

**Funktion von DNER und AQP1 in der Pathogenese der  
Osteoarthrose**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des  
Fachbereichs Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Lucija Berninger  
geboren am 11.10.1984 in Frankfurt am Main

Gießen/Bad Nauheim 2015



Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Tina Trenczek  
Lehrstuhl für Allgemeine Zoologie und  
Entwicklungsbiologie des Fachbereichs Biologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen
  
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner  
Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt  
Rheumatologie des Fachbereichs Medizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Gelenk	1
1.1.1 Aufbau der Diarthrosen	1
1.1.2 Knorpelzusammensetzung	2
1.1.2.1 Chondrozyten	3
1.1.2.2 Extrazelluläre Matrix	3
1.1.3 Knorpelstruktur	5
1.1.4 Chondrogenese	7
1.2 Osteoarthrose	9
1.2.1 Epidemiologie	9
1.2.2 Pathogenese	10
1.2.3 Molekularbiologie der Osteoarthrose	11
1.2.3.1 Zytokine und katabole Mediatoren	12
1.2.3.2 Matrixmetalloproteinasen	13
1.2.3.3 A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs	14
1.2.3.4 Tissue-Inhibitors of Metalloproteinase	15
1.2.3.5 Anabole Mediatoren und Reparaturprozesse	16
1.2.4 Diagnostik	16
1.2.5 Therapie	18
1.3 Delta/Notch-like EGF-related Receptor (DNER)	19
1.3.1 Notch-Signalweg	20
1.3.2 Die Rolle von Notch bei der Chondrogenese und der Osteoarthrose	21
1.4 Aquaporin 1	23
1.4.1 Struktur	23
1.4.2 Lokalisation	24
1.4.3 Funktion von AQP1	25
1.4.4 AQP1 in der Osteoarthrose	26
1.5 Fragestellung	28
2. MATERIAL	29
2.1 Bakterien	29
2.2 Chemikalien	29
2.3 Materialien	31

2.4 Bakterienkultur	32
2.5 Zellkulturmedien	32
2.6 Lösungen und Puffer	33
2.7 Enzyme	35
2.8. Plasmide	35
2.9 Marker	36
2.10 Antikörper	36
2.11 Molekularbiologische Kits	38
2.12 Oligonukleotide	38
2.13 Geräte	42
2.14 Software	43
<b>3. METHODEN</b>	<b>44</b>
3.1 Mikrobiologische Methoden	44
3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	44
3.1.2 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	44
3.2 Zellbiologische Methoden	45
3.2.1 Gewebeentnahme und Transport	45
3.2.2 Isolierung und Kultivierung humaner OA Chondrozyten	45
3.2.3 Kultivierung von gesunden humanen Chondrozyten	46
3.2.4 Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen	46
3.2.5 Passagieren der Zellen	46
3.2.6 Bestimmung der Zellzahl	47
3.2.7 Zelllysate	47
3.3 Molekularbiologische Methoden	47
3.3.1 Plasmidisolierung	47
3.3.2 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen	48
3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	49
3.3.4 Gelextraktion	49
3.3.5 Ligation	50
3.3.6 Sequenzierung	50
3.3.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Chondrozyten und hMSC-Pellets	51
3.3.8 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	51
3.3.9 Reverse Transkription	52
3.3.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	53

3.3.11 Semi-quantitative <i>real-time</i> PCR	54
3.3.12 Effizienzoptimierung der Primer für die semi-quantitative <i>real-time</i> PCR	56
3.3.13 RNA-Integritätsanalyse	56
3.3.14 Microarray Technologie	57
3.4 Immunologische Methoden	58
3.4.1 Gewebepräparation für immunhistochemische Färbungen	58
3.4.2 Gefrierschnitte	58
3.4.3 Herstellung der Antikörperlösungen	58
3.4.4 Immunhistochemische Färbung von Geweben	59
3.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	59
3.4.6 Safranin-O/Fast Green-Färbung	60
3.4.7 Alcianblau-Färbung	60
3.4.8 TUNEL-Assay	61
3.4.9 Immunzytologische Färbung	62
3.4.10 Nachweis von apoptotischen und nekrotischen humanen Chondrozyten	62
3.4.11 BCA-Proteinbestimmung	63
3.4.12 Western-Blot	63
3.5 Transfektion von Primärzellen	65
3.5.1 Transfektion von humanen Chondrozyten	65
3.5.1.1 <i>Lipofektion</i>	65
3.5.1.2 <i>Nukleofektion</i>	66
3.5.2 Nukleofektion von humanen mesenchymalen Stammzellen	67
3.6 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	68
3.7 Bildanalyse und densitometrische Bestimmung	68
3.8 Statistische Auswertung	69
4 ERGEBNISSE	70
4.1 Untersuchung von AQP1 in humanen OA-Chondrozyten	70
4.1.1 Klonierung von AQP1	70
4.1.2 Überexpression von AQP1 in humanen OA-Chondrozyten	73
4.1.3 Einfluss der AQP1 Überexpression auf humane OA-Chondrozyten	74
4.2 DNER Expression in humanen osteoarthrotischen Knorpel	75
4.2.1 Histologische Analyse des Knorpels	75
4.2.2 Immunhistochemische Analyse von DNER	77
4.3 Einfluss von DNER auf humane Chondrozyten	78

4.3.1 Knockdown der DNER mRNA Expression in OA-Chondrozyten	78
4.3.2 Einfluss des DNER Knockdowns auf den Chondrozytenstoffwechsel	79
4.3.3 Untersuchung des DNER Knockdowns auf Proteinebene	80
4.3.4 Überexpression der DNER mRNA in humanen OA-Chondrozyten	83
4.3.5 Überexpression des DNER Proteins in humanen OA-Chondrozyten	84
4.3.6 Einfluss der DNER Überexpression auf den Chondrozytenstoffwechsel	85
4.3.7 Microarray-Analyse nach DNER Überexpression	86
4.4 Analyse der Transfektionsmethode für humane Chondrozyten	92
4.5 Chemische Transfektion von pDNER in humane Chondrozyten	93
4.5.1 Überexpression von DNER auf Proteinebene	94
4.5.2 Einfluss der DNER Überexpression auf OA-Chondrozyten	96
4.5.3 Einfluss der DNER Überexpression auf gesunde Chondrozyten	96
4.6 Einfluss von DNER auf die chondrogene Differenzierung	97
4.6.1 <i>In vitro</i> Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen	98
4.6.2 Überexpression von DNER während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	100
4.6.2.1 <i>Immunhistochemische Färbung von DNER in den hMSC-Pellets</i>	100
4.6.2.2 <i>Histologische Analyse der Glykosaminoglykan-Expression</i>	102
4.6.2.3 <i>Immunhistochemische Analyse der Kollagen Typ I Expression</i>	104
4.6.2.4 <i>Immunhistochemische Analyse der Kollagen Typ X Expression</i>	106
4.6.2.5 <i>Immunhistochemische Analyse der Sox9 Expression</i>	108
4.6.2.6 <i>Analyse der Zellapoptose</i>	110
4.6.3 Überexpression der DNER mRNA während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	112
4.6.4 mRNA Expression von chondrogenen Stoffwechselfparametern	113
4.6.4.1 <i>Kollagen Typ I mRNA Expression</i>	114
4.6.4.2 <i>Kollagen Typ X mRNA Expression</i>	115
4.6.4.3 <i>MMP-13 mRNA Expression</i>	116
4.6.4.4 <i>Sox9 mRNA Expression</i>	118
4.6.4.5 <i>ADAMTS-4 mRNA Expression</i>	119
4.6.4.6 <i>ADAMTS-5 mRNA Expression</i>	121
4.6.4.7 <i>TIMP-3 mRNA Expression</i>	122
4.6.4.8 <i>Notch-1 mRNA Expression</i>	123
4.6.4.9 <i>Notch-2 mRNA Expression</i>	125
4.6.4.10 <i>Jagged-1 mRNA Expression</i>	126
4.6.4.11 <i>Hes-1 und Hey-1 mRNA Expression</i>	128
4.6.4.12 <i>β-Catenin mRNA Expression</i>	130

5. DISKUSSION	132
5.1 Rolle von Aquaporin 1 bei der Pathogenese der Osteoarthritis	133
5.1.1 Überexpression von Aquaporin 1 in humanen OA Chondrozyten	134
5.2 DNER Expression im osteoarthrotischen Kniegelenksknorpel	135
5.3 Der Einfluss von DNER auf humane Chondrozyten	137
5.3.1 Knockdown von DNER in OA Chondrozyten	137
5.3.2 Nukleofektion von pDNER in gesunden und osteoarthrotischen Chondrozyten	138
5.3.3 Einfluss der Transfektionsmethode auf das Transkriptom der Chondrozyten	140
5.3.4 Lipofektion von pDNER in gesunden und osteoarthrotischen Chondrozyten	141
5.4 Der Einfluss von DNER auf die <i>in vitro</i> Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen	142
5.4.1 Expressionsanalyse der Strukturproteine während der <i>in vitro</i> Chondrogenese nach DNER Überexpression	143
5.4.2 Einfluss von DNER auf die Hypertrophie der hMSCs während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	144
5.4.3 Einfluss von DNER auf den Notch-Signalweg während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	146
5.4.4 Einfluss von DNER auf Transkriptionsfaktoren während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	148
5.4.5 Einfluss von DNER auf die Apoptose der hMSCs während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	150
5.4.6 Einfluss von DNER auf Enzyme der extrazellulären Matrix und deren Gegenspieler während der <i>in vitro</i> Chondrogenese	151
5.5 Diskussion der Methodik	152
6. ZUSAMMENFASSUNG	154
7. SUMMARY	156
8. LITERATURVERZEICHNIS	158

9. ANHANG	172
9.1 Abkürzungsverzeichnis	172
9.2 Publikationen	175

# 1. EINLEITUNG

Die Osteoarthrose (OA; Synonyme sind u.a. Arthrose, Arthrosis deformans, engl. Osteoarthritis) ist eine fortschreitende degenerative Erkrankung des Gelenks, welche als Hauptursache für Schmerzen und Funktionsstörungen im Alter gilt. Neben der degenerativen Zerstörung des Gelenkknorpels sind auch angrenzende Areale, wie der subchondrale Knochen, die Menisci, der Bandapparat, das Synovium, die Gelenkkapsel und die periartikulären Muskeln betroffen (Loeser *et al.*, 2012). Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis ist die Osteoarthrose eine primär nicht-entzündliche Erkrankung die hauptsächlich an der Wirbelsäule und an den peripheren Gelenken, vor allem den Hand-, Hüft- und Kniegelenken auftritt (S R Goldring and M B Goldring, 2006).

## 1.1 Das Gelenk

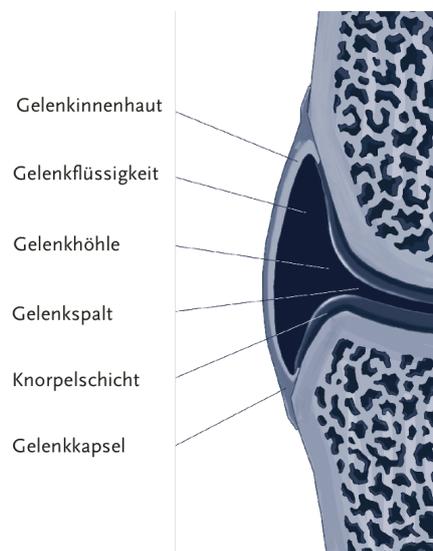
Das Gelenk ist eine Verbindung zwischen Knochen oder Knorpel-elementen des Skeletts und ermöglicht die Bewegung sowie Stabilität des menschlichen Körpers. Gelenke müssen starken Druckstößen und Zugkräften standhalten und übertragen diese auf andere Skelettelemente. Man unterteilt die weit über 100 Gelenke im menschlichen Körper in echte und unechte Gelenke. Unechte Gelenke (Synarthrosen) sind knorpelige oder bindegewebige Knochenverbindungen, die keinen Gelenkspalt besitzen und somit eine eingeschränkte Beweglichkeit aufweisen. Zu ihnen zählen unter anderem das Sternum und die Bandscheiben. Im Gegensatz dazu besitzen echte Gelenke (Diarthrosen) einen Gelenkspalt, welcher die mit Knorpel überzogenen Gelenkflächen trennt und somit einen größeren Bewegungsradius ermöglicht. Zu den echten Gelenken zählen unter anderem Kniegelenk, Hüftgelenk, oberes Sprunggelenk sowie die Fingergelenke (Zervos-Kopp, 2013).

### 1.1.1 Aufbau der Diarthrosen

Ein wichtiges Merkmal der Diarthrosen ist der Gelenkspalt. Der Gelenkspalt trennt die Gelenkflächen und ist ein Teil der Gelenkhöhle, welche durch eine aus dem Periost hervorgehende Gelenkkapsel umschlossen wird. Die Gelenkkapsel besteht aus einer äußeren Bindegewebsschicht (Membrana fibrosa) und einer innen liegenden, stark durchbluteten und innervierten Gelenkinnenhaut (Membrana synovialis). Eine wichtige Funktion der Gelenkinnenhaut ist die Produktion der viskosen und klaren Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit), welche unter Druckbelastung zwischen den, mit hyalinem Knorpel überzogenen, Knochenenden einen Gleitfilm bildet und somit für eine nahezu reibungslose Bewegung des Gelenks sorgt. Zusätzlich versorgt die Synovialflüssigkeit den Knorpel und

## EINLEITUNG

die Knorpelzellen mit wichtigen Nährstoffen, da das Knorpelgewebe selbst keine Blutgefäße enthält. Das Kniegelenk (Abb. 1) ist die gelenkige Verbindung zwischen Oberschenkelknochen (Femur), Schienbein (Tibia) und Kniescheibe (Patella). Die mit Knorpel bedeckten Gelenkflächen des Knies werden als Kondylen bezeichnet. Neben den zuvor erwähnten Bestandteilen der Diarthrosen besitzt das Kniegelenk zusätzlich zwei Menisken, welche für eine Kontaktflächenvergrößerung sowie den Ausgleich von Inkongruenzen zwischen den Kondylen sorgen. Die Menisken sind mit der Gelenkkapsel sowie mit den Seitenbändern verwachsen. Die Bänder (Ligamente) sind faserige Bindegewebsstränge, welche das Gelenk umgeben und für dessen Stabilität sorgen (Zervos-Kopp, 2013).



**Abb. 1:** Anatomischer Aufbau eines gesunden humanen Kniegelenks. Bildquelle: Robert-Koch-Institut (2013).

### 1.1.2 Knorpelzusammensetzung

Beim Knorpelgewebe handelt es sich um eine Form des Bindegewebes, welches aus spezialisierten Zellen (Chondrozyten) und der extrazellulären Matrix (EZM) besteht. Der humane Knorpel wird in drei Formen unterteilt, welche sich anhand der Faserzusammensetzung und der Anzahl an vorhandenen Chondrozyten unterscheiden lassen. Der hyaline Knorpel ist neben dem elastischen- und dem Faser-Knorpel die häufigste Form des Knorpels im menschlichen Körper. Er bildet den Gelenkknorpel und ummantelt somit auch die Kondylen des Kniegelenks. Die Eigenschaften des nur wenige Millimeter dicken hyalinen Knorpels sind einzigartig, da er Festigkeit und Elastizität so kombiniert, dass eine nahezu reibungsfreie Bewegung gewährleistet ist und er gleichzeitig enormen Druckkräften standhalten kann (Pearle *et al.*, 2005). Verantwortlich hierfür ist die

## EINLEITUNG

Beschaffenheit der EZM welche zu 70-80% aus Wasser, 3% Zellen und 27% Strukturproteinen besteht. Die Strukturproteine setzen sich wiederum zu 15% aus Kollagenen, 9% aus Proteoglykanen und 3% aus nicht-kollagenen Proteinen zusammen (Aigner und STOVE, 2003). Knorpelgewebe besitzt keine Nervenendigungen, Blut- oder Lymphgefäße und ist somit abhängig von der Nährstoffzufuhr aus der Synovialflüssigkeit (Sophia Fox *et al.*, 2009).

### 1.1.2.1 Chondrozyten

Das Knorpelgewebe enthält nur einen einzigen Zelltyp, die Chondrozyten. Wie alle Zellen des Bindegewebes stammen die Chondrozyten vom embryonalen Mesenchym ab (Archer und Francis-West, 2003). Die runden bzw. polygonalen Zellen machen etwa 3% des Knorpelvolumens aus und unterscheiden sich je nach Knorpelzone in Größe, Form und metabolischer Aktivität. Ihre Aufgabe besteht darin, das metabolische Gleichgewicht des Matrixumbaus aufrecht zu erhalten, indem sie Kollagene, lange Proteoglykane sowie nicht-kollagene Proteine und matrixabbauende Enzyme synthetisieren. Die Zelle an sich ist metabolisch sehr aktiv, was man an der großen Menge an synthetisierenden Organellen erkennen kann. Da die Chondrozyten jedoch einen geringen Anteil am Gesamtvolumen des Knorpels ausmachen, ist die metabolische Aktivität des Knorpelgewebes eher gering (Buckwalter und Mankin, 1998). Aufgrund der fehlenden Nervenzellenden, Blut- und Lymphgefäße wird das Knorpelgewebe als bradytroph charakterisiert, wodurch die Stoffwechselprozesse anaerob ablaufen. Bei der Signaltransduktion spielen vor allem Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche über die Synovialflüssigkeit zu den Zellen gelangen, eine übergeordnete Rolle (Sophia Fox *et al.*, 2009). Zusätzlich verfügen manche Chondrozyten über eine zytoplasmatische Verlängerung, ein sogenanntes Zilium, welches sich in die EZM streckt und der Zelle ermöglicht, auf äußere mechanische Einflüsse zu reagieren (Farnum und Wilsman, 2011). Die Chondrozyten liegen in der Regel vereinzelt in der EZM vor, können aber auch zu Paaren oder Zellsäulen zusammengelagert sein. Hierbei kommt es jedoch nicht zu interzellulären Kontakten, da jeder Chondrozyt von einer eigenen Matrix (perizelluläre Mikroumgebung) umgeben wird. Diese funktionelle Einheit des Knorpelgewebes wird als Chondron bezeichnet (Poole, 1997).

### 1.1.2.2 Extrazelluläre Matrix

Die strukturgebenden Proteine der EZM bestehen aus Kollagenen, Proteoglykanen, nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen. Hierbei machen die Kollagene 60% der

## EINLEITUNG

Trockenmasse aus und sind, bis auf eine erhöhte Konzentration in der Oberflächzone, homogen im Knorpelgewebe verteilt. Die Kollagene bestehen aus je drei helikalen Proteinketten, welche über Wasserstoffbrücken umeinander gewunden sind. Sie verleihen dem Knorpel seine Form und Zugfestigkeit. Der Gelenkknorpel besteht aus den Kollagen Typen II, VI, IX, X und XI wobei Kollagen Typ II 90-95% der gesamten Kollagenmenge ausmacht und mit den Kollagenen Typ IX und XI für die Quervernetzungen der EZM verantwortlich ist. Kollagen Typ VI umgibt primär die Chondrozyten und sorgt dafür, dass diese mit der EZM verbunden werden. Kollagen Typ X wird nur in der kalzifizierten Zone des Gelenkknorpels und in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumszone synthetisiert, weshalb es vermutlich eine Rolle bei der Mineralisierung des Knorpels spielt (Martinek, 2003). Die Proteoglykane machen 25%-35% der Trockenmasse aus und sind die größten Makromoleküle der EZM. Sie füllen den Raum zwischen den Kollagenfasern aus und sind in der Lage, große Mengen an Wasser zu binden (Nixon *et al.*, 1993). Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein und einem oder mehreren Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAG). Die GAGs sind lange unverzweigte Polysaccharide, welche aus sich wiederholenden Disacchariden bestehen. Bei den Disaccharid-Einheiten handelt es sich um einen Aminosucker, welcher über eine 1,3-glykosidische Bindung an eine Uronsäure geknüpft ist. Die Carboxyl- bzw. Sulfatgruppen der Zucker sorgen für die starke negative Ladung der GAGs und somit für die Hydrophilie der Proteoglykane (Buckwalter und Mankin, 1998). Die Proteoglykane werden in zwei Hauptgruppen unterteilt. Eine Gruppe bilden die Aggrekane. Bei den Aggrekanen ist das Kernprotein der Proteoglykan-Monomere über ein Verbindungsprotein (Link Protein) an einen langen Hyaluronsäure-Faden gebunden, wodurch unterschiedlich große Proteoglykan-Aggregate entstehen. Je nach Anzahl der Proteoglykan-Monomere können Aggrekane zwischen einigen hundert und 10.000 nm lang sein (Martinek, 2003). Die zweite Gruppe umfasst die kleinen, nicht-aggregierten Proteoglykane wie Decorin, Biglycan und Fibromodulin. Decorin und Fibromodulin binden an Kollagen Typ II und stabilisieren somit das Kollagennetzwerk, während Biglycan in der perizellulären Matrix an Kollagen Typ VI gebunden ist (Roughley und E R Lee, 1994). Hyaliner Knorpel enthält auch membrangebundene Proteoglykane wie beispielsweise das Syndecan, welches FGF (*Fibroblast growth factor*) sowie TGF (*Transforming growth factor*) bindet und somit die Aktivität dieser Zytokine reguliert. Syndecan bindet auch das nicht-kollagene Protein Fibronectin, welches ebenfalls für den Zell-Matrix Kontakt zuständig ist (C B Knudson und W Knudson, 2001). Die nicht-kollagenen Proteine und Glykoproteine machen 15%-20% der Knorpel-Trockenmasse aus. Ihre Funktion liegt darin die Matrix zu organisieren, stabilisieren und die Chondrozyten mit der EZM zu verbinden. Zusätzlich binden sie, so wie die Proteoglykane, Wasser. Zu den nicht-kollagenen Proteinen zählen das Link protein, das kollagen-bindende Protein Anchorin sowie das Kollagen Typ II bindende

## EINLEITUNG

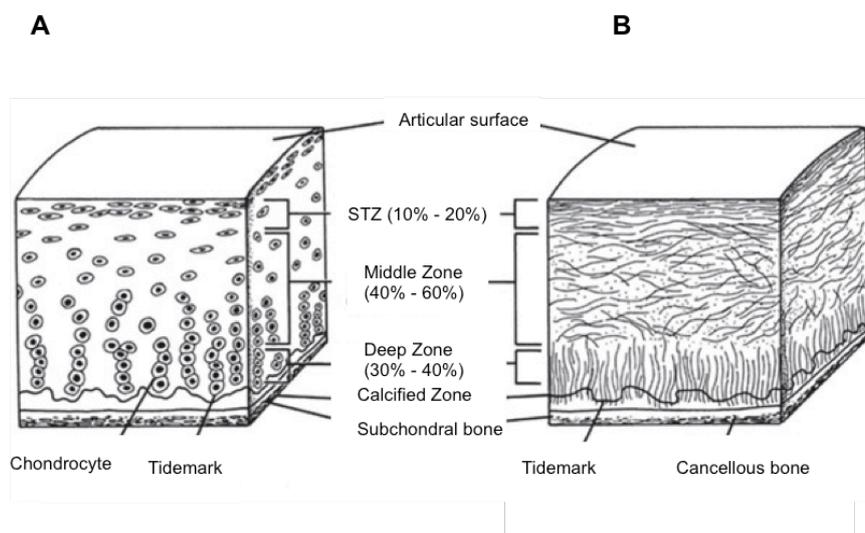
*Cartilage oligomeric protein* (COMP), welches als Marker für die OA diskutiert wird, da die Konzentration von COMP in der Synovialflüssigkeit und im Serum von OA Patienten erhöht ist (Kuettner, 1992; Martinek, 2003).

### 1.1.3 Knorpelstruktur

Obwohl die Funktion und die Strukturelemente in jedem Gelenkknorpel gleich sind variieren die Gewebedicke, die Zelldichte sowie die Beschaffenheit der EZM innerhalb eines Gelenkes enorm. Die Morphologie der Chondrozyten, deren Funktion und somit auch die Beschaffenheit der EZM verändern sich abhängig vom Abstand zur Knorpeloberfläche und zu den Chondrozyten selbst (Buckwalter und Mankin, 1998). Die Einteilung des hyalinen Knorpels erfolgt in vier Zonen welche nicht klar abgegrenzt sind, sondern ineinander übergehen (Abb. 2): 1) Obere Zone (*Superficial tangential zone*), 2) Mittlere Zone (*Middle zone*), 3) Tiefe Zone (*Deep zone*) und 4) Kalzifizierte Zone (*Calcified zone*). Die Obere Zone besteht aus zwei Schichten und ist die dünnste Zone des Knorpels. Bei der ersten Schicht, der *lamina splendens*, handelt es sich um einen Bereich unmittelbar unter der Knorpeloberfläche, welcher 1% der Knorpeldicke ausmacht. Diese Schicht besteht überwiegend aus feinen Kollagenfibrillen und enthält keine Chondrozyten und nur wenige Polysaccharide. Direkt unterhalb der *lamina splendens* befindet sich eine Schicht bestehend aus abgeflachten ovalen Chondrozyten deren Zellachse parallel zur Oberfläche verläuft. Diese Schicht (auch Tangentialzone genannt) ist reich an parallel zur Oberfläche angeordneten Kollagenfasern und der Anteil an Proteoglykanen ist im Vergleich zu den anderen Zonen relativ gering. Außerdem besitzt sie die höchste Konzentration an Wassermolekülen und an dem Adhäsionsprotein Fibronectin (Buckwalter und Mankin, 1998; Söder und Aigner, 2011). Die Obere Zone macht etwa 10%-20% der Knorpeldicke aus. Die parallele Anordnung der Kollagenfasern erhöht die Zugfestigkeit und die Widerstandskraft gegenüber Scherkräften. In Experimenten bei denen die Obere Zone entfernt wurde, erhöhte sich die Druckbelastung auf die Tieferen Zonen der EZM. Da die Zerstörung der Oberflächenzone eines der ersten detektierbaren Anzeichen der OA ist, liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen in dieser Schicht während der OA einen enormen Einfluss auf das mechanische Verhalten des Knorpels haben. Zusätzlich geht man davon aus, dass sie als Barriere zwischen Synovialflüssigkeit und Knorpelgewebe dient und somit beispielsweise das Eindringen von Molekülen des Immunsystems verhindert (Guilak *et al.*, 1994). Die Mittlere Zone, auch Transitionalzone genannt, macht etwa 40%-60% der Knorpeldicke aus und besteht aus vereinzelt und rundlichen Chondrozyten. Diese weisen eine erhöhte Konzentration von synthetisierenden Organellen, wie beispielsweise Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi Apparat auf, was für eine stärkere

## EINLEITUNG

Stoffwechselaktivität spricht. Der Anteil an Kollagenfasern und Wasser ist im Vergleich zu der Oberen Zone reduziert, aber im Gegensatz dazu haben die schräg zur Oberfläche verlaufenden Fasern einen größeren Durchmesser. Die Proteoglykankonzentration ist in dieser Schicht erhöht (Buckwalter und Mankin, 1998; Martinek, 2003). In der Tiefen Zone besitzen die Chondrozyten ebenfalls eine runde Form, bilden jedoch im Vergleich zur Mittleren Zone kurze und unregelmäßige Reihen. Diese Zone macht zwischen 30%-40% der Knorpeldicke aus und wird auch als Radialzone bezeichnet. Diese Schicht enthält den größten Proteoglykananteil und die Kollagenfasern mit dem größten Durchmesser. Im Vergleich zu den anderen Zonen ist die Wasserkonzentration am geringsten. Die Kollagenfasern sind senkrecht zur Oberfläche aufgestellt und reichen bis tief in die Tidemark, eine basophile kalziumreiche Linie, welche als Trennlinie zwischen tiefer Knorpelzone und kalzifiziertem Knorpel gilt (Buckwalter *et al.*, 1994; Buckwalter und Mankin, 1998; Martinek, 2003). Die Kalzifizierte Zone liegt zwischen der Tidemark und dem subchondralen Knochen. Die Chondrozyten aus dieser Zone haben ein geringeres Volumen und besitzen eine geringe Anzahl an synthetisierenden Organellen. Zusätzlich werden die Chondrozyten teilweise komplett von kalzifiziertem Knorpel umgeben und somit von der Umgebung abgeschirmt, was für eine reduzierte metabolische Aktivität spricht (Buckwalter und Mankin, 1998).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des hyalinen Knorpels. A) Chondrozytenorganisation in den Knorpelzonen. Abgeflachte ovale Chondrozyten in der Oberen Zone (*Superficial tangential zone*; STZ), vereinzelte runde Chondrozyten in der Mittleren Zone, runde und zu Säulen angeordnete Chondrozyten in der Tiefen Zone und kleine vereinzelte Chondrozyten in der Kalzifizierten Zone. B) sagittaler Querschnitt durch den Knorpel und Darstellung der Kollagenfaseranordnung. In der Oberen Zone sind die Kollagenfasern parallel, in der Mittleren Zone schräg und in der Tiefen Zone senkrecht zur Oberfläche angeordnet. Bildquelle: Buckwalter und Mankin (1998).

## EINLEITUNG

Neben der Einteilung der EZM in Zonen wird der Knorpel in drei unterschiedliche Regionen, abhängig von der Entfernung zu den Chondrozyten, unterteilt. Ausgehend von der Zelle sind das die perizelluläre-, die territoriale- und die interterritoriale Region. Hierbei sind die Strukturproteine konzentrisch um die Zelle herum gelagert. Die direkt an die Chondrozyten angrenzende perizelluläre Matrix ist sehr proteoglykanreich und enthält ebenfalls nicht-kollagene Proteine wie beispielsweise das Zellmembran-assoziierte, Kollagen-bindende Anchorin und das nicht-fibrilläre Kollagen Typ VI (Mollenhauer *et al.*, 1984; Poole *et al.*, 1988; Buckwalter und Mankin, 1998). Kollagen VI scheint durch seine vielseitige Bindung an weitere Proteine der perizellulären Matrix (Decorin, Fibronectin, Hyaluronsäure und Fibromodulin) aber auch an Kollagen Typ II eine Art Bindeglied zwischen den Chondrozyten und der rigiden interterritorialen Matrix zu sein (Poole *et al.*, 1992). Fibrilläre Kollagene sind hingegen nur wenig vorhanden. Zytoplasmatische Verlängerungen der Chondrozyten, sogenannte Zilien, ragen in und durch die perizelluläre Matrix in die territoriale Region. Daraus kann man schließen, dass dieser Region eine funktionelle Rolle bei der Signalweiterleitung zuteil wird (Buckwalter und Mankin, 1998; Sophia Fox *et al.*, 2009). Die etwas dickere territoriale Region ummantelt die perizelluläre Region einer einzelnen Zelle oder einem Zellverband (Zellcluster). Sie besteht überwiegend aus dünnen und feinen Fibrillen, welche meist überkreuz verlaufen und die perizelluläre Matrix wie eine Art Korb umhüllen (Guilak und Mow, 2000). Es besteht die Vermutung, dass die territoriale Region die Chondrozyten vor mechanischem Stress und Belastung schützt. Relativ abrupt endet die verzweigte Struktur der Fibrillen und geht in eine eher parallel organisierte Struktur über, welche abhängig von der Matrixzone unterschiedlich zur Oberfläche orientiert ist. Dieser Bereich wird als interterritoriale Region bezeichnet und enthält Kollagenfibrillen mit einem größeren Durchmesser, wodurch sie das größte Volumen der Knorpelmatrix ausmacht. Zusätzlich enthält die interterritoriale Region eine hohe Konzentration an Proteoglykanen (Kuettner, 1992).

### 1.1.4 Chondrogenese

Als Chondrogenese wird die Entwicklung des Knorpels aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) bezeichnet. Die Chondrogenese gilt als Vorstufe der endochondralen Ossifikation, einem Prozess, bei dem das aus hyalinem Knorpel gebildete Primordialskelett zum Knochenskelett ausgebildet wird. Zusätzlich sind die Chondrogenese und die endochondrale Ossifikation Prozesse des Knochenwachstums sowie der Knochenheilung. Die mesenchymalen Stammzellen stammen hierbei aus drei unterschiedlichen embryonalen Zelllinien: Zellen aus der ektodermalen Neuralleiste (kraniofaziales Skelett), Zellen aus dem paraxialen Mesoderm (axiales Skelett) und Zellen des lateralen Mesoderm (Extremitäten) (Olsen *et al.*, 2000). Der Differenzierungsprozess der Chondrogenese beinhaltet mehrere

## EINLEITUNG

Schritte, in denen unterschiedliche Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Adhäsionsproteine und Proteine der EZM exprimiert werden. Zu Beginn kommt es zur Kondensation und zur Proliferation der MSCs. Die kondensierenden MSCs exprimieren die Kollagene Typ I, III und V sowie Chondrogenese-induzierende Wachstums- und Transkriptionsfaktoren (Mary B Goldring, 2012). Der wichtigste Regulator der frühen Differenzierungsphase ist der Transkriptionsfaktor Sox9 (Wright *et al.*, 1995). Sox9 wird auch als „Mastergen“ der Knorpelentwicklung bezeichnet und enthält eine SYR (*sex-related region on Y chromosome*)-ähnliche HMG (*high mobility group*)-Box Domäne, anhand welcher der Transkriptionsfaktor an die DNA binden kann (Wright *et al.*, 1993; Harley und Goodfellow, 1994). Er reguliert die Expression von typischen Knorpelmatrixproteinen wie Kollagen Typ II, Aggrecan, Kollagen Typ IX und XI und ist ein Repressor der Kollagen Typ X Expression (Lefebvre *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1997; Bi *et al.*, 1999; Sekiya *et al.*, 2000). Sox9 unterliegt der Kontrolle des BMP-Signalwegs (Pan *et al.*, 2008). Aus den kondensierenden MSCs werden Prächondrozyten, welche kontinuierlich die mesenchymalen Marker verlieren und Matrix- und Adhäsionsproteine wie Kollagen Typ II, N-Cadherin, N-CAM und Tenascin C exprimieren (Lefebvre und Smits, 2005). Die Adhäsionsproteine sorgen für die Interaktion der Zellen mit der EZM sowie mit Epithelzellen aus der Umgebung, was nachweislich die Zusammenlagerung der Zellen vorantreibt (Cancedda *et al.*, 1995). Die Prächondrozyten beginnen mit der Expression von Sox5 und Sox6, zwei weiteren Transkriptionsfaktoren, welche mit Sox9 kooperieren und aktiv die Expression von Kollagen Typ II regulieren (Lefebvre und Smits, 2005). Zusätzlich sorgt das (Sox-)Trio, welches der Kontrolle von TGF- $\beta$  und BMP unterliegt, für die Suppression von typischen Markern der hypertrophen Chondrozyten (Ikeda *et al.*, 2004). Aus den Prächondrozyten entwickeln sich zunächst frühe Chondroblasten und später die säulenartigen Chondroblasten, welche sehr stark proliferieren und Matrixproteine wie die Kollagene Typ II, IX und XI sowie Aggrecan, COMP, Link Protein und Matrilin 1 exprimieren (Lefebvre und Smits, 2005). Der morphologische Unterschied zwischen diesen beiden Entwicklungsstufen ist, dass die frühen Chondroblasten eher klein und rund sind, wohingegen die in Säulen angeordneten Chondroblasten eher abgeflacht vorliegen. Die Regulation dieser speziellen Anordnung erfolgt über unterschiedliche Signalwege und Moleküle wie beispielsweise FGF, Ihh (*Indian hedgehog*), BMP und Wnt (Kronenberg, 2003). Die Chondroblasten entwickeln sich weiter zu prähypertrophen Chondrozyten, welche neben den zuvor erwähnten Matrixproteinen die Gene für das kurze, nicht-fibrilläre Kollagen Typ X, das PTHrP (*Parathyroid hormone-related Peptide*) und dessen Rezeptor, sowie die Gene des Ihh-Signalwegs exprimieren (Lefebvre und Smits, 2005). Der Rückkopplungsmechanismus zwischen PTHrP und Ihh reguliert die Proliferation der Chondrozyten und bestimmt den Eintritt in die hypertrophe Phase (Brochhausen *et al.*, 2009). Die hypertrophen Chondrozyten vergrößern ihr Volumen um das 5 bis 10fache und

## EINLEITUNG

reduzieren die Expression der frühen Matrixproteine sowie die von PTHrP und Ihh, wohingegen sie die Expression von Kollagen Typ X, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) und Runx2 stark hochregulieren (Lefebvre und Smits, 2005; Brochhausen *et al.*, 2009). Runx2 ist ein transkriptioneller Aktivator der Kollagen Typ X Synthese (Zheng *et al.*, 2003). Runx2 wird von PTHrP gehemmt, wohingegen es die Expression von Ihh aktiviert (Iwamoto *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2004), was eine regulatorische Rolle im Zusammenhang mit dem Rückkopplungsmechanismus von PTHrP/Ihh vermuten lässt (Lefebvre und Smits, 2005). VEGF ist ein angiogenetischer Faktor, welcher für die Einsprossung der Blutgefäße und somit für die Vaskularisation des hypertrophen Knorpels sorgt (Gerber *et al.*, 1999). Das letzte Entwicklungsstadium der Chondrogenese wird als terminale Differenzierung bezeichnet. Die Chondrozyten beenden die Expression von Kollagen Typ X und exprimieren das Matrixabbauende Enzym Matrixmetalloproteinase 13 (MMP-13) sowie die Osteoblastenmarker Osteopontin und die Alkalische Phosphatase. Runx2 wird ebenfalls weiter synthetisiert und aktiviert direkt die Expression von MMP-13 (Lefebvre und Smits, 2005). Die hypertrophen Chondrozyten induzieren die Mineralisierung der Region und unterliegen anschließend der Apoptose. Die Chondrogenese ist zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen und geht in die endochondrale Ossifikation über. Durch die angelegten Blutgefäße gelangen Osteoklasten und Osteoblasten in die Lakunen der ehemaligen Chondrozyten und beginnen mit dem Aufbau der Knochenmatrix (Brochhausen *et al.*, 2009).

## 1.2 Osteoarthrose

Die Osteoarthrose galt in der Vergangenheit als eine altersspezifische und durch Verschleiß und Abnutzung hervorgerufene Erkrankung des Gelenks. Heutzutage weiß man, dass es sich hierbei um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, bei der zwar das Alter und die mechanischen Faktoren eine übergeordnete Rolle spielen, aber nicht die einzige Ursache darstellen. Weitere Risikofaktoren können das weibliche Geschlecht, Übergewicht, vorhergehende Verletzungen, Gelenkfehlstellungen sowie genetische Prädispositionen sein (Hunter und Felson, 2006).

### 1.2.1 Epidemiologie

Die Osteoarthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit (WHO; *World Health Organization*, 2003). Epidemiologische Studien zur Verbreitung der Osteoarthrose variieren erheblich, da die Statistik häufig auf Selbstangaben beruht, welchen keine körperlichen oder radiologischen Untersuchungen zugrunde liegen. Eine Dunkelziffer wird ebenfalls vermutet,

## EINLEITUNG

da nicht jede Person mit Osteoarthrose-typischen Symptomen einen Arzt konsultiert. In der vorliegenden GEDA- („Gesundheit in Deutschland Aktuell“) Studie des Robert-Koch-Instituts von 2010 wurden Osteoarthrose-Patienten nach ihrer Lebensprävalenz und ihrer 12-Monats-Prävalenz befragt. Bei der Lebensprävalenz stellte sich die Frage nach einer jemals diagnostizierten Osteoarthrose oder einer degenerativen Gelenkerkrankung, wohingegen es bei der 12-Monats-Prävalenz um eine aktuell vorliegende Erkrankung ging. Mit diesem Verfahren sollten die aktiven, schmerzhaften Phasen der schubweise verlaufenden Osteoarthrose von den latenten, schmerzfreien Phasen separiert werden (RKI, 2013). Das Ergebnis dieser Studie war, dass von allen Befragten bei 27% der Frauen und 18% der Männer jemals eine Osteoarthrose ärztlich diagnostiziert wurde. Altersgruppenübergreifend waren immer mehr Frauen als Männer betroffen und die Anzahl der Erkrankungen stieg mit zunehmendem Alter. Ab dem 65. Lebensjahr waren die Hälfte der Frauen (52,9%) und ein Drittel der Männer (34,8%) betroffen. Die Ergebnisse der 12-Monats-Prävalenz lagen Altersgruppen-übergreifend einige Prozentpunkte unterhalb der Lebensprävalenz-Daten. Die GEDA-Studie von 2012 belegte, dass die Lebenszeitprävalenz bei den Frauen zwischen 2003 und 2012 von 23% auf 28% und bei den Männern von 16% auf 20% stieg. Es wird deutlich, dass die Osteoarthrose eine altersassoziierte Erkrankung ist und es aufgrund des demographischen Wandels immer mehr Menschen geben wird, die unter den Folgen dieser Erkrankung leiden werden. Zusätzlich sind deutlich mehr Frauen als Männer betroffen, was auf die menopausale Hormonumstellung zurückgeführt wird. Neben den persönlichen Einschränkungen ist die Zunahme der Krankheitsfälle eine volkswirtschaftliche Belastung. Zum einen kommt es zu einer gesteigerten Beanspruchung des Gesundheitssystems, und zum anderen werden durch die Invalidität und der damit verbundenen Arbeitsunfähigkeit die indirekten Kosten erhöht (RKI, 2012).

### 1.2.2 Pathogenese

Die Osteoarthrose ist primär durch den fortschreitenden Knorpelverlust und die damit einhergehenden Bewegungseinschränkungen gekennzeichnet. Wo letztendlich der Ursprung der Erkrankung liegt, wird in den letzten Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Neben dem Knorpel wird der Ursprung im subchondralen Knochen und im Bandapparat vermutet (Felson und Neogi, 2004; Brandt *et al.*, 2006). Eine weitere Hypothese beschreibt die veränderte metabolische Aktivität der Chondrozyten als einen möglichen Auslöser. Unabhängig vom Ursprung der Erkrankung ist der Auslöser der Osteoarthrose ein Ungleichgewicht zwischen Belastung und Widerstandskraft des Knorpels. Die Progression der Erkrankung wird in drei Phasen unterteilt (Martel-Pelletier, 2004). Die erste Phase der Pathogenese erfolgt vom Patienten meist unbemerkt, da der Knorpel nicht innerviert ist und somit auch keine

## EINLEITUNG

Schmerzrezeptoren besitzt. Diese Phase wird als latente, schmerzfreie Phase bezeichnet und kann sich über mehrere Jahre ziehen (Spector *et al.*, 1992). Zu diesem Zeitpunkt kommt es zum langsamen Abbau der Proteoglykanschicht. Die Chondrozyten versuchen diesen Zustand zu kompensieren, indem sie durch vermehrte Proliferation und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren die Synthese der Matrixproteine aktivieren. Histopathologisch ist dies durch eine sogenannte Zellclusterbildung gekennzeichnet (Sulzbacher, 2012). Im weiteren Verlauf, auch aktivierte Phase genannt, kommt es immer wieder zu Ermüdungs- und Belastungsschmerzen. Diese können spontan oder nach längerer Schonung, wie beispielsweise Nachtruhe, auftreten. Im Knorpel selber kommt es durch die Reduktion der Proteoglykanschicht zu einem Ungleichgewicht zwischen internem Quelldruck der Proteoglykane und der Spannung der Kollagen Typ II Fasern. Die Konsequenz ist eine progressive Zerstörung der Kollagenschicht und eine Faserbildung in der Oberflächenzone. Die Instabilität der Oberflächenzone führt zur vermehrten Furchenbildung bis in die tiefer gelegenen Regionen des Knorpels. Proinflammatorische Zytokine werden ausgeschüttet, welche die Produktion von matrixabbauenden Enzymen aktivieren und die Synthese der Matrix hemmen. Es kann auch zur Entzündung der Gelenkinnenhaut (Synovialmembran) kommen, was durch eine Schwellung des Gelenks sowie durch Überwärmung, Rötung und Schmerzen gekennzeichnet ist. In der letzten Phase, der dekompensierten Arthrose, sind die Schmerzen dauerhaft und die Bewegung des Gelenks nahezu vollständig eingeschränkt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Knorpel weitestgehend abgetragen und die mechanische Last wird direkt auf den subchondralen Knochen übertragen. Der subchondrale Knochen wird umgebaut, wodurch es zur Verdickung der subchondralen Knochenplatte und der subartikulären Spongiosa kommt, was zur Osteosklerose führt. Der sklerosierte, verhärtete Bereich ist nicht belastungsresistent, wodurch es zum Bruch der Knochenplatte kommen kann. Blutgefäße wandern in den vergrößerten kalzifizierten Knorpel ein und führen zur Invasion von weiteren Entzündungsmolekülen. Um das Gelenk gegen den Außendruck zu stabilisieren, werden Osteophyten ausgebildet, was zu einer Gelenkflächenvergrößerung führt. Die Osteophytenposition ist meist verantwortlich für starke Bewegungseinschränkungen und für den Schmerz, der durch den Druck auf Nerven und umliegendes Gewebe entsteht (Sulzbacher, 2012; Liu-Bryan und Terkeltaub, 2015).

### **1.2.3 Molekularbiologie der Osteoarthritis**

Wie in Kapitel 1.2.2 erläutert, gibt es unterschiedliche Theorien bezüglich des Ursprungs der Osteoarthritis. Dennoch treten im allgemeinen die ersten pathologischen Veränderungen an der Gelenkoberfläche auf, an der die mechanische Belastung und der Druck am stärksten sind (Loeser *et al.*, 2012). Die Knorpelzellen spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Unter

## EINLEITUNG

gesunden Bedingungen erhalten die Chondrozyten das Gleichgewicht zwischen Matrixauf- und -abbau. Im Verlauf der OA fangen die Chondrozyten an zu proliferieren und ihr Expressionsprofil sowie ihre Morphologie zu verändern, was zu einem metabolischen Ungleichgewicht in Richtung Katabolismus führt (Pelletier *et al.*, 2001; Mary B Goldring, 2009). Diese Veränderung wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren wie  $\text{TNF}\alpha$  (*Tumor necrosis factor*), IL-1 (Interleukin 1), IGF-1 (*Insulin-like growth factor I*), TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor*), FGFs (*Fibroblast growth factor*) und BMPs (*Bone marrow protein*) verursacht, welche entweder vom Synovium oder von den Chondrozyten selbst sezerniert werden. Eine ausführliche Beschreibung der bei der OA involvierten Faktoren wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

### 1.2.3.1 Zytokine und katabole Mediatoren

Die Infiltration von mononukleären Zellen sowie die Überexpression von pro-inflammatorischen Mediatoren konnten in der frühen und späten OA nachgewiesen werden (Benito *et al.*, 2005). Die pro-inflammatorischen Hauptakteure sind hierbei die Zytokine IL-1 $\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6. IL-1 $\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  werden von mononukleären Zellen, Osteoblasten, Synoviozyten, aber auch von den Chondrozyten selbst sezerniert, und die Expression ist während der OA in der Synovialmembran, in der synovialen Flüssigkeit, im subchondralen Knochen sowie im Knorpel erhöht. Man geht davon aus, dass IL-1 $\beta$  für die Destruktion des Knorpels verantwortlich ist, wohingegen  $\text{TNF}\alpha$  die Entzündungskaskade vorantreibt (Kapoor *et al.*, 2011). Nicht nur die Zytokine selbst, sondern auch ihre spezifischen Rezeptoren wie IL-1-Rezeptor Typ I und  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptor 1 (p55) werden von den OA-Chondrozyten stärker exprimiert (Martel-Pelletier *et al.*, 1992). Beide Zytokine zeigten in vorhergehenden Studien anti-anabole Effekte, indem sie die Synthese von Matrixkomponenten, wie Kollagen Typ II und Aggrecan sowie Inhibitoren von matrixabbauenden Enzymen (*Tissue-inhibitor of metalloproteinase*; TIMP) in den Chondrozyten hemmten (Saklatvala, 1986; M B Goldring *et al.*, 1994). Zusätzlich sind IL-1 und  $\text{TNF}\alpha$  verantwortlich für die Hochregulierung von matrixabbauenden Enzymen, z. B. den Mitgliedern der MMPs und ADAMTS Familie. Hierzu gehören die maßgeblich an der Destruktion des Gelenkknorpels beteiligten MMP-1, MMP-3, MMP-13 sowie ADAMTS-4. Für ADAMTS-5 konnte der stimulierende Effekt von IL-1 $\beta$  und  $\text{TNF}\alpha$  weder in bovinen noch in humanen Chondrozyten nachgewiesen werden (Kapoor *et al.*, 2011). Neben den katabolen und anti-anabolen Effekten von IL-1 und  $\text{TNF}\alpha$  sind sie in der Lage, die Synthese von weiteren Zytokinen wie beispielsweise IL-6 zu induzieren (Guerne *et al.*, 1990). Auch die Expression von Entzündungsmediatoren wie der induzierbaren Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS), welche die Bildung von Stickstoffmonoxid

## EINLEITUNG

(NO) katalysiert, oder die von Phospholipase A2, Cyclooxygenase 2 (COX-2) und mikrosomalen Prostaglandin E Synthase 1, welche für die Biosynthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) verantwortlich sind, ist erhöht. NO und PGE<sub>2</sub> aktivieren simultan zu den Zytokinen die MMP-Synthese, inhibieren die Expression von Matrixkomponenten und initiieren die Apoptose der Chondrozyten (Kapoor *et al.*, 2011). Die Signalkaskaden, über welche die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  primär wirken, sind die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) und die p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen sowie der *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF $\kappa$ B) Signalweg (Mary B Goldring *et al.*, 2011). Ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg im Zusammenhang mit der OA ist der Wnt- $\beta$ -Catenin Signalweg. Es konnte gezeigt werden, dass im Knorpel von OA Patienten das *Wnt-induced signaling protein 1* (WISP-1) erhöht ist und dass es durch eine Stimulierung der Chondrozyten mit WISP-1 zu einer Überexpression von IL-1 $\beta$  kommt (Blom *et al.*, 2009; Geyer *et al.*, 2009). Weitere Untersuchungen mit dem natürlichen Wnt-Antagonisten *Dickkopf-related protein 1* (DKK1), bei denen die Hochregulierung zu einer reduzierten Progression der OA geführt hat, untermauern diese Ergebnisse (Lane *et al.*, 2007).

### 1.2.3.2 Matrixmetalloproteinasen

Bei den MMPs handelt es sich um eine Gruppe von zinkabhängigen Endopeptidasen, welche durch den Abbau der EZM viele physiologische und pathologische Prozesse regulieren. Der kontrollierte Abbau der EZM ist wichtig bei der embryonalen Entwicklung, Morphogenese, Reproduktion und beim Umbau von Geweben (Galasso *et al.*, 2012). Die MMPs werden aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität in folgende Gruppen unterteilt: Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), Matrilysin (MMP-7), Metalloelastase (MMP-12) und Membran-Typ Metalloproteinasen (MT-MMP-1, 2, 3 und 4). Als pro-MMPs (Zymogene) sekretiert, werden die MMPs erst durch die anschließende Proteolyse mittels Serinproteinasen oder andere MMPs aktiviert (Werb, 1997). Die Regulierung der MMPs erfolgt unter anderem über Chemokine und Wachstumsfaktoren.

