

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. MED. DR. BIOL. HOM. VOLKER ALT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleichende Charakterisierung meniskaler Progenitorzellen in der äußeren
und inneren Zone osteoarthritischer Menisken – Isolation mittels differentieller
Fibronektin-Adhäsion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Henrik Heuer

2025

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR UNFALLCHIRURGIE
PROF. DR. MED. DR. BIOL. HOM. VOLKER ALT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vergleichende Charakterisierung meniskaler Progenitorzellen in der äußeren
und inneren Zone osteoarthritischer Menisken – Isolation mittels differentieller
Fibronektin-Adhäsion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Henrik Heuer

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Angele
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ernst Michael Jung
Tag der mündlichen Prüfung:	22. Oktober 2025

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung	IV
1 Einleitung	1
1.1 Stand der Forschung	1
1.1.1 Der Meniskus: Funktion, Anatomie und klinische Herausforderungen	1
1.1.2 Humane mesenchymale Stromazellen	3
1.1.3 Meniskale Progenitorzellen	4
1.1.4 Fibronektin als Stammzellnischen-assoziiertes Protein	6
1.2 Fragestellung und Zielsetzung	7
1.3 Hypothese	7
2 Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.1.1 Antikörper, Chemikalien und Reagenzien	8
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	9
2.1.3 Geräte und Hilfsmittel	9
2.1.4 Software	10
2.1.5 Lösungen und Puffer	10
2.1.5.1 Immunhistochemie	11
2.1.5.2 Koloniebildungs-Assay	11
2.1.5.3 Alizarin-Färbung	11
2.1.5.4 Ölrot O Färbung	12
2.1.5.5 DMMB-Färbung	12
2.1.5.6 Safranin O/Fast Green-Färbung	12
2.1.6 Medien	12
2.1.6.1 Meniskus-Aufarbeitung	12
2.1.6.2 Proliferationsmedium für Meniskuszellen	13
2.1.6.3 Osteogene Differenzierung	13
2.1.6.4 Adipogene Differenzierung	13
2.1.6.5 Chondrogene Differenzierung	14
2.2 Methoden	14
2.2.1 Histologie	14
2.2.1.1 Anfertigung von Gewebeschnitten	14
2.2.1.2 Immunhistochemie	15

2.2.1.3	Dimethylmethylenblau-(DMMB)-Färbung	16
2.2.1.4	Safranin O/Fast Green Färbung	16
2.2.2	Meniskusakquirierung	17
2.2.3	Meniskusverarbeitung und -verdau	17
2.2.4	Fibronectin-Adhäsions-Assay	18
2.2.5	Klonselektion und -isolation	19
2.2.6	Zellexpansion der Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen	19
2.2.7	Zellexpansion der nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen	20
2.2.8	Populations-Verdopplungszeiten (PD)	20
2.2.9	Bildanalyse	20
2.2.10	Weitere grundlegende Methoden der Zellkultur	21
2.2.10.1	Zellauszählung und Resuspendierung	21
2.2.10.2	Trypsinieren von Zellen	21
2.2.10.3	Einfrieren von Zellen	22
2.2.10.4	Auftauen von Zellen	22
2.2.10.5	Medienwechsel	23
2.2.11	Koloniebildungs-Assay	23
2.2.12	Differenzierungsassays	24
2.2.12.1	Osteogenese	24
2.2.12.1.1	Osteogene Differenzierung	24
2.2.12.1.2	Alizarin Rot Färbung	24
2.2.12.2	Adipogenese	25
2.2.12.2.1	Adipogene Differenzierung	25
2.2.12.2.2	Ölrot O Färbung	25
2.2.12.3	Chondrogenese	26
2.2.12.3.1	Chondrogene Differenzierung (3D-Kultur)	26
2.2.12.3.2	Ernten und Behandlung der Pellets	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Allgemeine Daten zu den verwendeten Menisken	27
3.2	Immunhistochemische Färbungen von Meniskusgewebe	28
3.3	Analyse von nicht-Fibronectin-adhärenenten vaskulären und avaskulären Meniskuszellen	29
3.3.1	Meniskusverdau und Kulturverhalten	29
3.3.2	Koloniebildungskapazität	31
3.3.3	Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung	33
3.4	Analyse von Fibronectin-adhärenenten vaskulären und avaskulären Meniskuszellen	35
3.4.1	Zellmorphologie im Kulturverlauf	35
3.4.2	Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung	36

4	Diskussion	39
4.1	Einordnung der Ergebnisse	39
4.2	Klinische Anwendung und Ausblick	42
4.3	Wissenschaftliche Limitationen	44
5	Zusammenfassung	45
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang	51
7.1	Abkürzungsverzeichnis	51
7.2	Abbildungsverzeichnis	53
7.3	Tabellenverzeichnis	54
	Danksagung	55
	Selbstständigkeitserklärung	56

Vorbemerkung

Es folgt die Dissertationsschrift zu meiner Promotion zum Doktor der Medizin im Labor für experimentelle Unfallchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Denitsa Docheva. Doktorvater ist Prof. Dr. Peter Angele – betreut wurde die Arbeit durch Dr. Girish Pattappa. Die praktische Laborarbeit wurde durch die biologisch-technische Assistentin Ruth Schewior unterstützt.

Die Arbeit ist Teil des von der EU geförderten Projektes „MEFISTO“. Eine Reihe von Universitäten, Forschungseinrichtungen und Unternehmen haben sich mit dem Ziel vernetzt, verschiedene innovative Strategien zur Rekonstruktion des Meniskus und Verhinderung einer Entstehung beziehungsweise eines Fortschreitens von Osteoarthritis nach Menisektomie zu entwickeln. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission der Universität Regensburg liegt vor (18-83-101).

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Der Meniskus: Funktion, Anatomie und klinische Herausforderungen

Die Menisken sind paarige, semilunare, fibrokartilaginöse Strukturen, die intraartikulär zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau liegen und einen wichtigen Beitrag zu der komplexen Biomechanik und der langfristigen Gesundheit des Kniegelenks leisten. Sie tragen entscheidend zur Lastübertragung, Stoßdämpfung und Erhöhung der Gelenkstabilität sowie -kongruenz bei, außerdem zur Gelenkernährung und -schmierung sowie zur Propriozeption. Während die embryonalen und heranwachsenden kindlichen Menisken noch ausgeprägte Vaskularität aufweisen, nimmt bis zum Erreichen des Erwachsenenalters bedingt durch die mechanische Krafteinwirkung die Durchblutung insbesondere im inneren Meniskusanteil stetig ab. Bei einem Erwachsenen werden lediglich noch die äußeren 10 bis 30 Prozent des medialen und die äußeren 10 bis 25 Prozent des lateralen Meniskus über einen aus der Arteria poplitea stammenden premeniskalen Kapillarplexus versorgt und werden als rot-rote Zone bezeichnet. Die inneren 70 bzw. 75 bis 90 Prozent der ausgewachsenen Menisken werden nur über die Synovialflüssigkeit und deren Verteilung bei Gelenkbewegung ernährt – es ist von der weiß-weißen Zone die Rede. Der Übergangsbereich zwischen beiden Bereichen wird als rot-weiße Zone bezeichnet (1). Abbildung 1 stellt schematisch die Menisken im Kniegelenk dar (2).

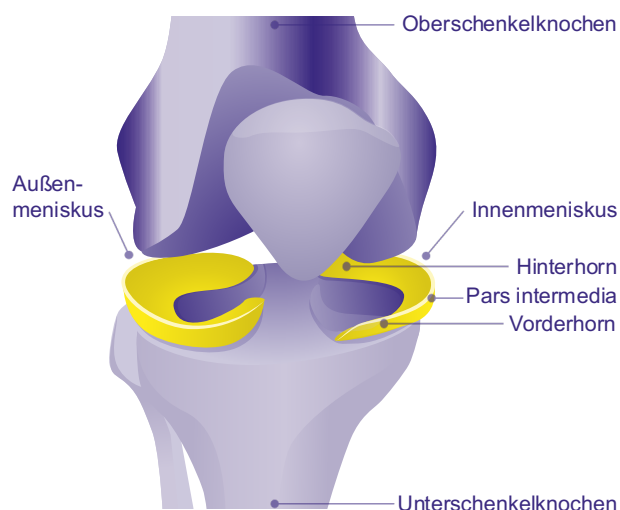


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Menisken im Kniegelenk ohne ligamentäre Strukturen (2).

Bei Meniskusläsionen wird zwischen traumatischen und degenerativen Läsionen unterschieden. Für das Erleiden von traumatischen Meniskusläsionen prädisponiert die Ausübung einiger Sportarten, wie beispielsweise Fußball und Rugby (3). Die Inzidenz degenerativer Meniskusläsionen nimmt mit steigendem Alter zu (4–6), weitere Risikofaktoren stellen das männliche Geschlecht, Übergewicht bzw. Adipositas oder auch arbeitsbedingtes häufiges Hinknien bzw. in die Hocke gehen sowie extensives Treppensteigen dar (3,7).

Der Kliniker muss in Zusammenschau der klinischen Untersuchung, geeigneter Bildgebung, der individuellen Voraussetzungen des Patienten sowie der jeweiligen Läsion eine optimale Behandlungsstrategie erarbeiten und dabei zwischen einer konservativen sowie einer operativen Therapie abwägen. Operativ werden hauptsächlich drei Methoden angewandt: eine arthroskopisch durchgeführte Meniskusteilresektion, eine Meniskusreparatur mit oder ohne Augmentations-Techniken, sowie eine Meniskusrekonstruktion, beispielsweise mit Scaffolds oder Allotransplantaten (8).

Es ist bekannt, dass Meniskusläsionen und insbesondere die in der Vergangenheit häufig konsekutiv durchgeführten Meniskustotalresektionen neben einer langfristigen Schmerzentwicklung und Entkräftigung des Kniegelenks auch einen bedeutenden Risikofaktor für die Destruktion des Gelenkknorpels und somit der Entstehung und des Fortschreitens einer Gonarthrose darstellen (9–12). Daher geht in den letzten Jahren die Entwicklung immer mehr in die Richtung, möglichst viel Meniskusgewebe zu bewahren (13,14).

Während Läsionen in der äußeren, vaskularisierten Zone eine gute Heilungskapazität aufweisen und mit hoher Erfolgsrate genäht werden können, stellen insbesondere Läsionen in der avaskulären, inneren Zone des Meniskus bis heute eine große Herausforderung dar (15).

Aufgrund der negativen mittel- und langfristigen Auswirkungen einer Meniskusteilresektion auf die Gelenkgesundheit und der abzusehenden hohen Belastung des Gesundheitswesens wird viel an Meniskusgewebe-schonenden Behandlungsansätzen gearbeitet.

Während zum Beispiel lokale Applizierung von VEGF zur Förderung der Angiogenese und Gefäßeinsprossung nicht wie erhofft zu einer verbesserten Heilung, sondern im Gegenteil wohl zu einer Versteifung und somit Verschlechterung der Gewebearchitektur führt (16,17), scheint die Erforschung verschiedener für die Meniskusreparatur bzw. -rekonstruktion in Frage kommender Biomaterialien und Gewebearten sowie zellbasierter Strategien vielversprechender zu sein.

1.1.2 Humane mesenchymale Stromazellen

Innerhalb dieses Feldes haben sich einige Studien auf die Erforschung der Tauglichkeit von Zellen mit Stammzeleigenschaften, insbesondere von aus dem Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Stromazellen (MSCs) zur Meniskusregeneration konzentriert. Neben dem Knochenmark lassen sich mesenchymale Stromazellen auch aus anderen ausgewachsenen Organen und Geweben isolieren (18).

Die Minimalkriterien zur Definition mesenchymaler Stromazellen wurden dabei im Jahr 2006 von der Internationalen Gesellschaft für zelluläre Therapie festgelegt. Diese umfassen die Fähigkeit, spezifische Oberflächenantigene zu exprimieren (unter anderem CD73, CD90 und CD 105), die Fähigkeit auf Plastik zu adhären und die Fähigkeit multipotent in Fett-, Knochen- und Knorpelgewebe zu differenzieren (19). Weiterhin zeichnen sie sich durch Selbsterneuerungskapazität, sowie migratorische und immunmodulatorische Fähigkeiten aus (20,21). Abbildung 2 zeigt übersichtsweise und stark vereinfacht, wie sich mesenchymale Stammzellen in mehreren Differenzierungsschritten in verschiedene Richtungen entwickeln können (22).

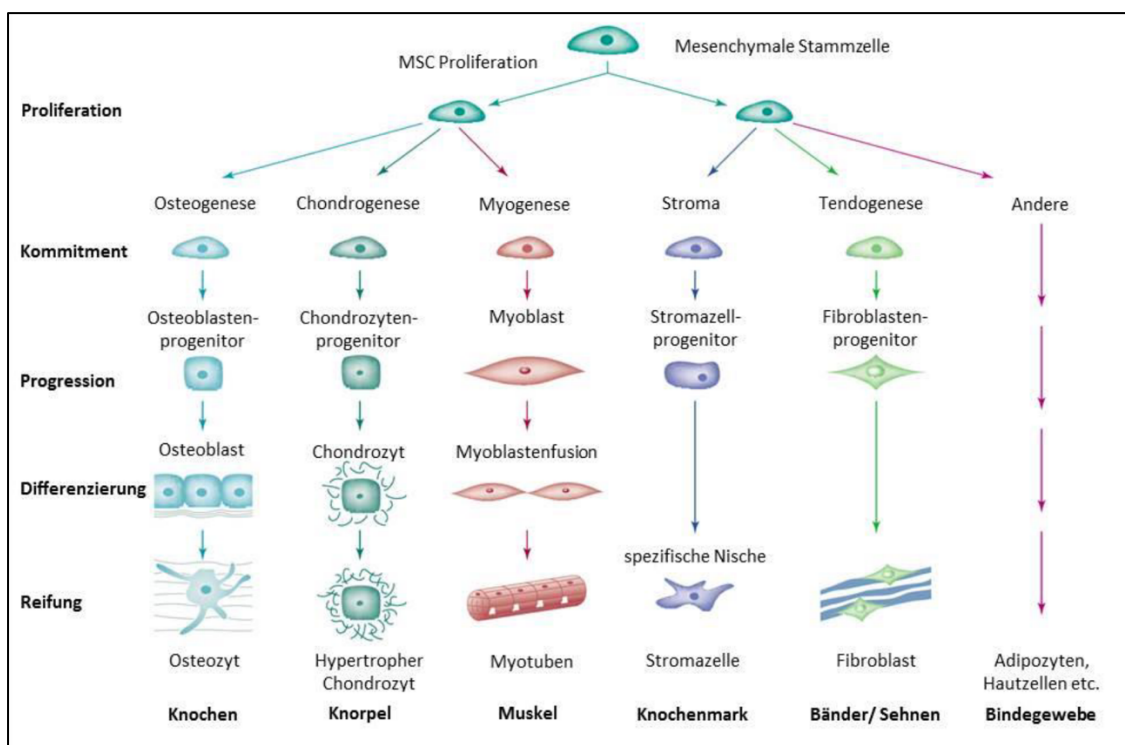


Abbildung 2: Überblick des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stromazellen (nach Caplan et al. 2001 (22)).

Das sich in den bisherigen Studien abzeichnende durchaus vielversprechende Potential von mesenchymalen Stromazellen für die Meniskusreparatur muss zunächst in weiteren Studien an humanen Meniskusrissen reproduziert und bewiesen werden, außerdem fehlt es bis dato an einer Standardisierung von Isolationsprotokollen sowie der Isolationsgewebe (23,24). Vor einer möglichen klinischen Anwendung in einigen Jahren muss beleuchtet werden, ob und wie genau die applizierten Zellen zu einer Regeneration beitragen (23,24). Zudem muss sichergestellt werden, dass die Möglichkeit unerwünschter Nebenwirkungen, wie zum Beispiel durch bei einer Kultur der Zellen auftretende Infektionen oder falsche bzw. überschießende Differenzierung und Vermehrung im Zielgewebe, minimiert wird (25).

1.1.3 Meniskale Progenitorzellen

Ein weiterer Forschungsansatz beschäftigt sich mit der Verwendung von Meniskuszellen. Diese Strategie wurde bereits analog bei Versuchen zur Regeneration von Gelenkknorpel verfolgt (26). Es wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen, dass sich auch aus Menisken Zellen mit Stammzeleigenschaften, wie der Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren oder Kolonien zu bilden, isolieren lassen (27,28). Interessanterweise konnten solche Zellen sowohl in der äußeren als auch in der inneren Zone nachgewiesen werden (29). Tabelle 1 zeigt übersichtsweise Ergebnisse der bisherigen Studien zur Isolation von meniskalen Progenitorzellen.

Die Mehrheit der Arbeitsgruppen griff auf einen enzymatischen Verdau von Meniskusgewebe zur Isolation der Zellen zurück – eine weitere angewendete Methode machte sich die migratorischen Fähigkeiten der Zellen zunutze, indem das ganze bzw. zerkleinertes Gewebe einer Kultur zugeführt und herauswachsende Zellen mithilfe von Trypsin abgelöst wurden (30,31).

Diese Zellen – deren Nomenklatur übrigens bis jetzt uneinheitlich ist und von „aus Meniskus-stammende (mesenchymale) Stammzellen“ (28,30) über „aus Meniskus-stammende Stromazellen“ (32), bis zu „meniskalen (Stamm-/Progenitor-)Vorläuferzellen“ (30,31,33) reicht – könnten einen weiteren vielversprechenden Ansatz in der Therapie von Meniskusrissen in der inneren, avaskulären Zone darstellen.

Tabelle 1: Übersicht der Studienlage zu meniskalen Progenitorzellen.

