätteten. Danach wurden die Schnitte mit einem Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig, DE) aufgenommen, für circa 30 min auf eine 42°C warme Wärmeplatte gelegt und im Anschluss für 48 Stunden in einen 37°C warmen Wärmeschrank (Heraeus, Hanau, DE) getrocknet.

2.4.2. H.E.-Färbung von histologischen Meniskusschnitten

In dieser Arbeit wurde die Hämatoxylin- Eosin- Färbung (H.E.-Färbung) angewandt, um im mikroskopischen Bild verschiedene Gewebsstrukturen unterscheiden und vergleichen zu können. Die H.E.-Färbung besteht aus zwei verschiedenen Einzelfärbungen. Hämalaun (Merck, Darmstadt, DE) färbt alle basophilen (sauen) Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA). Eosin (Roth, Karlsruhe, DE) ist ein saurer Farbstoff und färbt alle azidophilen (eosinophilen) Strukturen rot, vor allem die Zellplasmaproteine. Diese H.E.-Färbung wurde mit Hilfe eines Färbeautomaten (DiaPath, Martinengo, IT) durchgeführt, nach folgendem Protokoll:

Tabelle 2: H.E.- Färbung

Schritt	Lösungsmittel	Zeit
1	Xylol	5 min
2	absol. Ethanol	2 min
3	80 % Ethanol	2 min
4	Aqua dest.	2 min
5	Hämalaun	4 min
6	Aqua dest.	1 min
7	fließend Wasser	15 min
8	Eosin	7 min
9	Aqua dest.	1 min
10	60 % Ethanol	1 min

Tabelle 2: H.E.- Färbung

11	80 % Ethanol	1 min
12	absol. Ethanol	2 min
13	Xylol	3 min

2.4.3. Immunhistochemische Darstellung von Meniskusgewebe

Die Immunhistochemie ist eine Methode bei der, mittels markierter Antikörper, Proteine in verschiedenen Geweben sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde die Methode dazu verwendet, intrazelluläre Signalproteine (Smad1, Smad2, Smad3, Smad4) und extrazelluläre Signalmoleküle (TGF- β 3), die wesentliche Komponenten des TGF- β -Signalwegs sind, in Meniskusgewebe nachzuweisen. Die Antikörper gegen die oben genannten Proteine wurden mit Hilfe des HiDef Alkalische Phosphatase Polymersystems (Ca. No. 962D-12) von Cell Marque (Rocklin, USA) sichtbar gemacht. Dieses System besteht aus einem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und an welchen das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt wird. Die Alkalische Phosphatase setzt als Substrat den roten Farbstoff Chromogen um und macht so die gesuchten Moleküle mikroskopisch sichtbar.

Zunächst wurden die Meniskusschnitte entparaffiniert und rehydriert, indem sie jeweils für 5 min in folgende Lösungen nacheinander gegeben wurden: Xylol1, Xylol2, 100% Ethanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 60% Ethanol, 50% Ethanol. Anschließend folgte ein 10 min. Waschschrift in 20mM TBS-Puffer mit 0,05% Tween (TBS-T). Zum Blocken der endogenen Phosphatase wurde 45 min lang mit KPL Universal Block (KPL, Gaithersburg, USA) geblockt. Nach einem erneuten, 10 min- Waschschrift mit TBS-T wurden die Präparate in einer Wärmekammer für 20 min bei 60°C in ProTaq 1 (BIOCYC, Luckenwalde, DE) inkubiert. Anschließend folgte ein jeweils 5 minütiger Verdau mit Chondroitinase ABC (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE), Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) und Protease 24 (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer,

gefolgt von einer 10 min. Inkubation mit 1% TBS/BSA. Nun erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers. Nach dem 15 min- Waschschrift mit TBS-T wurden die Präparate für 5 min mit DAKO Block S3022 (Dako, Carpinteria, USA) geblockt, um eine unspezifische Bindung des folgenden sekundären Antikörpers zu vermeiden. Anschließend wurde mit HiDef Amplifier (HiDef Detection Alk Phos Polymer System von Cell Marque) für 10 min inkubiert, welches den sekundären Antikörper beinhaltet. Danach wurden die Präparate abermals für 10 min mit TBS-T gewaschen und wieder für 5 min mit DAKO Block S3022 geblockt. Nun erfolgte die Zugabe von HiDef Polymer Lösung (HiDef Detection Alk Phos Polymer System von Cell Marque), welche das Enzym alkalische Phosphatase beinhaltet, für 10 min. Nach 10 min Waschen mit TBS-T wurden 100 µl Chromogenlösung (Diagnostic BioSystem, Pleasanton, USA) pro Schnitt auf jedes Präparat für 7-8 min aufgetragen. Im Anschluss wurden die Chromogenreste für 10 min mit TBS-T weggewaschen und für 1-2 min mit Hämalaun (Merck, Darmstadt, DE) nach Meyer 1:4 in Aqua dest. gegengefärbt. Danach wurden die Präparate in einer Küvette unter fließendem Wasser gespült und wieder dehydriert, indem sie die oben genannte Alkoholreihe mit identischen Inkubationszeiten rückwärts durchliefen. Zum Schluss wurden die Präparate mit Glas- Coverslips (Thermo Scientific, Braunschweig, DE) gedeckt und konnten nun unter dem Mikroskop beurteilt werden.

10 xTBS: 24,2 g TRIS 200 mM
87,6 g NaCl 1,5 M
auffüllen auf 1 Liter mit dest. H₂O
pH 7,4

TBS-T: 100 ml 10 x TBS
500 µl Tween (0,05%)
auffüllen auf 1 Liter mit dest. H₂O

Hyaluronidase 6,66 ml einer 0,3 M Sörensen- Pufferlösung mit dest. H₂O auf 100 ml auffüllen (Endkonzentration: 0,02 M Phosphatpuffer).

Darin werden gelöst:

0,45 g NaCl (77 mM)

0,01 g BSA (0,01%)

100 mg Hyaluronidase (1 mg/ ml)

Proteinase 24 45 ml dest. H₂O
5 ml 0,05 M Tris- HCl pH 7,6 (6 g Tris base in 250 ml aqua dest.
+ 36 ml 1 M HCl. Dies mit dest. H₂O auf 1 Liter auffüllen.)
25 mg Proteinase XXIV
25 mg CaCl₂

1x Protaqs 1 20 ml ProTaq 1 Antigen Enhancer 50×
mit dest. H₂O auf 1 Liter auffüllen

2.4.3.1. Verwendete Primärantikörper

Smad1 (A-4) sc-7965

Der Antikörper (AK) der Firma Santa Cruz ist ein monoklonaler AK, welcher in der Maus produziert wurde. Dieser AK richtet sich gegen die AS 1-465, welche dem vollständigen humanen Smad1- Protein entsprechen. Das molekulare Gewicht des Smad1 Proteins beträgt 52-56 kDa.

Smad2/3 (C- 8) sc-133098

Der AK der Firma Santa Cruz ist ein monoklonaler AK, welcher in der Maus produziert wurde. Dieser AK richtet sich gegen die AS 1-425, welche dem gesamten humanen Smad3- Protein entsprechen. Das molekulare Gewicht der Smad2/3- Moleküle liegt bei 55- 60 kDa.

Smad4 (B- 8) sc-7966

Der AK der Firma Santa Cruz ist ein monoklonaler AK, welcher aus der Maus stammt. Dieser AK richtet sich gegen die AS 1-552 des humanen Smad4- Proteins, was dessen vollständiger Länge entspricht. Das Molekulargewicht des humanen Smad4- Proteins liegt bei 61 kDa.

TGF- β 3 (III) sc-83

Der AK der Firma Santa Cruz ist ein polykloinaler AK, welcher in der Maus produziert wurde. Dieser AK richtet sich gegen eine AS- Sequenz, welche sich am C- Terminus des humanen TGF- β 3 Proteins befindet. Das Molekulargewicht des humanen TGF- β 3 Proteins beträgt 12,5 kDa.

Tabelle 3: Immunhistochemie: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Firma/ Nummer:	Herkunft:	Verdünnung
SMAD1 (A- 4)	Santa Cruz sc-7965	Maus, IgG, monoklonal	1:100; über Nacht
SMAD2/3 (C- 8)	Santa Cruz sc-133098	Maus, IgG, monoklonal	1:50; 1 h
SMAD4 (B- 8)	Santa Cruz sc-7966	Maus, IgG, monoklonal	1:50; 1 h
TGF- β 3 (III)	Santa Cruz sc-83	Kaninchen, IgG, polyklonal	1:100; über Nacht

2.5. Western-Blot

2.5.1. Allgemein

Der Western-Blot, auch Immunoblot genannt, ist eine Methode zum gezielten Nachweis von bestimmten Proteinen in einem Proteingemisch. Vor dem eigentlichen Western-Blot muss das Proteingemisch entsprechend Größe und Ladung der Proteine aufgetrennt werden. Hierzu eignet sich die SDS PAGE Methode. Bei dieser Methode werden die zu untersuchenden Proteine per Gelelektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel durch ein

senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld, in dem die Proteine aufgrund ihrer Ladung Richtung Anode wandern, in Proteinbanden aufgetrennt. Im Anschluss werden die Proteine durch ein weiteres elektrisches Feld, welches senkrecht zu dem Polyacrylamid-Gel steht, auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran (Milipore, Darmstadt, DE) übertragen. Dies geschieht in einem mit Transferpuffer gefüllten Tank, und auch hierbei wandern die Proteine in Richtung Anode. Auf der PVDF Membran bleiben die Proteine aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen haften. Die Proteinbanden können nun mit zwei unterschiedlichen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Primärantikörper ist gegen ein bestimmtes Protein gerichtet und bindet an dieses. Anschließend wird die Membran mit einem Sekundärantikörper behandelt, der an ein Enzym gekoppelt ist, welches ein zugegebenes Substrat umsetzt, was wiederum einen Nachweis auf Fotopapier in einer Dunkelkammer erlaubt.

Im folgenden Text wird genauer auf die verschiedenen, oben genannten Abschnitte und Methoden des Western-Blots eingegangen.

2.5.2. Proteinprobenvorbereitung

Als Proteingemische wurden die aus der Zellkultur gewonnenen Zellpellets von MPCs (oben beschrieben) verwendet, welche nach der Herstellung bei -81°C eingefroren worden sind. Die Zellpellets tauten innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur auf, sodass diese unmittelbar vor der Elektrophorese in 3fach konzentriertem SDS-Probenpuffer resuspendiert werden konnten. Zuvor wurden 450 μl des 3x SDS Probenpuffers mit 50 μl β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) gemischt. Nach erfolgter Resuspension wurden diese Proben 5 min bei 95°C mittels eines Heizblocks (Thermocycler comfort, Eppendorf, Hamburg, DE) erhitzt, damit die Proteine denaturieren und somit besser aufgetrennt werden können. Die Proteine waren nun bereit für die SDS PAGE.

3 x SDS-Probenpuffer:	3,6 g	0,3 M Tris (Roth, Karlsruhe, DE)
	9 g	9% SDS (Roth, Karlsruhe, DE)
	22,5 g	22,5% Glycerin (Roth, Karlsruhe, DE)
		Spatelspitze Bromphenolblau
		vor SDS-Zugabe mit HCl auf pH 6,7 auf 100ml mit dest. H ₂ O auffüllen

2.5.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

Bevor man mit der Herstellung des Polyacrylamid-Gels beginnen konnte, mussten die beiden Glasplatten, die später durch eine Gummidichtung voneinander getrennt zusammengeklammert wurden, mit 100% Ethanol und einem Haushaltsschwamm gereinigt und von möglichen Gelresten befreit werden. Anschließend wurde die Gummidichtung auf die Glasplatte mit den Spacern gelegt und die andere Glasplatte darauf festgeklammert. Danach überprüfte man dieses Konstrukt auf die Dichte und markierte mit einem Edding 6 cm von dem unteren Rand der Glasplatte eine Trennlinie, die später die Grenze zwischen Trenngel und Sammelgel darstellen sollte. Nun konnte mit dem Zusammenpipettieren des Trenngels, entsprechend dem unten aufgelisteten Protokoll, begonnen werden. Dabei bestimmte die Konzentration des Acrylamids die Porengröße des Gels. Das Amonium-Peroxodisulfat (APS) (Roth, Karlsruhe, DE) wurde als letztes zur Lösung hinzugegeben, da diese einige Sekunden nach Zugabe beginnt sich zu polymerisieren. Nun wurde das Trenngel zwischen die zusammengeklammerten Glasplatten gegossen und anschließend vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette mit 100% Ethanol (AppliChem, Darmstadt, DE) überschichtet, um Luftblasenbildungen zu verhindern. Nach circa 15 min war das Trenngel auspolymerisiert, und das Ethanol konnte wieder abgekippt werden. Das Sammelgel wurde auch nach unten beschriebenem Protokoll zusammenpipettiert, wobei auch wieder die Zugabe von APS, aus oben genannten Gründen, als letztes erfolgte. Anschließend wurde das Sammelgel zwischen die beiden Glasplatten auf das bereits polymerisierte Trenngel gegossen. In dieses Sammelgel wurde sofort im Anschluss ein Kamm eingesetzt, welcher die späteren Probestaschen für die Proteinlösungen erstellte. Circa 45 min nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden Kamm, Klammern und Dichtungsgummi wieder entfernt. Für die Gelelektro-

phorese wurde der Nachbau einer Biometra Elektrophoresekammer verwendet. Dessen Kammern wurden mit 1x Laufpuffer befüllt und die Glasplatten mit dem Gel wurden vorsichtig eingesetzt und mit Klammern befestigt. Nun konnten die vorbereiteten Proben und die Proteinleiter (Fermentas, #SM0671) in die Taschen aufgetragen werden. Die Proteinleiter diente später zur Bestimmung des Molekulargewichts der nachgewiesenen Proteine. Das Probenvolumen betrug, abhängig von der Proteinkonzentration, zwischen 5 µl und 20 µl, die Proteinleiter wurde standardgemäß mit 4 µl aufgetragen. Zunächst wurde solange eine Stromstärke von 15 mA angelegt, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Dann wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht, bis die komplette Proteinleiter auf dem Gel zu sehen war.

Tabelle 4: Western-Blot: Gelzusammensetzungen

Trenngel 10%		Sammelgel 5%	
Trenngelpuffer	1,4 ml	Sammelgelpuffer	1,25ml
10% SDS	55 µl	10% SDS	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
Acrylamid	1,85 ml	Acrylamid	0,8 ml
H ₂ O	2,0 ml	H ₂ O	2,7 ml
10% APS	0,25 ml	10% APS	0,2 ml

Sammelgel- Puffer: 15,1 g Tris (0,25 M)
250 ml H₂O
mit HCl auf pH 6,8 einstellen

Trenngel- Puffer 45,4 g Tris (1,5 M)
250 ml dest. H₂O
mit HCl auf pH 8,9 einstellen

5x SDS Laufpuffer: 30,3 g 0,25 M Tris
142,6 g 1,9 M Glycin
0,5% SDS (50 ml 10% SDS)
mit H₂O auf 1000 ml auffüllen

2.5.4. Immunoblot (Western-Blot)

Bevor mit dem Zusammenbau der Blotkassette (PaqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) begonnen werden konnte, mussten zuerst pro Blot 6 Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf die Größe des Trenngels (9 cm x 6 cm) zurechtgeschnitten werden. Um die PVDF-Membran zu aktivieren, wurde sie für 15 Sekunden in 100% Methanol getränkt. Anschließend wurde sie mehrmals in destilliertem Wasser geschwenkt und dann zusammen mit den 6 Filterpapieren und 2 Schwämmen für mindestens 15 min in kalten Transferpuffer eingelegt. Der Zusammenbau der Blotkassette erfolgte in einer mit kaltem Transferpuffer gefüllten Schale, damit dieser möglichst luftblasenfrei gewährleistet werden konnte. Begonnen wurde der Zusammenbau an der Anodenseite mit einem Schwamm, gefolgt von 3 Filterpapieren und der PVDF-Membran. Anschließend wurde das Trenngel auf die Membran gelegt und von weiteren 3 Filterpapieren und einem Schwamm überdeckt. Nun konnte die Blotkassette geschlossen und mit Gummibändern fixiert werden. Die Blotkassette wurde in einen mit kaltem Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt. Damit die Temperatur in diesem Tank konstant kalt gehalten werden konnte, legte man einen magnetischen Rührfisch mit in den Tank und schloss die im Boden des Tanks integrierte Wasserkühlung an den Kaltwasseranschluss an. Während 90 min bei 350 mA wanderten die Proteine von dem Trenngel Richtung Anode auf die PVDF-Membran.

Transferpuffer: 6,05 g Tris (25 mM)
28,8 g Glycin (192 mM), 400 ml Methanol (20%)
mit dest. H₂O auf 2 Liter auffüllen, pH 8,3

2.5.5. Proteindetektion

Die Proteine, welche sich nun auf der PVDF-Membran befanden, wurden durch eine Commassie Brilliant-Blau-Färbung (Roth, Karlsruhe, DE) blau angefärbt. Dies geschah mit Hilfe einer kleinen Schale, in welcher die PVDF-Membran in der Färbelösung auf einer Wippe geschwenkt wurde, bis die Proteinbanden zu sehen waren. Die Entfärbelösungen, bestehend aus Methanol und Essigsäure, wurden anschließend nacheinander solange auf die Membran gegeben, bis der Hintergrund wieder entfärbt war. Anschließend konnte die

Membran eingescannt werden. Dann wurde sie 2 x 5 min mit TBS-T gewaschen um Methanol und Essigsäure von der Membran zu entfernen.

Färbelösung: 0,1 g Brilliant-Blau R250 (0,1%)
50 ml Methanol (50%)
70 ml Essigsäure (7%)
mit dest. H₂O auf 100 ml auffüllen

Entfärbelösung 1: 50 ml Methanol (50%)
7 ml Essigsäure (7%)
mit dest. H₂O auf 100 ml auffüllen

Entfärbelösung 2: 90 ml Methanol (90%)
10 ml Essigsäure (10%)
mit dest. H₂O auf 100 ml auffüllen

2.5.6. Immunmarkierung

Bevor die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert werden konnte, mussten die freien Proteinbindungsstellen mit 5% Milchlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt werden, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden. Die Milchlösung bestand aus 5% Milchpulver (Roth, Karlsruhe, DE) gelöst in TBS-T und wurde frisch angesetzt. Der Antikörper wurde gemäß der vorher durchgeführten Verdünnungsreihe und gemäß der Angaben des mitgelieferten Datenblattes in der oben beschriebenen Blocklösung verdünnt und auf die Membran aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einer Wippe bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung von der Membran entfernt, diese wurde 5 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend konnte der Sekundärantikörper, ebenfalls entsprechend mit Blocklösung verdünnt, auf die Membran aufgetragen werden. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur und der HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelte Sekundärantikörper war gegen den Wirt gerichtet, aus welchem der Primärantikörper gewonnen wurde. Danach wurde wieder 5 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Zum Nachweis der Immunmarkierung verwendeten wir das

Amersham ECL Prime Western Blotting Reagents der Firma GE Healthcare, Buckinghamshire, UK (# RPN2106). Mit Hilfe dieses Kits konnte die chemolumineszente Reaktion, zusammen mit der HRP der Sekundärantikörper, ausgelöst werden. Die in diesem Kit enthaltenen Lösungen A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min auf den Blot gegeben. Diese Reaktion musste lichtgeschützt stattfinden. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei zwischen eine Klarsichtfolie in eine Röntgenkassette gelegt. Ab nun wurde in der Dunkelkammer weitergearbeitet. Es wurde ein Röntgenfilm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) auf die Größe der Membran zurechtgeschnitten, auf die Membran gelegt und die Röntgenkassette geschlossen. Der Röntgenfilm wurde je nach Konzentration des Antikörpers und je nach Proteingehalt der Membran, zwischen 1 Sekunde und 1 Stunde in der Röntgenkassette belassen. Im Anschluss wurde der Film für circa eine Minute in eine Wanne mit Entwickler (Kodak, Rochester, USA) gelegt, anschließend kurz in Wasser gewaschen und zum Schluss für circa 10 min in einer Wanne mit Fixierer (Kodak, Rochester, USA) belassen. An der Höhe der Banden konnte man nun mit Hilfe der Proteinleiter das Molekulargewicht des gesuchten Proteins ablesen. Zudem konnte auch ein quantitativer Vergleich der verschiedenen Proben innerhalb des Blots angestellt werden.

Blocklösung (5%-ige Milch): 2,5 g Milchpulver
50 ml 1 × TBS

2.5.7. Verwendete Antikörper

Kollagen Typ I R1038

Der Kollagen Typ I AK R1038 der Firma Acris ist ein polyklonaler AK, welcher aus einem Kaninchen stammt. Dieser AK richtet sich sowohl gegen humanes Alpha- 1 Typ I Kollagen, als auch gegen humanes Alpha- 2 Typ I Kollagen.