Bei der Knorpelhomöostase werden im gesunden Gewebe einige Kollagenasen und Gelatinasen in geringen Mengen sekretiert, wohingegen es während der OA Pathogenese zu einer starken Erhöhung der mRNA Expression als auch der enzymatischen Aktivität von einigen MMPs wie MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 10 und 13 kommt (Jayasuriya und Chen, 2012). Die prominenteste Matrixmetalloproteinase bezüglich der Gelenkknorpeldegeneration ist MMP-13 (Mitchell *et al.*, 1996). MMP-13 wird ebenfalls als pro-MMP synthetisiert und anschließend durch die MMPs 2, 3 und 14 aktiviert. Die höchste Substratspezifität hat MMP-13 gegenüber Kollagen Typ II, wodurch das Enzym zu den Hauptakteuren bei der

## EINLEITUNG

Destruktion der EZM während der OA gezählt wird (Mitchell *et al.*, 1996; Reboul *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2013). Weitere Substrate von MMP-13 sind die Kollagene Typ III, IV, IX und X sowie Aggrekan (Jayasuriya und Chen, 2012). MMP-13 spielt eine wesentliche Rolle bei der enchondralen Ossifikation, genauer bei der terminalen hypertrophen Differenzierung, bei der das Enzym überwiegend in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und für die Expansion der hypertrophen Zone verantwortlich zu sein scheint (Mary B Goldring *et al.*, 2005; Jayasuriya und Chen, 2012). Im Mausmodell konnte die Kollokalisierung von MMP-13 und Kollagen Typ X im frühen OA Stadium nachgewiesen werden (Kamekura *et al.*, 2005). Eine weitere, zunächst unscheinbare Matrixmetalloproteinase im Bezug auf die OA ist die Gelatinase MMP-9. MMP-9 spaltet unter anderem die Kollagene Typ IV, V, XI sowie Kollagen Typ I und III (Okada *et al.*, 1992; Spahn, 2006; Galasso *et al.*, 2012; Bigg *et al.*, 2007). MMP-9 wird von Osteoklasten, Makrophagen, Trophoblasten, hippocampalen Neurozyten sowie von migrierenden Keratinozyten exprimiert und normalerweise mit pulmonalen, myokardialen und neoplastischen Krankheiten in Verbindung gebracht (Galasso *et al.*, 2012). Im gesunden Knorpelgewebe wird MMP-9 in sehr geringen Mengen exprimiert, wohingegen die Expression im OA Gewebe erhöht ist. Ein eindeutiger Anstieg der MMP-9 Expression konnte im subchondralen Knochen, in der Spongiosa sowie in den fibrillären Arealen des Knorpels nachgewiesen werden (Buckwalter *et al.*, 2007; Hulejová *et al.*, 2007; Galasso *et al.*, 2012). Durch die erhöhte metabolische Aktivität in der Spongiosa kann es zu den OA-spezifischen morphologischen Veränderungen des Gelenks kommen, welche die Progression der OA vorantreiben. Zusätzlich konnte eine positive Korrelation zwischen der MMP-9 und der MMP-13 Expression in der OA beobachtet werden, wodurch der Verdacht besteht, dass MMP-9 für die Aktivierung von MMP-13 verantwortlich ist (Kyoung Soo Kim *et al.*, 2012).

### *1.2.3.3 A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*

Die Aggrekanasen gehören zur Familie der ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*) und werden, so wie die MMPs, als Zymogene synthetisiert. Erst durch die proteolytische Spaltung anhand von Proproteinkonvertasen wie Furin oder durch einige MMPs, erlangen sie ihre katalytische Aktivität (Wight, 2005). Die Aggrekanasen sind die wichtigsten Proteasen beim Aggrekanabbau in der OA, wobei den Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5 eine zentrale Rolle bei der proteolytischen Zerstörung des arthrotischen Gelenkknorpels zugeschrieben wird, da sie im Vergleich zu anderen Proteinase das Aggrekan am effektivsten spalten (Kashiwagi *et al.*, 2004; Gendron *et al.*, 2007). Im normalen, gesunden Knorpel unterliegt der Aggrekanabbau einer feinen Balance zwischen den Aggrekanasen und deren Inhibitoren, wie beispielsweise TIMP-3 (*Tissue-*

## EINLEITUNG

*inhibitor of metalloproteinase-3*). Bei der OA ist diese Balance in Richtung Katabolismus verschoben (Verma und Dalal, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass ADAMTS-5 Knockout-Mäuse vor dem Aggrekanverlust und den hiermit verbundenen Knorpelerosionen der frühen OA geschützt sind, wohingegen bei ADAMTS-4 Knockout-Mäusen diese Protektion nicht nachgewiesen werden konnte (Glasson *et al.*, 2004; Stanton *et al.*, 2005; Malfait *et al.*, 2010). Obwohl nicht bekannt ist, welche der beiden Aggrekanasen für die Degradation des humanen Knorpels hauptverantwortlich ist, geht man davon aus, dass die Aggrekanasen generell den Abbau der Knorpelmatrix initiieren. Zu Beginn der OA wird Aggrekan abgebaut, wodurch die kollagenen Strukturen freigelegt werden und somit die MMPs leichten Zutritt zu ihrem spezifischen Substrat haben (Nagase und Kashiwagi, 2003). Während die ADAMTS-4 Expression durch die katabolen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , sowie den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  reguliert wird, sind die Meinungen bezüglich der ADAMTS-5 Regulation kontrovers. ADAMTS-5 wird im humanen Knorpel konstitutiv exprimiert, und bislang konnte keine Zytokin-induzierte ADAMTS-5 Synthese nachgewiesen werden (Koshy *et al.*, 2002; Fosang *et al.*, 2008). Im Tiermodell wiederum wurde nach Stimulierung mit katabolen Zytokinen die ADAMTS-5 Expression hochreguliert (Fosang *et al.*, 2008).

### 1.2.3.4 Tissue-Inhibitors of Metalloproteinase

Bei den *Tissue-inhibitors of metalloproteinase* (TIMP) handelt es sich um endogene Inhibitoren der MMPs und einigen Mitgliedern der ADAMs und ADAMTS Familien, wodurch sie wichtige Regulatoren des EZM-Umbaus sind. Bei den Säugetieren sind vier Mitglieder der TIMPs (TIMP-1 bis 4) bekannt, welche alle 23 der derzeit bekannten MMPs inhibieren (Brew und Nagase, 2010). Die Spezifität für die unterschiedlichen MMPs variiert stark innerhalb der TIMPs. Hierbei ist TIMP-3 sehr speziell, da es ein breites Spektrum an MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-13, MMP-14 und MMP-15) aber auch einige Mitglieder der ADAMs und ADAMTS Familien gehemmt. Hierzu gehören auch die Aggrekanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5, was TIMP-3 zu einem zentralen Inhibitor der Knorpeldegradation macht (Kashiwagi *et al.*, 2001; Gendron *et al.*, 2003; Jonas Jacobsen *et al.*, 2008). In einer Studie von 2004 wurden die TIMP mRNA Expressionsprofile von humanen normalen und osteoarthrotischen Knorpelgeweben verglichen. Während TIMP-1 und TIMP-4 im OA Gewebe reduziert exprimiert wurden, konnte ein erhöhtes Expressionslevel von TIMP-3 nachgewiesen werden. TIMP-2 zeigte keine statistisch signifikanten Expressionsunterschiede (Kevorkian *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu konnten Morris *et al.* größere Mengen an TIMP-3 aus gesundem Gewebe als aus OA Gewebe extrahieren. Zusätzlich fanden sie heraus, dass die Stimulierung mit IL-1 $\beta$  die Expression

## EINLEITUNG

von TIMP-3 erniedrigt, wohingegen sie durch die Zugabe von  $TNF\alpha$  und  $TGF-\beta$  erhöht wird (Morris *et al.*, 2010).

### 1.2.3.5 Anabole Mediatoren und Reparaturprozesse

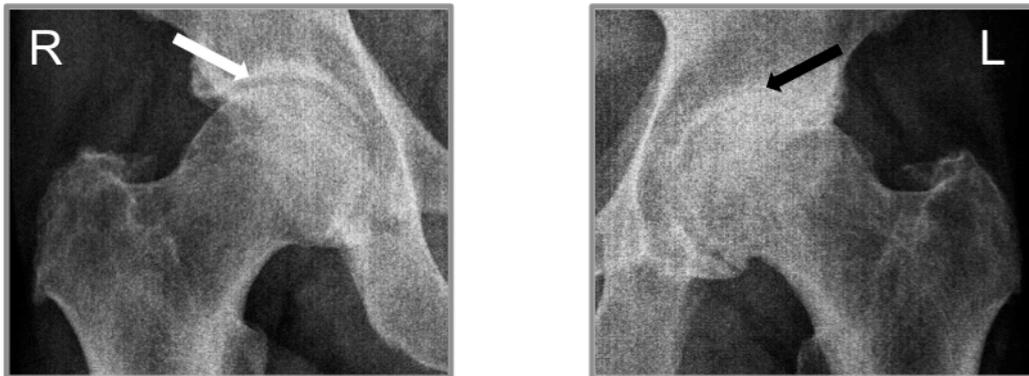
Während die Zytokine  $IL-1\beta$  und  $TNF\alpha$  für den Abbau der EZM verantwortlich sind, haben einige Wachstums- bzw. Transkriptionsfaktoren wie *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1),  $TGF-\beta$  und SOX9 einen positiven Effekt auf die Synthese der Matrixkomponenten (Tyler, 1989; Bell *et al.*, 1997; Blaney Davidson *et al.*, 2007). Bei der Osteoarthritis wird dieser positive Effekt durch das proinflammatorische Milieu runterreguliert, wodurch der Matrixaufbau gestört und die Degradation des Knorpels befördert wird (Blanco Garcia, 1999). In der frühen OA verdickt sich das Gewebe zunächst kurzzeitig, da die hyperproliferativen Chondrozyten größere Mengen an Matrixkomponenten synthetisieren. Dieser fehlgesteuerte Reparaturprozesses führt jedoch zum Aufweichen des Gewebes, wodurch die Elastizität des Knorpels reduziert wird. Folglich sind die Chondrozyten der mechanischen Belastung stärker ausgesetzt und verändern ihre physiologische Funktion (Panula *et al.*, 1998; H Xu *et al.*, 2003; Maldonado und Nam, 2013). Im weiteren Verlauf wird die verdickte Knorpelmatrix, wie zuvor beschrieben, enzymatisch abgebaut. Ein weiteres Problem stellt die Synthese von nicht-chondrogener EZM dar. Die Chondrozyten produzieren nicht mehr hauptsächlich Kollagen Typ II, sondern das normalerweise im subchondralen Knochen vorkommende Kollagen Typ I. Im Vergleich zu Kollagen Typ II enthält Kollagen Typ I weniger Hydroxylysine und Glycoside, welche die Interaktion mit den Proteoglykanen vermitteln, wodurch die Integrität der EZM automatisch geschwächt ist (Gelse, 2003). Neben Kollagen Typ I wird auch die Expression von Kollagen Typ X stark hochreguliert. Kollagen Typ X ist ein Marker der hypertrophen Chondrozyten und wird im normalen Knorpel lediglich in der kalzifizierten Zone exprimiert. In der OA ist Kollagen Typ X irregulär auf alle Zonen verteilt und hauptsächlich um die Zellcluster der morphologisch veränderten und proliferierenden Chondrozyten der faserigen Knorpelschicht lokalisiert (Mark *et al.*, 1992).

### 1.2.4 Diagnostik

Um die Osteoarthritis diagnostizieren zu können, müssen mehrere Verfahren herangezogen werden. Erst ein Gesamtbild aus Anamnese, klinischem Befund und radiologischen Aufnahmen lassen eine sichere Diagnose zu. Typische Anzeichen für eine Osteoarthritis sind die Verdichtung des Knochens (subchondrale Sklerosierung) sowie die Verschmälerung des Gelenkspaltes (Abb. 3). Zusätzlich können ungleichmäßige Gelenkflächen, Osteophytenbildung und Deformierungen des Gelenks dargestellt werden (Spector *et al.*,

## EINLEITUNG

1992). Der Schweregrad der Osteoarthrose wird beispielsweise durch die radiologische Beurteilung nach Kellgren und Lawrence (1957) festgelegt (Tabelle 1):



**Abb. 3:** Radiologischer Befund eines Patienten mit Coxarthrose am linken Hüftgelenk. Während der Gelenkspalt des rechten Hüftgelenks noch gut einsehbar ist (linkes Bild; weißer Pfeil), ist auf der erkrankten linken Seite der Gelenkspalt oberhalb des Hüftkopfes kaum vorhanden (rechtes Bild; schwarzer Pfeil).

**Tab. 1:** Radiologische Beurteilung des Osteoarthrose Schweregrads (Kellgren und Lawrence, 1957). Dargestellt nach Krukemeyer und Möllenhoff (Krukemeyer und Möllenhoff, 2013).

Kellgren und Lawrence Score Systematik	
Osteophyten	Keine oder fraglich = 0 Eindeutig = 1 Größe = 2
Gelenkspalt	Nicht oder fraglich verschmälert = 0 Eindeutig verschmälert = 1 Fortgeschritten verschmälert = 2 Aufgehoben = 3
Sklerose	Keine = 0 Leichte = 1 Leichte mit Zystenbildung = 2 Sklerose mit Zystenbildung = 3
Deformierung	Keine = 0 Leichte = 1 Deutliche = 2

## EINLEITUNG

Grad des Knorpelschadens (Grad 0 bis Grad 4)		
Grad	Punkte	Beschreibung
0	0	-
1	1-2	Weiche Knorpeloberfläche, aber noch keine Schädigung der Knorpeloberfläche
2	3-4	Aufgeraute Knorpeloberfläche, leichte Schäden der Knorpelstruktur, nur oberflächliche Knorpelschichten sind betroffen
3	5-9	Knorpelschaden mit eindeutigem Knorpelverlust, Knorpelabbrüche, Schädigung aller Knorpelschichten bis hin zum Knochen
4	10	Vollständige Knorpelzerstörung mit freiliegender Knochen

### 1.2.5 Therapie

Aufgrund der multifaktoriellen Komplexität der Osteoarthrose sind die derzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsstrategien stark limitiert. Es gibt bislang keine Möglichkeiten die Progression der Erkrankung langfristig zu stoppen, weswegen vor allem die Schmerzreduktion und die Funktionserhaltung im Fokus der Arthrosetherapien stehen (Berenbaum, 2008). Die Therapiemaßnahmen werden an den Patienten, je nach persönlicher Situation und Krankheitsstadium, angepasst. Ist die Erkrankung noch nicht weit fortgeschritten, werden konservative Maßnahmen empfohlen, welche aus nicht-pharmakologischen und pharmakologischen Methoden bestehen. Zu den nicht-pharmakologischen Methoden gehören Beratungen zur Vorbeugung gelenkbelastender Verhaltensweisen, funktionserhaltende und die Muskulatur stärkende Physiotherapie, Gewichtsreduktion sowie physikalische Therapien wie Elektrotherapie und Massagen. Gerade die gezielte und angepasste Bewegung ist sehr wichtig, da dadurch der Knorpel besser versorgt werden kann. Im fortgeschrittenen Stadium (aktivierte und dekompenzierte Osteoarthrose; 1.2.2) werden schmerz- und entzündungslindernde Medikamente eingesetzt. Beginnend mit Initialpräparaten wie Paracetamol werden weiterhin nicht-steroidale Entzündungshemmer (*Non-steroidal antiinflammatory drugs*; NSAIDs) verwendet. Sind die Nebenwirkungen der NSAIDs zu groß oder wird keine ausreichende Schmerzlinderung erzielt, wird auf Opioidanalgetika umgestiegen bzw. diese parallel verabreicht. Ist der Schmerz sehr stark und akut und liegt eine lokale Entzündung mit Gelenkerguss vor, werden unter Umständen Glucocorticoide intraartikulär injiziert (Hunter und Felson, 2006). Sind die konservativen Methoden ausgeschöpft und die Bewegung des Patienten maßgeblich

## EINLEITUNG

eingeschränkt, werden operative Therapiemethoden angewendet. Hierbei wird zwischen gelenkerhaltenden- und gelenkersetzenden Methoden unterschieden. Die Gelenkersatzmethode ist die letzte Instanz, wenn es zur totalen Knorpelzerstörung bis hin zum freiliegenden Knochen kommt. Gelenkerhaltende Methoden werden bei leichter bis mittelschwerer Osteoarthrose angewendet. Neben arthroskopischen und knochenmarksstimulierenden Methoden, deren Therapieerfolge i. d. R. von relativ kurzer Dauer sind, sind die gelenkflächenwiederherstellenden Methoden inzwischen zuverlässig. Für die Gelenkflächenwiederherstellung werden entweder Knochen-Knorpelstücke aus gesunden Arealen transplantiert (AOT; autologe osteochondrale Transplantation) oder alternativ isolierte Chondrozyten auf eine Trägermatrix gebracht und in das defekte Areal eingesetzt (MACT; matrixgekoppelte autologe Chondrozytentransplantation). Der hierbei gebildete Knorpel ist dem hyalinen Knorpel relativ ähnlich wodurch diese Methode langfristige Ergebnisse verspricht (Brittberg *et al.*, 1994; Behrens *et al.*, 2006; Kon *et al.*, 2016).

### 1.3 Delta/Notch-like EGF-related Receptor (DNER)

*Delta/Notch-like EGF-related Receptor* (DNER) ist ein Transmembranprotein mit nur einer Transmembrandomäne und zehn extrazellulären EGF (*epidermal growth factor*)-ähnlichen Wiederholungen. Auf der zytoplasmatischen Seite besitzt DNER zwei spezifische Sequenzen, welche für die basolaterale Sortierung in polarisierten Zellen verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich um ein Tyrosin-basiertes Signal und ein Di-Leucin-Motiv (Rapoport *et al.*, 1997). Das Membranprotein wurde erstmals 2002 in unterschiedlichen postmitotischen Neuronen entdeckt (Eiraku *et al.*, 2002). Die Namensgebung erfolgte aufgrund seiner Sequenzhomologie zum Rezeptor Notch und dessen Liganden Delta, welche bei der Embryonalentwicklung eine maßgebliche Rolle spielen. 2005 konnte nachgewiesen werden, dass DNER ein funktioneller Ligand des Notch-Signalwegs ist und die morphologische Differenzierung der Bergmann-Glia im Zentralnervensystem (ZNS) reguliert (Eiraku *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den klassischen Notch-Liganden fehlt DNER das sogenannte DSL Notch-Bindemotiv. Das Protein bindet an den Notch Rezeptor anhand der ersten beiden EGF-ähnlichen Wiederholungen und aktiviert den Signalweg über eine  $\gamma$ -Sekretase vermittelte S3 Spaltung des Notch-Rezeptors. Die Affinität zu Notch-1 ist im Vergleich zu dessen klassischem Liganden Delta-1 reduziert, weshalb eine Interaktion zu weiteren Notch-Rezeptoren nicht ausgeschlossen ist. Die DNER vermittelte Differenzierung der Bergmann-Glia wird hierbei sowohl über den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Notch-Signalweg induziert (siehe 1.3.1). Beim klassischen, kanonischen Notch-Signalweg bindet im Anschluss an die  $\gamma$ -Sekretase-vermittelte Spaltung von Notch die intrazelluläre Domäne

## EINLEITUNG

(NICD) an die CSL Transkriptionsfaktoren und initiiert somit die Transkription der Zielgene. Der nicht-kanonischen Notch-Signalweg ist CSL-unabhängig und führt über die E3 Ubiquitinligase Deltex zur Aktivierung weiterer Proteine und Signalwege (Eiraku *et al.*, 2005). 2012 wurde DNER als Tr-Antigen eines paraneoplastischen Syndroms (PCD; paraneoplastic cerebellar disorder) identifiziert. Das PCD ist unter anderem eine Begleiterkrankung beim Hodgkin-Lymphom, bei welchem Autoimmunantikörper (Anti-Tr Antikörper) gegen den Tumor gebildet werden. Eine Nebenwirkung der Anti-Tr Antikörper ist die Zerstörung bestimmter Komponenten des ZNS wie beispielsweise der Purkinje-Zellen, welche sehr stark DNER exprimieren (de Graaff *et al.*, 2012). Eine weitere Rolle scheint DNER bei der Adipogenese von hAMSCs (*Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*) zu spielen, da durch den Knockdown von DNER die Differenzierung zu Adipozyten vorangetrieben werden konnte (Park *et al.*, 2010). Im Kontext der Osteoarthritis konnte eine erhöhte mRNA Expression von DNER in den stärker geschädigten Arealen von humanem osteoarthrotischem Kniegelenksknorpel im Vergleich zu den weniger lädierten Arealen nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2009). In einem murinen Modell wurde der Notch-Rezeptor in hypertrophen Chondrozyten während der endochondralen Ossifikation identifiziert, was zu der Hypothese führte, dass DNER als Ligand von Notch im osteoarthrotischen Knorpel an einem unzureichenden Versuch des Matrixumbaus beteiligt sein könnte (Hayes *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2009).

### 1.3.1 Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein stark konservierter Signaltransduktionsweg, der zuerst in der Taufliège *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde (Morgan, 2014). Benannt wurde der Signalweg nach dem transmembranen Rezeptor Notch, welcher über direkten Zell-Zell-Kontakt mit seinen Liganden in Verbindung tritt. Es gibt vier bislang bekannte Notch-Rezeptoren (Notch-1 bis 4) bei Säugern, und alle enthalten multiple EGF-ähnliche Wiederholungen in der extrazellulären Domäne. Bei den Notch-Liganden handelt es sich um Transmembranproteine aus der Familie der DSL (Delta/Serate/LAG-2) Proteine. Bislang bekannt sind Delta-like 1, Delta-like 2, Delta-like 3, Jagged-1 und Jagged-2 (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Der Notch-Signalweg ist maßgeblich an der embryonalen Entwicklung beteiligt und reguliert zusätzlich Prozesse im ausgewachsenen Gewebe. Er reguliert hierbei Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie die Apoptose (Borggreve und Oswald, 2009). Die Signaltransduktion kann über zwei parallele Wege erfolgen: dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Notch-Signalweg. Der kanonische Notch-Signalweg wird durch die Bindung des Notch-Rezeptors an seinen Liganden aktiviert. Hierbei kommt es anschließend zu zwei proteolytischen Spaltungen. Bei

## EINLEITUNG

der ersten Spaltung wird durch eine Metalloproteinase der ADAM Familie (*A desintegrin and metalloproteinase*) namens TACE (*Tumor necrosis factor alpha converting enzyme*) die extrazelluläre Domäne von Notch (NECD) entfernt. Die intrazelluläre Domäne (NICD) wird anschließend anhand eines  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes von der Zellmembran gelöst und diffundiert in den Zellkern. NICD verbindet sich im Zellkern mit einem Transkriptionsfaktor aus der CSL (CBF1/RBP-Jk, Su(H) und Lag-1)-Familie und weiteren Co-Faktoren, was letztendlich zu der Expression der Zielgene führt. Zu den Notch-Zielgenen gehören Mitglieder der Transkriptionsfaktor-Familien Hes (*Hairy and enhancer of split*) und Hey (*Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif*), welche ein *basic helix-loop-helix* (bHLH) Motiv enthalten. Der nicht-kanonischen Notch-Signalweg ist ein CSL unabhängiger, paralleler Signalweg bei dem die NICD mit dem zyttoplasmatischen Protein Deltex (E3 Ubiquitinligase) interagiert und unter anderem die Notch-vermittelte Gentranskription supprimiert (Izon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte ein Liganden-unabhängiger nicht-kanonischer Notch-Signalweg nachgewiesen werden, bei dem intrazelluläres Notch mit den Proteinen anderer Signalwege, wie beispielsweise dem Wnt-Signalweg, interagiert (Andersen *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Die Rolle von Notch bei der Chondrogenese und der Osteoarthritis

Der Notch-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle bei der embryonalen Entwicklung unterschiedlicher Gewebe, und somit konnte auch sein Einfluss bei der Entwicklung des Gelenkknorpels beobachtet werden. Hayes *et al.*, untersuchten 2003 die Expression der Notch-Rezeptoren sowie deren Liganden während der murinen Gelenkknorpel-Entwicklung als auch in der Wachstumsfuge. Sie fanden heraus, dass Notch-1 während der Entwicklung in der Knorpeloberfläche exprimiert wird, während die postnatale Expression auf die tieferen Zonen des Knorpels begrenzt ist. Die Expression von Notch-2 und 4 sowie Delta und Jagged-2 ist während der Entwicklung homogen im Knorpel verteilt und verlagert sich im Alter ebenfalls auf die tiefer liegenden Regionen. Notch-3 und Jagged-1 werden bei der Knorpelentwicklung überhaupt nicht exprimiert, nur postnatal ist eine Expression in den tiefer gelegenen Knorpelzonen detektierbar. In der Wachstumsfuge konnten alle Rezeptoren als auch die Liganden in den hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden. Hayes *et al.*, (2003) schlussfolgerten daraus, dass der Notch-Signalweg während der Embryonalentwicklung des Knorpels sowohl bei der Differenzierung als auch bei der Proliferation beteiligt ist und postnatal sowohl die Reifung der Chondrozyten als auch die terminale Differenzierung in den tiefer gelegenen Knorpelzonen reguliert.

Eine weitere Studie an humanen mesenchymalen Stammzellen zeigte während der chondrogenen Differenzierung, dass eine Überexpression des Notch-Liganden Jagged-1 die

## EINLEITUNG

Chondrogenese hemmt und den Stammzellphänotyp aufrecht erhält (Oldershaw *et al.*, 2008). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des Notch-Signalwegs für die ersten 14 Tage als auch für die ersten 5 Tage die Chondrogenese der hMSCs hemmt, wohingegen eine Blockade des Notch-Signalwegs zwischen Tag 5 und 14 keinen Einfluss auf die Chondrogenese hatte. Somit ist ein An- und Abschalten des Signalwegs essentiell für die korrekte chondrogene Differenzierung von MSCs zu Knorpel. Im adulten, gesunden humanem Knorpelgewebe wurde die Expression von Notch-1 und Delta-like 1 in der Oberflächenzone, und bei Notch-1 zusätzlich noch in der tiefen Knorpelzone nachgewiesen. Die immunhistochemische Färbung von Notch-2 wurde in allen Zonen beobachtet, während Jagged-1 lediglich in den tiefen Zonen nachgewiesen werden konnte. Die Expression von Notch-3, Notch-4 sowie Jagged-2 konnte in keiner der Knorpelzonen nachgewiesen werden. Bei Notch-1, Delta-like 1 und Jagged-1 wurde die Expression überwiegend in den Koloniebildenden Chondrozyten identifiziert (Ustunel *et al.*, 2008). Da in der Oberflächenregion des Knorpels eine Subpopulation von chondrogenen Vorläuferzellen vermutet wird, welche für die Klonalität der Chondrozyten sorgen soll, wird die Funktion des Notch-Signalwegs mit der Proliferation dieser Vorläuferzellen in Verbindung gebracht (Alsalameh *et al.*, 2004; Dowthwaite *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010). Bei der OA verändern sich die Chondrozyten und verlieren ihren ausdifferenzierten Phänotyp, wodurch es zur Expression von unnatürlichen Proteinen der Knorpelmatrix kommt. Hinter dieser Fehlfunktion wird ein fehlerhafter Reparaturprozess, ausgelöst von den dedifferenzierten Chondrozyten vermutet. Bei Expressionsuntersuchungen der Notch-Mitglieder in gesundem und OA Knorpel aus unterschiedlichen pathologischen Stadien zeigte sich, dass sich die Zunahme der Notch-Mitglieder Expression generell proportional zum Schweregrad der OA verhält. Im Gegensatz zu der Studie von Ustunel *et al.*, (2008) konnte die Expression der Notch-Mitglieder als auch deren Liganden nicht im gesunden Knorpel identifiziert werden, wohingegen mit gesteigertem Schweregrad der Erkrankung sich die Expression intensivierte. Hierbei waren die Notch-Mitglieder im frühen OA Stadium an der Oberfläche lokalisiert und im späten Stadium verteilte sich die Expression auf die tiefer gelegenen Regionen (Mahjoub *et al.*, 2012).

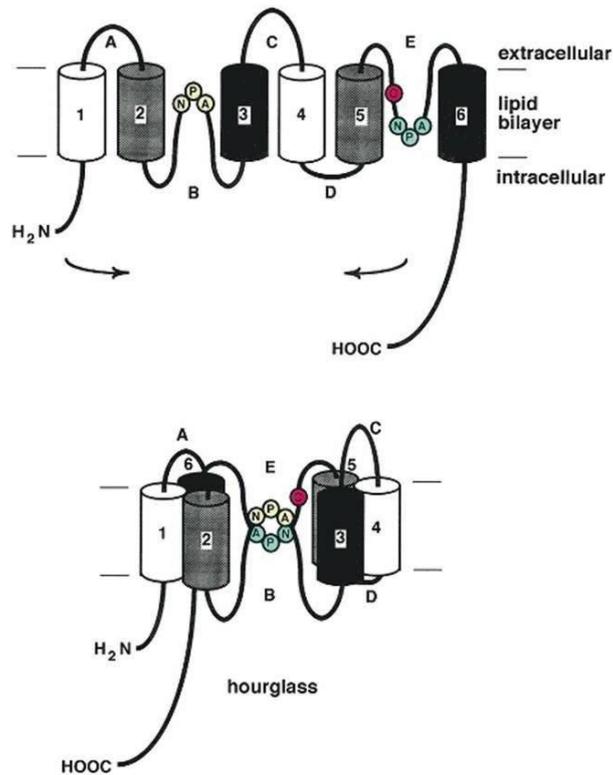
### 1.4 Aquaporin 1

Aquaporine sind transmembrane Wasserkanäle, die ubiquitär verbreitet sind und sowohl in Pflanzen, Mikroorganismen, Invertebraten und Vertebraten vorkommen (Agre *et al.*, 2002). Ihre Funktion besteht darin, effektiv die Wassermoleküle entlang des osmotischen Gradienten durch die Lipiddoppelschicht zu leiten, ohne den Protonengradienten zu zerstören. 13 humane Aquaporine konnten bislang identifiziert werden. Aquaporine werden in zwei Gruppen unterteilt. Bei der Gruppe der gewöhnlichen Aquaporine handelt es sich um Wasserkanäle, die spezifisch für Wassermoleküle permeabel sind, wohingegen die zweite Gruppe, die Aquaglyceroporine, Glycerin oder Harnstoff passieren lassen (Verkman, 2005; Hagiwara *et al.*, 2013).

#### 1.4.1 Struktur

Alle Aquaporine weisen eine ähnliche Struktur auf. Anhand von Röntgenstrukturanalysen konnten ca. 30 kDa schwere Monomere identifiziert werden, welche aus 6 Membran durchspannenden  $\alpha$ -helicalen Domänen bestehen und über fünf Schleifen (*Loops*) verbunden sind (A bis E). Vier Aquaporin-Monomere liegen immer als Homotetramer in der Zellmembran vor (Jung *et al.*, 1994). Das am besten untersuchte und als erstes entdeckte Aquaporin ist Aquaporin 1 (AQP1) (Preston und Agre, 1991). AQP1 ist ein wasserselektives, 269 Aminosäuren langes Protein, welches bis zu 3 Milliarden Wassermoleküle pro Sekunde passieren lässt (Zeidel *et al.*, 1992). Die Wasserselektivität des AQP1 wird durch ein spezielles Strukturmotiv in den Schleifen B und E verursacht, welches aus den Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin, auch NPA-Motiv genannt, besteht (Abb. 4). Diese Konstellation bildet die eigentliche Pore des Aquaporins und ist mit 3 Å die engste Stelle des Wasserkanals (Sanduhrmodell; *Hour Glass*) (de Groot und Grubmüller, 2001; de Groot *et al.*, 2003). Das Molekulargewicht der AQP1 Monomere beträgt nicht-glykosyliert 28 kDa und glykosyliert zwischen 40-60 kDa (Borgnia *et al.*, 1999). Aquaporine arbeiten bidirektional und ohne Aufwendung von Energie. Aquaporin 1 kann durch Quecksilber-, Gold- oder Silberionen gehemmt werden, indem diese an ein Cystein, welches im Poreneingang lokalisiert ist, binden und den Wasserfluss blockieren (Seeliger *et al.*, 2013).

## EINLEITUNG



**Abb. 4:** Graphische Darstellung der strukturellen Anordnung von AQP1. Die Schleifen B und E, welche das konservierte NPA Motiv (Asparagin-Prolin-Alanin) enthalten, bilden den eigentlichen Wasserkanal. Bildquelle: Jung *et al.*, 1994.

### 1.4.2 Lokalisation

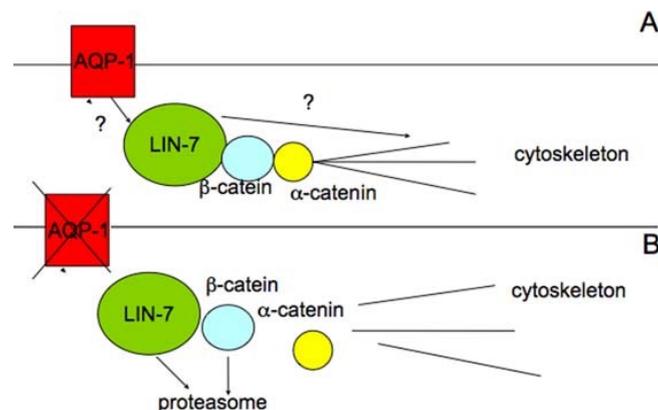
AQP1 wurde als erstes Aquaporin in den Erythrozyten entdeckt und später in den Epithelzellschichten nahezu aller Gewebe sowie in vielen Endothelzellschichten lokalisiert. Die Verteilung und die relative Expression im gesunden humanen Gewebe wurde 2003 mittels *Tissue Microarray* (TMA) Technologie von Mobasheri und Marples untersucht. Sie analysierten 66 unterschiedliche Gewebe des menschlichen Körpers und konnten zeigen, dass AQP1 unter anderem sehr stark im Nierenkortex und im hepatobiliären System exprimiert wird. Eine eher moderate Expression konnte im Hippocampus und den ependymalen Zellen des ZNS sowie in der Lunge, Blase, im Brustepithel, Synovium und Gelenkknorpel nachgewiesen werden. In fetalen Membranen, im Nebenhoden und im lymphatischen Epithel des Herzens konnte nur eine geringe Expression im Vergleich zu den anderen Geweben nachgewiesen werden.

### 1.4.3 Funktion von AQP1

Aquaporine spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten. AQP1 Knockout-Mäuse zeigten eine gestörte Absorption von Wasser in den Nierentubuli, was letztendlich zu einem Defekt bei der Urinkonzentrierung führte (Schnermann *et al.*, 1998). 2005 konnte ein Zusammenhang zwischen der AQP1 Expression und dem Migrationsverhalten von Endothelzellen in Mäusen nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die Endothelzellen von AQP1 Knockout-Mäusen ein reduziertes Migrationsverhalten, was eine Beeinträchtigung der Tumorangiogenese zur Folge hatte (Saadoun, Papadopoulos, Hara-Chikuma, und Verkman, 2005a). Basierend auf Zellmigrationsversuchen wurde der Prozess der Migration in die vier Phasen Polarisierung, Protrusion, Traktion und Retraktion unterteilt. Bei der Fortbewegung kommt es zur Ausbildung einer Ausstülpung am Leitsaum (Protrusion) in Bewegungsrichtung und zur Retraktion am hinteren Ende. Die Depolymerisierung der Aktinfilamente sowie der Einstrom von Ionen führt zur Erhöhung der zytoplasmatischen Osmolarität am Leitsaum der Zellen und somit zum Einstrom von Wasser durch die Plasmamembran (Saadoun, Papadopoulos, Hara-Chikuma, und Verkman, 2005b). Da eine erhöhte Expression von AQP1 am Leitsaum migrierender Zellen nachgewiesen wurde geht man davon aus, dass AQP1 beim Umbau der Zellmembran für die Ausstülpung und somit bei der Ausbildung des Lamellipodiums eine Rolle spielt. Man vermutet, dass es durch den Wassereinstrom zu einer Erhöhung des hydrostatischen Drucks und somit zur Vergrößerung der Plasmamembran kommt. Durch die Vergrößerung der Plasmamembran werden die Aktinfilamente verlängert und die Protrusion stabilisiert (Verkman, 2008). Für die Organisation des Zytoskeletts werden Gerüstproteine benötigt, welche eine plasmamembran-assoziierte PDZ-Domäne enthalten, die als Bindeglied zwischen unterschiedlichen Proteinen fungiert (Craven und Bredt, 1998). Ein Gerüstkomplex, welcher vermehrt in Epithelzellen und Neuronen vorkommt, ist der heterotrimere CASK/LIN-2, LIN-7 und LIN-10 Komplex (Cohen *et al.*, 1998; Butz *et al.*, 1998; Kaech *et al.*, 1998; Borg *et al.*, 1998). In Säugetierzellen ist LIN-7 verantwortlich für die Rekrutierung von Zelladhäsionsmolekülen, Rezeptoren und Signalproteinen, wohingegen LIN-2 Bindestellen für Proteine des Zytoskeletts besitzt (Cohen *et al.*, 1998). In der Arbeit von Monzani von 2009 konnte eine Co-Immunopräzipitation von LIN-7 mit AQP1 nachgewiesen werden. Der Knockdown von AQP1 in humanen Endothelzellen sowie in einer humanen Melanomzelllinie führte zur Repression von LIN-7 und  $\beta$ -Catenin.  $\beta$ -Catenin schafft eine Verbindung zwischen LIN-7 und dem Zytoskelett über das  $\alpha$ -Catenin (Abb. 5). Der Knockdown der AQP1 Expression in den oben genannten Zellen führte somit zu einer fehlerhaften Organisation von F-Aktin über den LIN-7/ $\beta$ -Catenin Komplex (Monzani *et al.*, 2009).

## EINLEITUNG

Die Expression von AQP1 konnte auch in murinen Chondrozyten nachgewiesen werden, wo der Wasserkanal ebenfalls einen Einfluss auf die Migration, aber auch auf die Adhäsion der Zellen in der Kultur hatte. Die Chondrozyten aus AQP1 Knockout-Mäusen zeigten eine um die Hälfte reduzierte Migrationsrate im Vergleich zu den Chondrozyten aus Wildtyp-Mäusen. Zusätzlich konnte eine reduzierte Zelladhäsion von AQP1 Knockdown-Chondrozyten gegenüber Kollagen II nachgewiesen werden (Liang *et al.*, 2008).



**Abb. 5:** Hypothetische Interaktion zwischen AQP1 und dem Zytoskelett. A) Interaktion zwischen AQP1 und LIN-7 und lokale Organisation des Zytoskeletts über den LIN-7/β-Catenin/α-Catenin-Komplex. B) Das Fehlen von AQP1 führt zur Destabilisierung des AQP1 vermittelten LIN-7/β-Catenin/α-Catenin-Komplexes und somit zur Re-organisation des Zytoskeletts und folglich zu einem reduzierten Migrationsverhalten. Bildquelle: Monzani *et al.*, 2009.

### 1.4.4 AQP1 in der Osteoarthritis

Eine fehlerhafte Expression von Aquaporinen führt zu Krankheiten wie beispielsweise Diabetes insipidus und der kongenitalen Katarakt (King *et al.*, 2001). Aber auch ein Zusammenhang zwischen der Expression von Aquaporinen und osteoartikulären Erkrankungen konnte beobachtet werden. 2004 wurde die Proteinexpression von AQP1 in humanem, normalem, osteoarthrotischem sowie rheumatoid arthritischem Gewebe untersucht. Hierbei zeigte sich, dass AQP1 in den Chondrozyten, den synovialen Mikrogefäßen sowie den Synoviozyten exprimiert wird. Im Knorpel konnte die AQP1 Expression vor allem in den tiefer gelegenen Zonen nachgewiesen werden. Während keine Expressionsunterschiede zwischen dem normalem und dem OA Knorpel ermittelt werden konnten, war die Expression im RA Knorpel erhöht (Trujillo *et al.*, 2004). 2007 wurde die mRNA Expression von AQP1 und AQP3 in normalem und OA Kiefergelenksknorpel von Ratten untersucht. Hier konnte kein Unterschied der AQP1 mRNA Expression zwischen normalem und OA Knorpel nachgewiesen werden, wohingegen die mRNA Expression von AQP3 im OA Knorpel signifikant erhöht war. Im normalen Knorpel war die Proteinexpression

## EINLEITUNG

von AQP3 in der Oberflächzone lokalisiert, wohingegen sich die Expression im OA Frühstadium auf die mittlere und im späteren Verlauf auf die tiefe Zone verlagert hatte (Meng *et al.*, 2007). In einer Studie von Geyer *et al.*, von 2009 wurden mRNA Expressionsunterschiede zwischen stärker geschädigten und weniger geschädigten Arealen in humanem OA Knorpel untersucht. Neben fünf weiteren Proteinen konnte auch eine erhöhte Expression von AQP1 in den stärker geschädigten Arealen nachgewiesen werden. Dieser Expressionsunterschied wurde auch auf Proteinebene bestätigt, wobei im Gegensatz zu vorangegangenen Studien die AQP1 Expression in der Oberflächzone und dort vor allem in den stärker geschädigten Arealen lokalisiert wurde (Geyer *et al.*, 2009). Anhand der Ergebnisse wurde geschlossen, dass AQP1 zu den OA-typischen Veränderungen der wasserabhängigen Homöostase der Zellen bzw. der EZM führt.

### 1.5 Fragestellung

Um die pathogen veränderte Molekularbiologie des osteoarthrotischen Knorpelgewebes besser verstehen zu können, wurden basierend auf der vorhergehenden Genexpressionsanalyse von Geyer *et al.*, (2009), bei der in makroskopisch lädierten Bereichen des osteoarthrotischen humanen Kniegelenksknorpels neben vier weiteren Genen (IGFBP-3, DAF, CIF, WISP-1) der Wasserkanal AQP1 und der Notch-Rezeptor-Ligand DNER in den makroskopisch lädierten Arealen als überexprimiert nachgewiesen wurden, folgende Analysen durchgeführt:

- Überexpression von AQP1 in kultivierten humanen osteoarthrotischen Chondrozyten und Analyse von knorpelspezifischen Stoffwechselfparametern, Transkriptionsfaktoren und Gerüstproteinen
- Untersuchung der Expression des DNER-Proteins in makroskopisch intakten und lädierten humanen OA Knorpelarealen
- Knockdown und Überexpression von DNER in kultivierten humanen osteoarthrotischen und gesunden Chondrozyten und Analyse von knorpelspezifischen Stoffwechselfparametern, Transkriptionsfaktoren und Mitgliedern des Notch-Signalwegs
- Untersuchung des Einflusses von DNER auf die *in vitro* Chondrogenese durch die Überexpression von DNER in humanen mesenchymalen Stammzellen und die Analyse von Stoffwechselfparametern, Transkriptionsfaktoren und Mitgliedern des Notch-Signalwegs auf RNA- und Proteinebene

## 2. MATERIAL

### 2.1 Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden und Klonierungsprodukten wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  (Genotyp: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 endA1 recA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>,m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 gyrA96(Nal<sup>r</sup> relA1  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169) verwendet. Der DH5 $\alpha$  Stamm (Raleigh *et al.*, 1989) wurde als Schenkung von der Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Die chemische Kompetenz erhielten die Zellen durch die Behandlung mit entsprechenden Puffern (3.1.1). Kommerzielle, chemisch kompetente DH5 $\alpha$  Bakterien wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific in Waltham (USA) (One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ <sup>™</sup>-T1R) bezogen.

### 2.2 Chemikalien

**Tab. 2:** Verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis-Lösung (40%)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agar	Difco Laboratories GmbH, Heidelberg
Agarose High Resolution	Roth, Karlsruhe
Alcianblau	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AMV-Puffer 5x	Promega, Mannheim
Antibiotisch-antimykotische Lösung (Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Aquatex <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entellan <sup>®</sup>	Merck Millipore, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe

## MATERIAL

FCS (fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hank´s Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ladepuffer 6x, blau-orange	Promega, Mannheim
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mangan(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver, fettarm	Roth, Karlsruhe
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Nonidet P 40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NuPAGE® Transferpuffer 20x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TissueTek®	Sakura Finetek, Heppenheim
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PCR Nukleotid Mix	Roche, Mannheim
Probenpuffer 5x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Probenpuffer 6x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette (Complete Mini)	Roche, Mannheim
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
RT-PCR <i>Grade Water</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Safranin-O	Roth, Karlsruhe
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## MATERIAL

Natriumsulfat)	
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth, Karlsruhe
TGF-β3	Lonza Cologne GmbH, Köln
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

## 2.3 Materialien

**Tab. 3:** Verwendete Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
Blotpapier, extra dick	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Light Cycler Kapillaren (20 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroliter-Pipette	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Objektträger mit Kammern ( <i>Lab-Tek II Chamber Slide</i> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger (Superfrost® Plus)	Menzel Gläser, Braunschweig
Pipettenspitzen	Corning B.V. Life Sciences, Niederlande
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße für PCR (Multi® - UltraStripes)	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Sterilfilter (0,2 µm Filter, nicht-Proteinbindend, PF, blau)	Corning B.V. Life Sciences, Niederlande
Transfermembran (Immobilon-P® PVDF)	Merck Millipore, Darmstadt
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten Polystyrol (6well, 96well)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten Polypropylen (96well, V-Boden)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschale (Cellstar® 100 x 20 mm)	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zellsieb 70 µm	BD Bioscience, Heidelberg

## MATERIAL

### 2.4 Bakterienkultur

**Tab. 4:** Verwendete Medien für die Kultivierung, Transformation und Aufbewahrung von *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Bezeichnung	Zusammensetzung
Luria Broth (LB) Medium + Ampicillin	0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Trypton, 0,05% (w/v) NaCl, autoklavieren, $\pm$ 100 $\mu$ g/ml Ampicillin
Super Optimal Broth Medium (SOB)	0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 0,058% (w/v) NaCl in dH <sub>2</sub> O lösen, autoklavieren, 0,12% (w/v) MgSO <sub>4</sub> , 0,095% (w/v) MgCl <sub>2</sub>
LBamp Platten	LB Medium, 1,5% (w/v) Agar
Glycerin-Dauerkultur	400 $\mu$ l 50% (v/v) Glycerin, 600 $\mu$ l Flüssigkultur

### 2.5 Zellkulturmedien

**Tab. 5:** Verwendete Zellkulturmedien. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Bezeichnung	Hersteller
DMEM ( <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i> ), 1g/l Glukose, L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ham's F12, L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
MSCGM (Mesenchymal Stem Cell Growth Medium) - Wachstumsmedium	Lonza Cologne GmbH, Köln
MSC Differenzierungsmedium (Chondrogenese)	Lonza Cologne GmbH, Köln
CBM-Medium ( <i>chondrocyte basal medium</i> ) - Wachstumsmedium	Lonza Cologne GmbH, Köln

Mediensupplementierungen	
DMEM/Ham's F12 (hCH Wachstumsmedium)	Serumfrei oder mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% (v/v) antibiotisch-antimykotische Lösung, 1% (v/v) HEPES, Lagerung bei 4°C
Ham's F12	Serumfrei oder mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, antibiotisch-antimykotische Lösung, 1% (v/v) HEPES, Lagerung bei 4°C

## MATERIAL

MSCGM ( <i>Mesenchymal Stem Cell Growth Medium</i> )	Die Medienzusätze waren in der Lieferung enthalten: 10% (v/v) <i>mesenchymal stem cell growth supplement</i> , 2% (v/v) L-Glutamin, 0,1% (v/v) GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B)
MSC Differenzierungsmedium (Chondrogenese)	1% (v/v) ITS (Insulin, Transferrin, Selenium) + <i>supplement</i> , 1% Ascorbinsäure, 1% (v/v) Pyruvat, 1% (v/v) Prolin, 0,5% (v/v) Dexamethason, 2% (v/v) L-Glutamin, 0,1% (v/v) GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B), 0,01 µg/ml TGF-β3
CBM-Medium ( <i>Chondrocyte Basal Medium</i> )	5% (v/v) FBS, 0,2% (v/v) R <sup>3</sup> -IGF-1 ( <i>insulin growth factor</i> ), 0,5% (v/v) bFGF ( <i>basic fibroblast growth factor</i> ), 0,1% (v/v) Transferrin, 0,2% (v/v) Insulin, 0,1% (v/v) GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B)

## 2.6 Lösungen und Puffer

**Tab. 6:** Verwendete Lösungen und Puffer. Die Lagerung erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Chondrozytenisolierung aus Gewebe	
Pronase-Lösung	0,2% (w/v) Pronase in Ham's F12 mit 5% (v/v) FCS lösen; steril filtrieren; kurze Lagerung bei 4°C möglich
Kollagenase Typ 2-Lösung	200 U/ml Kollagenase Typ 2 (Worthington) in Ham's F12 mit 5% (v/v) FCS lösen; steril filtrieren; kurze Lagerung bei 4°C möglich
Chondrozytenpräparation vor Nukleofektion	
Pronase	Arbeitskonzentration: 1 mg/ml Pronase in DMEM/Ham's F12 (5% FCS); kurze Lagerung bei 4°C möglich
Kollagenase P-Lösung	Stammlösung: 1 mg/ml Kollagenase P in DMEM/Ham's F12 (5% FCS); Arbeitskonzentration: 0,18 U/mL; kurze Lagerung bei 4°C möglich
Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	
RF1-Lösung (für kompetente Zellen)	0,78% (w/v) RbCl <sub>2</sub> , 2,4% (w/v) MnCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 0,147% (w/v) Kaliumacetat, 0,07% (w/v) CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 1,63 M Glycerin; mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen; autoklavieren
RF2-Lösung (für kompetente Zellen)	0,03% (w/v) RbCl <sub>2</sub> , 0,015% (w/v) MOPS, 0,22% (w/v) CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 1,63 M Glycerin; mit NaOH auf pH 6,8 einstellen; autoklavieren

## MATERIAL

Histologische Färbungen	
Alcianblau	1% (w/v) Alcianblau in 3% Essigsäure
Eosin-Lösung	1% (w/v) Eosin in dH <sub>2</sub> O lösen, filtrieren und dunkel lagern; vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure
Fast-Green-Lösung	0,001% (w/v) Fast-Green in dH <sub>2</sub> O
Hämalaun	0,1% (w/v) Hämatoxylin, 0,02% (w/v) Natriumjodat, 5% (w/v) Kaliumaluminiumsulfat; vollständig in dH <sub>2</sub> O lösen; 5% (w/v) Chloralhydrat, 0,1% Ascorbinsäure; filtrieren, dunkel lagern
Milchpulverlösung (5%)	5% (w/v) Milchpulver gelöst in 1x PBS
Safranin-O-Lösung	1% (w/v) Safranin-O in dH <sub>2</sub> O
Weigert'sche-Lösung	Lösung A: 1% (w/v) Hämatoxylin in 95% (v/v) Ethanol Lösung B: 29% (w/v) Eisen-III-chlorid-Hexahydrate in dH <sub>2</sub> O lösen. Davon 4 ml in 95 ml dH <sub>2</sub> O geben und mit 1 mL konz. Salzsäure (≥ 32%, p.a. ISO) versetzen; Beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen und dunkel bis zu 4 Wochen lagern
Plasmid-Isolierung/Auftrennung	
Puffer P1	0,3% (w/v) Tris, 0,9% (w/v) Glucose, 0,3% (w/v) EDTA, 0,01% (w/v) RNase; Lagerung bei 4°C
Puffer P2	0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
Puffer P3	3M Kaliumacetat in 120 ml dH <sub>2</sub> O lösen, 23 ml Eisessig, ad 200 ml (pH 4,8 eingestellt); autoklavieren
TAE-Puffer 50x	121 g Tris, 28,6 ml Essigsäure, 50 ml 0,5 mM EDTA (pH8), ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
Western-Blot	
Elektrodenpuffer 10x	3% (w/v) Tris, 14,4% (w/v) Glycin, 1% (w/v) SDS; Lagerung bei 4°C
Gelpuffer (Trenngel)	1,5 M Tris, mit HCL pH 8,8 einstellen
Gelpuffer (Sammelgel)	1 M Tris mit HCL pH 6,8 einstellen
Lysepuffer	0,6% (w/v) Tris, 1% (v/v) Nonidet P 40 in dH <sub>2</sub> O lösen; pro 10 ml Lysepuffer eine Proteaseinhibitor-Tablette frisch zugeben; Lagerung bei 4°C
TBS-T-Puffer 1x	0,121% (w/v) Tris, 0,88% (w/v) NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20

## 2.7 Enzyme

**Tab. 7:** Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
Alkaline Phosphatase (10.000 Units/ml)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
AMV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
<i>EcoRI</i> Units	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Kollagenase P (1,5 U/mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kollagenase (Worthington 370 U/mg Lot: 42B13273)	Worthington Biochemical/CellSystems GmbH, Troisdorf
<i>KpnI</i> Units	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Pronase (7 Units/mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-Polymerase ( <i>Taq PCR Master Mix Kit</i> )	QIAGEN, Hilden
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
T4 DNA Ligase units	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>XhoI</i> units	New England BioLabs, Frankfurt/Main

## 2.8. Plasmide

**Tab. 8:** Kommerziell erworbene und eigens konstruierte Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
pGEM-T® Easy	3015 bp, T/A-Klonierungsvektor; <i>bla</i> , <i>lacZα</i>	Promega, Mannheim
pGEM-T® Easy + AQP1	TA-Klonierung des 810 bp humanen AQP1-Fragments in den 3015 bp pGEM-T® Easy Vektor	Dissertation Dr. Kramm (2014)
pAQP1	AQP1 exprimierendes Plasmid, Integration des humanen AQP1-Fragments in den pcDNA 3.1 (+) mittels <i>EcoRI</i> Restriktionsschnittstelle, 5428 bp, CMV Promotor, <i>bla</i> , <i>neo</i>	Vorliegende Arbeit
pDNER	DNER exprimierendes Plasmid, 7431bp, CMV Promotor, His-Tag (C-terminal), <i>bla</i>	QIAGEN, Hilden
pGFP	GFP exprimierendes Plasmid, Integration des GFP-Fragments in den pcDNA 3.1 (+) mittels <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i> Restriktionsschnittstellen, 6128bp, CMV Promotor, <i>bla</i> , <i>neo</i>	Vorliegende Arbeit

## 2.9 Marker

**Tab. 9:** Verwendete DNA- und Protein-Marker.

Bezeichnung	Hersteller
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker	Promega, Mannheim
50 bp Marker	Roth, Karlsruhe
100bp Marker	Roth, Karlsruhe
peqGOLD Protein Marker IV	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

## 2.10 Antikörper

**Tab. 10:** Primärantikörper für immunhisto- und immunzytochemische Färbungen (IHC und ICC) sowie Western-Blot Analysen (WB).