Publikation	Spezies	Isolationsmethode	Lokalisation	Osteogenese	Adipogenese	Chondrogenese	(Oberflächen-) Marker	Weitere festgestellte Eigenschaften
Mauck et al. 2007	Rind, 3–6 Monate alt	7–14 Tage Kultur von Gewebestückchen (1–2 mm ³), Trypsinierung herauswachsender Zellen	Äußere, innere und Hornregion	Genexpression (+) (A > I > H), Färbung (+) (I u. H minimal)	Genexpression (+), Färbung (+) (A & H mehr)	Genexpression (+)	/	Charakteristische Morphologie der herauswachsenden Zellen: Außen – spindelförmig, Innen – leicht gerundet/polygonal
Segawa et al. 2008	Mensch, vor TEP	Gewebeverdaу ganzer Menisken mit Kollagenase (3 mg/ml, 5h); 17/170/1700 Zellen/cm ²	/	Färbung (+)	Färbung (+)	Färbung (+)	(+) CD90, CD105, CD166, CD44; (-) CD34, CD45	Im Vergleich zu adulten Stammzellen anderer Bindegewebe stärkere Expression von Glykoprotein PRELP
Shen et al. 2013	Kaninchen	Gewebeverdaу ganzer Menisken mit Kollagenase (3 mg/ml, 6h), 2 Zellen/cm ²	/	Färbung (+)	Färbung (+)	Färbung (+)	(-) MHC-II	Geringe Immunogenität und sogar immunsuppressive Funktion; Zellkolonien heterogen in Größe, Form und Zelldichte (in P0 überwiegend polygonal/sternförmige Zellen, in höheren Passagen „MSC-ähnlich“)
Shen et al. 2014	Mensch	Gewebeverdaу ganzer Menisken mit Kollagenase (3 mg/ml, 5h); anschließend monoklonale Isolation	/	Färbung (+)	Färbung (+)	Färbung (+)	(+) CD90, CD105, CD166, CD44; (-) CD34, CD45	35% aller isolierten Meniskuszellen formten runde Kolonien (größerer Anteil als in anderen Geweben), Höhere Expression von Koll. Typ II in men. Progenitorzellen als in MSCs aus dem Knochenmark
Muhammad et al. 2014	Mensch, frühe OA/OA	7- bis 10-tägige Inkubation von Meniskusstückchen (weiße Zone, 2–3 mm ³), Verdaу mit Kollagenase I/II und Dispase (6h at 37°C)	Innere Meniskuszone (weiß-weiß)	Färbung (+)	Genexpression (+), Färbung (+)	Genexpression (+),	(+) STRO-1, CD105, CD106, CD29, CD90; (-) CD45, CD34;	Lenkung der meniskalen Progenitorzellen über kanonischen TGF-β Signalweg; charakteristisches Pattern an Stammzellmarkern und Fähigkeit, Kollagen Typ 1 und 2 zu bilden (im Vergleich zu chondrogenen Progenitorzellen),
Ding et al. 2015	Kaninchen	Verdaу von Meniskusstückchen (1 mm ³) mit Kollagenase u. Dispase (1 h bei 37 °C)	/	Genexpression (+), Färbung (+) (im Vgl. zu MSCs aus KM beides geringer)	Genexpression (+), Färbung (+), Western-Blot (+) (im Vgl. zu MSCs aus KM ähnlich)	Genexpression (+), Färbung (+) (im Vgl. Zu MSCs aus KM beides ausgeprägter)	(+) SSEA-4, Nanog, nucleostemin, STRO-1, CD44, CD90; (-) CD34;	Im Vgl. zu MSCs aus Knochenmark: Kolonien men. Progenitorzellen deutlich kleiner und langsamer wachsend, weniger Expression von CD34, ausgeprägtere Tendenz zur chondrog. Differenzierung (MSCs mit größerem osteogenem Potential)
Gui et al. 2015	Kaninchen	Verdaу von Meniskus mit Kollagenase	/	Genexpression (+)	Genexpression (+)	Genexpression (+)	/	Starke Expression von Kollagen Typ II, Tendenz in Richtung chondrogene Differenzierung
Huang et al. 2016	Kaninchen, 8–10 Wochen	Verdaу von Meniskusstückchen (1 mm ³) mit Kollagenase u. Dispase (1h bei 37 °C), 750 Zellen/cm ² und monoklonaler Isolation	/	Genexpression (+), Färbung (+) (im Vgl. zu MSCs aus KM beides geringer)	Genexpression (+), Färbung (+), (im Vgl. zu MSCs aus KM ähnlich)	Genexpression (+), Färbung (+) (im Vgl. Zu MSCs aus KM beides ausgeprägter)	(+) CD44, CD73, CD90, CD105; (-) CD31, CD34, CD45	Morphologie: polygonal/gerundet auch nach langer Kulturdauer, Kolonienmorphologie: heterogene Größe und Zelldichte (Hinweis auf unterschiedliche Zellteilungsraten, Populationsverdopplungszeit kürzer als bei Fibrochondrozyten)
Fu et al. 2016	Mensch, Debris, medianes Alter 37	Gewebeverdaу mit Kollagenase (3 mg/ml, 5h);	/	Genexpression (+), Färbung (+)	Genexpression (+), Färbung (+)	Genexpression (+), Färbung (+)	(+) CD44, CD90, CD105; (-) CD34, CD45	Morphologie: fibroblastenähnlich, charakteristischer mesenchymaler Phänotyp ohne hämatopoetische Oberflächenmarker
Gamer et al. 2016	Maus	Migration von Zellen aus Kultur von gesamtem Meniskusgewebe	Äußere Zone und superfizielle Zone	Färbung (+)	Färbung (+)	Färbung (+)	(+) CD44, Sca-1; (-) CD105, CD34	Ca. 2–3 % der herauswachsenden Zellen haben klonogene Kapazität, Kolonien mit variabler Größe/Zelldichte/Morphologie; starke rel. Expression von Biglykan, Koll. Typ I, Lox und Igf-1
Seol et al. 2017	Rind, 15–24 Monate	10-tägige Gewebekultur von absichtlich verletzten und mit Fibrinhydrogel gepatchten Menisken Trypsinierung (10 min) herauswachsender Zellen	Äußere und innere Zone	Färbung (+) (20–30 % der Zellen)	Nur leichte Färbung (<5 % der Zellen)	Intensive Färbung	(+) CD44, Notch	Herauswachsende Zellen sowohl in intakten als auch in verletzten Menisken; 8,4-mal mehr in äußerer im Vergleich zu innerer Zone; im Vgl. zu Meniskuszellgesamtheit: Unterregulation von CHAD u. COL2A1 (Chondrozytenmarker), Überregulation von Col1A2, IL8 u. MMP9
Sun et al. 2020	Mensch	Verdaу von Meniskusstückchen mit 4 mg/ml Protease (1 h) und 2 mg/ml Kollagenase P (6–10 h)	/	Färbung (+)	Färbung (+)	/	(+) CD146	Beschreibung von meniskalen Progenitorzellen als CD146-positiv – auch die CD93-positiven meniskalen Endothelzellen weisen Stammzeleigenschaften auf. Degenerative Menisken mit positiver Safranin O Färbung (im Vgl. zu gesunden)
Chahla et al. 2021	Mensch, mittleres Donoralter 21	Verdaу von Meniskusstückchen (1mm ³) mit Pronase 2mg/ml für 1 h und Kollagenase 2mg/ml für 18 h	Rot-rote, rot-weiße und weiß-weiße Zone	Genexpression (+),	Färbung (+)	Färbung (+)	(+) CD44, CD 105, CD 29, CD 90	Darstellung von Vaskularisation auch in der weiß-weißen Zone; größerer Anteil an Zellen mit MSC Oberflächenmarkerprofil in der weiß-weißen Zone im Vergleich zu den anderen
Korper shock et al. 2021	Mensch, OA-Menisken	Verdaу und anschließend differentielle Fibronektin-Adhäsion	Äußere und innere Zone	Färbung (+)	Färbung (+)	Färbung (+)	(+) CD105, CD73, CD 90; HLA-DR (-) CD45, CD34, CD11b, CD79	Keine spezifischen Marker zur Differenzierung von meniskalen Progenitor- und anderen Meniskuszellen vorhanden

1.1.4 Fibronectin als Stammzellnischen-assoziiertes Protein

Fibronectin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das an vielen physiologischen Prozessen, wie Wundheilung und embryologische Entwicklung, sowie Zelladhäsion, Migration oder Differenzierung beteiligt ist (34).

Der extrazellulären Matrix, sowie im Speziellen der Stammzellnische – von der Fibronectin ebenfalls ein Teil ist – wird eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der Stammzellschicksale zugeschrieben. Über Zelladhäsionsrezeptoren, wie beispielsweise sogenannte Integrine, können neben Fibronectin auch andere extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen und Laminin, gebunden werden. So können Zellkontakte ermöglicht und Signale hinsichtlich Zellfunktionen wie Proliferation, Migration, Überleben und Differenzierung übermittelt werden (35).

Diese Erkenntnis führte zu der Hypothese, dass eine Imitierung der Stammzellnische zu einer verbesserten Stammzellexpansion und kontrollierteren Differenzierung *in vitro* beitragen könnte. Auf die besondere Rolle von Fibronectin für die Stammzellnische in verschiedenen Gewebearten des Körpers weisen mehrere Studien hin. Jones et al. machte im Jahr 1993 die Beobachtung, dass aus der Epidermis stammende Zellen, welche nach einer gewissen Zeit auf Fibronectin-beschichtetem Plastik adhärieren eine höhere Koloniebildungs-Effizienz besitzen als die Vergleichspopulation. Eine Übertragung dieser Methodik auf Knorpelgewebe durch Williams et al. Im Jahr 2010 brachte anschließend die Erkenntnis, dass durch Fibronectin-Adhäsion isolierte Knorpelzellen im Gegensatz zu Zellen in einer normalen Massen-Monolayerkultur in der Lage sind, bei Expansion unter starker Vermehrung einen Knorpel-Phänotyp beizubehalten. Beide Ergebnisse weisen auf einen ausgeprägteren Stammzellcharakter der jeweils auf Fibronectin adhärierenden Zellen hin (36). Darüber hinaus zeigte eine Aussäung von mesenchymalen Stammzellen auf Fibronectin eine schnellere Migration mit vermehrtem Ausbreiten im Vergleich zur Aussäung auf einer Glasoberfläche (37). Weiterhin wurde gezeigt, dass verminderte Fibronectin-Level in der Stammzellnische des gealterten Muskels die Regenerationsfähigkeit und die Funktion von muskulären Stammzellen negativ beeinflussen und dass zudem eine Remobilisierung der muskulären Stammzellen sowie Wiedereinsetzen einer jugendhaften Regenerationsfähigkeit des Muskels durch Wiederherstellung höherer Fibronectin-Level zu erreichen ist (38).

All diese Arbeiten zu verschiedenen Gewebearten des menschlichen Körpers machten neugierig, wie es um die Rolle der Stammzellnische und insbesondere der Rolle von Fibronectin im meniskalen Setting steht. Zu dieser Thematik waren nach unserem

Wissensstand zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns keine Arbeiten publiziert. Im Jahr 2021 zeigten schließlich Korpershoek et al. als Erstes, dass tatsächlich mittels differenzialer Fibronectin-Adhäsion eine meniskale Zellpopulation mit vielversprechenden Stammzeleigenschaften isoliert werden kann (39).

1.2 Fragestellung und Zielsetzung

Es sollte herausgefunden werden, ob Meniskuszellen, welche direkt nach Isolation aus dem Gewebe mit Fibronectin-beschichteten Plastikplatten in Kontakt kommen, hinsichtlich ihrer potenziellen Stammzeleigenschaften von Meniskuszellen, welche nur mit Plastik in Berührung kommen, Unterschiede aufweisen. Die verschiedenen Zellpopulation sollten unter Kulturbedingungen bei 37 °C expandiert und unter Zuhilfenahme verschiedener Assays und Verfahren vergleichend charakterisiert werden. Dies beinhaltete neben einer morphologischen Analyse des Zellphänotyps im Laufe der Kultur auch Immunhisto- und -zytochemischen Färbungen, Colony-forming Unit (CFU) Assays sowie dreilinige Differenzierungsassays in Knochen-, Fett- und Knorpelgewebe.

Durch Separierung der äußeren und inneren Meniskuszone wurde dabei versucht, weitere Erkenntnisse über eine exaktere Lokalisation der bereits in mehreren Studien nachgewiesenen meniskalen Progenitorzellen zu gewinnen.

Ein nicht unerheblicher Teil der praktischen Arbeit bestand in der Anpassung, Standardisierung und weiteren Etablierung der verschiedenen oben genannten Protokolle. Durch den Einbezug von Menisken von Patienten, die vor einem Gelenkersatz stehen, wurde ein Fokus auf tendenziell degeneratives Meniskusmaterial gelegt.

1.3 Hypothese

Unter Berücksichtigung der Studienlage und der ersten Ergebnisse der vorherigen Doktorandin wurde vermutet, dass durch die Fibronectin-Adhäsion in vitro eine verstärkte Selektion von progenitalen Meniskuszellen der in vivo mit der Stammzellnische assoziierten Zellen erzielt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper, Chemikalien und Reagenzien

ABC-Komplex	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Alizarin Red S	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniaklösung (NH ₄ OH)	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-FN-Primär-Ak.	Sigma Aldrich, Steinheim
Anti-Koll. I-Primär-Ak. (Maus)	Merck KGaA, Darmstadt
Anti-Koll. II-Primär-Ak. (Maus)	Merck KGaA, Darmstadt
Anti-Maus-Ak.	Cambridgeshire (UK)
Biotin-SP-konj. Ziege-Ak.	Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA)
1,9-Dimethyl-Methylenblau	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAN Biotech, Aidenbach
Fibronektin Rinderplasma (F1141)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	B. Braun, Melsungen
Kollagenase Typ II	PAA Laboratories GmbH, Pasching (AU), Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Oil Red O	Sigma Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pepsin	Carl Roth, Karlsruhe
Pronase	Merck KGaA, Darmstadt
QIAzol Lysis Agent	Qiagen, Venlo (NE)
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Safranin O (C.I. 50240)	Merck KGaA, Darmstadt

Trypanblau-Lösung (0.4%)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

DACO-Pen	Agilent Technologies, Waldbronn
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
DePex-Eindeckmedium	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Filterpapier	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Klonzylinder	Carl Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen 2,0 ml	TPP Techno Plastic Products, Trasadingen (CH)
Kulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturschalen (96-, 48-, 24-Well)	BD Falcon, Heidelberg
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroreaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Blaubrand, Wertheim
Objektträger Starfrost adhäsiv	Knittel, Braunschweig
Parafilm	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten Costar (5/10/15/50 ml)	Corning, Corning (USA)
Pipettensets (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (5/10/20 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Sterile Einmalskalpelle, No. 22	CynaMed, Pittsburgh (USA)
Sterilfilter (0,45/0,2 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany, Umkirch
Vaseline	Unilever Belgium N.V., Anderlecht (Belgien)
Wasserstoffperoxid (34,5 – 36,5 %)	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Chemikalienausgabe Universität Regensburg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb (70 µm)	Corning Inc., Corning (USA)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg

2.1.3 Geräte und Hilfsmittel

Autoklav Melatronic 23	MELAG Medizintechnik, Berlin
CO ₂ -Inkubator Hera cell 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

CO ₂ -Inkubator Hera cell vios 250i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Gefriertruhe MDF-DC500VX	PHC Corporation, Tokio (Japan)
Hämozytometer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Kryostat CM1950	Leica Camera AG, Wetzlar
Kühlschrank RFY 3855 (4°C)	Whirlpool Corporation, Benton Harbor (USA)
Laborabzug MC6	Waldner, Wangen im Allgäu
Mikroskop BX61	Olympus K.K., Shinjuku (Japan)
Mikroskop Dialux 20 EB	Ernst-Leitz GmbH, Wetzlar
Mikroskop-Kamera (Fluovert FU)	Ernst Leitz GmbH, Wetzlar
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Nikon Eclipse TE-2000-U	Nikon Corporation, Minato (Japan)
Pinzetten, chirurgisch/anatomisch	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettierhilfe Easypet 3	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäßständer neoRack	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Reinraumwerkbank Haaeus HS 18	Kendro Laboratory Products GmbH, Newton (USA)
Schüttler Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttler UKR 36152	Eigenkonstruktion
Waage Kern EW 4200 & Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zentrifuge FVL-2400 Combi-Spin	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Newton (USA)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.4 Software

Image J	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Photoscape X	Mooii, Seoul (South Korea)
Prism 10	GraphPad Software, San Diego (USA)
Zotero 6.0.27	Corporation for Digital Scholarship, Vienna (USA)

2.1.5 Lösungen und Puffer

PBS mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.1.5.1 Immunhistochemie

Phosphatpuffer	0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (177, 91 MW): 35,6 g ad 1 L H_2O bidest, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ (137,99 MW): 13,8 g ad 500 ml H_2O ; Mischung ca. 5:1 bis pH 7,4 (ca. 833 + 167 g); Phosphatpuffer 0,1 M: 1:1 mit H_2O bidest;
Saccharose-Lösung	Saccharose in Phosphatpuffer 0,1 M (10 %, 20 %, 30 %)
8 % Formaldehydlösung	8 g PFA in 50 ml Phosphatpuffer, erwärmen und lösen, ad 100 ml mit H_2O bidest; Weiterverdünnung 1:1 mit 0,1 M Phosphatpuffer möglich für 4 % Formaldehydlösung
TRIS-Puffer	24.228 g TRIS-Base in 1000 ml H_2O bidest, pH 7;
Waschpuffer	0.2 M TRIS, 140 M NaCl in H_2O bidest;
Pepsin-Andaulösung	1 mg ml^{-1} Pepsin in McIlvaine-Puffer;
McIlvaine-Puffer	67.8 ml 0.1 M Zitronensäure, 32.2 ml 0.2 M Na_2HPO_4 pH 3.6;
Blockierungspuffer	5.3 ml 0.2 M TRIS, 0.11 g NaCl, 1 ml FCS, 1 ml Ziegenserum in 2.6 ml H_2O bidest;
ABC-Lösung	2,5 ml TRIS-Puffer 0,1M pH 7.0, 40 μl Lösung A, 40 μl Lösung B; mischen, 30 min inkubieren;
DAB-Stammlösung	50 mg BSA, 250 mg DAB in 50 ml H_2O bidest;
m-PBS Puffer (1M)	47.2 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$, 6.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 36 g NaCl in 500 ml H_2O bidest; pH 7-7.4;
Ni/Co-Stammlösung	Lösung A: 100 mg NiCl_2 , 5 mg CoCl_2 in 5 ml H_2O ; Lösung B: 10 mg BSA in 5 ml H_2O ; Lösungen unter Rühren mischen;
DAB-Arbeitslösung	9 ml m-PBS 0.1 M, 1 ml DAB-Stammlösung, 240 μl Ni/Co-Stammlösung, 6 μl 30 % H_2O_2 (erst kurz vor Verwendung pipettieren; DAB- und Ni-/Co-Abfälle Sondermüll);

2.1.5.2 Koloniebildungs-Assay

Kristallviolett-Lösung	0,5 % Kristallviolett in Methanol;
------------------------	------------------------------------

2.1.5.3 Alizarin-Färbung

Alizarin Rot Stammlösung (40mM) 6,846 g Alizarin Red S in ca. 450 ml H_2O bidest lösen

	(pH $\approx$ 2,6), pH-Wert mit 10 % NH_4O auf 4,25 einstellen, ad 500 ml mit H_2O bidest;
Verdünnungspuffer (optional)	100 ml 10 % CH_3COOH (pH mit 10 % NH_4O auf 4,25 eingestellt) mit ca. 8,4 ml NH_4OH ;
10 % Formaldehydlösung	10 g PFA und 50 ml 0,2 M Phosphatpuffer erwärmen und somit lösen, ad 100 ml mit H_2O bidest;