Kollagen Typ II CIICI

Der Kollagen Typ II AK CIICI ist ein monoklonaler IgG2a AK, welcher aus der Maus stammt. Hergestellt wurde dieser von R. Holmdahl und K. Rubin, Uppsala, Schweden, welche den AK über die Hybridoma Bank zur Verfügung stellten. Dieser AK richtet sich

zum einen gegen Kollagen Typ II aus humanen Gewebe und zum anderen auch gegen Kollagen Typ II der Spezien: Rind, Maus, Ratte, Huhn und Xenopus.

Tabelle 5: Western-Blot: Verwendete Primärantikörper

Name:	Firma/ Nummer:	Herkunft:	Verdünnung:
SMAD1 (A- 4)	Santa Cruz sc-7965	Maus, IgG, monoklonal	1:500, über Nacht
SMAD2/3 (C- 8)	Santa Cruz sc-133098	Maus, IgG, monoklonal	1:500; über Nacht
SMAD4 (B- 8)	Santa Cruz sc-7966	Maus, IgG, monoklonal	1:500; über Nacht
Kollagen Typ I	Acris R1038	Kaninchen, polyklonal	1:1000; über Nacht
Kollagen Typ II (CIIIC)	Hybridoma bank, Rikard Holmdahl, Uppsala, Schweden	Maus, IgG2a, kappa - Leichtkette, monoklonal	1:1000; über Nacht

Tabelle 6: Western-Blot: Verwendete Sekundärantikörper

Name:	Firma/ Nummer:	Herkunft:	Verdünnung:
A9917 Ziege-anti- Maus IgG	Sigma- Aldrich A9917	Ziege, IgG, anti- Maus, Peroxidase gekoppelt	1:40000
A0545 Ziege-anti- Kaninchen IgG	Sigma - Aldrich A0545	Ziege, IgG, anti- Kaninchen, Peroxidase gekoppelt	1:100000

2.6. RNA-Isolation aus primären Zellen

Die Zellen für die RNA (Ribonukleinsäure)- Isolation wurden entweder direkt aus einer Zellkulturflasche geerntet oder, wenn die RNA-Isolation zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen sollte, bei -80°C als Zellpellet eingefroren und zum Zeitpunkt der Isolation wieder aufgetaut. Zur RNA- Isolation wurde ein Kit der Firma Qiagen verwendet (Qiagen RNeasy Minikit Cat. No.74106). Die Zellen befanden sich in Form eines Zellpellets in einem 1,5 ml Eppendorfcup. In dieses wurden 350 µl RLT Puffer und 3,5 µl Beta- Mercaptoethanol direkt auf die Zellen pipettiert. Das Medium musste zuvor vollständig entfernt worden sein, damit die Zellysis nicht inhibiert wurde. Der verwendete RLT Puffer enthielt Thiocyanat, welches für die Inaktivierung der RNAsen verantwortlich war. Die Lösung, die sich nun in dem 1,5ml Eppendorfcup befand, wurde nach dem Vortexen für 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend auf eine Qiagen Shredder Säule pipettiert. Danach folgte eine 2- minütige Zentrifugation bei *full speed*, sodass sich im Durchfluss die RNA befand und der Zellschrott in der Säule verblieb. Die Säule mit dem Zellschrott wurde verworfen. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt und auf eine RNeasy- Minisäule gegeben. Danach wurde für 30 Sekunden mit 10000 rpm zentrifugiert. Hierbei wurde die RNA an der Silikatmembran der RNeasy Minisäule gebunden, wodurch sie sich gut aufreinigen ließ. Nach der Zentrifugation wurde diesmal der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die Probe mit 700 µl RW1 Puffer versetzt und 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Wieder verwarf man den Durchfluss. Darauf folgte das Aufreinigen durch das Hinzufügen von 500 µl RPE Puffer und das wiederholte 30 sekundige Zentrifugieren bei 10000 rpm. Dieser Schritt erfolgte zweimal hintereinander. Nun wurde die Säule mit der RNA auf ein Biopur 1,5ml Eppendorfcup gesteckt, 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das RNase freie Wasser sorgte für die Ablösung der RNA von der Membran. Im Anschluss wurde eine Minute bei *full speed* zentrifugiert, sodass sich nun die DNA im Durchfluss befand. Die Konzentration der mRNA konnte nun mit Hilfe eines Nanodrop 1000 Spectrometers (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) bestimmt werden.

2.7. Synthese von cDNA

Um mit Hilfe der PCR Methode den Grad der Genexpression bestimmen zu können, musste die gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde das quantiTect Reverse Transcription Kit (Cat.No. 205313) der Firma Qiagen verwendet. Während des gesamten Umschreibens wurde auf Eis gearbeitet, um eine Degradierung der mRNA zu vermeiden. Zunächst wurde die mRNA bei 42°C für 2 min in einem *genomic DNA wipeout buffer* inkubiert, welcher DNasen enthielt. Dadurch wurden die möglicherweise vorhandene restliche genomische DNA eliminiert. Im Anschluss wurde die mRNA mit einem Mastermix, bestehend aus Transkriptionspuffer, Transkriptase und Primermix für 15 min bei 42°C inkubiert. Bei diesem Schritt wurde die mRNA zu cDNA umgeschrieben. Danach wurde die Probe für 3 min auf 95°C erhitzt, wodurch sich die Stränge wieder lösten und die reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Um am Ende eine Konzentration von 1ng/µl zu erhalten, wurde die cDNA je nach Konzentration mit RNase freiem Wasser verdünnt. Dabei geht man davon aus, dass die Umschreibung von mRNA zu cDNA im Verhältnis 1:1 stattfindet.

2.8. Quantitative real-time- Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

2.8.1. Allgemeines zur Methode

Die quantitative real-time- PCR (qRT-PCR) dient zur Amplifikation und Quantifizierung von bestimmten Nukleinsäuresequenzen, wodurch z.B. der Grad einer Genexpression bestimmt werden kann. Die Durchführung der PCR geschieht mit Hilfe einer hitzestabilen Taq-Polymerase und eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green). Das Enzym Taq-Polymerase ist sehr hitzebeständig und wird deswegen für die PCR verwendet, bei welcher teilweise Temperaturen von 95°C entstehen. Die PCR gliedert sich in drei unterschiedliche, sich wiederholende Phasen:

1. Die DNA wird bei 95°C in Einzelstränge denaturiert
2. Es folgt die Anlagerung der Primer an die DNA (*Annealing*)
3. Synthetisierung der Komplementärstränge durch die Taq-Polymerase und Anlagerung des SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoffes

Der gesamte Verlauf der PCR findet in einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, DE) statt. Die drei Phasen wiederholen sich bis zu 45 mal, wobei sich theoretisch die DNA bei jedem Zyklus verdoppelt und sich somit auch der Einbau des SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoffes erhöht. Anhand dieses Farbstoffes kann die Amplifizierung quantifiziert werden, indem ein von dem PCR Programm festgelegter Schwellenwert überschritten wird. Der Zyklus, bei dem dieser Schwellenwert überschritten wird, gibt den ct-Wert (*threshold cycle*) an. Da durch den Einbau von SYBR-Green in die DNA die Fluoreszenz proportional zu der Anzahl der eingesetzten DNA Molekülen ist, können mit Hilfe des ct-Wertes Rückschlüsse über die DNA Menge des Zielgens gezogen werden. Je größer nun die DNA-Menge des gesuchten Zielgens ist, desto früher wird der Schwellenwert erreicht und desto kleiner ist der ct-Wert und umgekehrt. Dies bedeutet, dass ein reziproker Zusammenhang zwischen dem ct-Wert und der Menge an DNA des Zielgens besteht. Im Anschluss an diese 3 Phasen folgt die Schmelzkurve. Anhand der Schmelzkurve kann man erkennen, ob es sich ausschließlich um das gesuchte Gen handelt oder ob neben diesem noch zusätzliche nicht erwünschte Produkte wie z.B. Primer Dimere vorhanden sind.

2.8.2. RT-PCR-Protokoll

Für die PCR-Methode wurde das HotStar Taq DNA Polymerase Kit von der Firma Qiagen verwendet. Zu Beginn wurde ein Master-Mix-Ansatz in einem 1,5 ml Eppendorfcup zusammenpipettiert, von welchem später 9 µl in jedes Well gegeben wurden. Dieser Master-Mix-Ansatz bestand aus 5 µl SYBR-Green (Invitrogen, Carlsbad, USA), welches die Polymerase, die dNTP (10mM) und den 10fach PCR Puffer (15mM MGCl₂) enthielt, 2 µl RNase freiem Wasser und 2 µl Primermix, (10 pmol/µl/Primer) bestehend aus forward und reverse Primer. Um eventuelle Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, wurde immer ein Ansatz mehr angesetzt als eigentlich benötigt. Als nächstes wurde eine PCR-96-Well-Platte (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) mit einer Microseal B Adhesive Folie (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) überklebt und nur diejenigen Wells mit einem Skalpell freigeschnitten, die für die PCR benötigt wurden. Nun wurden von dem Master-Mix-Ansatz jeweils 9 µl in jedes zuvor freigeschnittene Well pipettiert. Danach wurde zusätzlich jeweils 1 µl der zu untersuchenden cDNA in die freigeschnittenen Wells

pipettiert, sodass sich nun insgesamt 10 µl (9 µl Master-Mix + 1 µl cDNA) in jedem Well befanden.

Tabelle 7: PCR: Pipettierschema des Master-Mix-Ansatzes

Mastermix pro Well:	Menge in µl:
SYBR-Green	5 µl
Primer (forward/ reverse)	2 µl (je 20 pmol)
RNase freies H ₂ O	2 µl
Totalvolumen:	9 µl

Im Anschluss wurden die freigeschnittenen Wells mit Optical Flat Caps (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE) verschlossen und kurz abzentrifugiert, wodurch gewährleistet war, dass sich der komplette Ansatz am Boden jedes Wells befand. Nun konnte die 96 Well- Platte in einem Mastercycler-Gerät der Firma Eppendorf platziert werden. Drei Mal wurde die RT-PCR mit dreifachen Ansätzen und folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 8: RT-PCR-Protokoll

Phase	Temp.	Zeit	Zyklen
Initiale Aktivierung	95 °C	5 Minuten	
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	
Annealing	53-59 °C	15 Sekunden	45 ×
Elongation	72 °C	20 Sekunden	
Finale Extension	72 °C	10 Minuten	
Schmelzkurve	Ann.-Temp. -1 °C bis 95 °C in 0,2 °C Schritten	15 Sekunden je 8 Sekunden	

2.8.3. Statistik/ Pfaffl

Die relative Quantifizierung und Normalisierung der gewonnenen PCR-Daten erfolgte nach der Pfaffl-Methode, bei welcher ein Housekeeping-Gen als Referenzgen diente. Housekeeping-Gene werden im Vergleich zu anderen Genen in allen Geweben des Körper exprimiert und weisen idealerweise, jeweils spezifisch für ein bestimmtes Gewebe, zu jedem Zeitpunkt eine konstante Expression auf. Diese Gene unterliegen keinen internen oder externen regulatorischen Einflüssen. Die gewonnenen PCR-Daten wurden gegen die cDNA von chondrogenen Progenitorzellen (CPC) mittels des Housekeeping-Gens $\beta 2$ Mikro ($\beta 2M$) nach Pfaffl 2001 normalisiert. $\beta 2M$ zeigte in den zu untersuchenden Proben eine zeitlich unabhängige konstante Expression und wurde deswegen als Housekeeping-Gen verwendet.

Um die Effizienz der PCR bestimmen zu können wurde eine Standardkurve für $\beta 2M$ durch eine Verdünnungsreihe erstellt. Als Standard cDNA wurde die cDNA von MPCs in einer Konzentration von 1ng/ μ l verwendet und in 1:10 Verdünnungsschritten bis 1:1000 verdünnt, unter Verwendung des oben beschriebenen 10 μ l PCR-Ansatzes. Die Berechnung der Ratio wird durch den Vergleich der Proben ermittelt. Der relative Expressionsunterschied zwischen dem Housekeeping-Gen zur Referenzprobe, normalisiert durch das Referenzgen $\beta 2M$ wurde aus der arithmetischen Formel: $E^{-\Delta\Delta CT}$ (E= Effizienz der PCR) berechnet.

Die Effizienz von dem Referenzgen $\beta 2M$ lag bei einem Wert von 1,89. Dadurch ergab sich die Formel $1,89^{-\Delta\Delta CT}$ für die Errechnung der Ratio.

2.8.4. Primerdesign

Die für die RT-PCR erforderlichen Primer wurden mit Hilfe der Software primer3 designed. Bei dem Programm primer3 wurde bei der Auswahl der entsprechenden Primersequenzen darauf geachtet, dass diese eine maximale Länge von 18-23 Basen besaßen und der Guanin- und Cytosinegehalt zwischen 40% und 60% betrug. Anschließend wurde die designte Primersequenz mit der NCBI Blast Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) überprüft, um *Alignments* ausschließen zu können. Sofern keine *Alignments* vorlagen,

wurden die spezifischen Sequenzen zu der Firma Operon Biotechnologie GmbH (Köln, Deutschland) geschickt, welche die Primer synthetisierten und an uns verschickten. Diese Primer wurden von uns entsprechend der Herstellerangabe in RNase freiem Wasser resuspendiert und bei -21°C aufbewahrt.

2.8.5. Gradienten-PCR

Um die spezifische Annealing-Temperatur für die Primer zu ermitteln wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Die spezifische *Annealing*-Temperatur ist wichtig für eine optimale Anlagerung des Primers an die komplementäre cDNA und somit für einen reibungslosen PCR-Ablauf verantwortlich. Bei der Gradienten-PCR wurde für jeden Primer und jede Temperatur ein identischer 10µl Ansatz in das Well pipettiert, welcher unten aufgeführt ist. Bei der verwendeten cDNA handelte es sich um cDNA aus MPCs in einer Konzentration von 1ng/µl. Die verschiedenen Temperaturen, die bei der Gradienten-PCR durchlaufen wurden, lagen bei 52°C, 52,2°C, 53,1°C, 54,6°C, 56,4°C, 58,5°C, 60,7°C, 62,9°C, 64,9°C, 66,6°C, 67,8°C und 68,5°C. Der Pipettieransatz für die Gradienten-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 9: Gradienten-PCR: Pipettieransatz der Gradienten-PCR

Ansatz pro Well:	Menge in µl:
Primermix (forward/ reverse)	2 µl
SYBR-Green	5 µl
RNase freies H ₂ O	2 µl
cDNA	1 µl
Totalvolumen:	10 µl

Die Gradienten-PCR wurde mit Hilfe eines Mastercycler Gerätes der Firma Eppendorf (Hamburg, DE) durchgeführt. Dabei wurde folgendes Protokoll für die Gradienten-PCR verwendet:

Tabelle 10: Gradienten-PCR-Protokoll

Phase	Temp.	Zeit	Zyklen
Initiale Aktivierung	95 °C	5 Minuten	
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	
Annealing	unterschiedlich ¹	15 Sekunden	45 ×
Elongation	72 °C	20 Sekunden	
Finale Extension	72 °C	10 Minuten	
Schmelzkurve	Ann.-Temp. -1 °C bis 95 °C in 0,2 °C Schritten	15 Sekunden je 8 Sekunden	

¹ (siehe 2.8.5.)

Die Temperatur mit der der höchsten Extinktion, d.h. welche den höchsten schlanken Peak in der Schmelzkurve aufwies, wurde als *Annealing*-Temperatur für den Primer gewählt. Um die Spezifität der Primer zu bestimmen, wurden diese zusammen mit dem PCR-Produkt zur Sequenzierung zu der Firma Sequence Laboratories in Göttingen geschickt. Dort wurde eine Sequenzierung nach der Methode von Sanger durchgeführt und das Ergebnis an uns weitergeleitet. Diese übermittelten Nukleotidsequenzen wurden nochmals mit Hilfe des Blastprogramms der Homepage <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> abgeglichen, und es wurde überprüft, ob das PCR-Produkt dem gesuchten Zielgen entsprach. Sofern dies der Fall war, konnten die Primer für PCR-Untersuchungen benutzt werden.

2.8.6. Verwendete Primer

Tabelle 11: PCR: Verwendete Primer

Zielgen:	Forward Primer 5' → 3'	Reverse Primer 5' → 3'	Annealing- Temperatur
SMAD1	tcttcagagccaccatgaactaa	aaccagcacaggaggaagtacag	55,5 °C
SMAD2	gtctcttgatggtcgtctcca	ttctgtaggatctcgggtgtgc	53,1 °C
SMAD3	ccatcctgcctttcactc	tggtgatgcacttggtgt	56 °C
SMAD4	gcacaaggttggttgctaaga	gcagaacagtgagacattaggtag ag	53,1 °C

2.9. Lichtmikroskopische Immunfluoreszenz/ Immunzytochemie

2.9.1. Allgemeines zur Methode

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, die besonders gut zum Nachweis von intrazellulären Proteinen und Membranproteinen geeignet ist. Die gesuchten Proteine können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, sichtbar gemacht werden. Der Nachweis basiert auf einer Antigen-Antikörperreaktion, bei welcher es zu einer spezifischen Bindung zwischen Antikörper und dem entsprechendem Epitop des Antigens kommt. Bei den durchgeführten Versuchen erfolgte der Proteinnachweis über die indirekte Immunfluoreszenz, d.h. der Antikörper-Antigen-Komplex wurde mit Hilfe eines Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Dieser Sekundärantikörper war mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und richtete sich gegen den Antigen-Antikörper-Komplex. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes kann man unter UV-Licht die Fluoreszenz innerhalb des Gewebes bzw. der Zellen beurteilen. Dabei verhält sich die Fluoreszenz proportional zu der Konzentration des gesuchten Proteins.

2.9.2. Protokoll der lichtmikroskopischen Immunfluoreszenz

Die Methode der lichtmikroskopischen Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Signalproteine Smad1, Smad2, Smad3 und Smad4 in MPCs nachzuweisen und deren Lokalisation innerhalb der Zelle genauer zu beschreiben. Die MPCs wurden zuvor, wie oben beschrieben, in Zellkulturflaschen angezchtet, geerntet und gezählt. Es wurde eine 24 Well Platte vorbereitet, indem ein steriles Deckgläschen (DG) (12mm Durchmesser) mit Hilfe einer sterilen Pinzette in jedes Well gelegt wurde. Auf diese DGs wurden nun 5000 Zellen pro Well, resuspendiert in 1 ml DMEM aufgetragen und für 5 Tage in einem Brutschrank bei 37°C kultiviert. Sobald die Zellen konfluent auf den DGs gewachsen waren, wurde das Nährmedium abgesaugt und zunächst zweimal mit je 100 µl PBS pro Well gewaschen. Das Absaugen von Wasch- und Inkubationslösungen erfolgte mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe. Um die Zellen zu fixieren, wurde jedes Deckglas für 15 min in 250 µl 2% Paraformaldehyd (Roth, Karlsruhe, DE) in PBS inkubiert. Danach wurde zweimal mit 100 µl PBS pro DG gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch das Inkubieren der DGs mit 250 µl 0,25% Triton-X100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) in PBS für 10 min. Durch zweimaliges Waschen mit 100 µl PBS pro DG wurde das Triton-X100 wieder entfernt. Nun konnte für 15 min mit 250 µl 1% BSA/ PBS pro DG geblockt werden, um die Spezifität des primären Antikörpers zu erhöhen. Im Anschluss wurden die DGs mit 200 µl Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 mit BSA/ PBS für 60 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Auf die Negativkontrollen wurde für diese Zeit 200 µl 1% BSA/ PBS pipettiert. Diese Negativkontrollen dienen zur Überprüfung der Spezifität der Sekundärantikörper. Danach wurde wieder zweimal mit 100 µl PBS pro DG gewaschen. Nach den Waschsritten konnten die DGs nun für 30 min bei 37 °C in dem Brutschrank mit den Sekundärantikörpern inkubiert werden. Diese Sekundärantikörper wurden in einer Konzentration von 1:100 auf alle DGs aufgetragen und waren mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt. Entweder mit dem Marker FITC (grün) oder dem Marker Dylight 549 (grün). Nach einem zweimaligen Waschschrift mit 100 µl PBS folgte für 5 min die Inkubation mit 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) der Firma KPL (Gaithersburg, USA). Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde zuvor 1:1000 mit destilliertem H₂O verdünnt und diente der Markierung des Nukleus. Im Anschluss erfolgte nun das Eindeckeln. Dafür wurden 10

µl Fluorescence Mounting Medium (Eindeckmedium) der Firma DAKO (Carpinteria, USA) auf einen Objektträger getropft und ein DG mit der zellbehafteten Seite nach unten auf den Objektträger gedrückt. Das überschüssige Eindeckmedium wurde abgesaugt. Nun konnten die Zellen auf dem Objektträger fotografiert werden oder in einer Dunkelkammer bei 4°C in einem Kühlschrank aufbewahrt werden. Zum Fotografieren der Zellen wurde eine Nikon D90 (Tokyo, JPN) verwendet.