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
β-Aktin	Maus anti-human Monoklonal IgG	WB 1:200	Santa Cruz Biotechnologie, Texas, USA sc47778
Aquaporin 1	Maus anti-human Monoklonal IgG1	ICC 1:100	Abcam, Cambridge, UK Ab11023
Kollagen Typ I	Maus anti-human Monoklonal IgG1	IHC 1:4000	Acris Antibodies GmbH, Herford AM10043SU-N
Kollagen Typ X	Kaninchen anti-human Polyklonal IgG	IHC 1:500	Life Science Inc., Houston, USA A92156Hu01
Cyclophilin B	Kaninchen anti-human	WB 1:2000	Abcam, Cambridge, UK
DNER	Ziege anti-human Polyklonal IgG	IHC 1:4 ICC 1:3 WB 1:500	R&D Systems, Wiesbaden BAF3646
Sox9	Maus anti-human Monoklonal IgG2ak	IHC 1:1428	Abcam, Cambridge, UK Ab76997

## MATERIAL

**Tab. 11:** Sekundärantikörper für immunhisto- und immunzytochemische Färbungen (IHC und ICC) sowie Western-Blot Analysen (WB)

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) anti- mouse, -rabbit</i>	anti-Maus anti-Kaninchen	-	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
<i>Histofine Simple Stain MAX PO (G) anti-goat</i>	anti-Ziege	-	Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan
anti-Mouse Ig	Ziege anti-Maus	WB 1:1000	DAKO, Hamburg
anti-Goat Ig	Kaninchen anti-Ziege	WB 1:2000	DAKO, Hamburg
anti-Rabbit Ig	Ziege anti-Kaninchen	WB 1:5000	DAKO, Hamburg

**Tab. 12:** Verwendete Isotypkontrollen mit Verdünnung für die entsprechende Primärantikörperfärbung

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Goat IgG	DNER IHC 1:40 DNER ICC 1:30	R&D Systems, Wiesbaden AB-108-C
Mouse IgG1k	Collagen type I 1:4000 Aszit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen M1398
Mouse IgG1k	Aquaporin 1 1:25	BD Bioscience, Heidelberg 550878
Mouse IgG2ak	Sox9 1:350	BD Bioscience, Heidelberg 550339
Rabbit IgG	Collagen type X 1:500	Abcam, Cambridge, UK Ab125938

## 2.11 Molekularbiologische Kits

**Tab. 13:** Verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) <i>Substrate Kit</i>	Vector laboratories, Burlingame, USA
Amaxa™ <i>Human Chondrocyte Nucleofector Kit</i>	Lonza Cologne GmbH, Köln
Amaxa™ <i>Human Mesenchymal Stem Cell Nucleofector Kit</i>	Lonza Cologne GmbH, Köln
<i>BCA Protein Assay Kit</i> (Pierce®)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Flexi Tube Gene Solution for DNER-Kit + AllStars Negative Control siRNA</i>	QIAGEN, Hilden
<i>peqGold Plasmid Miniprep Kit</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick <i>Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNeasy Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNase-free DNase Set</i>	QIAGEN, Hilden
<i>RNAqueous®-Micro Kit</i>	Ambion®/ Life Technologies, Darmstadt
<i>SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Taq PCR Master Mix Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Absolute qPCR SYBR Green Capillary Mix</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
X-tremeGENE HP DNA <i>Transfection Reagent</i>	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.12 Oligonukleotide

Für das Designen der Oligonukleotide (Primer) wurden ca. 20 bp lange Nukleotidsequenzen des entsprechenden Gens entweder manuell oder mit Hilfe des Programms „Primer3“ ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/Primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/Primer3_www.cgi)) ausgewählt. Um die Primer auf Dimere und Sekundärstrukturen zu überprüfen, wurde das Programm „Beacon Designer“ (<http://www.premierbiosoft.com/qpcr>) verwendet. Die Spezifität der Primer-Hybridisierung wurde anhand des Programms „BLAST Search“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) untersucht. Synthetische Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und sind in Tabelle 14 mit Angaben zu ihrer Verwendung zusammengestellt. Die lyophilisierten Primer wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst (Konzentration: 100 pmol/μl).

MATERIAL

**Tab. 14:** Verwendete Primer mit optimierten Magnesiumchlorid-Konzentrationen und Hybridisierungstemperaturen. *Annealing*-Temperatur ( $T_a$ ), *forward* (for), *reverse* (rev).

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung	MgCl <sub>2</sub> [mM]	T <sub>m</sub> [°C]
h18s (for)	cggctaccacatccaagga	Amplifikation des humanen 18s Gens (Referenzgen), <i>real-time</i> PCR	3	50-60
h18s (rev)	gctggaattaccgcggtgc			
ADAMTS-4-LB28 (for)	tgtagaaatgtgtgtgtgct	Amplifikation des humanen ADAMTS-4 Gens, <i>real-time</i> PCR	4	55
ADAMTS-4-LB29 (rev)	ataatccctcactccctgaa			
ADAMTS-5-LB30 (for)	aagctttgtgtcacggtagg	Amplifikation des humanen ADAMTS-5 Gens, <i>real-time</i> PCR	4	53
ADAMTS-5-LB31 (rev)	tgaccccttaaatgtcctca			
Aggrekan-LB32 (for)	tcctcaccatcccctgcta	Amplifikation des humanen Aggrekan Gens, <i>real-time</i> PCR	4,5	57
Aggrekan-LB33 (rev)	gcagtgagacctgtcctga			
AQP1-LB44 (for)	ggtggggaacaaccagacg	Amplifikation des humanen Aquaporin 1 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	60
AQP1-LB45 (rev)	tacatgagggcacggaagatg			
AQP1-810-LB48 (for)	tcggcctctctgtagccctt	Amplifikation des 3' und des 5' Endes von <i>AQP1</i> (human) für die Sequenzierung		
AQP1-810-LB49 (rev)	aagcccagggcagaaccgat			
β-Catenin-LB62 (for)	cgacaccaagaagcagagat	Amplifikation des humanen β-Catenin Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
β-Catenin-LB63 (rev)	agcctttatcagaggccagt			
BST-2-KF (for)	cagaagggttcaggatgt	Amplifikation des humanen BST-2 Gens, <i>real-time</i> PCR	3,5	58
BST-2-KF (rev)	tgatctctccctcaagctcc			

MATERIAL

Coll1-LB1 (for)	caagatgtgccactctgact	Amplifikation des humanen Kollagen Typ I Gens, <i>real-time</i> PCR	3,5	53
Coll1-LB2 (rev)	agtctccatgttgcaaga			
Coll10-LB74 (for)	gcatgtgaaagggactcatg	Amplifikation des humanen Kollagen Typ X Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
Coll10-LB75 (rev)	ccacacctggctattttctg			
DNER-MG (for)	aaggctatgaaggccaact	Amplifikation des humanen DNER Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
DNER-MG (rev)	ctgagagcgaggcaggattt			
DNERopt-LB76 (for)	caagatcgactactgcatcc	Amplifikation der Codon-optimierten hDNER Sequenz, <i>real-time</i> PCR	4	55
DNERopt-LB77 (rev)	cacgtaacaggtgccattg			
Hes-1-LB68 (for)	aagtgtgctggggaagtacc	Amplifikation des humanen Hes-1 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
Hes-1-LB69 (rev)	ttgatctgggtcatgcagtt			
Hey-1-LB102 (for)	acgagaatggaaacttgagttc	Amplifikation des humanen Hey-1 Gens, <i>real-time</i> PCR	4,5	57
Hey-1-LB103 (rev)	aactccgatagccatagcaag			
Jagged-1-LB98 (for)	agtcactggcacggttag	Amplifikation des humanen Jagged-1 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
Jagged-1-LB99 (rev)	tcgctgtatctgtccacctg			
LIN-2-LB54 (for)	ctagccgctgtgtcaagtca	Amplifikation des humanen LIN-2 Gens, <i>real-time</i> PCR	4	55
LIN-2-LB55 (rev)	ttctccaatacctctttggc			
LIN-7-LB66 (for)	ttgcagctttgcagctagt	Amplifikation des humanen LIN-7 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
LIN-7-LB67 (rev)	ctccttctcccatcacat			

MATERIAL

MMP-9-LB24 (for)	cggaccaaggatacagttt	Amplifikation des humanen MMP-9 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	53
MMP-9-LB25 (rev)	cagtgaagcggtagataggg			
MMP-13-LB26 (for)	tctacacctacaccggcaaa	Amplifikation des humanen MMP-13 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	50
MMP-13-LB27 (rev)	ttagggttggggtcttcatc			
Notch-1 (for)	QuantiTect® Primer Assay Hs_Notch_1_1_SG	Amplifikation des humanen Notch-1 Gens, <i>real-time</i> PCR	3,5	60
Notch-1 (rev)	Cat. No.: QT00231056 QIAGEN, Hilden			
Notch-2-LB104 (for)	ccccattgtgactttccag	Amplifikation des humanen Notch-2 Gens, <i>real-time</i> PCR	4	58
Notch-2-LB105 (rev)	gagctacctgcccgtcctg			
pcDNA 3.1 (+) LB60 (for)	taatagcactcactataggg	Amplifikation der <i>multiple cloning site</i> von pcDNA 3.1 (+) – <i>forward</i> und <i>reverse</i> für die Sequenzierung		
pcDNA 3.1 (+) LB61 (rev)	tagaaggcacagtcgagg			
Sox9-LB34 (for)	acccgtctacacacagctca	Amplifikation des humanen Sox9 Gens, <i>real-time</i> PCR	4,5	53
Sox9-LB35 (rev)	aggggaattctggttgctct			
SPEN-LB90 (for)	gaggggacaacagtagcagcac	Amplifikation des humanen SPEN Gens, <i>real-time</i> PCR	4,5	57
SPEN-LB91 (rev)	atgctttgggtggagtccttt			
TIMP-3-LB58 (for)	cgtgtacctttcccattgtg	Amplifikation des humanen TIMP-3 Gens, <i>real-time</i> PCR	4	55
TIMP-3-LB59 (rev)	tccctcaaaaccagtgaca			
TRIM22-LB94 (for)	gggtggacgtgatgctgaa	Amplifikation des humanen TRIM22 Gens, <i>real-time</i> PCR	3	55
TRIM22-LB95 (rev)	tcactgtctctgatccacagaaata			

## MATERIAL

Für die cDNA-Synthese wurden *random* Primer p(DN)<sub>6</sub> der Firma Roche Diagnostics verwendet.

### 2.13 Geräte

**Tab. 15:** Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Amaya Nucleofector® II	Lonza Cologne GmbH, Köln
Biofuge primo R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Gelelektrophorese Apparatur horizontal	Bio-Rad Laboratories, München
Gelelektrophorese Apparatur vertikal ( <i>Mini-Protean® Tetra Cell</i> )	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubationsschüttler (Certomat® H)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kryostat (CM 3050S)	Leica Microsystems, Wetzlar
LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Light Cycler 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroskop (DM IRB)	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskopkamera (DC 200)	Leica Microsystems, Wetzlar
Multifuge 3 S-R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Photometer (NanoDrop®)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Röntgenfilmentwickler (Protec® Optimax®)	PROTEC Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
Thermocycler (GeneAMP PCR System 9700)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ThermoStat plus 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge (5417C)	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® SD (Semi-Dry Transfer Cell)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

## 2.14 Software

**Tab. 16:** Verwendete Software.

Software	Verwendungszweck	Hersteller
ApE (A plasmid Editor)	Analyse von Sequenzen, Klonierungssimulation, Konstruktion von Plasmidkarten	Biologylabs, Utah, USA
Beacon Designer™	Analyse von SYBR® Green Primern	Premier Biosoft, Palo Alto, USA
BLAST Search	<i>Alignment</i> von konstruierten DNA und Proteinsequenzen mit Sequenzen einer Datenbank	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Clone Manager	Analyse von Sequenzen, Klonierungssimulation, Konstruktion von Plasmidkarten	Scientific& Educational Software, Cary, USA
IM 1000	Bildverwaltungsprogramm	Leica Microsystems, Wetzlar
ImageJ	Bildverarbeitungsprogramm für die densitometrische Bestimmung und Bildanalyse	National Institute of Health, Bethesda, USA
Light Cycler Software 3.5	<i>Real-time</i> PCR Analyse	Roche Diagnostics, Mannheim
Magellan 5	Microtiterplattenreader Analysesoftware	Tecan, Crailsheim
ND-1000 V3.5.2	NanoDrop Analysesoftware	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Primer3 BioTools	Analyse von Primersequenzen	University of Massachusetts, USA

### 3. METHODEN

#### 3.1 Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$

Für die Aufnahme und anschließende Replikation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$  hergestellt. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium mit einer 5 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  in einem Verhältnis von 1:200 inokuliert. Es folgte die Inkubation bei 37°C und 150 rpm auf einem Bakterienerschüttler bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 erreichte. Die Kultur wurde anschließend in sterile 50 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen zu sedimentieren, folgte die Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 min und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und die Bakterien in 20 ml steriler RF1-Lösung resuspendiert. Es folgte eine Inkubation der Zellsuspension für 1-2 Stunden auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 4000 rpm für 15 min und 4°C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 2 ml steriler RF2-Lösung resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurden anschließend 100  $\mu$ L Aliquots hergestellt, welche vor der Lanzeitlagerung bei -80°C zunächst für 15 min auf Eis inkubiert wurden.

##### 3.1.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* DH5  $\alpha$  mussten Zell- und Zytoplasmamembran permeabilisiert werden. Hierfür wurden pro Ansatz 100  $\mu$ L der chemisch kompetenten Zellen (Punkt 3.1.1) für 5 min auf Eis aufgetaut. Es folgte die Zugabe von 0,5  $\mu$ g Plasmid-DNA (Punkt 3.3.1) oder 2-10  $\mu$ L eines Ligationsansatzes (Punkt 3.3.5). Das Zell/DNA-Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen permeabel für die Nukleinsäuren zu machen, erfolgte ein Hitzeschock von 45 s bei 42°C im Heizblock. Im Anschluss wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 900  $\mu$ L SOB- oder LB-Medium (Punkt 2.4) folgte eine Inkubation der Zellen für 1,5 Stunden auf einem Thermoschüttler bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur (RT) in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in 100  $\mu$ L SOB- bzw. LB-Medium resuspendiert. Die transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden auf LB-Platten mit dem Selektionsmarker Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die langfristige Lagerung der Klone wurde 24h nach der Inkubation eine Glycerin-Dauerkultur (Punkt 2.4) angelegt.

### 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Gewebeentnahme und Transport

Die Knorpelimplantate, welche für die Gewinnung von humanen Chondrozyten als auch für die immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden, stammten von Kniegelenkersatzoperationen. Bei den Patienten wurde eine Osteoarthritis im Endstadium diagnostiziert, während eine rheumatische Erkrankung der Gelenke ausgeschlossen werden konnte. Die Gewebe wurden von den orthopädischen Abteilungen der Universitätsklinik Gießen, des Markus-Krankenhauses Frankfurt am Main und der Universitätsklinik Regensburg zur Verfügung gestellt. Die Einverständniserklärungen der Patienten lagen vor. Die Gewebeentnahmen erfolgten mit Genehmigung der Ethikkommission der jeweiligen Klinik. Nach Entnahme der Gewebe wurden diese in ein steriles Gefäß überführt und in physiologischer Kochsalzlösung gelagert. Der Transport erfolgt in einer gekühlten Styroporkiste. Die Weiterverarbeitung der Gewebe erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von 2 bis max. 24 Stunden nach der Entnahme.

#### 3.2.2 Isolierung und Kultivierung humaner OA Chondrozyten

Für die Isolierung humaner OA Chondrozyten wurden makroskopisch intakte Knorpelareale mittels physiologischer Kochsalzlösung von Blutresten befreit. Anschließend wurde der intakte Knorpelbereich mit Hilfe eines Skalpell von der Knochenplatte präpariert und in 2 x 5 mm große Stücke geschnitten. Die Knorpelstücke wurden in HBSS gewaschen. Zum Verdau der extrazellulären Matrix wurden die Knorpelstücke für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln bei ca. 60 rpm in einer 1 mg/ml Pronaselösung (Punkt 2.6) inkubiert (1 g Knorpel in 10 ml Pronaselösung). Im Anschluss wurden die Knorpelstücke dreimal in HBSS gewaschen. Für eine vollständige Herauslösung der Chondrozyten aus der Knorpelmatrix erfolgte ein Kollagenase-Verdau über Nacht. Hierfür wurden pro Gramm Knorpel 10 ml einer 200 U/ml Kollagenase-Lösung (Punkt 2.6) hergestellt und die Gewebestücke für 16-18 Stunden bei 37°C, schüttelnd bei 60 rpm inkubiert. Um die Matrixreste zu entfernen, wurde die Zellsuspension über ein 70 µm Zellsieb gegeben und anschließend für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in einem adäquaten Volumen an hCH Wachstumsmedium (Punkt 2.5) resuspendiert. Die Chondrozyten wurden in einer Konzentration von ca. 40.000-50.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät und bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert. Zur Induktion der Kollagen Typ II Synthese in den Chondrozyten wurde das Medium mit 17,5 µg/ml einer sterilen Ascorbinsäure-Lösung

## METHODEN

versetzt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

### **3.2.3 Kultivierung von gesunden humanen Chondrozyten**

Die gesunden humanen Chondrozyten wurden von der Firma Lonza Cologne GmbH (Köln) bezogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte für 2 min bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden in vorgewärmtem CBM-Wachstumsmedium (2.5) aufgenommen und direkt auf die Zellkulturflaschen verteilt (10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>). Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Zur Induktion der Kollagen Typ II Synthese in den Chondrozyten wurde das Medium mit 17,5 µg/ml einer sterilen Ascorbinsäure-Lösung versetzt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

### **3.2.4 Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurden von der Firma Lonza Cologne GmbH (Köln) in Passage 2 eingefroren geliefert und entweder im flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt aufgetaut und kultiviert. Das Wachstumsmedium (MSCG-Medium) wurde vom Hersteller mitgeliefert und musste vor Gebrauch mit den entsprechenden Zusätzen (2.5) supplementiert werden. Das Auftauen der Zellen erfolgte für 1,5 min bei 37°C im Wasserbad. Im Anschluss wurden die Zellen direkt in 5 ml vortemperiertes Kultivierungsmedium überführt und bei 500 x g für 5 min und bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in MSCG-Medium aufgenommen und auf die Zellkulturflaschen verteilt (empfohlen: 5.000-6.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>). Pro cm<sup>2</sup> einer Zellkulturflasche erfolgte die Zugabe von 0,2 – 0,4 MSCG-Medium. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt.

### **3.2.5 Passagieren der Zellen**

Unter sterilen Bedingungen wurde das gesamte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 1 x PBS (hMSCs) oder 1 x HBSS (hCH) gewaschen. Das entsprechende Volumen an Trypsin/EDTA (3 ml pro 75 cm<sup>2</sup> - Zellkulturflasche) wurde auf den Zellen verteilt und diese für 5 - 8 min bei 37°C inkubiert. Wenn weniger als 90% der Zellen abgelöst waren, musste die Inkubationszeit um eine weitere Minute verlängert werden. Die Zellen sollten insgesamt nicht länger als 15 min mit Trypsin inkubieren. Nachdem sich alle Zellen abgelöst

## METHODEN

haben, wurde ein adäquates Volumen an vorgewärmten Medium (Verhältnis Trypsin/EDTA: Medium mindestens 1:1) dazugegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 600 x g und RT. Die Zellen wurden anschließend in einem entsprechenden Volumen von Kultivierungsmedium (hMSC: MSCG-Medium; OA hCH: hCH Wachstumsmedium; hCH: CBM-Wachstumsmedium) aufgenommen und auf die Zellkulturflaschen verteilt (hMSCs: 5.000-6.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>; OA hCH: 40.000-50.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>; hCH: 10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>). Die Inkubation erfolgt bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

### 3.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung erfolgte durch die Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen in einer Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 resuspendiert. Die toten Zellen nehmen aufgrund der geschädigten Zellmembran den blauen Farbstoff auf, wohingegen die lebenden Zellen unter dem Mikroskop farblos erscheinen.

Für die Zellzahlanalyse werden 10 µL einer Trypanblau/Zelllösung in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zählkammer besteht aus 4 Quadraten, welche nacheinander ausgezählt und anschließend gemittelt werden. Die Gesamtzellzahl wird durch folgende Formel berechnet:

Zellichte (Zellen/ml) = Mittelwert der Zellzahl aus den Quadraten x 2 x 10<sup>4</sup> x ml<sup>-1</sup>

### 3.2.7 Zellysate

Die Lyse von Zellen erfolgte durch die Zugabe von 50 -100 µL Lysepuffer (2.6; Tabelle 6) pro 6well. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturplatte abgelöst und das Lysat im Anschluss auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde i. d. R. nach dem Protokoll von Birnboim und Doly durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979). Zusätzlich wurden kommerzielle Kits zur Plasmidpräparation mit Aufreinigung über Silikat-Membran-Säulen verwendet. Bei einer anschließenden Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte die Isolierung mittels

## METHODEN

*peqGold Plasmid Miniprep Kit* (<30 µg). Bei der Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA (<500 µg) kam das QIAGEN Plasmid Maxi Kit zum Einsatz. Alle verwendeten Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA basieren auf dem Prinzip der alkalischen Lyse:

Eine 5 ml Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Klons wurde angezogen und am nächsten Tag in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Zellsuspension wurde bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) für 1 min und bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 µL P1-Puffer durch starkes Vortexen vollständig resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µL P2-Puffer und ein Durchmischen des Lysates durch vorsichtiges Invertieren (ca. 4 – 6 Mal). Im Anschluss folgte die schnelle Zugabe von P3-Puffer. Das Lysat wurde erneut vorsichtig invertiert. Nach anschließender Inkubation für 10 min auf Eis wurde das Lysat für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. 700 µL des klaren Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL Isopropanol versetzt. Das DNA/Isopropanol - Gemisch wurde für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert um die DNA zu fällen. Gewaschen wurde das daraus resultierende DNA Pellet durch die Zugabe von 500 µL 70% Ethanol. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C wurde das Ethanol verworfen und das Pellet für 30 min bei 37°C getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 30 µL dH<sub>2</sub>O aufgenommen und für 15 min bei RT schüttelnd inkubiert. Die Konzentration wurde durch die Absorptionmessung bei 260 nm anhand eines NanoDrop Lite Spektrometers der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bestimmt und die DNA anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.3.2 DNA-Verdau mittels Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA-Fragmenten oder Plasmiden wurde anhand von spezifischen Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese Enzyme sind bakteriellen Ursprungs und schneiden spezifische DNA-Sequenzen entweder glatt (*blunt ends*) oder versetzt (*sticky ends*). Die generelle Zusammensetzung des Restriktionsansatzes ist Tabelle 17 zu entnehmen.

**Tab. 17:** Standard Restriktionsansatz.

DNA	1-2 µg
Restriktionsenzym	0,5 µL
10x BSA	1,5 µL
10x Restriktionspuffer	1,5 µL
ad 15 µL mit dH <sub>2</sub> O	

## METHODEN

Die Inkubation wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Nach dem Restriktionsverdau kann eine Inaktivierung des Enzyms durch Hitze bei 60-80°C für 20 min in einem Heizblock oder über eine Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels Gelextraktion (Punkt 3.3.4) erfolgen.

Werden Plasmide mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten, entstehen zwei kompatible Enden die spontan miteinander re-ligieren können. Um diese Zusammenlagerung zu vermeiden, wurden 0,5 µL einer alkalischen Phosphatase zum Restriktionsansatz hinzugegeben und die Plasmid-DNA somit dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase wurde im Anschluss durch die Auftrennung im Agarosegel inaktiviert.

### **3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente anhand ihrer molekularen Größe in einem 1-2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Für die Herstellung eines 1-2%igen (w/v) Agarosegels wurde die Agarose im Elektrophoresepuffer (TBE-Puffer) aufgekocht und das Gel mit Hilfe eines Gelschlittens und einem entsprechendem Kamm (10 oder 16 Geltaschen) gegossen. Zum Sichtbarmachen der Lauffront sowie zum Beschweren der Proben diente die Zugabe von 6x Probenpuffer zu den analysierenden Proben. Die konstant angelegte Spannung lag je nach Gelgröße zwischen 70-100 mV. Für den Nachweis der DNA-Banden wurde das Gel anschließend für ca. 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) inkubiert und mit Hilfe eines UV-Spektrometers analysiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte mit Hilfe von DNA-Markern (Tabelle 2.9)

### **3.3.4 Gelextraktion**

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten für nachfolgende Anwendungen wurden diese durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden) gemäß Herstellerangaben extrahiert:

Pro 100 mg Gel wurden 300 µL QG-Puffer hinzugegeben und die Proben für 10 min bei 50°C im Heizblock inkubiert. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose wurde die DNA auf eine Silikat-Membran Säule gegeben und durch die Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm und RT (Tischzentrifuge; Eppendorf) aufgereinigt. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 30 µl dH<sub>2</sub>O und der Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm bei RT. Die Konzentration der

## METHODEN

aufgereinigten DNA wurde durch die Absorptionsmessung bei 260 nm anhand eines NanoDrop Lite Spektrometers der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bestimmt.

### 3.3.5 Ligation

Bei einer Ligationsreaktion werden zwei DNA-Fragmente durch die enzymatische Katalyse einer Ligase verknüpft. Das Insert und der Vektor müssen zuvor durch entsprechende Restriktionsenzyme geschnitten werden (Punkt 3.3.2). Hierbei werden entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder versetzte Enden (*sticky ends*) generiert.

Bei einem standardisiertem Ligationsansatz (Tabelle 18) liegt das molare Verhältnis von Insert zu Vektor bei mindestens 3:1, wobei die eingesetzte Plasmid-DNA-Menge standardmäßig 50 ng beträgt. Der Insert-Anteil kann anschließend durch folgende Formel berechnet werden:

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} * \text{bp (Insert)}}{\text{bp (Vektor)}} = \frac{3}{2} = \text{Menge Insert [ng]}$$

**Tab. 18:** Komponenten eines standardisierten Ligationsansatzes.

Komponenten	Menge
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µL
Vektor DNA	50 ng
Insert DNA	Je nach Berechnung
T4 DNA Ligase	1 µL
nukleasefreies Wasser	ad 20 µL

Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte in einem Thermocycler über Nacht bei 16°C. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E. coli* DH5α transformiert (3.1.2).

### 3.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen von DNA-Fragmenten, wurde von der Firma GATC Biotech in Köln durchgeführt und beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977).

### 3.3.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Chondrozyten und hMSC-Pellets

Für die RNA-Isolierung aus humanen Chondrozyten wurde das *RNeasy Mini Kit* der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Zellen wurden zunächst mit HBSS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  RLT-Puffer pro *6well*, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurde das Lysat mit 400  $\mu\text{L}$  70% Ethanol versetzt und die Zellen mittels Zellschaber vollständig abgelöst. Das Lysat wurde auf eine Silikat-Membran-Säule gegeben, die selektiv RNA bindet und bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert (Tischzentrifuge; Eppendorf). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 350  $\mu\text{L}$  RW1-Puffer gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 15 s erfolgte die enzymatische Entfernung von DNA-Kontaminationen. Hierfür wurden 80  $\mu\text{L}$  einer DNase I Lösung (*RNase-free DNase Set*; QIAGEN) auf die Säule pipettiert und für 40 min bei RT inkubiert. Nach der DNase I Behandlung wurden 350  $\mu\text{L}$  RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben und die Probe bei 10.000 rpm für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500  $\mu\text{L}$  RPE-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die Probe anschließend für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule für eine weitere Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert um das Ethanol vollständig zu entfernen. Die Säule wurde anschließend auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und die RNA durch die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O eluiert. Der Ansatz wurde für 1 min inkubiert und anschließend für 2 min bei 8.000 rpm zentrifugiert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Absorptionsmessung im NanoDrop Lite Spektrometer. Die RNA-Proben wurden entweder bei -80 °C gelagert oder direkt durch die reverse Transkription in cDNA (Punkt 3.3.9) umgewandelt.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus den hMSC-Pellets wurde das *RNAqueous®-Micro Kit* der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.3.8 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch (Nanodrop Lite Spektrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durch das Messen der Absorption bei 260 nm ermittelt. Für eine OD<sub>260</sub> von 1 wurde für doppelsträngige DNA eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ , für RNA von 40  $\mu\text{g/ml}$  zugrunde gelegt. Die Reinheit der Nukleinsäure ließ sich aus dem Verhältnis der OD<sub>260</sub> zur OD<sub>280</sub> abschätzen. Bei reinen DNA-Lösungen liegt dieser Wert bei 1,8, bei reinen RNA-Lösungen bei 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989). Werte zwischen 1,8 und 2,2 wurden akzeptiert.

### 3.3.9 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurden 100-1000 ng RNA durch die Zugabe einer reversen Transkriptase in cDNA umgewandelt. Die generelle Zusammensetzung eines 50 µl Ansatzes ist Tabelle 19 zu entnehmen.

**Tab. 19:** 50 µl Ansatz einer reversen Transkription.

1x Ansatz	Menge
AMV Puffer (5x)	10 µL
dNTP-Mix	4 µL
AMV Polymerase	2 µL
RNase Inhibitor	1 µL
Hexamer Primer	1 µL
RNA	100-1000 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

Zunächst wurde 1 µL der Hexamer Primer, mit der RNA gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Reaktionsvolumen von 33 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für zwei Minuten bei 70°C im Thermocycler erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Die restlichen Komponenten wurden zu der jeweiligen Probe pipettiert. Die reverse Transkription fand in einem Thermocycler statt und wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

**Tab. 20:** Programm für die reverse Transkription

- 1) 25 °C, 15 min
- 2) 37 °C, 5 min
- 3) 42 °C, 60 min
- 4) 55 °C, 30 min
- 5) optional: 70 °C, 10 min

Bis zur Verwendung der cDNA wurde diese bei -20°C gelagert.

### 3.3.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die Amplifikation erfolgte durch eine hitzestabile Polymerase. Je nach Anwendung kamen verschiedene Polymerasen zum Einsatz. Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen wo keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proofreading* Aktivität) erforderlich war, wurde die Taq-Polymerase (*Taq PCR Master Mix Kit*, QIAGEN) verwendet. Die Synthesegeschwindigkeit der Taq-Polymerase beträgt 2-4 kb/min bei 72°C, und es wird ein zusätzliches dATP an das 3'-Ende des synthetisierten Strangs angehängt. Die generelle Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Ansatzes mit der Taq-Polymerase sowie das Amplifikationsprogramm sind den Tabellen 21 und 22 zu entnehmen.

**Tab. 21:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes bei Verwendung der Taq-Polymerase.

1x Ansatz	Menge
Taq PCR Master Mix (2x)	10 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
Matrize	variabel
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL

Bei einer PCR-Reaktion muss die *annealing*-Temperatur den Primern angepasst werden, wohingegen die Elongations-Dauer abhängig von der Syntheserate bzw. von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ist.

**Tab. 22:** Programm der PCR-Reaktion mittels Taq-Polymerase.

PCR Abschnitte	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	15-30 s	30-35x
Annealing	48-63 °C	15-60 s	
Elongation	72 °C	variabel	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1x
	4 °C	∞	1x

Zur Amplifikation von Zielgenen für anschließende Klonierungsversuche wurde die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase mit *proofreading* Aktivität verwendet. Diese Polymerase besitzt neben einer 5'-3'-Polymeraseaktivität zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch falsch eingesetzte Nukleotide erkannt werden können. Im Gegensatz zu Taq-Polymerase werden die Amplifikationsprodukte mit *blunt-ends* (glatten Enden) generiert. Die

## METHODEN

generelle Zusammensetzung eines 20 µl PCR-Ansatzes mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase sowie das Amplifikationsprogramm sind den Tabellen 23 und 24 zu entnehmen.

**Tab. 23:** Zusammensetzung eines PCR Ansatzes bei Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase.

1x Ansatz	Menge
Phusion HF Puffer (5x)	10 µL
10 mM dNTPs	1 µL
10 µM Primer	2,5 µL
Template	variabel
Phusion DNA-Polymerase	0,5 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

**Tab. 24:** Programm der PCR-Reaktion mittels Phusion-Polymerase.

PCR Abschnitte	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1x
Denaturierung	98 °C	10 s	35x
Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1x
	4 °C	∞	1x

Die PCR-Reaktionen erfolgten im Thermocycler der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

### 3.3.11 Semi-quantitative *real-time* PCR

Eine Methode zur Analyse der Transkriptmengen bestimmter Gene ist die semi-quantitative *real-time*-PCR. Bei der *real-time* PCR kann durch die Anlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffs an doppelsträngige DNA, die Amplifikationsreaktion während einer PCR-Reaktion in Echtzeit (*real-time*) dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet, welcher mit der neu entstandenen doppelsträngigen DNA interkaliert und somit bei jedem weiteren Zyklus die Fluoreszenzrate erhöht wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt somit proportional zur Anzahl der gebildeten Kopien des Zieltranskriptes zu, wodurch die relative Templatmenge berechnet werden kann. Die Messung wurde in einem Light Cycler der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt. Die Reaktion ist semi-quantitativ, da

## METHODEN

nicht die absolute DNA-Menge, sondern das Verhältnis zu einem konstitutiv und ubiquitär exprimierten Referenzgen (*housekeeping gene*) bestimmt wird. In der vorliegenden Arbeit diente die 18s ribosomale RNA als Referenzgen. Die x-fache Expressionsänderung der behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde mittels  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt. Um eine semi-quantitative Aussage über die Expression eines *gene of interest* (GOI) treffen zu können, müssen die Primer unter optimalen Bedingungen verwendet werden. Hierbei spielt nicht nur die *annealing*-Temperatur, sondern auch die  $MgCl_2$ -Konzentration im Ansatz eine wichtige Rolle (3.3.12).

**Tab. 25:** *Real-time* PCR Ansatz bei unterschiedlichen  $MgCl_2$ -Konzentrationen.

MgCl <sub>2</sub> -Konzentration im Reaktionsansatz	3 - 4,5 mM
Komponenten:	Volumen:
SYBR Green (mit 3 mM MgCl <sub>2</sub> )	10 µl
Primer <i>forward</i> (10 mM)	0,5 µl
Primer <i>reverse</i> (10 mM)	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM MgCl <sub>2</sub> )	0 – 1,2 µl
H <sub>2</sub> O	7 – 5,8 µl
cDNA	2 µl

Pro Light Cycler-Kapillare wurden 18 µL des jeweiligen Ansatzes vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µL der cDNA (Punkt 3.3.9). Für die Wasserkontrolle wurden anstelle der cDNA 2 µL nukleasefreies Wasser (Ambion®) zugegeben. Die Kapillaren wurden verschlossen, in das Light Cycler-Karussell transferiert und für einige Sekunden bei 3000 rpm in der Light Cycler-Zentrifuge zentrifugiert. Das Karussell wurde anschließend in den Light Cycler eingesetzt und das *real-time* PCR-Programm (Tabelle 26) gestartet:

**Tab. 26:** *Real-time* PCR-Programm mit dem Light Cycler der Firma Roche Diagnostics (Mannheim).

Temperatur	Dauer	PCR Abschnitte	Zyklenzahl
95°C	15 min	Initiale Denaturierung	1 Zyklus
95°C	15 s	Denaturierung	
x°C	25 s	<i>annealing</i>	35-55 Zyklen
72°C	30 s	Elongation/Fluoreszenz-Messung	

Um die Spezifität der Primer-Hybridisierung zu ermitteln, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden am Ende des *real-time* PCR-Programms die Proben von 50°C

## METHODEN

auf 99°C mit einer Geschwindigkeit von 0,1°C/s kontinuierlich erhitzt. Da jedes DNA-Fragment eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, konnte man anhand der entstandenen Schmelzkurve das spezifische Fragment von Dimeren oder Nebenprodukten unterscheiden. Zum Schluss wurde die Temperatur auf 40°C reduziert und das Programm beendet.

### 3.3.12 Effizienzoptimierung der Primer für die semi-quantitative *real-time* PCR

Bevor die Primer in einer *real time* PCR eingesetzt werden können, müssen optimale Bedingungen für die Reaktion geschaffen werden. Hierzu gehört zum einen die Ermittlung der spezifischen *annealing*-Temperatur, als auch die Ermittlung der optimalen Magnesiumchlorid-Ionen Konzentration. Durch das MgCl<sub>2</sub> wird die Primer/DNA-Bindung stabilisiert. Zusätzlich ist das MgCl<sub>2</sub> ein wichtiger Co-Faktor der Taq-Polymerase und sorgt für eine effiziente DNA-Synthese. Die optimale Konzentration liegt in der Regel zwischen 2,5 mM und 4,5 mM im Gesamtansatz. Für die Amplifikation des GOI wurden die Primer so designt, dass die Produktgröße zwischen 100 – 200 bp lag. Durch die Verwendung der Softwareprogramme Primer3, *Beacon designer* und *BLAST* (2.14; Tabelle 16) konnten sowohl Sekundärstrukturen und Dimerisierung weitestgehend ausgeschlossen, und die Spezifität der Primer ermittelt werden. Bei einer effizienten PCR-Reaktion verdoppelte sich die Produktmenge pro Zyklus ( $N(n) = N_0 \times 2^n$ ). Um diese Effizienz zu testen, wurde eine Standardkurve anhand einer Verdünnungsreihe der cDNA erstellt (1:2, 1:4, 1:8 und 1:16). Die daraus resultierende Steigung der Standardkurve wurde anschließend in die folgende Formel zur Effizienzberechnung eingesetzt:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Für eine optimale *Primer*-Effizienz muss der daraus resultierende Faktor bei  $2 \pm 0,5$  liegen.

### 3.3.13 RNA-Integritätsanalyse

Für die Verwendung von RNA in der *real-time* PCR oder in Microarray-Analysen ist es extrem wichtig, dass die RNA Proben nicht degradiert sind. Daher wurde die RNA-Integrität mit Hilfe des 2100 Bioanalyser der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) überprüft. Die Durchführung wurde vom Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik der Universität Regensburg vorgenommen.

## METHODEN

Die Bioanalyser-Methode beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und somit auf der ladungsabhängigen Trennung von RNA in einem elektrischen Feld. Bei dem 2100 Bioanalyzer werden die Proben mit einer gebrauchsfertigen Lösung versetzt und anschließend in Mikrokapillaren eines *chips* überführt. Die Mikrokapillaren bestehen aus Glas und sind mit einer Polymermatrix und einem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt. Neben den Proben wird ein Standard (RNA-Leiter) mitgeführt. Während der Analyse wird ein elektrisches Feld angelegt und die negativ geladene RNA aufgrund des konstanten Masse/Ladungs-Verhältnisse und der Polymermatrix der Größe nach aufgetrennt. Der Farbstoff interkaliert mit der RNA, und dieser Komplex kann mithilfe der laserinduzierten Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Visualisierung erfolgt zum einen anhand eines „virtuellen Gelbildes“ als auch in einem so genannten Elektropherogramm.

Zur Bestimmung der RNA-Integrität einer Probe wird das Verhältnis von 28s zu 18s rRNA ermittelt. Qualitativ hochwertige RNA besitzt je nach Gewebe ein 28s/18s-rRNA-Verhältnis von etwa 2:1. Neben diesem Verhältnis generiert die Software einen sogenannten RIN-Wert (*RNA integrity number*). Dieser Wert beruht auf der Abnahme des 28s/18s-rRNA-Verhältnisses sowie der Zunahme des Hintergrundsignals, welches durch die Degradation der RNA verursacht wird. Ein Wert von 10 repräsentiert eine intakte RNA, wohingegen ein Wert von 1 für eine komplett degradierte RNA mit schlechter Qualität steht.

### 3.3.14 Microarray Technologie

Bei der Microarray Technologie handelt es sich um ein Genchip-Verfahren, bei dem eine Vielzahl von Gensequenzen parallel identifiziert werden kann. Der Genchip oder Microarray besteht aus einem ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Trägermaterial (Glas oder Plastik), welches entweder mit einzelsträngigen DNA-Fragmenten oder Oligonukleotiden beschichtet ist. Die zu analysierende Probe wird in einer Prozedur aus mehreren Schritten Biotin-markiert und anschließend auf das Trägermaterial gegeben. Während einer Hybridisierungs-Reaktion bindet die markierte RNA komplementär an die Oligonukleotide des Microarrays. Die Visualisierung erfolgt anhand der Zugabe eines Streptavidin-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs, welcher durch die laserinduzierte Aktivierung gemessen werden kann.

Die Microarray-Analyse wurde von dem Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik der Universität Regensburg durchgeführt. Bei dem verwendeten GeneChip® handelt es sich um den PrimeView™ Human Gene Expression Array der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA), mit einem Erfassungsbereich des gesamten humanen Genoms. Er beinhaltet 530.000 Sonden mit über 36.000 Transkriptvarianten, welche insgesamt mehr als 20.000 Gene repräsentieren. Die mRNA Sequenzen des Microarrays stammen aus den Datenbanken

## METHODEN

UniGene database 219, RefSeq version 36 und GenBank®. Die einzusetzende RNA-Menge muss zwischen 50-500 ng betragen.

### 3.4 Immunologische Methoden

#### 3.4.1 Gewebepräparation für immunhistochemische Färbungen

Die Knochen-Knorpelplatten, welche aus den Kniegelenkersatzoperationen stammten, wurden unter sterilen Bedingungen makroskopisch in intakte und beschädigte Areale unterteilt. Hierbei wurde die Knorpeloberfläche zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung von Blutresten befreit und anschließend die Farbe als auch die Beschaffenheit der Knorpeloberfläche als Indikator für die Einteilung in „beschädigt“ und „weniger beschädigt“ bzw. „intakt“ verwendet. Glatter, weißlich gefärbter und elastischer Knorpel wurde als „intakt“ eingestuft. Ein Areal mit faseriger, zerklüfteter Oberfläche und gelblicher Verfärbung wurde als „beschädigt“ deklariert (Geyer *et al.*, 2009). Sowohl aus dem intakten als auch beschädigten Areal wurde jeweils ein ca. 2x3 mm<sup>2</sup> großes Stück Knorpel entnommen und in OCT TissueTek® eingebettet. Die Gewebestücke wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 Grad Celsius bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Analyse der hMSC-Pellets wurden diese mit 1x PBS gewaschen und vorsichtig mit saugfähigem Papier abgetupft um die überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Anschließend wurden sie direkt in dem OCT TissueTek® eingebettet und bei -80°C eingefroren.

#### 3.4.2 Gefrierschnitte

Aus in OCT TissueTek®-Einfriermedium eingebetteten Gewebestücken und hMSC-Pellets wurden mittels Kryostat 5 µm Gewebeschnitte angefertigt. Um die Gewebeschnitte auf dem Objektträger zu fixieren, wurden diese für ca. 10 min an der Luft getrocknet, und anschließend für weitere 10 min in eiskaltem Aceton inkubiert. Nach dem Verdampfen des Acetons (30 min, RT) wurden die Gewebeschnitte entweder direkt immunhistochemisch gefärbt oder für 2 Wochen bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.4.3 Herstellung der Antikörperlösungen

Für die immunhisto- und immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Primärantikörper mit 1x PBS verdünnt und die Gewebeschnitte bzw. die Zellen über Nacht bei 4°C in der Antikörperlösung inkubiert. Die Schnitte und Zellen für die DNER-

## METHODEN

Antikörperfärbung wurden für 3h mit dem Primärantikörper bei RT inkubiert und der Antikörper in 5% Milchpulverlösung (Punkt 2.6) gelöst.

### 3.4.4 Immunhistochemische Färbung von Geweben

Zur Analyse von humanem OA Knorpel und hMSC-Pellets wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Untersucht wurden spezifische Knorpelparameter und ausgewählte Proteinkandidaten. Hierfür wurden die Gefrierschnitte für 5 min in 1x PBS gewaschen und anschließend in einer 5%igen Milchpulverlösung (Punkt 2.6) für 1 Stunde bei RT und hoher Luftfeuchtigkeit (feuchte Kammer) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (2.10; Tabelle 10) für 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Als Isotypkontrolle dienten entsprechende IgG-Antikörper (2.9; Tabelle 12). Eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper sowie eine Reagenzkontrolle ohne Primär- und Sekundärantikörper wurden ebenfalls mitgeführt. Die Kontrollen wurden in separaten Küvetten behandelt, um eine falsch positive Färbung dieser zu vermeiden. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte für 5 min in 1x PBS gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidasen erfolgte durch die Inkubation in einer 0,3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung für 30 min bei 4°C. Nach dem erneuten Waschen in 1x PBS wurde *Histofine Simple Stain MAX PO* als Sekundärantikörper hinzugegeben und die Schnitte für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Gewebeschnitte in 1x PBS erfolgte die Zugabe des AEC-Substrats (Vector Laboratories). Die Detektionsreaktion wurde mikroskopisch beobachtet und je nach Farbentwicklung innerhalb von 20 min mit Leitungswasser abgestoppt. Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung erfolgte je nach Bedarf eine Kernfärbung mit Hämatoxylin. Für die Konservierung der Gewebeschnitte wurde Eindeckmedium auf Wasserbasis (Aquatex®) verwendet. Die Auswertung der Färbung erfolgte mikroskopisch.

### 3.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, welche der Differenzierung von Gewebestrukturen dient und anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen durchgeführt wird. Hämatoxylin färbt saure/basophile Strukturen wie beispielsweise DNA blau, während das Eosin basische Strukturen, wie Proteine des Zytoplasmas, aber auch Kollagene rötlich färbt.

Bevor die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt werden konnten, wurden sie für 5 min in 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 8 min in einer

## METHODEN

0,1%igen Hämatoxylin-Lösung. Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte für 8 Minuten in einer 1%igen Eosin-Lösung inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in 1x PBS erfolgte die Entwässerung der Gewebeschnitte durch die Inkubation für jeweils 5 Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 96% und 100%). Zum Klären wurden die Schnitte anschließend dreimal für 5 Minuten in Xylol inkubiert. Die Konservierung erfolgte durch das Eindecken mit Entellan® (Eindeckmedium auf Xylolbasis). Ausgewertet wurden die Gewebeschnitte anschließend mikroskopisch.

### **3.4.6 Safranin-O/Fast Green-Färbung**

Die Safranin-O/Fast Green-Färbung wird zur Darstellung von Knorpelgewebe verwendet und zeigt den Proteoglykangehalt der Matrix an. Die Proteoglykankonzentration wird absteigend von rot, orange über weiß dargestellt, während das Fehlen von Proteoglykanen durch eine Blaufärbung nachgewiesen werden kann.

Bei der Safranin-O/Fast Green Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst für 5 min in einer Weigert'schen Lösung und anschließend in einer 0,001% Fast Green Lösung inkubiert. Zwischen den Färbeschnitten wurde die überschüssige Farbe durch 3 maliges Waschen mit dH<sub>2</sub>O entfernt. Bevor die Gewebeschnitte für 10 min in einer 1%igen Safranin/O Lösung inkubiert wurden, musste der Rest der überschüssigen Farbe durch das Eintauchen der Schnitte für 15 s in 1%iger Essigsäure entfernt werden. Vor dem Eindecken wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 70%, 96% und 100%, für jeweils 5 min) entwässert. Zum Klären wurden die Schnitte anschließend dreimal für 5 Minuten in Xylol inkubiert. Um die Gewebeschnitte zu konservieren und mikroskopisch auswerten zu können wurden diese mit Entellan® eingedeckt.

### **3.4.7 Alcianblau-Färbung**

Die Alcianblau-Färbung ermöglicht eine Sichtbarmachung von Proteoglykanen im Knorpel. Die Färbemethode basiert auf der Fähigkeit des basischen Phtalocyaninfarbstoff eine elektrostatische Bindung mit den sauren Gruppen von Mucopolysacchariden (Seitenketten der Proteoglykane) einzugehen, die bei einem niedrigen pH-Wert (pH=2,5) negativ geladen sind.

In dieser Arbeit wurde zum Färben der Proteoglykane im Knorpel oder in den hMSC-Pellets ein pH-Wert von 2,5 verwendet. Dieser wurde durch die Inkubation der Gewebeschnitte für 3 min in Essigsäure eingestellt. Anschließend wurden die Schnitte mit einer 1%igen Alcianblau-Lösung in 3%iger Essigsäure für 30 min gefärbt. Nachfolgend wurden die

## METHODEN

Schnitte erneut für 3 min in 3%iger Essigsäure inkubiert, bevor sie mit dH<sub>2</sub>O gewaschen wurden. Nachdem die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96%, 100% für jeweils 5 min) entwässert und 3 mal für 5 min in Xylol geklärt wurden, erfolgte die Konservierung mittels des Eindeckmediums Entellan®.

### 3.4.8 TUNEL-Assay

Für den Nachweis apoptotischer Zellen in den hMSC-Pellets wurde das *Apoptosis-Detection Kit* (TACS\*XL *in situ* Kit; R&D Systems) verwendet, welches auf dem TUNEL-Assay Prinzip (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) basiert. Bei dem Verfahren wird durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) ein Bromdesoxyuridintriphosphat (BrdUTP) an das 3'OH Ende eines Nukleotidfragments eingebaut, welches durch den Bruch der DNA bei der Apoptose entsteht. Das eingebaute BrdU kann anschließend durch die Zugabe eines anti-BrdU Antikörpers, welcher eine Biotinmarkierung besitzt, gebunden werden. Als sekundärer Antikörper dient HRP-konjugiertes Streptavidin (HRP; engl. *horseradish peroxidase*). Der Nachweis des Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe des Detektionsreagenz *TACS Blue Label*.