2.1.5.4 Ölrot O Färbung

Ölrot O Stammlösung 0,5 % Ölrot O in Isopropanol, über Nacht bei 37 °C Rühren im Backofen, Filtrieren mit Filterpapier (bzw. 20 μm Sterilfilter), Lagern bei 4 °C;

Ölrot O Arbeitslösung Stammlösung 3:2 mit H_2O bidest gemischt, 10 min inkubieren, filtrieren (jedes Mal frisch herstellen);

60 %iger Isopropanol 3 ml Isopropanol mit 2 ml PBS;

2.1.5.5 DMMB-Färbung

DMMB-Färbelösung 0,016 g DMMB in 5 ml Ethanol lösen, 950 ml H_2O bidest und 2 g Natriumformiat hinzufügen; pH mit Ameisensäure auf 3,0 einstellen und Lösung in einer mit Folie abgedeckten Flasche bei Raumtemperatur lagern

2.1.5.6 Safranin O/Fast Green-Färbung

Stammlösung A 1 g Hämatoxylin in 100 ml 95 % Ethanol;

Stammlösung B 4 ml 29 % Eisenchlorid in H_2O bidest mit 1 ml Salzsäure;

Weigert's Eisen Hämatoxylin Stammlösung A & B zu gleichen Teilen vermischen ergibt die Arbeitslösung (stabil für ca. 4 Wochen);

0,05 % Fast Green FCF Lösung 0,5 g Fast green FCF in 1000 ml H_2O bidest;

1 % Essigsäure Lösung 1 ml glaziale Essigsäure in 99 ml H_2O bidest;

0,1 % Safranin O Lösung 0,1 g Safranin O in 100 ml H_2O bidest;

2.1.6 Medien

2.1.6.1 Meniskus-Aufarbeitung

SF-Medium: RPMI 1640, Pen/Strep 1 %, HEPES-Puffer 1 %, L-Glutamin 1 %, *Anti-Anti 1* %, FGF 0.1 %;

FCS-Medium (mit *Anti-Anti*): RPMI 1640, FCS 10 %, Pen/Strep 1 %, HEPES-Puffer 1 %, L-Glutamin 1 %, *Anti-Anti* 1 %, FGF 0.1 %;

2.1.6.2 Proliferationsmedium für Meniskuszellen

FCS-Medium: RPMI 1640, FCS 10 %, Pen/Strep 1 %, HEPES-Puffer 1 %, L-Glutamin 1 %, FGF 0.1 %;

2.1.6.3 Osteogene Differenzierung

Differenzierungsmedium:

Substanz:	Konzentration der Stammlösung:	Konzentration im Medium:	(Beispiel-)Menge:
DMEM-HG		86,75 %	34,7 ml
FBS		10 %	4 ml
Pen./Strep.	10000 IU ml ⁻¹	100 IU ml ⁻¹ , 1 %	400 µl
Dexamethason	10 µM	100 nM, 1 %	400 µl
β-Glycerophosphat	1 M	10 mM, 1 %	400 µl
L-Ascorbinsäure	20 mM	50 µM, 0,25 %	100 µl
Gesamt			40 ml

Kontrollmedium:

Substanz:	Konzentration der Stammlösung:	Konzentration im Medium:	(Beispiel-)Menge:
DMEM-HG		89 %	35,6 ml
FBS		10 %	4 ml
Pen./Strep.	10000 IU ml ⁻¹	100 IU ml ⁻¹ , 1 %	400 µl
Gesamt			40 ml

2.1.6.4 Adipogene Differenzierung

Induktionsmedium (Differenzierungsmedium):

Substanz:	Konzentration der Stammlösung:	Konzentration im Medium:	(Beispiel-)Menge:
DMEM-HG		86,6 %	43,3 ml
FBS		10 %	5 ml
Pen./Strep.	10000 IU ml ⁻¹	100 IU ml ⁻¹ , 1 %	500 µl
Dexamethason	100 µM	1 µM, 1 %	500 µl
Indomethacin	100 mM	0,2 mM, 0.2 %	100 µl
Insulin	10 mg ml ⁻¹	0,1 mg ml ⁻¹ , 1 %	500 µl
IBMX	500 mM	1 mM, 0,2 %	100 µl
Gesamt			50 ml

Konservierungsmedium (Kontrollmedium):

Substanz:	Konzentration der Stammlösung:	Konzentration im Medium:	(Beispiel-)Menge:
DMEM-HG		88 %	44 ml
FBS		10 %	5 ml
Pen./Strep.	10000 IU ml ⁻¹	100 IU ml ⁻¹ , 1 %	500 µl
Insulin	10 mg ml ⁻¹	0,1 mg ml ⁻¹ , 1 %	500 µl
Gesamt			50 ml

2.1.6.5 Chondrogene Differenzierung

Differenzierungsmedium:

Substanz:	Konzentration der Stammlösung:	Konzentration im Medium:	(Beispiel-)Menge:
DMEM-HG		95,5 %	47,75 ml
Dexamethason	10 µM	100 nM, 1 %	500 µl
Ascorbinsäure	20 mM	1 %	500 µl
ITS		1 %	500 µl
Natriumpyruvat		1 %	500 µl
TGF-β ₁		0,5 %	250 µl
Gesamt			50 ml

Kontrollmedium:

Entspricht Differenzierungsmedium ohne Zusatz von TGF-β₁.

2.2 Methoden

2.2.1 Histologie

2.2.1.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurde bereits initial bei Meniskusakquirierung aus dem zentralen Meniskusanteil ein circa 0,5 cm breites Gewebestück abgetrennt und über Nacht in einem Zentrifugenröhrchen bei 4 °C in 4 % PFA inkubiert und fixiert. Nach ca. 24 Stunden wurde das Gewebe zweimal für 30 Minuten bei niedriger Schüttelgeschwindigkeit bei Raumtemperatur gewaschen. Nun wurde das Gewebe zur Entwässerung einer aufsteigenden Saccharose-Reihe zugeführt (10 %, 20 %, 30 % Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer für jeweils

1 h bis 1 Tag bei 4 °C). Nun wurde zunächst die Hälfte der Saccharose-Lösung entfernt und für 24 Stunden durch Tissue-Tek ersetzt, anschließend das gesamte Zentrifugenröhrchen mit Tissue-Tek aufgefüllt und für weitere 24 h bei 4 °C gelagert. Nach Einbettung des Gewebes in Tissue-Tek in einer Form, die eine weitere Prozessierung mittels Kryotom ermöglicht, wurde die Probe mit flüssigem Stickstoff auf -80 °C tiefgefroren. Die mithilfe des Kryotoms angefertigten Gefrierschnitte des Meniskusgewebes wurden auf Objektträgern (OT) platziert, über Nacht getrocknet und konnten dann weiteren histologischen Untersuchungen zugeführt werden.

2.2.1.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten nach einem etablierten Protokoll, wobei die einzigen Unterschiede in der Wahl des Primär- bzw. Sekundärantikörpers lagen. Eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) wurde jeweils inkludiert, um die Spezifität des Primärantikörpers zu überprüfen.

Zur Freilegung der Bindungsstellen für den jeweiligen Antikörper wurden die OT zunächst zehn Minuten in Waschpuffer rehydriert, um von der Einbettung verbliebenes TissueTek zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase für 30 Minuten mit 10% H₂O₂ und 10% Methanol in PBS gesättigt, anschließend die Schnitte mit Waschpuffer gespült. Zum Matrixverdau wurden die OT 15 Minuten mit 150 µl Pepsin-Andaulösung behandelt. Nach einem erneuten Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer pro OT wurden mit Blockierungspuffer für eine Stunde nicht-spezifische Bindungsstellen auf dem Präparat blockiert. Dies reduziert eine übermäßige Hintergrundfärbung. Nun wurde der Primärantikörper mit Blockierungspuffer verdünnt (bspw. bei Kollagenfärbung: monoklonaler Anti-Kollagen-Typ I/II-Antikörper in 1:200- bzw. 1:100-Verdünnung), 150-200 µl gleichmäßig auf den OT verteilt (außer auf der Negativkontrolle) und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden nach einem dreimaligen Waschen in Waschpuffer 150 µl des verdünnten sekundären Antikörpers (bei der Kollagenfärbung: Biotin-SP-konjugierter AffiniPure-Ziege-Anti-Maus-Antikörper in 1:100 Verdünnung). Nach 60 Minuten Inkubation wurden die OT erneut dreimal gewaschen und die ABC-Lösung, welche bereits 30 min vor Gebrauch anzufertigen ist, für 90 min zugegeben. Erneutes dreimaliges Waschen. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin ist in der Lage, die in der ABC-Lösung enthaltene Meerrettich-Peroxidase (HRP) als sogenanntes Reporterenzym zu rekrutieren. Die bei

entsprechender Bindung ablaufende Oxidation von DAB führt zur Bildung eines bereits makroskopisch sichtbaren braunen Produktes.

Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit DAB-Arbeitslösung für fünf bis zehn Minuten unter Beobachtung der Kontrollen entwickelt, in aufsteigender Alkoholreihe fixiert (2x kurz 96% Isopropanol → 2x 5 min 100% Isopropanol → 2x 5 min Xylol) und mithilfe von DePex-Eindeckmedium durch Deckgläser abgedeckt. Nach einer ca. zweistündigen Trocknungsphase wurden Aufnahmen gemacht.

2.2.1.3 Dimethylmethylenblau-(DMMB)-Färbung

Die Färbung mit DMMB ist eine etablierte Methode zur Quantifizierung sulfatierter Glykosaminoglykane (GAG) in chondrogenen Kulturen. GAG sind Bestandteil der sogenannten Proteoglykane, welche neben Kollagen einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelgewebe darstellen. An ein zentrales Kernprotein sind bei Proteoglykanen kovalent GAG gebunden, welche aus langen Disaccharidketten bestehen.

DMMB ist ein blauer, kationischer Thiazin-Farbstoff, der an die sulfatierten Glykosaminoglykane (GAG) bindet und dabei in violett umschlägt. Somit liegt bei einem violetteren Signal ein vermehrtes Vorhandensein von sulfatierten Glykosaminoglykanen vor und es können Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der jeweiligen Zellen gezogen werden (40).

Die ausgewählten Objektträger wurden 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen, um überschüssigen Kryokleber zu entfernen. Danach wurden sie mit 0,1%-iger DMMB-Färbelösung 10 Minuten lang gefärbt. Nach kurzem Waschen mit H₂O bidest. Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe und Abdeckung (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.4 Safranin O/Fast Green Färbung

Von ausgewählten Meniskusschnitten und Schnitten chondrogen differenzierter Zellpellets (3D-Kultur) wurden Safranin O/Fast Green Färbungen angefertigt.

Negativ geladene Proteoglykane werden dabei durch Safranin O rot angefärbt und Kollagen durch Fast Green in grüner Farbe (41).

Hier eine kurze Schilderung des Färbungsprotokolls: Zunächst Anfärbung der Zellkerne durch sechsminütige Inkubation des Präparats mit Eisenhämatoxylin-Lösung. Nach einem Waschschriff mit destilliertem Wasser wurde die Probe dreimal mit 0,5 % sauren Alkohol bedeckt und 5 min unter laufendem Leitungswasser gespült. Nun wurde mittels dreiminütiger Inkubation mit der Fast Green Färbung (0,02 %) begonnen. Anschließend dreimaliges

Eintauchen in 1 %-iger Essigsäure und sechsminütige Inkubation in der Safranin O Färbelösung (0,1 %). Anschließend Fixierung des Färberesultats mittels aufsteigender Alkoholreihe, DePex-Medium und Deckgläsern (siehe 2.2.1.2).

2.2.2 Meniskusakquirierung

Das humane Meniskusmaterial wurde mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Philipp von Roth aus einem Patientenkollektiv des Sporthopaedicum Regensburg mit diagnostizierter Gonarthrose akquiriert, welches sich einem kniechirurgischen Eingriff zum totalen beziehungsweise partiellen Gelenkflächenersatz unterzog. Gemäß der Deklaration von Helsinki wurde von jedem Patienten vor dem operativen Eingriff eine schriftliche Einverständniserklärung für die Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke eingeholt. Es wurde darauf geachtet, für die Analysen nur solche Menisken zu verwenden, welche makroskopisch keine ausgeprägten traumatischen oder degenerativen Veränderungen aufwiesen.

Das Meniskusgewebe wurde nach Akquirierung mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung bedeckt und in einem 50ml Falcon auf direktem Weg ins Labor transportiert, wo mit der Aufarbeitung begonnen wurde. Zunächst wurde jedem Meniskus eine Labornummer (LN) zugewiesen.

2.2.3 Meniskusverarbeitung und -verdau

Es wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank auf Zuschneideplatten mit 22er Skalpellen und sterilen chirurgischen Pinzetten gearbeitet.

Bevor Bilder gemacht und das Gewicht des Meniskus mithilfe einer Feinwaage bestimmt wurden, wurde Fett und überschüssiges Bindegewebe vom Meniskus entfernt.

Das äußere Meniskusdrittel wurde makroskopisch jeweils als vaskuläre, die inneren zwei Meniskusdrittel als avaskuläre Zone des Meniskus identifiziert und entsprechend voneinander getrennt. Nun wurden beide Meniskusanteile getrennt voneinander erst grob mit Skalpellen zerkleinert und dann zusammen mit einem Tropfen FCS-freiem Medium so lange zerhackt, bis eine breiige homogene Masse entstand. Mit der Spitze des Skalpells wurden dann je 0,5 bis 1ml des Breis in beschriftete 15 ml Falcons transferiert.

Die 15 ml Falcons wurden mit ca. 3 ml der Pronase-Gebrauchslösung (70 U ml⁻¹ Pronase in SF-Medium mit 5 % FCS) versetzt und bei 37 °C für 30 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) und dem Abnehmen der Pronase mit einer Stripette wurden je 3 ml einer Kollagenase-II-Gebrauchslösung (100 U ml⁻¹ Kollagenase Typ 2 in SF-Medium

mit 5 % FCS, im Verhältnis 1:4) hinzugefügt und bei RT über Nacht (ca. 12 bis 14 h) auf einem Schüttler platziert.

Am Folgetag wurden die Falcons mit FCS-Medium (mit Anti-Anti) aufgefüllt und der Inhalt mithilfe von 70 µm Zellsieben filtriert. Die Zellen der vaskulären bzw. avaskulären Zone wurden getrennt voneinander wieder in jeweils ein 50ml Falcon zusammengeführt. Nun wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 2000 rpm), in 1 ml FCS-Medium resuspendiert und ausgezählt. Im Folgenden soll von Zellen, die aus dem vaskularisierten äußeren Meniskusanteil isoliert wurden als von „vaskulären“ Zellen und von solchen aus dem avaskulären inneren Meniskusanteil als von „avaskulären“ Zellen die Rede sein.

2.2.4 Fibronektin-Adhäsions-Assay

Vorbereitung:

24 Stunden vor Meniskusakquirierung wurden 6-Well Platten unter sterilen Bedingungen mit ca. 2,6 ml Fibronektin-Lösung pro Vertiefung (Bovines FN 1:100 verdünnt in speziellem PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) befüllt, mit Parafilm luftdicht versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Fibronektin sollte sich dabei auf dem Boden absetzen und anschließend eine selektive Zelladhäsion ermöglichen. Mithilfe der divalenten Ionen sollen bestimmte Zellen über in ihrer Zellwand befindliche Integrine an das Fibronektin binden können.

Durchführung:

Sobald der enzymatische Meniskusverdau abgeschlossen war, wurden die 6-Well Platten auf Raumtemperatur gebracht und die Fibronektin-Lösung verworfen. Von den aus dem Verdau erhaltenen vaskulären und avaskulären Zellsuspensionen wurden jeweils Zellen in einer Konzentration von 1000 Zellen pro ml abgenommen und zu 2 ml pro Vertiefung (verdünnt mit FCS-Medium) in eine der mit FN beschichteten 6-Well Platten pipettiert. Die Platten wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Es ist in der Theorie davon auszugehen, dass dieser Zeitraum zur Adhäsion jener Meniskuszellen mit Fibronektin-Adhäsionstendenz ausreicht. Von genau diesen Zellen, welche auch im Folgenden noch das Charakteristikum aufweisen, Zellkolonien auszubilden, wird vermutet, dass an ihnen auch weitere Stammzeleigenschaften nachzuweisen sind. Im Folgenden ist im Zusammenhang dieser adhärierenden Zellen von Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen (entspricht meniskalen Progenitorzellen) die Rede.

Nach 20 min wurde die Suspension der übrigen nicht-Fibronektin adhärenenten Zellen zusammen mit den übrigen aus dem Meniskusverdau erhaltenen Zellen jeweils in einer T75-Flasche in

12 ml Proliferationsmedium ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Auch die 6-Well Platten wurden mit zwei Milliliter Proliferationsmedium pro Well bedeckt.

Alle Zellen und Assays des Versuchsaufbaus wurden bei 37 °C, einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % und einem Sauerstoffgehalt von 21 % inkubiert.

2.2.5 Klonselektion und -isolation

Das Zellwachstum auf den 6-Well Platten wurde im Mikroskop laufend beobachtet, wobei alle drei Tage das Medium gewechselt wurde. Die Zellen sollten dabei nicht zu konfluent werden und einzelne Kolonien nicht ineinander wachsen. Nach 10-14 Tagen wurden einzelne Kolonien von mehr als 32 Zellen unter einem Mikroskop identifiziert, gezählt und mit einem feinen Folienstift auf der Plattenunterseite bzw. dem -deckel für die Isolation umrandet.

Das Medium wurde aus dem entsprechenden Well entfernt und in einem Falcon für spätere Medienwechsel aufbewahrt. Nach dem Waschen des Wells mit SF-Medium, wurde ein Klonzylinder für die Isolation vorbereitet, indem dieser mithilfe einer autoklavierten Pinzette mit der aufsetzenden Seite in angewärmte und sterile Vaseline getaucht wurde. Diese ermöglichte eine Abdichtung des Zylinders, sodass nach Aufsetzen desselben auf die zu isolierende Kolonie, ohne zu Verrutschen des Zylinders, mithilfe von 150 µl Trypsin unter Mikroskopkontrolle selektiv eine Kolonie für Passage 1 in das Loch einer 48-Well Platte überführt werden konnte. Sequenziell wurden so bis zu acht Klone einer Kondition isoliert und mit einer 1:1 Mischung aus konditioniertem Kulturmedium (aufgehobenes Medium aus den 6-Well Platten, welches bereits mit den Zellen und deren Wachstumsfaktoren in Kontakt war) und frischem FCS-Medium expandiert. Medienwechsel erfolgte standardmäßig alle drei bis vier Tage.