2.9.2.1. Verwendete Antikörper

Tabelle 12: Immunzytochemie: Primäre Antikörper

Name:	Firma/ Nummer:	Herkunft:	Verdünnung:
SMAD1 (A- 4)	Santa Cruz sc-7965	Maus, IgG, monoklonal	1:50; 1h
SMAD2/3 (C- 8)	Santa Cruz sc-133098	Maus, IgG, monoklonal	1:50; 1h
SMAD4 (C- 20)	Santa Cruz sc-1909	Ziege, IgG ,polyklonal	1:50; 1h

Tabelle 13: Immunzytochemie: Senkundäre Antikörper

Name:	Firma/ Nummer:	Herkunft:	Verdünnung:
DyLight 488	KPL DyLight 488	Kaninchen, IgG, anti- Ziege	1:100, 30 min
Anti- Maus IgG, FITC gekoppelt	KPL 202-1806	Ziege, IgG, anti- Maus	1:100, 30 min

2.10. Überexpression von Smad1, Smad2 und Smad4

2.10.1. Allgemeines zur Methode

Unter Überexpression versteht man eine deutlich über der Norm liegende Expression eines bestimmten Gens innerhalb einer Zelle. Daraus resultiert in der Regel eine vermehrte Synthese des Proteins, für welches das überexprimierte Gen codiert. Die Methode der Überexpression dient dazu, das entstandene Protein bezüglich seiner Auswirkungen auf die Zelle bzw. auf den Organismus zu untersuchen. Um eine solche Überexpression in Zellen zu erreichen, benötigt man einen Vektor/ Plasmid, in welchem die gewünschte Gensequenz eingebaut ist, kompetente Bakterien, die den Vektor aufnehmen und vervielfältigen, und Zellen, in denen nach der Transfektion das gewünschte Gen überexprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Überexpression verwendet, um die Auswirkungen der Smad-Signalmoleküle 1,2 und 4 auf die Regenerationsprozesse von MPCs genauer zu untersuchen. Bevor mit der Transfektion des Vektors in die MPCs begonnen werden konnte, musste zuerst das Plasmid, welches die Gensequenz des gewünschten Gens beinhaltet, in ausreichender Menge vorhanden sein. Um dies zu gewährleisten, wurde das Plasmid, welches sich in DH5 α -Bakterien befand, über Nacht durch diese vervielfältigt. Anschließend wurde es über Säulen aus den Bakterien isoliert und stand nun in ausreichender Menge für die Transfektion zur Verfügung. Dieses Plasmid konnte per Transfektion in die MPCs eingebracht werden. Ab sofort erfolgte in den MPCs, unabhängig von dem Restzyklus, die Genexpression der jeweiligen Smad-Signalproteine.

2.10.2. Klonierung der Expressionsvektoren

Die Expressionsvektoren/ Plasmide, mit den jeweiligen Inserts für Smad1, Smad2 und Smad4, wurden über die Onlineplasmidbank Addgene bestellt. Für die Überexpressionsexperimente in dieser Arbeit wurden die Plasmide pCMV5 Flag-Smad1 (#14044), pCMV5B-HA-Smad2 (#11734) und pcDNA Flag-Smad4M verwendet. Abbildung 8 zeigt die Vektorkarten der Vektoren pCMV5 und pcDNA3.1(+). Die gelieferten Plasmide befanden sich bereits in DH5 α -Bakterien auf Agar. Mit Hilfe eines spitzen Holzspatels

wurden die Bakterien aus dem Agarmedium gepickt und zusammen mit LB-Medium, welches im Verhältnis 1:1000 mit Ampicillin versetzt war, bei 37°C und 180 rpm über Nacht in einem Schikanekolben inkubiert. Während dieses Zeitraums wurde das Plasmid von den Bakterien vervielfältigt. Im Anschluss wurde für 15 min bei 4°C mit 6000g zentrifugiert, sodass danach das Plasmid aus dem Bakterienpellet isoliert werden konnte.

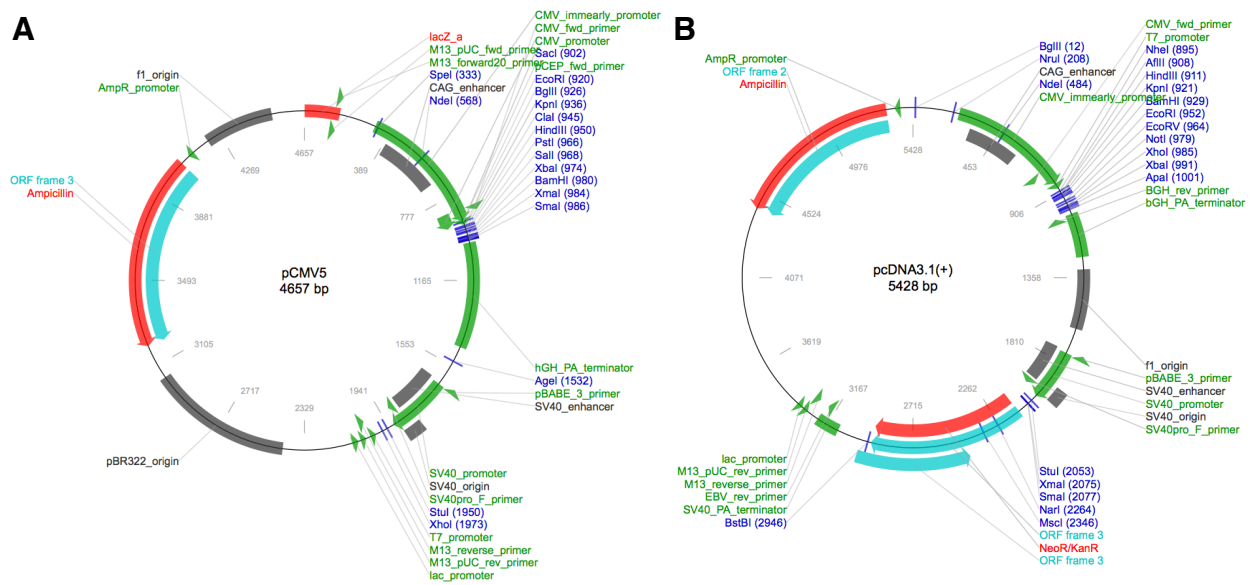


Abbildung 8: Vektorkarten der Vektoren pCMV5 (A) und pcDNA3.1(+) (B)

2.10.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* DH5 α

Die Plasmidisolation aus den Bakterien erfolgte mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kits (Ca. No. 12362) der Firma Qiagen. Zunächst wurde das Bakterienpellet in 10 ml des Puffer P1 komplett resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml des Puffer P2 wurde der Ansatz 4-6 mal geschwenkt, gefolgt von einer 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 10 ml des Puffers P3 hinzupipettiert, und die Lösung wurde durch mehrmaliges Schwenken gemischt. Das nun entstandene Lysat wurde in eine QIAfilter Cartridge Säule überführt. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde

der zugehörige Stempel in die Säule eingesetzt und das Zellysat in ein 50 ml Falcon Tube gefiltert. Danach wurden dem Lysat 2,5 ml des ER Puffers zugeführt. Diese Lösung wurde durch vorsichtiges Drehen gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Nach zuvoriger Equilibrierung der Qiagen-tip 500 mit 10ml QBT- Puffer konnte das Zellysat auf die Qiagen-tip aufgetragen werden. Nachdem das Zellysat mit Hilfe der Schwerkraft das Qiagen-tip durchlaufen hatte, wurde dieses zweimal mit jeweils 30 ml QC Puffer gewaschen. Es folgte die Eluierung der Plasmid-DNA mit 15 ml QN Puffer in einem Reagenzglas. Zum Konzentrieren der eluierten Plasmid-DNA wurde diese mit 10,5 ml Isopropanol versetzt, für 30 min bei 4°C mit 15000g zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte das Trocknen des Pellets für 15 min an der Luft. Zum Schluss wurde dieses in 110 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Nun stand die Plasmid-DNA für die Transfektion in MPCs zur Verfügung.

Zur Überprüfung der Gensequenz des gekauften Plasmids wurde eine Probe der eluierten Plasmid-DNA zum Sequenzieren an die Firma SeqLab in Göttingen geschickt. Die von SeqLab ermittelte Nukleotidsequenz wurde mit Hilfe des NCBI-Blast-Programms mit einer Online Datenbank abgeglichen. Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich um die gewünschten Inserts handelte.

2.10.4. Transfektion von MPCs mit den Expressionsvektoren

Die Transfektion der Plasmide (siehe 2.10.2) in MPCs erfolgte mit Hilfe des Amaxa Human MSC Nucleofector Kit (Cat. No. VPE-1001) der Firma Lonza. Zunächst wurde eine 6 Well Platte vorbereitet, indem jeweils 1 ml DMEM Nährmedium in jedes Well pipettiert wurde. Nachdem 2,25 ml Human Chondrocyt Nucleofactor Solution und 500 µl Supplement1 Lösung aus dem Lonza Kit zusammenpipettiert worden waren, konnte das Zellpellet, welches aus MPCs bestand, in dieser Lösung resuspendiert werden. In diesen Ansatz wurde 1 µl der jeweiligen Plasmid-DNA zugegeben. Anschließend erfolgte die luftblasenfreie Überführung des gesamten Ansatzes in eine Küvette (Lonza), welche für das Elektroporationsgerät Nucleofektor II der Firma Amaxa biosystems geeignet war. Diese Küvette wurde in das Elektroporationsgerät eingesetzt, und die Elektroporation konnte gestartet werden. Im Anschluss wurden zusätzlich 500 µl DMEM in die Küvette pipettiert,

der gesamte Ansatz mit Hilfe einer sterilen Pipette aufgezogen und tröpfchenweise in die vorbereiteten Wells gegeben. Nachdem alle Wells mit transfizierten Zellen bedeckt waren, wurde die 6 Well Platte für 48 Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des DMEM Nährmediums. 48 Stunden nach der Transfektion konnten die transfizierten Zellen geerntet werden und standen nun zur weiteren molekularen Untersuchung bereit.

Zusätzlich erfolgte eine Positivkontrolle mit Hilfe des Plasmids pMax-GFP der Firma Lonza, welches für das *green fluorescent protein* (GFP) codiert. Dieses Plasmid wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise in die MPCs transfiziert. Bei erfolgreicher Transfektion exprimierte die Zelle dieses Protein, welches unter UV-Licht grün leuchtete. Somit konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops der Erfolg der Transfektion beurteilt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis auf Gewebeebene: Immunhistochemie

3.1.1. Beispiel für einen histologischen Schnitt eines gering erkrankten Meniskus

Die Abbildung 9 zeigt einen histologischen, vertikalen Schnitt eines gering erkrankten Meniskus, welcher mit Hilfe der H.E-Färbung angefärbt wurde. In der Übersicht (A) ist die Keilform des Meniskus gut zu erkennen. In der superfizialen Zone dieses geringfügig erkrankten Meniskusgewebes sind die abgeflachten Superfizialschichtzellen deutlich dargestellt. Die innere Zone des Meniskus (C) beherbergt die runden Chondrozyt-ähnlichen Zellen, welche von einer homogenen Matrix umgeben sind, die keinerlei Degenerationszeichen aufweist.

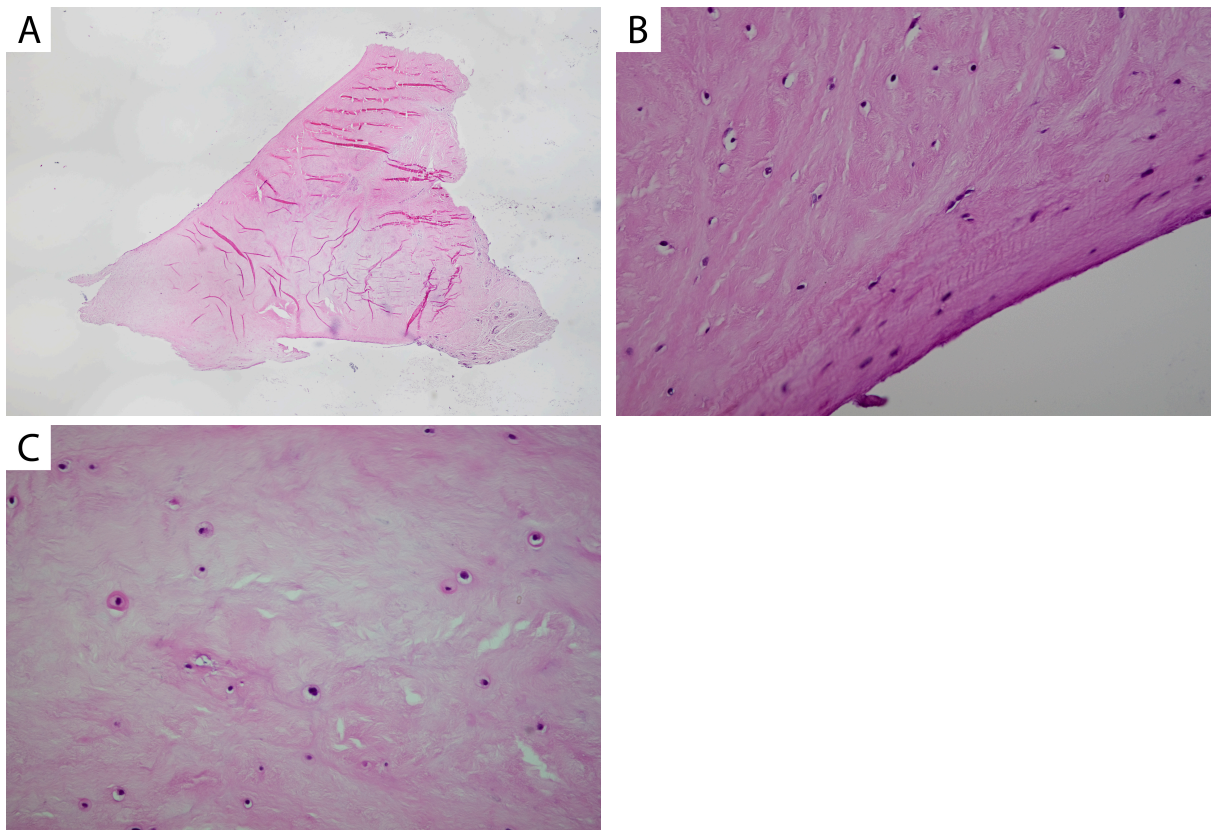


Abbildung 9: Histologische Darstellung eines geringfügig erkrankten Meniskus in der H.E-Färbung.

A) Übersicht über gesamten Meniskus, B) Superfiziale Zone, C) Innere Zone, B) und C) 40-fache Vergrößerung.

3.1.2. Beispiel für einen histologischen Schnitt eines hoch erkrankten Meniskus

In der Abbildung 10 ist ein hochgradig erkrankter, H.E gefärbter Meniskus histologisch dargestellt. Dieser histologische Schnitt wurde durch eine vertikale Schnittführung innerhalb des Korpusbereiches eines Meniskus erreicht. In der Übersicht (A) ist eine Keilform des Meniskus zu erkennen. Die superfiziale Zone (B) ist degeneriert, und die Chondrozyt-ähnlichen-Zellen sind die überwiegende Zellart. Die innere Zone ist gekennzeichnet durch diverse Degenerationszeichen, wie z.B Kalzifizierungen (C) oder Cluster-Bildungen (D).

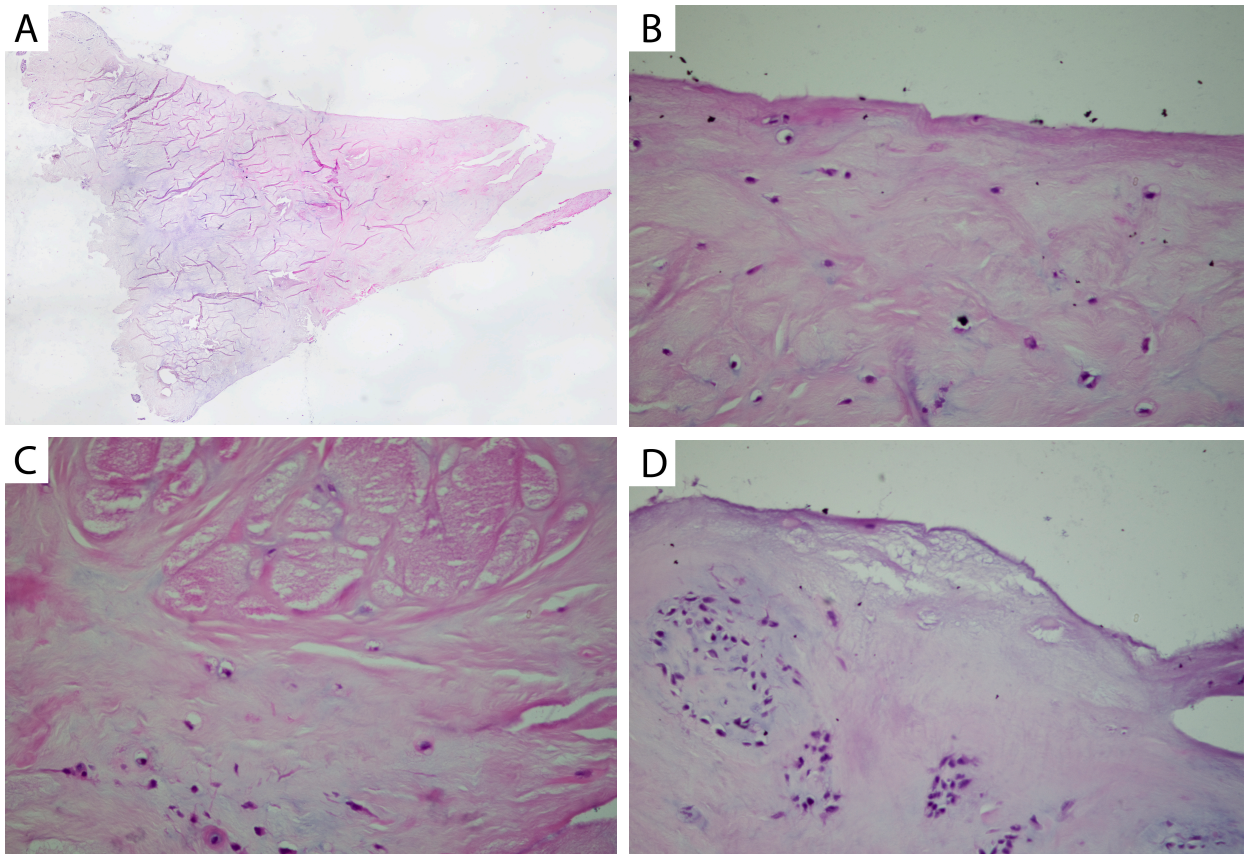


Abbildung 10: Histologische Darstellung hochgradig erkrankten Meniskusgewebes in der H.E-Färbung.

A) Übersicht über gesamten Meniskus, B) Superfizielle Zone, C) Innere Zone, Kalzifizierung, D) Superfizielle Zone, Cluster Bildung. B)-D) 40-fache Vergrößerung.

3.1.3. Nachweis und Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle auf Gewebeebene

Die Abbildung 11 zeigt die Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle innerhalb des hochgradig erkrankten Meniskusgewebes. In der Übersicht (A) ist die Degeneration des Gewebes und besonders der superfizialen Schicht zu erkennen. Die rot angefärbten Zellen zeigen die intrazelluläre Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle. Diese sind sowohl in der nahezu komplett degenerierten superfizialen Zone (B) als auch in der inneren Zone (C) vorhanden. Das Vorliegen der o.g. Moleküle, innerhalb geringgradig erkrankten Meniskusgewebes, konnte nicht nachgewiesen werden.