Für den Nachweis der apoptotischen Zellen wurden die Gewebeschnitte zunächst für 10 min in 1x PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50 µL Cytonin für 15 min bei 37°C, um die Zellen permeabel für die Antikörper-Reaktion zu machen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für 2 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. An dieser Stelle erfolgte bei den Schnitten für die Positivkontrolle die Zugabe einer im Kit enthaltenen Nuklease-Lösung für 10 min, welche dem gewollten Abbau der DNA diente. Anschließend wurden alle Gewebeschnitte für 5 min in einer *Quenching Solution* inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu blockieren. Es folgte die Inkubation in 1x PBS für eine Minute. Für die Markierungsreaktion wurden die Schnitte zunächst für 5 min in *1x TdT Labeling Buffer* bei RT, und anschließend für 30 min mit 50 µl *Labeling Reaction Mix* bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe eines *1x TdT Stop Buffer* für 5 min. Die Schnitte wurden erneut zweimal für zwei Minuten in 1x PBS gewaschen bevor 50 µL des anti-BrdU-Antikörpers für 30 min hinzugegeben wurden. Vor der Inkubation von 50 µl *Streptavidin-HRP Solution* für 10 min wurden die Gewebeschnitte zweimal für zwei Minuten in 1x PBS gewaschen. Die Detektionsreaktion erfolgte durch die Inkubation der Schnitte in 50 µl *TACS Blue Label* für 5 min und das Waschen mit dH<sub>2</sub>O zweimal für zwei Minuten. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für 30 s – 5 min in *Nuclear Fast Red* inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 10x kurz in dH<sub>2</sub>O eingetaucht und dieser Vorgang einmal wiederholt. Zum Entwässern wurden die Schnitte zunächst 10 Mal kurz in 95% Ethanol und anschließend 10x in 100%

## METHODEN

Ethanol und zum Klären 20x in Xylol eingetaucht. Die Konservierung der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Eindeckmediums Entellan®. Die Schnitte wurden über Nacht im Dunkeln getrocknet.

### 3.4.9 Immunzytologische Färbung

Für die immunzytologische Färbung (ICC) wurden die Zellen auf Glas-Objektträgern mit aufgesetzten Kammern (Lab Tek II *chamber slides*) ausgesät und für 24 Stunden in Wachstumsmedium bei 37°C inkubiert. Am Tag der immunzytologischen Färbung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen in 1x PBS gewaschen und für 1-2 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Die Inkubation im serumfreien Medium sorgte dafür, dass unspezifische Signale durch die Anlagerung von Serumproteinen dezimiert wurden. Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen in -20°C kaltem Aceton für 10 min fixiert. Nach dem Verdampfen des Acetons erfolgte das erneute Waschen mit 1x PBS. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen für 1 Stunde in einer 5%igen Milchpulverlösung bei erhöhter Luftfeuchtigkeit (feuchte Kammer) inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte entweder für 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach einem erneuten Waschschrift von 5 min in 1x PBS erfolgte die Blockierung endogener Peroxidasen durch eine Inkubation für 30 min in einer 0,3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Lösung. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen für 30 min mit dem Sekundärantikörper (*Histofine Simple Stain MAX PO*) inkubiert. Es folgte das Waschen für 5 min in 1x PBS und die Zugabe des AEC-Substrats (Vector Laboratories). Die Detektionsreaktion wurde mikroskopisch beobachtet und je nach Farbentwicklung durch die Inkubation in 1x PBS für mindestens 5 min abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen entweder mit Hämalaun gefärbt (Kernfärbung) oder direkt mit Aquatex® eingedeckt.

### 3.4.10 Nachweis von apoptotischen und nekrotischen humanen Chondrozyten

Zum Nachweis apoptotischer humaner OA Chondrozyten wurde das *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Das Verfahren basiert auf den Eigenschaften von Annexin V und Propidiumiodid. Das mit einem Farbstoff gekoppelte Annexin V bindet calciumabhängig an das bei der Apoptose nach außen gestülpte Phosphatidylserin und ermöglicht somit den Nachweis nekrotischer und apoptotischer Zellen. Propidiumiodid besitzt fluoreszierende Eigenschaften und ist in der Lage, mit DNA zu interkalieren. Dies ermöglicht den Nachweis der DNA von permeabilisierten, nekrotischen Zellen.

Vor Versuchsbeginn wurde das Annexin-V-FLUOS Reagenz stets frisch, entsprechend den Herstellerangaben, angesetzt. Die Zellen wurden anschließend für 5 min in 1x PBS

## METHODEN

gewaschen und mit dem Annexin-V-FLUOS Reagenz versetzt. Direkt im Anschluss an die Reagenzzugabe wurde ein Deckglas auf die Zellen gelegt und diese für 10-15 min bei RT und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte anhand eines Fluoreszenz-Mikroskops. Für den Nachweis von Propidiumiodid wurde ein Wellenlängenbereich von 450-500 nm und für Annexin V von 515-565 nm eingestellt.

### 3.4.11 BCA-Proteinbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* (Pierce®) der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Durch die Bindung der Proteine mit dem BCA kommt es zur Farbreaktion, welche photometrisch bestimmt werden kann. Anhand einer BSA-Kalibriergerade im Bereich von 0 bis 2 mg/ml kann die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben unverdünnt bzw. in den Verdünnungen 1:2 und 1:5 eingesetzt. Die Probenverdünnungen als auch die Proben der BSA-Kalibriergeraden wurden auf eine 96well Mikrotiterplatte verteilt. Nach Zugabe von 200 µL BCA-Reagenz pro well erfolgte die Inkubation der Proben bei 37°C für 30 min. Nach einer weiteren Inkubation der Proben für ca. 15 min bei RT erfolgte die Absorptionsmessung bei 562 nm in einem Mikrotiterplatten-Reader (*Sunrise ELISA Reader*).

### 3.4.12 Western-Blot

Bei der Western-Blot Analyse werden die Proteine in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel entsprechend ihrer molekularen Masse unter Spannung aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran transferiert und immunologisch nachgewiesen. Zur Größenauffrennung wurde i. d. R. ein Trenngel mit einer Acrylamid-Konzentration von 10% (v/v) eingesetzt. Das Sammelgel war stets 4%ig (v/v). Die Zusammensetzung der Gellösungen sind Tabelle 27 zu entnehmen.

**Tab. 27:** Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

	5% Sammelgel	10% Trenngel
dH <sub>2</sub> O	2,7 ml	6,9 ml
Acrylamid/Bis-Lösung (40%)	0,67 ml	4 ml
1,5 M Tris pH 8,8		3,8 ml
1 M Tris pH 6,8	0,5 ml	
SDS (10% [w/v])	0,04	0,15
APS (10% w/v)	0,04	0,15
TEMED	0,004	0,009

## METHODEN

### Anfertigung der Proben

Die Zellysate (3.2.7) wurden mit 5x Probenpuffer (Punkt 2.2) ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und mit dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 40  $\mu$ l aufgefüllt und für 3 min bei 98°C erhitzt. Pro Geltasche lag eine Proteinkonzentration von 15  $\mu$ g vor.

### Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinproben erfolgte in einer Gelelektrophorese-Apparatur (*Mini-Protean® Tetra Cell*). für ca. 1,5 - 2 Stunden bei 130 V in 1x Elektrodenpuffer. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde der *peqGOLD* Protein Marker IV mitgeführt.

### Blotten

Der Proteintransfer vom Gel auf eine Immobilon-P® PVDF Transfermembran erfolgte mit Hilfe der Trans-Blot® SD-Apparatur (*Semi-Dry Transfer Cell*). Vor dem Transfer wurde die Membran für 10 s in Methanol und anschließend für 10 min im NuPage® Transferpuffer äquilibriert. Auch das Filterpapier wurde kurz in dem Transferpuffer getränkt. Im Anschluss wurde das Filterpapier auf die Elektrodenplatte der Trans-Blot® SD-Apparatur luftblasenfrei aufgelegt. Die Transfermembran wurde ebenfalls luftblasenfrei auf das Filterpapier transferiert und das Gel mit den Proben auf der Membran platziert. Abschließend wurde ein zweites mit Transferpuffer befeuchtetes Filterpapier oben aufgelegt. Die Trans-Blot® SD-Apparatur wurde verschlossen und die Proteine für 1,5 Stunden bei 80 mA auf die Membran transferiert. Bei zwei Membranen dauerte der Transfer 1,5h bei 120 mA.

### Immunreaktion

Vor der Immunreaktion mit dem Primärantikörper wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation der Membran in einer 5%igen, gefilterten Milchpulverlösung (Punkt 2.6) für 1,5 h bei RT geblockt. Der Antikörper wurde ebenfalls in der Milchpulverlösung verdünnt und im Anschluss auf die Membran gegeben. Die Antikörper-Reaktion erfolgte rotierend über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 15 min in 1x TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde rotierend bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 15 min in 1x TBS-T-Puffer gewaschen bevor das Ergebnis mittels Detektionsreaktion ermittelt werden konnte.

## METHODEN

Um eine semi-quantitative Aussage über die Proteinkonzentration treffen zu können, erfolgte der Nachweis einer Ladekontrolle. Als Ladekontrolle dienten Cyclophilin B und  $\beta$ -Aktin. Die zuvor verwendete Membran wurde hierfür mindestens eine Stunde in 1x TBS-T-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Immunreaktion wie oben beschrieben durchgeführt.

### Detektion

Der Protein-Nachweis erfolgte anhand des *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrat* Detektions-Kits der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Das Detektionsreagenz, welches aus den zwei Lösungen *SuperSignal® West Dura Luminol/Enhancer Solution* und *SuperSignal® West Dura Stable Peroxide Solution* besteht, wurde 1:1 vermischt und die Membran darin für 2 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Film-Kassette transferiert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Entwickelt wurde der Film in einem Röntgenfilmentwickler.

## **3.5 Transfektion von Primärzellen**

### **3.5.1 Transfektion von humanen Chondrozyten**

Um die transiente Expression eines bestimmten Gens mit Hilfe eines künstlichen Vektors zu erreichen, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Transfektions-Systeme untersucht. Zum einen wurde die Transfektion durch die Zugabe eines Lipidgemisches durchgeführt, welches die Fremd-DNA mit Hilfe der Endozytose in das Zytoplasma einschleusen kann. Diese Form der Transfektion wird auch als Lipofektion bezeichnet. Zum anderen wurde eine Methode der Firma Lonza Cologne GmbH verwendet, welche das Verfahren der Elektroporation mit einer chemischen Reaktion vereint und somit dafür sorgt, dass die DNA nicht nur durch die Zellmembran, sondern auch in den Zellkern selbst gelangt. Diese Kombination wird als Nukleofektion bezeichnet und sorgt dafür, dass durch das aktive Einschleusen der DNA in den Zellkern eine höhere Effizienz der Transfektion erreicht werden kann.

#### *3.5.1.1 Lipofektion*

In dieser Arbeit wurde für die Transfektion von humanen Chondrozyten das *X-tremeGENE HP Transfection Reagent* der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Das Reagenz besteht aus einem Gemisch aus unterschiedlichen Lipiden und Lipid-basierten

## METHODEN

Bausteinen, welche mit 80% (v/v) Ethanol versetzt wurden. Die exakte Zusammensetzung der Lösungen bleibt dem Anwender vorenthalten.

Für die Transfektion mit dem *X-tremeGENE HP Transfection Reagent* wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70% - 90 % kultiviert. Hierfür wurden 150.000 Chondrozyten pro *6well* ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen kurz mit HBSS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml frischem Kulturmedium. Parallel dazu wurde die zu transfizierende DNA-Lösung hergestellt. Hierfür wurden 90-98 µL vorgewärmtes, serumfreies Medium in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, so dass das Endvolumen nach Zugabe der DNA 100 µL betrug. Die Konzentration der DNA lag zwischen 2 und 5 µg pro Ansatz. Medium und DNA wurden ordentlich gemischt, bevor das Transfektionsreagenz ebenfalls dazu gegeben werden konnte. An dieser Stelle war es wichtig, dass das Transfektionsreagenz bei der Zugabe nicht die Reaktionsgefäßwand berührt. Die in dieser Arbeit verwendete Ratio zwischen Reagenz und µg DNA betrug 3:1. Die Transfektionsreagenz/DNA-Lösung musste gut gemischt und anschließend für ca. 15 min bei RT inkubiert werden. Die 100 µL des Transfektionsreagenz/DNA-Gemisches wurden anschließend zu den Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schütteln der Zellkulturplatte auf den Zellen verteilt. Die Inkubationszeit betrug 24-72 Stunden bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit.

### 3.5.1.2 Nukleofektion

Für die Nukleofektion humaner Chondrozyten wurden diese bis zu einer Konfluenz von etwa 90 – 100% in einer Zellkulturflasche kultiviert. Am Tag der Nukleofektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10ml HBSS pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe einer 1 mg/ml Pronase/Kollagenase-Lösung und die Inkubation für 2-3 Stunden bei 37°C, um die Zellen abzulösen und gleichzeitig die von den Chondrozyten aufgebaute Matrix abzubauen. Im Anschluss wurden die Zellen durch die Zentrifugation bei 300 x g für 10 min geerntet und in 5 ml HBSS resuspendiert. Die sich anschließende Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Punkt 3.2.6). Die Zelllösung wurde so verdünnt, dass die Zellkonzentration 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml betrug. Je 1 ml der Zelllösung wurde auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 10 min bei 2000 rpm (Tischzentrifuge; Eppendorf) bei RT zentrifugiert. Parallel dazu wurde die *Cell Line Nucleofector® Solution T* mit dem *Supplement (Amaxa™ Human Chondrocyte Nucleofector Kit* der Firma Lonza Cologne GmbH, Köln) im Verhältnis 4,5:1 gemischt und bei RT für 5-10 Minuten inkubiert. Der Überstand wurde im Anschluss an die Zentrifugation dekantiert und 100 µL der supplementierten *Nucleofector® Solution* zu jedem Reaktionsgefäß einzeln

## METHODEN

dazugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und die DNA bzw. siRNA dazugegeben. Das Zell-DNA/siRNA-Gemisch wurde luftblasenfrei in eine für die Nukleofektion von humanen Chondrozyten zertifizierte Küvette gegeben. Anschließend erfolgte die Nukleofektion in einem Nucleofector®-Gerät (Programm: U-24 bzw. U-28). Im Anschluss an die Nukleofektion erfolgte die schnelle Zugabe von 500 µL Wachstumsmedium (OA hCH: hCH Wachstumsmedium ; hCH: CBM-Wachstumsmedium) und der Transfer in eine 6well-Zellkulturplatte, welche 1 ml vorgewärmtes Medium pro 6well enthielt. 24 Stunden nach der Nukleofektion wurden das Medium und die Zellen, die durch die Nukleofektion zerstört wurden, abgesaugt und frisches Medium zugegeben. Dieses enthielt zur Induktion der Kollagen Typ II Synthese in den Chondrozyten 17,5 µg/ml einer sterilen Ascorbinsäure-Lösung.

### 3.5.2 Nukleofektion von humanen mesenchymalen Stammzellen

Für die Nukleofektion von Plasmid-DNA in humane mesenchymale Stammzellen wurde das Amaxa™ *Human Mesenchymal Stem Cell Kit* der Firma Lonza Cologne GmbH (Köln) verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe einer Trypsin/EDTA – Lösung für 5-8 min bei 37°C im Brutschrank von der Zellkulturflasche abgelöst und durch die Zentrifugation bei 300 x g für 10 min geerntet. Resuspendiert wurde das Zellpellet anschließend durch die Zugabe von 1x PBS. Die Zellzahlbestimmung fand mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Punkt 3.2.6) statt. Pro Nukleofektionsansatz wurden 600.000 Zellen benötigt. Hierfür wurde die Zellsuspension mit einer Konzentration von 600.000 Zellen pro ml auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 10 min bei 2000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) und RT zentrifugiert. Das 1x PBS wurde anschließend dekantiert. Parallel dazu wurde die *Human MSC Nucleofector® Solution* mit dem *Supplement (Amaxa™ Human MSC Nucleofector Kit* der Firma Lonza Cologne GmbH, Köln) im Verhältnis 4,5:1 gemischt und bei RT für 5-10 Minuten inkubiert. Pro Nukleofektionsansatz erfolgte die Zugabe von 100 µL der supplementierten *Nucleofector® Solution* und 2 µg Plasmid-DNA. Das Zellsuspension/DNA – Gemisch wurde in eine zertifizierte Küvette transferiert und mit Hilfe eines Nucleofector® - Gerätes nukleofiziert (Programm C-17). Anschließend erfolgte die schnelle Zugabe von 500 µL vortemperiertem Wachstumsmedium, bevor die Zellen in eine 6well-Zellkulturplatte überführt wurden. Das 6well enthielt ebenfalls 1 ml vorgewärmtes Medium. Kultiviert wurden die Zellen für 24 Stunden bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit bevor sie 24 Stunden später für die Differenzierung verwendet werden konnten.

### 3.6 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Für die chondrogene Differenzierung von hMSCs wurde zunächst das Wachstumsmedium (MSCG-Medium) abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von 500  $\mu$ L Trypsin/EDTA pro 6well, um die Zellen von der Zellkulturplatte abzulösen. Nachdem über 90% der Zellen abgelöst waren, wurde ein äquivalentes Volumen (hier 2 ml) an vorgewärmtem MSC Differenzierungsmedium (ohne TGF- $\beta$ 3) pro 6well zugegeben und die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 600 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in einem adäquaten Volumen von MSC Differenzierungsmedium resuspendiert, so dass eine Konzentration von 100.000 Zellen pro 0,1 ml entstand. Jeweils 0,3 ml der Zellsuspension wurden in die Vertiefungen einer 96well Platte mit V-Boden überführt und die 96well Platte bei 2000 rpm (Multifuge 3 S-R, Heraeus) für 5 min bei RT zentrifugiert. Um das Herausschleudern der Zellen zu verhindern, wurde der Zentrifugationsschritt durch langsames Bremsen abgestoppt (Bremsen: Stufe 2). Der Überstand wurde anschließend nicht dekantiert, sondern die Platte bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Differenzierungsmedium erneuert. Ein Austausch des Differenzierungsmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Hierbei wurden 0,01  $\mu$ g/ml TGF- $\beta$ 3 immer frisch dazugegeben. Nach 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden die Pellets in OCT TissueTek® eingebettet und bei -80°C bis zum Gebrauch eingefroren.

### 3.7 Bildanalyse und densitometrische Bestimmung

Um die Expression von Proteinen im Anschluss an eine Western-Blot-Analyse (Punkt 3.4.12) zu quantifizieren, erfolgte eine densitometrische Bestimmung mit Hilfe des Programmes ImageJ. Für die Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten des Zielproteins und des Referenzproteins (Ladekontrolle) vermessen und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Die Expressionsunterschiede wurde in % angegeben.

Das Programm ImageJ wurde zusätzlich für die Bildanalyse der immunhistochemischen Färbungen der hMSC-Pellets verwendet. Hierbei konnte das Programm die spezifische Antikörperfärbung der Proteine erkennen und als Rotanteil prozentual wiedergeben. Für die Quantifizierung der Proteinexpression wurden je Pellet 3 repräsentative Bereiche ausgesucht und der Rotanteil der exakt gleich großen Areale berechnet. Aus den drei Arealen wurde ein Mittelwert gebildet und der Standardfehler berechnet. Für die Bildanalyse der Matrixproteine wurden hMSC-Pellets ohne Hämalaun-Kernfärbung ausgewählt, um das Ergebnis nicht zu verfälschen. Bei intrazellulären Proteinen wurden zur Vereinfachung zellkerngefärbte Pellets

## METHODEN

verwendet. Hierbei wurde nicht wie bei den Matrixproteinen der Rotanteil erfasst, sondern der Anteil an gefärbten zu ungefärbten Zellen kalkuliert.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Hierfür wurde die Student-T-Verteilung gewählt. Die statistische Signifikanzgrenze lag bei einem *p-value* von  $\leq 0,05$  (\*). Irrtumswahrscheinlichkeiten von  $p \leq 0,01$  wurden als sehr signifikant (\*\*) und von  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) als hoch signifikant festgelegt.

## 4 ERGEBNISSE

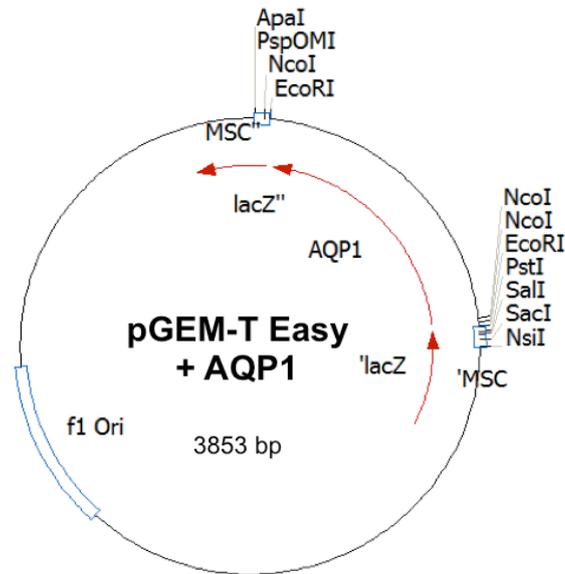
### 4.1 Untersuchung von AQP1 in humanen OA-Chondrozyten

Neben den bekannten Risikofaktoren der Osteoarthritis wie beispielsweise konstanter Belastung, Alter und Verletzungen, spielen auch genetische Faktoren eine wesentliche Rolle (Spector, 2004). Einer dieser Faktoren könnte der Wasserkanal AQP1 sein, welcher in den stärker geschädigten Arealen eines osteoarthrotischen Kniegelenkknorpels nachgewiesen wurde (Geyer *et al.*, 2009). Um die Rolle dieses Wasserkanals bei der Pathogenese der Osteoarthritis näher zu untersuchen, wurde in der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Kramm (Kramm, 2014) der Knockdown von AQP1 in isolierten Chondrozyten von Osteoarthritis-Patienten untersucht. Hierbei konnte kein Einfluss auf typische Stoffwechselfparameter des Knorpels, wie die Kollagen Typen 1, 2 und 9, den Transkriptionsfaktor Sox9 und den matrixabbauenden Enzymen MMP-13, ADAMTS-4 und 5 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte ebenfalls kein Einfluss auf LIN-2 (hCASK), eines von drei Proteinen des zytoskelett-assoziierten, heterotrimären Proteinkomplexes ermittelt werden, welcher bei der AQP1 vermittelten Migration von humanen Melanom- und Endothelzellen eine Rolle spielt (Monzani *et al.*, 2009). Da nicht alle Chondrozyten eines osteoarthrotischen Kniegelenkknorpels eine erhöhte Expression von AQP1 aufweisen, sondern lediglich stark geschädigte Areale, sollte in dieser Arbeit der Einfluss einer Überexpression von AQP1 auf die physiologischen Eigenschaften von isolierten, humanen, osteoarthrotischen Chondrozyten untersucht werden.

#### 4.1.1 Klonierung von AQP1

Die humane Sequenz von AQP1 wurde aus isolierten Chondrozyten amplifiziert und in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy mit der TA-Methode kloniert (Abb. 6) (Kramm, 2014). Durch die Transformation in den *E. coli* Stamm DH5 war die Vermehrung der Sequenz und eine anschließende Klonierung in den Überexpressionsvektor pcDNA 3.1 (+) möglich.

## ERGEBNISSE



**Abb. 6:** Plasmidkarte des pGEM-T Easy Klonierungsvektors mit AQP1 Insert. Die Klonierung der humanen AQP1-Sequenz in den pGEM-T Easy Vektor erfolgte mittels TA-Klonierung. Der Vektor besitzt eine Gesamtlänge von 3853 Basenpaaren (bp). Die AQP1 Sequenz hat eine Länge von 810 bp. MSC: *multiple cloning site*; lacZ: Gen der  $\beta$ -Galaktosidase; ori: *origin of replication*. Hergestellt wurde der Vektor von Frau Dr. Kramm (2014).

Um das Protein in den Chondrozyten exprimieren zu können, musste die humane AQP1 Sequenz aus dem pGEM-T Easy in den pcDNA 3.1 (+) kloniert werden. Der pcDNA 3.1 (+) gehört zu den gängigen Überexpressionsvektoren von eukaryotischen Zellen. Das Zielgen wird transient exprimiert und durch den starken CMV (Cytomegalievirus)-Promoter kann eine hohe Kopienzahl erreicht werden. Für die Klonierung der AQP1 Sequenz in den pcDNA 3.1 (+) wurden Insert und Vektor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und im Verhältnis 3:2 (Insert/Vektor) in die Ligationreaktion eingesetzt. Nach anschließender Transformation in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  wurden insgesamt 40 Klone ausgewählt und der Einbau der AQP1 Sequenz nach Plasmid-DNA-Isolierung mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese untersucht. Die Plasmid-DNA von 6 Klonen wurden mit den *Primern* LB60 (for) und LB61 (rev) sequenziert, wovon 2 Klone eine erfolgreiche Ligation aufweisen konnten. In Abb. 7 ist zum einen die Plasmidkarte des neu konstruierten Vektors pAQP1 als auch die Nukleotidsequenz mit MSC (*multiple cloning site*) des pcDNA 3.1 (+) Vektors mit der AQP1 Sequenz dargestellt. Die *Primer* LB60 (for) und LB 61 (rev) binden ca. 50 Basenpaare vor und nach den beiden *EcoRI* Schnittstellen.

# ERGEBNISSE

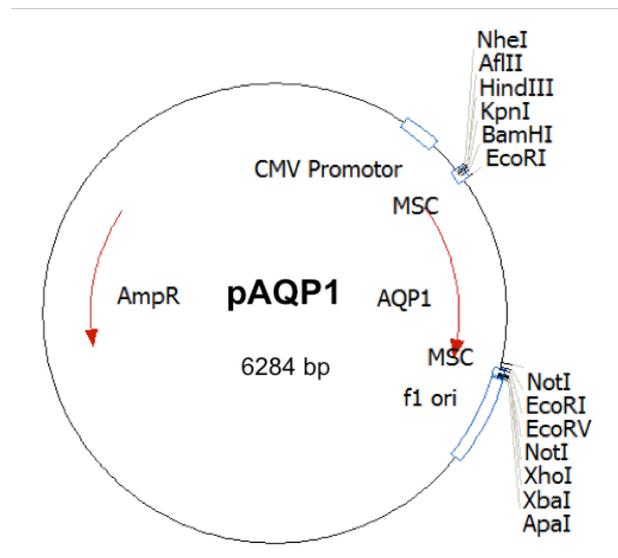
**A**

```

                                     LB60 ▶                               NheI
                                     TAATACGA CTCACTATAG GG
801  gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctagc
                                     HindIII
                                     AflII KpnI BamHI EcoRI
901  gtttaaactt aagcttggtg ccgagctcgg atccactagt ccagtggtgt ggaattgat taaacatgg gccaccatgg ccagcaggtt caagaagaag
                                     AQP1-810-LB49 rev
                                     TAGCCAGAG GGGACCCGA
1001 ctcttctgga gggcagtggt ggccgagttc ctggccacga cctctttgt cttcateagc atcggttctg ccttgggctt caaataccg gtggggaaca
1101 accagacggc ggtccaggac aacgtgaagg tgtcgtgctg cttcgggctg agcatcgcca cgctggcgca gagtgtggc cacatcagcg gcgcccact
1201 caaccggct gtcacactgg ggctgctgct cagctgccag atcagcatct tccgtgcctt catgtacatc atcgcccagt gcgtggggcg catcgtgcc
1301 accgccatc tctcagcat cactcctcc ctgactggga actcgttgg ccgcaatgac ctggctgatg gtgtgaactc gggccagggc ctgggcatcg
                                     AQP1-810-LB48 for
                                     TCGGCCCTCTC
1401 agatcatcgg gaccctccag ctggtgctat gcgtgctggc tactaccgac cggaggcgcc gtgacctggg tggctcagcc cccttgcca tcggccttc
AQP1-810-LB48 for
TGTAGCCCTT
1501 tgtagccctt ggacacctcc tggtattga ctacactggc tgtgggatta accctgctcg gtcccttggc tccgcggtga tcacacaaa cttcagcaac
1601 cactggattt tctgggtggg gccattcatc gggggagccc tgctgtact catctacgac ttcactctgg ccccacgag cagtgacctc acagaccgag
                                     NotI
1701 tgaaggtgtg gaccagcggc caggtggagg agtatgacct ggatgccgac gacatcaact ccaggtgga gatgaagccc aaataggcgg ccgcaaaaat
                                     EcoRI EcoRV NotI XhoI XbaI ApaI
1801 cactagttaa ttctgcagat atccagcaca gtggcgccg ctcgagtcta gaggcccg ttaaaccgcg tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc
                                     LB61
                                     GGA GCTGACACGG AAGAT

```

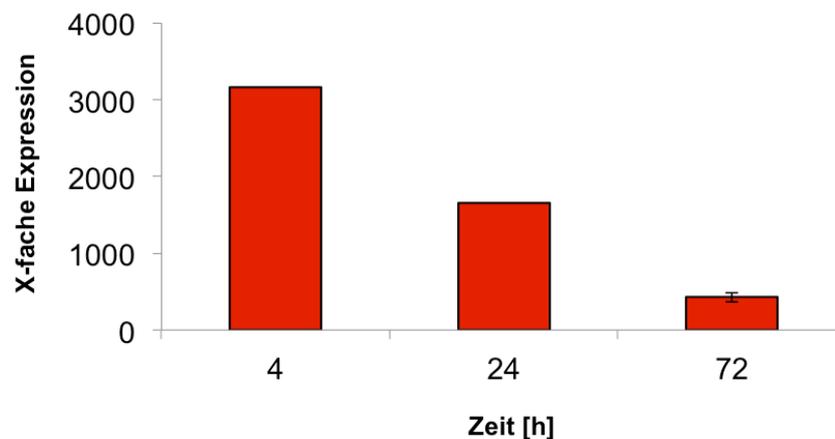
**B**



**Abb. 7:** Ligationsmechanismus der humanen AQP1 Sequenz mit dem pcDNA 3.1 (+) Vektor. A) Nukleotidsequenz von AQP1 innerhalb der MSC des pcDNA 3.1 (+) Vektors. Das Insert wurde anhand der *EcoRI* Schnittstellen in den Vektor kloniert. Mit den *Primern* LB60 (for) und LB61 (rev), sowie LB48 (for) und LB49 (rev) ist die Sequenzierung von AQP1 möglich. B) Plasmidkarte des pcDNA 3.1 (+) mit humanem AQP1 Insert und Bezeichnung des neu konstruierten Vektors als pAQP1. MSC: *multiple cloning site*; CMV: Cytomegalievirus; AQP1: Aquaporin 1 Sequenz; ori: *origin of replication*, AmpR: Ampicillin-Resistenzgen.

#### 4.1.2 Überexpression von AQP1 in humanen OA-Chondrozyten

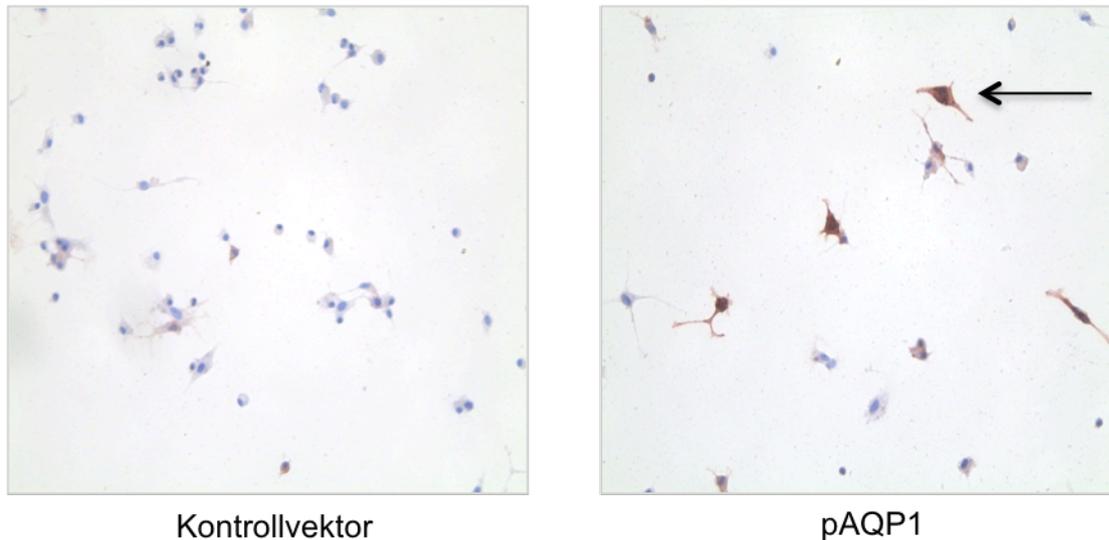
Um den Einfluss des AQP1 Wasserkanals auf die OA-Chondrozyten untersuchen zu können, wurden diese in Passage 1 mit 2,5 µg des AQP1-Plasmids (pAQP1) bzw. einem Kontrollvektor nukleofiziert (Punkt 3.5.1.2) und anschließend die mRNA nach 4, 24 und 72 Stunden isoliert. Die Analyse der AQP1 Überexpression wurde mittels semi-quantitativer *real-time* PCR überprüft (Abb. 8). Nach 4h konnte bei einer Chondrozyten-Population eine 3169fach erhöhte Expression im Vergleich zu den Kontrollvektor-behandelten Zellen (pcDNA 3.1 (+)) nachgewiesen werden, während sie bei einer weiteren Population nach 24h bei 1652fach lag. Nach 72h wurde die AQP1 Expression von drei Populationen gemittelt (n=3). Die Expression war um das 424±57fache erhöht.



**Abb. 8:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse der AQP1 Expression in humanen, osteoarthrotischen Chondrozyten im Zeitverlauf [h]. Die Zellen wurden mit dem AQP1 exprimierenden pcDNA 3.1 (+) Vektor (pAQP1) oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die mRNA nach 4h, 24h und 72h isoliert. Nach 4h konnte eine 3169fache und nach 24h eine 1652fache Überexpression von AQP1 gemessen werden; (n=1). Nach 72h war die Expressionsrate um 424±57fach erhöht; n=3.

Zur Verifizierung der *real-time* PCR Analyse und zum Nachweis der Überexpression von AQP1 auf Proteinebene wurde eine immunzytochemische Färbung mit den kultivierten Chondrozyten 24h nach der Nukleofektion durchgeführt (Abb. 9). Die Zellen, welche mit pAQP1 nukleofiziert worden sind, wiesen als Marker eine starke Rotfärbung auf, wohingegen die mit dem Kontrollvektor nukleofizierten Chondrozyten nicht gefärbt waren. Somit konnte eine Proteinüberexpression von Aquaporin 1 in den pAQP1 nukleofizierten Chondrozyten nachgewiesen werden.

## ERGEBNISSE

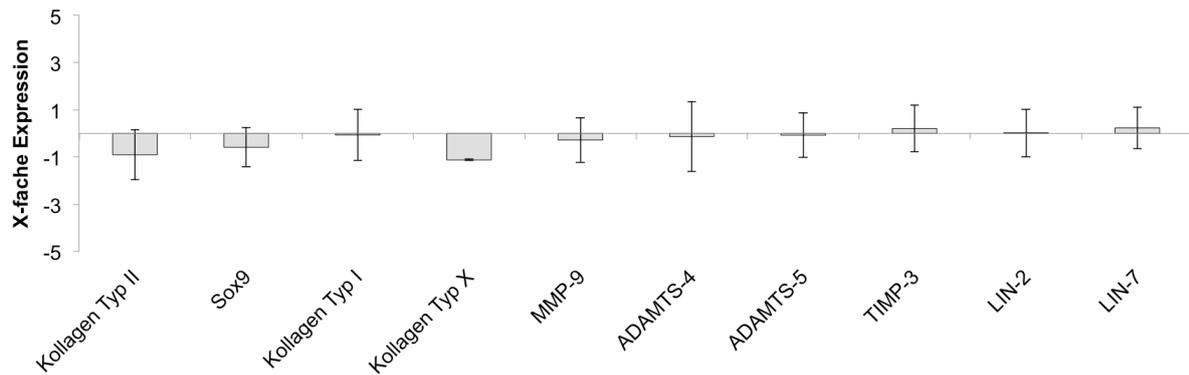


**Abb. 9:** Immunzytochemische Färbung von AQP1 in humanen, OA-Chondrozyten 24h nach der Nukleofektion. Die mit pAQP1 nukleofizierten Zellen wiesen z.T. eine rote AQP1-Färbung auf (rechtes Bild; schwarzer Pfeil) wohingegen die Kontrollvektor-behandelten Zellen (linkes Bild) nicht gefärbt waren. Für die Analyse der AQP1 Proteinexpression wurde ein anti-AQP1 Antikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun angefärbt. 20fache Vergrößerung.

### 4.1.3 Einfluss der AQP1 Überexpression auf humane OA-Chondrozyten

Da AQP1 in den stärker beschädigten Arealen des Kniegelenkknorpels eine erhöhte Expression zeigte (Geyer *et al.*, 2009), sollte der Einfluss des Wasserkanals auf typische Stoffwechselfparameter des Knorpels analysiert werden. Hierfür wurden die Chondrozyten aus dem Knorpel von Kniegelenkersatz-Patienten entnommen, mit 2,5 µg pAQP1 oder dem Kontrollvektor pcDNA 3.1 (+) nukleofiziert und die mRNA nach 72h isoliert. Die Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer *real-time* PCR ergab, dass die Überexpression von AQP1 keinen Einfluss, sowohl auf die ausgewählten Stoffwechselfparameter als auch auf LIN-2 (hCASK) ( $0,02 \pm 1,01$ ) und LIN-7 ( $0,23 \pm 0,89$ ) hatte (Abb. 10). Untersucht wurden die Stoffwechselfparameter Kollagen Typ I ( $-0,07 \pm 1,08$ ), Kollagen Typ II ( $-0,9 \pm 1,05$ ), Kollagen Typ X ( $-1,12 \pm 0,03$ ), der Transkriptionsfaktor Sox9 ( $-0,59 \pm 0,82$ ), die Matrix-abbauenden Enzyme MMP-9 ( $-0,28 \pm 0,94$ ), ADAMTS-4 ( $-0,13 \pm 1,48$ ) und ADAMTS-5 ( $-0,08 \pm 0,93$ ), sowie TIMP-3 ( $0,21 \pm 0,98$ ) als Hemmer der Matrixmetalloproteinasen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 10:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse unterschiedlicher Stoffwechselfparameter aus humanen, OA-Chondrozyten 72h nach der Überexpression von AQP1. Der Graph gibt die x-fache Expressionsänderung der untersuchten Gene an. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede bei allen gemessenen Parametern im Vergleich zum Kontrollansatz nachgewiesen werden; n=3.

## 4.2 DNER Expression in humanen osteoarthrotischen Knorpel

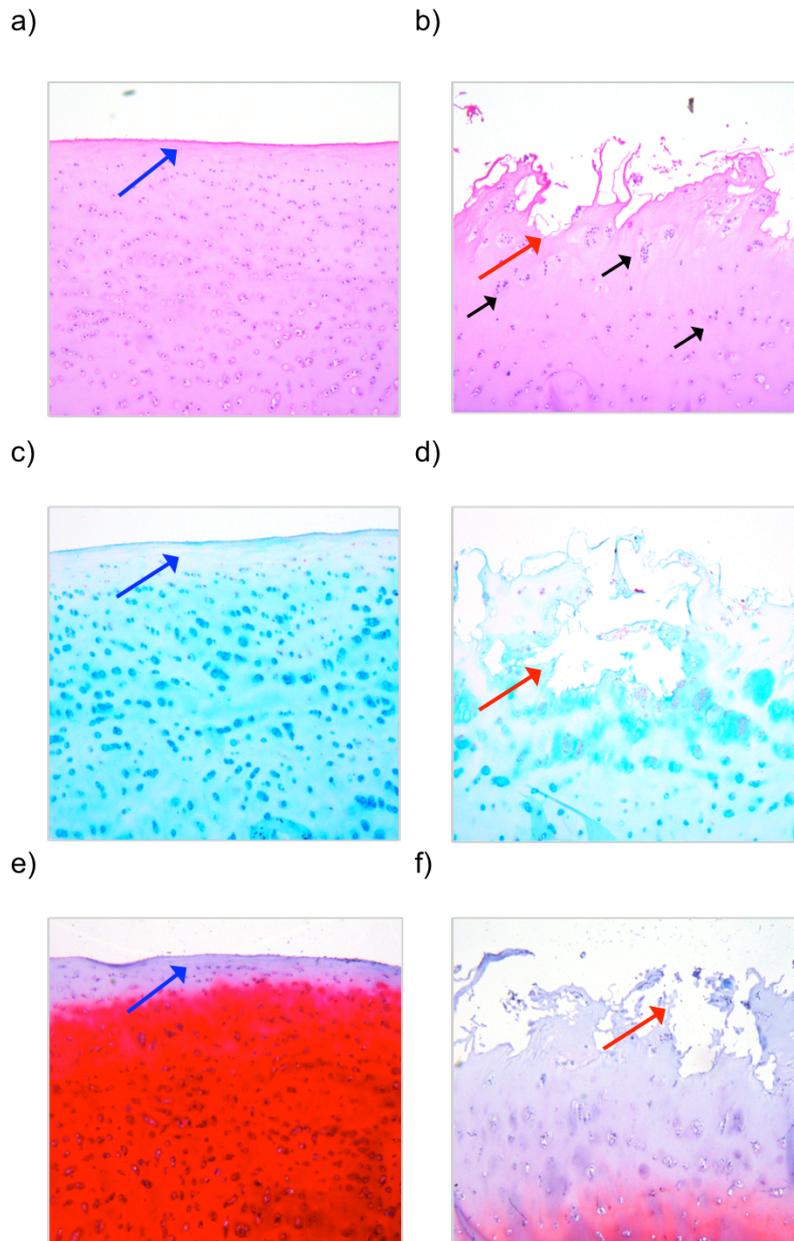
Bei der Microarray-Analyse von geschädigten und weniger geschädigten Knorpelarealen von OA-Patienten, konnte eine verstärkte Expression der DNER mRNA in den geschädigten Arealen nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2009). Um die erhöhte Expressionsrate auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde der Kniegelenksknorpel makroskopisch in geschädigte und weniger geschädigte Areale unterteilt und anschließend immunhistochemisch mit einem anti-DNER Antikörper untersucht (Punkt 4.2.2).

### 4.2.1 Histologische Analyse des Knorpels

Anhand der Übersichtsfärbung mit Eosin/Hämalaun konnte die glatte Oberfläche der weniger geschädigten Knorpelareale und die faserige, zerklüftete Oberfläche der geschädigten Bereiche dargestellt werden (Abb. 11 a-b). Man kann erkennen, dass im intakten Areal die Chondrozyten homogen über die gesamte Knorpeloberfläche verteilt sind, wohingegen in dem geschädigten Areal die Anzahl stark reduziert ist und es bei den noch vorhandenen Chondrozyten zu der typischen Clusterformation im OA-Gewebe kommt (Mankin *et al.*, 1971). Das es sich bei beiden Arealen letztendlich um OA-Knorpel handelt, zeigten die Alcianblau- und Safranin-O-Färbungen (Abb. 11 c-d; e-f). Die Alcianblau-Färbung detektiert die Glykosaminoglykane (GAG) der Knorpelmatrix. Bei dem weniger geschädigten Areal wurden der mittlere und der untere Bereich homogen Blau gefärbt, wohingegen die Oberfläche eher weiß erschien. Das stark geschädigte Areal wurde im mittleren und unteren Bereich lediglich punktuell Alcianblau gefärbt. Die stark zerklüftete Oberfläche erschien hingegen völlig farblos. Somit konnte in beiden Arealen ein eindeutiger Abbau der GAGs

## ERGEBNISSE

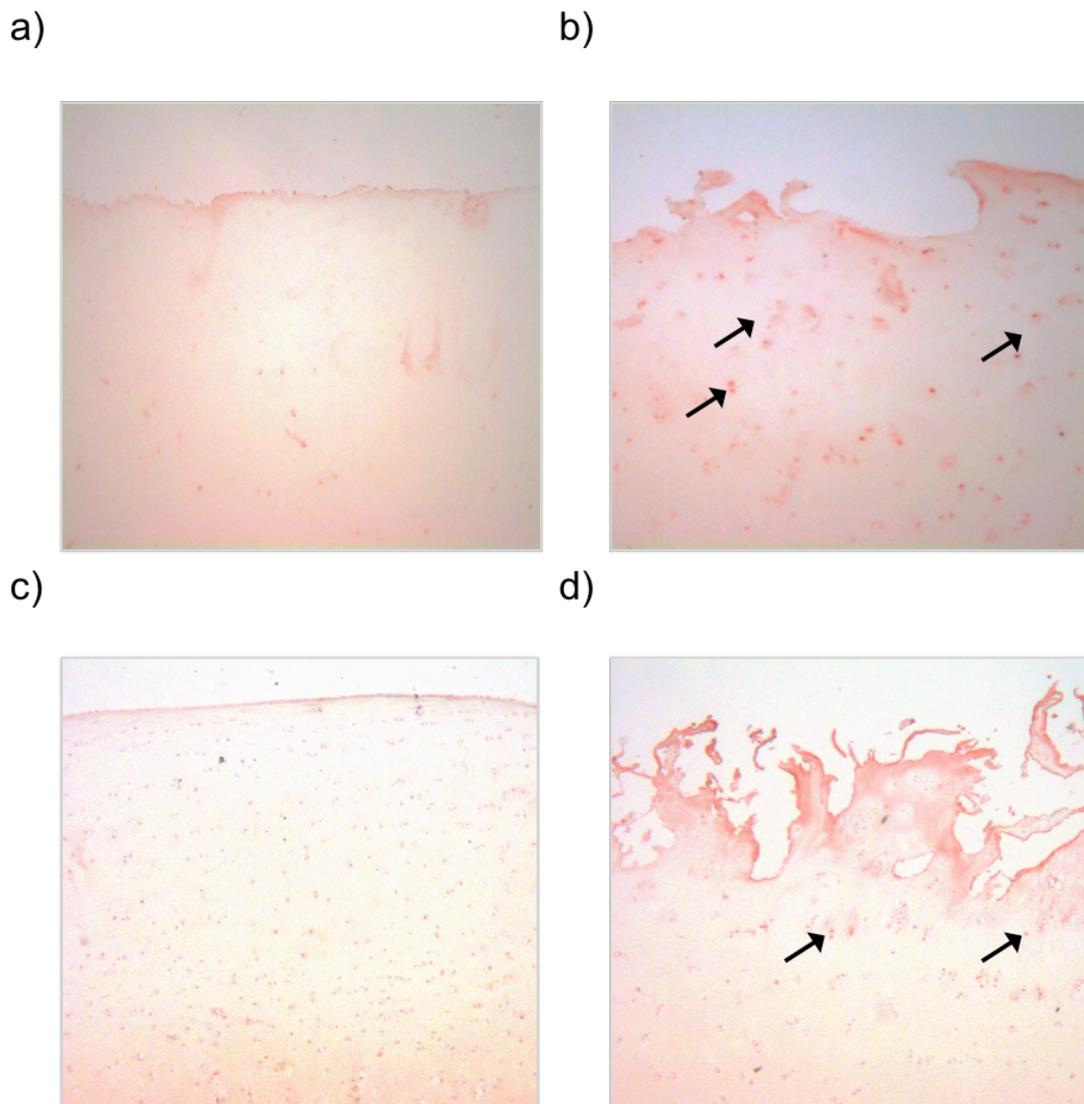
nachgewiesen werden, welcher in dem stärker geschädigten Bereich bis in die mittlere und untere Knorpelschicht reichte. Mit Hilfe der Safranin-O-Färbung wird die Kollagenstruktur des Knorpels durch eine rot bis orangene Färbung sichtbar. Ähnlich wie bei der Alcianblau-Färbung wurde der weniger geschädigte Bereich bis auf die Oberfläche relativ stark gefärbt, wohingegen in dem geschädigten Areal kaum noch Kollagene nachzuweisen waren. Nur noch der unterste Randbereich schien kollagene Strukturen zu enthalten.



**Abb. 11:** Histologische Analyse eines makroskopisch geschädigten und weniger geschädigten Areals aus osteoarthrotischem humanem Kniegelenksknorpel. Das weniger geschädigte Areal (linke Spalte) wies eine glatte Oberfläche (blaue Pfeile), sowie eine relativ homogene Knorpelstruktur auf. Im geschädigten Bereich des Knorpels (rechte Spalte) waren starke Erosionen (rote Pfeile), vor allem an der Knorpeloberfläche, erkennbar und die Chondrocyten wiesen typische Clusterformationen auf (schwarze Pfeile). a, b: HE-Färbung; c, d: Alcianblau-Färbung; e, f: Safranin-O-Färbung. 10fache Vergrößerung.

#### 4.2.2 Immunhistochemische Analyse von DNER

Kniegelenksknorpel von OA-Patienten wurden mit einem anti-DNER Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Während die makroskopisch intakten Areale des Knorpels entweder keine oder eine eher homogene, über die gesamte Fläche verteilte, DNER-Färbung aufwiesen (Abb. 12 a und c), wurden die makroskopisch geschädigten Areale intensiver und zum Teil auch eher an der Knorpeloberfläche gefärbt (Abb. 12 b und d).



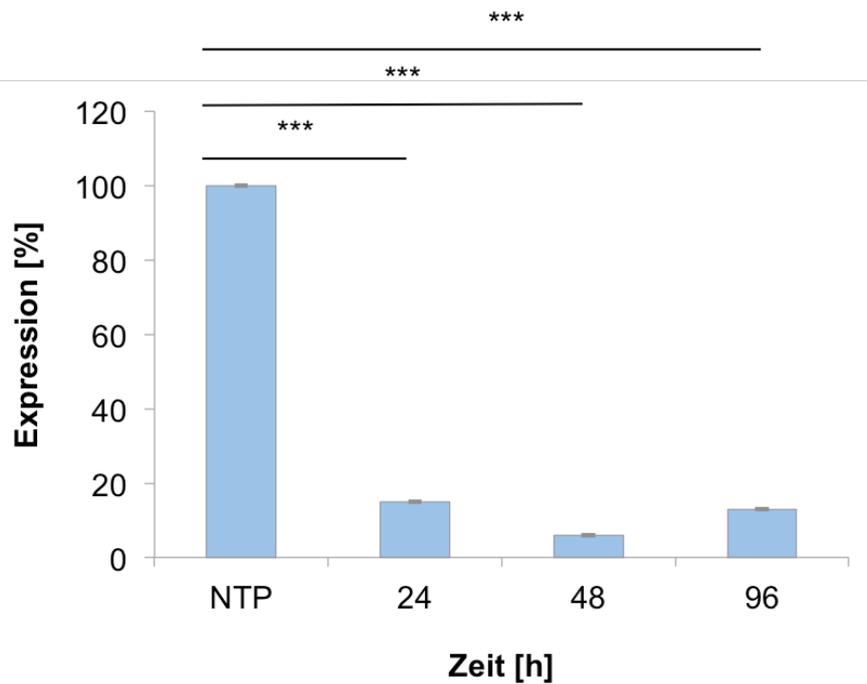
**Abb. 12:** Immunhistochemische Färbung von humanem osteoarthrotischem Kniegelenksknorpel anhand eines anti-DNER Antikörpers. Dargestellt sind makroskopisch geschädigte (rechte Spalte) und weniger geschädigte (linke Spalte) Knorpelareale. Die weniger geschädigten Areale wurden entweder gar nicht oder sehr homogene über die gesamte Knorpelfläche DNER gefärbt, wohingegen bei den stark geschädigten Arealen die DNER-Färbung intensiver und überwiegend an der Knorpeloberfläche nachweisbar war. a, b sowie c, d: unterschiedliche Patienten. 10fache Vergrößerung.