Die Zylinder wurden für einen erneuten Gebrauch über Nacht getrocknet, mit Papiertüchern gereinigt und mit Alkohol sterilisiert.

2.2.6 Zellexpansion der Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen

Passage 2 wurde meist in einer T25-Flasche durchgeführt, ab Passage 3 wurden pro expandiertem Klon zwei T175-Flaschen mit je 2000 Zellen/cm² befüllt - überschüssige Zellen wurden stets eingefroren. Ab Passage 4 wurden je drei Klone einer Kondition den Differenzierungs-Assays zugeführt. Es wurde versucht, mehrere gut proliferierende Klone/Klonpopulationen zur Generierung von Wachstumskurven bis Passage 6 zu expandieren.

Die Zellen aller übrigen Klone wurden zum frühestmöglichen Zeitpunkt trypsiniert und eingefroren. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

2.2.7 Zellexpansion der nicht-Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen

Expandiert wurden die nicht-Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen ab Passage 1 in T175-Flaschen mit 2000 Zellen/cm² - überzählige Zellen wurden bei -80 °C für spätere Versuche eingefroren. Es wurde über mindestens 90 Tage bis einschließlich Passage 6 expandiert, wobei Zellen der Passage 1 für CFU-Assays und Zellen der Passagen 3 bzw. 4 für Differenzierungs-Assays verwendet wurden. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Medienwechsel.

2.2.8 Populations-Verdopplungszeiten (PD)

Aus den beim Überführen von Zellen aus einer Kulturflasche in die nächste Passage errechneten Zellzahlen wurden bei den nicht-Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen mit folgender Formel die Verdopplungszeiten (PD) der jeweiligen Zellpopulationen berechnet:

$$PD [h] = (t_2 - t_1) \cdot \log(2) / [\log(q_2) - \log(q_1)] t_2 - t_1 = \text{Passagendauer [h]}$$

q_2 = Zellzahl am Ende der Passage

q_1 = Zellzahl am Anfang der Passage (Anzahl der ausgesäten Zellen)

Diese wurden gegenüber der Passagenzahl aufgetragen. Zu erwarten wäre, dass die Verdopplungsdauer nach Isolierung der Zellen aus dem Primärgewebe zunächst sinkt und dann im Laufe der Kultur bei gleichzeitigem Fortschreiten der Zellseneszenz immer länger wird.

2.2.9 Bildanalyse

Es wurde versucht, in jeder Passage Bilder von den Zellen jeder Kondition zu machen, um etwaige morphologische Unterschiede zwischen den Konditionen oder auch Veränderungen im Kulturverlauf erkennen zu können. Dazu wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Nikon, Eclipse TE-2000-U) Bilder der Auflösung 2560 x 1920 in 10-facher und 20-facher Vergrößerung mit erweitertem Kontrast geschossen. Evaluiert wurde diese mithilfe der Software ImageJ.

2.2.10 Weitere grundlegende Methoden der Zellkultur

2.2.10.1 Zellauszählung und Resuspendierung

Zur Minimierung von Messfehlern wurde zunächst versucht durch entsprechende Resuspension des nach Zentrifugation der Zellsuspension entstehenden Zellpellets am Boden eines Zentrifugationsröhrchens eine Konzentration von ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen pro ml einzustellen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden nun 20 μ l der Zellsuspension in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß mit 20 μ l Trypanblau-Lösung gemischt, wiederum 20 μ l dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Während vitale Zellen mit ihrer intakten Zellmembran in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen, und somit im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen das Trypanblau auf und stellen sich blau gefärbt dar.

Nach Auszählung der hellen, vitalen Zellen aus vier Großquadraten berechneten sich die Zellkonzentration sowie die Zellzahl in der Ausgangssuspension nach folgender Formel:

$$\text{Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Gezählte Zellen} / 4) \cdot 2 \cdot 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$\text{Zellzahl (gesamt)} = \text{Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]} \cdot \text{Volumen der Zellsuspension [ml]}$$

Beim Passagieren von Zellen oder Durchführung verschiedener Assays war es auch immer wieder von Nöten, eine Zellsuspension definierter Konzentration herzustellen. Es wurde gerechnet:

$$V_{\text{benötigt}}(\text{Zellsuspension}) = c_{\text{soll}} / c_{\text{ist}}$$

$$c_{\text{soll}} = \text{Gewünschte Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]}$$

$$c_{\text{ist}} = \text{Vorliegende Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]}$$

$$- V_{\text{benötigt}}(\text{Zellsuspension}) + 1 \text{ ml} = V_{\text{benötigt}}(\text{Medium})$$

Das Zusammenführen beider Volumina $V_{\text{benötigt}}(\text{Zellsuspension})$ und $V_{\text{benötigt}}(\text{Medium})$ ergab dabei 1 ml einer Zellsuspension der gewünschten Zellkonzentration c_{soll} .

2.2.10.2 Trypsinieren von Zellen

Das Expandieren von verschiedenen Zellpopulationen über bis zu 100 Tage und mehrere Passagen sowie das Ansetzen von verschiedenen Assays erforderte bei konfluent werdenden Zellen regelmäßig das Überführen von Zellen in ein anderes Gefäß. Dieser Vorgang des sogenannten „Passagierens“ erfolgte stets, wenn die Zellen ca. 80 % des jeweiligen

Kultivierungsgefäßes bedeckten. Der Grad der Konfluenz wurde dabei regelmäßig unter lichtmikroskopischer Kontrolle evaluiert. Ein Versäumnis des Passagierens von Zellen mit der Entstehung eines zu dichten Zellrasens hätte neben dem Versetzen der Zellen in einen Ruhezustand mit gleichzeitig möglicherweise irreversibler Hemmung des Zellwachstums nach einiger Zeit auch ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden sowie ihren Zelltod eingeleitet. Das Medium wurde aus der jeweiligen Platte bzw. Kulturflasche entfernt. Mit sterilem PBS (ca. einem Fünftel der Mediummenge) wurden die Zellen gewaschen, anschließend das Trypsin/EDTA 1x (ca. ein Viertel der Mediummenge) auf die Zellen pipettiert. Nun wurde das Behältnis für fünf bis sieben Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch seitliches Beklopfen wurde unter Mikroskopkontrolle (Zellen runden sich ab und sind frei beweglich) erreicht, dass sich die Zellen vom Plastikboden ablösen. Da das Trypsin zytotoxisch wirkt, wurde darauf geachtet, die Einwirkungszeit des Trypsins so kurz wie möglich zu halten. Nun konnte durch Zugabe von der eineinhalbfachen Menge an FCS-Medium unter Auf- und Ab pipettieren ein Großteil der Zellen in Suspension aufgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt werden. Das Serum bewirkte dabei eine Aufsättigung der Enzymbindungsstellen des Trypsins und somit ein Abstoppen der Wirkung des Trypsins auf die Zellen. Nach Zentrifugation (5-10 min, 1000 rpm) und Abnehmen des Trypsins konnten die Zellen in frischem Medium resuspendiert, ausgezählt und dem weiteren Versuchsablauf zugeführt werden.

2.2.10.3 Einfrieren von Zellen

Nach dem Trypsinieren und Auszählen von Zellen wurden überschüssige Zellen für einen späteren Zeitpunkt bei -80 °C eingefroren. Dazu wurde zunächst die Anzahl der gewünschten Kryoröhrchen bestimmt. Das gemischte Einfriermedium bestand zu 50 % aus FCS, zu 40 % aus dem jeweiligen Kulturmedium und zu 10 % aus DMSO. Letzteres sollte eine Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses verhindern, wodurch Zellen zerstört werden würden. Die Zytotoxizität dieser Substanz berücksichtigend sollte das Befüllen der Kryobehälter mit denen in 1 ml Einfriermedium resuspendierten Zell zügig erfolgen.

2.2.10.4 Auftauen von Zellen

Das Auftauen sollte möglichst schnell erfolgen. In einem Becherglas mit lauwarmen Wasser wurde das Kryoröhrchen so lange geschwenkt, bis etwa die Hälfte des Inhalts aufgetaut ist. Das Röhrchen und besonders der Deckel wurden gründlich desinfiziert; der Inhalt in einem 50 ml Falcon mit 10 ml FCS-Medium überführt. Nach Zentrifugation, Resuspension und Auszählung konnten die Zellen in neuen Flaschen ausgesät werden.

2.2.10.5 Medienwechsel

Mit einer Pumpe wurde das alte Medium in der Kulturflasche abgesaugt und neues Kulturmedium mit Stripette und Pipettierhilfe hinzugefügt. Dabei wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet:

T175 → 25 ml Medium; T75 → 12 ml M.; T25 → 6 ml M.

96-Well → 0,3 ml M.; 48-Well → 0,5 ml M.; 24-Well → 0,7 ml M.; 6-Well → 2 ml M.

2.2.11 Koloniebildungs-Assay

Um das Potential der vaskulären und avaskulären nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen (welche die zunächst nicht auf FN adhärierenden Zellen, aber auch alle übrigen, bisher noch nicht ausgesäten Meniskuszellen umfassen) zu testen, Kolonien zu formen, wurden diese beim Übergang zur Passage 1 jeweils auf 10 cm messenden Petrischalen zu drei verschiedenen Zelldichten (20 Zellen pro cm², 5 Zellen pro cm², 2 Zellen pro cm²) mit je 5 ml FCS-Medium ausgesät. Bei zweimaligem Medienwechsel pro Woche wurden die Zellen über 12 bis 16 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Wieder wurde auch ein Vergleich zwischen reinem Plastik und Fibronectin-Beschichtung angestrebt – dementsprechend wurden auch Petrischalen 24 Stunden vor Benutzung, wie oben beschrieben, mit einer Fibronectin-Lösung benetzt, luftdicht mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C inkubiert. Auch auf diesen wurden vaskuläre und avaskuläre nicht-Fibronectin-adhärenente Meniskuszellen zu drei verschiedenen Zelldichten ausgesät.

Nach ca. 15 Tagen – je nach Wachstumsraten und Konfluenz der Zellen (wobei gebildete Kolonien auch in der höchsten Zelldichte nicht ineinander wachsen sollten) – wurden die gebildeten Kolonien mit Kristallviolett gefärbt und ausgewertet. Dies konnte in unsteriler Umgebung unter einem Abzug durchgeführt werden.

Dazu wurden die Petrischalen zunächst zweimal mit ca. 10 ml PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 3 ml Kristallviolett-Lösung bedeckt und leicht geschwenkt, wobei eine ausreichende Löslichkeit der Farblösung sichergestellt werden musste. Dann wurde die Kristallviolett-Lösung vorsichtig abgenommen; die Petrischalen wurden erneut zweimal mit ca. 10 ml PBS gewaschen und für 5 min mit PBS auf den Schüttler gestellt, um überschüssige Farbpartikel zu entfernen. Nun wurden die Petrischalen bei RT zum Trocknen stengelassen und es konnte mit der Auswertung der CFU-Assays begonnen werden.

Zunächst wurde die Anzahl der intensiv gefärbten, ein bis acht Millimeter großen Kolonien bestimmt und die sogenannte CFU-Effizienz anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{CFU-Effizienz [\%]} = (\text{Anzahl gezählter Kolonien} / \text{Anzahl der ausgesäten Zellen}) \times 100$$

Diese setzt die Anzahl der bei verschiedenen Zelldichten gebildeten Kolonien zueinander in ein Verhältnis. Dabei ist zu erwarten, dass sich CFU-Effizienz und Zelldichte umgekehrt proportional zueinander verhalten.

Des Weiteren wurden Aufnahmen angefertigt, um die Verteilung, Größe und Morphologie der Kolonien festzuhalten. Da die Färbung bereits nach wenigen Stunden substanziell nachlässt, erfolgte eine Auswertung der Ergebnisse am selben Tag der Färbung.

2.2.12 Differenzierungsassays

Die Meniskuszellen wurden jeweils über 21 Tage mit osteo-, adipo- (2D-Kultur) und chondrogenen (3D-Kultur) Differenzierungsmedium kultiviert. Sowohl bei den nicht-Fibronektin-adhärenenten als auch bei den Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen wurde ab Passage 3 mit der Differenzierung begonnen; bei Letzteren wurde teilweise bis Passage 4 gewartet, um eine ausreichende Zellanzahl zu erhalten. Die jeweilige Medienzusammensetzung wurde in Kapitel 2.1.6 dargestellt.

2.2.12.1 Osteogenese

2.2.12.1.1 Osteogene Differenzierung

Nach einer Aussäung von 5000 Zellen pro cm² in drei Wells einer 24-Well Platte pro Kondition wurde – durch Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums – unmittelbar mit der osteogenen Differenzierung begonnen. Ein weiteres Triplet jeder Kondition wurde außerdem als Negativkontrolle mit Kontrollmedium ohne osteogene Zusätze bedeckt. Zweimal pro Woche wurde das jeweilige Medium gewechselt, wobei die zu differenzierenden Zellen durchgehend mit osteogenem Differenzierungsmedium und die Zellen der Negativkontrolle durchgehend mit osteogenem Kontrollmedium inkubiert wurden.

2.2.12.1.2 Alizarin Rot Färbung

Alizarin Rot S (3,4-Dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonsäure) ist ein wasserlösliches Salz der Alizarinsulfonsäure, welches in der Histologie zur Färbung von Kalziumablagerungen einer osteogenen Differenzierung verwendet wird. Es handelt sich um einen frühen Marker (ab 10-16 Tage in-vitro) einer Matrixmineralisation, welche einen entscheidenden Schritt zur Bildung von kalzifizierter Matrix und somit von Knochengewebe

darstellt. Sowohl freies als auch in Zellen oder Gewebe befindliches Kalzium wird durch Alizarin Rot S orangerot angefärbt.

Nach 21-tägiger Kultivierung der Zellen mit Differenzierungsmedium wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nun wurden die Zellen unter dem Abzug mit 10% PFA für 15 min bei RT fixiert. Nach Entsorgung des PFA wurden die Zellen dann für 30 min bei RT mit ca. 0,5 ml der 40 mM Alizarin Rot-Stammlösung pro Well unter leichten Schwenken inkubiert. Danach wurde das Well vier Mal für je fünf Minuten auf dem Schüttler mit PBS gewaschen. Schließlich konnte die Färbung unter dem Mikroskop analysiert und abfotografiert werden. Wegen der niedrigen Lichtbeständigkeit der Färbung sollte das Mikroskopieren nicht zu viel Zeit beanspruchen.

2.2.12.2 Adipogenese

2.2.12.2.1 Adipogene Differenzierung

Analog zur osteogenen Differenzierung wurden auch für die adipogene Differenzierung und entsprechende Negativkontrolle 5000 Zellen pro cm² auf 24-Well Platten ausgesät. Während die Negativkontrolle mit einem Medienwechsel zweimal wöchentlich durchgehend mit Konservierungsmedium inkubiert wurde, wurde bei den zu differenzierenden Zellen außerdem zwischen Induktionsmedium (für vier bis fünf Tage) und Konservierungsmedium (für zwei bis drei Tage) gewechselt. Begonnen wurde mit der Zugabe des entsprechenden Mediums auch unmittelbar nach Aussähen der Zellen.

2.2.12.2.2 Ölrot O Färbung

Ölrot O (1-(2,5-Dimethyl-4-(2,5-dimethylphenyl)phenyldiazenyl)azonaphthalen-2-ol), auch bekannt als Solvent Red 27, ist ein Bisazofarbstoff, der zur Färbung von Triglyceriden in fixierten Zellen verwendet wird. Der Farbstoff wird als Pulver gekauft, welches in seinem Lösungsmittel Isopropanol nur minimal löslich ist. Während des Färbevorgangs wandert das Ölrot O aus der Lösung zum Lipid in der Probe, wodurch dieses intensiv hellrot gefärbt wird. Die Absorptionsmaxima des Farbstoffs bei 518 und 359 nm ermöglichen die Betrachtung und Analyse mittels Phasenkontrastmikroskopie.

Nach 21 Tagen Differenzierung wurde eine Ölrot O Färbung angefertigt. Zunächst mussten die Zellen fixiert werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, jedes Well mit 0,5 ml PBS gewaschen und unter dem Abzug ca. 1 ml 10% Formaldehydlösung pro Well zugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT und dem anschließenden Abnehmen der

Fixierungslösung, wurde das Well mit 60%igem Isopropanol gewaschen und trocknen gelassen.

Nun wurde für 10 min ca. 1 ml Ölrot O Arbeitslösung pro Well hinzugefügt, anschließend die Farblösung vorsichtig abpipettiert und das Well viermal mit H₂O bidest gewaschen. Es folgte ein Mikroskopieren und Fotografieren der gefärbten Zellen.

2.2.12.3 Chondrogenese

2.2.12.3.1 Chondrogene Differenzierung (3D-Kultur)

In 96-Well Platten mit V-förmigem Boden wurden jeweils 100.000 Zellen pro Well ausgesät. Diese wurden jeweils mit 0,3 ml chondrogenem Differenzierungsmedium bedeckt, zentrifugiert und unter regelmäßigen Medienwechseln (dreimal pro Woche) für 21 Tage bei 37 °C kultiviert. In den Wells mit V-förmigem Boden bildeten sich so Zellpellets, welche nach 21 Tagen weiteren Analysen zugeführt werden konnten. Es wurde versucht, ca. 12 bis 18 Zellpellets von jeder Kondition anzufertigen. Auch Negativkontrollen unter Kultivierung mit Medium ohne Zusatz von TGF- β_1 wurden angefertigt.

2.2.12.3.2 Ernten und Behandlung der Pellets

Die Pellets wurden im Anschluss der Differenzierungsphase in Tissue-Tek bei -20°C gesammelt. Zur Analyse des Differenzierungspotentials wurden alle Pellets mit Kryokleber in verschiedenen Blöcken eingebettet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blöcke wurden bis zur Weiterverarbeitung (Schneiden, Färben) bei – 80°C gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Daten zu den verwendeten Menisken

Vier mediale Menisken konnten für diese Arbeit einer Analyse zugeführt werden (vgl. Tab. 2). Alle Spender waren männlich und unterzogen sich bei vorliegender fortgeschrittener Osteoarthritis einer operativen Versorgung mit einer Knie-Totalendoprothese. Das Durchschnittsalter der vier Spender, welche der Verwendung der bei einer prothetischen Versorgung des Kniegelenks entfernten Menisken für Forschungszwecke schriftlich zustimmten, lag bei $58 \pm 3,12$ Jahren. Das Nassgewicht der Menisken betrug $5,36 \pm 1,17$ g. Die Abbildung 3 zeigt ein repräsentatives Makrobild von Meniskus LN1410.

Tabelle 2: Übersicht der analysierten Menisken.