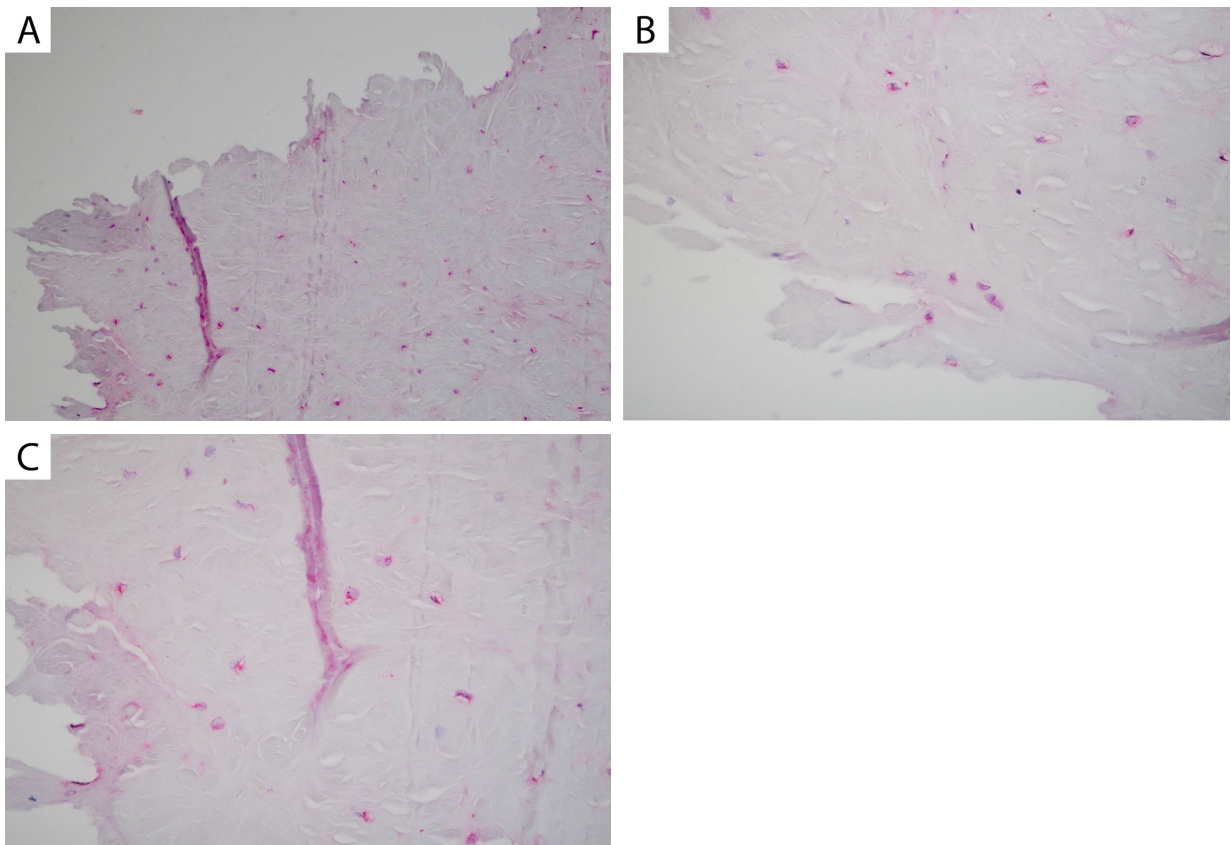


Abbildung 11: Immunhistologischer Nachweis von Smad1- Signalmolekülen in hochgradig erkranktem Meniskusgewebe.

A) Übersicht, hoch erkrankter Meniskus, 10fache Vergrößerung, Smad1 AK, B) Superfiziale Zone, Smad1 AK, C) Innere Zone, Smad1 AK, B) und C) 40-fache Vergrößerung.

3.1.4. Nachweis und Lokalisation der Smad2- und Smad3- Moleküle auf Gewebeebene

In der Abbildung 12 ist die Lokalisation der Smad2- und Smad3- Signalmoleküle innerhalb geringgradig erkrankten Meniskusgewebes (A, B, C) und innerhalb hochgradig erkrankten Meniskusgewebes (D, E, F) dargestellt.

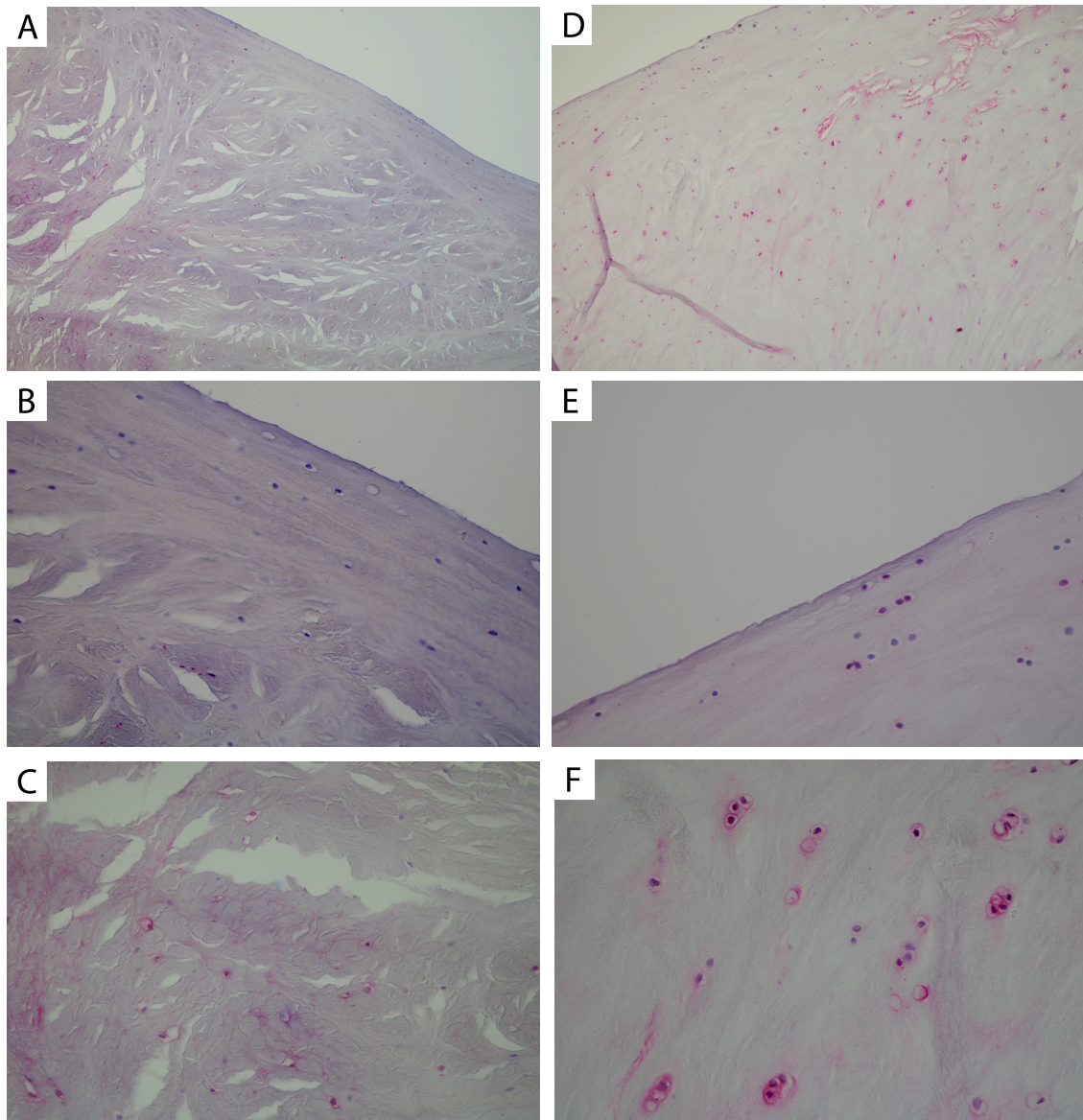


Abbildung 12: Immunhistologischer Nachweis von Smad2- und Smad3- Signalmolekülen in verschiedenen Zonen innerhalb von hochgradig- und geringgradig erkranktem Meniskusgewebe

A) Übersicht, gering erkrankter Meniskus, Smad2/3 AK, B) Superfizielle Zone, gering erkrankter Meniskus, Smad2/3 AK, C) Innere Zone, gering erkrankter Meniskus, Smad2/3 AK, D) Übersicht, hoch erkrankter Meniskus, Smad2/3 AK, E) Superfizielle Zone, hoch erkrankter Meniskus, Smad2/3 AK, F) Innere Zone, hoch erkrankter Meniskus, Smad2/3 AK, A) und D) 10-fache Vergrößerung, B), C), E) und F) 40-fache Vergrößerung.

Die Zellen der superfizialen Zone des gering erkrankten Gewebes (B) zeigen keine Färbung, wohingegen die Zellen der inneren Zone des gleichen Gewebes (C) angefärbt sind und somit Smad2 und Smad3 beinhalten. In dem hochgradig erkrankten Gewebe ist die superfiziale Schicht degeneriert (D, E), sodass auch oberflächlich Chondrozyt-ähnliche Zellen zu erkennen sind (E). Diese Zellen, welche sich sowohl oberflächlich (E), als auch in der inneren Zone (F) befinden, sind positiv angefärbt, was bedeutet, dass sie die Signalmoleküle Smad2 und Smad3 beinhalten. Zusätzlich zeigt Bild F, dass sich die Chondrozyt-ähnlichen Zellen, welche die o.g. Signalmoleküle beinhalten, zu *Clustern* zusammenlagern. Dieses Phänomen zeigt sich hingegen in der inneren Zone des geringgradig erkrankten Gewebes (C) nicht.

3.1.5. Nachweis und Lokalisation der Smad4- Moleküle auf Gewebeebene

Die Abbildung 13 zeigt zum einen die Lokalisation der Smad4- Signalmoleküle innerhalb von gering erkranktem Meniskusgewebe (A, B), und zum anderen deren Verteilung innerhalb von hochgradig erkranktem Meniskusgewebe. Die Chondrozyt-ähnlichen Zellen der inneren Zonen sind sowohl im geringgradig- (B) als auch im hochgradig erkrankten Gewebe (D) angefärbt, d.h. sie beinhalten das Protein Smad4. Die Zellen der superfizialen Zone des gering erkrankten Gewebes (A) beinhalten kein Smad4. In der degenerierten superfizialen Zone des stark erkrankten Gewebes (C) befinden sich Chondrozyt-ähnliche Zellen, welche z.T. das Smad4- Molekül enthalten. Die Abbildung 13 zeigt, dass sich das Smad4- Signalmolekül hauptsächlich in den Zellen der inneren Zone (B, D) befindet.

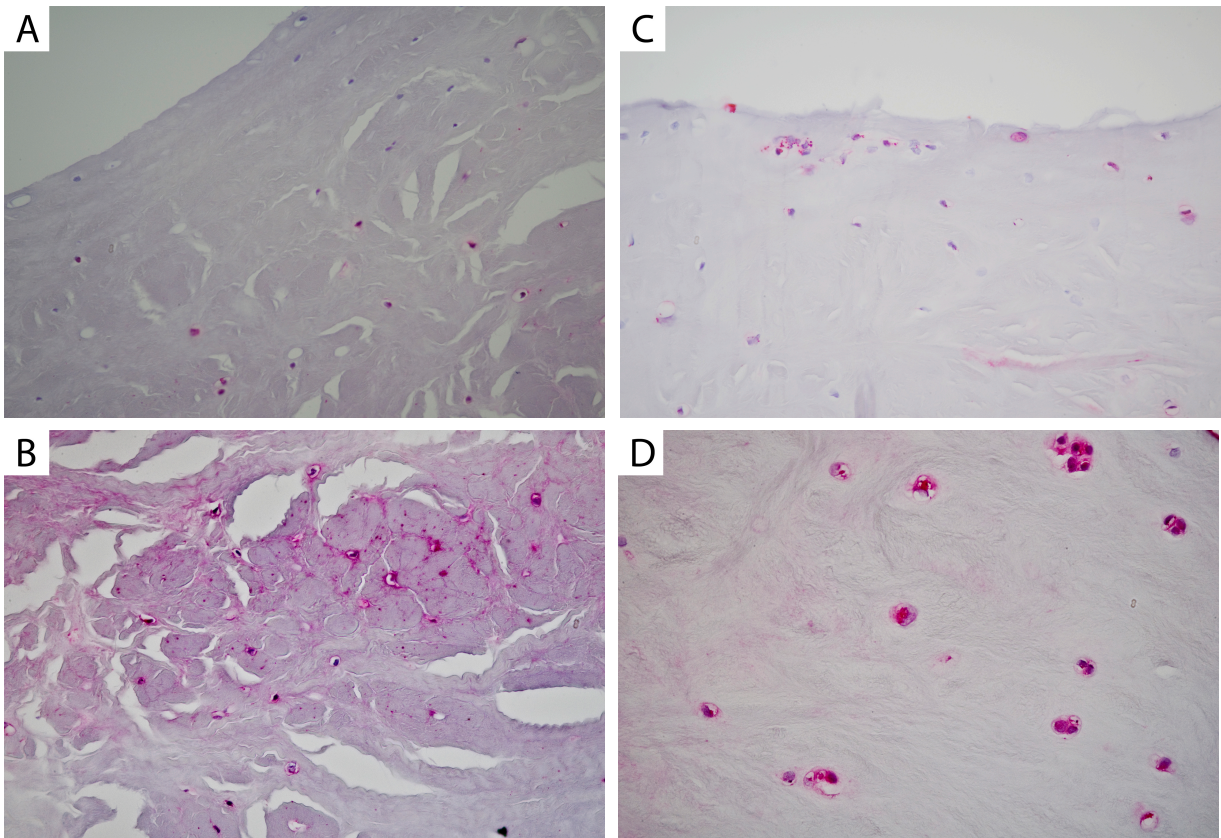


Abbildung 13: Immunhistologischer Nachweis von Smad4- Signalmolekülen in verschiedenen Zonen von hochgradig- und geringgradig erkranktem Meniskusgewebe

A) Superfiziale Zone, gering erkrankter Meniskus, Smad4 AK B) Innere Zone, gering erkrankter Meniskus, Smad4 AK, C) Superfiziale Zone, hoch erkrankter Meniskus, Smad4 AK, D) Innere Zone, hoch erkrankter Meniskus, Smad4 AK, A) - D) 40-fache Vergrößerung.

3.1.6. Nachweis und Lokalisation von TGF- β 3 auf Gewebeebene

In der Abbildung 14 sind die Lokalisation des Liganden TGF- β 3 in gering- und hochgradig erkranktem Meniskusgewebe dargestellt. In dem gering erkrankten Gewebe befindet sich TGF- β 3 sowohl an den Zellen der inneren Zone (B) als auch an den Zellen der superfizialen Zone (A). Während sich TGF- β 3 in der inneren Zone (B) perinukleär anlagert, ist es in der oberflächlichen superfizialen Zonen zusätzlich in der extrazellulären Matrix vorhanden. Im hochgradig erkrankten Gewebe befindet sich der Ligand vorwiegend an den Zellen der inneren Zone (D), an welchen er sich, wie auch in Bild B, perinukleär anlagert. Die superfiziale Zone des stark erkrankten Gewebes (C) ist in hohem Maße degeneriert, sodass dort TGF- β 3 kaum nachgewiesen werden kann.

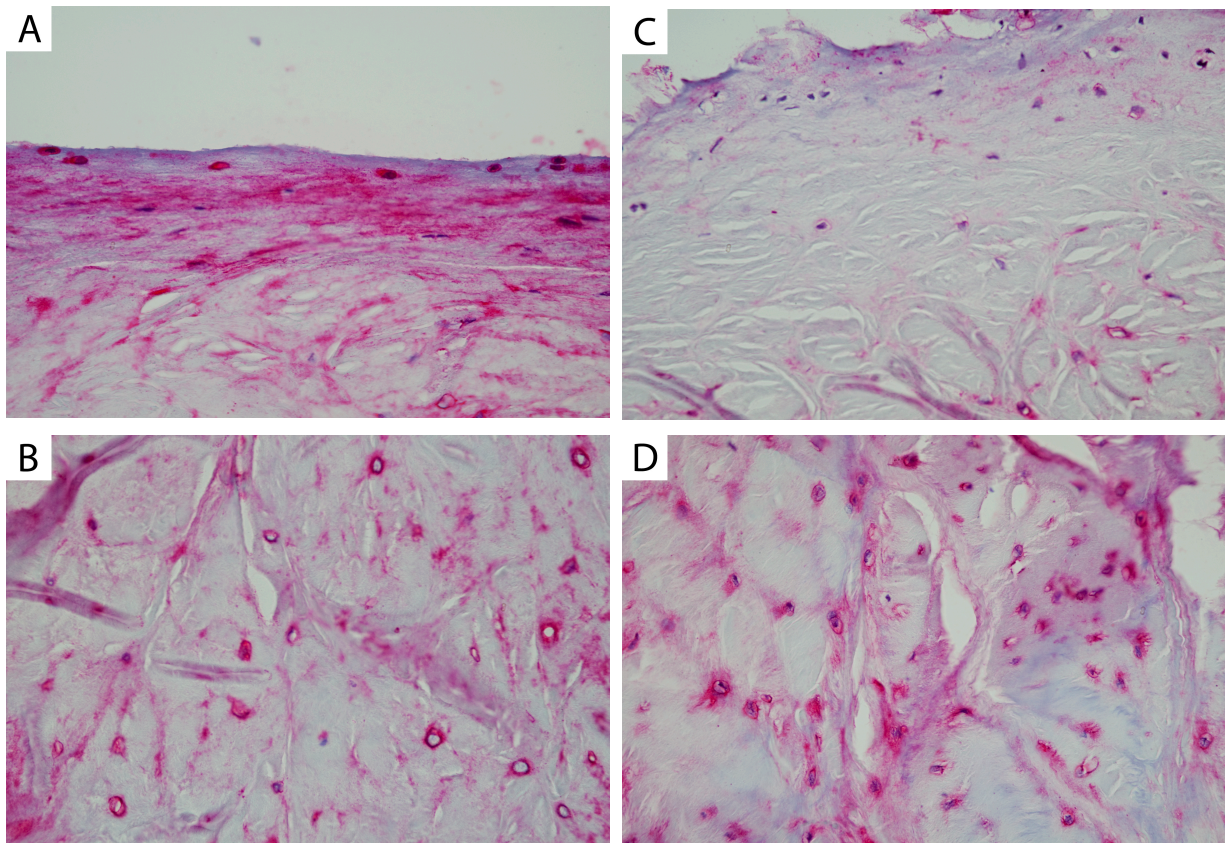


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von TGF- β 3 in verschiedenen Zonen von gering- und hochgradig erkranktem Meniskusgewebe.

A) Superfiziale Zone, gering erkrankter Meniskus, B) Innere Zone, gering erkrankter Meniskus, C) Superfiziale Zone, hoch erkrankter Meniskus, D) Innere Zone, hoch erkrankter Meniskus, A)-D) 40-fache Vergrößerung.

3.2. Nachweis auf zellulärer Ebene: Immunzytochemie

3.2.1. Zelluläre Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle

Die Abbildung 15 zeigt die Lokalisation der Smad1- Signalmoleküle innerhalb der MPCs. Diese MPCs stammen aus gering erkranktem Meniskusgewebe. Die Signalmoleküle befinden sich im Zytoplasma der MPCs und sind anhand der grünen Fluoreszenz zu erkennen. Sie lagern sich perinukleär an (A) und sind zusätzlich im Nukleus der Zellen lokalisiert (C). Der Nukleus der Zellen ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert und erscheint blau (A, B). Bild D stellt die Negativkontrolle dar, in welcher keinerlei Fluoreszenz zu erkennen ist. Dieser zelluläre Nachweis und die intrazelluläre Lokalisation der Smad1 - Signalmoleküle konnten in gleichem Ausmaß auch für MPCs aus hoch erkranktem Meniskusgewebe gezeigt werden.

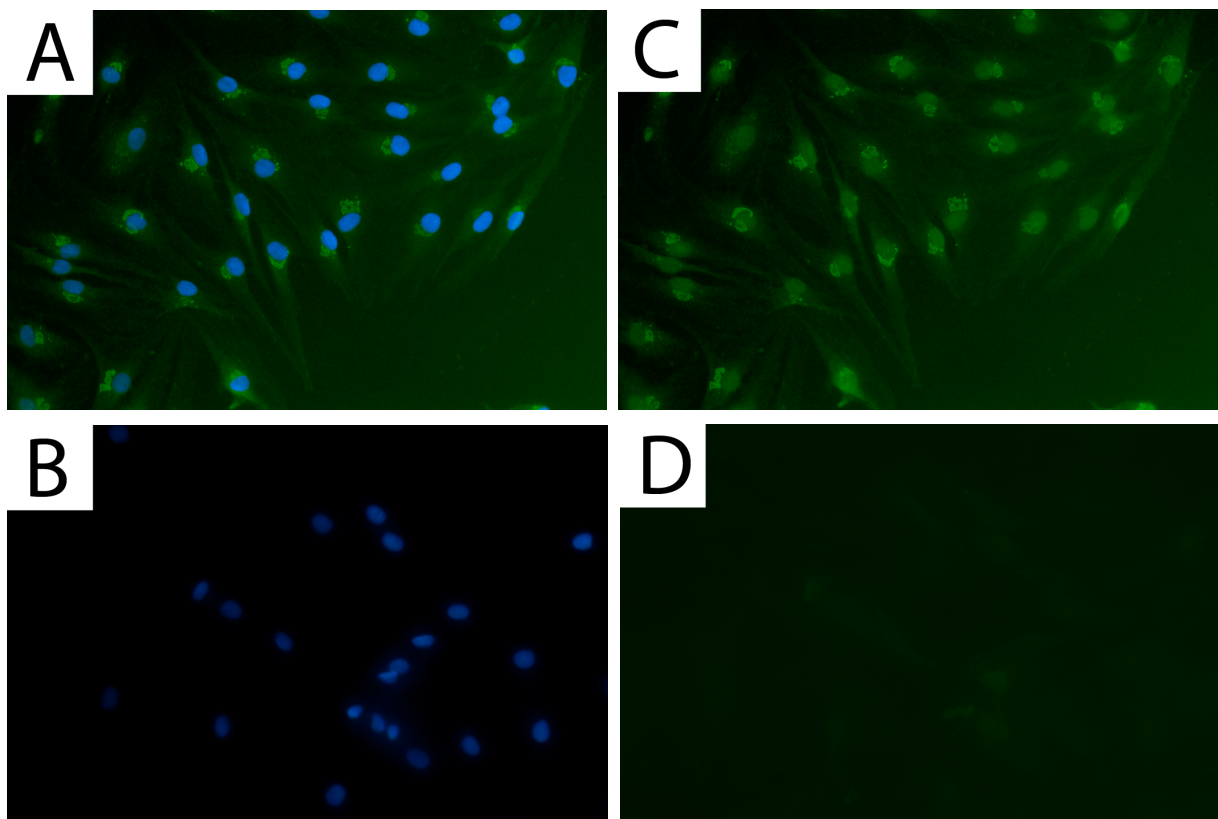


Abbildung 15: Immunzytochemie: Zelluläre Lokalisation der Smad1- Moleküle in MPCs.