### 4.3 Einfluss von DNER auf humane Chondrozyten

Wie in Kapitel 4.2.2 dargestellt, wird die DNER Expression in stärker geschädigten Arealen des OA-Kniegelenkknorpels hochreguliert. Um den Einfluss des Proteins auf den Knorpel näher untersuchen zu können, sollte der Einfluss einer Reprimierung bzw. Überexpression von DNER in isolierten und kultivierten Chondrozyten analysiert werden. Für die Reprimierung wurde ein Pool von siRNAs verwendet, welche spezifisch gegen die DNER mRNA gerichtet waren (2.11). Die Hochregulierung von DNER erfolgte durch das kommerziell erworbene Überexpressionsplasmid pDNER (2.8). Analysiert wurden in beiden Fällen typische anabole Stoffwechselfparameter des Knorpels, wie beispielsweise Kollagen Typ II und Aggrekan, katabole Parameter wie, MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4 und ADAMTS-5 und Parameter für den Nachweis von hypertrophem/osteoarthrotischem Knorpel wie, Kollagen Typ X und Kollagen Typ I. Auch der Transkriptionsfaktor Sox9 sowie Mitglieder des Notch-Signalwegs wurden näher untersucht.

#### 4.3.1 Knockdown der DNER mRNA Expression in OA-Chondrozyten

Für den Knockdown der DNER Expression in humanen OA-Chondrozyten wurden diese nach der Isolierung aus dem Kniegelenkknorpel im Monolayer kultiviert und in Passage 1 mit der siRNA gegen die spezifische DNER mRNA nukleofiziert. Nach 24, 48 und 96 Stunden wurde die RNA isoliert und der Knockdown mittels semi-quantitativer *real-time* PCR untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, welche lediglich mit einem *non-targeting Pool* (NTP), einem Pool bestehend aus nicht-bindenden siRNA Fragmenten, nukleofiziert wurden. In Abb. 13 ist die prozentuale Reprimierung von DNER im Vergleich zu den NTP nukleofizierten Kontrollzellen dargestellt. Nach 24h lag die DNER Expressionrate bei  $15 \pm 0,09\%$ , nach 48h bei  $6 \pm 0,02\%$  und nach 96h bei  $13 \pm 0\%$  im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Reprimierung war zu allen untersuchten Zeitpunkten statistisch signifikant  $p \leq 0,001$ .



**Abb. 13:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse der DNER Expression in humanen OA-Chondrozyten nach dem DNER Knockdown. Dargestellt ist die DNER Expression im Zeitverlauf [h]. Der Knockdown wurde mittels Nukleofektion und unter der Verwendung einer spezifischen siRNA gegen DNER durchgeführt. Nach 24h, 48h und 96h konnte eine signifikante Reprimierung von DNER im Vergleich zum Kontrollansatz (NTP) nachgewiesen werden. \*\*\*  $p < 0,001$ ; NTP = *non-targeting pool*;  $n=3$ .

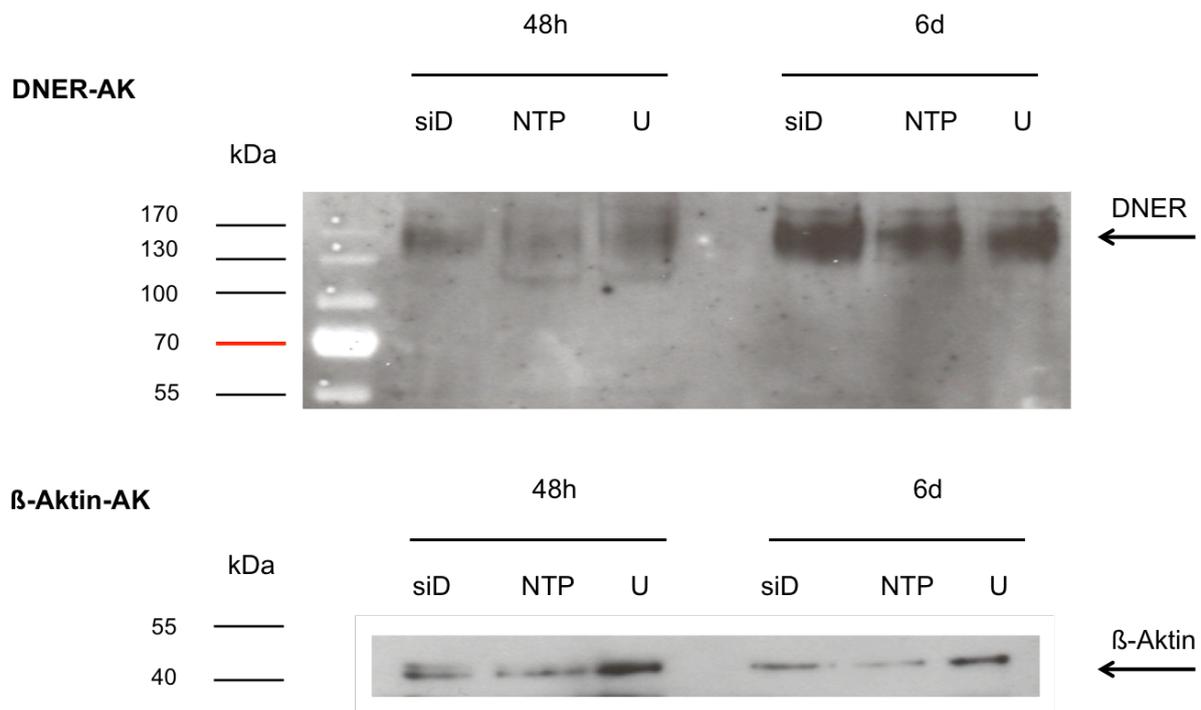
#### 4.3.2 Einfluss des DNER Knockdowns auf den Chondrozytenstoffwechsel

Da die DNER mRNA Expression 48 Stunden nach dem DNER Knockdown mit  $6 \pm 0,02\%$  (4.3.1) im Vergleich zu den NTP behandelten Kontrollzellen am niedrigsten war, sollte der Einfluss auf die knorpelspezifischen Stoffwechselfparameter nach 72 Stunden erfolgen. Es bestand die Annahme, dass durch die Verzögerung um 24 Stunden der Effekt auf die OA-Chondrozyten am größten sei. Hierfür wurde die RNA 72h nach der siRNA bzw. NTP Nukleofektion isoliert und eine semi-quantitative *real-time* PCR Analyse der x-fachen Expressionsänderung durchgeführt (Abb. 14). Die Analyse ergab, dass es zwischen den siRNA- und NTP behandelten Proben keine Expressionsunterschiede bei den ausgewählten Parametern gab. Analysiert wurden die Parameter Kollagen Typ II (1,15fach), Sox9 (-1,2fach), Kollagen Typ I (0,84fach), MMP-9 (-1,03fach), ADAMTS-4 (-1,56fach) und ADAMTS-5 (1,2fach).



## ERGEBNISSE

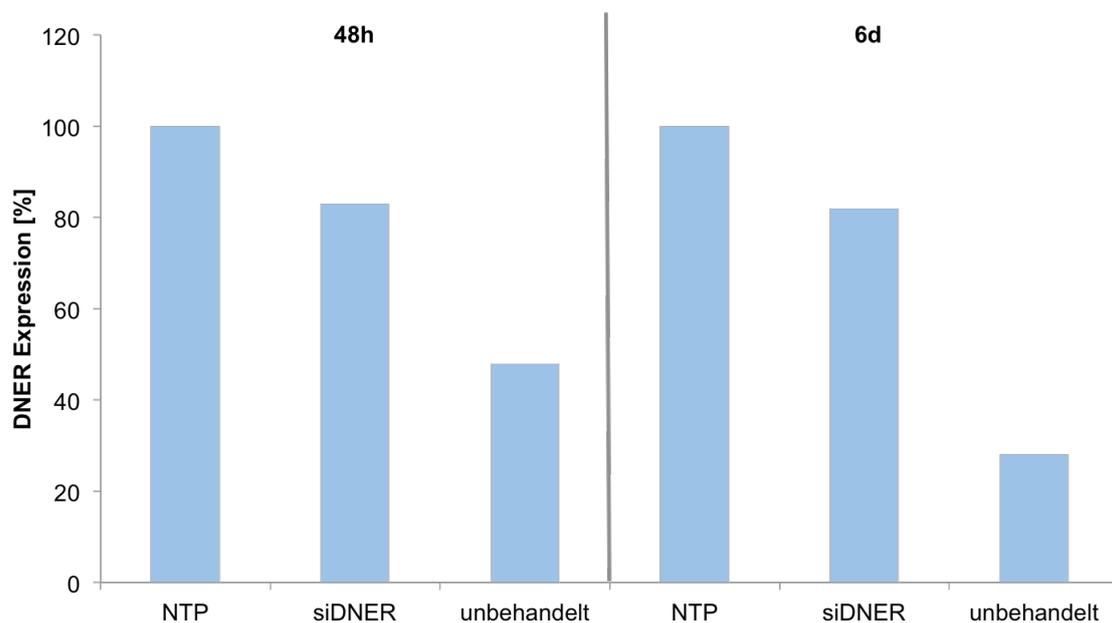
Um das Ergebnis der immunzytochemischen Färbung zu überprüfen, welches einen Knockdown von DNER auf Proteinebene widerlegt, wurde zusätzlich eine Western-Blot Analyse durchgeführt (Abb. 16). Für die Western-Blot Analyse wurden die Zellen ebenfalls entweder mit der siRNA gegen DNER (siDNER) oder einem non-targeting pool (NTP) nukleofiziert. Nach 48 Stunden bzw. nach 6 Tagen wurden Zelllysate der Proben hergestellt. Für den Nachweis von DNER wurde derselbe anti-DNER Antikörper wie für die immunzytochemische Färbung verwendet. Das DNER Monomer hatte nach Analyse der Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 78 kDa bzw. abzüglich der Signalsequenz von 75 kDa. Laut Herstellerangabe ist eine DNER spezifische Bande jedoch bei 150 kDa zu erwarten. In Abb. 16 ist der Western-Blot der drei verschiedenen Proben (siDNER, NTP und unbehandelte Zellen) zu den Zeitpunkten 48h und 6d dargestellt. Bei beiden Zeitpunkten konnte in allen Proben eine DNER spezifische Bande bei 150 kDa nachgewiesen werden. Als Ladekontrolle wurde ein anti- $\beta$ -Aktin Antikörper verwendet, welcher  $\beta$ -Aktin bei 42 kDa nachweist.



**Abb. 16:** Western-Blot Analyse des DNER Knockdowns 48 Stunden und 6 Tage nach der Nukleofektion. Dargestellt sind die mit einem anti-DNER Antikörper behandelten Zelllysate von humanen, OA-Chondrozyten. Die Zelllysate wurden aus unbehandelten Zellen (U) und aus Zellen welche mit siRNA gegen DNER (siD) oder mit einem non-targeting pool (NTP) behandelt wurden, hergestellt. Eine DNER spezifische Bande konnte bei 150 kDa nachgewiesen werden. Für die Analyse des Referenzproteins  $\beta$ -Aktin (42 kDa) wurde ein anti- $\beta$ -Aktin Antikörper verwendet.

## ERGEBNISSE

Die Unterschiede der DNER-Proteinexpression aus den Proben siDNER, NTP und unbehandelt wurden densitometrisch bestimmt. Bei der densitometrischen Bestimmung wurde die Intensität jeder einzelnen Bande gemessen und mit dem Referenzprotein, in diesem Fall  $\beta$ -Aktin, in ein Verhältnis gesetzt. In Abb. 17 sind die DNER Expressionsunterschiede der einzelnen Proben nach 48h und 6d graphisch dargestellt. Die NTP behandelten Zellen dienten als Basislinie. Im Vergleich zu den NTP behandelten Zellen lag die DNER Expression in den siDNER behandelten Zellen nach 48h bei 83% und nach 6d bei 82%, wohingegen sie bei den unbehandelten Zellen nach 48h bei 48% und nach 6d bei 28% lag.

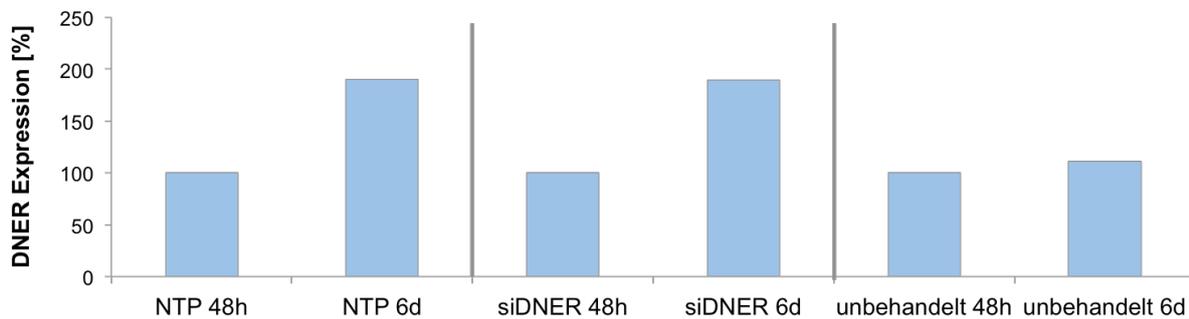


**Abb. 17:** Densitometrische Auswertung des DNER Knockdowns 48 Stunden und 6 Tage nach der Nukleofektion. Dargestellt sind die Resultate der Western-Blot Analyse unterschiedlicher Proteinproben bestehend aus unbehandelten Zellen und Zellen welche mit siRNA gegen DNER (siDNER) oder einem non-targeting pool (NTP) behandelt wurden. Für die semi-quantitative Auswertung wurde die DNER Expression mit der  $\beta$ -Aktin Expression ins Verhältnis gesetzt. Es konnte keine signifikante Runterregulierung der DNER Proteinexpression nach Zugabe von siDNER gemessen werden.

Bei Betrachtung der Western-Blot Analyse fiel auf, dass die DNER Expression nach 6 Tagen im Vergleich zu 48 Stunden stärker zu sein schien (Abb. 16). Selbst bei den unbehandelten Zellen war die Bande nach 6d intensiver. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen Proben der beiden Zeitpunkte miteinander verglichen (Abb. 18). Nach 6d war die DNER Expression der NTP Proben mit 190% fast doppelt so hoch wie nach 48h. Die DNER Expression der siDNER Zellen stieg auf 189% und die unbehandelten Zellen hatten eine Expressionsrate

## ERGEBNISSE

von 110% nach 6 Tagen. Somit lässt sich ein eindeutiger Anstieg der DNER Expression im Zeitverlauf belegen, welcher bei den nukleofizierten Zellen noch eindeutiger ausfiel.

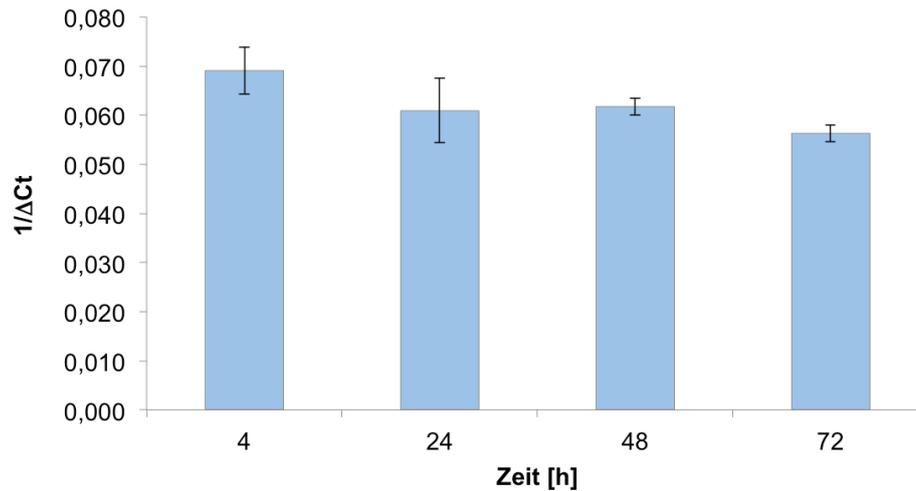


**Abb. 18:** Densitometrischer Vergleich der DNER Expression nach 48h und 6d in den Proben: NTP, siDNER und unbehandelt. In allen drei Proben war die DNER Expression nach 6d im Vergleich zu 48h erhöht. Für die densitometrische Analyse wurde  $\beta$ -Aktin als Referenzgen verwendet. NTP = *non-targeting pool*.

### 4.3.4 Überexpression der DNER mRNA in humanen OA-Chondrozyten

Für die Überexpression von DNER wurde ein kommerziell erworbenes Plasmid verwendet ( $\rho$ DNER). Das synthetisch hergestellte Plasmid enthält eine Codon-optimierte DNER-Nukleotidsequenz um eine stabilere mRNA zu transkribieren und um optimale Ergebnisse bei der Translation zu erzielen. Bei der Codon-Optimierung wird die Wildtyp-Gensequenz so modifiziert, dass trotz der unterschiedlichen Nukleotidabfolge, dieselbe Aminosäuresequenz synthetisiert wird. Für die Überexpression von DNER wurden 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  der Plasmid-DNA in die humanen OA-Chondrozyten nukleofiziert. Die Analyse der DNER mRNA Überexpression wurde nach 4h, 24h, 48h und 72h mittels semi-quantitativer *real-time* PCR durchgeführt. Für das Designen der DNER-Primer diente die Codon-optimierte DNER-Sequenz als Matrize (DNERopt). Dies ermöglichte einen spezifischen Nachweis der Codon-optimierten DNER mRNA. Um die DNER Expressionsrate zu ermitteln, wurden die  $\Delta\text{ct}$ -Werte der mit  $\rho$ DNER und der Kontrollvektor nukleofizierten Zellen verglichen. Der  $\Delta\text{ct}$ -Wert beschreibt hierbei die Expression des Zielgens verglichen mit der Expression eines konstitutiv exprimierten Referenzgens, in diesem Fall 18s. In Abb. 19 ist die Expressionsrate von DNER als  $1/\Delta\text{ct}$ -Wert der Proben im Zeitverlauf dargestellt. Man kann erkennen, dass eine Überexpression der optimierten DNER Sequenz in allen Proben möglich war. Zum Zeitpunkt 4h konnte die höchste Expressionsrate im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten nachgewiesen werden. Hierbei lag der  $1/\Delta\text{ct}$  bei 0,069. Nach 24h wurde ein  $1/\Delta\text{ct}$  von 0,061, nach 48h von 0,062 und nach 0,056 gemessen.

## ERGEBNISSE



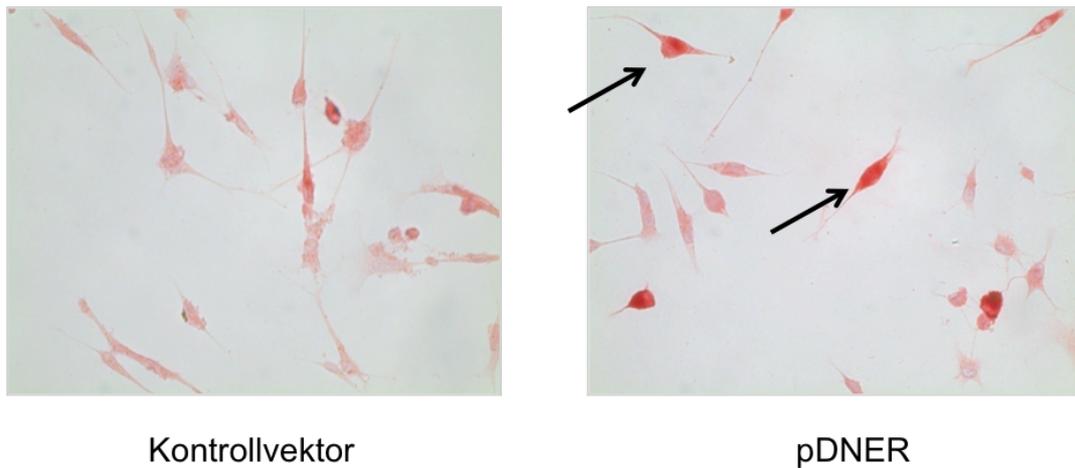
**Abb. 19:** Semi-quantitative *real-time* PCR zur Analyse der DNER Expression in humanen, OA-Chondrozyten nach der Nukleofektion eines DNER exprimierenden Plasmids (pDNER). Dargestellt ist die DNER Expressionsmessung im Zeitverlauf [h]. Gemessen wurde die relative Menge von Amplifikat (DNER) zum Referenzgen (18s) angegeben als  $1/\Delta Ct$ . Die DNER Expression der synthetischen DNER-Sequenz konnte ab dem Zeitpunkt 4h nachgewiesen werden. Die Expression nahm zwischen 4h und 72h konstant ab; n=3.

### 4.3.5 Überexpression des DNER Proteins in humanen OA-Chondrozyten

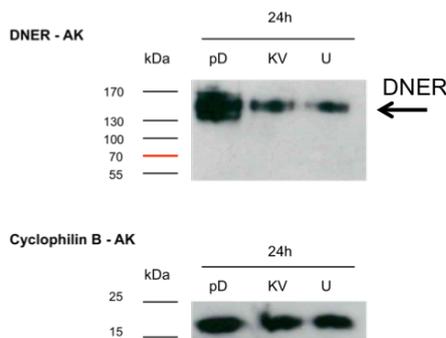
Um die Überexpression von DNER im Vergleich zu den Kontrollvektor-nukleofizierten Zellen auch auf Proteinebene nachweisen zu können, wurden die Zellen immunzytochemisch analysiert. Hierfür wurden die Zellen 24h nach der Nukleofektion mit pDNER oder dem Kontrollvektor auf *chamber slides* ausgesät und mit einem anti-DNER Antikörper behandelt. Wie in Abb. 20 A dargestellt, zeigten einige der pDNER nukleofizierten Zellen eine intensive spezifische DNER-Färbung, wohingegen die mit dem Kontrollvektor nukleofizierten Zellen schwächer gefärbt waren. Des Weiteren wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt, um die Überexpression von DNER quantifizieren zu können (Abb. 20 B). Die densitometrische Analyse (Abb. 20 C) bestätigt die Überexpression von DNER in den pDNER nukleofizierten Zellen, im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen, mit einer Expressionsrate von 241%. Die unbehandelten Zellen wiesen eine Expressionsrate von 85% im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen auf. Als Ladekontrolle wurde ein Cyclophilin B-Antikörper verwendet, welcher Cyclophilin B bei 21 kDa nachweist.

## ERGEBNISSE

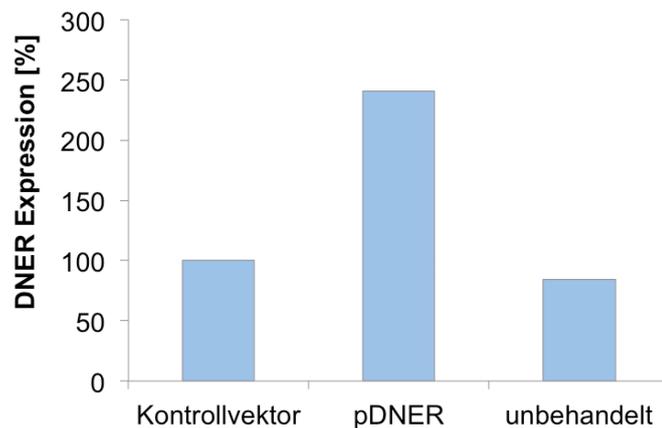
**A**



**B**



**C**



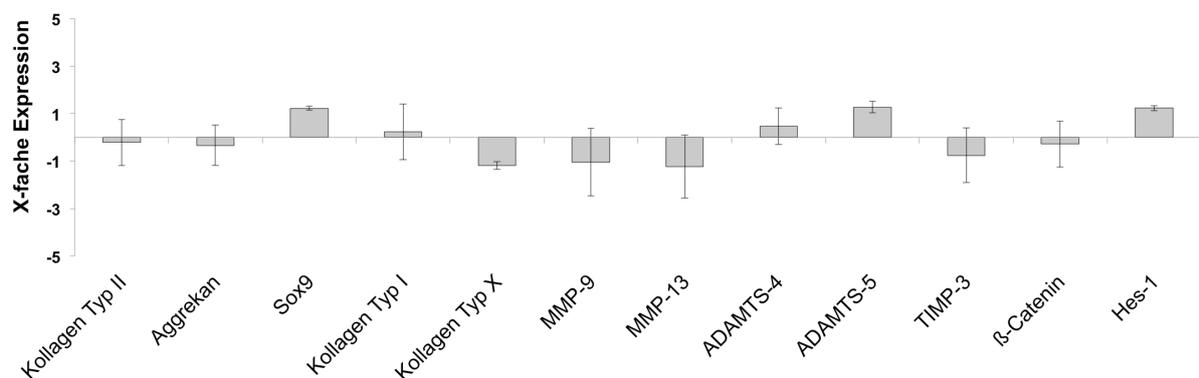
**Abb. 20:** Nachweis der DNER-Proteinexpression in humanen, OA-Chondrozyten 24h nach der Nukleofektion mit pDNER. Für die Proteinfärbung wurde ein anti-DNER Antikörper verwendet. A) Bei der immunzytochemischen Färbung waren die pDNER behandelten Zellen (rechts; schwarze Pfeile) intensiver gefärbt als die Kontrollvektor-Zellen (links). B) Durch die Western-Blot Analyse konnte bei allen drei Proben eine DNER spezifische Bande bei 150 kDa nachgewiesen werden. C) Die densitometrische Analyse des Western-Blots zeigte einen ca. 2,5fachen Anstieg von DNER nach der Nukleofektion mit pDNER im Vergleich zu den Kontrollvektor- und unbehandelten Zellen. Als Referenzprotein wurde Cyclophilin B verwendet (21 kDa). pD: pDNER; KV = Kontrollvektor; U = unbehandelt; AK = Antikörper; kDa = Kilodalton.

### 4.3.6 Einfluss der DNER Überexpression auf den Chondrozytenstoffwechsel

Nach Verifizierung der DNER Überexpression sollte der Einfluss der erhöhten DNER Expression auf humane OA-Chondrozyten untersucht werden. Hierzu wurden die Chondrozyten mit 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  von pDNER nukleofiziert und nach 72 Stunden die RNA der Zellen isoliert. Anschließend wurde eine semi-quantitative *real-time* PCR zur Analyse

## ERGEBNISSE

(Abb. 21) der anabolen Parameter Kollagen Typ II ( $-0,23 \pm 1,17$ ), Aggrekan ( $-0,34 \pm 0,85$ ) sowie der katabolen Parameter MMP-9 ( $-1,05 \pm 1,42$ ), MMP-13 ( $-1,24 \pm 1,33$ ), ADAMTS-4 ( $0,46 \pm 0,77$ ) und ADAMTS-5 ( $1,27 \pm 0,24$ ) durchgeführt. Untersucht wurden des Weiteren der Transkriptionsfaktor Sox9 ( $1,22 \pm 0,08$ ), der Matrixmetalloproteinase-Hemmer TIMP-3 ( $-0,76 \pm 1,15$ ), die Marker für hypertrophe, osteoarthrotische Chondrozyten Kollagen Typ X ( $-1,18 \pm 0,16$ ) und Kollagen Typ I ( $0,22 \pm 0,97$ ), ein Downstream-Parameter des Notch-Signalwegs Hes-1 ( $1,23 \pm 0,11$ ) sowie  $\beta$ -Catenin ( $-0,28 \pm 0,97$ ). Die Expressionsanalyse ergab, dass es zwischen den pDNER-nukleofizierten Zellen und den Kontrollzellen keine statistisch signifikanten Unterschiede gab.

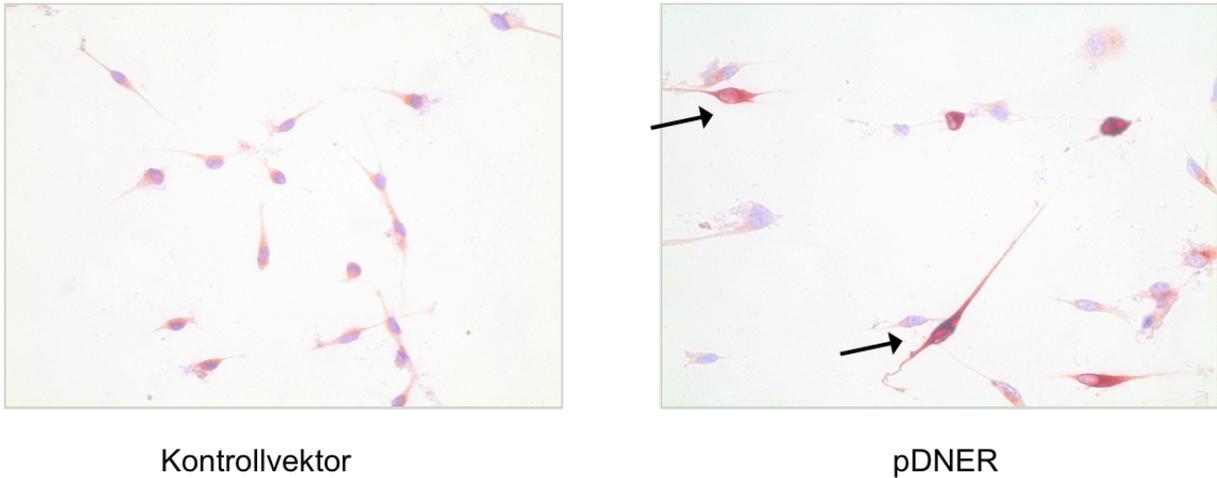


**Abb. 21:** Semi-quantitative *real-time* PCR zur Analyse unterschiedlicher Stoffwechselfparameter aus humanen, OA-Chondrozyten 72h nach der Überexpression von DNER. Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den DNER überexprimierenden Zellen und den Kontrollvektor-behandelten Zellen gemessen werden; n=3.

### 4.3.7 Microarray-Analyse nach DNER Überexpression

Nachdem die Überexpression von DNER keinen Einfluss auf einige wichtige Stoffwechselfparameter des Knorpels in humanen, osteoarthrotischen Chondrozyten zeigte (4.3.6), wurden anschließend humane, gesunde Chondrozyten (Lonza Cologne GmbH, Köln) untersucht. Neben den zuvor analysierten Parametern sollten auch andere evtl. von DNER beeinflusste Parameter auffindig gemacht werden, weshalb diesmal eine vergleichende Transkriptomanalyse (Microarray-Analyse) durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Zellen mit  $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  des DNER kodierenden Plasmids (pDNER) nukleofiziert und vor der RNA-Isolierung für 48h kultiviert. Um die Überexpression nachzuweisen wurden eine immunzytochemische Färbung mit einem anti-DNER Antikörper durchgeführt. Nach 24h waren einige der mit pDNER nukleofizierten Zellen stark DNER gefärbt, wohingegen die Kontrollzellen lediglich eine homogene aber schwache Färbung aufweisen konnten (Abb. 22).

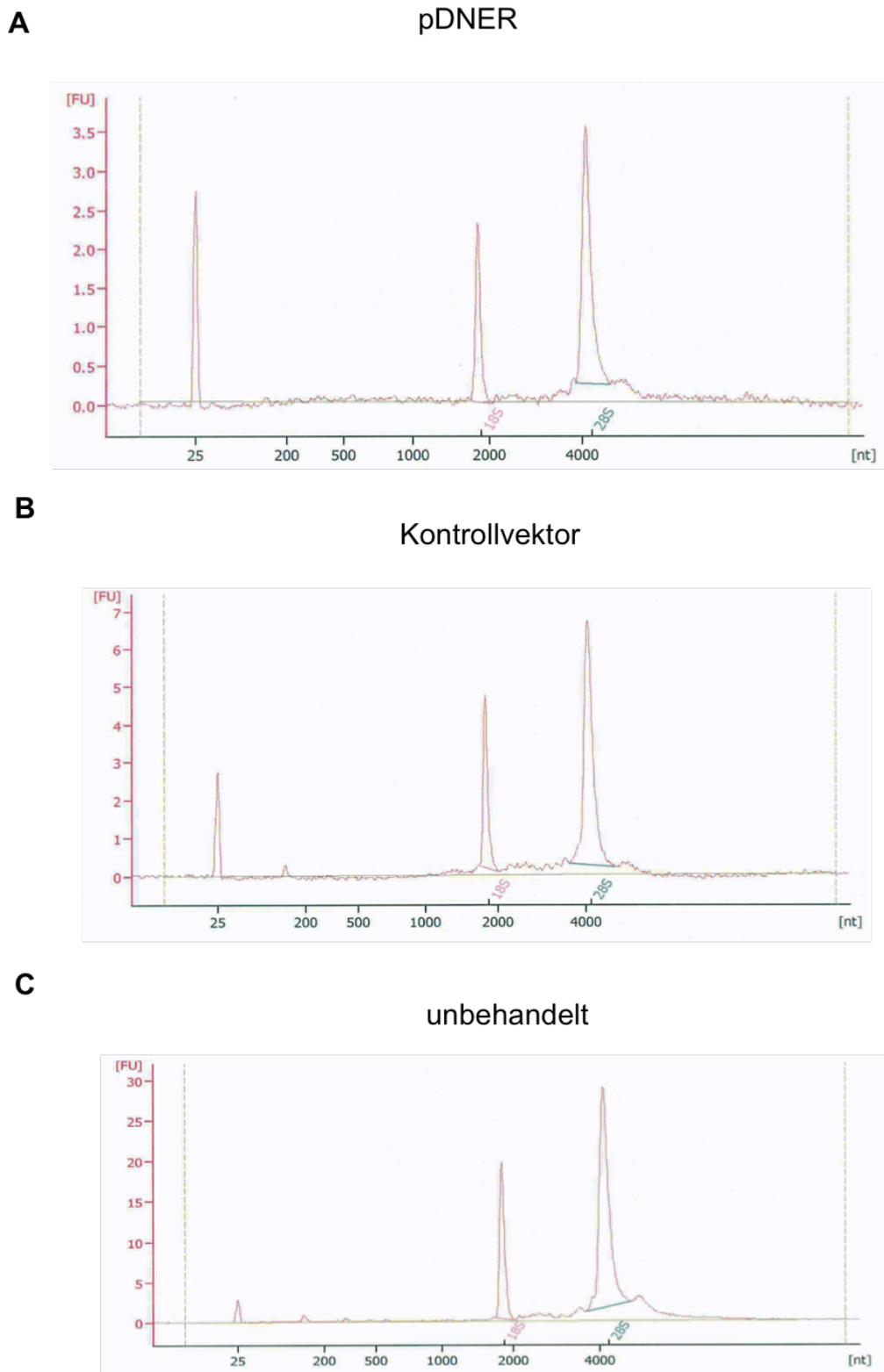
## ERGEBNISSE



**Abb. 22:** Immunzytochemische Färbung von DNER in gesunden, humanen Chondrozyten 24h nach der Nukleofektion mit pDNER. Für die Analyse wurde ein anti-DNER Antikörper verwendet. Die erfolgreiche Überexpression von DNER war durch die zum Teil sehr intensiv gefärbten Chondrozyten gekennzeichnet (rechts; schwarze Pfeile). Die mit dem Kontrollvektor behandelten Zellen wiesen eine schwache homogene DNER-Färbung auf (links). 20fache Vergrößerung.

Nach erfolgreicher Nukleofektion von pDNER sowie dem Nachweis der Überexpression von DNER auf Proteinebene, wurde die RNA aus den pDNER und den Kontrollvektor nukleofizierten Zellen, sowie aus unbehandelten Zellen 48h nach der Nukleofektion isoliert. Um eine erfolgreiche Genexpressionsanalyse zu gewährleisten, musste zunächst die RNA-Qualität untersucht werden (Abb. 23). Hierfür diente der sog. RIN-Wert (*RNA integrity number*), welcher das Maß der RNA-Integrität aufzeigt, indem er das Verhältnis von 18s zu 28s rRNA sowie andere Parameter verrechnet. Der RIN-Wert der pDNER-Probe lag bei 8,9. Der RIN-Werte für die Kontrollvektor-Probe als auch für die Probe der unbehandelten Zellen lag bei 10.

## ERGEBNISSE



**Abb. 23:** Kapillarelektrophorese zur Überprüfung der RNA-Integrität dargestellt in einem Elektropherogramm. Analysiert wurde die RNA aus humanen, gesunden Chondrozyten 48h nach der Nukleofektion mit pDNER (A) oder einem Kontrollvektor (B). Zur weiteren Kontrolle diente eine Probe mit nicht-nukleofizierten Zellen (unbehandelt; C). Die Auswertung der RIN-Werte für die Proben ergab für pDNER: 8,9; für den Kontrollvektor: 10 und unbehandelt: 10. RIN = *RNA Integrity Number*.

## ERGEBNISSE

Neben der Integrität muss für eine Microarray-Analyse eine ausreichende Menge an RNA zur Verfügung stehen (50-500 ng pro Ansatz). Die RNA-Konzentration der Proben wurde anhand eines NanoDrop Photometers bestimmt. In Tabelle 28 sind die Konzentrationen der Proben zu Beginn der Untersuchung dargestellt. Die RNA-Konzentration der pDNER nukleofizierten Zellen betrug insgesamt 0,7 µg, der Kontrollvektorzellen 1,4 µg und der unbehandelten Zellen 7,7 µg. Für die komplementäre Bindung der RNA-Proben an die Oligonukleotide der Trägermatrix musste die RNA im Anschluss an die Qualitäts- und Quantitätskontrolle in Biotin-markierte cRNA bzw. antisense RNA (aRNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde die RNA zunächst mittels reverser Transkription in ds-cDNA umgeschrieben und anschließend mittels *in vitro* Transkription in aRNA umgewandelt. Die aRNA-Proben wurden gereinigt und die Quantität und Qualität erneut überprüft. Wie in Tabelle 29 dargestellt waren die Konzentrationen der RNA-Proben nach der Amplifikation um ein 10-20faches erhöht und die Qualität wurde vom Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik der Universität Regensburg als ausreichend deklariert. Somit konnten alle drei Proben für die Microarray-Analyse verwendet werden.

**Tab. 28:** Photometrisch ermittelte Konzentrationen der RNA-Proben nach der Isolierung.

Bezeichnung	c [µg/µl]	260/280 ratio	V [µl]	µg gesamt
pDNER	0,018	2,09	38	0,7
Kontrollvektor	0,037	2,11	38	1,4
unbehandelt	0,202	2,07	38	7,7

**Tab. 29.:** RNA-Konzentrationen nach Amplifikation und Biotin-Markierung.

Bezeichnung	c [µg/µl]	260/280 ratio	V [µl]	µg gesamt	Qualität
pDNER	2,117	1,92	48,5	102,7	ok
Kontrollvektor	2,167	1,92	48,5	105,1	ok
unbehandelt	2,348	1,91	48,5	113,9	ok

**Tab. 28. und 29.:** Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA-Proben für die Microarray-Analyse. Dargestellt sind die analytischen Daten der Proben pDNER, Kontrollvektor und unbehandelt (nicht-nukleofizierte Zellen). Die Analyse erfolgte anhand eines Nanodrop Spektrometers. 28) RNA-Proben direkt nach der RNA-Isolierung. 29) Quantitäts- sowie Qualitätsbestimmung der Biotin-markierten aRNA-Proben im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik der Universität. Die Konzentrationen wurden um ein 10-20faches erhöht und Qualität wurde vom Kompetenzzentrum als ok deklariert was bedeutet, dass alle drei Proben für die Microarray-Analyse verwendet werden konnten.

## ERGEBNISSE

Analysiert wurde das Expressionsprofil der Probe 1: pDNER (pD) vs. Kontrollvektor (pC), Probe 2: pDNER vs. unbehandelt und Probe 3: Kontrollvektor vs. unbehandelt. In Probe 1 konnten drei Gene des gesamten humanen Genoms nachgewiesen werden, welche nach der DNER Überexpression, im Vergleich zu den Kontrollvektor behandelten Zellen, differentiell exprimiert wurden (Abb. 24; Tabelle 30). Die drei Gene waren *SPEN homolog transcriptional regulator* - SPEN (1,86±0,24), *bone marrow stromal cell antigen 2* – BST-2 (-2,2±0,82) und *tripartite motif containing 22* – TRIM22 (-2,07±0,1). Bei Betrachtung der Daten von Probe 2 und 3 konnten zum Teil sehr starke Expressionsunterschiede im Vergleich zu Probe 1 nachgewiesen werden. Hier lagen die x-fachen Expressionsunterschiede in Probe 2 bei: SPEN (1,58±0,24), BST-2 (5,9±1,61), TRIM22 (2,45±0,45) und in Probe 3 bei: SPEN (-0,47±0,79), BST-2 (12,82±3,94) und TRIM22 (5,23±1,18).

### A

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	pDNER vs. Kontrollvektor [x-fach]	pDNER vs. unbehandelt [x-fach]	Kontrollvektor vs. Unbehandelt [x-fach]
11758513_s_at	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN	2,35	1,87	-1,26
11743665_at	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN	2,22	1,77	-1,26
11743666_at	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN	1,00	1,11	1,11
11716036_x_at	bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	-2,18	7,50	16,31
11716035_at	bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	-2,22	7,89	17,51
11716034_a_at	bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	-2,32	7,07	16,42
11760810_at	bone marrow stromal cell antigen 2	BST2	1,03	1,07	1,04
11722368_a_at	tripartite motif containing 22	TRIM22	-2,28	2,57	5,86
11755587_a_at	tripartite motif containing 22	TRIM22	-2,34	3,44	9,32
11750170_a_at	tripartite motif containing 22	TRIM22	-1,91	1,20	2,28
11722370_a_at	tripartite motif containing 22	TRIM22	-1,91	2,58	4,93
11722371_x_at	tripartite motif containing 22	TRIM22	-1,89	1,96	3,74

### B

**Tab. 30.:** Expressionslevel der drei differentiell exprimierten Gene der Microarray-Analyse.

Gen	Symbol	pDNER vs. Kontrollvektor	pDNER vs. unbehandelt	Kontrollvektor vs. unbehandelt
<i>SPEN homolog transcriptional regulator</i>	SPEN	1,86±0,24	1,58±0,24	-0,47±0,79
<i>Bone marrow stromal cell antigen 2</i>	BST-2	-2,2±0,82	5,9±1,61	12,82±3,94
<i>Tripartite motif containing 22</i>	TRIM22	-2,07±0,1	2,45±0,45	5,23±1,18

**Abb. 24:** Microarray-Daten differentiell exprimierter Gene aus humanen, gesunden Chondrozyten 48h nach der DNER Überexpression. A) Dargestellt sind die Gencluster-Ergebnisse der Vergleichsproben pDNER vs. Kontrollvektor, pDNER vs. unbehandelt (nicht-nukleofizierte Zellen) und Kontrollvektor vs. unbehandelt. Vom gesamten Genom konnten 3 differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden: *SPEN homolog transcriptional regulator* (SPEN), *bone marrow stromal cell antigen 2* (BST-2) und *tripartite motif containing 22*. (TRIM22) B) Tabelle über die Mittelwerte der einzelnen Gencluster.

## ERGEBNISSE

Für die Verifizierung der Microarray-Analyse wurde eine semi-quantitative *real-time* PCR mit den selben RNA-Proben wie für den Microarray durchgeführt (Tabelle 31). Verglichen wurden wie beim Microarray die Proben 1: pDNER vs. Kontrollvektor, 2: pDNER vs. unbehandelt und 3: Kontrollvektor vs. unbehandelt. Im Vergleich zu den Microarray-Daten variierte der x-fache Regulationsfaktor, wohingegen das Regulierungsprofil (d.h. ob herauf- oder herunterreguliert) in den meisten Proben gleich blieb. Die Expressionsprofile von BST-2 ließen sich anhand der *real-time* PCR-Analyse validieren und lagen bei Probe 1 bei -1,77, Probe 2 bei 11,67 und Probe 3 bei 20,61. Auch bei TRIM22 konnten die im Microarray gemessenen Expressionsunterschiede in etwa bestätigt werden. Sie lagen in Probe 1 bei -4,79, Probe 2 bei 3,68 und Probe 3 bei 17,63. Im Vergleich zum Microarray, wo SPEN in Probe 1 zweifach hochreguliert war, konnten bei der *real-time* PCR-Analyse keine Expressionsunterschiede in alle drei Proben nachgewiesen werden.

**Tab. 31:** Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels semi-quantitativer *real-time* PCR. Analysiert wurden die x-fachen Expressionsänderungen von SPEN, BST-2 und TRIM22.

Gen	pDNER vs. Kontrollvektor	pDNER vs. unbehandelt	Kontrollvektor vs. unbehandelt
SPEN	1,22	1,23	1,01
BST-2	-1,77	11,67	20,61
TRIM22	-4,79	3,68	17,63

Zusätzlich wurde eine Verifizierung der Microarray-Analyse mit einer weiteren Population von gesunden humanen Chondrozyten durchgeführt (Tabelle 32). Hierfür wurde die mRNA ebenfalls 48h nach der Nukleofektion mit dem DNER exprimierenden Plasmid (pDNER) oder dem Kontrollvektor isoliert. Die Ergebnisse der Expressionsänderungen der semi-quantitativen *real-time* PCR für die Proben pDNER vs. Kontrollvektor lagen für SPEN bei -1,26, für BST-2 bei 1,56 und für TRIM22 bei -2,27. Bei TRIM22 konnte somit ebenfalls eine Runterregulierung, ähnlich wie beim Microarray, nachgewiesen werden, wohingegen die Expressionsunterschiede von SPEN und BST-2 demnach populationsabhängig waren.

**Tab. 32:** Expressionsanalyse von SPEN, BST-2 und TRIM22 in einer weiteren Population von humanen, gesunden Chondrozyten.

Gen	pDNER vs. Kontrollvektor
SPEN	-1,26
BST-2	1,56
TRIM22	-2,27

#### 4.4 Analyse der Transfektionsmethode für humane Chondrozyten

Bei der Microarray-Analyse wurde deutlich, dass die nukleofizierten Zellen ein stark differentielles Expressionsprofil im Vergleich zu den nicht-nukleofizierten Zellen aufwiesen (Abb. 24). Vor allem Apoptose-assoziierte Gene wurden bei den nukleofizierten Proben stärker exprimiert (Daten nicht gezeigt). Ein Grund hierfür könnte die Nukleofektionsmethode selbst sein. Um den Einfluss der Nukleofektionsmethode auf die Apoptose bzw. Nekrose der Zellen zu untersuchen, wurde eine Annexin-V-FLUOS Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert bzw. chemisch transfiziert und die Zelltodrate nach 72h bestimmt. Als Kontrolle dienten nicht-nukleofizierte/nicht-transfizierte Zellen. Die Zellen wurden auf *1well chamber slides* ausgesät. Bei den zu transfizierenden Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektionsbeginn 130.000 Zellen pro *chamber slide* ausgesät, während für die Nukleofektion ca. 600.000 Zellen pro Ansatz verwendet wurden. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen, welche bei der Nukleofektionsmethode in geringerer Anzahl ausgesät wurden (300.000 Zellen pro *chamber slide*), um eine anschließende Auszählung möglich zu machen. Alle Zellen wurden nach der Transfektion/Nukleofektion für 72 Stunden bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Pro Probe wurden drei repräsentative Gesichtsfelder gewählt und zunächst die Gesamtzellzahl ermittelt.

Die Gesamtzellzahl, die Zahl der Zellen die nach der Versuchsdauer an den Deckgläsern adhärirt waren, variierte stark zwischen den transfizierten- und den nukleofizierten Zellen. Durchschnittlich konnten bei den transfizierten und unbehandelten Zellen ca. 600 Zellen pro Gesichtsfeld gezählt werden, wohingegen es bei den nukleofizierten Zellen nur ca. 200 Zellen waren (Tabelle 33). Betrachtet man die Ergebnisse des Apoptose/Nekrose Assays kann man erkennen, dass die nukleofizierten Zellen durchschnittlich doppelt so viele apoptotische und nekrotische Zellen im Vergleich zu den chemisch transfizierten Zellen aufwiesen. Bei den pDNER nukleofizierten Zellen betrug die Zelltodrate nach chemischer Transfektion 36% und nach Nukleofektion 69%. Bei den mit Kontrollvektor behandelten Zellen lag die Zelltodrate der transfizierten Zellen bei 43% und bei den nukleofizierten Zellen bei 67%. Selbst bei den nicht-nukleofizierten (unbehandelt), aber für die Nukleofektion vorbereiteten Zellen, war die Zelltodrate um ein Vielfaches höher als bei den unbehandelten Chondrozyten, welche für die Transfektion ausgesät wurden. Hier waren 7% der unbehandelten Zellen unter Transfektionsbedingungen und 49% der Zellen unter Nukleofektionsbedingungen apoptotisch bzw. nekrotisch. Zwischen den pDNER- und Kontrollvektorzellen gab es sowohl bei der Nukleofektion als auch bei der chemischen Transfektion kaum Unterschiede. Generell lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass für

## ERGEBNISSE

die osteoarthrotischen Chondrozyten beide Methoden sehr zytotoxisch sind, die chemische Transfektion jedoch die schonendere Methode darstellt.

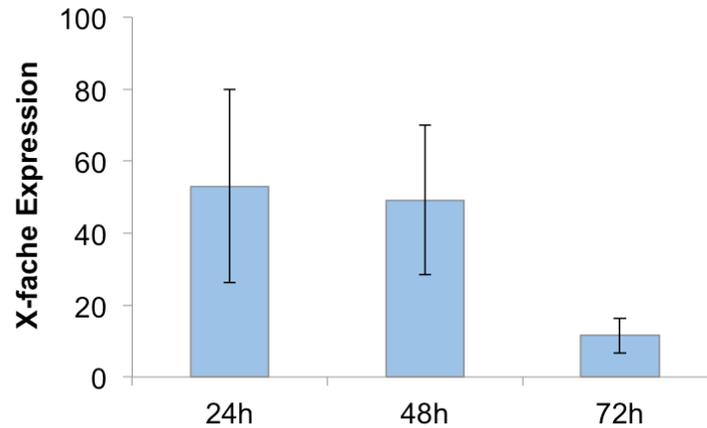
**Tab. 33.:** Analyse der apoptotischen und nekrotischen Zellen 72h nach Nukleofektion und chemischer Transfektion der humanen OA-Chondrozyten dargestellt als prozentualer Gesamtanteil.

	<b>Gesamtzellzahl</b>	<b>Apoptotische Zellen [%]</b>	<b>Nekrotische Zellen [%]</b>	<b>Tote Zellen gesamt [%]</b>
<b>Chemische Transfektion</b>				
pDNER	578±12	23±2	13±3	36
Kontrollvektor	600±40	29±26	14±3	43
unbehandelt	766±111	5±3	2±2	7
<b>Nukleofektion</b>				
pDNER	246±104	41±22	28±21	69
Kontrollvektor	154±12	39±14	28±20	67
unbehandelt	625±70	36±10	13±7	49

### 4.5 Chemische Transfektion von pDNER in humane Chondrozyten

Aufgrund der Erkenntnisse, dass die Nukleofektionsmethode einen ausgeprägten zellulären Stress auf die osteoarthrotischen Chondrozyten ausübt und konsekutiv einen deutlichen Einfluss auf das Expressionsprofil zu haben scheint, sollte der Einfluss von DNER auf die humanen OA-Chondrozyten mittels chemischer Transfektion ermittelt werden. Für das Einschleusen des DNER-Plasmids, wurde das X-tremeGENE HP DNA Transfektionsreagenz der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die RNA isoliert und die DNER Expression mittels semi-quantitativer *real-time* PCR bestimmt. Nach 24h wurde DNER um das 53fache, nach 48h um das 49fache und nach 72h um das 11fache hochreguliert (Abb. 25). Aufgrund der populationsabhängigen Expressionsschwankungen, waren die Ergebnisse, im Vergleich zu den mit Kontrollvektor-transfizierten Zellen statistisch nicht signifikant.