Labor-nummer	Alter des Spenders	Geschlecht	Medial oder Lateral	Nassgewicht [g]
LN1394	60	M	Medial	4,302
LN1397	54	M	Medial	6,290
LN1408	61	M	Medial	6,450
LN1410	59	M	Medial	4,405

Alter des Spenders		Nassgewicht [g]	
Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
58,500	3,109	5,362	1,167



Abbildung 3: Repräsentatives Makrobild eines der Menisken (LN1410).

3.2 Immunhistochemische Färbungen von Meniskusgewebe

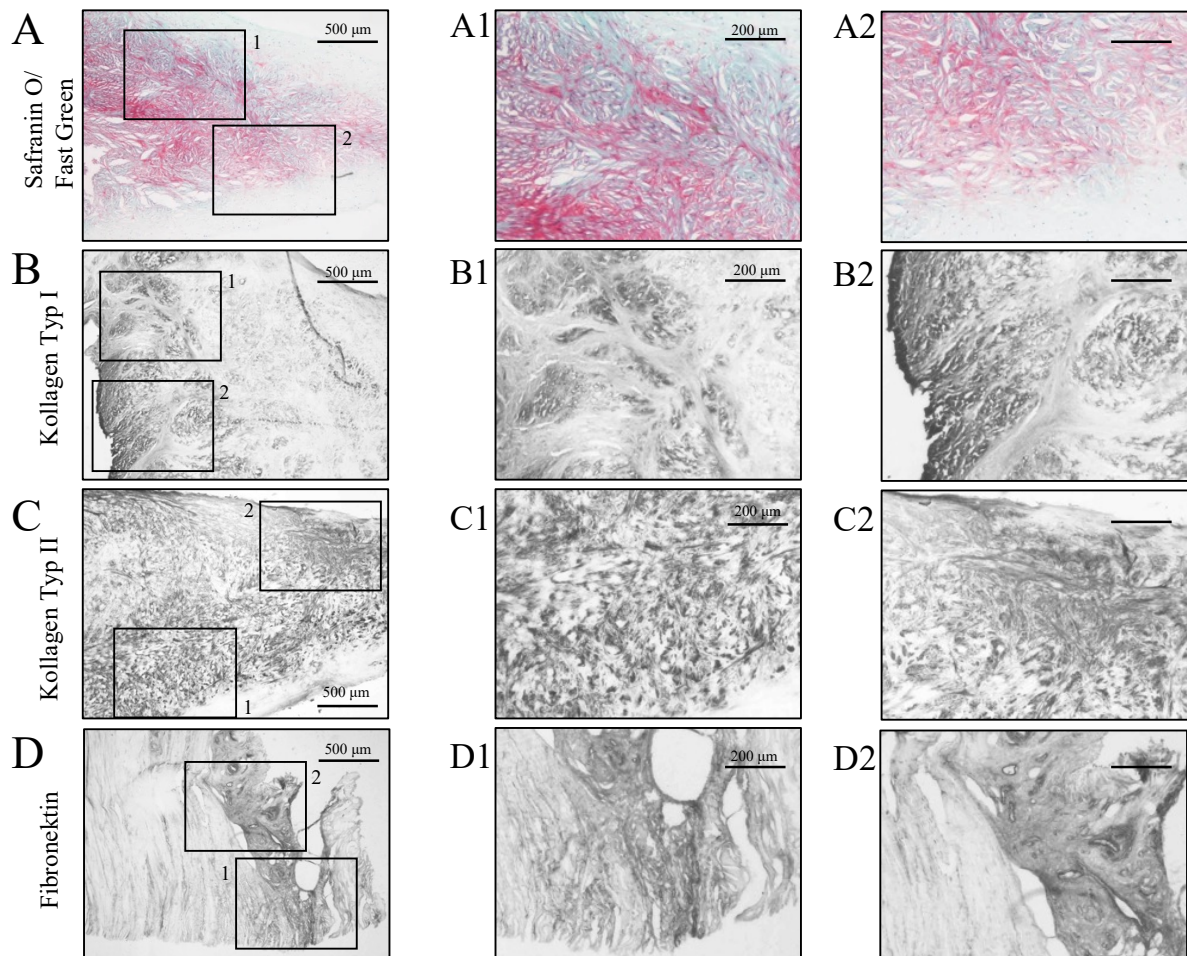


Abbildung 4: Ausschnitte immunhistochemischer Färbungen von Meniskusgewebe (exemplarisch von Meniskus LN1394). (A) Safranin O/ Fast Green Färbung. (B) Kollagen Typ I Färbung. (C) Kollagen Typ 2 Färbung. (D) Fibronektin Färbung.

Verschiedene histologische und immunhistochemische Färbungen von gefrorenen, 10 µm dünnen, mit Paraformaldehyd fixierten Meniskusschnitten wurden durchgeführt, um charakteristische meniskale Eigenschaften des verwendeten Gewebes nachzuweisen. Dies wird beispielhaft gezeigt anhand Meniskus LN1394 (vgl. Abb. 4).

Es zeigte sich sowohl im äußeren, vaskularisierten, als auch im inneren, avaskulären Meniskus eine ausgeprägt sichtbare Safranin O Färbung und damit ein Vorhandensein von negativ geladenen Glykosaminoglykanen. Im Bereich der Ober- und Unterseite des Meniskus überwiegte das durch Fast Green blau-grün angefärbte Kollagen. (vgl. Abb. 4A). Die Safranin O Anfärbung kann in ihrer deutlichen Intensität Ausdruck des bereits fortgeschrittenen Alters des verwendeten Meniskusmaterials sein (42).

Anhand der Färbungen von Kollagen Typ I und Typ II konnte ein Eindruck der Distribution dieser beiden hauptsächlichen Strukturproteine der meniskalen extrazellulären Matrix gewonnen werden. Gut sichtbar war eine – wie auch in der Literatur beschriebene (vgl. (1,43)) – Häufung von Kollagen Typ I im vaskularisierten äußeren Meniskusanteil, sowie das Überwiegen von Kollagen Typ II im avaskulären inneren Meniskusanteil (vgl. Abb. 4B und 4C).

Durch Anfärbung des extrazellulären Strukturproteins Fibronectin wurde versucht, Hinweise auf dessen Lokalisation innerhalb des Meniskus zu erlangen. Aus der sehr schwach positiven Fibronectin-Färbung lassen sich dahingehend nur bedingt Schlüsse ziehen, es scheint allerdings in höherem Maße im vaskulären Anteil vorzufinden zu sein, und somit eine Häufung in der Nähe von Gefäßen vorzuliegen. (vgl. Abb. 4D).

3.3 Analyse von nicht-Fibronectin-adhärenenten vaskulären und avaskulären Meniskuszellen

Zunächst sollen die Ergebnisse der Analysen nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen dargestellt werden.

3.3.1 Meniskusverdau und Kulturverhalten

Bei dem enzymatischen Verdau der kleingehackten medialen Menisken konnten aus dem vaskularisierten äußeren Meniskusanteil (MW = 0,24; SD = 0,03) höhere Zellzahlen pro Gramm Nassgewicht als aus dem avaskulären, inneren Anteil der Menisken (MW = 0,12; SD = 0,07) isoliert werden (vgl. Abb. 5A). Ein T-Test mit unterschiedlicher Varianz ergab statistische Signifikanz, $t(4) = 2,78$; $p = 0,034$; $d = 2,60$ (44).

Abbildung 5B zeigt vaskuläre und avaskuläre nicht-Fibronectin adhärenente Zellen in der frühen Kulturphase. Diese weisen augenscheinlich eine ähnliche Morphologie auf. Bei den avaskulären Zellen fiel ein etwas höherer Anteil an runden bis polygonalen Zellen mit mehr als zwei Zellausläufern auf im Gegensatz zu den überwiegend länglichen, spindelförmigen Zellen bei den Zellen aus dem vaskulären Meniskusanteil.

Insgesamt behielten die Zellen ihre Morphologie im Kulturverlauf bis zur fortgeschrittenen Passage bei. Bei den avaskulären Zellen schien es zu einer Entwicklung hin zu einer mehr fibroblastisch anmutenden Morphologie zu kommen mit einer Zunahme länglicher Zellfortsätze.

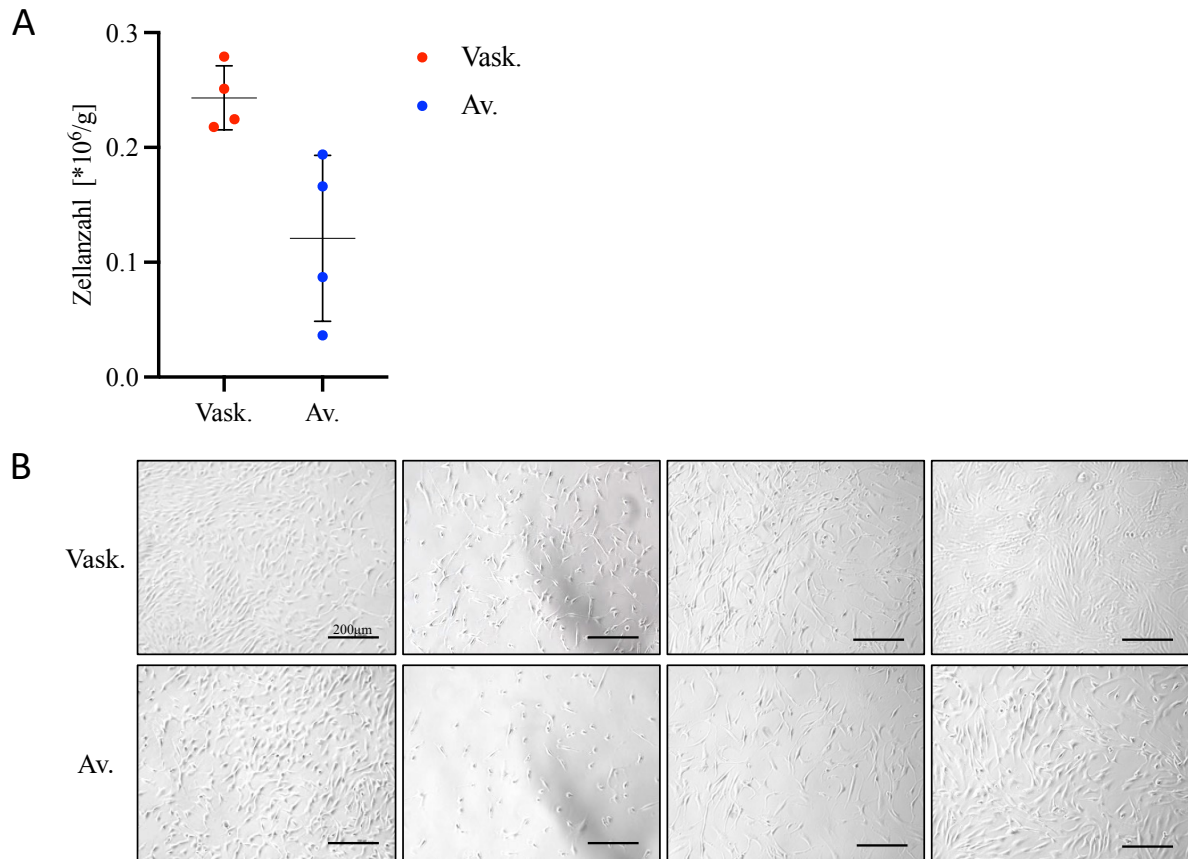


Abbildung 5: (A) Ausgesäte Zellanzahl nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen initial nach Gewebeverdau ($n=4$, $MW \pm SD$). (B) Phasenkontrastbilder der nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen in früher Passage.

Die nicht-Fibronectin-adhärenter vaskulären und avaskulären Zellen wurden bis zum Ende der sechsten Passage über einen Zeitraum von im Mittel 90 Tagen kultiviert. Abbildung 6 zeigt Populationswachstumskurven der Zellen im Kulturverlauf mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Die kumulativen Populationsverdopplungszeiten der vaskulären und avaskulären Zellen stellten sich nicht signifikant unterschiedlich dar.

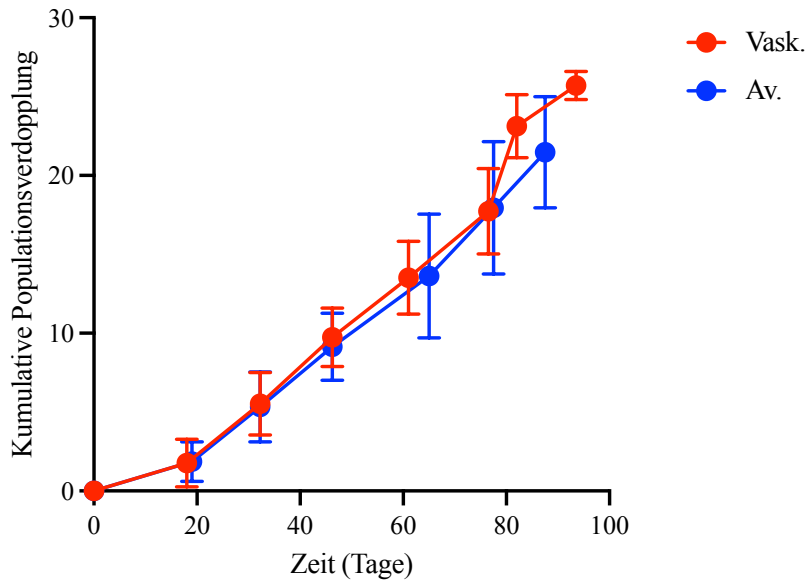


Abbildung 6: Populationswachstumskurven nicht-Fibronectin-Adhärenter Meniskuszellen (n=4, Mittelwert $\pm$ SD).

3.3.2 Koloniebildungskapazität

Abbildung 7 zeigt exemplarisch mit Kristallviolett-gefärbte Zellkolonien von nicht-Fibronectin-adhären Zellen des Meniskus LN1394. In allen Petrischalen zu allen ausgesäten Zelldensitäten formten sich innerhalb von 12 Tagen Zellkolonien, was Ausdruck der Klonogenität – also einer wichtige Stammeigenschaft – eines Anteils sowohl der vaskulären als auch der avaskulären nicht-Fibronectin-adhären Meniskuszellpopulation ist. Makroskopisch stellten sich die Kolonien auf Fibronectin-beschichteten Petrischalen größer dar.

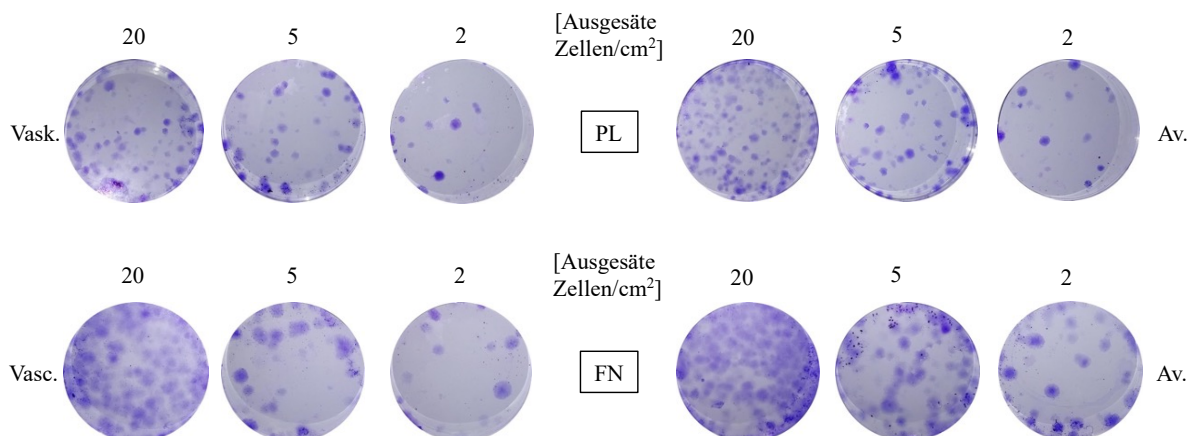


Abbildung 7: Mit Kristallviolett gefärbte Kolonien nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen auf unbeschichteten Petrischalen (PL) und auf Fibronectin-beschichteten Petrischalen (FN), exemplarisch LN1394.

Die Zählung der gebildeten Kolonien ergab über alle ausgesäten Zelldichten und ausgewerteten Menisken hinweg eine höhere mittlere Anzahl gebildeter Kolonien auf Plastik als auf Fibronectin-beschichteten Petrischalen von 39 % bei den vaskulären und 55 % bei den avaskulären Zellen vgl. Abb. 8A). Dabei bildeten die avaskulären Zellen im Mittel eine leicht höhere Kolonienzahl als die vaskulären Zellen (auf Plastik 18 % mehr und auf Fibronectin 7 % mehr). Statistische Signifikanz wurde in beiden Fällen nicht nachgewiesen.

Die Abbildung 8B zeigt den Anteil gebildeter Kolonien an der initial ausgesäten Zellanzahl, also eine Koloniebildungseffizienz. Diese nahm zu je niedriger die initial ausgesäte Zelldichte und erreichte eine mittlere Effizienz von bis zu 26,3 % bei avaskulären Zellen und einer initialen Zelldichte von 2 Zellen pro cm^2 . Die mittlere Koloniebildungseffizienz zeigte sich auf Plastik im Vergleich zur Fibronectin-Beschichtung über alle Zelldensitäten und Konditionen hinweg leicht erhöht ohne statistische Signifikanz.