Die Signalmoleküle weisen eine perinukleäre Anlagerung (A) und eine nukleäre Lokalisation (C) auf. In A und B sind die Zellkerne der MPCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert. Die Negativkontrolle (D) zeigt keine Fluoreszenz von Smad1-Signalmolekülen.

3.2.2. Zelluläre Lokalisation der Smad2- und Smad3- Signalmoleküle

Die Abbildung 16 beweist das Vorhandensein der Signalmoleküle Smad2 und Smad3 innerhalb der MPCs. Die MPCs, welche in dieser Abbildung zu erkennen sind, stammen aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe. Auch die Signalmoleküle Smad2 und Smad3 befinden sich sowohl im Zytoplasma (A, C), als auch im Nukleus der MPCs Bild D ist die Negativkontrolle, bei welcher weder Zytoplasma, noch Zellkerne angefärbt sind. Der zelluläre Nachweis und die Lokalisation dieser Signalmoleküle konnte in identischer Form auch in MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe bestätigt werden.

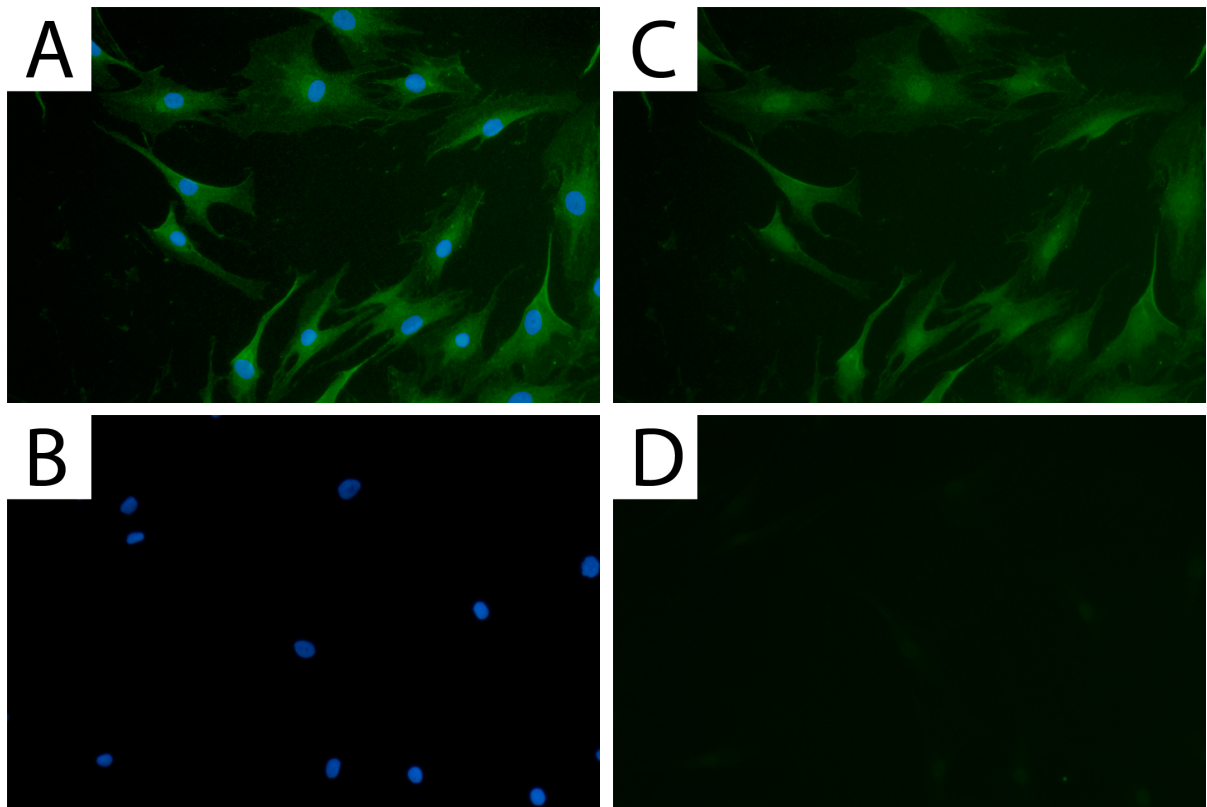


Abbildung 16: Immunzytochemie: Zelluläre Lokalisation der Smad2- und Smad3-Signalmoleküle in MPCs.

Die Signalmoleküle weisen eine perinukleäre Anlagerung (A) und eine nukleäre Lokalisation (C) auf. In A und B sind die Zellkerne der MPCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert. Die Negativkontrolle (D) zeigt keine Fluoreszenz von Smad2- und Smad3-Signalmolekülen.

3.2.3. Zelluläre Lokalisation der Smad4- Signalmoleküle

In der Abbildung 17 wurde erfolgreich das Vorliegen von Smad4- Signalmolekülen innerhalb von MPCs, welche aus geringfügig erkranktem Meniskusgewebe stammen, untersucht. In Bild A und Bild C sind die o.g. Signalmoleküle diffus im Zytoplasma verteilt. In Bild C ist zusätzlich die Lokalisation dieser im Zellkern zu erkennen. In der Negativkontrolle (D) sind weder blaue, noch grüne Fluoreszenzen zu erkennen. Die dargestellten immunzytochemischen Ergebnisse konnte in identischem Ausmaß auch für MPCs aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe gezeigt werden.

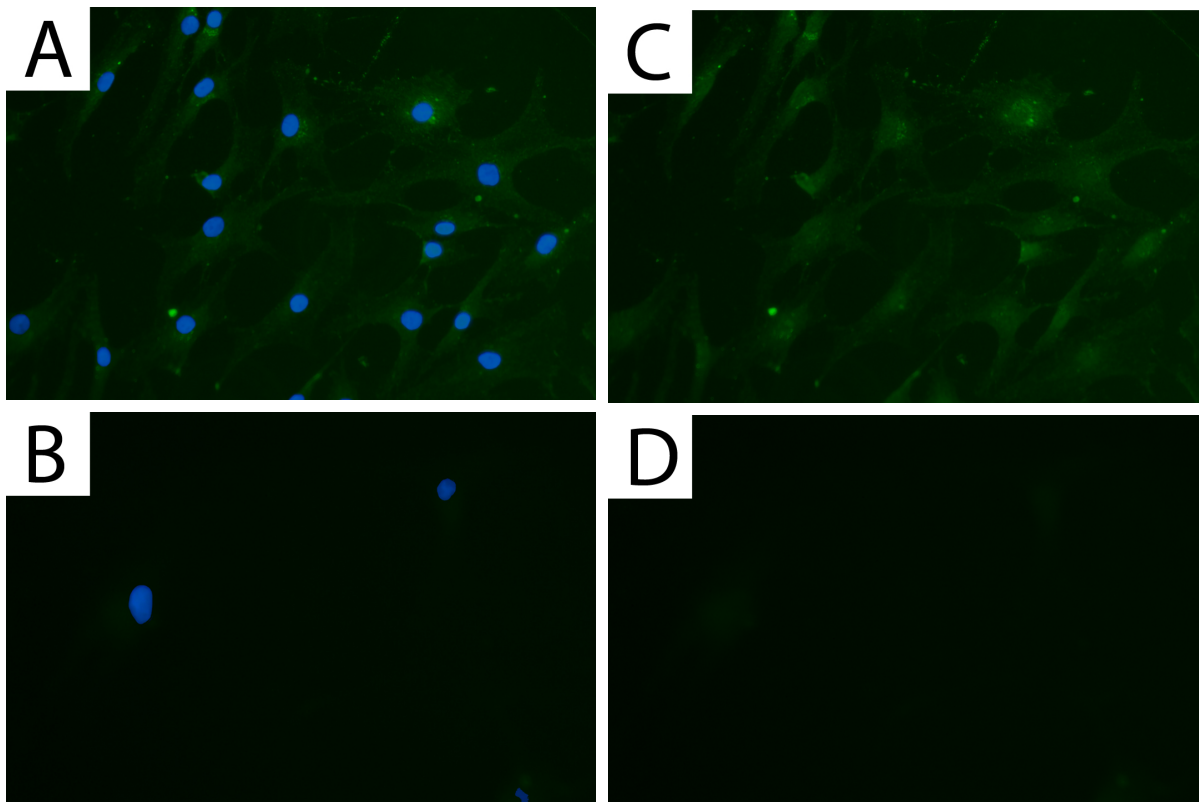


Abbildung 17: Immunzytochemie: Zelluläre Lokalisation der Smad4- Moleküle in MPCs.

Die Signalmoleküle weisen eine perinukleäre Anlagerung (A) und eine nukleäre Lokalisation (C) auf. In A und B sind die Zellkerne der MPCs mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert. Die Negativkontrolle (D) zeigt keine Fluoreszenz von Smad4- Signalmolekülen.

3.3. Nachweis auf Genebene: *real time*-PCR

3.3.1. Vergleichende Genexpressionsanalysen von hochgradig und gering erkrankten MPCs

In der Abbildung 18 ist, in Form von Diagrammen, die Genexpression der Signalproteine Smad2, Smad3 und Smad4 in MPCs aus stark erkranktem Meniskusgewebe und MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe dargestellt. Auf der x-Achse der Diagramme sind die verschiedenen MPCs aufgetragen. Auf der y-Achse befinden sich die relativen Genexpressionslevel. Die Genexpression der MPCs aus hoch erkranktem Meniskusgewebe sind in blauen Säulen abgebildet, wohingegen die Genexpression der MPCs aus geringgradig erkranktem Meniskusgewebe in grünen Säulen dargestellt ist. Die Vergleiche der unterschiedlich stark erkrankten MPCs zeigen, dass die MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe eine erhöhte Expression, sowohl für Smad2 und Smad3 als auch für Smad4, im Vergleich zu den MPCs aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe aufweisen. Am deutlichsten ist dieser Unterschied für die Genexpression des Smad3-Signalproteins zu erkennen.

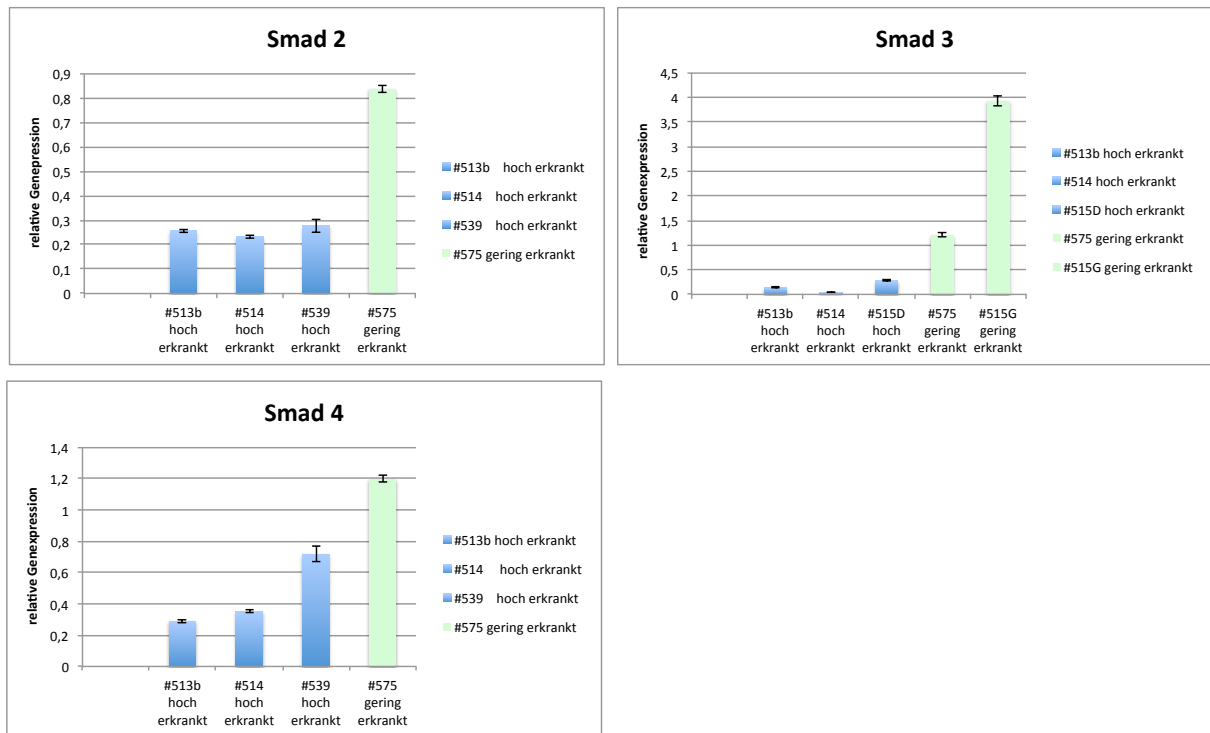


Abbildung 18: RT-PCR-Daten: relative Genexpressionslevel für die Smad2, Smad3 und Smad4 in MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe.

Die grünen Säulen symbolisieren die Genexpression in MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe und die blauen Säulen die Genexpression in MPCs aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe.

3.4. Nachweis auf Proteinebene: Western-Blot

3.4.1. Nachweis der Smad1- Proteine in MPCs

Die Western-Blot-Untersuchung in Abbildung 19 zeigt eindeutig das Vorliegen von Smad1-Signalmolekülen in MPCs auf Proteinebene. In der Abbildung ist dargestellt, dass bei gleicher Menge an Probenmaterial (alpha-Tubulin-Kontrolle) unterschiedlich ausgeprägte Proteinbanden entstehen, abhängig von der AK- Konzentration. Probe 1 und Probe 2 sind identische MPCs, mit dem Unterschied, dass bei Probe 1 eine AK- Verdünnung von 1:250 und bei Probe 2 eine Verdünnung von 1: 500 verwendet wurde. Das Molekulargewicht der Smad1- Proteine beträgt ca. 55 kDa, welches mit Hilfe der Proteinleiter (links im Bild der Coomassie- Färbung) ermittelt wurde.

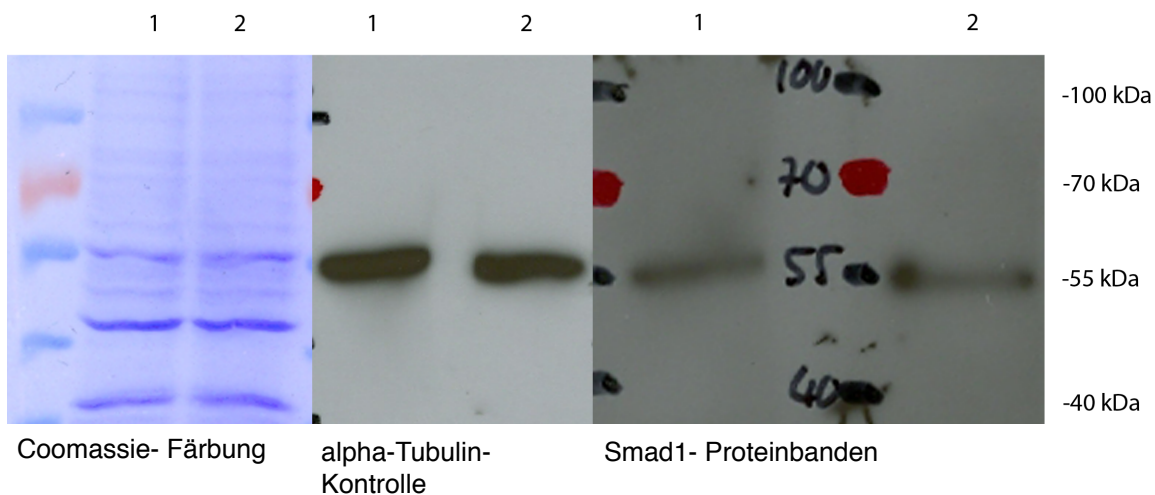


Abbildung 19: Proteinnachweis der Smad1- Signalmoleküle mittels Western-Blot.

Probe 1 zeigt eine Proteinbande bei einer AK- Verdünnung von 1:250 und Probe 2 bei einer Verdünnung von 1:500.

3.4.2. Proteinnachweis der Smad2- und Smad3- Moleküle in MPCs aus hochgradig und geringfügig erkranktem Meniskusgewebe

Die Abbildung 20 zeigt das Vorliegen von Smad2- und Smad3- Proteinen in MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe (1) und hochgradig erkranktem Gewebe (2, 3). Es ist dargestellt, dass bei identischer Menge an Probenmaterial (alpha-Tubulin-Kontrolle) die MPCs aus gering erkranktem Gewebe (1) eine höhere Konzentrationen an Smad2 und Smad3- Signalmolekülen aufweisen, als die MPCs aus hochgradig erkranktem Gewebe (2, 3). Die Proteinbanden bei circa 56 kDa entsprechen dem Signalmolekül Smad3 und die Proteinbanden bei 62 kDa dem Signalmolekül Smad2.

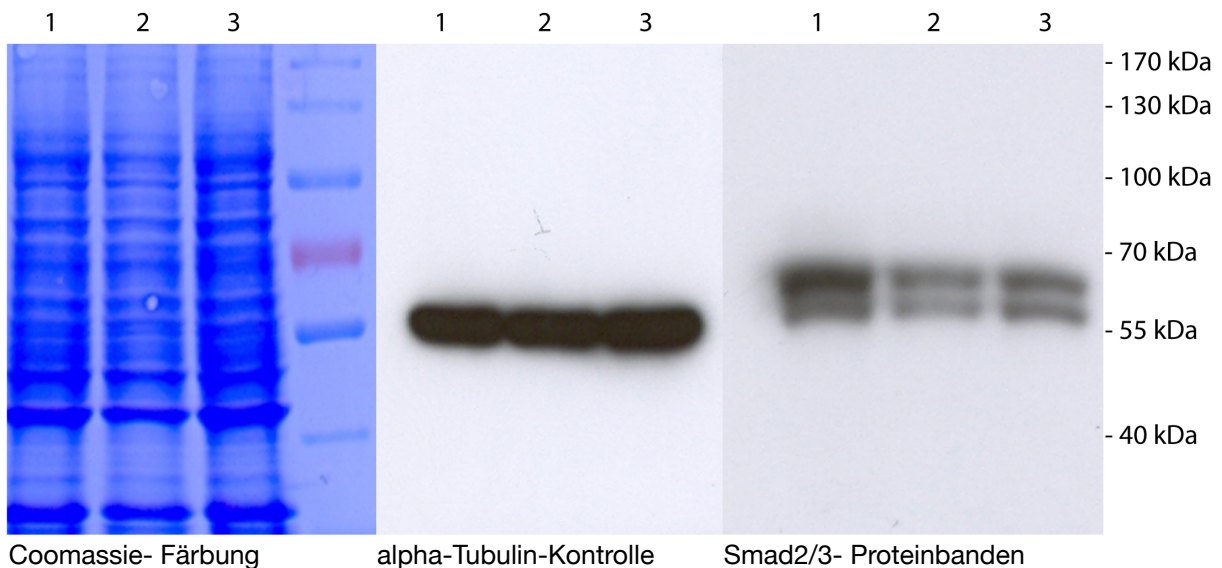


Abbildung 20: Proteinnachweis der Smad2- und Smad3- Signalmoleküle in MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe mittels Western-Blot.