## ERGEBNISSE



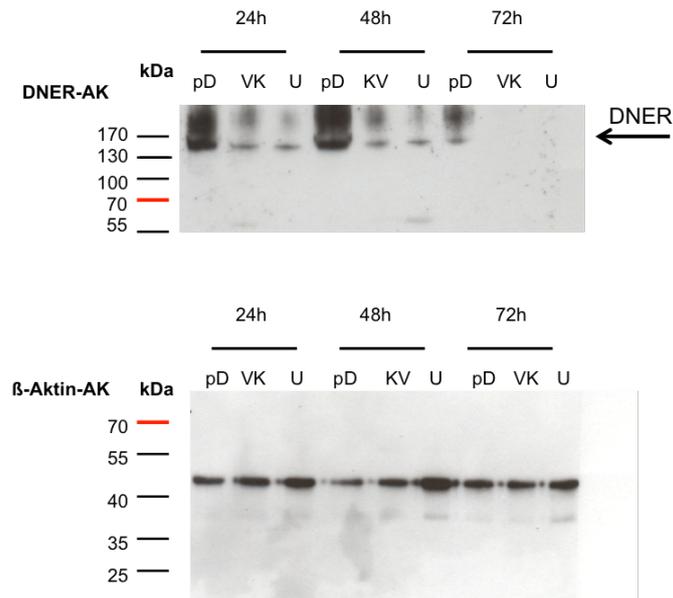
**Abb. 25:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse der DNER Expression in humanen OA-Chondrozyten im Zeitverlauf. Die Zellen wurden mit einem pDNER oder einem Kontrollvektor chemisch transfiziert und die Expression nach 24h, 48h und 72h gemessen. Nach 24h war die DNER Expression mit einer 53fachen Hochregulierung am größten. Die Expressionsunterschiede waren statistisch nicht signifikant; n=3.

### 4.5.1 Überexpression von DNER auf Proteinebene

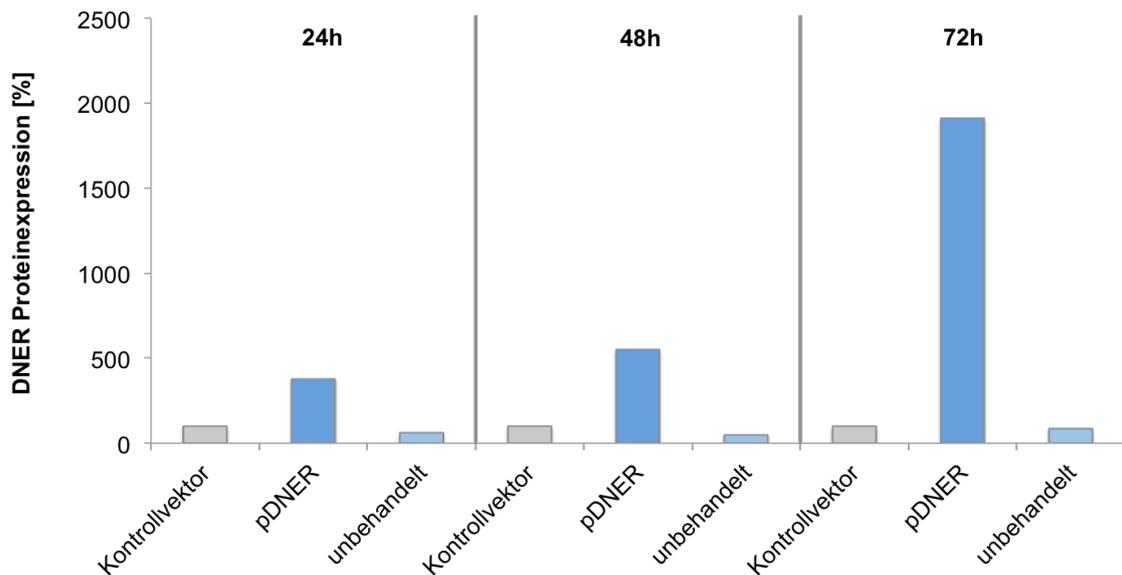
Um die Überexpression von DNER anhand der chemischen Transfektionsmethode auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde eine Western-Blot Analyse mit einem anti-DNER Antikörper durchgeführt (Abb. 26). Die Proteinlysate der Proben pDNER (pD), Kontrollvektor (KV) und unbehandelte Zellen (U), wurden 24h, 48h und 72h nach der chemischen Transfektion hergestellt. Im Western-Blot konnte in allen Lysaten, bis auf die Proben KV und U nach 72h, eine DNER-spezifische Bande bei 150 kDa nachgewiesen werden (Abb. 26 A). Anhand der densitometrischen Analyse des Western-Blots, konnte eine konstante Erhöhung der DNER Expression in den pDNER transfizierten Proben im Vergleich zu den Kontrollvektor-Proben beobachtet werden (Abb. 26 B). Nach 24h war die DNER Expression um 377%, nach 48h um 551% und nach 72h um 1912% erhöht. Im Vergleich dazu lag die DNER Expressionsrate der unbehandelten Zellen nach 24h bei 61%, nach 48h bei 48% und nach 72h bei 85%.

# ERGEBNISSE

## A



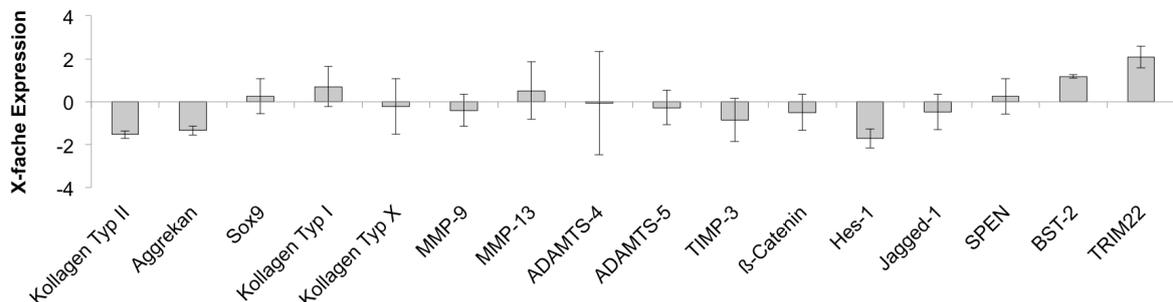
## B



**Abb. 26:** Nachweis der Proteinexpression in humanen, OA-Chondrozyten 24h, 48h und 72h nach der chemischen Transfektion von pDNER. Verwendet wurde ein anti-DNER Antikörper. A) Der Western-Blot zeigt eine DNER spezifische Bande bei 150 kDa sowie zwei weitere Banden zwischen ca. 40 und 50 kDa. B) Die densitometrische Analyse des Western-Blots demonstriert eine konstante DNER Expressionserhöhung im Vergleich zu den Kontrollvektor behandelten Zellen im Zeitverlauf. Das Expressionslevel zwischen Kontrollvektor- und unbehandelten Zellen war annähernd konstant. Als Referenzprotein wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. pD: pDNER; KV = Kontrollvektor; U = unbehandelt; AK = Antikörper; kDa = Kilodalton.

#### 4.5.2 Einfluss der DNER Überexpression auf OA-Chondrozyten

In weiteren Experimenten sollten typische Stoffwechselfparameter des Knorpels aber auch Kandidaten des DNER-assoziierten Notch-Signalwegs sowie die in der Microarray-Analyse nachgewiesenen Parameter nach der Überexpression von DNER untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen chemisch mit pDNER oder einem Kontrollvektor transfiziert und nach 72h Kultivierung die RNA aus den Chondrozyten isoliert. Die Expressionsanalyse der Parameter erfolgte durch semi-quantitative *real-time* PCR. In Abb. 27 sind die Ergebnisse der *real-time* PCR dargestellt. Die analysierten Parameter waren die Kollagene Typ II (-1,53±0,18), Typ I (-1,34±0,21) und Typ X (-0,23±1,29), die Matrix-abbauenden Enzyme MMP-9 (-0,4±0,75), MMP-13 (0,52±1,34), ADAMTS-4 (-0,07±2,41) und ADAMTS-5 (-0,27±0,8), der Transkriptionsfaktor Sox9 (0,26±0,81), der Matrixproteinase-Hemmer TIMP-3 (-0,85±1), Parameter des Notch Signalwegs Hes-1 (-1,71±0,45), Jagged-1 (-0,49±0,82) und die Gene SPEN (0,24±0,82), BST-2 (1,18±0,09), TRIM22 (2,08±0,5),  $\beta$ -Catenin (-0,5±0,84), sowie das Glykosaminoglykan Aggrekan (-1,34±0,21). Bei allen gemessenen Parametern konnte kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied gemessen werden.



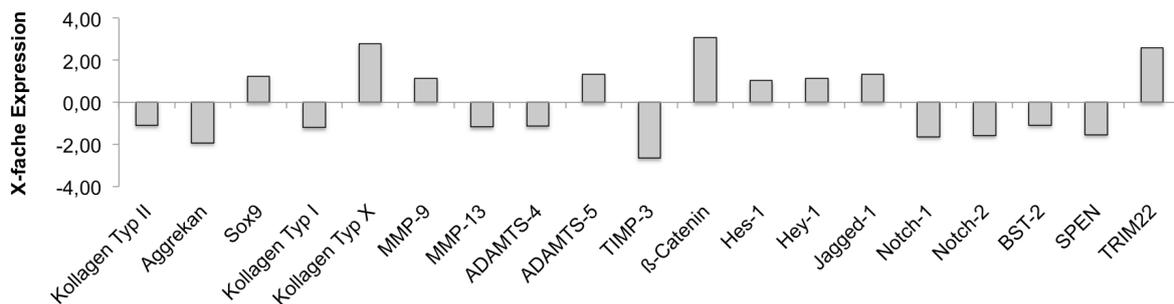
**Abb. 27:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse unterschiedlicher Stoffwechselfparameter aus humanen, OA-Chondrozyten 72h nach der chemischen Transfektion eines DNER exprimierenden Gens (pDNER). Es konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den pDNER Zellen und den Kontrollvektor behandelten Zellen gemessen werden. n=3.

#### 4.5.3 Einfluss der DNER Überexpression auf gesunde Chondrozyten

Da die Möglichkeit bestand, dass die osteoarthrotischen Chondrozyten, wenn auch nur zum Teil, von Grund auf eine höhere DNER Expressionsrate aufweisen, sollte die DNER Expression mittels chemischer Transfektion ebenfalls in normalen gesunden Chondrozyten untersucht werden. Hierfür wurden die kommerziell erworbenen Zellen kultiviert, mit pDNER oder einem Kontrollvektor transfiziert und nach 72h die RNA aus den Chondrozyten isoliert. Analysiert wurden mittels semi-quantitativer *real-time* PCR die Expressionsunterschiede der Kollagene Typ II (-1,09), Typ I (-1,2) und Typ X (2,79), der Matrix-abbauenden Enzyme

## ERGEBNISSE

MMP-9 (1,15), MMP-13 (-1,16), ADAMTS-4 (-1,13) und ADAMTS-5 (1,32), der Transkriptionsfaktor Sox9 (1,22), der Matrixproteinasen Hemmer TIMP-3 (-2,64), der Parameter des Notch Signalwegs Hes-1 (1,04), Hey-1 (1,15), Jagged-1 (1,34) und der Gene SPEN (-1,54), BST-2 (-1,08), TRIM22 (2,6),  $\beta$ -Catenin (3,07) sowie das Glykosaminoglykan Aggrecan (-1,92) (Abb. 28). Bei Betrachtung der Ergebnisse war eine erhöhte Expression von Kollagen Typ X,  $\beta$ -Catenin und TRIM22, sowie eine leichte Reprimierung von TIMP-3 zu verzeichnen. Die Expression der Stoffwechselfparameter nach der Überexpression von DNER wurde einmal bestimmt (n=1).



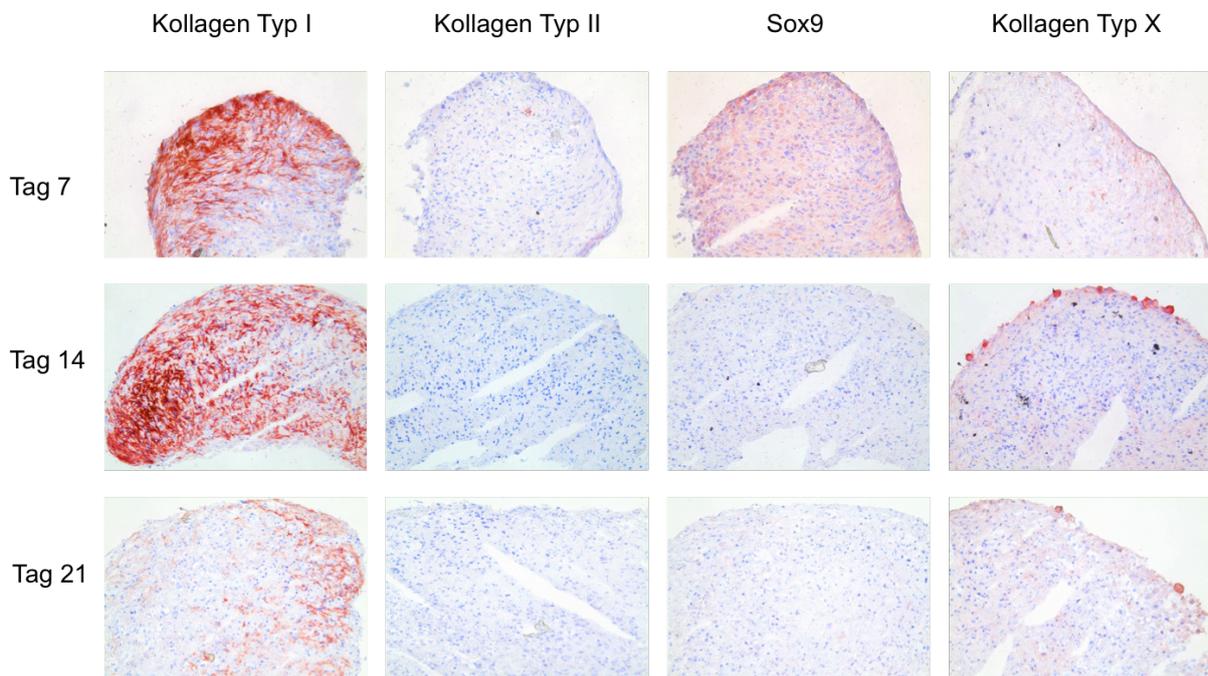
**Abb. 28:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse unterschiedlicher Stoffwechselfparameter aus humanen gesunden Chondrozyten 72h nach der chemischen Transfektion von pDNER im Vergleich zum Kontrollvektor. Bei Kollagen Typ X,  $\beta$ -Catenin und TRIM22 konnte eine erhöhte Expression beobachtet werden, wohingegen es zu einer leichten Reprimierung von TIMP-3 kam. Die übrigen untersuchten Parameter zeigten keine Expressionsunterschiede. Die Zellen wurden in Passage 4 transfiziert; n = 1.

### 4.6 Einfluss von DNER auf die chondrogene Differenzierung

Bei der Untersuchung der Funktion von DNER in humanen Chondrozyten konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen DNER überexprimierenden Zellen und den Kontrollvektorzellen, sowohl in normalen als auch osteoarthrotischen Chondrozyten nachgewiesen werden. 2009 wurden im Knorpelgewebe eine Art Reparaturzellen, sog. knorpelartige Vorläuferzellen, entdeckt (Koelling *et al.*, 2009). Bei diesen Zellen handelt es sich um Stammzellen, welche in der Lage sind in Chondrozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren. Da DNER vor allem in den lädierten und oberflächlichen Knorpelarealen exprimiert wird, sollte die Funktion von DNER während der Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) untersucht werden.

#### 4.6.1 *In vitro* Chondrogenese humaner mesenchymaler Stammzellen

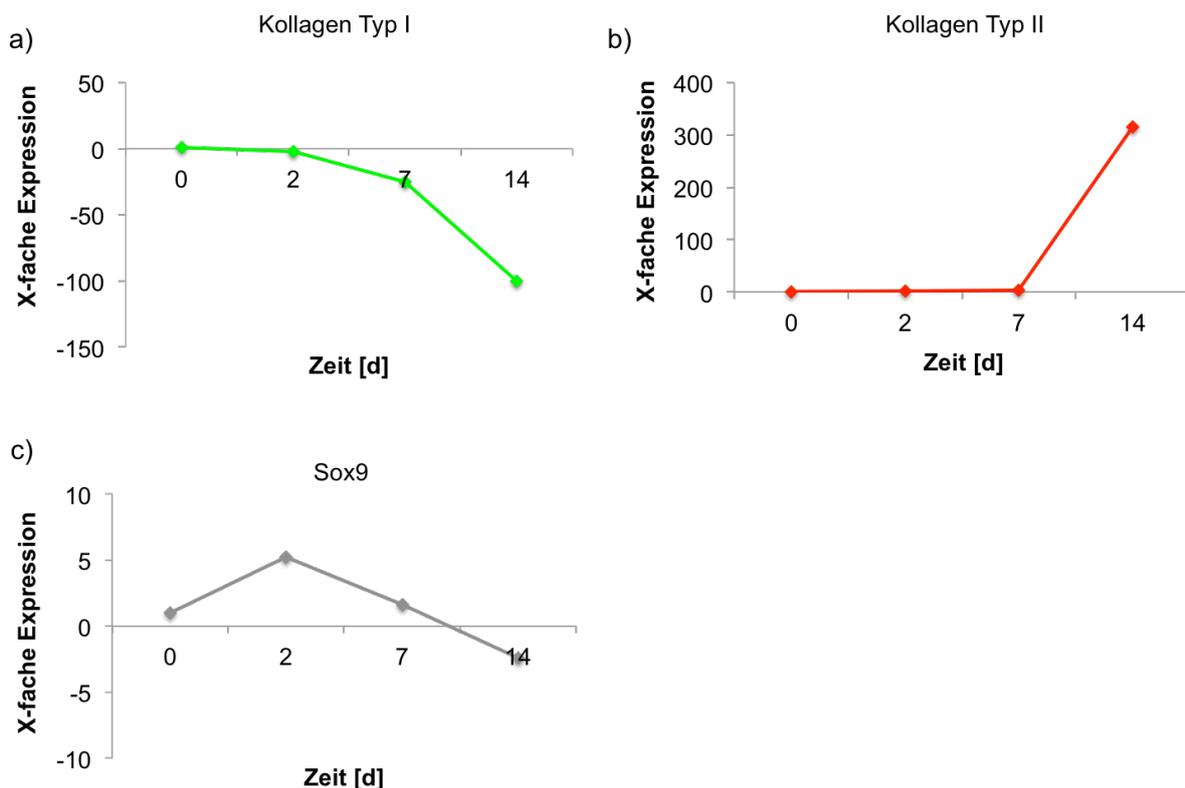
Bei der *in vitro* Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), differenzieren die Zellen durch die Zugabe von Wachstumshormonen wie TGF- $\beta$ 3 und Dexamethason, sowie durch die Erhöhung der Zelldichte zu knorpelartigem Gewebe. Die Chondrogenese fand in Form von Zell-Pellets statt. Kultiviert wurden die Zell-Pellets 21 Tage in MSC Differenzierungsmedium (3.6). In Abb. 29 sind immunhistochemische Färbungen der Pellets nach 7, 14 und 21 Tagen dargestellt. Um den Erfolg der Chondrogenese zu verifizieren, wurden die Pellet-Schnitte gegen typische Stoffwechselfparameter des Knorpels gefärbt. Untersucht wurde die Expression von Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Sox9 und Kollagen Typ X. Nachgewiesen werden konnte eine dem Zeitverlauf angemessene Abnahme von Kollagen Typ I, eine starke Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 zu Beginn der Chondrogenese, sowie eine konstante Expression des Markers für hyperthrophe Chondrozyten, Kollagen Typ X (Ng *et al.*, 1997; Barry, 2001; Bosnakovski *et al.*, 2006; Kitagawa *et al.*, 2013). Die Expression von Kollagen Typ II konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 29:** Immunhistochemische Färbung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Pellets wurden an den Tagen 7, 14 und 21 auf verschiedene Stoffwechselfparameter des Knorpels (Kollagen Typ I, Kollagen Typ II, Sox9 und Kollagen Typ X) untersucht. Die Expressionsabnahme von Kollagen Typ I und Sox9 sowie die gleichbleibende Expression von Kollagen Typ X konnte im Zeitverlauf nachgewiesen werden. Die Färbung anhand eines anti-Kollagen Typ II Antikörpers war nicht erfolgreich. Die Zellen wurden in Passage 4 differenziert; n = 1.

## ERGEBNISSE

Zusätzlich zu den Proteinexpressionsdaten wurde die RNA der Pellets zu den Zeitpunkten 2, 7 und 14 Tage isoliert und eine RNA Expressionsanalyse mittels semi-quantitativer *real-time* PCR durchgeführt (Abb. 30). Obwohl Kollagen Typ II nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, war eine Zunahme der RNA ab Tag 14 zu messen. Die Expression von Kollagen Typ II war um das 315,17fache, im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor der Differenzierung, erhöht (Abb.30b). Auch die konstante Abnahme von Kollagen Typ I an Tag 14 (bis -100fach, Abb. 30a) konnte gemessen werden. Die RNA Daten von Sox9 bestätigten ebenfalls die Zunahme der Expression des Transkriptionsfaktors zu Beginn der Differenzierung und die konstante Abnahme ab Tag 7 (Abb.30c). Im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Differenzierung wurde Sox9 an Tag 2 um das 5,24fache hochreguliert. An Tag 7 fiel die Expressionsrate wieder annähernd auf das Anfangsniveau zurück (1,65fach), wohingegen das Expressionslevel an Tag 14 sogar unter dem des Zeitpunktes vor der Differenzierung lag (-2,44fach). Durch die Kombination der RNA-Analyse und der immunhistochemischen Proteinbestimmung, konnte ein erfolgreicher Verlauf der *in vitro* Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen verzeichnet werden.



**Abb. 30:** Semi-quantitative *real-time* PCR der hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Expression von a) Kollagen Typ I, b) Kollagen Typ II und c) Sox9 wurde 2, 7 und 14 Tage nach Differenzierungsbeginn untersucht. Während die Expression von Kollagen Typ I und Sox9 ab Tag 2 sank, wurde Kollagen Typ II ab Tag 7 stärker exprimiert. Die Zellen wurden in Passage 4 differenziert; n=1.

### 4.6.2 Überexpression von DNER während der *in vitro* Chondrogenese

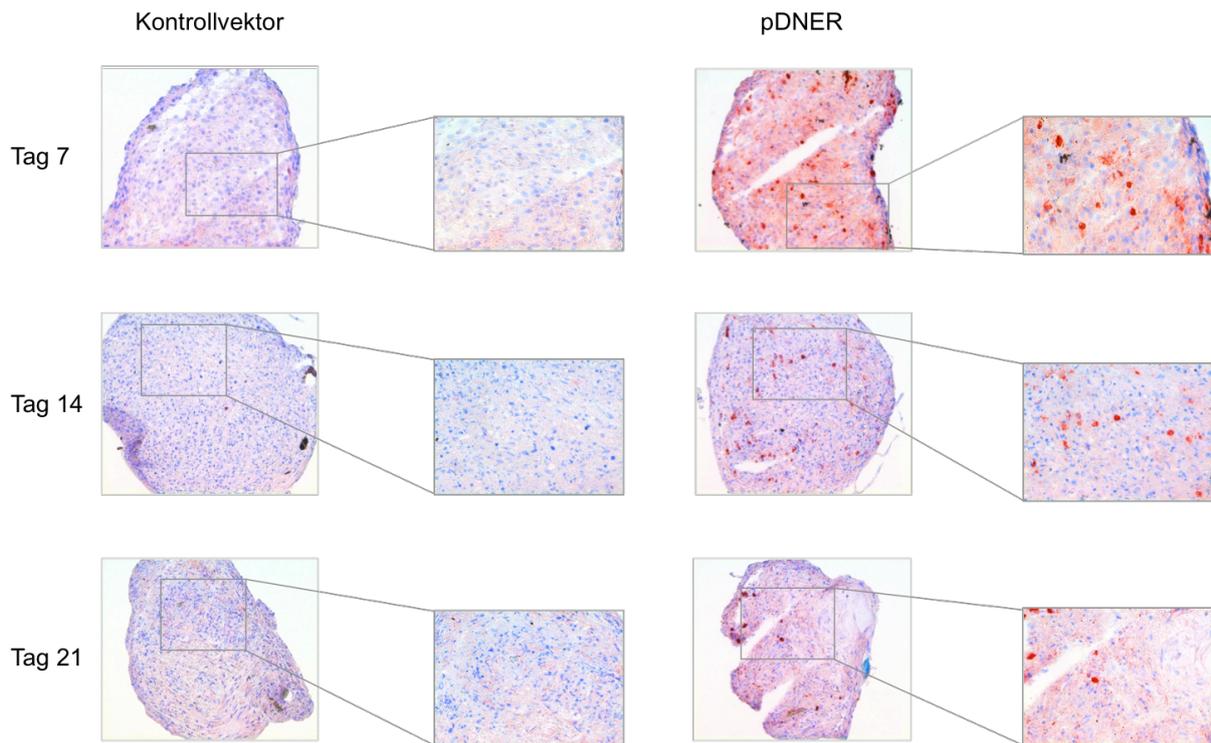
Um den Einfluss von DNER auf die Differenzierung der hMSCs zu untersuchen, wurden die Zellen vor Induktion der Chondrogenese entweder mit einem DNER exprimierendem Plasmid (pDNER) oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Die nukleofizierten hMSCs wurden 24h in einer Monolayerkultur mit MSCGM Wachstumsmedium kultiviert, bevor sie zu hMSC-Pellets zentrifugiert und für weitere 28 Tage mit MSC Differenzierungsmedium kultiviert worden sind. Nach 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden die Pellets entnommen und in OCT Tissue Tek® eingefroren. Für die histologischen Untersuchungen wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Auswertung der Färbungen wurde mittels ImageJ generiert. Untersucht wurden insgesamt fünf Populationen (Passage 6). Es konnte beobachtet werden, dass einige Pellets von Tag 28 nekrotische Areale besaßen, und somit nicht für die Analyse verwendet werden konnten. Die Auswertung der hMSC Differenzierung wurde bis einschließlich Tag 21 bewertet.

#### 4.6.2.1 Immunhistochemische Färbung von DNER in den hMSC-Pellets

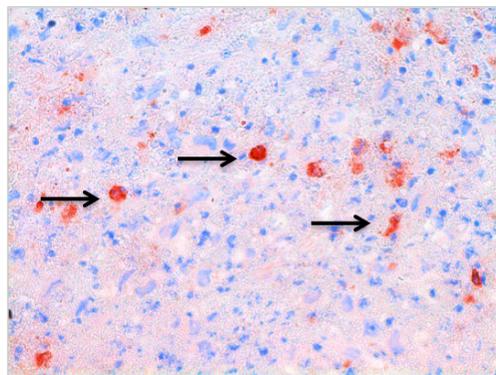
Die immunhistochemische Färbung von DNER erfolgte mit einem humanen anti-DNER Antikörper. In Abb. 31 A ist exemplarisch eine immunhistochemische Färbung von DNER in den hMSC-Pellets im Zeitverlauf dargestellt. Anhand der 40fachen Vergrößerung eines Pellets (Abb. 31 B; Tag 14 der pDNER nukleofizierten Zellen) ist die starke Rotfärbung als Marker für die DNER exprimierenden Zellen zu erkennen. Mittels ImageJ Bildanalyse konnte eine Überexpression von DNER in den DNER nukleofizierten Zellen nachgewiesen werden, welche an den Tagen 7 und 14 statistisch signifikant war (\*  $p \leq 0,05$ ) (Abb. 32; Tabelle 34).

## ERGEBNISSE

### A

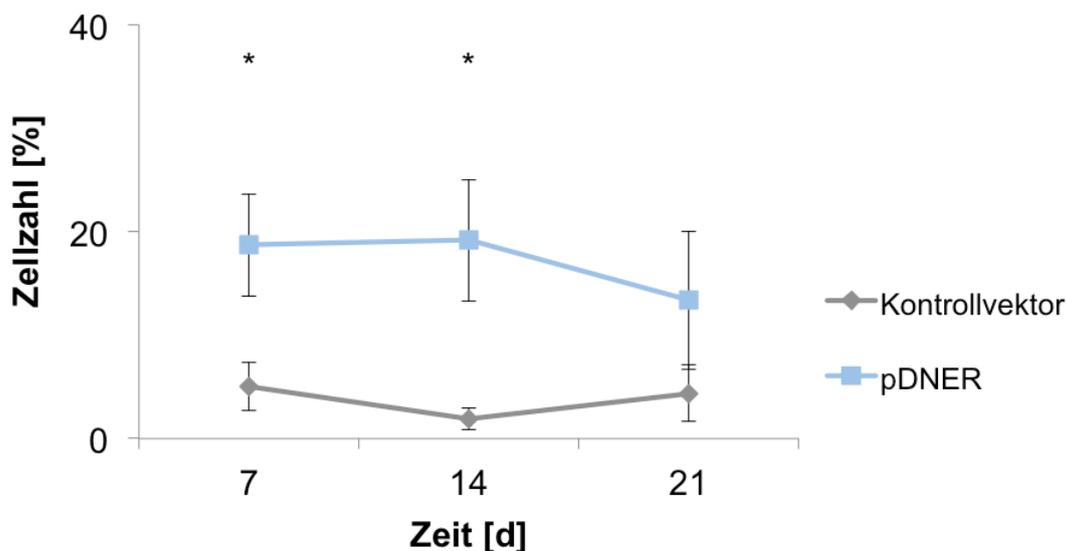


### B



**Abb. 31:** Immunohistochemische Färbung von DNER in den hMSCs, während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. A) Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Pellets mit einem anti-DNER Antikörper gefärbt. B) Die 40fache Vergrößerung zeigt exemplarisch die stark rot gefärbten DNER exprimierenden Zellen (schwarze Pfeile).

## ERGEBNISSE



**Tab. 34:** Gesamtzellzahl der DNER überexprimierenden Zellen innerhalb der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Gesamtzellzahl der DNER exprimierende Zellen				
Tag	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
7	19±5	5±2	<b>0,017</b>	5
14	19±6	2±1	<b>0,038</b>	5
21	13±7	4±3	0,291	5

**Abb. 32 und Tabelle 34:** Bildanalyse der immunhistochemischen Färbung von DNER in den hMSCs, während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Anhand der Auswertung von fünf Populationen konnte eine signifikant höhere Menge an DNER exprimierenden Zellen an den Tagen 7 und 14 in den pDNER-Pellets im Vergleich zu den Kontrollvektor-Pellets gezählt werden; \*  $p \leq 0,05$ .

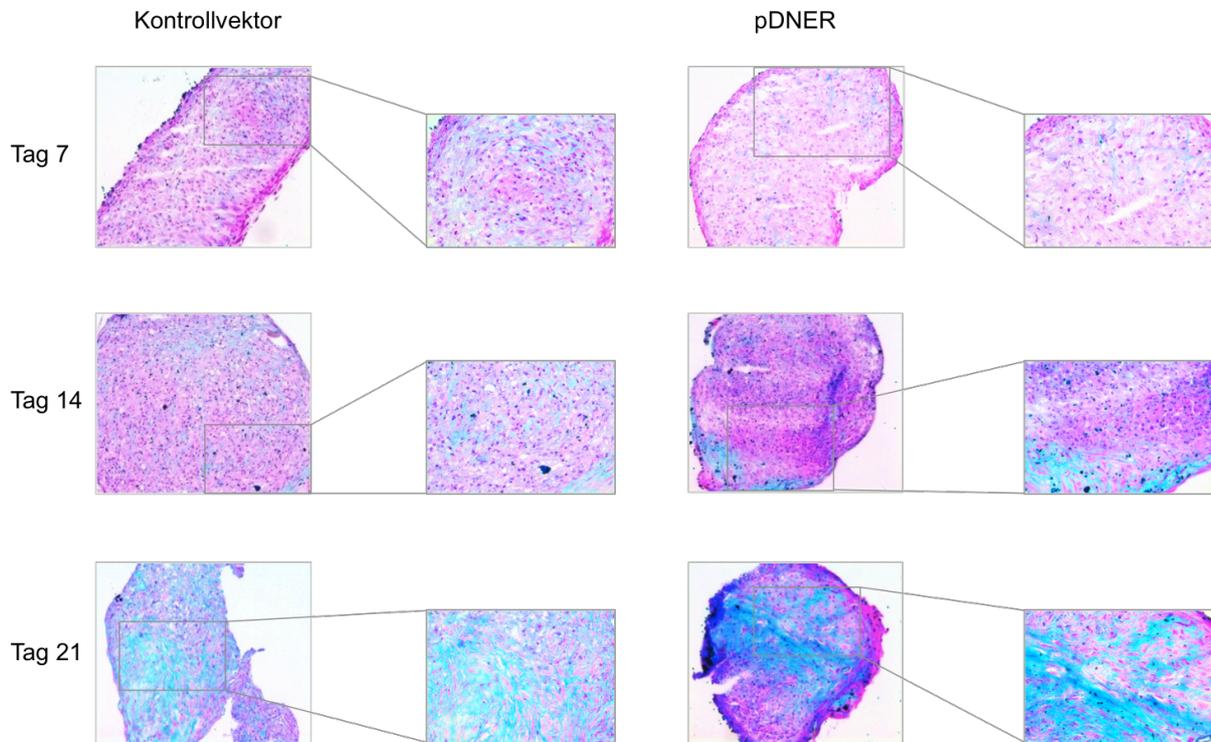
### 4.6.2.2 Histologische Analyse der Glykosaminoglykan-Expression

Um den Einfluss von DNER auf die Chondrogenese und somit auf Stoffwechselprodukte der Knorpelmatrix zu untersuchen, wurden die pDNER und Kontrollvektor nukleofizierten Pellets mittels Alcianblau gefärbt. Alcianblau färbt die Glykosaminoglykane (GAGs) der Matrix an. Abb. 33 A zeigt exemplarisch die histologische Alcianblau-Färbung der Pellets von Tag 7 bis Tag 21. Wie anhand der repräsentativen Bilder dargestellt, steigt die GAG-Expression während der Chondrogenese an. Anhand der 40fachen Vergrößerung in Abb. 33 B (Tag 21 der mit Kontrollvektor nukleofizierten Zellen) kann man die blau gefärbten Areale im Detail erkennen. Die Bildanalyse ergab, dass kein Expressionsunterschied zwischen den pDNER

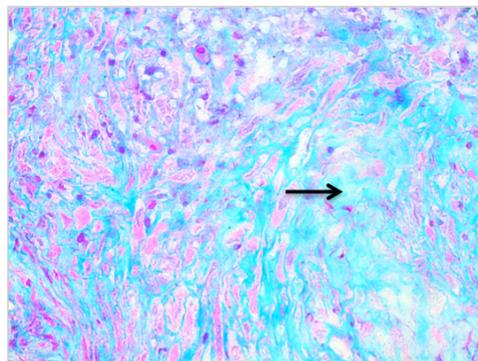
## ERGEBNISSE

und den Kontrollvektor nukleofizierten Pellets nachgewiesen werden konnte (Abb 34; Tabelle 35).

### A

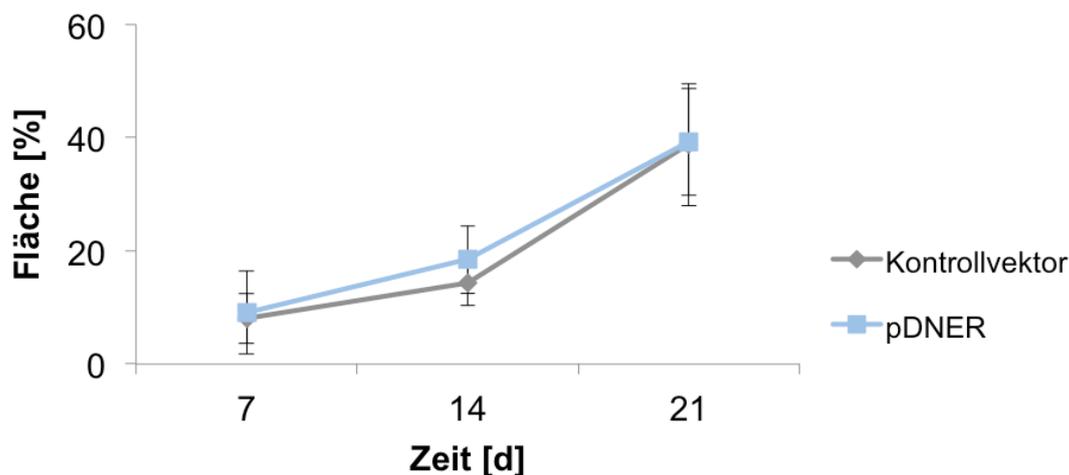


### B



**Abb. 33:** Alcianblau-Färbung der hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. A) Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Pellets mit Alcianblau angefärbt um die Glykosaminoglykane (GAG) der Matrix zu detektieren. B) Die 40fache Vergrößerung zeigt exemplarisch die hellblau gefärbten Areale im Detail (schwarzer Pfeil).

## ERGEBNISSE



**Tab. 35:** Prozentuale Gesamtfläche der Alcianblau gefärbten hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Alcianblau-Färbung [%]				
Tag	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
7	9±7	8±4	0,789	5
14	18±6	14±4	0,264	5
21	39±9	39±11	0,957	5

**Abb. 34 und Tabelle 35:** Bildanalyse der Alcianblau gefärbten hMSC-Pellets, während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Bei der Auswertung von fünf Populationen konnten keine signifikanten Unterschiede der GAG-Expression zwischen den pDNER-Pellets und den Kontrollvektor-Pellets nachgewiesen werden. Bei beiden Ansätzen erhöhte sich die GAG-Sezernierung konstant bis Tag 21.

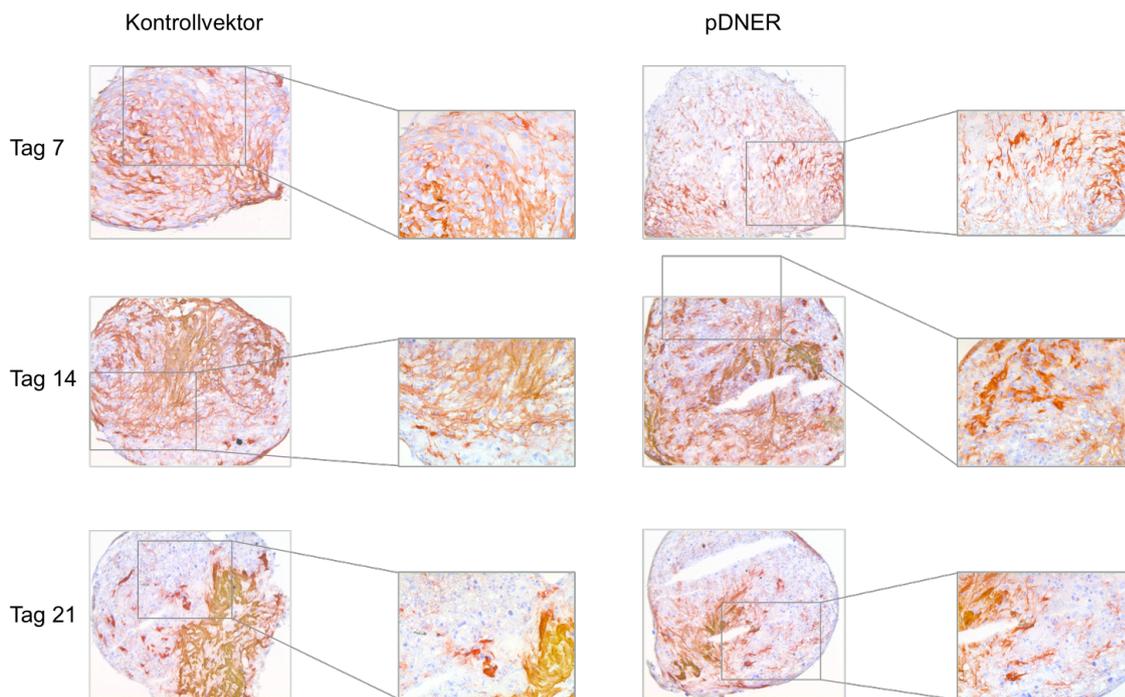
### 4.6.2.3 Immunhistochemische Analyse der Kollagen Typ I Expression

Kollagen Typ I ist ein typischer MSC-Marker und wird zu Beginn der Chondrogenese stark exprimiert. Mit zunehmendem Differenzierungsstadium sollte die Expression von Kollagen Typ I reduziert werden (4.6.1). Um zu überprüfen, welchen Einfluss die DNER Überexpression auf Kollagen Typ I hat, wurden die Gewebeschnitte mit einem humanen anti-Kollagen Typ I Antikörper immunhistochemisch gefärbt. In Abb. 35 A ist repräsentativ der histologische Zeitverlauf einer Population dargestellt. Die 40fache Vergrößerung eines Pellets (Tag 7 der mit Kontrollvektor nukleofizierten Zellen) zeigt die Kollagen Typ I Färbung der Matrix im Detail (Abb. 35 B). Bei den Kontrollvektor und pDNER nukleofizierten Zellen waren die Pellets von Tag 7 stark Kollagen Typ I gefärbt und die Färbung der Matrix war in

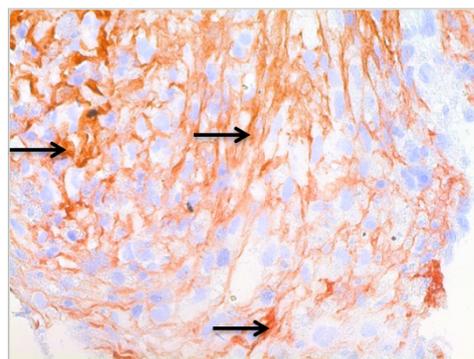
## ERGEBNISSE

beiden Proben relativ homogen in den Pellets verteilt. An Tag 14 war die Kollagen Typ I Expression nicht mehr homogen, sondern intensivierte sich in einigen Pellet-Arealen. An Tag 21 konnte Kollagen Typ I nur noch vereinzelt in kleineren Bereichen der Pellets nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen exprimierten die pDNER nukleofizierten Zellen an den Tagen 7 und 14 eine geringere Menge an Kollagen Typ I, wohingegen das Expressionslevel an Tag 21 annähernd gleich war (Abb. 36; Tabelle 36).

### A

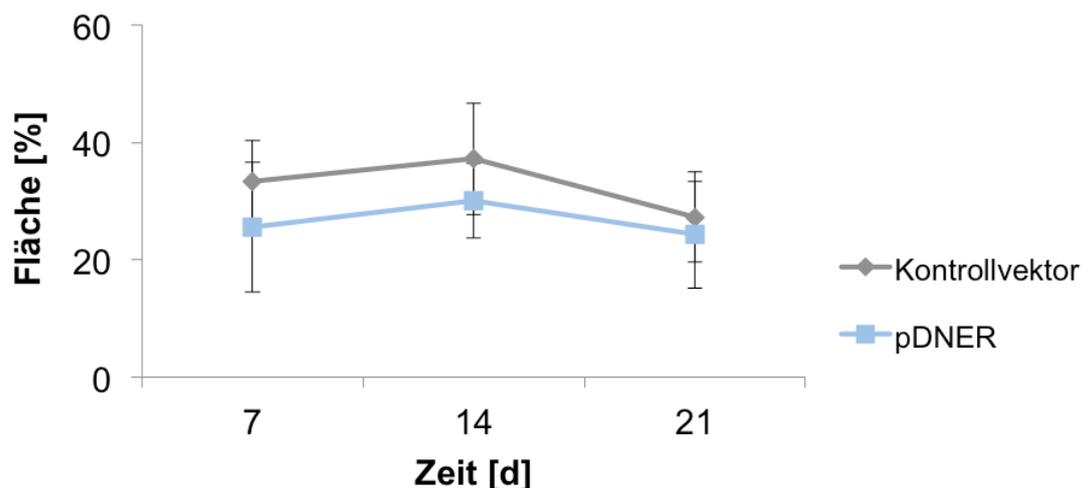


### B



**Abb. 35:** Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ I in den hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. A) Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Pellets anhand eines anti-Kollagen Typ I Antikörpers immunhistochemisch untersucht. B) Die 40fache Vergrößerung zeigt die rote Kollagen Typ I Färbung der Matrix im Detail (schwarze Pfeile).

## ERGEBNISSE



**Tab. 36:** Prozentuale Gesamtfläche der Kollagen Typ I gefärbten hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Kollagen Typ I-Färbung [%]				
Tag	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
7	26±7	33±11	0,398	5
14	30±10	37±6	0,269	5
21	24±7	27±9	0,421	5

**Abb. 36 und Tabelle 36:** Bildanalyse der Alcianblau gefärbten hMSC-Pellets, während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Bei der Untersuchung von fünf Populationen konnte kein signifikanter Unterschied der Kollagen Typ I Expression zwischen den pDNER-Pellets und den Kontrollvektor-Pellets nachgewiesen werden. Insgesamt reduzierte sich die Menge an sezerniertem Kollagen Typ I bis Tag 21.

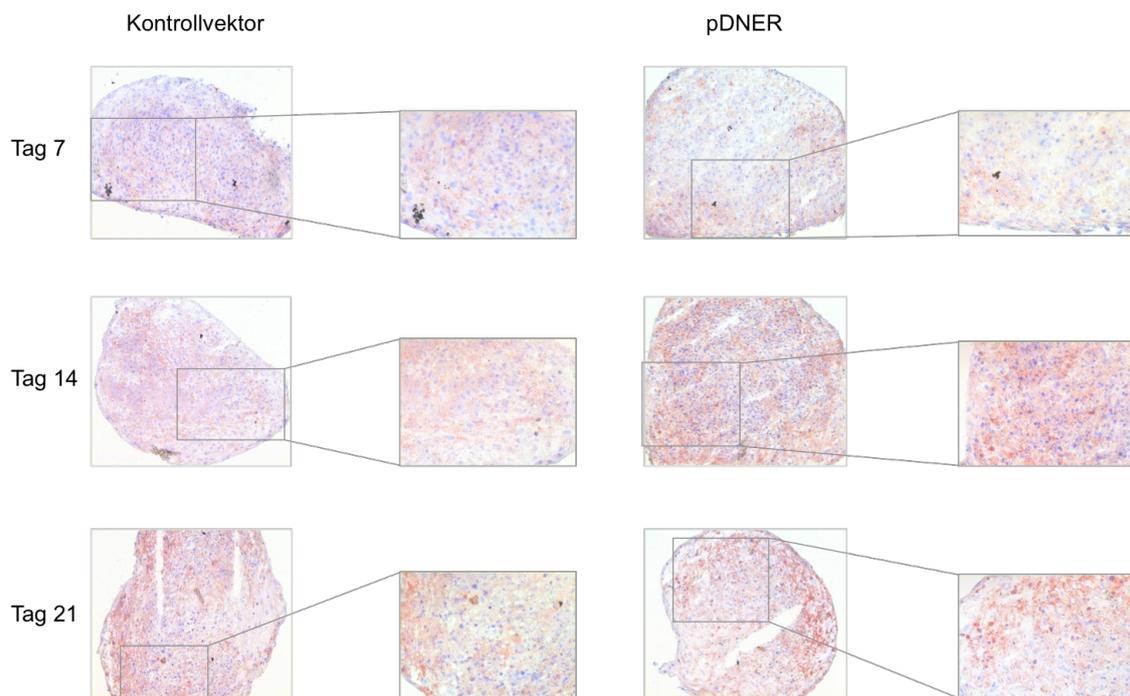
### 4.6.2.4 Immunhistochemische Analyse der Kollagen Typ X Expression

Kollagen Typ X wird überwiegend von kalzifizierten Chondrozyten exprimiert und ist ein Marker für die Hypertrophie der Zellen (Mayne, 1989). Bei der Chondrogenese von hMSCs wird Kollagen Typ X in verschiedenen Differenzierungsstadien exprimiert (Barry, 2001). Um den Einfluss von pDNER auf die Kollagen Typ X Expression zu untersuchen, wurden die pDNER und die Kontrollvektor nukleofizierten hMSC-Pellets mit einem humanen anti-Kollagen Typ X Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Der repräsentative Zeitverlauf einer Population ist in Abb. 37 A dargestellt. Die 40fache Vergrößerung eines Pellets (Tag 14 der mit pDNER nukleofizierten Zellen) zeigt die Kollagen Typ X Färbung im Detail (Abb. 37 B). Während an Tag 7 die Matrix sowohl in den pDNER als auch in den

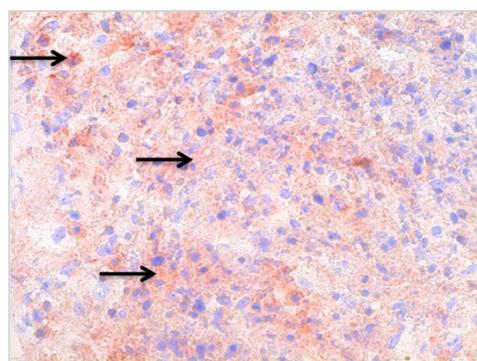
## ERGEBNISSE

Kontrollvektor nukleofizierten Pellets relativ homogen Kollagen Typ X gefärbt war, verteilte sich die Färbung an den Tagen 14 und 21 eher in den Randbereichen der Pellets. Die Bildanalyse der beiden Ansätze ergab, dass die DNER überexprimierenden Zellen eine stärkere Kollagen Typ X Expression zu allen Zeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen aufweisen konnten (Abb. 38; Tabelle 37). Zusätzlich kann man erkennen dass bei den Kontrollvektor nukleofizierten Zellen die Färbung konstant von Tag 7 bis Tag 21 anstieg, wohingegen bei den pDNER behandelten Zellen eine maximale Expression an Tag 14 nachgewiesen werden konnte.

### A

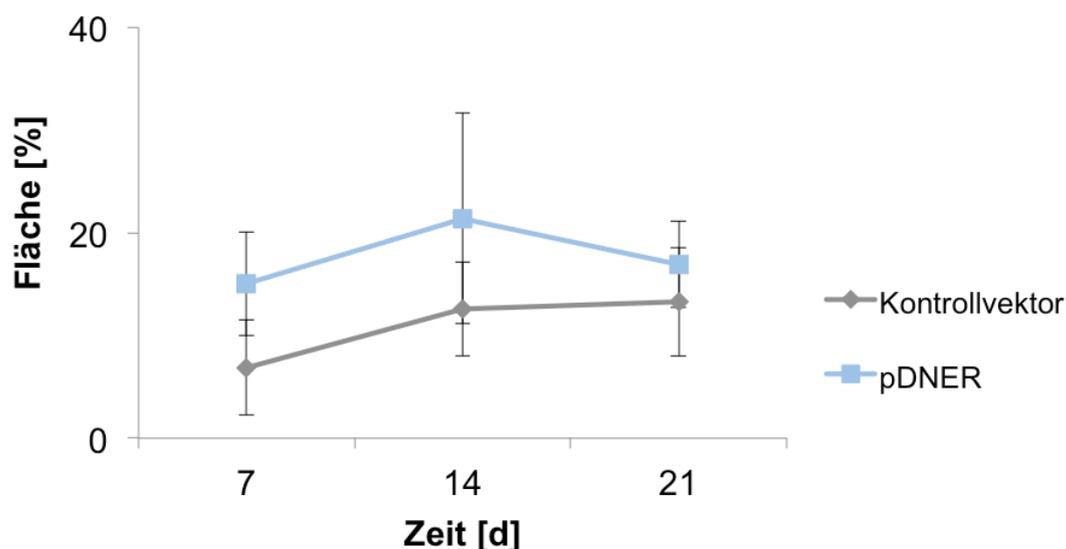


### B



**Abb. 37:** Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ X in den hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. A) Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Pellets anhand eines anti-Kollagen Typ X Antikörpers immunhistochemisch untersucht. B) Die 40fache Vergrößerung zeigt die Kollagen X Färbung der Matrix im Detail (schwarze Pfeile).