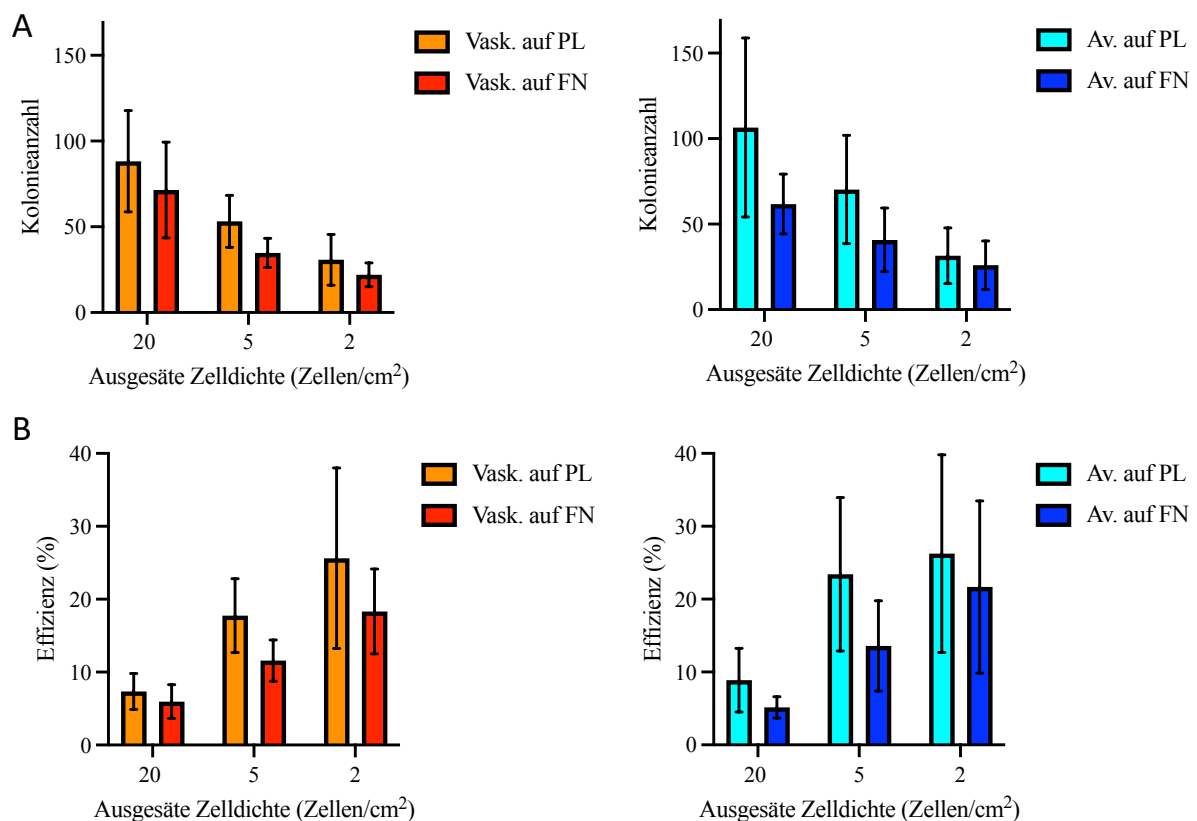


Abbildung 8: (A) Anzahl gezählter von nicht-Fibronectin-adhären vaskulären und avaskulären Meniskuszellen gebildeten Kolonien auf unbeschichteten (PL) und Fibronectin-beschichteten (FN) Petrischalen und (B) entsprechende Koloniebildungseffizienzen (gebildete Kolonien pro ausgesäter Zelldichte [%]), jeweils n=4 mit Mittelwert und SD.

3.3.3 Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung

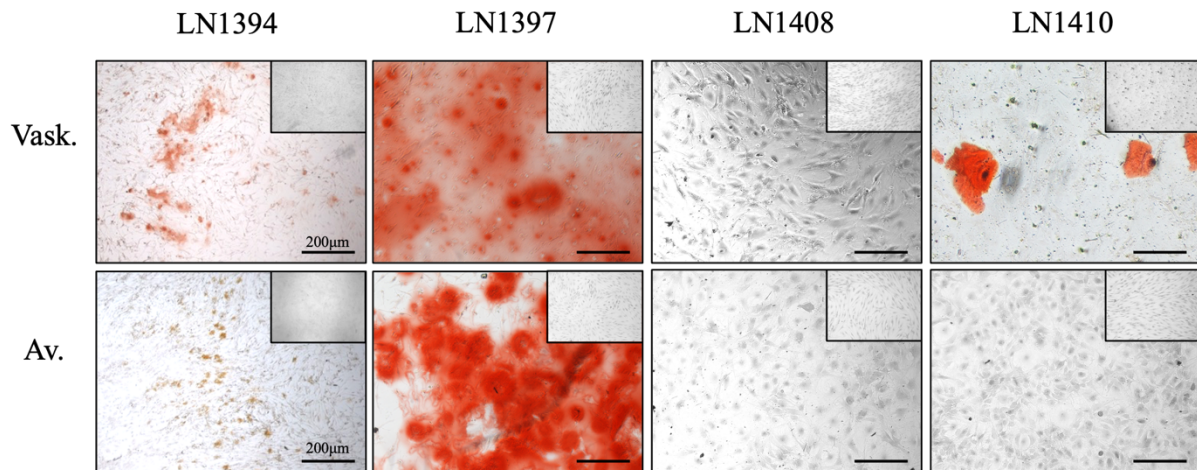


Abbildung 9: Alizarin-Färbung zur Darstellung von Kalziumdeposition bei nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bildauswahl + Negativkontrollen).

Vaskuläre und avaskuläre nicht-Fibronectin-adhärenente Zellen von zwei der vier Menisken, nämlich LN1394 und LN1397, zeigten nach einer Kultivierung für zwei Wochen mit osteogenem Differenzierungsmedium nach Passage 2 eine positive Alizarin-Färbung, welche eine Ca^{2+} -Deposition im Sinne der Bildung einer knöchernen Matrix anzeigt (vgl. Abb. 9). Die Intensität der Färbung variierte zwischen den verschiedenen Konditionen. Insgesamt erschien die Alizarin Färbung bei den vaskulären Zellen jeweils stärker – im Sinne einer womöglich etwas ausgeprägteren osteogenen Differenzierungskapazität von Zellen, welche aus dem vaskularisierten, äußeren Anteil des Meniskus stammen. Eine schwach positive Alizarin-Färbung wurde auch bei den vaskulären Zellen des Meniskus LN1410 beobachtet. Ein beträchtlicher Teil der Zellen stellte sich zum Zeitpunkt der Färbung in diesem Fall nicht mehr lebend dar, weswegen unklar ist, ob ein Teil der Zellen eines dritten Meniskus auch osteogenes Differenzierungspotential hatte. Bei den avaskulären Meniskuszellen von LN1410 war – wie bei den vaskulären und avaskulären Zellen von Meniskus LN1408 – die Alizarin-Färbung negativ.

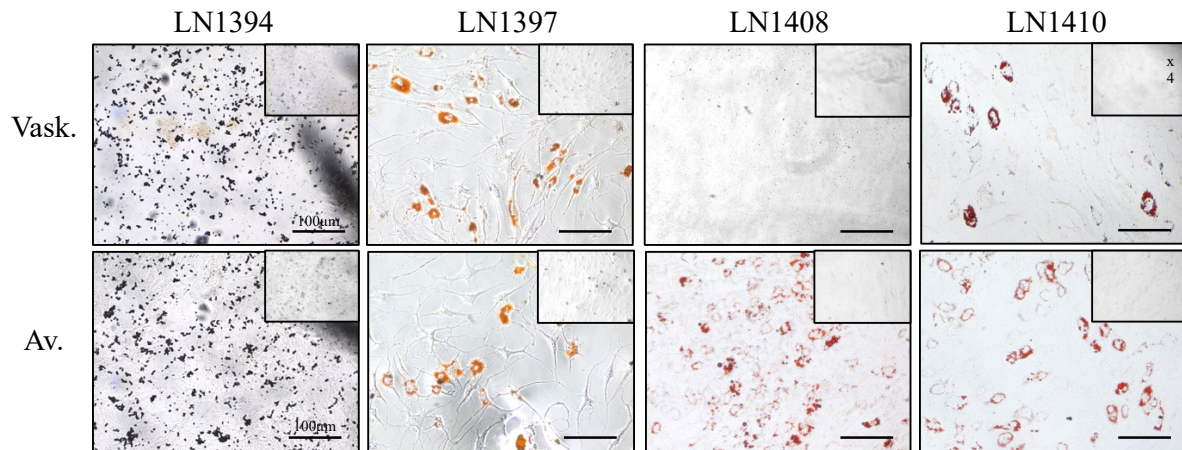


Abbildung 10: Ölot O-Färbung zur Darstellung von Lipidtröpfchen bei nicht-Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen nach Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bilderauswahl + Negativkontrolle).

Nach zweiwöchiger Differenzierung mit adipogenem Differenzierungsmedium konnten bei drei von vier Menisken eine Anfärbung von gebildeten Lipidvakuolen mittels Ölot-O-Färbung dargestellt werden (vgl. Abb. 10). Ein offensichtlicher Unterschied zwischen vaskulären und avaskulären Zellen hinsichtlich der Lipidvakuolen-Bildung und damit eines proklamierten adipogenen Differenzierungspotentials ließ sich nicht erkennen. Bei den vaskulären und avaskulären Meniskuszellen von Meniskus LN1394 sowie den vaskulären Zellen von LN1408 waren keine angefärbten Lipidvakuolen sichtbar, aber viel Zelldetritus mit wenigen lebenden Zellen. Dies lässt in diesen Fällen methodische Mängel vermuten.

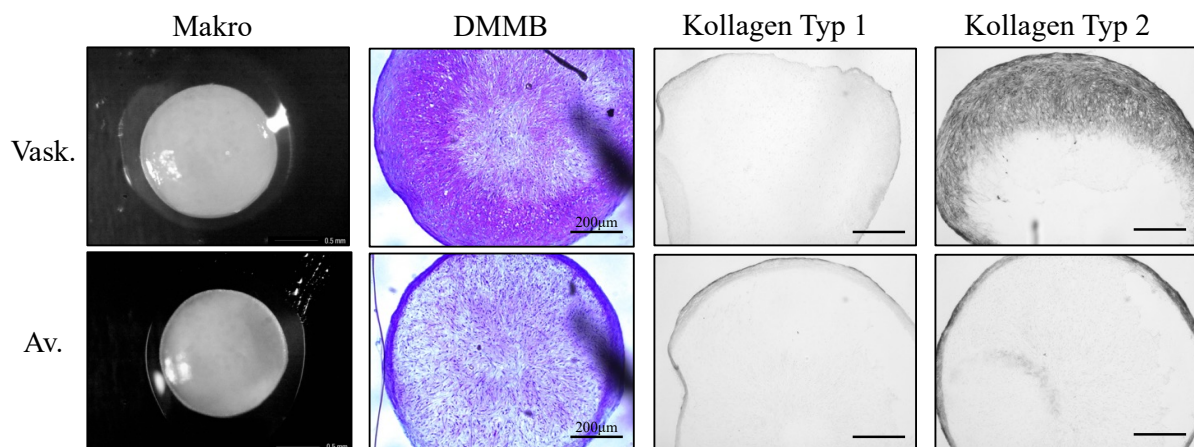


Abbildung 11: Chondrogene Differenzierung nicht-Fibronektin-adhärenenter Meniskuszellen als Zellpellet für 14 Tage – Makrobilder, DMMB-Färbung zur Darstellung von Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ 1- und Kollagen Typ II-Färbungen zur Darstellung von Knorpelmarkern (Exemplarische Bilderauswahl von Donor LN1397).

Abbildung 11 zeigt exemplarisch das chondrogene Differenzierungspotential nicht-Fibronectin-adhärenter vaskulärer und avaskulärer Meniskuszellen des Meniskus LN1394. Die nach zwei Wochen unter Kultivierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium geformten Zellpellets der vaskulären Meniskuszellen stellten sich bei allen analysierten Menisken leicht größer dar im Vergleich zu denen der avaskulären Meniskuszellen.

DMMB-Färbungen offenbarten bei den nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen ein gemischtes chondrogenes Differenzierungspotential. Lediglich bei einem von – in diesem Fall – drei analysierten Menisken, dem Donor LN1394, ließ sich ein deutlich violettes Knorpelsignal als Hinweis auf Anreicherung von Glykosaminoglykan erkennen. Dabei stellte es sich stärker bei den Pellets aus vaskulären als bei denen aus avaskulären Meniskuszellen dar. Eine exemplarische immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ 1 und Typ 2 bei Meniskus LN1394 konnte das Vorhandensein von knorpeltypischem Kollagen Typ 2 nachweisen. Dabei zeigte sich eine stärkere Färbung bei dem vaskulären Pellet, bei dem sich die Kollagenanreicherung im Gegensatz zu dem avaskulären Pellet nicht nur auf den äußeren Pelletrand beschränkte. Die Färbung von für Knochengewebe charakteristischem Kollagen Typ 1 stellte sich negativ dar.

3.4 Analyse von Fibronectin-adhärenenten vaskulären und avaskulären Meniskuszellen

Nun werden die Ergebnisse der Analysen Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen dargestellt. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit von den drei Menisken LN1937, LN1408 und LN1410 Fibronectin-adhärenente Zellen einer Kultivierung und Differenzierung zugeführt werden.

3.4.1 Zellmorphologie im Kulturverlauf

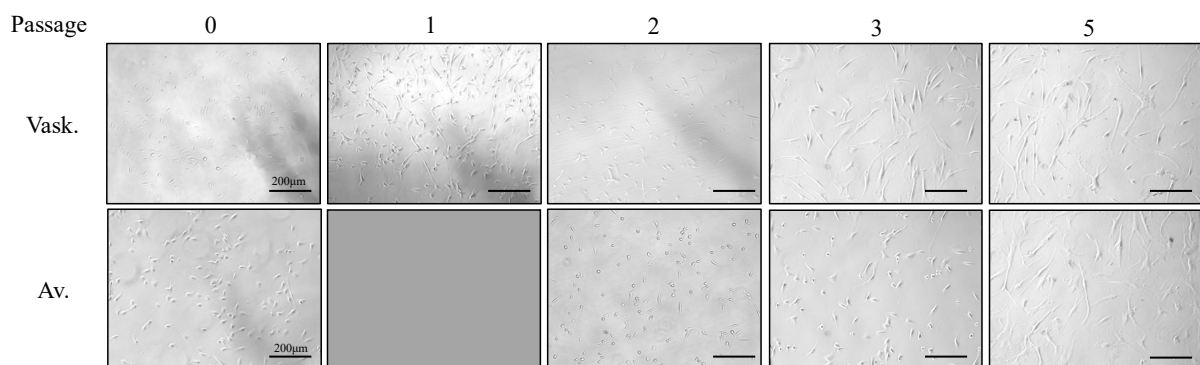


Abbildung 12: Morphologie Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen im Verlauf der Zellkultur (Exemplarisch LN1397, Phasenkontrastbilder).

Abbildung 12 zeigt exemplarisch phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen Fibronektin-adhärenter vaskulärer und avaskulärer Meniskuszellen des Meniskus LN1397 im Kulturverlauf. Während in früher Passage bei Zellen beider Meniskusregionen kleine Zellen mit polygonaler Zellform ohne längere Zellausläufer überwogen, wirkt es so, als ob die Zellen im Verlauf der Zellkultur in fortgeschrittener Passage zunehmend eine längliche, fibroblastische Zellform annahmen mit zumeist zwei länglichen gegenüberliegenden Zellfortsätzen. Insgesamt entstand der Eindruck, dass diese Entwicklung bei den vaskulären Fibronektin-adhärenenten Zellen früher vonstatten ging – also bereits in früherer Passage als bei den avaskulären Fibronektin-adhärenenten Zellen solche mit länglicher, fibroblastisch anmutender Zellform überwogen. Zu einem fortgeschrittenen Kultivierungszeitpunkt war dann kein morphologischer Unterschied zwischen den vaskulären und avaskulären Fibronektin-adhärenenten Zellen mehr zu erkennen.

3.4.2 Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung

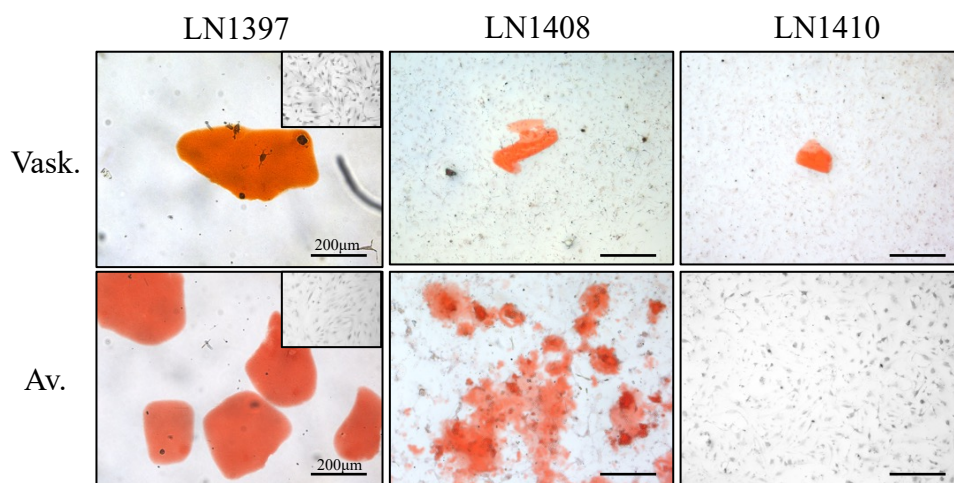


Abbildung 13: Alizarin-Färbung zur Darstellung von Kalziumdeposition bei Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bilderauswahl ± Negativkontrolle).

Abbildung 13 zeigt Alizarin-gefärbte Fibronektin-adhärenente Meniskuszellen nach Kultivierung der Zellen nach Passage 2 mit osteogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage. Bei einem der drei Menisken, LN1408, zeigt sich eine klar positive Alizarin-Färbung bei den avaskulären Zellen und eine leicht positive Färbung bei den vaskulären Zellen. Bei LN 1397 sind keine lebenden Zellen zu sehen im Vergleich zur Negativkontrolle, weswegen das positiv anmutende Signal sowohl bei den vaskulären, als auch bei den avaskulären Zellen nicht sicher als

Kalziumdeposition im Sinne der Ausbildung einer knöchernen Matrix zu werten ist. Auch bei LN1410 zeigt sich lediglich bei den vaskulären Zellen ein allenfalls leicht positives Signal – die Alizarin-Färbung der entsprechenden avaskulären Zellen bleibt negativ.

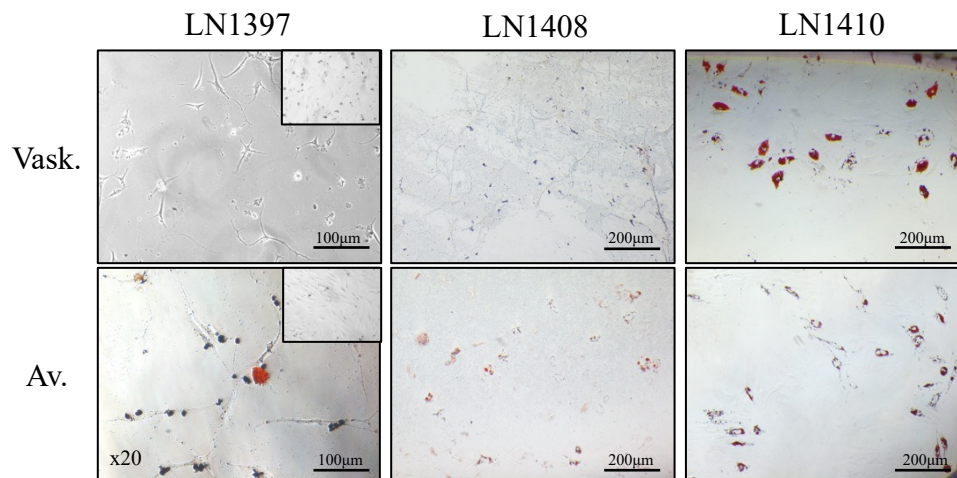


Abbildung 14: Ölrot O Färbung zur Darstellung von Lipidtröpfchen bei Fibronektin-adhärenenten Meniskuszellen nach Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bilderauswahl ± Negativkontrolle).