MPCs der Probe 1 stammen aus geringgradig erkranktem Gewebe und MPCs der Probe 2 und 3 aus hochgradig erkranktem Gewebe.

3.4.3. Nachweis der Smad4- Moleküle in MPCs aus hochgradig und geringfügig erkranktem Meniskusgewebe

Die Abbildung 21 zeigt Western-Blot Untersuchungen an MPCs und den Nachweis von Smad4. Der Nachweis erfolgte sowohl in MPCs aus gering erkrankten (1), als auch in MPCs aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe (2, 3). Die alpha-Tubulin-Kontrolle zeigt die gleiche Menge an Probenmaterial in den 3 verschiedenen MPCs. In der Abbildung ist anhand der Proteinbanden zu erkennen, dass Smad4 in MPCs aus gering erkranktem Gewebe (1) in höherer Konzentration vorliegt als in MPCs aus stark erkranktem Gewebe (2, 3). Das Molekulargewicht der Smad4- Proteine beträgt circa 61 kDa, welches mit Hilfe der Proteinleiter (rechts im Bild Coomassie- Färbung) ermittelt wurde.

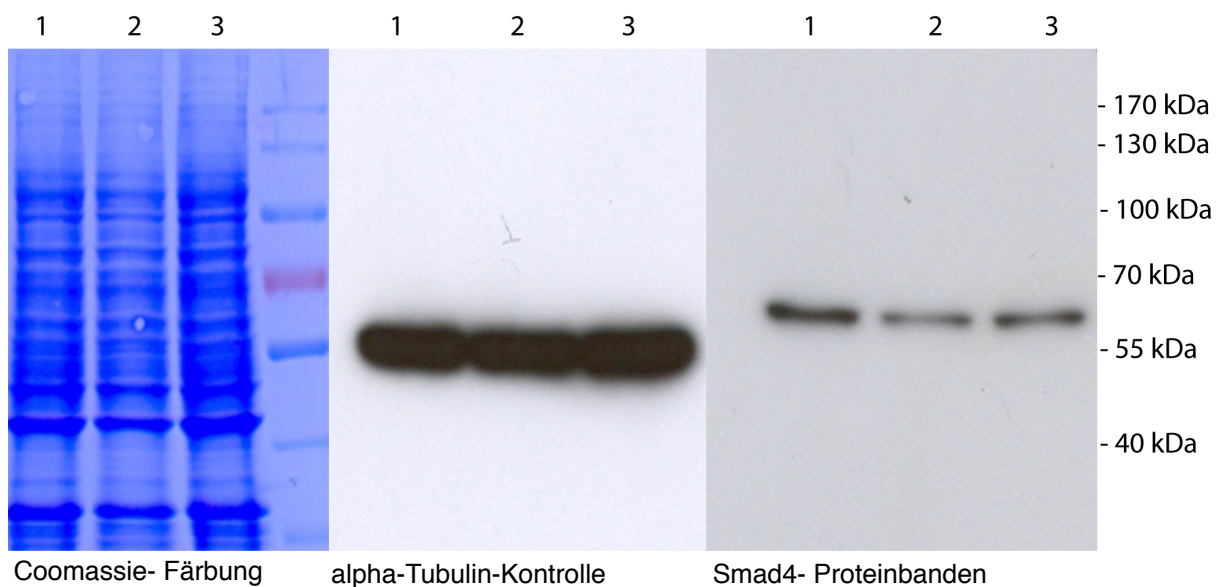


Abbildung 21: Proteinnachweis von Smad4- Signalmolekülen in MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe mittels Western-Blot.

MPCs der Probe 1 stammen aus geringgradig erkranktem Gewebe und MPCs der Proben 2 und 3 aus hochgradig erkranktem Gewebe

3.5. Überexpression verschiedener Smad- Signalmoleküle

3.5.1. Nachweis überexprimierter Smad1- Moleküle

Die Abbildung 22 belegt die Überexpression der Smad1- Signalmoleküle innerhalb transfizierter MPCs. Die Proben 1 bis 4 bestehen aus denselben MPCs (#605). Die Proteinbande der Probe 3 zeigt, dass das Smad1- Protein in diesen MPCs, die zuvor mit dessen Gensequenz transfiziert wurden, überexprimiert wird. Die beiden ersten Proben (1, 2) sind auch MPCs #605, allerdings wurden diese nicht transfiziert und dienen als Kontrolle. Die Probe 2 wurde in 2facher Konzentration, bezogen auf die Proben 1, 3 und 4, welche ähnliche Konzentrationen besitzen, auf das Gel aufgetragen. Dies ist in der alpha-Tubulin-Kontrolle gut zu erkennen. Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren und die Probe 4 mit Sequenzen, die für die Proteine Smad2 und Smad4 kodieren.

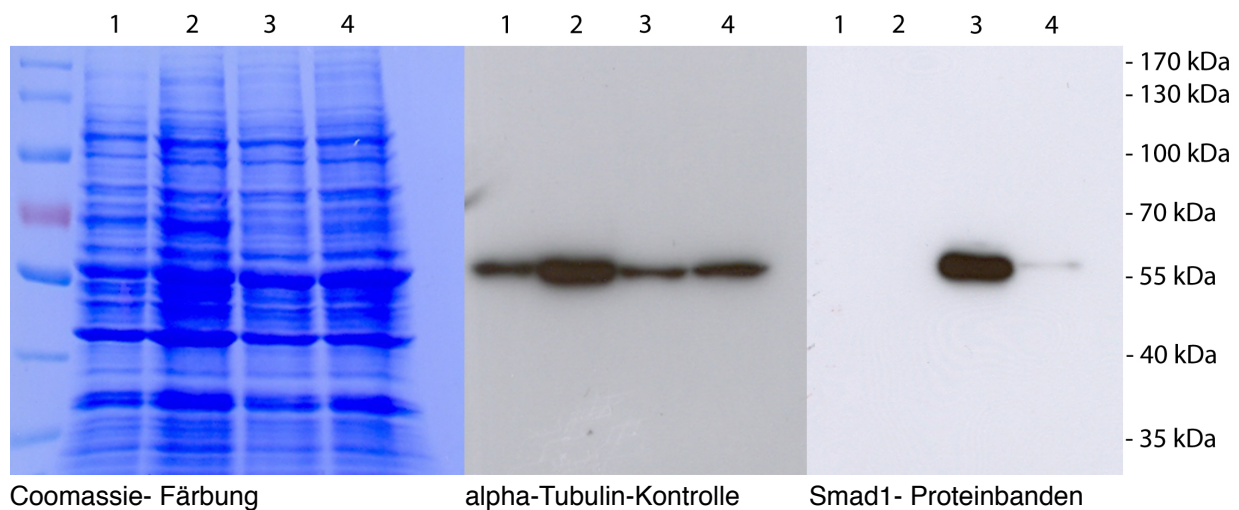


Abbildung 22: Nachweis der Smad1- Überexpression innerhalb transfizierter MPCs.

Alle 4 Proben enthalten die gleichen MPCs #605. Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren und Probe 4 mit Sequenzen, die für Smad2 und Smad4 kodieren.

3.5.2. Nachweis überexprimierter Smad2- Signalmoleküle

In der Abbildung 23 ist die Überexpression der Smad2- Signalmoleküle innerhalb transfizierter MPCs (#605) dargestellt, wobei die MPCs der Probe 3 mit Gensequenzen transfiziert wurden, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren und die MPCs der Probe 4 mit Sequenzen, die für die Proteine Smad2 und Smad4 kodieren. Die Proben 1 und 2 bestehen aus den gleichen, jedoch nicht transfizierten MPCs (#605) und dienen als Kontrolle. Das Probenmaterial 2 besitzt die doppelte Proteinmenge im Vergleich zu den restlichen Proben. Dies zeigt die alpha-Tubulin-Kontrolle. Diese Abbildung beweist die Überexpression des Signalproteins Smad2 in der Probe 4. Die Proteinbanden bei 55 kDa entsprechen dem Signalmolekül Smad3 und die Proteinbanden bei circa 59 kDa dem Signalmolekül Smad2.

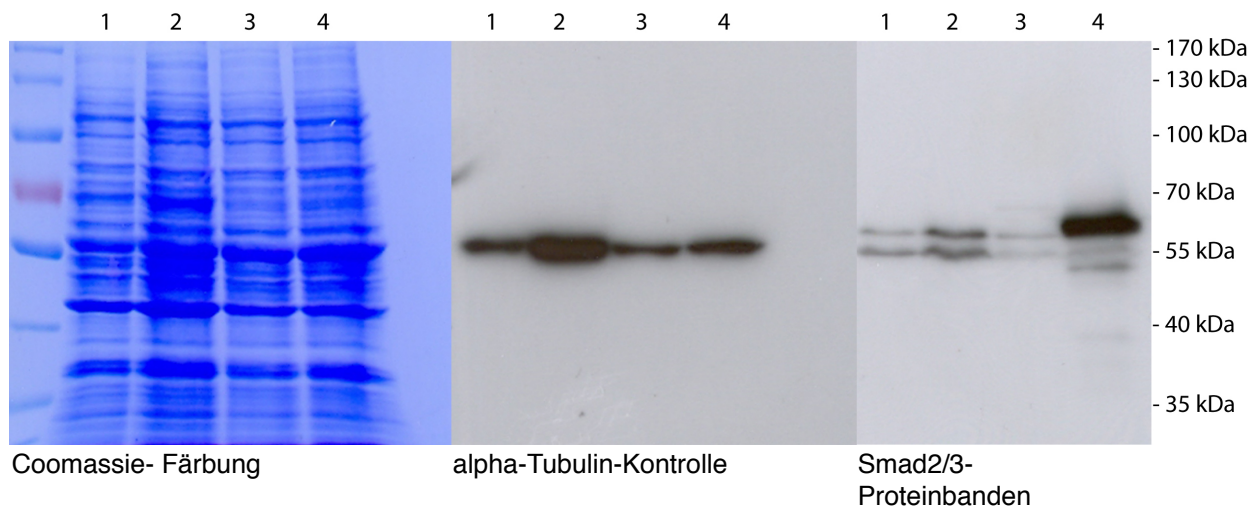


Abbildung 23: Nachweis der Smad2- Überexpression innerhalb transfizierter MPCs.

Alle 4 Proben enthalten die gleichen MPCs #605. Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren und Probe 4 mit Sequenzen, die für Smad2 und Smad4 kodieren.

3.5.3. Nachweis überexprimierter Smad4- Signalmoleküle

Die Abbildung 24 belegt die Überexpression von Smad4- Signalmolekülen in transfizierten MPCs (#605). Die Proben 3 und 4 wurden jeweils mit einer Gensequenz transfiziert, welche für das Smad4- Protein kodiert. Die Proben 1 und 2 dagegen bestehen aus denselben Zellen (#605), wurden jedoch nicht transfiziert und dienen somit als Kontrolle. Die alpha-Tubulin-Kontrolle zeigt, dass in der Probe 2 die doppelte Menge an Zellen aufgetragen wurde im Vergleich zu den restlichen Proben. Die Proteinenbanden der überexprimierten Smad4- Proteine in den Proben 3 und 4 zeigen, dass diese ein Molekulargewicht von circa 70 kDa aufweisen.

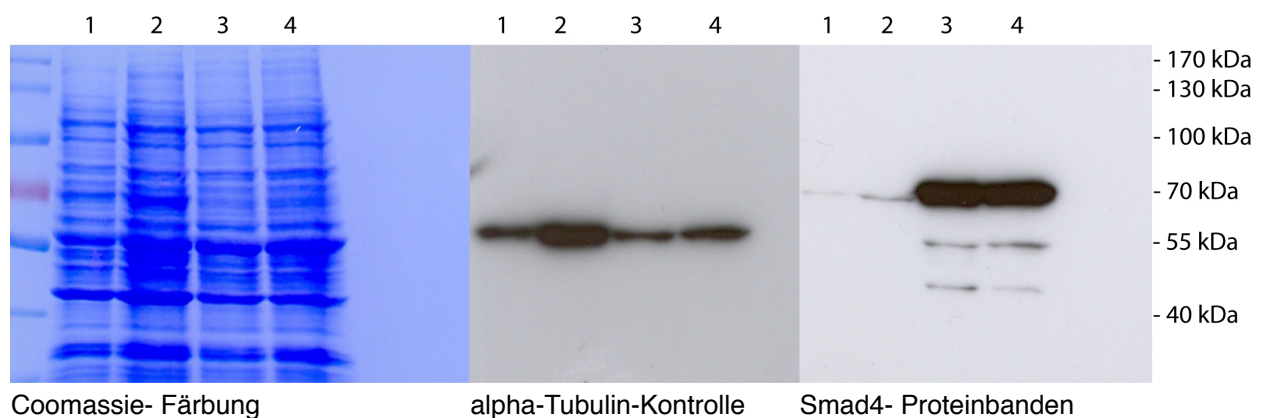


Abbildung 24: Nachweis der Smad4- Überexpression innerhalb transfizierter MPCs.

Alle 4 Proben enthalten die gleichen MPCs (#605). Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren, und Probe4 mit Sequenzen, die für Smad2 und Smad4 kodieren.

3.5.4. Auswirkungen der Überexpression auf die Kollagen I-Synthese

In der Abbildung 25 sind die Auswirkung der Überexpression verschiedener Smad Signalproteine auf die Kollagen I-Produktion dargestellt. Alle 4 Proben bestehen aus den selben MPCs (#612). Die Proben 1 und 2 dienen als Kontrolle, wobei in Probe 2 die doppelte Zellzahl im Vergleich zu den anderen Proben aufgetragen wurde, welches sich in der alpha-Tubulin-Kontrolle widerspiegelt. Die Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren, und die Probe 4 mit Sequenzen, die für Smad2 und Smad4 kodieren. Diese Abbildung zeigt, dass der Kollagen I- Proteingehalt sowohl in der Probe 3 als auch in der Probe 4 im Vergleich zu den beiden Kontrollproben erhöht ist. Das Molekulargewicht der Kollagen I- Proteine beträgt circa 58 kDa, welches mit Hilfe der Proteinleiter (links im Bild Coomassie- Färbung) ermittelt wurde.

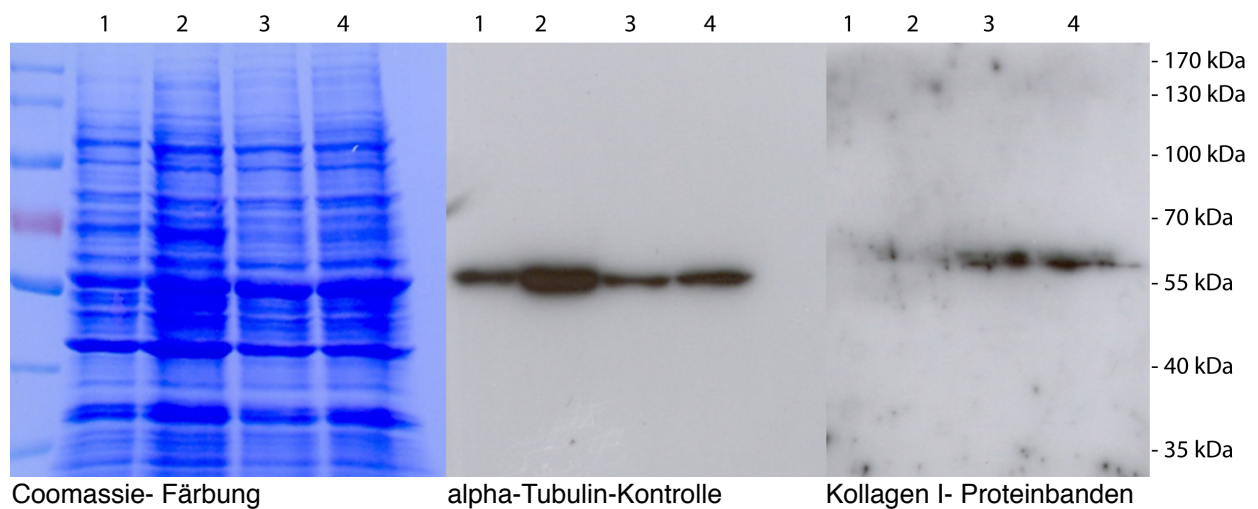


Abbildung 25: Auswirkung der Überexpression auf die Kollagen I-Synthese.

Alle 4 Proben enthalten die gleichen MPCs (#612). Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren, und Probe 4 mit Sequenzen, die für Smad2 und Smad4 kodieren.

3.5.5. Auswirkungen der Überexpression auf die Kollagen II-Synthese

Die Abbildung 26 zeigt die Auswirkungen der Überexpression verschiedener Smad Signalmoleküle innerhalb von MPCs auf dessen Kollagen II-Synthese. Alle 4 Proben bestehen aus den gleichen MPCs (#612). Wie oben nachgewiesen, exprimieren die transfizierten MPCs der Probe 3 vermehrt Smad1 und Smad4 und die MPCs der Probe 4 vermehrt Smad2 und Smad4. Die Proben 1 und 2 sind nicht transfizierte MPCs (#612) und dienen als Kontrolle. In dieser Abbildung sind 3 unterschiedlich stark ausgeprägte Proteinbanden in zwei verschiedenen Höhen zu erkennen. Die stärkste Proteinbande zeigt sich bei der Probe 3. Die Proteine dieser Bande besitzen ein Molekulargewicht von ca. 67 kDa. Bei der Probe 4 ist eine deutlich schwächer ausgeprägte Proteinbande auf der gleichen Höhe zu erkennen. Die Proteinbande der Kontrollprobe 2 verläuft niedriger und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Probe 1 hingegen zeigt keine Proteinbande.

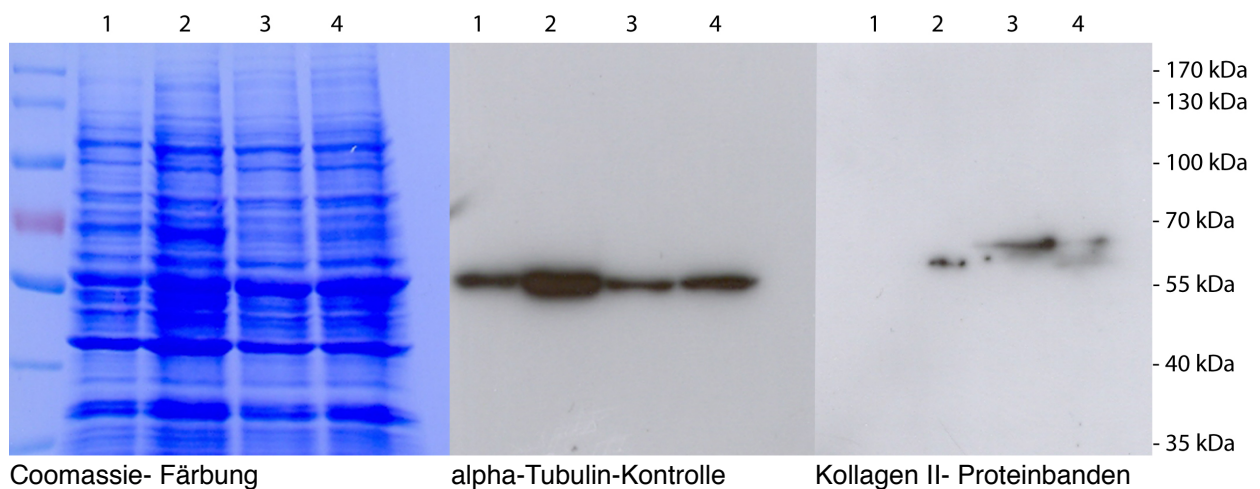


Abbildung 26: Auswirkung der Überexpression auf die Kollagen II-Synthese.

Alle 4 Proben enthalten die gleichen MPCs (#612). Probe 3 wurde mit Gensequenzen transfiziert, welche für die Proteine Smad1 und Smad4 kodieren, und Probe 4 mit Sequenzen, die für Smad2 und Smad4 kodieren.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Progenitorzellen innerhalb des Meniskusgewebes

In der vorliegenden Arbeit wurde der TGF- β -Signalweg innerhalb des Meniskusgewebes und insbesondere innerhalb der MPCs genauer untersucht, um neue Einblicke in die Regenerationskapazität und Regenerationsaktivität der MPCs zu erhalten. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten einen grundlegenden Schritt bei der Suche von neuen therapeutischen Ansatzpunkten in der Behandlung von Meniskusdefekten darstellen.