## ERGEBNISSE



**Tab. 37:** Prozentuale Gesamtfläche der Kollagen Typ X gefärbten hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Kollagen Typ X-Färbung [%]				
Tag	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
7	15±5	7±5	0,114	5
14	21±10	12±5	0,263	5
21	17±4	13±5	0,344	5

**Abb. 38 und Tabelle 37:** Bildanalyse der Kollagen Typ X Färbung in den hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Die Auswertung von fünf Populationen zeigte während des gesamten Zeitverlaufs eine stärkere Kollagen Typ X Expression in den pDNER-Pellets im Vergleich zu den Kontrollvektor-Pellets.

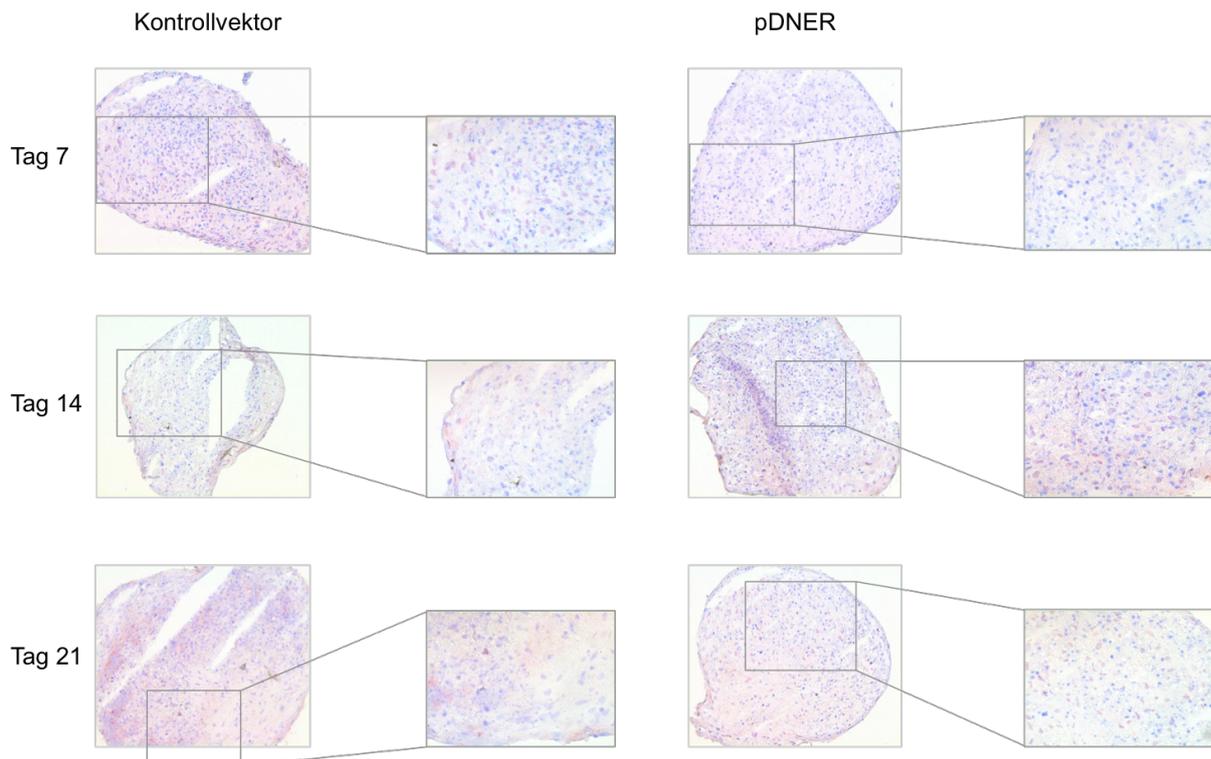
### 4.6.2.5 Immunhistochemische Analyse der Sox9 Expression

Der Transkriptionsfaktor Sox9 wird zu Beginn der Chondrogenese stark exprimiert, um die Expression von typischen Matrixproteinen wie beispielsweise Kollagen Typ II und Aggrecan zu initiieren (Lefebvre *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1997; Sekiya *et al.*, 2000). Des Weiteren supprimiert Sox9 die Hypertrophie der Chondrozyten, weshalb die Expression des Transkriptionsfaktors gegen Ende der Chondrogenese reduziert wird (Bell *et al.*, 1997; Lefebvre und Smits, 2005) (4.6.1). Um den Einfluss von pDNER auf die Sox9 Expression zu untersuchen, wurden die pDNER und die Kontrollvektor nukleofizierten hMSC-Pellets mit einem humanen anti-Sox9 Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Die repräsentative immunhistochemische Färbung der Pellets von einer Population zeigt, dass es bei den

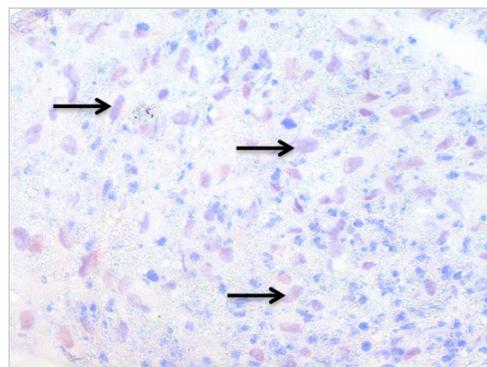
## ERGEBNISSE

Kontrollvektor behandelten Zellen zu einer typischen Abnahme im Zeitverlauf kommt, wohingegen die DNER überexprimierenden Zellen eine Zunahme bis Tag 14 und eine Runterregulierung bis Tag 21 aufweisen (Abb. 39 A). Die Rotfärbung der Sox9 exprimierenden Zellkerne ist 40fach vergrößert in Abb. 39 B dargestellt (Tag 7 der mit Kontrollvektor nukleofizierten Zellen; schwarze Pfeile). Die Expression von Sox9 war in den pDNER nukleofizierten Zellen an den Tagen 14 und 21 im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen erhöht (Abb. 40; Tabelle 38).

### A

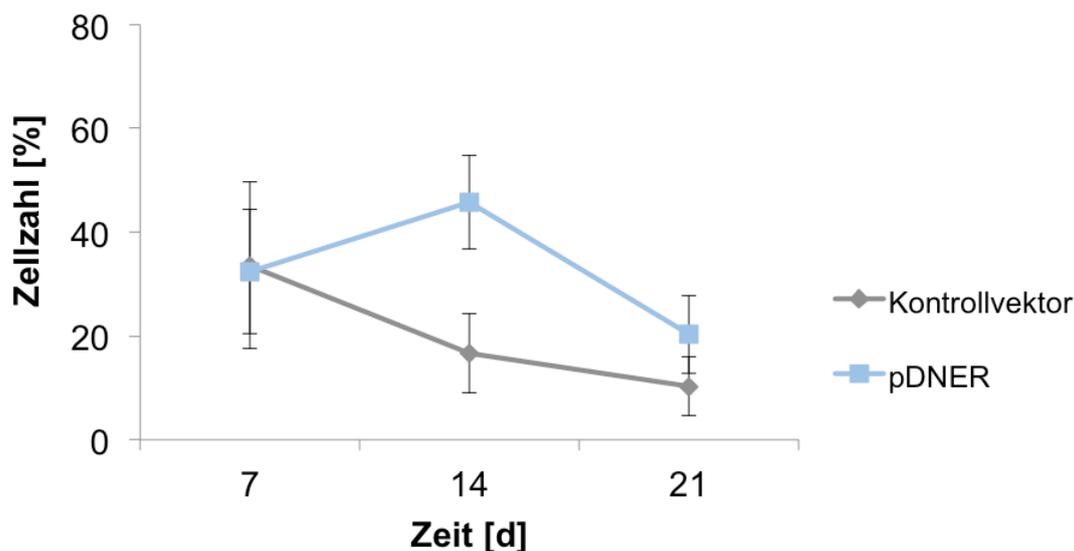


### B



**Abb. 39:** Immunhistochemische Färbung von Sox9 in den hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. A) Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Pellets mit einem anti-Sox9 Antikörper immunhistochemisch gefärbt. B) Die 40fache Vergrößerung zeigt die Sox9 exprimierenden, rötlich gefärbten Zellkerne im Detail (schwarze Pfeile).

## ERGEBNISSE



**Tab. 38:** Gesamtzellzahl der Sox9 gefärbten Zellen innerhalb der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Gesamtzellzahl der Sox9 exprimierende Zellen				
Tag	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
7	32±12	34±16	0,951	5
14	46±9	17±8	0,132	5
21	20±8	10±6	0,075	5

**Abb. 40 und Tabelle 38:** Bildanalyse der immunhistochemischen Färbung von Sox9 in den hMSCs während der chondrogenen Differenzierung in einer Pellet-Kultur. Die Zellen wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Die Auswertung der Ergebnisse von fünf Populationen zeigte, dass es insgesamt zu einer Reprimierung von Sox9 im Zeitverlauf kam, die pDNER nukleofizierten Zellen an Tag 14 jedoch eine deutlich höhere Expression von Sox9 aufweisen konnten.

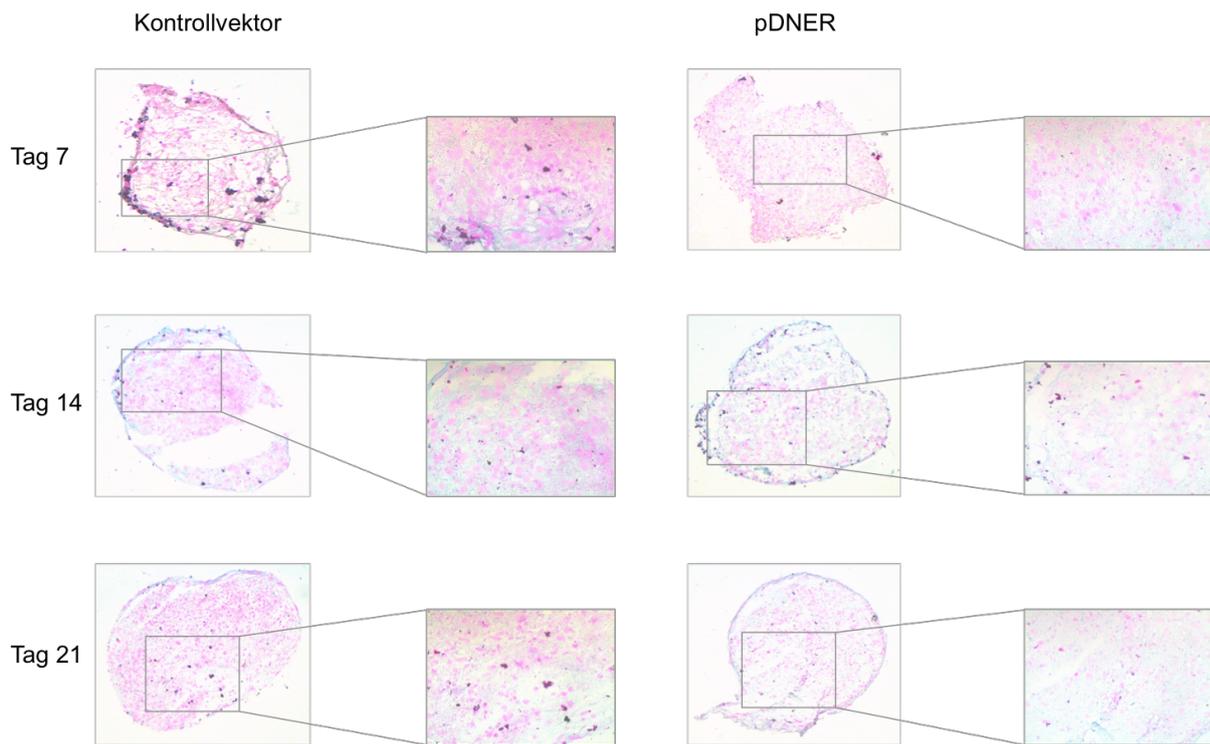
### 4.6.2.6 Analyse der Zellapoptose

Die Apoptose der Chondrozyten spielt eine wesentliche Rolle bei der Chondrogenese. Hierbei induzieren die hypertrophen Chondrozyten die Mineralisierung des Knorpels um anschließend in die Apoptose überzugehen und von migrierenden Osteoklasten und Osteoblasten ersetzt zu werden (Brochhausen *et al.*, 2009). Die Apoptose der Chondrozyten gehört zusätzlich zu den pathologischen Befunden der OA, weshalb der Einfluss von DNER auf die Apoptose der Zellen untersucht werden sollte (Horton *et al.*, 2005). Hierfür wurden die Apoptose-typischen Strangbrüche der DNA innerhalb des Zellkerns anhand eines sogenannten TUNEL-Assay immunhistochemisch angefärbt. Der repräsentative Zeitverlauf

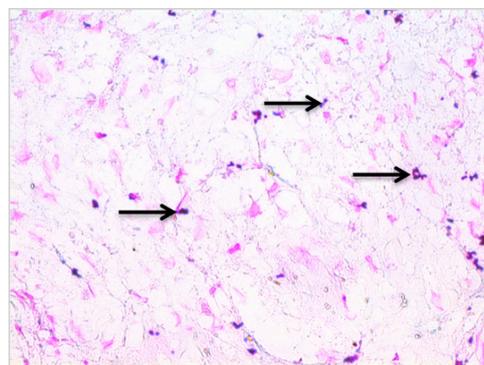
## ERGEBNISSE

von einer hMSC-Population demonstriert eine eher diffuse Verteilung der apoptotischen Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 41 A). In Abb. 41 B sind die blau angefärbten DNA-Strangbrüche 40fach vergrößert dargestellt (Tag 21 der mit Kontrollvektor nukleofizierten Zellen). Die Bildanalyse ergab, dass bei den Kontrollvektorzellen eine tendenzielle Abnahme der apoptotischen Zellen beobachtet werden konnte, wohingegen die Anzahl an apoptotischen Zellen in den DNER überexprimierenden Pellets an Tag 14 am höchsten war (Abb. 42; Tabelle 39).

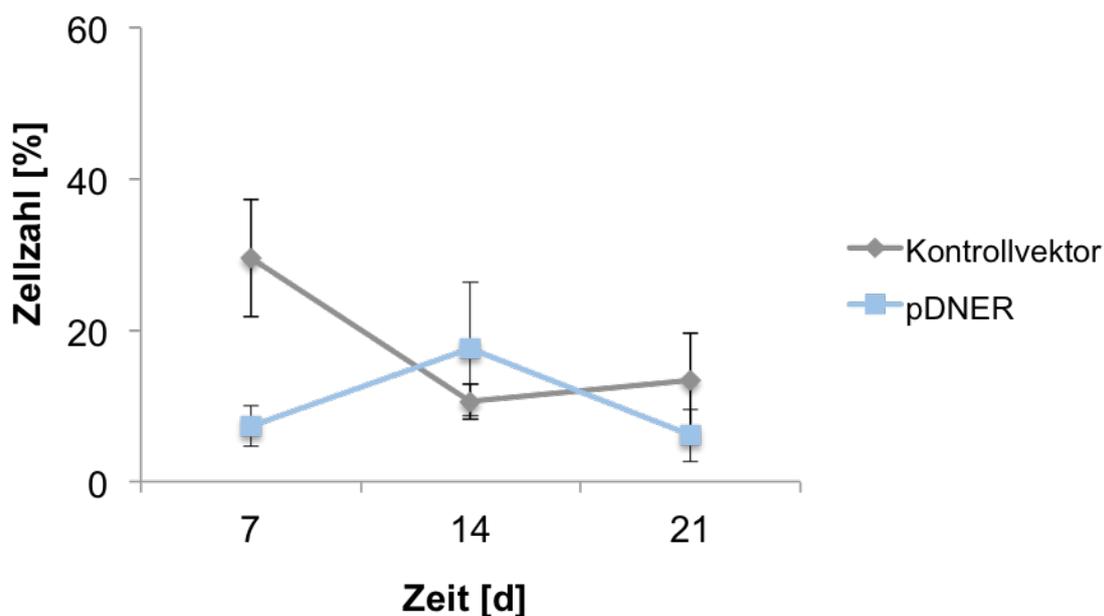
### A



### B



**Abb. 41:** TUNEL-Assay zur Bestimmung der Anzahl an apoptotischen hMSCs während der chondrogenen Differenzierung. Die hMSC-Pellets wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. A) Nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Zellkerne von apoptotischen hMSCs, anhand der im Kit enthaltenen Reagenzien immunhistochemisch analysiert. B) Die 40fache Vergrößerung zeigt deutlich die dunkelblau gefärbte DNA der apoptotischen Zellen (schwarzen Pfeile)



**Tab. 39:** Gesamtzellzahl der apoptotischen Zellen innerhalb der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Gesamtzellzahl der apoptotischen Zellen				
Tag	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
7	7±3	30±8	0,107	3
14	18±9	11±2	0,449	3
21	6±4	13±6	0,297	3

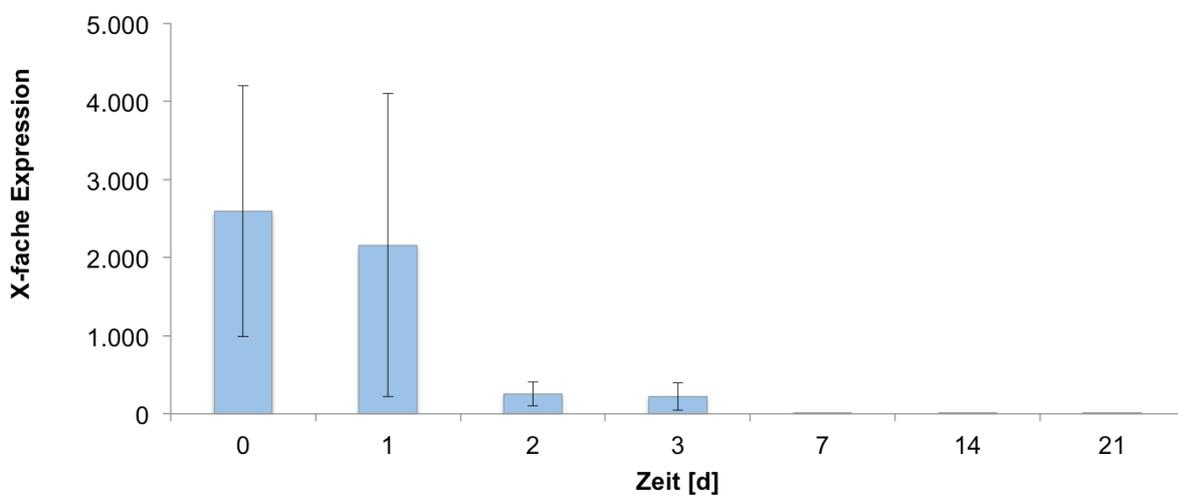
**Abb. 42 und Tabelle 39:** Bildanalyse der apoptotischen hMSCs während der chondrogenen Differenzierung. Die hMSC-Pellets wurden 24h vor Differenzierungsbeginn entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert. Die Auswertung der Ergebnisse von drei Populationen zeigte, dass es bei den Kontrollvektor transfizierten Pellets zu einer Abnahme an apoptotischen Zellen kam, wohingegen bei den pDNER-Pellets die Anzahl an apoptotischen Zellen an Tag 14 am höchsten war.

#### 4.6.3 Überexpression der DNER mRNA während der *in vitro* Chondrogenese

Für die Überexpression von DNER wurde das DNER exprimierende Plasmid (pDNER) in die hMSCs nukleofiziert. Das Plasmid wurde mit einer Codon-optimierten Sequenz von DNER konstruiert (4.3.4) und die Expression dieser veränderten DNA mit den entsprechenden *Primern* DNERopt (2.12, Tabelle 14; LB76 und LB77) nachgewiesen. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit einem Kontrollvektor nukleofiziert worden sind (4.3.4). Da diese Zellen lediglich DNER mRNA mit WT Sequenz transkribieren, wurde die DNER Expression in

## ERGEBNISSE

diesen Zellen mit DNER-WT *Primern* (2.12, Tabelle 14; DNER-MG for und rev) gemessen. Verglichen wurde somit die DNER-WT Expression der Kontrollvektorzellen mit der DNERopt Expression der pDNER Zellen. Wie in Abb. 43 dargestellt, ist 24h nach der Nukleofektion (Tag 0) die DNER Expression um das  $2595 \pm 1604$ fache im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen erhöht, wohingegen einen Tag nach Differenzierungsbeginn (Tag 1) die Expression bei  $2159 \pm 1940$ fach lag. Im Zeitverlauf konnte eine kontinuierliche Abnahme der Expressionsrate beobachtet werden: 2d  $250 \pm 152$ fach, 3d  $218 \pm 177$ fach, 7d 4fach, 14d 3fach und 21d 1fach. Für die Zeitpunkte 0d bis 3d wurden drei Populationen pro Zeitpunkt kalkuliert, während für die Zeitpunkte 7d bis 21d lediglich zwei Populationen zur Verfügung standen.



**Abb. 43:** Semi-quantitative *real-time* PCR Analyse der DNER mRNA Expression in humanen mesenchymalen Stammzellen nach der Nukleofektion von pDNER und im Verlauf der Chondrogenese. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die DNER Expression während der Chondrogenese analysiert. Der Graph repräsentiert die x-fache Expressionsänderung im Zeitverlauf [d]. Zum Zeitpunkt 0 (24h nach Nukleofektion und vor Differenzierungsbeginn) war die DNER Expression am höchsten. Die Expressionsrate nahm konstant während des Zeitverlaufs ab. Für die Zeitpunkte 0d bis 3d standen drei und für die Zeitpunkte 7d bis 21d zwei Populationen zur Verfügung.

### 4.6.4 mRNA Expression von chondrogenen Stoffwechselfparametern

Um den Einfluss von DNER auf die Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen, sollte neben der histologischen Untersuchung auch die mRNA Expression von unterschiedlichen Kandidatengenen untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.6.2 beschrieben, entweder mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und an den Tagen 0, 1, 2, 3, 7, 14 und 21 die RNA der Pellets isoliert. Der Zeitpunkt Null beschreibt den Zustand der Zellen 24h nach Nukleofektion und vor der

## ERGEBNISSE

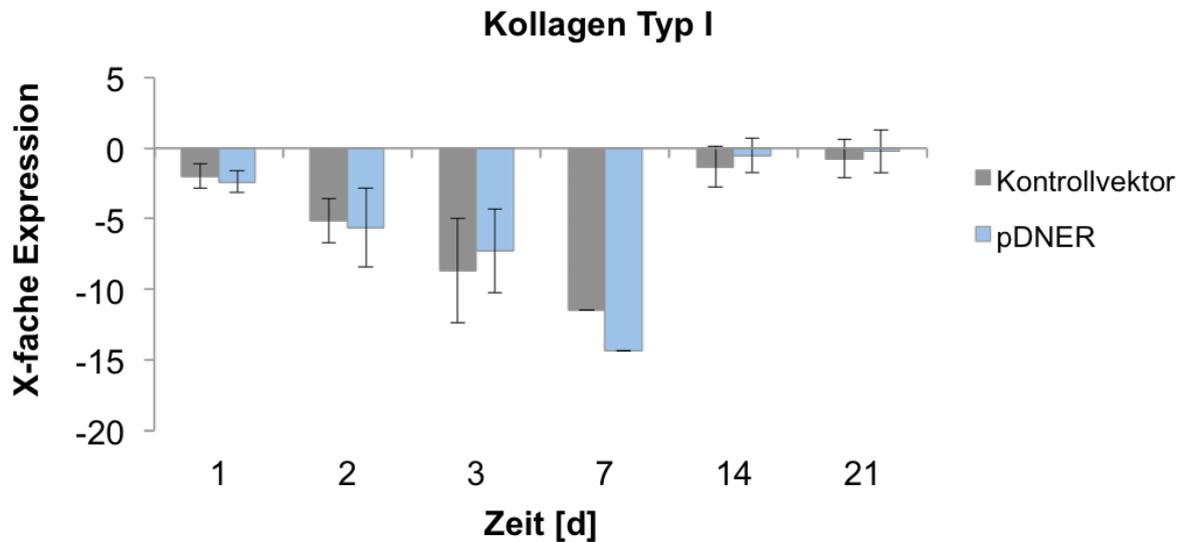
Zugabe vom Differenzierungsmedium und Zeitpunkt 1 den Zustand 24h nach Differenzierungsbeginn (3.6). Die Expressionsänderungen der Kandidatengene von pDNER- und Kontrollvektor-Pellets wurden zu den Zeitpunkten 1d - 21d jeweils mit dem Zeitpunkt vor Differenzierungsbeginn (Zeitpunkt 0) verglichen. Es wurde eine semi-quantitative *real-time* PCR durchgeführt und die x-fachen Expressionsänderungen anhand der delta-delta ct-Werte berechnet. Als Referenzgen wurde 18s rRNA verwendet. Zwei bis drei Populationen standen für die Analyse zur Verfügung. Untersucht wurden typische anabole und katabole Stoffwechselfparameter des Knorpels, sowie Genkandidaten des Notch-Signalwegs, da DNER als Ligand des Notch-Rezeptors identifiziert werden konnte (Eiraku *et al.*, 2005). Zusätzlich wurde auch die Expression von  $\beta$ -Catenin untersucht, einem wichtigen Vertreter des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs. Der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der OA zu spielen, indem die Aktivierung der Signalkaskade eine Progression der Knorpeldestruktion verursacht (Blom *et al.*, 2009; Geyer *et al.*, 2009).

### 4.6.4.1 Kollagen Typ I mRNA Expression

Kollagen Typ I ist ein MSC Marker der vor allem zu Beginn der Chondrogenese exprimiert wird (4.6.1) und dessen Expressionsänderung unter dem Einfluss von DNER untersucht werden sollte. In Tabelle 40 sind die Kollagen Typ I mRNA Expressionsunterschiede der Kontrollvektor und der pDNER nukleofizierten hMSC-Pellets von Tag 1 bis Tag 21 nach dem Differenzierungsbeginn dargestellt. Die graphische Darstellung (Abb. 44) zeigt, dass es im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor Differenzierungsbeginn (Zeitpunkt 0) in beiden Versuchsansätzen zu einer konstanten Reduktion der Kollagen Typ I Expression bis einschließlich Tag 7 kam. Zu den Zeitpunkten 14d und 21d war das Expressionsniveau vergleichbar mit dem von Zeitpunkt 0.

**Tab. 40:** Kollagen Typ I mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Kollagen Typ I mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	-2±0,86	-2,38±0,75	0,759	3
2	-5,16±1,56	-5,62±2,79	0,893	3
3	-8,66±3,7	-7,27±2,98	0,785	3
7	-11,46	-14,35	-	2
14	-1,33±1,45	-0,52±1,21	0,691	3
21	-0,75±1,35	-0,22±1,52	0,809	3



**Abb. 44:** Vergleich der Transkriptionslevel von Kollagen Typ I in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder dem Kontrollvektor nukleofiziert und die Kollagen Typ I Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 24 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Als Vergleichsprobe diente in beiden Fällen der Zeitpunkt vor Differenzierungsbeginn (Zeitpunkt 0). In beiden Versuchsansätzen war eine konstante Reduktion der Kollagen Typ I Expression inklusive Tag 7 detektierbar gewesen, wohingegen kein Expressionsunterschied im Vergleich zu dem Zeitpunkt 0 an den Tagen 14 und 21 beobachtet werden konnte.

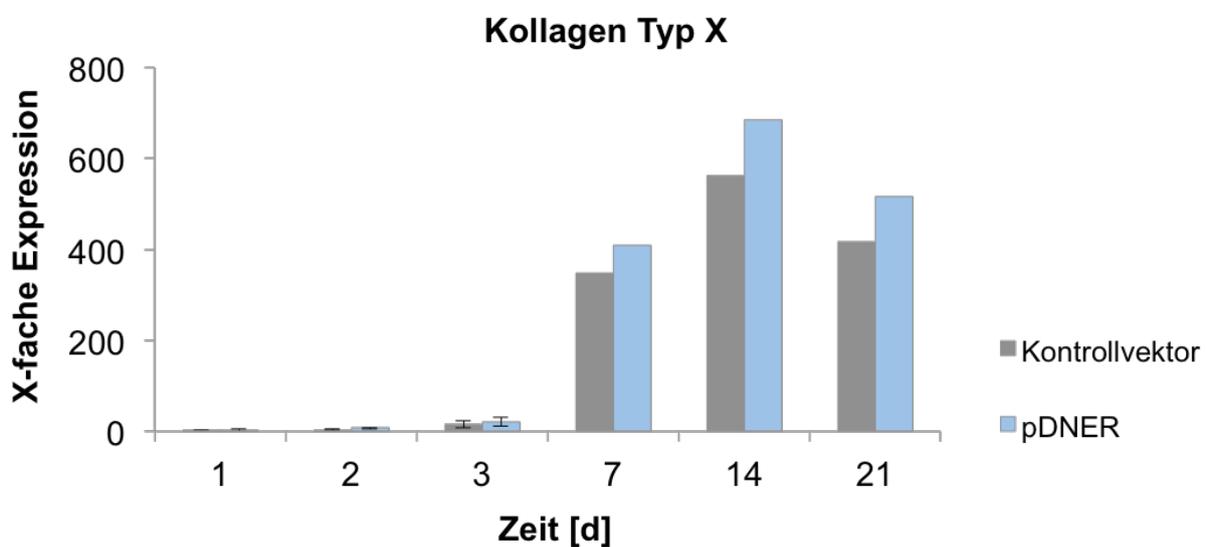
#### 4.6.4.2 Kollagen Typ X mRNA Expression

In Tabelle 41 sind die Kollagen Typ X mRNA Expressionsunterschiede der mit pDNER und Kontrollvektor nukleofizierten hMSC-Pellets zwischen Tag 1 und Tag 21 nach Differenzierungsbeginn dargestellt. Kollagen Typ X ist ein Marker für hypertrophe Chondrozyten und wird sowohl während der Chondrogenese als auch im kalzifizierten Knorpel stark exprimiert (Martinek, 2003; Lefebvre & Smits, 2005). Sowohl bei den Kontrollvektor- als auch bei den pDNER nukleofizierten Zellen ist eine Hochregulierung der Kollagen Typ X mRNA bis einschließlich Tag 14 zu beobachten gewesen. An Tag 21 sank die Expressionsrate in beiden Ansätzen. Zusätzlich konnte eine stärkere Kollagen Typ X Expression in den pDNER nukleofizierten hMSC-Pellets im Vergleich zu den Kontrollvektor-Pellets bei allen gemessenen Zeitpunkten beobachtet werden. In Abb. 45 ist die Kollagen Typ X mRNA Expression der beiden Ansätze zu den verschiedenen Zeitpunkten graphisch dargestellt.

## ERGEBNISSE

**Tab. 41:** Kollagen Typ X mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Kollagen Typ X mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	1,87±4,5	0,18±1,92	0,748	3
2	7,14±1,94	3,42±1,6	0,213	3
3	21,32±9,71	15,45±8,45	0,672	3
7	408,22	347,4	-	2
14	685,24	561,66	-	2
21	517,22	417,26	-	2



**Abb. 45:** Vergleich der Transkriptionslevel von Kollagen Typ X in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder dem Kontrollvektor nukleofiziert und die Kollagen Typ X Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Anhand des Graphen war eine konstante Erhöhung der Kollagen Typ X Expression einschließlich Tag 14 zu beobachten, welche sich an Tag 21 wieder reduzierte. Während des gesamten Zeitverlaufs war die Kollagen Typ X Expression der pDNER-Pellets im Vergleich zu den Kontrollvektor-Pellets erhöht.

### 4.6.4.3 MMP-13 mRNA Expression

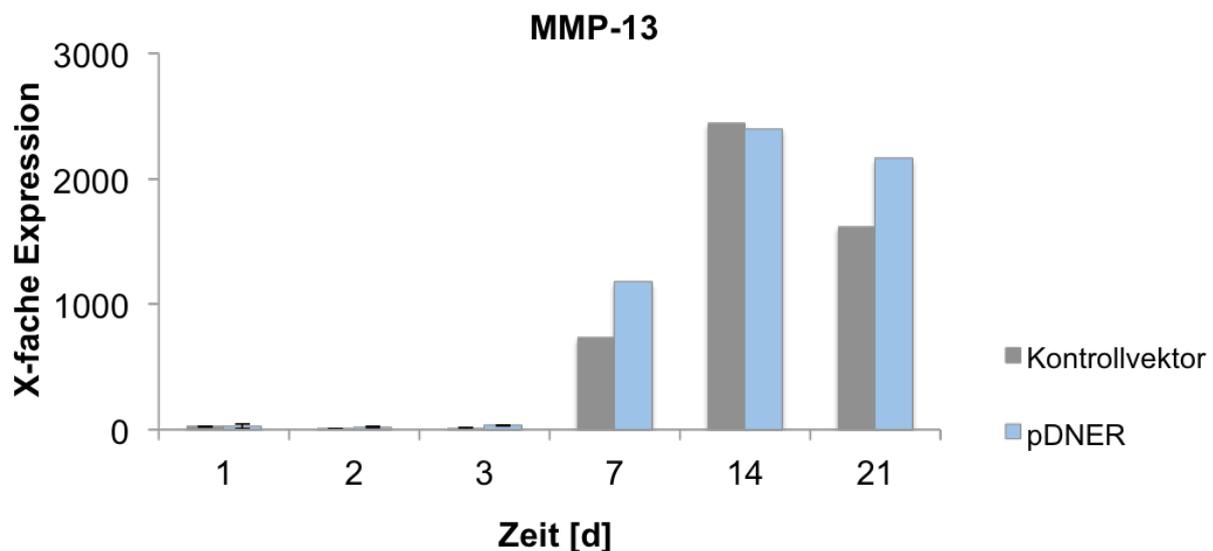
Wie in Tabelle 42 dargestellt, ergab die Analyse der MMP-13 mRNA Expression einen Tag nach Differenzierungsbeginn sowohl in den pDNER als auch in den Kontrollvektor nukleofizierten hMSC-Pellets eine ca. 25fach erhöhte Expression im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor Beginn der Chondrogenese (Tag 0). In den Kontrollvektorzellen nahm diese Hochregulierung an den Tagen 2 und 3 kontinuierlich ab, während sie bei pDNER an Tag 2

## ERGEBNISSE

ebenfalls herunter aber an Tag 3 wieder hochreguliert wurde. In beiden Versuchsansätzen wurde die MMP-13 mRNA an den Tagen 7 und 14 weiter hochreguliert, wohingegen sie an Tag 21 wieder abnahm. Zu den Zeitpunkten 2d, 3d, 7d und 21d wurde die MMP-13 mRNA der pDNER nukleofizierten Zellen stärker exprimiert als in den Kontrollvektorzellen. Die Transkriptionslevel der beiden Versuchsansätze sind graphisch in Abb. 46 dargestellt.

**Tab. 42:** MMP-13 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

MMP13 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	25,2±12,2	26,55±19,82	0,956	3
2	19,01±8,84	11,17±4,35	0,471	3
3	34,95±32,05	11,56±4,08	0,509	3
7	1180,21	733,63	-	2
14	2402,02	2446,07	-	2
21	2163,5	1617,92	-	2



**Abb. 46:** Vergleich der Transkriptionslevel von MMP-13 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die MMP-13 mRNA Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Zwischen Tag 1 und 3 schwankte die MMP-13 Expression bei den Kontrollvektorzellen zwischen 26fach und 11fach und bei den pDNER-Zellen zwischen 34fach und 19fach. In beiden Ansätzen stieg die MMP-13 Expression bis einschließlich Tag 14 und sank an Tag 21. Bis auf die Zeitpunkte 1d und 14d war die Expression der MMP-13 mRNA in den DNER überexprimierenden Zellen höher.

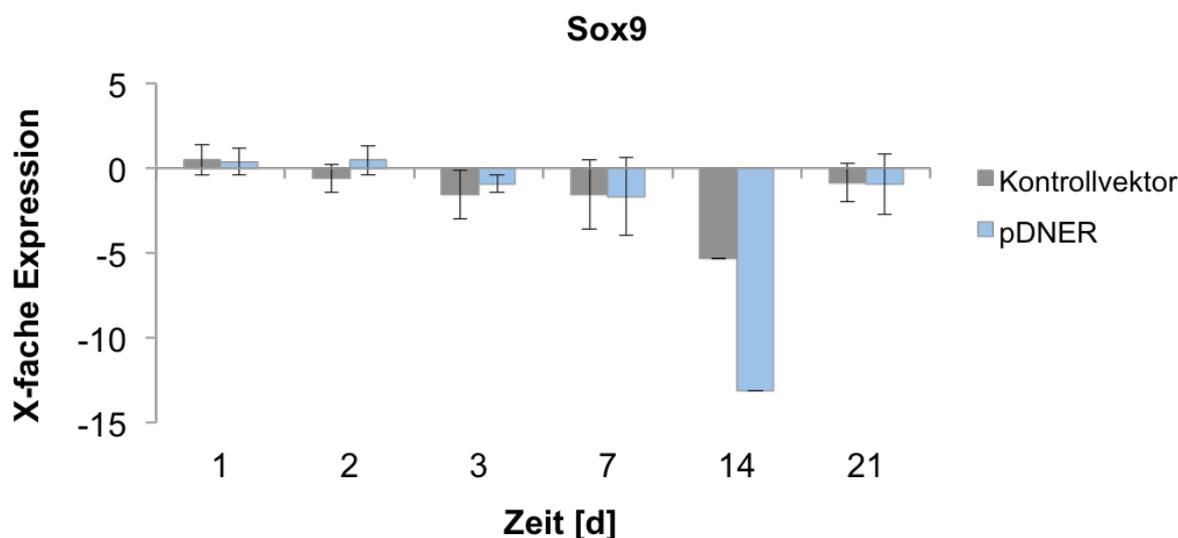
## ERGEBNISSE

### 4.6.4.4 Sox9 mRNA Expression

Im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor Differenzierungsbeginn (Zeitpunkt 0) war die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors Sox9 in beiden Versuchsansätzen (Kontrollvektor- und pDNER-Zellen) an Tag 1 annähernd gleich. Im weiteren Verlauf kam es zu einer konstanten Reprimierung von Sox9 in den Kontrollvektorzellen bis einschließlich Tag 14, wohingegen die Sox9 Expression an Tag 21 wieder auf das Anfangsniveau hochreguliert wurde. Die stärkste Reprimierung konnte an Tag 14 beobachtet werden. Bei den pDNER nukleofizierten Zellen erfolgte die Reprimierung der Sox9 mRNA erst ab Tag 3 und zeigte das niedrigste Niveau an Tag 14. Auch hier ging die Expression an Tag 21 auf das Anfangsniveau von Zeitpunkt 0 zurück. Beim Vergleich der beiden Ansätze konnte eine stärkere Abnahme der Sox9 mRNA in den pDNER nukleofizierten Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz zu den Zeitpunkten 7d, 14d und 21d beobachtet werden. Die Expressionsunterschiede liegen zusammengefasst in Tabelle 43 vor und sind graphisch in Abb. 47 dargestellt.

**Tab. 43:** Sox9 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Sox9 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	0,38±0,78	0,5±0,91	0,449	3
2	0,46±0,86	-0,62±0,83	0,897	3
3	-0,93±0,53	-1,57±1,41	0,959	3
7	-1,68±2,28	-1,54±2,05	0,924	3
14	-13,11	-5,33	-	2
21	-0,97±1,79	-0,85±1,15	0,25	3



**Abb. 47:** Vergleich der Transkriptionslevel von Sox9 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die Sox9 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. In beiden Versuchsansätzen konnte eine konstante Reprimierung der Sox9 mRNA im Zeitverlauf beobachtet werden mit der stärksten Herunterregulierung an Tag 14. An Tag 21 ging das Expressionsniveau in beiden Versuchsansätzen auf das Anfangsniveau (Zeitpunkt 0) zurück. Zwischen den Zeitpunkten 7d und 21d kam es zu einer stärkeren Reprimierung der Sox9 mRNA in den pDNER nukleofizierten Zellen.

#### 4.6.4.5 ADAMTS-4 mRNA Expression

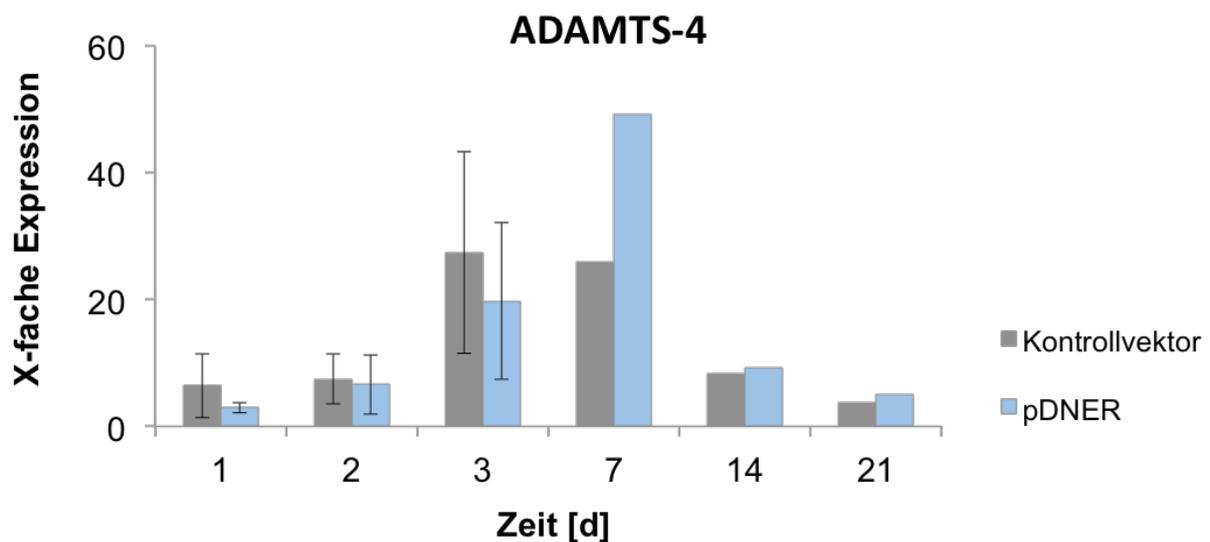
ADAMTS-4 gehört zu den matrixabbauenden Enzymen und ist neben ADAMTS-5 hauptverantwortlich für den Aggrecanabbau während der OA-Pathogenese (Malfait *et al.*, 2002; Sumer *et al.*, 2007). Auch während der *in vitro* Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen konnte die Expression der ADAMTS-4 mRNA nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine Überexpression des Enzyms im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Differenzierung beobachtet (Boeuf *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde die ADAMTS-4 mRNA Expression während der Chondrogenese in den Kontrollvektor- und DNER überexprimierenden Zellen untersucht. Anhand der Expressionsanalyse (Tabelle 44) konnte ein konstanter Anstieg der ADAMTS-4 Expression in den Kontrollvektorzellen zu den Zeitpunkten 1d bis 3d im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese (Zeitpunkt 0) beobachtet werden. Ab dem Zeitpunkt 7d sank die ADAMTS-4 Expression konstant ab, blieb allerdings bis einschließlich Tag 21 oberhalb des Anfangsniveaus von Zeitpunkt 0. Bei den pDNER nukleofizierten Zellen verhielt es sich sehr ähnlich mit dem Unterschied, dass die Überexpression der ADAMTS-4 mRNA bis einschließlich Tag 7 konstant anstieg und erst ab

## ERGEBNISSE

Tag 14 wieder herunter reguliert wurde. Während das Expressionslevel von ADAMTS-4 in den Kontrollvektorzellen zwischen den Zeitpunkten 1d und 3d höher war als in den pDNER-Zellen, konnte eine höhere Expression in den pDNER nukleofizierten Zellen zwischen 7d und 21d nachgewiesen werden. Graphisch sind die Expressionsunterschiede von ADAMTS-4 in Abb. 48 dargestellt.

**Tab. 44:** ADAMTS-4 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

ADAMTS-4 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	2,98±0,82	6,42±5,02	0,536	3
2	6,61±4,67	7,49±3,98	0,893	3
3	19,79±12,35	27,4±15,87	0,724	3
7	49,15	25,93	-	2
14	9,25	8,34	-	2
21	5	3,75	-	2



**Abb. 48:** Vergleich der Transkriptionslevel von ADAMTS-4 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die ADAMTS-4 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Bei beiden Versuchsansätzen kam es während des Zeitverlaufs zunächst zu einem kontinuierlichen Anstieg der ADAMTS-4 Expression, welche gegen Ende der Chondrogenese bei den Kontrollvektorzellen ab Tag 7 und bei den pDNER-Zellen ab Tag 14 wieder herunter reguliert wurde.

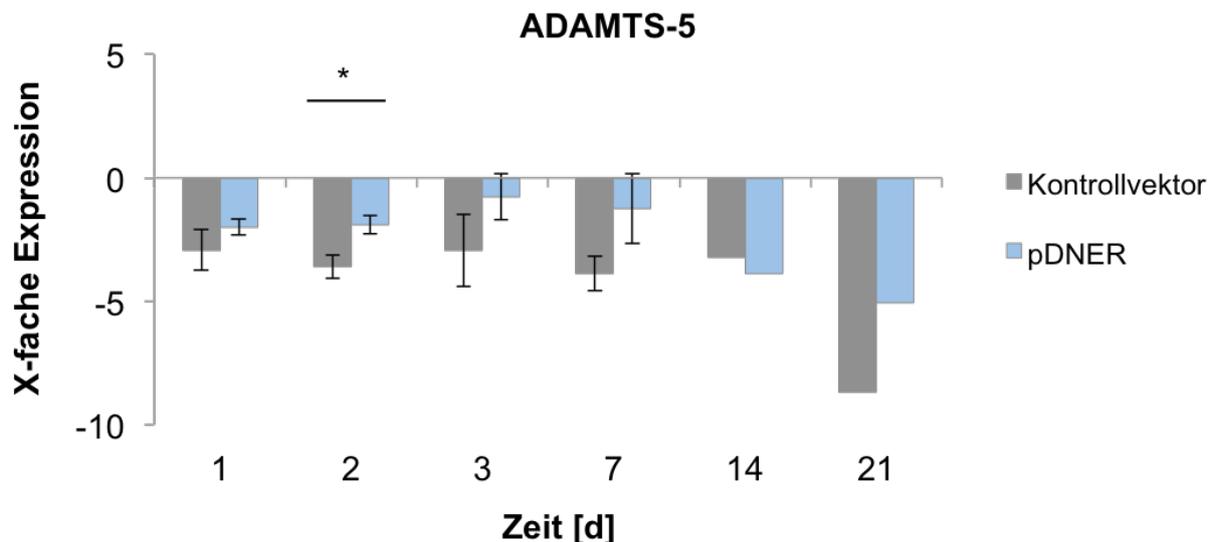
## ERGEBNISSE

### 4.6.4.6 ADAMTS-5 mRNA Expression

Da die matrixabbauenden Enzyme ADMATS-4 und ADAMTS-5 eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese der Osteoarthrose spielen und neben der ADAMTS-4 auch die Expression der ADAMTS-5 mRNA im Verlauf der *in vitro* Chondrogenese analysiert werden konnte (Boeuf *et al.*, 2012), wurde das Transkriptionslevel von ADAMTS-5 in Abhängigkeit von DNER während der Chondrogenese untersucht. Ähnlich wie in der Studie von Boeuf *et al.*, (2012) war die ADAMTS-5 mRNA Expression in den Kontrollvektorzellen während des gesamten Zeitverlaufs konstant herunterreguliert. Bei den pDNER nukleofizierten Zellen verhielt es sich sehr ähnlich mit dem Unterschied, dass bis auf Zeitpunkt 14 das Expressionslevel konstant höher war als in den Kontrollvektor behandelten Zellen. Dieser Expressionsunterschied war zum Zeitpunkt 2d statistisch signifikant (\*  $p \leq 0,05$ ) und zeigte eine Reprimierung von  $-3,6 \pm 0,49$  bei den Kontrollvektorzellen und von  $-1,9 \pm 0,37$  bei den pDNER-Zellen (Tabelle 45). In beiden Ansätzen konnte die stärkste Reprimierung der ADAMTS-5 mRNA Expression an Tag 21 nachgewiesen werden. Graphisch sind die Transkriptionslevel der pDNER- und Kontrollvektorzellen in Abb. 49 dargestellt.

**Tab. 45:** ADAMTS-5 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

ADAMTS-5 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	$-1,99 \pm 0,32$	$-2,92 \pm 0,82$	0,347	3
2	$-1,9 \pm 0,37$	$-3,6 \pm 0,49$	<b>0,049</b>	3
3	$-0,76 \pm 0,93$	$-2,94 \pm 1,47$	0,28	3
7	$-1,26 \pm 1,42$	$-3,87 \pm 0,7$	-0,173	3
14	-3,87	-3,23	-	2
21	-5,07	-8,68	-	2



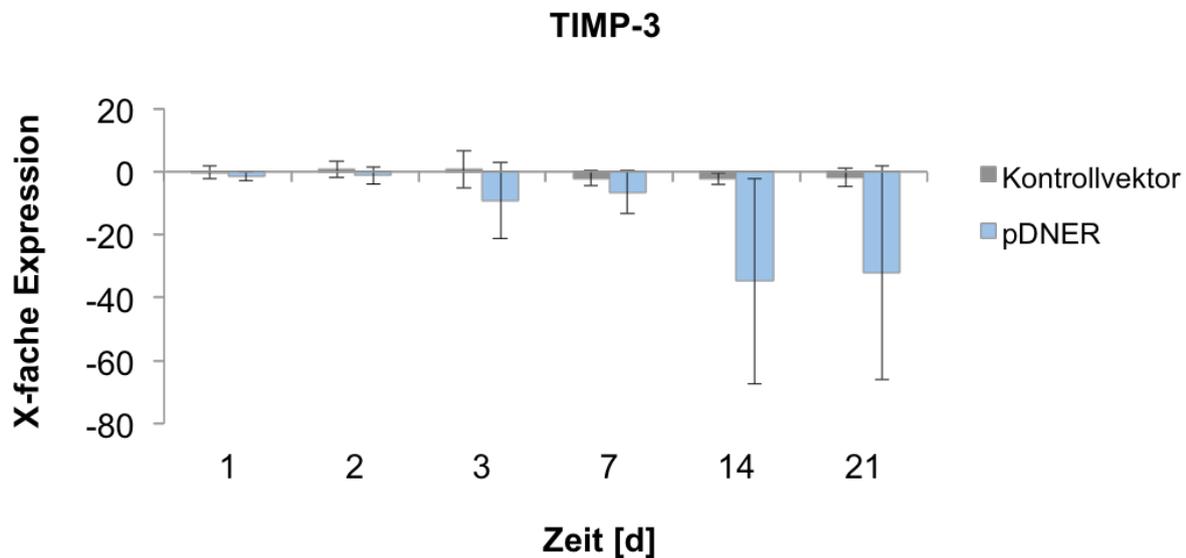
**Abb. 49:** Vergleich der Transkriptionslevel von ADAMTS-5 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die ADAMTS-5 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Bei beiden Versuchsansätzen konnte während der gesamten Chondrogenese eine Herunterregulierung im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Differenzierung nachgewiesen werden, welche an Tag 21 am stärksten war. Hierbei lag die ADAMTS-5 Expression der pDNER-Zellen bis auf den Zeitpunkt 14d konstant höher. Ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied zwischen den beiden Versuchsansätzen konnte zum Zeitpunkt 2d nachgewiesen werden (\*  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.4.7 TIMP-3 mRNA Expression

TIMP-3 ist ein Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen sowie der Aggrecanasen ADAMTS-4 und 5, welche bei der Degradierung von Knorpelgewebe eine zentrale Rolle spielen. Bislang wurde die Expression von TIMP-3 nicht im Verlauf der *in vitro* Chondrogenese untersucht es ist jedoch bekannt, dass der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  die Expression von TIMP-3 reguliert (Leivonen *et al.*, 2013). Um den Einfluss von DNER auf einen der wichtigsten Inhibitoren des Matrixabbaus zu untersuchen, wurde die TIMP-3 mRNA Expression während der Chondrogenese in den pDNER nukleofizierten Zellen als auch in den Kontrollvektorzellen untersucht (Tabelle 46). Bei den Kontrollvektorzellen konnte zwischen Tag 1 bis Tag 3 keine Expressionsänderung und ab Tag 7 eine leichte Runterregulierung von TIMP-3, im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese nachgewiesen werden. Bei den DNER überexprimierenden Zellen kam es während des gesamten Zeitverlaufs zu einer kontinuierlichen Reduktion der TIMP-3 mRNA Expression, welche populationsabhängig zu den Zeitpunkten 14d und 21d sehr stark war. In Abb. 50 sind die Transkriptionslevel der beiden Ansätze im Zeitverlauf graphisch dargestellt.