Die Auswertung des adipogenen Differenzierungspotentials Fibronektin-adhärenenter Meniskuszellen zeigt ein ähnlich gemischtes Bild (vgl. Abb. 14). Eine klar positive Ölrot O Färbung als Zeichen von gebildeten Lipidvakuolen findet sich nach zweiwöchiger Kultivierung der Zellen mit adipogenem Differenzierungsmedium bei den vaskulären und avaskulären Zellen von Meniskus LN1410 und bei den avaskulären Zellen von Meniskus LN1408. Die vaskulären Zellen von LN1408 und die vaskulären und avaskulären Zellen von Meniskus LN1397 zeigen keine positive Ölrot O Färbung.

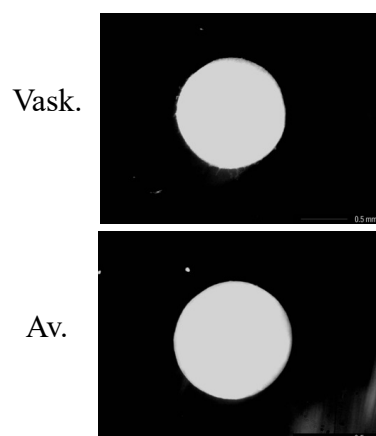


Abbildung 15: Chondrogene Differenzierung Fibronektin-adhärenenter Meniskuszellen als Zellpellet für 14 Tage – Exemplarische Makrobilder von Meniskus LN1410.

Das chondrogene Differenzierungspotential Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht umfänglich analysiert. Abbildung 15 zeigt exemplarisch Makroaufnahmen von vaskulären und avaskulären Zellpellets nach zweiwöchiger Kultivierung mit chondrogenem Differenzierungsmedium.

4 Diskussion

Es folgt eine kurze Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit - dabei soll auch Bezug genommen werden auf die Ergebnisse bisheriger Publikationen zu dem Thema. Einem Ausblick auf potenzielle klinische Anwendungsmöglichkeiten soll schließlich eine kritische Diskussion der Limitationen dieser Arbeit folgen.

4.1 Einordnung der Ergebnisse

Das Ziel ist, durch Studien wie diese die klinischen Möglichkeiten zur Meniskusregeneration zu verbessern. Ein Ansatz besteht dabei in der Ausschöpfung von zellulären Methoden. Eine bereits autochthon im Meniskus nachgewiesene Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften, hier bezeichnet als meniskale Progenitorzellen, könnte dabei eine interessante Rolle spielen und Vorteile im Vergleich zu MSCs aus dem Knochenmark bieten (29,31,45). Es wurde versucht, weitere Hinweise auf die Lokalisation und Charakteristika dieser Zellen zu erlangen. Desweiteren wurde versucht, das Potential der Zellisolation mittels differentieller Fibronektin-Adhäsion, welche bereits bei chondralen Progenitorzellen erfolgreich angewendet wurde, zu evaluieren.

Die Arbeit reiht sich ein in die bisherigen Arbeiten, welche die Morphologie der Zellen aus dem äußeren Meniskusanteil als charakteristischerweise spindelförmig und fibroblastenartig und die des inneren Meniskusanteils als eher rundlich, polygonal beschreiben (31,46). Bei den mittels differentieller Fibronektin-Adhäsion isolierten Zellen hingegen war auch bei den Zellen aus dem äußeren Meniskusanteil in früher Passage ein höherer Anteil an eher polygonalen Zellen zu sehen, was für eine gewisse Selektion durch Fibronektin spricht.

Die signifikant höhere Zellzahl beim initialen Meniskusverdau des äußeren Meniskusanteils kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen ist anzumerken, dass die Trennung zwischen äußerem und inneren Meniskusanteil schätzungsweise nach makroskopischen Kriterien erfolgte. Auch wenn auf eine makroskopische Intaktheit des verwendeten Meniskusmaterials geachtet wurde, ist es außerdem möglich, dass gerade der innere Anteil auch bedingt durch die jeweils vorliegende fortgeschrittene Osteoarthritis in einem höheren Ausmaß degenerative Veränderungen mit gegebenenfalls erniedrigter Zellularität aufwies.

Hinsichtlich der Koloniebildungskapazität ist zu sagen, dass zwar Koloniebildungs-Assays von nicht-Fibronektin-adhären Meniskuszellen (also mehr oder weniger der

Meniskuszellgesamtheit) auf Plastik und Fibronectin angefertigt wurden, allerdings nicht von den Fibronectin-adhärenenten Zellen. Dies sollte in Folgestudien ergänzt und analysiert werden, um mögliche Hinweise auf eine etwaige Überlegenheit einer Isolation mittels Fibronectin-Adhäsion zu erlangen.

Die Durchführung des Assays mit nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen auf Fibronectin-beschichteten Petrischalen erbrachte in unserer Arbeit im Vergleich zu unbeschichteten Petrischalen eine niedrigere Koloniezahzahl und Koloniebildungseffizienz über alle Zellkonditionen hinweg. Möglicherweise bewirkte die Anwesenheit des Fibronectins dabei eine weitere Selektion wachsender Zellen. Es ist bekannt, dass Fibronectin als Teil der extrazellulären Matrix u.a. auf die Migration von Zellen Einfluss hat (34,35). Über eine Interaktion mit Integrinen, spezifischen Zelloberflächenrezeptoren, welche intrazelluläre Signalwege aktivieren und so zelluläre Prozesse steuern, fungiert Fibronectin im Rahmen der Embryonalentwicklung, der Wundheilung sowie auch der Metastasierung von Tumoren als Leitschiene für Zellen. Durch die Bindung an Integrine induziert es eine Reorganisation des Zytoskeletts und fördert die Bildung von Fokaladhäsionen, wodurch sich Zellen aktiv in Richtung von Fibronectin-reichen Bereichen bewegen können (34). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Fibronectin an der Differenzierung von Stammzellen am Beispiel der Chondrogenese, also der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten, nachgewiesen. Singh et al. zeigten 2012, dass Fibronectin hier sowohl fördernd als auch hemmend wirken kann, abhängig von der spezifischen Zellumgebung und der Zusammensetzung der jeweiligen extrazellulären Matrix (35). Übertragen auf unseren Versuchsaufbau der CFU-Assays könnten die in Anwesenheit von Fibronectin makroskopisch deutlich größer anmutenden Zellkolonien folglich zum einen auf eine begünstigte zelluläre Migrationsfähigkeit hindeuten. Darüber hinaus könnte diese Beobachtung auch Ausdruck einer selektiv erhöhte Zellteilung und -vermehrung, also alterierten Differenzierungskapazität sein. Insgesamt ließ sich, wie bei Ding et al. 2015 und Shen et al. 2014, die Koloniebildungskapazität als wichtiges Stammzellcharakteristikum erneut bei einem Anteil der nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen sowohl des äußeren als auch des inneren Meniskusanteils nachweisen (28,47). Die maximal erreichte CFU-Effizienz (bei ausgesäter Zelldichte von 2 Zellen/cm²) betrug bei uns sowohl für vaskuläre als auch für avaskuläre Zellen ca. 26 %. Im Vergleich dazu beschrieben Shen et al. 2014 eine CFU-Effizienz von 35% (47). In einem abgewandelten Versuchsaufbau mit Vorselektion der untersuchten Zellen durch eine Analyse von lediglich den herauswachsenden Zellen in einer Gewebekultur von Mausmenisken wurde bei Gamer et al. 2017 vergleichsweise ein Anteil klonogener Zellen von 2 % beschrieben (33).

Die zwar nicht statistisch signifikante, aber doch leicht erhöhte mittlere Koloniezahl bei Zellen aus dem inneren Meniskusanteil kann als Bestätigung eines Vorhandenseins potenter Zellen darin angesehen werden. Die zum Teil relativ hohe Standardabweichung bei den gezählten Kolonien, kann entweder Ausdruck einer zwischen den verschiedenen Spendern unterschiedlichen Zellwachstumsgeschwindigkeit oder auch eines zwischen den verschiedenen Spendern unterschiedlichen Anteils von Zellen mit Stammzellpotential sein. Auch der unterschiedliche Versuchsaufbau erschwert eine Vergleichbarkeit.

Nun zur Einordnung der Ergebnisse bezüglich des multipotenten Differenzierungspotentials. Insgesamt zeigte sich sowohl bei nicht-Fibronectin-adhärenenten als auch bei den Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen ein gemischtes Bild mit augenscheinlich donorabhängigem Differenzierungspotential. Nicht alle Meniskuszellen der unterschiedlichen Menisken zeigten ein umfangreiches Differenzierungspotential. Der Donor der am besten differenzierenden nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen, LN1397, war mit 54 Jahren der jüngste der vier in dieser Arbeit untersuchten Menisken. Natürlich kann dies bei der niedrigen Anzahl analysierter Menisken Zufall sein – möglicherweise ist aber auch ein positiver Zusammenhang zwischen fortschreitendem Alter/degenerativen Gewebeveränderungen und einer Verkleinerung der meniskalen Progenitorpopulation (bzw. Zellseneszenz mit einhergehender Abnahme von Stammzeleigenschaften) dafür verantwortlich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch diese Arbeit multipotente Zellen sowohl in der äußeren als auch in der inneren Meniskuszone nachweist (vgl. (29,31,39,45,46)). Dies lässt darauf schließen, dass meniskale Progenitorzellen nicht nur in direkter räumlicher Nähe zu Gefäßen anzutreffen sind. Die Durchführung weiterer quantitativer Methoden, wie Alizarin-Quantifizierung, GAG-Quantifizierung oder auch die Messung der Expression von genetischen Markern der verschiedenen Differenzierungen, könnte in folgenden Forschungsarbeiten ergänzt werden, um weitere vergleichende Aussagen hinsichtlich des Ausmaßes des Differenzierungspotentials treffen zu können. Rein makroskopisch sind sowohl bei der Osteo- als auch bei der Adipogenese keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Differenzierungspotentials von Zellen aus der äußeren oder aus der inneren Meniskuszone zu erkennen. Bei der Chondrogenese ist eine Tendenz zur höheren Differenzierungskapazität bei Zellen des äußeren Meniskusanteils im Vergleich zu Zellen aus dem inneren Meniskusanteil zu erkennen.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Fibronectin-adhärenenten Zellen und ihrer sequenziell expandierten Klone sind folgendermaßen zusammenzufassen. Es ist möglich, mittels differenzieller Fibronectin-Adhäsion multipotente Zellen sowohl aus dem äußeren als

auch aus dem inneren Meniskusanteil zu isolieren. Dies wurde sowohl von dieser Studie, also auch von Korpershoek et al. 2021 nachgewiesen (39). Die chondrogene Differenzierungskapazität Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen wurde nur unzureichend analysiert, daher wird sich mit Schlussfolgerungen hierzu an dieser Stelle zurückgehalten. Auch bei den Fibronectin-adhärenten Meniskuszellen zeigt sich ein gemischtes Differenzierungspotential – während sich bei einem Donor eine ausgeprägte adipogene und kaum ausgeprägte osteogene Differenzierungsfähigkeit darstellt, ist es bei einem zweiten Donor genau umgekehrt. Die niedrige Anzahl analysierter Klone und analysierter Menisken lässt es hier nicht zu, belastbare Aussagen über das Ausmaß der Differenzierungskapazität zu treffen. Auch Vergleiche zwischen den nicht-Fibronectin-adhärenten und Fibronectin-adhärenten Meniskuszellen sind so an dieser Stelle mit den Ergebnissen dieser Arbeit aktuell nicht zielführend. Es wäre daher sinnvoll, eine noch größere Anzahl von Klonen zu analysieren. Gleichzeitig weisen aber bereits diese Ergebnisse das Potential der auf diesem Weg isolierten Zellen nach. Auch die Ergebnisse von Korpershoek et al. 2021 sind hier noch einmal hervorzuheben (39). Diese waren bereits in der Lage, vielversprechende Unterschiede Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen im Vergleich zur Meniskuszellgesamtheit herauszuarbeiten. Hier wurde eine im Vergleich höhere Proliferationsrate und Koloniebildungskapazität beschrieben. Zusammen mit den hier ebenfalls nachgewiesenen Merkmalen von mesenchymalen Stammzellen, einschließlich der Expression von Stammzellmarkern und der unter geeigneten Bedingungen vorhandenen Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung in verschiedene Gewebetypen könnte die Fibronectin-Adhäsion als Selektionskriterium isolierter Meniskuszellen zur Eröffnung neuer Wege einer personalisierten und effektiven Zelltherapie in der Behandlung von Meniskuspathologien beitragen (39).

4.2 Klinische Anwendung und Ausblick

Hinsichtlich einer klinischen Anwendung sind verschiedene Ansätze denkbar. Einerseits kann weiter nach Möglichkeiten gesucht werden, z.B. medikamentös die Migration oder auch die Aktivität von Zellen der nachgewiesenen Progenitorpopulation in dem Bereich eines Defekts in vivo anzuregen. Gegebenenfalls könnte dazu auch auf das umgebende, oft osteoarthritisch veränderte Milieu Einfluss genommen werden. In einer Arbeit aus dem Jahr 2021 von Wei et al. wurde zum Beispiel beschrieben, dass bei Mäusen über den Hedgehog-Signalweg gesteuerte sogenannte Gli1-positive Zellen einen größeren Anteil der meniskalen Progenitorzellen

darstellen und dass eine medikamentöse Anregung des Hedgehog-Signalwegs in einem murinen Osteoarthritis-Modell kurz nach einer Meniskusläsion zu einer beschleunigten Heilung und verringerten Ausprägung von Osteoarthritis beitragen würden (48).

Ein weiterer Ansatz könnte sein, meniskale Progenitorzellen mit Zellkultur-Techniken zu vermehren und allogen z.B. als Zellsuspension oder mithilfe sogenannter Scaffolds in dem Bereich einer Läsion zu applizieren. Da im Rahmen von Knie-Endoprothetik Menisken entfernt und verworfen werden, wäre eine hohe Verfügbarkeit solcher Zellen durchaus gegeben. Weitere Studien sind notwendig, um das klinische Potential der meniskalen Progenitorzellen *in vivo* auszuloten. Zum Beispiel wäre es sinnvoll, das Heilungspotential isolierter und expandierter Meniskuszellen mit postulierten Stammzeleigenschaften, also Progenitorzellen, im Bereich einer Meniskusläsion an einem Tiermodell mit Meniskuszellen in der Gesamtheit und gegebenenfalls auch mit MSCs aus dem Knochenmark zu vergleichen. Natürlich spielt bei jeglicher allogener Transplantation von Zellmaterial auch die Sicherheit hinsichtlich etwaiger immunologischer Reaktionen beim Empfänger eine Rolle. Eine Arbeit von Shen et al. aus dem Jahr 2013 beschrieb dazu bereits vielversprechende Ergebnisse – die hier isolierten Zellen mit Stammzeleigenschaften aus Kaninchenmenisken wiesen eine geringe Immunogenität und sogar immunsuppressive Eigenschaften auf (30).

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie auch Korpershoek 2021, dass eine Isolation mithilfe differentieller Fibronektin-Adhäsion möglich ist. Die Arbeit reiht sich auch in die bisherigen Arbeiten ein, die Zellen mit Stammzellprofil in der inneren, avaskulären Zone nachweisen. Es bleibt noch unklar, ob die Zellisolation mittels Fibronektin auch wirklich Vorteile bietet, sowohl in dem Ausmaß der Ausprägung von Stammzeleigenschaften als auch in der klinischen Anwendung. Weitere Arbeiten mit klonaler Zellisolation via Fibronektin sind notwendig, um genauer feststellen zu können, welcher Anteil der adhärierenden Zellen die gewünschten Eigenschaften aufweisen.

Helfen kann dabei eine Analyse von Markern der Zelloberfläche. Ein eindeutiges Markerprofil könnte auch zu einer gezielten Isolation der gewünschten Zellpopulation beitragen. Inzwischen ist es mehreren Gruppen gelungen, hier Fortschritte zu erzielen. Sun et al. beschrieben aus gesundem Meniskus stammende meniskale Progenitorzellen als CD146-positiv. Weiterhin konnten Stammzeleigenschaften auch den meniskalen CD93-positiven Endothelzellen zugeschrieben werden. Interessanterweise war bei osteoarthritischen Menisken ein Shift des Markerprofils meniskaler Progenitorzellen hin zu CD318-Positivität zu sehen (49). Bei den osteoarthritischen Menisken der Arbeit von Korpershoek et al. wurde ebenfalls eine signifikant

erhöhte CD318-Positivität bei Fibronectin-adhärenenten im Vergleich zu den restlichen nicht-Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen beschrieben (39).

Als potenzieller Nachteil im Vergleich zur Expansion von Meniskuszellen ohne Fibronectin-Adhäsion ist zu nennen, dass sich die Isolation durch die zusätzlichen Schritte mit Klonierung aufwendiger und – jedenfalls unseren Erfahrungen nach – auch etwas unzuverlässiger hinsichtlich der Wachstumsraten und des Zellüberlebens gestalten. Dies kann allerdings auch methoden- und protokollbedingt sein. Im Gegensatz dazu beschrieben Korpershoek et al. eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zu den Zellen der Meniskuszellgesamtheit (39).

4.3 Wissenschaftliche Limitationen

Es wurden für diese Arbeit vier jeweils mediale Menisken von ausschließlich männlichen Spendern einer umfassenden Analyse unterzogen. Es wäre erstrebenswert, die Ergebnisse an einer größeren Anzahl von Menisken zu reproduzieren und auch weibliche Spender sowie laterale Menisken einzubeziehen.

Tatsächlich besteht das mit Abstand am meisten verfügbare Meniskusmaterial wahrscheinlich in Menisken, welche bei z.B. fortgeschrittener Osteoarthritis im Rahmen von einem Gelenkersatz durch eine Knieprothese entfernt werden. Insofern wurde für diese Arbeit auf solche Menisken zurückgegriffen. Gleichzeitig besteht aber auch die Möglichkeit, dass das fortgeschrittene Alter der Patienten mit bereits vorhandenen degenerativen Meniskusveränderungen einen Einfluss auf die zelluläre Komposition hat. Bekannterweise nimmt bei fortschreitendem Alter beispielsweise der Anteil an Glykosaminoglykan in der extrazellulären Matrix zu (49). Auch die verwendete Safranin O Färbung der in dieser Arbeit verwendeten Menisken konnte dies sichtbar machen. Es ist weiterhin möglich, dass sich das Stammzellpotential residenter Zellpopulationen im Laufe des Lebens verändern und abnehmen könnte. Dies könnte sich auch auf den Erfolg klinischer Anwendungen auswirken.