Die Arbeitsgruppe (AG) Miosge beschäftigt sich hauptsächlich mit der Thematik der Kniegelenkosteoarthritis. In den späten Stadien der Kniegelenkosteoarthritis ist der hyaline Gelenkknorpel meist hochgradig degeneriert, sodass als Ultima Ratio oftmals ein endoprothetischer Kniegelenkersatz durchgeführt wird. Durch die wissenschaftliche Untersuchung der operativ entfernten Kniegelenkskomponenten, gelang es der AG Miosge erstmals, chondrogene Progenitorzellen innerhalb des humanen hyalinen Gelenkknorpels, welcher aus osteoarthrotischen Kniegelenken gewonnen wurde, nachzuweisen. Diese chondrogenen Progenitorzellen, kurz CPCs genannt, sind Abkömmlinge pluripotenter Stammzellen, die in der Lage sind, sich zu differenzieren und die Stammzellcharakteristika wie z.B. Multipotenz, Migrationspotenzial und diverse stammzelltypische Oberflächenmarker besitzen. Zudem weisen diese Zellen sowohl ein osteogenes und adipogenes als auch ein chondrogenes Differenzierungspotenzial auf und sind vermutlich an Reparaturprozessen des Knorpelgewebes beteiligt.

Es wird davon ausgegangen, dass embryonale mesenchymale Stammzellen in verschiedenen Geweben bis in das Erwachsenenalter undifferenziert persistieren, um dort für spätere Reparaturprozesse zur Verfügung zu stehen (Koelling et al. 2009). In Studien wird bereits die klinische Anwendung von Progenitorzellen innerhalb der Diagnostik und der Therapie bestimmter Erkrankungen beschrieben. Endotheliale Progenitorzellen werden z.B. als Marker bei kardiovaskulären Erkrankungen verwendet. Zusätzlich werden sie in Studien therapeutisch zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen wie z.B. pulmonaler Hypertonie oder Herzinfarkt eingesetzt (Liew et al. 2006). In vielen Bereichen der Medizin

stehen Progenitorzellen -neben den mesenchymalen Stammzellen- im Mittelpunkt der aktuellen Forschung. Dabei versucht man herauszufinden, wo diese Zellen herkommen, wo sie ihre Nische im Gewebe haben und wie man ihre Differenzierung so beeinflussen kann, dass sie einen Nutzen im Hinblick auf diverse Erkrankungen besitzen.

Aus den oben beschriebenen, operativ entfernten humanen Kniegelenken wurden zusätzlich die Menisken im Hinblick auf eventuelle Vorläuferzellen (Progenitorzellen) genauer untersucht. In bisher unveröffentlichten Studien dieser Arbeitsgruppe konnten auch innerhalb des Meniskusgewebes Progenitorzellen nachgewiesen werden. Auch diese Zellen erfüllten alle Kriterien für mesenchymale Stammzellen wie Multidifferenzierbarkeit, Migrationspotenzial und das Vorhandensein entsprechender Oberflächenmarker (Caplan 1991), sodass diese als Meniskusprogenitorzellen (MPCs) bezeichnet werden können. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die MPCs, je nach verwendetem Medium, chondrogen, adipogen oder osteogen differenzieren können. Unklar ist jedoch weiterhin, ob die MPCs erst im Zuge einer manifesten Osteoarthritis in Erscheinung treten oder evtl. als Reaktion auf einen Meniskusschaden, welcher meist einer manifesten Osteoarthritis vorausgeht. Es wird angenommen, dass die MPCs Abkömmlinge einer mesenchymalen Stammzellpopulation sind, welche während der gesamten Entwicklung im Gewebe verweilen, um später für Regenerationsprozesse des Gewebes zur Verfügung zu stehen. Es ist aber auch denkbar, dass es sich um transdifferenzierte Chondrozyten handelt, welche erst im Spätstadium der Osteoarthritis auftreten. Wie zuvor in der Einleitung beschrieben, ist der Meniskus ein sehr komplexes Gewebe, welches mindestens 3 unterschiedliche Zelltypen beinhaltet. Auch die extrazelluläre Matrix variiert innerhalb des Meniskusgewebes und beherbergt sowohl Kollagen I als auch Kollagen II in unterschiedlichen Konzentrationen, je nach Meniskuszone. In der vorliegenden Arbeit wurden die MPCs aus der inneren Zone der Menisken gewonnen, die im Vergleich zu der äußeren Zone mehr Kollagen II besitzt. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung dieses Gewebes und der noch unzureichend erforschten Funktionen der MPCs in Bezug auf Meniskusregeneration stellt die gezielte Manipulation der Meniskusregeneration zu diesem Zeitpunkt eine große wissenschaftliche Herausforderung dar. Bevor man die

Differenzierung von MPCs gezielt zur Bildung von nativem Meniskusgewebe anregen kann, ist es notwendig, die Funktionen und die Eigenschaften der MPCs genauer zu verstehen.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass diverse Wachstumsfaktoren, unter anderem TGF- β , eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Meniskusgewebes aus embryonalen Stammzellen spielen (Pazin et al. 2012). Da die MPCs als Residuen solcher embryonalen Stammzellen angesehen werden, ist es möglich, dass diese Wachstumsfaktoren ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von MPCs spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Erkenntnisse über die Bedeutung und die Lokalisation des TGF- β -Signalwegs -und insbesondere dessen Smad-Signalmoleküle innerhalb der MPCs- gewonnen. Es wurden die Meniskuspräparate mit Hilfe eines histo-pathologischen Bewertungsscores von Moritz Roth (Doktorand dieser Arbeitsgruppe; Dissertation: Histologische Klassifikation degenerativ erkrankter Menisken - Die Signalwegsmodulatoren RSPO2 und SFRP2 in humanem Meniskusgewebe) in hochgradig und geringgradig erkrankt eingeteilt, um eine Aussage bezüglich möglicher Unterschiede in der Regenerationsaktivität unterschiedlich stark degenerierter Menisken machen zu können.

4.2. Diskussion der Ergebnisse auf Genebene

Unterschiede zwischen hoch- und geringgradig erkranktem Meniskusgewebe -in Bezug auf die Genexpressionslevel der Smad- Signalmoleküle- konnten mittels der qRT-PCR quantifiziert und unter Verwendung der Pfaffl-Methode (Pfaffl 2001) normalisiert werden (Abb. 18). Es konnte die Genexpression der Smad2, Smad3 und Smad4-Signalmoleküle innerhalb der MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich bei dem Vergleich der MPCs aus hoch- und geringgradig erkranktem Gewebe eine höhere Ratio bei den MPCs aus geringgradig erkranktem Gewebe hinsichtlich aller untersuchten Smad-Signalmoleküle. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass dem TGF- β -Signalweg eventuell eine protektive Rolle während der Meniskusdegeneration zukommt. Die Vermutung wird bekräftigt durch eine Studie mit Smad3-Knockoutmäusen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Knockoutmäuse eine Degeneration der Bandscheiben und eine degenerative Gelenkerkrankung aufweisen, welche stark an die humane Gelenkosteoarthritis erinnert (Yang et al. 2001).

Vergleichende Studien an gesundem und osteoarthrotischem Knorpelgewebe zeigten eine höhere Genexpression von TGF- β im gesunden Knorpelgewebe (Blaney Davidson et al. 2006). Da eine erhöhte TGF- β -Expression mit erhöhten Smad2- und Smad3-Leveln einhergeht, sind diese Ergebnisse kohärent zu den PCR-Daten dieser Arbeit.

Der Ligand TGF- β 3 konnte mittels Immunhistochemie auch innerhalb des Meniskusgewebes, sowohl bei hochgradig als auch bei geringfügig erkranktem Gewebe nachgewiesen werden (Abb.14). Das vermehrte Vorliegen des Wachstumsfaktors TGF- β 3 in der superfizialen Schicht des gering erkrankten Meniskusgewebes könnte darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Schicht die mechanischen Beanspruchungen am größten sind und folglich den Degenerationsprozessen am meisten entgegengewirkt werden muss. In dem hochgradig erkrankten Meniskusgewebe scheinen diese protektiven Einflüsse versagt zu haben, was offensichtlich eine Degeneration der superfizialen Schicht zur Folge hat. TGF- β 3 zählt zu den potentesten Stimulatoren der extrazellulären Matrixproduktion von Meniskuszellen (Barry und Murphy 2004, Collier und Ghosh 1995, Mauck et al. 2006), weshalb dieser Wachstumsfaktor in der Literatur als vielversprechender Faktor innerhalb von Meniskusreparaturprozessen diskutiert wird (Kasemkijwattana et al. 2000). Ionescu et. al konnten in Studien, die an Rindermenisken durchgeführt wurden, zeigen, dass unter TGF- β 3-Substitution der Proteoglykangehalt der Menisken signifikant zunimmt. Darüber hinaus wurde in dieser Studie ein positiver Effekt dieser Substitution auf die Reparaturprozesse des Meniskusgewebes festgestellt (Ionescu et al. 2012). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die Stimulation von CPCs beobachtet werden, welche eine erhöhte Kollagen II-Synthese und erhöhte Faserdichte im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen (Koelling et al. 2009). Diese Erkenntnisse bestätigen die oben genannte Vermutung, dass der TGF- β -Signalweg eine protektive Rolle während der Meniskusdegeneration spielen könnte, und sie demonstrieren darüber hinaus die enorme Bedeutung, welche diesem Signalweg innerhalb von Reparaturmechanismen verschiedener Gewebe zukommt.

4.3. Diskussion der Ergebnisse auf zellulärer Ebene

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt jedoch nicht auf den Liganden des TGF- β -Signalwegs, sondern vielmehr auf dessen Signalmolekülen (Smad- Proteine), welche die Signalweiterleitung vermitteln. Es konnte mittels immunzytochemischer Methoden nachgewiesen werden, dass sich die Smad-Signalmoleküle (Smad1, Smad2, Smad3, Smad4) sowohl innerhalb des Zytoplasmas als auch im Zellkern befinden (Abb.15- 17), was mit dem heutigen Kenntnisstand über diesen Signalweg übereinstimmt (Shi und Massague 2003). Im Gegensatz zu den oben erwähnten PCR-Ergebnissen, lässt diese Methode keine quantitativen Aussagen bezüglich des Vorhandenseins der Proteine zu. Sie dient lediglich der Beschreibung der Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle, weshalb keine Unterschiede hinsichtlich MPCs aus hochgradig und geringgradig erkranktem Gewebe zu erkennen sind.

4.4. Diskussion der Ergebnisse auf Gewebeebene

Die Lokalisation der Smad-Signalmoleküle innerhalb des Meniskusgewebes wurde mit Hilfe immunhistochemischer Methoden genauer untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Signalmoleküle (Smad2, Smad3, Smad4) sowohl bei den hochgradig erkrankten als auch bei den geringgradig erkrankten Menisken hauptsächlich in der inneren Zone und in der Spitze der Menisken anzutreffen sind. Gegenseitliches zeigt die superfizielle Schicht, in der nur wenige Smad1-, Smad2-, Smad3- oder Smad4-positive Zellen nachgewiesen wurden (Abb. 11-13). Zusätzlich konnte das Vorliegen der Signalproteine in der äußeren Zone der Menisken beobachtet werden.

Die beschriebene unterschiedliche Verteilung der Signalproteine resultiert sicherlich zum Teil daraus, dass bei dem hochgradig erkrankten Meniskusgewebe die superfizielle Schicht bereits weitestgehend degeneriert ist. Zum anderen könnte es aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Regenerationskapazität des Meniskusgewebes hauptsächlich von den Zellen der äußeren und der inneren Zone ausgeht. Aus letzterer wurden auch die untersuchten MPCs gewonnen. In Studien zur Multidifferenzierbarkeit von Rindermeniskuszellen konnte gezeigt werden, dass alle 3 Zonen des Meniskusgewebes die Kapazität zur Multidifferenzierbarkeit besitzen (Mauck et al. 2007). Diese Ergebnisse

wurden in bisher unveröffentlichten vorausgegangen Studien innerhalb der AG Miosge in ähnlicher Art und Weise auch für das humane Meniskusgewebe beobachtet. Die innere Zone der Menisken besteht in zellulärer Hinsicht, wie in der Einleitung bereits beschrieben, hauptsächlich aus den Chondrozyt-ähnlichen Zellen, und sie besitzt ein höheres chondrogenes Potenzial als die Zellen der äußeren Zone (Furumatsu et al. 2011). In Zusammenschau mit den oben beschriebenen histologischen Befunden dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass der TGF- β -Signalweg bzw. dessen Smad-Signalmoleküle die Meniskuszellen der äußeren und inneren Zone des Meniskus beeinflussen können. Dies bestärkt wiederum die Vermutung, dass dieser Signalweg eine protektive Wirkung auf die Meniskusdegeneration hat.

4.5. Diskussion der Ergebnisse auf Proteinebene

Auf Proteinebene wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Western-Blot-Analysen alle untersuchten Smad-Signalmoleküle (Smad1, Smad2, Smad3, Smad4) in den MPCs, welche aus der inneren Zone der Menisken stammten, nachgewiesen (Abb.19-21). Für die Signalproteine Smad2, Smad3 und Smad4 konnten quantitative Unterschiede bezüglich des Proteingehalts zwischen den MPCs aus hocherkranktem und den MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe festgestellt werden. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen, dass die Proteine Smad2, Smad3 und Smad4 in größeren Mengen in den MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe vorhanden sind als in den MPCs aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe. Diese Beobachtungen stimmen mit den oben beschriebenen Ergebnissen auf Genebene überein. Der TGF- β -Signalweg ist über seine Signalproteine Smad2, Smad3 und Smad4 in der Lage, den Effekten kataboler Enzyme, wie z.B. IL1 oder TNF-alpha, über die Stimulierung der Matrixproduktion und der Synthese von Proteaseinhibitoren entgegenzuwirken. Ebenso können diese Effekte durch die „Downregulierung“ von Zytokinrezeptoren und die Suppression knorpelabbauender Enzyme, begrenzt werden (Pelletier et al. 1991). Es ist daher naheliegend, dass die Verminderung von Smad2-, Smad3- oder Smad4- Signalmolekülen eine Meniskusdegeneration zur Folge hat. Die Relevanz dieser Signalmoleküle bzw. dieses Signalwegs wird unterstrichen durch das verminderte Vorliegen von TGF- β -Rezeptoren in

dem Knorpelgewebe alter Mäuse, welche eine erhöhte Anfälligkeit für eine Osteoarthritis aufwiesen (Blaney Davidson et al. 2005). Diese Erkenntnisse sind konform zu früheren Studien von Boumediene et al. und Verdier et al., welche im Kaninchen (Boumediene et al. 1998) und im humanen osteoarthrotischen Knorpelgewebe (Verdier et al. 2005) eine verminderte Expression von TGF- β -Rezeptoren zeigen konnten. Die oben beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch im Meniskusgewebe osteoarthrotische Degenerationsprozesse in einer reziproken Korrelation zu der Aktivität des TGF- β -Signalwegs stehen und dass dieser Signalweg, da er auch innerhalb der MPCs nachgewiesen wurde, vermutlich eine zentrale Rolle bei der Meniskusregeneration spielt.

4.6. Diskussion des Überexpressionsexperiments

Um die vermutete protektive Funktion des TGF- β -Signalwegs bzw. dessen Smad-Signalproteine genauer beschreiben zu können, wurden die Auswirkungen einer Überexpression in Bezug auf verschiedene Matrixkomponenten untersucht. Durch die Transfektion entsprechender Plasmid-DNA in MPCs (siehe 2.10), ist es in dieser Arbeit gelungen, die Signalproteine Smad1, Smad2, Smad3 und Smad4 innerhalb der MPCs zu überexprimieren (Abb. 22-24). In Bezug auf Kollagen I ist mit Hilfe der Western-Blot-Methode zu erkennen, dass eine Überexpression der Smad1- und Smad4- Proteine und eine Überexpression der Smad2- und Smad4- Proteine innerhalb der MPCs zu einer vermehrten Kollagen I-Synthese im Vergleich zur Kontrolle führt (Abb. 25). Kollagen I ist die überwiegende Kollagenart innerhalb des Meniskusgewebes und wird hauptsächlich von den Chondrozyt-ähnlichen Zellen, welche sich vorwiegend in der inneren Zone des Meniskus befinden, produziert (McDevitt und Webber 1990). Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass von dem TGF- β -Signalweg eine gewisse Regenerationsaktivität ausgeht bzw. dieser vermutlich in der Lage ist, Degenerationsprozessen innerhalb des Meniskusgewebes entgegenzuwirken. In Anbetracht dessen ist es nicht überraschend, dass durch Überexpression der Signalmoleküle des TGF- β -Signalwegs Kollagen I erhöht ist, da es eine Grundkomponente des gesunden Meniskusgewebes darstellt. Es ist jedoch erstaunlich, dass die Überexpression des Signalmoleküls Smad1, welches einen Teil des BMP-Signalwegs

darstellt, in ähnlicher Weise die Kollagen I-Synthese beeinflusst, wie eine Überexpression des Signalmoleküls Smad2, welches ein Bestandteil des TGF- β -Downstream-Mechanismus ist. Eigentlich stehen diese beiden Signalwege, die beide zur TGF- β -Superfamilie gehören, in einer reziproken Beziehung zueinander (Gronroos et al. 2012). Die beobachtete synergistische Wirkung der beiden Signalwege in dieser Untersuchung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Rezeptoren nicht durch Ligandenbindung aktiviert worden sind und somit die R-Smads (Smad1, Smad2, Smad3) nicht phosphoryliert wurden. Es müsste also in weiterführenden Studien überprüft werden, ob der Einfluss der beiden Signalwege auf die Kollagen I-Synthese auch durch eine ligandenvermittelte Stimulation eine synergistische Wirkung zeigt. Auf der anderen Seite unterstreichen diese Befunde den Stammzellcharakter der MPCs.

Die Auswirkungen einer Überexpression der Signalmoleküle Smad1 und Smad4 sowie Smad2 und Smad4 auf die Kollagen II-Synthese zeigt die Abbildung 26. Hier ist dargestellt, dass eine Überexpression der Signalmoleküle Smad1 und Smad4 (BMP-Signalweg) in höherem Maße zur vermehrten Kollagen II-Synthese führt als die Überexpression der Signalmoleküle Smad2 und Smad4 (TGF- β -Signalweg). Dieses Ergebnis ist allerdings kontrovers zu vorausgehenden Studien, welche ergaben, dass der TGF- β -Signalweg eher für die chondrogene Differenzierung und der BMP-Signalweg eher für die osteogene Differenzierung von Bedeutung ist (Augst et al. 2008). Auch im Knorpelgewebe konnte von Koelling et al. belegt werden, dass CPCs innerhalb einer 3D-Kultur unter TGF- β 3-Substitution höhere Mengen an Kollagen II aufwiesen als die Kontrollen (Koelling et al. 2009). Diese Unstimmigkeit zwischen dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit und der Literatur lässt sich evtl. durch die fehlende Stimulation der TGF- β - und BMP-Rezeptoren erklären. Wie schon in der Einleitung beschrieben, werden die Rezeptoren, welche Kinaseaktivität besitzen, durch ihre Liganden aktiviert, und sie sind erst dadurch in der Lage, die R-Smad-Moleküle zu aktivieren. Jedoch liegt auch ohne Ligandenbindung eine gewisse endogene Aktivität der Rezeptoren vor, wie die Ergebnisse der Überexpression eindeutig zeigen. Es wäre also denkbar, dass eine unterschiedliche endogene Aktivität der TGF- β - und BMP-Rezeptoren der erwähnten Unstimmigkeit zugrundeliegt. In weiterführenden Untersuchungen sollten daher die obigen

Überexpressionsversuche durch eine ligandenabhängige Stimulation des TGF- β - und des BMP-Signalwegs ergänzt werden, um einen störenden Einfluss der endogenen Rezeptoraktivität ausschließen zu können.

4.7. Therapeutische Ausblicke und klinische Relevanz dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der TGF- β -Signalweg und dessen Smad-Signalmoleküle innerhalb von MPCs dargestellt werden. Sowohl auf zellulärer und Gewebeebene, als auch auf Gen- und Proteinebene wurden die Smad-Signalmoleküle nachgewiesen. Zudem zeigte sich auf Gen- und Proteinebene, dass die MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe eine höhere Expression der Smad-Signalmoleküle aufweisen als MPCs, die aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe stammen. Aus der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit entwickelte sich die Vermutung, dass dem TGF- β -Signalweg und seinen Smad-Signalmolekülen eine protektive Funktion in der Ausbildung und Entstehung eines Meniskusschadens zukommt. Da Meniskusdefekte häufig direkt mit einer Osteoarthrose im Kniegelenk assoziiert sind, spielt die Regeneration von Meniskusgewebe auch in der Prävention der Osteoarthrose eine zentrale Rolle. Um diese Vermutung zu bekräftigen, müssen jedoch zunächst weitere Fragen geklärt bzw. bestätigende Experimente, wie z.B. eine ligandenvermittelte Stimulation des Signalwegs, durchgeführt werden. Zudem sollten die Effekte des TGF- β -Signalwegs genauer untersucht werden, um herauszufinden, ob eine Stimulation dieses Signalwegs innerhalb der MPCs die Synthese von nativem Meniskusgewebe zur Folge hat. Wäre dies der Fall, würden die MPCs einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung von Meniskusdefekten darstellen. Möglicherweise könnte die Untersuchung der Transkriptionsfaktoren Runx2 und Sox9, die in der Regeneration von Knorpelgewebe innerhalb der CPCs eine zentrale Rolle spielen (Koelling et al. 2009), im Rahmen einer Stimulation des Signalwegs neue Erkenntnisse über die TGF- β -vermittelte Meniskusregeneration liefern. Wenn es gelingen würde, die MPCs zur Synthese von nativem Meniskusgewebe anzuregen, wäre dies in Zukunft eine interessante konservative Therapiealternative zu den interventionellen Verfahren und könnte vielseitig hinsichtlich

intraartikulärer Injektionen, autologer Knorpelzelltransplantationen oder *tissue engineering* angewendet werden.