5 Zusammenfassung

Während Läsionen in der äußeren, vaskularisierten Zone von Menisken eine gute Heilungskapazität aufweisen und mit hoher Erfolgsrate genäht werden können, stellen insbesondere Läsionen in der inneren, avaskulären Zone des Meniskus bis heute eine große Herausforderung dar. Aufgrund der bekannten negativen mittel- und langfristigen Auswirkungen einer Meniskusteilresektion auf die Gelenkgesundheit und der sich aus Meniskuspathologien ergebenden hohen Belastung des Gesundheitswesens wird an Meniskusgewebe-schonenden Behandlungsansätzen gearbeitet.

Eine vielversprechende Möglichkeit stellen zelluläre Methoden dar. Verschiedene Studien haben den Nachweis von meniskalen Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften im Meniskusgewebe erbracht, welche perspektivisch zur Therapie von Meniskusdefekten beitragen könnten.

In dieser experimentellen Arbeit konnten vier Menisken von Spendern mit Osteoarthritis, welche sich einer Knie-Totalendoprothese unterzogen, einer Analyse zugeführt werden. Mittels verschiedener Methoden (u.a. Zellkultur, Immunhistochemie, Koloniebildungs- und dreiliniige Differenzierungsassays in Knochen-, Fett- und Knorpelgewebe) sollten Erkenntnisse über potenzielle Stammzeleigenschaften meniskaler Progenitorzellen in der vaskulären und avaskulären Zone gesammelt werden. Weiterhin sollte mittels differentieller Fibronektin-Adhäsion der Einfluss des mit der Stammzellnische assoziierten Glykoproteins Fibronektins auf die Zellisolation und die Stammzeleigenschaften der isolierten Meniskuszellen untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Studienlage wurde vermutet, dass durch die Fibronektin-Adhäsion in vitro eine verstärkte Selektion von progenitalen Meniskuszellen ermöglicht wird. Zusammenfassend ließen sich Zellen mit Stammzeleigenschaften, sprich meniskale Progenitorzellen, sowohl in der äußeren, vaskularisierten als auch in der inneren, avaskulären Zone des Meniskus nachweisen. Eine Koloniebildungskapazität als wichtiges Stammzellkriterium konnte bei Meniskuszellen beider Zonen gezeigt werden. Hinsichtlich des dreiliniigen Differenzierungspotentials in Knochen-, Fett-, und Knorpelgewebe ergab sich ein gemischtes Bild – eine Donorabhängigkeit bzw. Donorvariabilität wurde postuliert. Eine verstärkte spezifische Selektion von meniskalen Progenitorzellen durch die Zuhilfenahme einer differentiellen Fibronektin-Adhäsion konnte unter Vorbehalt der niedrigen Anzahl untersuchter Menisken in dieser Arbeit nicht herausgearbeitet werden. Weitere Arbeiten sind nötig, um das

Potential meniskaler Progenitorzellen zu evaluieren und für eine klinische Anwendung nutzbar zu machen.

6 Literaturverzeichnis

1. Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA. The Basic Science of Human Knee Menisci: Structure, Composition, and Function. *Sports Health Multidiscip Approach*. 2012 Jul;4(4):340–51.
2. Gundelfingen MGK. Hinterhorn des Innenmeniskus [Internet]. [cited 2023 Oct 8]. Available from: <https://gelenk-klinik.de/orthopaedie-glossar/hinterhorn-des-innenmeniskus.html>
3. Snoeker BAM, Bakker EWP, Kegel CAT, Lucas C. Risk Factors for Meniscal Tears: A Systematic Review Including Meta-analysis. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2013 Jun;43(6):352–67.
4. Englund M, Guermazi A, Gale D, Hunter DJ, Aliabadi P, Clancy M, et al. Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. *N Engl J Med*. 2008;359(11):1108–15.
5. Schneider O, Scharf HP, Stein T, Knapstein S, Hermann C, Flechtenmacher J. Inzidenz von Kniegelenkverletzungen: Zahlen für die ambulante und stationäre Versorgung in Deutschland. *Orthop*. 2016 Dec;45(12):1015–26.
6. Cleveland Clinic, Department of Radiology, Cleveland, USA, Colak C, Naveen S, Cleveland Clinic, Department of Radiology, Cleveland, USA, Jennifer B, Cleveland Clinic, Quantitative Health Sciences, Cleveland, USA, et al. Incidence of Medial Meniscal Tears in Various Age Groups. *J Acad Res Med*. 2018 Oct 26;8(3):203–6.
7. Ford GM, Hegmann KT, White GL, Holmes EB. Associations of body mass index with meniscal tears. *Am J Prev Med*. 2005 May;28(4):364–8.
8. Doral MN, Bilge O, Huri G, Turhan E, Verdonk R. Modern treatment of meniscal tears. *EFORT Open Rev*. 2018 May;3(5):260–8.
9. Hede A, Larsen E, Sandberg H. The long term outcome of open total and partial meniscectomy related to the quantity and site of the meniscus removed. *Int Orthop*. 1992 Jun;16(2):122–5.
10. Englund M, Guermazi A, Lohmander LS. The meniscus in knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009 Aug;35(3):579–90.
11. Englund M, Guermazi A, Roemer FW, Aliabadi P, Yang M, Lewis CE, et al. Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middle-aged and elderly persons: The Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*. 2009 Mar;60(3):831–9.
12. Verdonk R, Madry H, Shabshin N, Dirisamer F, Peretti GM, Pujol N, et al. The role of meniscal tissue in joint protection in early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2016 Jun 1;24(6):1763–74.
13. Beaufils P, Pujol N. Management of traumatic meniscal tear and degenerative meniscal lesions. Save the meniscus. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2017 Dec;103(8):S237–44.

14. Lee WQ, Gan JZW, Lie DTT. Save the meniscus – Clinical outcomes of meniscectomy versus meniscal repair. *J Orthop Surg.* 2019 May;27(2):230949901984981.
15. Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury: An experimental study in the dog. *Am J Sports Med.* 1983 May;11(3):131–41.
16. Yoshikawa T, Tohyama H, Katsura T, Kondo E, Kotani Y, Matsumoto H, et al. Effects of Local Administration of Vascular Endothelial Growth Factor on Mechanical Characteristics of the Semitendinosus Tendon Graft after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Sheep. *Am J Sports Med.* 2006 Dec;34(12):1918–25.
17. Kopf S, Birkenfeld F, Becker R, Petersen W, Stärke C, Wruck CJ, et al. Local Treatment of Meniscal Lesions with Vascular Endothelial Growth Factor: *J Bone Jt Surg-Am Vol.* 2010 Nov;92(16):2682–91.
18. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477–88.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
20. de Lucas B, Pérez LM, Gálvez BG. Importance and regulation of adult stem cell migration. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb;22(2):746–54.
21. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A.* 2018;93(1):19–31.
22. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 2001 Jun;7(6):259–64.
23. Chew E, Prakash R, Khan W. Mesenchymal stem cells in human meniscal regeneration: A systematic review. *Ann Med Surg.* 2017 Dec;24:3–7.
24. Pak J, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Lee SH. Potential use of mesenchymal stem cells in human meniscal repair: current insights. *Open Access J Sports Med.* 2017 Mar;Volume 8:33–8.
25. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. ENGINEERING PRINCIPLES OF CLINICAL CELL-BASED TISSUE ENGINEERING: *J Bone Jt Surg-Am Vol.* 2004 Jul;86(7):1541–58.
26. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Jan;11(1):21–34.
27. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, et al. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. *J Orthop Res.* 2009 Apr;27(4):435–41.

28. Ding Z, Huang H. Mesenchymal stem cells in rabbit meniscus and bone marrow exhibit a similar feature but a heterogeneous multi-differentiation potential: superiority of meniscus as a cell source for meniscus repair. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015 Dec;16(1):65.
29. Muhammad H, Schminke B, Bode C, Roth M, Albert J, von der Heyde S, et al. Human Migratory Meniscus Progenitor Cells Are Controlled via the TGF- β Pathway. *Stem Cell Rep*. 2014 Nov;3(5):789–803.
30. Shen W, Chen J, Zhu T, Yin Z, Chen X, Chen L, et al. Osteoarthritis Prevention Through Meniscal Regeneration Induced by Intra-Articular Injection of Meniscus Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2013 Jul 15;22(14):2071–82.
31. Seol D, Zhou C, Brouillette MJ, Song I, Yu Y, Choe HH, et al. Characteristics of meniscus progenitor cells migrated from injured meniscus: CHARACTERISTICS OF MENISCUS PROGENITOR CELLS. *J Orthop Res*. 2017 Sep;35(9):1966–72.
32. Huang H, Wang S, Gui J, Shen H. A study to identify and characterize the stem/progenitor cell in rabbit meniscus. *Cytotechnology*. 2016 Oct;68(5):2083–103.
33. Gamer LW, Shi RR, Gendelman A, Mathewson D, Gamer J, Rosen V. Identification and characterization of adult mouse meniscus stem/progenitor cells. *Connect Tissue Res*. 2017 May 4;58(3–4):238–45.
34. Pankov R. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002 Oct 15;115(20):3861–3.
35. Singh P, Schwarzbauer JE. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J Cell Sci*. 2012 Aug 15;125(16):3703–12.
36. Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Analbelsi T, et al. Identification and Clonal Characterisation of a Progenitor Cell Sub-Population in Normal Human Articular Cartilage. Agarwal S, editor. *PLoS ONE*. 2010 Oct 14;5(10):e13246.
37. Kasten A, Naser T, Brüllhoff K, Fiedler J, Müller P, Möller M, et al. Guidance of Mesenchymal Stem Cells on Fibronectin Structured Hydrogel Films. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2019 Jul 20];9(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4198140/>
38. Lukjanenko L, Jung MJ, Hegde N, Perruisseau-Carrier C, Migliavacca E, Rozo M, et al. Loss of fibronectin from the aged stem cell niche affects the regenerative capacity of skeletal muscle in mice. *Nat Med*. 2016 Aug;22(8):897–905.
39. Korpershoek JV, Rikkers M, de Windt TS, Tryfonidou MA, Saris DBF, Vonk LA. Selection of Highly Proliferative and Multipotent Meniscus Progenitors through Differential Adhesion to Fibronectin: A Novel Approach in Meniscus Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 10;22(16):8614.
40. Enobakhare BO, Bader DL, Lee DA. Quantification of Sulfated Glycosaminoglycans in Chondrocyte/Alginate Cultures, by Use of 1,9-Dimethylmethylene Blue. *Anal Biochem*. 1996 Dec;243(1):189–91.
41. Gruber HE, In JA. Basic Staining and Histochemical Techniques and Immunohistochemical Localizations Using Bone Sections.

42. Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, et al. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc*. 2011 Sep;19(9):1132–41.
43. Cheung HS. Distribution of Type I, II, III and V in the Pepsin Solubilized Collagens in Bovine Menisci. *Connect Tissue Res*. 1987 Jan;16(4):343–56.
44. Cohen J. Statistical Power Analysis. *Curr Dir Psychol Sci*. 1992 Jun;1(3):98–101.
45. Chahla J, Papalamprou A, Chan V, Arabi Y, Salehi K, Nelson TJ, et al. Assessing the Resident Progenitor Cell Population and the Vascularity of the Adult Human Meniscus. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2021 Jan;37(1):252–65.
46. Mauck RL, Martinez-Diaz GJ, Yuan X, Tuan RS. Regional multilineage differentiation potential of meniscal fibrochondrocytes: Implications for meniscus repair. *Anat Rec*. 2007 Jan;290(1):48–58.
47. Shen W, Chen J, Zhu T, Chen L, Zhang W, Fang Z, et al. Intra-Articular Injection of Human Meniscus Stem/Progenitor Cells Promotes Meniscus Regeneration and Ameliorates Osteoarthritis Through Stromal Cell-Derived Factor-1/CXCR4-Mediated Homing. *STEM CELLS Transl Med*. 2014 Mar;3(3):387–94.
48. Wei Y, Sun H, Gui T, Yao L, Zhong L, Yu W, et al. The critical role of Hedgehog-responsive mesenchymal progenitors in meniscus development and injury repair. *eLife*. 10:e62917.
49. Sun H, Wen X, Li H, Wu P, Gu M, Zhao X, et al. Single-cell RNA-seq analysis identifies meniscus progenitors and reveals the progression of meniscus degeneration. *Ann Rheum Dis*. 2020 Mar;79(3):408–17.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ak.	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CFU	Colony-forming unit
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM–LG/HG	Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Low glucose (1 g/L) / High glucose (4,5 g/L)
DMMB	Dimethylmethylenblau
Falcon	Zentrifugenröhrchen
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
FN	Fibronektin
GAG	Glykosaminoglykan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O bidest	Bidestilliertes Wasser ($\triangleq$ H ₂ O Millipore)
(h)MSC	(Humane) Mesenchymale Stromazellen
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	Insulin-like growth factor
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite solution
konj.	Konjugiert
LN	Labornummer
M	mol
mg	Milligramm

min	Minuten
ml	Milliliter
NaCl 0,9 %	Natriumchlorid 0,9% (Kochsalzlösung)
(m-)PBS	(modifizierte) Phosphatpuffersalzlösung
OT	Objektträger
PD	Populations-Verdopplungszeit
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin (Antibiotikum)
PFA	Paraformaldehyd
PL	Plastik
P,x‘	Passage ,x‘
rpm	Runden pro Minute
RPMI 1640 Medium	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Raumtemperatur
SF-Medium	Serumfreies Medium
sGAG	sulfatiertes Glykosaminoglykan
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
,x‘-Well Platte	Platte mit ,x‘ Vertiefungen
Ü/N	Über Nacht

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Menisken im Kniegelenk ohne ligamentäre Strukturen (2).

Abbildung 2: Überblick des Differenzierungspotentials mesenchymaler Stammzellen (nach Caplan et al. 2001 (22)).

Abbildung 3: Repräsentatives Makrobild eines der Menisken (LN1410).

Abbildung 4: Ausschnitte immunhistochemischer Färbungen von Meniskusgewebe (exemplarisch von Meniskus LN1394). (A) Safranin O/Fast Green Färbung. (B) Kollagen Typ 1 Färbung. (C) Kollagen Typ 2 Färbung. (D) Fibronectin Färbung.

Abbildung 5: (A) Ausgesäte Zellanzahl nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen initial nach Gewebeverdauer ($n=4$, $MW \pm SD$). (B) Phasenkontrastbilder der nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen in früher Passage.

Abbildung 6: Populationswachstumskurven nicht-Fibronectin-Adhärenter Meniskuszellen ($n=4$, Mittelwert $\pm SD$).

Abbildung 7: Mit Kristallviolett gefärbte Kolonien nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen auf unbeschichteten Petrischalen (PL) und auf Fibronectin-beschichteten Petrischalen (FN), exemplarisch LN1394.

Abbildung 8: (A) Anzahl gezählter von nicht-Fibronectin-adhärenter vaskulären und avaskulären Meniskuszellen gebildeten Kolonien auf unbeschichteten (PL) und Fibronectin-beschichteten (FN) Petrischalen und (B) entsprechende Koloniebildungseffizienzen (gebildete Kolonien pro ausgesäter Zelldichte [%]), jeweils $n=4$ mit Mittelwert und SD.

Abbildung 9: Alizarin-Färbung zur Darstellung von Kalziumdeposition bei nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bildauswahl + Negativkontrollen).

Abbildung 10: Ölrot O-Färbung zur Darstellung von Lipidtröpfchen bei nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen nach Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bilderauswahl + Negativkontrolle).

Abbildung 11: Chondrogene Differenzierung nicht-Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen als Zellpellet für 14 Tage – Makrobilder, DMMB-Färbung zur Darstellung von Glykosaminoglykanen und Kollagen Typ 1- und Kollagen Typ II-Färbungen zur Darstellung von Knorpelmarkern (Exemplarische Bilderauswahl von Donor LN1397).

Abbildung 12: Morphologie Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen im Verlauf der Zellkultur (Exemplarisch LN1397, Phasenkontrastbilder).

Abbildung 13: Alizarin-Färbung zur Darstellung von Kalziumdeposition bei Fibronectin-adhärenter Meniskuszellen nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bilderauswahl $\pm$ Negativkontrolle).

Abbildung 14: Ölrot O Färbung zur Darstellung von Lipidtröpfchen bei Fibronectin-adhärenenten Meniskuszellen nach Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium für 14 Tage (Exemplarische Bilderauswahl ± Negativkontrolle).

Abbildung 15: Chondrogene Differenzierung Fibronectin-adhärenenter Meniskuszellen als Zellpellet für 14 Tage – Exemplarische Makrobilder von Meniskus LN1410.

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Studienlage zu meniskalen Progenitorzellen.

Tabelle 2: Übersicht der analysierten Menisken.

Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich richten an Herrn Prof. Dr. Peter Angele und Herrn Dr. Girish Pattappa für das Überlassen des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit, im Labor für experimentelle Unfallchirurgie in Regensburg promovieren zu dürfen.

Danke an Herrn Prof. Angele und Girish Pattappa für die Betreuung und fortgesetzte Unterstützung bis zum Erreichen einer vollständigen Doktorarbeit. Auch an Frau Prof. Dr. Denitsa Docheva, die Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, Dank für wertvolle Anregungen in wöchentlichen Labor-Meetings und die Unterstützung bei der Strukturierung der Ergebnisse.

Danke an Ruth Schewior, die bei der praktischen Laborarbeit geduldig und tatkräftig geholfen hat. Ein besonderes Dankeschön an Daniela Drenkard und an alle anderen Kollegen der Arbeitsgruppe in der Zeit von April 2019 bis April 2020, insbesondere Theresia Stich und Sirine Baccar, die nicht nur ihre Laborerfahrung mit mir geteilt haben, sondern auch viel dazu beigetragen haben, dass das Arbeiten im Labor immer wieder Freude bereitet hat.

Ein Dankeschön möchte ich auch an PD Dr. Philipp von Roth vom sporthopädicum Regensburg richten, aus dessen Patientenkollektiv die untersuchten Menisken akquiriert werden konnten.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Vater und meiner Mutter danken, ohne die der Weg bis hierhin so nicht möglich gewesen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Henrik Heuer, geboren am 28.04.1997 in Fürstenfeldbruck, habe die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Konzepte und Abbildungen sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Mir ist bewusst, dass Täuschungen nach der für mich gültigen Studien- und Prüfungsordnung geahndet werden.

Ort, Datum

Henrik Heuer