Es bleibt jedoch weiterhin offen, ob der TGF- β -Signalweg die MPCs hinsichtlich der Synthese von nativem Meniskusgewebe beeinflussen kann. Die vorliegende Arbeit kann als Grundlage für weiterführende Experimente in dieser Richtung verwendet werden. Bevor jedoch der Manipulation des TGF- β -Signalwegs bezüglich der Meniskusregeneration klinische Bedeutung zukommen kann, bedarf es weiterer Untersuchungen hinsichtlich dieses Signalwegs und dessen Wirkung auf die MPCs.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten erstmals der TGF- β -Signalweg und dessen Smad-Signalmoleküle innerhalb der MPCs nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte sowohl auf zellulärer und Gewebeebene als auch auf Gen- und Proteinebene. Zusätzlich konnte auf Gen- und Proteinebene gezeigt werden, dass die Signalmoleküle Smad2, Smad3 und Smad4 in MPCs aus gering erkranktem Meniskusgewebe eine vermehrte Expression aufweisen im Vergleich zu den MPCs aus hochgradig erkranktem Meniskusgewebe. Diese Erkenntnis weist auf eine mögliche protektive Funktion des TGF- β -Signalwegs während degenerativer Prozesse im Meniskusgewebe hin. Um die Effekte des TGF- β -Signalwegs und dessen Smad-Signalmoleküle genauer zu verstehen und besser beschreiben zu können, wurde eine Überexpression der Smad-Signalmoleküle innerhalb von MPCs durchgeführt und die Auswirkungen dieser auf die Kollagen I- und Kollagen II-Synthese genauer beleuchtet. Infolgedessen konnte sowohl eine vermehrte Kollagen I-Synthese als auch eine vermehrte Kollagen II-Synthese festgestellt werden. Dies bestätigt die Annahme, dass dem TGF- β -Signalweg und dessen Smad-Signalmolekülen eine zentrale, protektive Funktion während der Meniskusdegeneration zukommt. Durch die vermehrte Synthese von Matrixkomponenten wird den Degenerationsprozessen innerhalb des Meniskusgewebes entgegengewirkt. Ein nicht degenerierter bzw. ein regenerierter Meniskus besitzt eine biomechanische Schutzfunktion für das Kniegelenk und wirkt somit einer Kniegelenkarthrose entgegen. In Zukunft könnte der TGF- β -Signalweg einen möglichen Ansatzpunkt für therapeutische Behandlungen bei Meniskusläsionen darstellen. Da Meniskusdefekte häufig direkt mit einer Osteoarthrose im Kniegelenk assoziiert sind, spielt die durch den TGF- β -Signalweg induzierte Regeneration von Meniskusgewebe auch in der Prävention der Osteoarthrose eine zentrale Rolle.

6. Anhang

6.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Protokoll des Einbettautomaten	S. 26
Tabelle 2:	Protokoll H.E.- Färbung	S. 27
Tabelle 3:	Immunhistochemie: Verwendete Primärantikörper	S. 31
Tabelle 4:	Western-Blot: Gelzusammensetzungen	S. 34
Tabelle 5:	Western-Blot: Verwendete Primärantikörper	S. 38
Tabelle 6:	Western-Blot: Verwendete Sekundärantikörper	S. 38
Tabelle 7:	PCR: Pipettierschema des Master-Mix-Ansatzes	S. 42
Tabelle 8:	PCR: RT-PCR-Protokoll	S. 42
Tabelle 9:	Gradienten-PCR: Pipettieransatz der Gradienten-PCR	S. 44
Tabelle 10:	Gradienten-PCR-Protokoll	S. 45
Tabelle 11:	PCR: Verwendete Primer	S. 46
Tabelle 12:	Immunzytochemie: Primäre Antikörper	S. 48
Tabelle 13:	Immunzytochemie: Sekundäre Antikörper	S. 48

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kraniale Darstellung des Kniegelenks.	S. 5
Abbildung 2:	Rekonstruktion der Faseranordnung innerhalb des Meniskus	S. 6
Abbildung 3:	5mm dicker Schnitt durch das mediale Kompartement des Knies.	S. 8
Abbildung 4:	Gefäßdarstellung des medialen (A) und lateralen (B) Meniskus mittels India Ink Färbung.	S. 9
Abbildung 5:	Regionale Unterschiede der Vaskularisierung und Zellpopulationen innerhalb des Meniskus.	S. 11
Abbildung 6:	Struktur eines R- Smad- Proteins modifiziert nach Shi und Massague 2003	S. 15
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des TGF- β -Signals von der Zellmembran zum Nukleus, modifiziert nach Shi und Massague 2003	S. 17
Abbildung 8:	Vektorkarten der Vektoren pCMV5 (A) und pcDNA3.1(+) (B)	S. 50
Abbildung 9:	Histologische Darstellung eines geringfügig erkrankten Meniskus in der H.E.-Färbung.	S. 53
Abbildung 10:	Histologische Darstellung hochgradig erkrankten Meniskusgewebes in der H.E.-Färbung.	S. 54
Abbildung 11:	Immunhistologischer Nachweis von Smad1- Signalmolekülen in hochgradig erkranktem Meniskusgewebe.	S. 55
Abbildung 12:	Immunhistologischer Nachweis von Smad2- und Smad3 - Signalmolekülen in verschiedenen Zonen innerhalb von hochgradig und geringgradig erkranktem Meniskusgewebe.	S. 56
Abbildung 13:	Immunhistologischer Nachweis von Smad4- Signalmolekülen in verschiedenen Zonen von hochgradig und geringgradig erkranktem Meniskusgewebe.	S. 58
Abbildung 14:	Immunhistochemischer Nachweis des TGF- β 3- Liganden in verschiedenen Zonen von gering- und hochgradig erkranktem Meniskusgewebe.	S. 59
Abbildung 15:	Immunzytochemie: Zelluläre Lokalisation der Smad1- Moleküle innerhalb der MPCs.	S. 60
Abbildung 16:	Immunzytochemie: Zelluläre Lokalisation der Smad2- und Smad3- Signalmoleküle innerhalb der MPCs.	S. 61

Abbildung 17:	Immunzytochemie: Zelluläre Lokalisation der Smad4-Signalmoleküle innerhalb der MPCs.	S. 62
Abbildung 18:	RT-PCR-Daten: relative Genexpressionslevel für die Signalmoleküle Smad1, Smad2, Smad3 und Smad4 in MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe.	S. 63
Abbildung 19:	Proteinnachweis der Smad1- Signalmoleküle mittels Western-Blot.	S. 64
Abbildung 20:	Proteinnachweis der Smad2- und Smad3- Signalmoleküle in MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe mittels Western-Blot.	S. 65
Abbildung 21:	Proteinnachweis von Smad4- Signalmolekülen in MPCs aus unterschiedlich stark erkranktem Meniskusgewebe mittels Western-Blot.	S. 66
Abbildung 22:	Nachweis der Smad1- Überexpression innerhalb transfizierter MPCs.	S. 67
Abbildung 23:	Nachweis der Smad2- Überexpression innerhalb transfizierter MPCs.	S. 68
Abbildung 24:	Nachweis der Smad4- Überexpression innerhalb transfizierter MPCs.	S. 69
Abbildung 25:	Auswirkung der Überexpression auf die Kollagen I-Synthese.	S. 70
Abbildung 26:	Auswirkung der Überexpression auf die Kollagen II-Synthese.	S. 71

7. Literaturverzeichnis

- Adams M E, Muir H (1981): The glycosaminoglycans of canine menisci. *Biochem J* 197(2),385-9.
- Andersson GBJ, Bouchard J, Bozick KJ et al., American Association of Orthopedic surgeons (2008): The burden of musculoskeletal diseases in the United States, 1. Auflage, Bone and Joint Decade, Rosemont, IL, USA, 71-96.
- Arnoczky S P, Warren R F (1982): Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med* 10(2),90-5.
- Ashraf S, Wibberley H, Mapp P I, Hill R, Wilson D, Walsh D A (2011): Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 70(3),523-9.
- Assimakopoulos A P, Katonis P G, Agapitos M V, Exarchou E I (1992): The innervation of the human meniscus. *Clin Orthop Relat Res* (275),232-6.
- Augst A, Marolt D, Freed L E, Vepari C, Meinel L, Farley M, Fajardo R, Patel N, Gray M, Kaplan D L, Vunjak-Novakovic G (2008): Effects of chondrogenic and osteogenic regulatory factors on composite constructs grown using human mesenchymal stem cells, silk scaffolds and bioreactors. *J R Soc Interface* 5(25),929-39.
- Barry F P, Murphy J M (2004): Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36(4),568-84.
- Blaney Davidson E N, Scharstuhl A, Vitters E L, Van Der Kraan P M, Van Den Berg W B (2005): Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther* 7(6),R1338-47.
- Blaney Davidson E N, Vitters E L, Van Der Kraan P M, Van Den Berg W B (2006): Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* 65(11),1414-21.
- Boumediene K, Conrozier T, Mathieu P, Richard M, Marcelli C, Vignon E, Pujol J P (1998): Decrease of cartilage transforming growth factor-beta receptor II expression in the rabbit experimental osteoarthritis--potential role in cartilage breakdown. *Osteoarthritis Cartilage* 6(2),146-9.
- Buckwalter J A, Saltzman C, Brown T (2004): The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res* (427 Suppl),S6-15.
- Bullough P G, Munuera L, Murphy J, Weinstein A M (1970): The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg Br* 52(3),564-7.

- Caplan A I (1991): Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5),641-50.
- Cheung H S (1987): Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 16(4),343-56.
- Collier S, Ghosh P (1995): Effects of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage* 3(2),127-38.
- Day B, Mackenzie W G, Shim S S, Leung G (1985): The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1(1),58-62.
- Derynck R, Gelbart W M, Harland R M, Heldin C H, Kern S E, Massague J, Melton D A, Mlodzik M, Padgett R W, Roberts A B, Smith J, Thomsen G H, Vogelstein B, Wang X F (1996): Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87(2),173.
- Derynck R, Zhang Y E (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425(6958),577-84.
- Dougados M (2001): The role of anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis: a European viewpoint. *Clin Exp Rheumatol* 19(6 Suppl 25),S9-14.
- Dyson S, Gurdon J B (1998): The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. *Cell* 93(4),557-68.
- Englund M, Guermazi A, Gale D, Hunter D J, Aliabadi P, Clancy M, Felson D T (2008): Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. *N Engl J Med* 359(11),1108-15.
- Felson D T (2006): Glucosamine and chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: where now? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(7),356-7.
- Furumatsu T, Kanazawa T, Yokoyama Y, Abe N, Ozaki T (2011): Inner meniscus cells maintain higher chondrogenic phenotype compared with outer meniscus cells. *Connect Tissue Res* 52(6),459-65.
- Ghadially F N, Lalonde J M, Wedge J H (1983): Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 136(Pt 4),773-91.
- Goldring M B, Birkhead J R, Suen L F, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J, Arbisser J L, Apperley J F (1994): Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 94(6),2307-16.
- Goldring M B, Goldring S R (2007): Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213(3),626-34.
- Gray H. (1974): Gray's Anatomy The unabridged Running Press Edition of the American Classic, Running Press, Philadelphia, USA, 276

- Gronroos E, Kingston I J, Ramachandran A, Randall R A, Vizan P, Hill C S (2012): Transforming growth factor beta inhibits bone morphogenetic protein-induced transcription through novel phosphorylated Smad1/5-Smad3 complexes. *Mol Cell Biol* 32(14),2904-16.
- Hellio Le Graverand M P, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hart D, Natsume T, Rattner J B (2001): The cells of the rabbit meniscus: their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat* 198(Pt 5),525-35.
- Herwig J, Egner E, Buddecke E (1984): Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 43(4),635-40.
- Hoberg M, Uzunmehmetoglu G, Sabic L, Reese S, Aicher W K, Rudert M (2006): [Characterisation of human meniscus cells]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 144(2), 172-8.
- Hunter D J, Zhang Y Q, Tu X, Lavalley M, Niu J B, Amin S, Guermazi A, Genant H, Gale D, Felson D T (2006): Change in joint space width: hyaline articular cartilage loss or alteration in meniscus? *Arthritis Rheum* 54(8),2488-95.
- Hunziker E B (2001): Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9(1),22-32.
- Ionescu L C, Lee G C, Huang K L, Mauck R L (2012): Growth factor supplementation improves native and engineered meniscus repair in vitro. *Acta Biomater* 8(10), 3687-94.
- 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(1),80-3.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland M S, Fu F H, Buranapanitkit B, Watkins S S, Huard J (2000): Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res* (370),272-85.
- Kettelkamp D B, Jacobs A W (1972): Tibiofemoral contact area--determination and implications. *J Bone Joint Surg Am* 54(2),349-56.
- Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path J R, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4(4),324-35.
- Kohn D, Moreno B (1995): Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study. *Arthroscopy* 11(1),96-103.
- Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J (1997): The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11(8),984-95.

- Liew A, Barry F, O'Brien T (2006): Endothelial progenitor cells: diagnostic and therapeutic considerations. *Bioessays* 28(3),261-70.
- Lo R S, Massague J (1999): Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nat Cell Biol* 1(8),472-8.
- Macias-Silva M, Abdollah S, Hoodless P A, Pirone R, Attisano L, Wrana J L (1996): MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87(7),1215-24.
- MacMullan P A, McCarthy G M (2010): The meniscus, calcification and osteoarthritis: a pathologic team. *Arthritis Res Ther* 12(3),116.
- Makris E A, Hadidi P, Athanasiou K A (2011): The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials* 32(30),7411-31.
- Massague J, Chen Y G (2000): Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14(6), 627-44.
- Mauck R L, Byers B A, Yuan X, Tuan R S (2007): Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech Model Mechanobiol* 6(1-2),113-25.
- Mauck R L, Yuan X, Tuan R S (2006): Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage* 14(2),179-89.
- McDevitt C A, Webber R J (1990): The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res* (252),8-18.
- Melrose J, Smith S, Cake M, Read R, Whitelock J (2005): Comparative spatial and temporal localisation of perlecan, aggrecan and type I, II and IV collagen in the ovine meniscus: an ageing study. *Histochem Cell Biol* 124(3-4),225-35.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin C H (2001): Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 114(Pt 24),4359-69.
- Paletta G A, Jr., Manning T, Snell E, Parker R, Bergfeld J (1997): The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study. *Am J Sports Med* 25(5),692-8.
- Patterson G I, Padgett R W (2000): TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet* 16(1),27-33.
- 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 D E, Gamer L W, Cox K A, 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(11),1816-26.
- Pelletier J P, Roughley P J, Dibattista J A, Mccollum R, Martel-Pelletier J (1991): Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum* 20(6 Suppl 2),12-25.
- Petersen W, Tillmann B (1995): Age-related blood and lymph supply of the knee menisci. A cadaver study. *Acta Orthop Scand* 66(4),308-12.
- Petersen W, Tillmann B (1999): Structure and vascularization of the knee joint menisci. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 137(1),31-7.
- Qin B Y, Chacko B M, Lam S S, De Caestecker M P, Correia J J, Lin K (2001): Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Mol Cell* 8(6),1303-12.
- Redini F, Mauviel A, Pronost S, Loyau G, Pujol J P (1993): Transforming growth factor beta exerts opposite effects from interleukin-1 beta on cultured rabbit articular chondrocytes through reduction of interleukin-1 receptor expression. *Arthritis Rheum* 36(1),44-50.
- Schroepel J P, Crist J D, Anderson H C, Wang J (2011): Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 26(3),377-94.
- Scott P G, Nakano T, Dodd C M (1997): Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys Acta* 1336(2),254-62.
- Sekelsky J J, Newfeld S J, Raftery L A, Chartoff E H, Gelbart W M (1995): Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139(3),1347-58.
- Shi Y (2001): Structural insights on Smad function in TGFbeta signaling. *Bioessays* 23(3),223-32.
- Shi Y, Massague J (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6),685-700.
- Starke C, Kopf S, Petersen W, Becker R (2009): Meniscal repair. *Arthroscopy* 25(9), 1033-44.
- Sweigart M A, Athanasiou K A (2001): Toward tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng* 7(2),111-29.
- Tanaka T, Fujii K, Kumagae Y (1999): Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 7(2),75-80.

- Thompson W O, Thaete F L, Fu F H, Dye S F (1991): Tibial meniscal dynamics using three-dimensional reconstruction of magnetic resonance images. *Am J Sports Med* 19(3),210-5; discussion 215-6.
- Van Beuningen H M, Van Der Kraan P M, Arntz O J, Van Den Berg W B (1994): Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Lab Invest* 71(2),279-90.
- Verdier M P, Seite S, Guntzer K, Pujol J P, Boumediene K (2005): Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int* 25(2), 118-24.
- Walker P S, Erkman M J (1975): The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop Relat Res* (109),184-92.
- Wieland H A, Michaelis M, Kirschbaum B J, Rudolphi K A (2005): Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* 4(4),331-44.
- Wilson P A, Lagna G, Suzuki A, Hemmati-Brivanlou A (1997): Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development* 124(16),3177-84.
- Wu J W, Hu M, Chai J, Seoane J, Huse M, Li C, Rigotti D J, Kyin S, Muir T W, Fairman R, Massague J, Shi Y (2001): Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 8(6),1277-89.
- Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng C X (2001): TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153(1),35-46.
- Zhang Y, Jordan J M (2010): Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 26(3), 355-69.
- Zimny M L, Albright D J, Dabezies E (1988): Mechanoreceptors in the human medial meniscus. *Acta Anat (Basel)* 133(1),35-40.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für seine stets geduldige Unterstützung bei der Erarbeitung und Durchführung dieser Dissertation. Auch danke ich ihm, dass er es mir ermöglicht hat, einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten innerhalb eines Labors zu erhalten.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Frau Christa Bode für die geduldige Einarbeitung, Unterstützung und Ermutigung. Zusätzlich bedanke ich mich dafür, dass sie mir während der gesamten Zeit im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Bogusha Sadowski danke ich für ihre Unterstützung bei den immunhistochemischen Methoden.

Bei Herrn Hayat Muhammad möchte ich mich ganz herzlich für die Anregungen und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. med. dent. Boris Schminke und Herrn Gökhan Cingöz danke ich für ihre geduldige Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor.

Meinen Mitdoktoranden -und ganz besonders Frau Elke Henze- danke ich für das super Arbeitsklima und die wirklich immer gute Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Mein Name ist Julius Albert, wohnhaft in der Wilhelmstraße 45 in 35392 Gießen. Am 16. März 1987 wurde ich als einziges Kind meiner Eltern Annemarie Kutscher- Albert und Bernd Albert in Marburg geboren. Meine Mutter, geboren am 21. Januar 1952, war Lehrerin für Politik und Wirtschaft an einer Berufsschule in Gießen und mein Vater, geboren am 15. September 1946, ist Volksdiplomwirt.

Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Ludwig- Uhland- Grundschule in Gießen. Danach wechselte ich auf die Gesamtschule- Gießen- Ost, an der ich im Jahr 2006 mein Abitur ablegte.

Nachdem ich ein dreimonatiges Pflegepraktikum auf der allgemeinchirurgischen Station des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt hatte, absolvierte ich eine zweimonatige Ausbildung zum Rettungssanitäter, welche ich im Sommer 2007 erfolgreich abgeschlossen habe.

Im Oktober 2007 immatrikulierte ich mich für das Studium der Humanmedizin an der Georg- August- Universität in Göttingen und legte im März 2010 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum) ab. Meine Famulaturen absolvierte ich in den Fachbereichen der Orthopädie, der Gastroenterologie, der Inneren Medizin, der Chirurgie und der Allgemeinmedizin. Im August 2012 begann ich in der Abteilung Prothetik, AG orale Biologie und Geweberegeneration unter der Leitung von Prof. Dr. med. N. Miosge, mit den Forschungsarbeiten an meiner Dissertation mit dem Thema „Die Rolle des TGF- β -Signalwegs in humanen Meniskusprogenitorzellen und im Meniskusgewebe“.

Das Staatsexamen der Humanmedizin werde ich voraussichtlich im Wintersemester 2014 ablegen.