**Tab. 46:** TIMP-3 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

TIMP-3 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	-1,52±1,35	-0,3±1,98	0,64	3
2	-1,2±2,75	0,66±2,52	0,644	3
3	-9,11±12,11	0,79±5,97	0,504	3
7	-6,53±6,78	-2,15±2,37	0,575	3
14	-34,75±32,62	-2,31±1,9	0,377	3
21	-32,1±33,95	-1,8±2,91	0,424	3



**Abb. 50:** Vergleich der Transkriptionslevel von TIMP-3 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die TIMP-3 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. In den Kontrollvektorzellen konnte eine leichte aber konstante Reduktion der TIMP-3 mRNA ab dem Zeitpunkt 7d beobachtet werden. In den pDNER nukleofizierten Zellen war die Reduktion ab Tag 1 kontinuierlich und an den Tagen 14 und 21 populationsabhängig sehr prominent.

#### 4.6.4.8 Notch-1 mRNA Expression

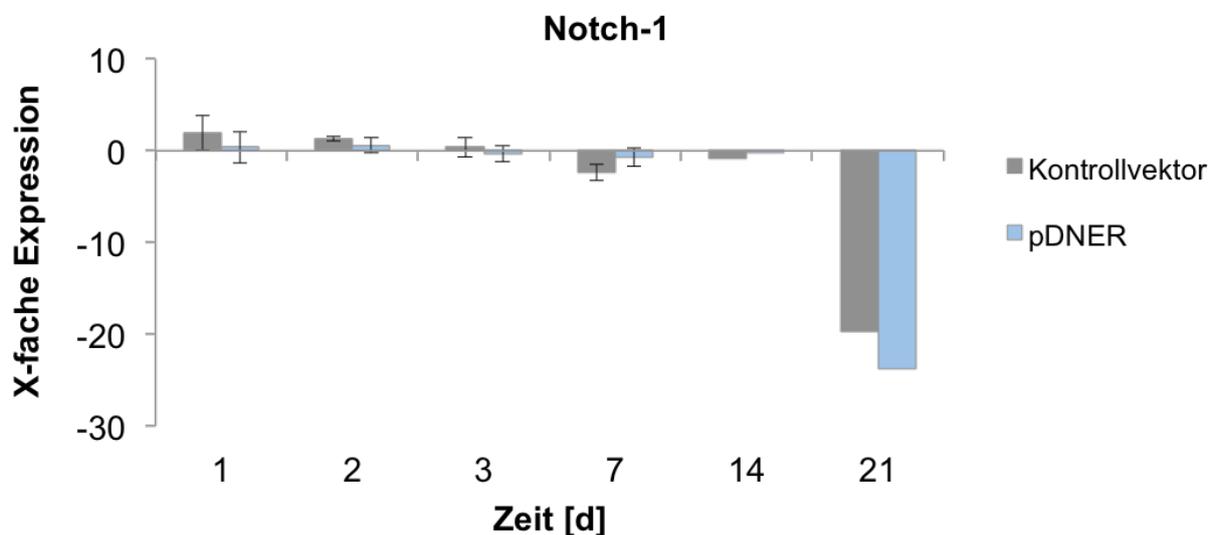
Der Notch-1 Rezeptor der eine große Rolle im Verlauf der Chondrogenese spielt sollte aufgrund seiner bekannten Interaktion mit DNER im ZNS ebenfalls untersucht werden (Eiraku *et al.*, 2005; Oldershaw und Hardingham, 2010). In Tabelle 47 kann man erkennen, dass in den Kontrollvektorzellen die mRNA Expression von Notch-1 zu Beginn der

## ERGEBNISSE

Chondrogenese leicht erhöht war und diese während des Zeitverlaufs kontinuierlich sank. In den pDNER nukleofizierten Zellen verhielt es sich ähnlich nur mit dem Unterschied, dass es zu Beginn der Differenzierung zu keinem messbaren Anstieg der mRNA Expression im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor der Chondrogenese (Zeitpunkt 0) kam. In beiden Versuchsansätzen konnte zum Zeitpunkt 21d die stärkste Reprimierung der Notch-1 mRNA Expression nachgewiesen werden. Die Expressionsunterschiede zu den unterschiedlichen Zeitpunkten sind graphisch in Abb. 51 dargestellt.

**Tab. 47:** Notch-1 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Notch-1 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	0,38±1,71	1,93±1,88	0,574	3
2	0,57±0,81	1,3±0,23	0,435	3
3	-0,31±0,88	0,39±1,06	0,639	3
7	-0,69±0,99	-2,37±0,85	0,267	3
14	-0,16	-0,84	-	2
21	-23,81	-19,64	-	2



**Abb. 51:** Vergleich der Transkriptionslevel von Notch-1 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die Notch-1 mRNA Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Während bei den Kontrollvektorzellen die mRNA Expression von Notch-1 zu Beginn der Chondrogenese leicht erhöht war und diese während des Zeitverlaufs kontinuierlich sank, blieb sie in den pDNER-Zellen in zu den Zeitpunkten 1d und 2d unverändert und regulierte sich ab dem Zeitpunkt 3d herunter. Die stärkste Reprimierung konnte in beiden Versuchsansätzen an Tag 21 nachgewiesen werden.

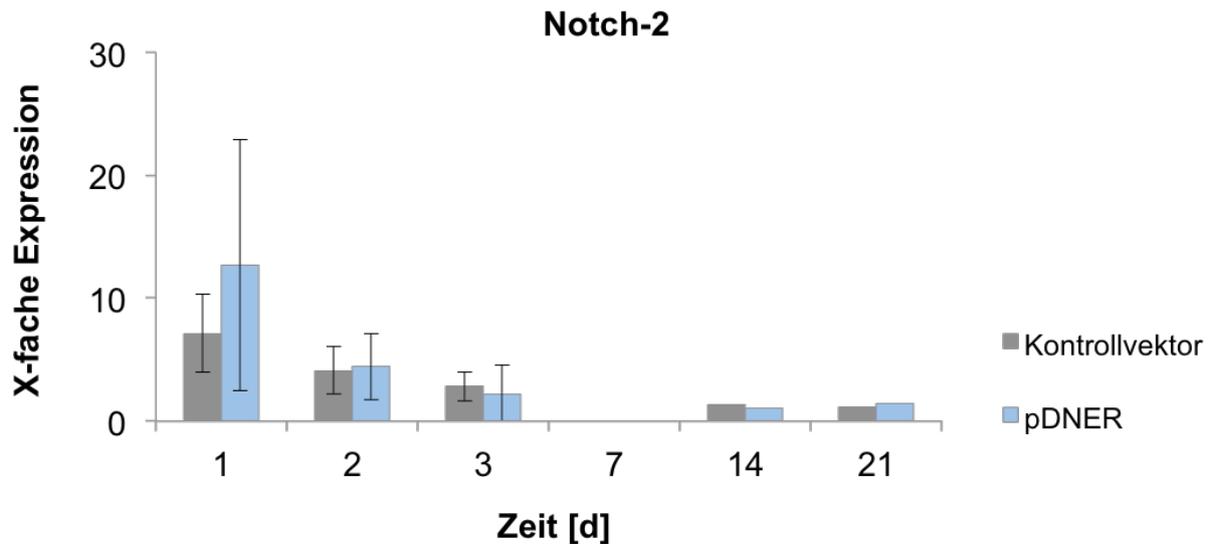
## ERGEBNISSE

### 4.6.4.9 Notch-2 mRNA Expression

Auch die Expression des Notch-2 Rezeptors konnte sowohl während der Chondrogenese als auch im adulten Knorpelgewebe nachgewiesen werden (Oldershaw *et al.*, 2008; Ustunel *et al.*, 2008). Um eine Interaktion mit DNER während der Chondrogenese zu untersuchen, wurde auch die Expressionsänderung der Notch-2 mRNA in Abhängigkeit von der DNER Überexpression untersucht (Tabelle 48). Im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor der Chondrogenese stieg sowohl bei den Kontrollvektorzellen als auch bei den pDNER Zellen die Notch-2 mRNA Expression am ersten Tag stark an und sank während des Zeitverlaufs nahezu auf das Anfangsniveau zurück. Zum Zeitpunkt 1d konnte populationsabhängig eine stärkere Notch-2 mRNA Expression in den pDNER nukleofizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen beobachtet werden, wohingegen im restliche Zeitverlauf die Expressionslevel der beiden Ansätze nahezu identisch waren. In Abb. 52 sind die Transkriptionslevel der beiden Ansätze graphisch dargestellt.

**Tab. 48:** Notch-2 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Notch-2 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	12,71±10,24	7,14±3,18	0,631	3
2	4,43±2,68	4,14±1,92	0,934	3
3	2,2±2,33	2,84±1,19	0,82	3
7	N/A	N/A	-	1
14	1,1	1,38	-	1
21	1,43	1,13	-	1



**Abb. 52:** Vergleich der Transkriptionslevel von Notch-2 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die Notch-2 mRNA Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Bei beiden Ansätzen stieg die Notch-2 Expression eine Tag nach Differenzierungsbeginn und sank im weiteren Zeitverlauf kontinuierlich auf das Anfangsniveau zurück. Populationsabhängig war eine stärkere Notch-2 Expression in den pDNER-Zellen zum Zeitpunkt 1d nachgewiesen werden. An Tag 7 konnte keine Notch-2 mRNA Expression gemessen werden.

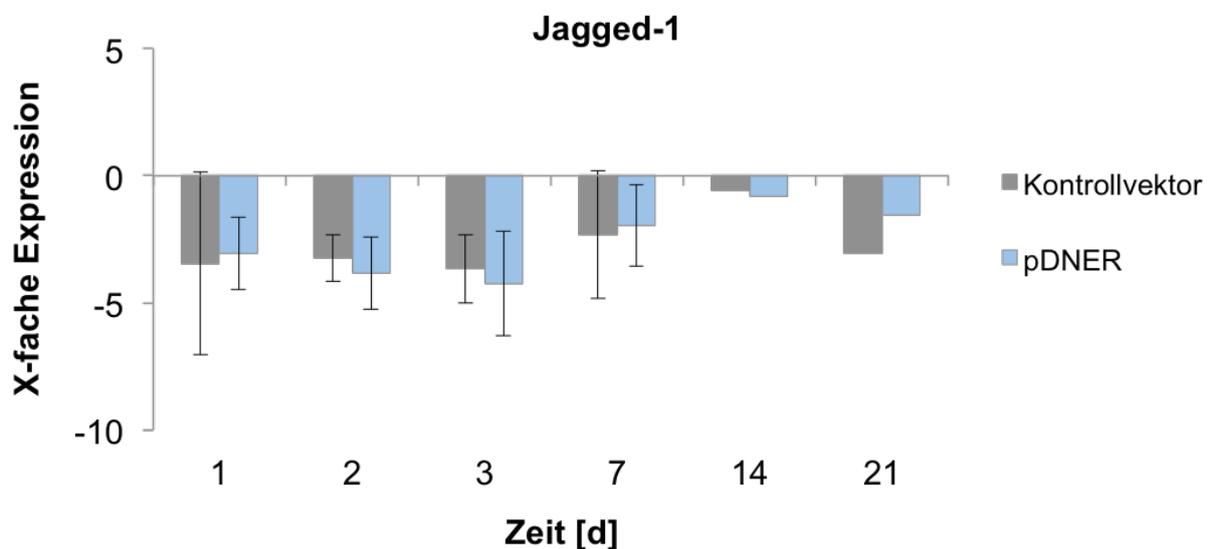
#### 4.6.4.10 Jagged-1 mRNA Expression

Die mRNA Expressionsanalyse des Notch-Rezeptor-Liganden Jagged-1 wurde ebenfalls während der Chondrogenese der hMSCs in den Kontrollvektor- und pDNER exprimierenden Zellen untersucht (Tabelle 49). Im Vergleich zu dem Zeitpunkt vor Differenzierungsbeginn konnte in beiden Ansätzen eine konstante Reduktion der Jagged-1 mRNA zu den Zeitpunkten 1d bis 3d nachgewiesen werden. Ab dem Zeitpunkt 7d nahm die Expression leicht zu und erreichte an Tag 14 das Anfangsniveau. An Tag 21 konnte erneut in beiden Ansätze eine leichte Abnahme der Jagged-1 Expression beobachtet werden. Graphisch sind die Expressionsunterschiede von Jagged-1 in Abb. 53 dargestellt.

## ERGEBNISSE

**Tab. 49:** Jagged-1 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Jagged-1 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	-3,06±1,41	-3,45±3,59	0,926	3
2	-3,83±1,42	-3,25±0,91	0,748	3
3	-4,24±2,04	-3,65±1,35	0,821	3
7	-1,96±1,62	-2,31±2,51	0,911	3
14	-0,8	-0,59	-	2
21	-1,53	-3,05	-	2



**Abb. 53:** Vergleich der Transkriptionslevel von Jagged-1 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die Jagged-1 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Bei beiden Ansätzen konnte eine konstante Reduktion der Jagged-1 mRNA zu den Zeitpunkten 1d bis 3d beobachtet werden, welche an Tag 7 etwas zunahm und an Tag 14 wieder auf dem Anfangsniveau war. An Tag 21 war in beiden Ansätzen die Expression der Jagged-1 mRNA erneut leicht erniedrigt.

## ERGEBNISSE

### 4.6.4.11 Hes-1 und Hey-1 mRNA Expression

Hes-1 und Hey-1 sind beide *downstream*-Parameter des Notch-Signalwegs. Die differenzielle Expression beider Gene konnte während der Chondrogenese nachgewiesen werden (Watanabe *et al.*, 2003). Um die Interaktion von DNER mit dem Notch-Rezeptor zu untersuchen, wurden auch die Zielgene des Notch-Signalwegs unter dem Einfluss der DNER Überexpression und während der Chondrogenese untersucht. Bei Betrachtung der *real-time* PCR Ergebnisse von Hes-1 (Tabelle 50) fiel auf, dass es in beiden Versuchsansätzen zu einer leichten Reprimierung der mRNA Expression während des gesamten Zeitverlaufs im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese (Zeitpunkt 0) kam. Das Expressionslevel schwankte hierbei zu den unterschiedlichen Zeitpunkten und erreichte einen populationsabhängigen Tiefpunkt an Tag 21 sowohl in den pDNER- als auch in den Kontrollvektorzellen. Zum Zeitpunkt 2d konnte ein statistisch signifikanter Expressionsunterschied von Hes-1 zwischen den DNER überexprimierenden Zellen und den Kontrollvektorzellen nachgewiesen werden ( $p \leq 0,05$ ). Hierbei war die Expression von Hes-1 in den pDNER-Zellen um den Faktor 0,87 erhöht. In Abb. 54 sind die Transkriptionslevel der beiden Ansätze im Zeitverlauf graphisch dargestellt.

**Tab. 50:** Hes-1 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

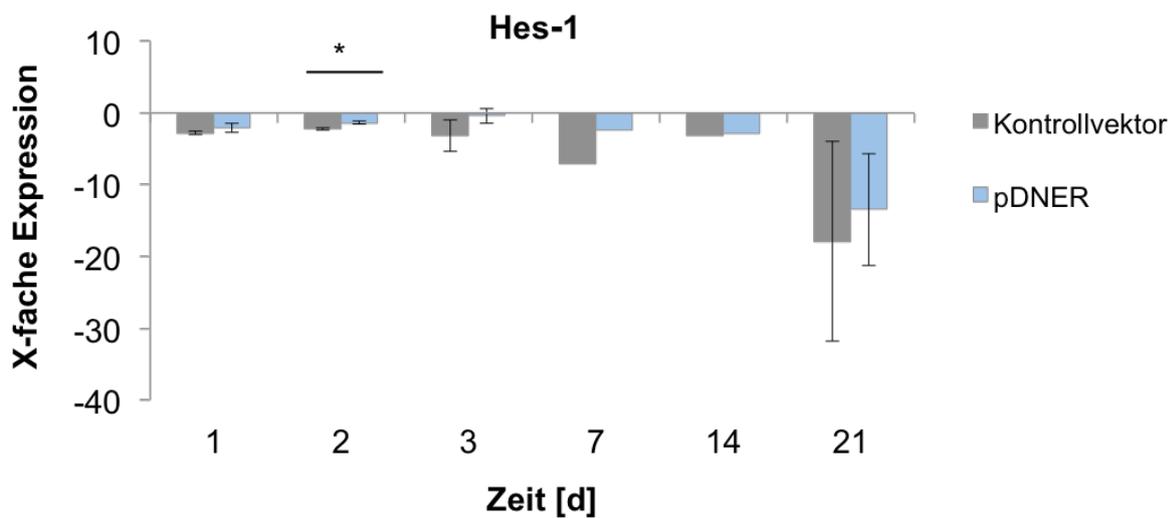
Hes-1 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	-2,1±0,63	-2,84±0,23	0,326	3
2	-1,38±0,17	-2,25±0,17	<b>0,023</b>	3
3	-0,39±1,04	-3,19±2,16	0,308	3
7	-2,31±	-7,09	-	2
14	-2,78	-3,13	-	1
21	-13,46±7,8	-17,89±13,93	0,296	3

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von Hey-1 (Tabelle 51) fiel auf, dass die mRNA Expression in beiden Ansätzen zwischen Tag 1 und Tag 3 leicht runterreguliert wurde. Ab Tag 7 konnte in den DNER überexprimierenden Zellen eine kontinuierlichen Zunahme der Hey-1 mRNA Expression nachgewiesen werden, wohingegen es in den Kontrollvektorzellen zwischen Tag 7 und Tag 14 zu einer Zunahme und an Tag 21 zu einer erneuten Abnahme der Hey-1 Expression kam. Graphisch sind die Hey-1 Expressionslevel der pDNER- und der Kontrollvektorzellen in Abb. 55 dargestellt.

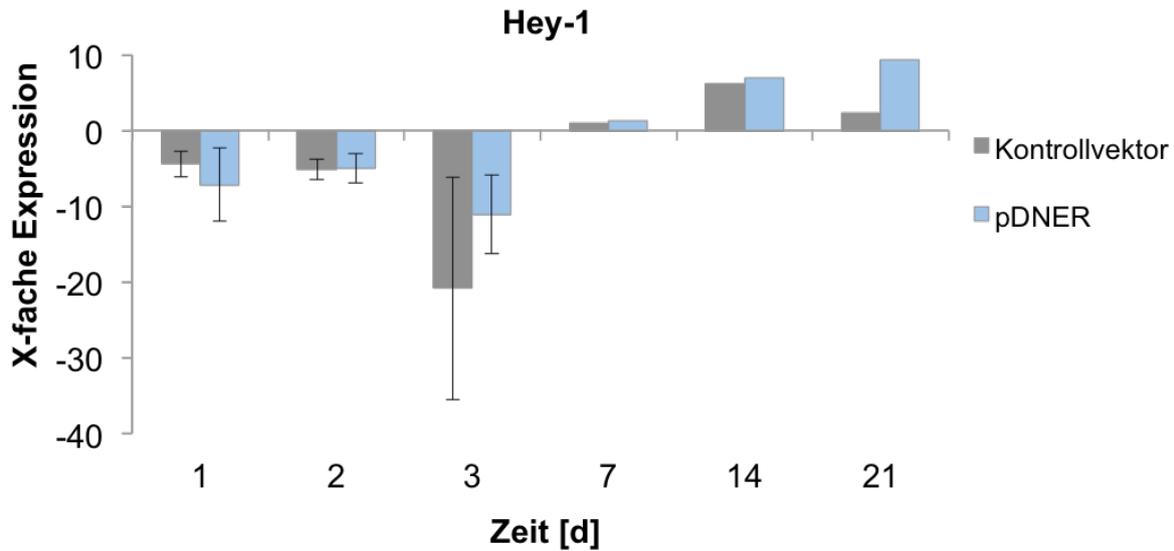
## ERGEBNISSE

**Tab. 51:** Hey-1 mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

Hey-1 mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	-7,14±4,79	-4,39±1,7	0,618	3
2	-4,96±1,95	-5,09±1,37	0,96	3
3	-11,02±5,21	-20,81±14,69	0,564	3
7	1,27	1,06	-	1
14	7,01	6,23	-	1
21	9,38	2,38	-	1



**Abb. 54:** Vergleich der Transkriptionslevel von Hes-1 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die Hes-1 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Bei Hes-1 wurde im Vergleich zum Zeitpunkt vor Differenzierungsbeginn in beiden Ansätzen eine leichte und konstante Reduktion der mRNA Expression zu beobachten. Hierbei konnte eine statistisch signifikant höhere Expression der Hes-1 mRNA in den DNER überexprimierenden Zellen an Tag 2 nachgewiesen werden; \*p≤0,05.



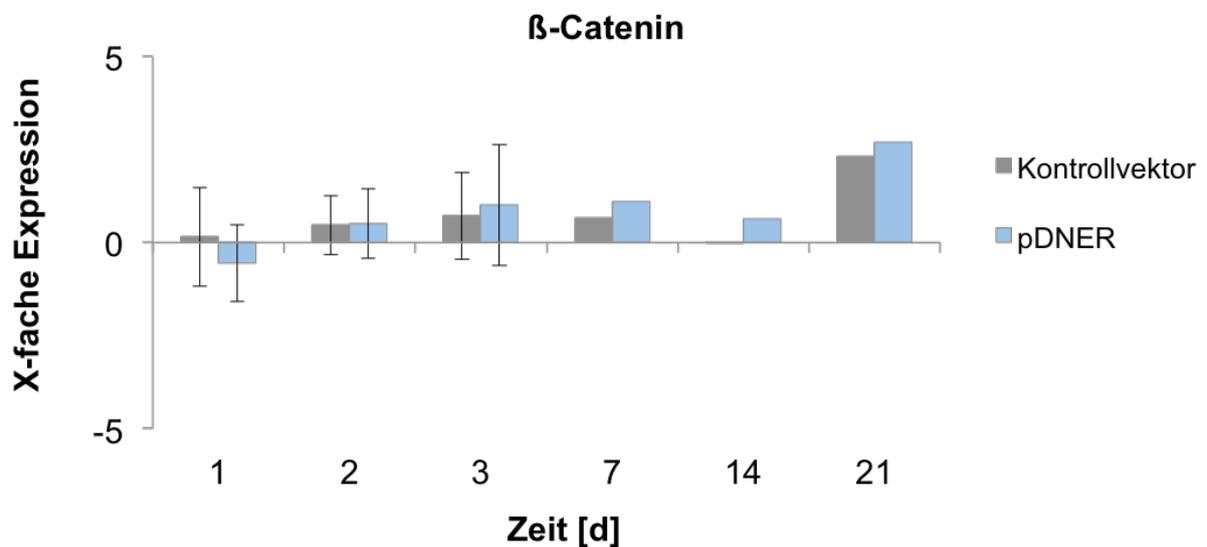
**Abb. 55:** Vergleich der Transkriptionslevel von Hey-1 in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die Hey-1 Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Die Analyse der Hey-1 Expression ergab eine konstante Reduktion der mRNA in beiden Ansätzen bis Tag 3, wohingegen sie ab Tag 7 über dem Anfangsniveau lag.

#### 4.6.4.12 $\beta$ -Catenin mRNA Expression

$\beta$ -Catenin wurde als Vertreter des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ebenfalls untersucht, da dessen Rolle sowohl bei der OA als auch bei der Interaktion mit dem Notch-Signalweg gezeigt werden konnte (Blom *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2012). Bei der  $\beta$ -Catenin mRNA Expressionsanalyse (Tabelle 52) fiel auf, dass sowohl in den Kontrollvektorzellen als auch in den DNER überexprimierenden Zellen bis auf Tag 21 keine Expressionsunterschiede im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese (Zeitpunkt 0) nachgewiesen werden konnten. Die Expressionserhöhung der  $\beta$ -Catenin mRNA an Tag 21 war in beiden Versuchsansätzen annähernd gleich und lag in den Kontrollvektorzellen bei 2,34fach und in den DNER überexprimierenden Zellen bei 2,71fach. Graphisch sind die  $\beta$ -Catenin Expressionslevel der pDNER- und der Kontrollvektorzellen in Abb. 56 dargestellt.

**Tab. 52:**  $\beta$ -Catenin mRNA Expression der hMSC-Pellets im Zeitverlauf [d].

$\beta$ -Catenin mRNA Expression				
Zeitpunkt [d]	pDNER	Kontrollvektor	p-Werte	Populationen
1	-0,55±1,04	0,16±1,33	0,696	3
2	0,52±0,94	0,47±0,79	0,969	3
3	1±1,62	0,73±1,17	0,897	3
7	1,1	0,68	-	2
14	0,62	-0,001	-	2
21	2,71	2,34	-	2



**Abb. 56:** Vergleich der Transkriptionslevel von  $\beta$ -Catenin in humanen mesenchymalen Stammzellen im Verlauf der Chondrogenese in Abhängigkeit von DNER. Die hMSCs wurden 24h vor Differenzierungsbeginn mit pDNER oder einem Kontrollvektor nukleofiziert und die  $\beta$ -Catenin Expression an den Tagen 1, 2, 3, 7, 14 und 21 nach Differenzierungsbeginn analysiert. Bei beiden Ansätzen konnten bis auf Tag 21 keine Expressionsunterschiede im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese (Zeitpunkt 0) nachgewiesen werden. An Tag 21 war die Expression von  $\beta$ -Catenin in den Kontrollvektorzellen 2,34fach und bei den pDNER nukleofizierten Zellen 2,71fach erhöht.

## 5. DISKUSSION

Die Osteoarthritis ist eine primär nicht-entzündliche, langsam verlaufende Erkrankung des hyalinen Gelenkknorpels, welche zunächst mit der Degeneration des Knorpels beginnt und sich im Laufe der Progression auf weitere Teile des Gelenks ausdehnt (Loeser *et al.*, 2012). Ursprünglich galt die OA als Verschleißerkrankung, welche mit dem höheren Alter der Patienten einhergeht. Mittlerweile spricht man von einer multifaktoriellen Erkrankung, deren Ausprägung neben Alter und Verschleiß auch durch das Geschlecht, Übergewicht und eine genetische Prädisposition beeinflusst wird (Hunter und Felson, 2006). Die genetischen Faktoren spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Den Beweis liefern unter anderem epidemiologische Studien, familiäre Häufungen als auch Zwillingsstudien, welche zusammengenommen eine erbliche Komponente von mehr als 50% vermuten lassen (Spector *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 2004; Kraus *et al.*, 2007). In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen zur Suche nach Risiko-Allelen, DNA Methylierungsprofilen, MicroRNA's und Genexpressionsprofilen zwischen normalen und OA Geweben durchgeführt (D *et al.*, 2009; Y Xu *et al.*, 2012; Delgado-Calle *et al.*, 2012; Panoutsopoulou und Zeggini, 2013). Hierbei sollten Gene nachgewiesen werden, welche auf die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen der OA schließen lassen und somit die therapeutische Entwicklung vorantreiben (Tsezou, 2014). Es wurden unter anderem vergleichende Genexpressionsanalysen zwischen Knie- und Hüftgelenkknorpel durchgeführt, bei denen im Vergleich zum nicht-arthrotischen Knorpel einige gemeinsame Signalwege identifiziert werden konnten (Y Xu *et al.*, 2012). Beim Vergleich von hyalinem Knorpel und Osteophyten fiel auf, dass im hyalinen Knorpel Antagonisten des Wnt- und BMP Signalwegs verstärkt exprimiert werden, um vermutlich den chondrozytären Phänotyp aufrecht zu erhalten, wohingegen in den Osteophyten größtenteils Gene exprimiert werden, die bei der enchondralen Ossifikation eine Rolle spielen (Gelse *et al.*, 2012). Eine differenzielle Genexpression konnte auch in den entzündeten und nicht-entzündeten Regionen der Synovialmembran identifiziert werden, welche bei Entzündungsprozessen, dem Knorpelmetabolismus, dem Wnt-Signalweg und der Angiogenese eine Rolle spielen (Lambert *et al.*, 2013). Aufschlüsse über das Ungleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Molekülen sowie inflammatorischen Mediatoren in osteoarthrotischem und gesundem Knorpel konnten ebenfalls durch vergleichende Genexpressionsanalysen gewonnen werden (Martin *et al.*, 2001; Aigner *et al.*, 2006). Um detaillierte Erkenntnisse über die pathogen veränderte Molekularbiologie während der Knorpeldegeneration zu erhalten, wurde von Geyer *et al.*, (2009) eine weitere Genexpressionsanalyse durchgeführt, bei der makroskopisch lädierte und nicht-lädierte Areale des osteoarthrotischen Kniegelenkknorpels untersucht wurden. Von den sechs Genkandidaten, welche in den lädierten Arealen eine erhöhte Expression aufwiesen, wurde in der vorliegenden Arbeit der

## DISKUSSION

Fokus auf den Wasserkanal Aquaporin 1 sowie auf den Notch-Rezeptor-Liganden DNER gelegt. Während es zum jetzigen Zeitpunkt bereits Untersuchungen über die Rolle von Aquaporin 1 in der Pathogenese der Osteoarthritis gibt (Trujillo *et al.*, 2004; Meng *et al.*, 2007), wurde DNER in diesem Zusammenhang nie zuvor untersucht.

### **5.1 Rolle von Aquaporin 1 bei der Pathogenese der Osteoarthritis**

Aquaporin 1 ist ein ubiquitär verbreiteter Wasserkanal, welcher im hyalinen Gelenkknorpel im Vergleich zu anderen menschlichen Geweben, eine moderate Expressionsrate besitzt (Mobasher, 2004). Aufgrund seiner Expression im Kniegelenkknorpel wurde AQP1 im Zusammenhang mit degenerativen Gelenkserkrankungen untersucht. Während keine Expressionsunterschiede zwischen humanem, normalem und OA Kniegelenkknorpel nachgewiesen werden konnten, wurde eine erhöhte Expression von AQP1 im RA Knorpelgewebe beobachtet (Trujillo *et al.*, 2004). Die Lokalisation des Wasserkanals beschränkte sich hierbei vorwiegend auf die Tiefe Zone (Deep zone) des Knorpels. Auch bei einer experimentell induzierten Osteoarthritis in Ratten konnte keine differenzielle AQP1 Expression zwischen dem osteoarthrotisch veränderten und dem normalen Gewebe beobachtet werden (Meng *et al.*, 2007). Die von Geyer *et al.*, (2009) durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch, dass es innerhalb des humanen OA Knorpelgewebes in Abhängigkeit von der Schädigung des Gewebes zu einer unterschiedlichen Regulation von AQP1 kommt. Hierbei konnte AQP1 ausschließlich in der Oberflächzone und hier vor allem in den Zellclusterregionen der stärker geschädigten Areale nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2009). Bestätigt wurde diese Analyse im Rahmen der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Kramm (2014). Meng *et al.*, (2007) und Geyer *et al.*, (2009) stellten die Hypothese auf, dass durch den veränderten Wasserhaushalt der Chondrozyten ihre Morphologie verändert und somit die Knorpelhomöostase beeinflusst wird, was zu den wesentlichen Prozessen der Pathogenese der Osteoarthritis zählt. Aufgrund dieser Hypothese wurde in der Arbeit von Frau Dr. Kramm (2014) zunächst der Einfluss einer AQP1-Suppression auf humane OA Chondrozyten untersucht. Hierbei zeigte sich nach der erfolgreichen Reprimierung von AQP1 keine Änderung der Expressionsraten typischer Stoffwechselfaktoren des Knorpels, darunter anabole Faktoren wie Kollagen Typ II, Kollagen Typ IX und Sox9 als auch katabole Faktoren wie ADAMTS-4 und 5, MMP-9 und MMP-13. Da AQP1 überwiegend im Leitsaum (Lamellopodium) migrierender Chondrozyten exprimiert wird (Saadoun, Papadopoulos, Hara-Chikuma, und Verkman, 2005b), wurde zusätzlich die Expression von Molekülen untersucht, welche mit der Zellmigration in Zusammenhang stehen. Obwohl die Chondrozyten postnatal als unbeweglich gelten, da ihre Umgebung, bestehend aus einer Proteoglykan- und Kollagenreichen Matrix, die Zellen

## DISKUSSION

abschirmt, sind sie *in vitro* durchaus in der Lage zu migrieren (W Qiu *et al.*, 2000; Morales, 2007). Vorhergehende Untersuchungen an Endothelzellen als auch an Chondrozyten konnten den Einfluss von AQP1 bei der Zellmigration belegen. Hierbei wurde die Zellmobilität durch die Reprimierung von AQP1 stark reduziert (G M Lee und Loeser, 1999; Liang *et al.*, 2008; Schwab *et al.*, 2012). In einer weiteren Studie an humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass AQP1 vermutlich die Bewegung durch die Interaktion mit dem Gerüstkomplexprotein LIN-7 initiiert. LIN-7 gehört zu dem CASK/LIN-2, LIN-7 und LIN-10 Gerüstkomplex, welcher für die Organisation des Zytoskelettes verantwortlich ist. Es konnte eine Co-Lokalisation von LIN-7 und AQP1 nachgewiesen werden, durch welche vermutlich eine Verbindung zum Zytoskelett hergestellt wird (Monzani *et al.*, 2009). Auch wenn die Chondrozyten im Knorpelgewebe als unbeweglich gelten wird angenommen, dass durch das Abtragen der Knorpelmatrix die Zellen die Möglichkeit besitzen sich innerhalb des fibrillären Gewebes fortzubewegen (Morales, 2007). Kouri *et al.*, (1996) demonstrierten, dass beim Vergleich von normalem und OA Knorpel die Zellclusterdichte im OA Knorpel zwar erhöht war, die Gesamtzellzahl jedoch vergleichbar mit der von normalem Knorpel zu sein schien. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es zu einer Neuordnung des Zytoskelettes und zur Ausstülpung von Filopodien bei den Chondrozyten kam. Sie stellten die Hypothese auf, dass es sich bei der Zellclusterformation im OA Knorpel nicht zwingend um Zellklone handelt, sondern dass die Zellen durch den aktiven Prozess der Migration zusammenfinden. Da AQP1 primär in den Zellclusterregionen des OA Knorpels nachgewiesen werden konnte, wurde in der Arbeit von Frau Dr. Kramm der Einfluss des AQP1-Knockdowns auf die Expression von LIN-2 untersucht (Geyer *et al.*, 2009; Dissertation Kramm, 2014). Allerdings konnte keine Expressionsänderung des Gerüstkomplexes nach der Reprimierung von AQP1 nachgewiesen werden. Da die Chondrozyten eine Vielzahl an Transportkanälen besitzen, welche an der Volumenregulation beteiligt sind, ist eine Kompensation des AQP1-Knockdowns denkbar (Barrett-Jolley, 2010). So konnte z.B. neben AQP1 auch die Expression von AQP3 in der Oberflächenzone von normalem humanem Knorpel nachgewiesen werden. Die Lokalisation von AQP3 verlagerte sich zwar im weiteren Verlauf der Osteoarthritis in die mittleren bis tiefer gelegenen Regionen, dennoch konnte eine erhöhte Expression des Aquaglyceroporins im OA Gewebe verglichen mit normalem, gesunden Gewebe nachgewiesen werden (Meng *et al.*, 2007).

### 5.1.1 Überexpression von Aquaporin 1 in humanen OA Chondrozyten

Nachdem der Knockdown von AQP1 in der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Kramm (2014) keinen Aufschluss über die Funktion von AQP1 in der Pathogenese der Osteoarthritis geben konnte, sollte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die Überexpression von AQP1 in

## DISKUSSION

den humanen OA Chondrozyten untersucht werden. Neben den zuvor erwähnten anabolen (Kollagen Typ II und Sox9) und katabolen (MMP-9, ADAMTS-4, ADAMTS-5) Stoffwechselfparametern der Knorpelmatrix, wurden auch die Marker für hypertrophes, osteoarthrotisches Gewebe Kollagen Typ X und Kollagen Typ I sowie der Proteinasehemmer TIMP-3 untersucht. Wie schon beim Knockdown von AQP1 konnte kein Einfluss der AQP1 Überexpression auf die untersuchten Stoffwechselprodukte der Knorpelmatrix nachgewiesen werden. Neben LIN-2 wurde zudem auch die Expression von LIN-7 analysiert. Aber auch die Expression von LIN-2 und LIN-7 blieb nach der Überexpression von AQP1 unverändert. Dass die Überexpression von AQP1 zu keiner Expressionsveränderung der gemessenen Parameter geführt hat könnte daran liegen, dass die osteoarthrotischen Chondrozyten von Grund auf eine erhöhte Aquaporinsyntheserate aufweisen und somit die Zellen eine gewisse Sättigung erreicht haben. Dass weder beim Knockdown noch bei der Überexpression von AQP1 die Expression der Gerüstkomplexproteine beeinflusst wurde, könnte bedeuten, dass anders als in den Endothelzellen AQP1 mit einem anderen Gerüstproteinkomplex interagiert. AQP1 könnte beispielsweise auch mit LIM-Proteinen interagieren. LIM-Proteine sind ebenfalls an der Organisation des Zytoskelettes beteiligt und interagieren mit dem Aktin-Zytoskelett. Die Expression der Gene *Fhl1*, *Fhl2*, *Lasp1* und *Pdlim1*, welche für LIM-Proteine kodieren konnten auch in humanen Chondrozyten nachgewiesen werden (Joos *et al.*, 2008).

### **5.2 DNER Expression im osteoarthrotischen Kniegelenksknorpel**

Neben AQP1 konnte auch eine erhöhte Expression der DNER mRNA in den stärker geschädigten Arealen des humanen osteoarthrotischen Kniegelenksknorpels nachgewiesen werden (Geyer *et al.*, 2009). DNER ist ein funktioneller Ligand des Notch-Rezeptors, doch seine Funktion wurde bisher lediglich im ZNS und in hAMSCs (*Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*) erforscht (Eiraku *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010). Um die Rolle von DNER in der Pathogenese der Osteoarthrose zu untersuchen, wurde humaner OA Knorpel einer immunhistochemischen Analyse unterzogen. Der Vergleich von makroskopisch intakten und makroskopisch geschädigten Arealen (4.2.2) ergab, dass DNER entweder gar nicht in den intakten Arealen nachgewiesen werden konnte oder aber, dass eine homogene Verteilung über die gesamte Knorpelfläche zu beobachten war (4.2.2 a und c). In den stärker geschädigten Arealen wurde insgesamt eine intensivere DNER-Färbung nachgewiesen, welche überwiegend in den mittleren bis oberflächlichen Bereichen auftrat (4.2.2 b und d). Die unterschiedlichen Expressionsmuster von DNER in den intakten Arealen waren stark populationsabhängig und deuten auf unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung hin. Um zu demonstrieren, dass es sich selbst bei dem makroskopisch intakten Knorpelgewebe um typisches OA Gewebe handelt, wurden histologische

## DISKUSSION

Übersichtsfärbungen der Areale durchgeführt. Bei Betrachtung der histologischen Färbungen mit Alcianblau und Safranin-O konnte gezeigt werden, dass es selbst in den makroskopisch intakten Regionen zu einem minimalen Abbau der Proteoglykan- als auch der Kollagenschicht kam, welcher ausgeprägt in der Oberflächenzone beobachtet werden konnte (4.2.1). Die intensivere Färbung von DNER in den lädierten Bereichen der Knorpelmatrix deutet ebenfalls darauf hin, dass DNER mit dem Schweregrad der Erkrankung einhergeht. Vor allem die Expression in den faserigen, zerklüfteten Arealen sowie in den Chondrozytenclustern scheint die Rolle von DNER in der Pathogenese der OA zu bestätigen.

Vergleicht man die Expressionen der Notch-Rezeptoren im Knorpelgewebe von OA Patienten mit den hier vorliegenden Ergebnissen, können einige Parallelen beobachtet werden. Auch bei der Analyse der Notch-Rezeptoren 1-4 und deren Liganden Delta-like 1 und Jagged-1 konnte eine proportional zum Schweregrad der OA erhöhte Expression nachgewiesen werden (Mahjoub *et al.*, 2012). Während im gesunden Gewebe keine Vertreter des Notch-Signalwegs nachgewiesen werden konnten, wurden alle vier Rezeptoren (Notch 1-4) im frühen OA Stadium in der Oberflächenzone und im späten OA Stadium in den tiefer gelegen Regionen exprimiert. Im frühen OA Stadium war lediglich die EZM angefärbt, wohingegen im Verlauf der OA eine intensive Rezeptorfärbung in den Chondrozytenclustern beobachtet werden konnte. Bei den Notch-Liganden verhielt es sich sehr ähnlich. Die Expression von Delta-like 1 und Jagged-1 konnte weder im gesunden Knorpel als auch im frühen OA Stadium nachgewiesen werden, wohingegen die Expression beider Liganden in allen drei Zonen des späten OA Stadiums ermittelt wurde. In einer weiteren Studie von Ustunel *et al.*, (2008) konnten selbst in gesundem, humanem Knorpel die Mitglieder des Notch-Signalwegs nachgewiesen werden. Auch hier wurde die Expression des Notch-1 Rezeptors in der Oberflächenzone des Gewebes beobachtet. Die Knorpeloberfläche scheint eine Schlüsselrolle sowohl im gesunden als auch im osteoarthrotischen Gelenkknorpel zu spielen. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass in der Oberflächenzone des Gelenkknorpels chondrogene Progenitorzellen, sogenannte Vorläuferzellen, lokalisiert sind (Alsalameh *et al.*, 2004; Dowthwaite *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010). Alsalameh *et al.*, (2004) verglichen in diesem Zusammenhang gesundes mit osteoarthrotisch verändertem Gewebe und demonstrierten, dass die Anzahl dieser Chondrozyten-Subpopulation im erkrankten Gewebe höher war als im gesunden. Sie schlussfolgerten hieraus, dass die chondrogenen Vorläuferzellen entweder stark proliferieren oder dass sie aus den Nachbarregionen, wie der Synovialmembran oder der Synovialflüssigkeit, rekrutiert werden. Zwei weitere Studien zeigten zusätzlich, dass die Vorläuferzellen den Notch-1 Rezeptor sowohl in humanem als auch in bovinem Knorpel exprimieren (Dowthwaite *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010). Die oberflächliche Lokalisation der Vorläuferzellen im gesundem

## DISKUSSION

Knorpelgewebe deutet auf mögliche Reparaturprozesse im Knorpelgewebe hin, welche bei der Osteoarthritis gestört zu sein scheinen und zu den typischen Veränderungen, wie beispielsweise der Synthese von Faserknorpel und zur Kalzifizierung des Knorpels führen (Alsalameh *et al.*, 2004). Möglicherweise ist das proinflammatorische Milieu verantwortlich für diesen fehlerhaften Reparaturprozess, da gezeigt werden konnte, wie IL-1 und TNF $\alpha$  den Phänotyp der Chondrozyten durch die Inhibierung des Transkriptionsfaktors Sox9 verändern (Murakami *et al.*, 2000).

Zusammenfassend deutet die verstärkte Expression sowohl der Notch-Mitglieder als auch von DNER in oberflächlichen Regionen des OA Knorpels auf eine fehlerhafte Programmierung der dort lokalisierten chondrogenen Vorläuferzellen hin, welche durch das proinflammatorische Milieu ausgelöst wird. Der genaue Zusammenhang zwischen dem Notch-Signalweg und der Chondrogenese bzw. die Rolle des Signalwegs in den adulten Chondrozyten ist bis heute unklar und bedarf weiterer Analysen. Um eine Interaktion von DNER mit den Notch-Rezeptoren im Knorpelgewebe zu bestätigen, müsste in weiteren Studien die Co-Lokalisation dieser Proteine immunhistochemisch analysiert werden. Zusätzlich wäre es möglich den Einfluss von proinflammatorischen Mediatoren auf die Expression von DNER und der Notch-Rezeptoren in kultivierten Chondrozyten zu untersuchen.

### **5.3 Der Einfluss von DNER auf humane Chondrozyten**

#### **5.3.1 Knockdown von DNER in OA Chondrozyten**

Um eine Grundvorstellung von der Rolle DNERs in den Chondrozyten zu erhalten, wurde ein Knockdown der DNER mRNA in den humanen OA Chondrozyten mittels RNAi-Technologie vorgenommen (4.3.1). Nach erfolgreichem mRNA Knockdown wurde die Expression typischer Genkandidaten der Knorpelmatrix, wie beispielsweise Kollagen Typ II, Sox9, MMP-9, ADAMTS-4 und ADAMTS-5 untersucht. Zusätzlich wurde auch Kollagen Typ I als Marker für fibrilläres, osteoarthrotisches Gewebe analysiert (4.3.2). Als Ergebnis dieser Untersuchung konnte keine Beeinflussung der Expression der untersuchten Stoffwechselfparameter in Abhängigkeit von DNER nachgewiesen werden, was auf eine unzureichende Translationshemmung zurückzuführen sein könnte. Aufgrund dessen wurde der Erfolg des DNER-Knockdowns auf Proteinebene mittels Immunzytochemie und einer Western-Blot Analyse der Zellen untersucht (4.3.3). Beide Methoden bestätigten, dass die Translation von DNER durch den Knockdown der mRNA nicht gehemmt werden konnte. Da es sich bei dem Knockdown mittels RNAi-Technologie um eine transiente Reprimierung der DNER mRNA handelt, war die Dauer der Reprimierung nicht ausreichend um die Expression

## DISKUSSION

von DNER auf Translationsebene zu inhibieren. DNER scheint demnach eine längere Halbwertszeit zu besitzen als für eine erfolgreiche Inhibierung der Translation des DNER-Proteins mittels RNAi-Technologie nötig wäre.

Park *et al.*, (2010) verwendeten ebenfalls siRNA gegen DNER in hAMSCs um den Differenzierungsmechanismus, dem die Adipogenese unterliegt, näher zu untersuchen. Sie konnten zeigen, dass es nach sieben Tagen zu funktionellen Unterschieden zwischen den Kontrollzellen und den mit siRNA gegen DNER transfizierten Zellen kam. Der erfolgreiche Knockdown von DNER auf Proteinebene wurde jedoch nicht dargestellt.

Obwohl in dieser Arbeit der Einfluss von DNER auf bekannte Stoffwechselfparameter des Knorpels nicht nachgewiesen werden konnte, ergab die Western-Blot Analyse (4.3.3) einen neuen Aspekt. Neben den mit siRNA gegen DNER und NTP nukleofizierten Zellen wurde die Expression von DNER in unbehandelten Zellen untersucht. Sowohl nach 48 Stunden als auch nach 6 Tagen war die Expression von DNER in den unbehandelten Zellen um das 40-50fache im Vergleich zu den nukleofizierten Zellen reduziert. Beim Vergleich der einzelnen Proben (NTP, siDNER, unbehandelt) zu den Zeitpunkten 48h und 6d fiel zusätzlich auf, dass es nach sechs Tagen in den Proben NTP und siDNER zu einer Erhöhung der DNER Expression im Vergleich zum Zeitpunkt 48h kam. Hingegen konnte kein Expressionsunterschied in den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Bei den nukleofizierten Zellen zeigten die Ergebnisse der Western-Blot Analyse also, dass die Kultivierung in Kombination mit der Nukleofektionsmethode die DNER Expression stimulierte. Obwohl im Monolayer kultivierte Chondrozyten erwiesenermaßen ihren Phänotyp verändern (Benya *et al.*, 1978), konnte im Fall der unbehandelten Zellen hingegen kein Einfluss auf die DNER Expression festgestellt werden.

### **5.3.2 Nukleofektion von pDNER in gesunden und osteoarthrotischen Chondrozyten**

Um die Funktion eines Proteins zu untersuchen, ist es notwendig, sowohl die Reprimierung als auch die Überexpression zu überprüfen. Für die Überexpression von DNER wurde ein kommerziell erworbenes Plasmid verwendet (pDNER) (4.3.4). Sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene konnte eine erfolgreiche Überexpression von DNER nachgewiesen werden (4.3.4; 4.3.5). Neben den typischen Stoffwechselfparametern des Knorpels wie Kollagen Typ II, Aggrekan, Sox9, MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5 und TIMP-3, wurden sowohl Kollagen Typ X als Marker für hypertrophe Chondrozyten, als auch Kollagen Typ I als Marker für osteoarthrotische Chondrozyten untersucht. Bei keinem der gemessenen Parameter konnte 72 Stunden nach erfolgreicher DNER Überexpression eine differenzielle Expressierung nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte der Zusammenhang von DNER mit

## DISKUSSION

dem Notch-Signalweg als auch mit dem Wnt-Signalweg untersucht werden. Hierfür wurde der Expressionsunterschied eines *downstream*-Parameters des Notch-Signalwegs, Hes-1, und des Transkriptionsfaktors der Wnt-Signalkaskade,  $\beta$ -Catenin, analysiert. Auch hier konnte kein Expressionsunterschied zwischen den mit pDNER und den Kontrollvektor nukleofizierten Zellen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die osteoarthrotischen Chondrozyten generell ein hohes Level an DNER exprimieren und somit die Zellen bereits ein differentielles Expressionsprofil besitzen. Um dies zu überprüfen, wurde die Expression von DNER in humanen gesunden Chondrozyten untersucht. Für die Abdeckung eines weiten Spektrums an Zielgenen wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür ebenfalls mit pDNER nukleofiziert und die RNA nach 48 Stunden isoliert und untersucht (4.3.7). Die Analyse ergab, dass weder Knorpelmatrix-assoziierte Gene noch Gene des Notch- bzw. Wnt-Signalwegs auf die Überexpression von DNER reagiert haben. Lediglich bei den drei Genen SPEN, BST-2 und TRIM22 konnte ein Expressionsunterschied nachgewiesen werden (Tabelle 30). Während es bei SPEN zu einer tendenziell erhöhten Expression in den pDNER nukleofizierten Zellen kam, wurden BST-2 und TRIM22 im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen reprimiert.

Bei SPEN handelt es sich um einen hormonell induzierbaren Co-Repressor, welcher entweder durch die Interaktion mit anderen Repressoren oder durch die Rekrutierung von Proteinen, die bei der Histondeacetylierung eine Rolle spielen, die Transkription von Zielgenen reguliert. 2009 konnte in einer Studie von Jin *et al.*, die Regulation von SPEN durch den Notch-Signalweg in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden. Hierbei fungierte SPEN als Repressor der Hämatopoese, indem der Stammzellphänotyp erhalten blieb.

BST-2 wurde in einer Knochenmarks-Zelllinie als auch in einer RA-assoziierten synovialen Zelllinie entdeckt. BST-2 scheint eine Rolle beim Wachstum und bei der Entwicklung von B-Zellen zu spielen und wird mit dem Wachstum von Pre-B-Zellen in der RA in Zusammenhang gebracht (Ishikawa *et al.*, 1995). Zusätzlich konnte eine Co-Lokalisation von BMP-2 mit der *Membrane-type matrix metalloproteinase 1* (MT1-MMP) nachgewiesen werden, welche wiederum für die Aktivierung der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) verantwortlich ist. Durch die Interaktion von BST-2 mit der MT1-MMP wurde diese gehemmt, wodurch die Aktivierung von MMP-2 nicht induziert werden konnte und somit die proteolytische Funktion ausfiel. In Folge dessen kam es zur Reduktion des Wachstums als auch der Migration in einer Epithel- und einer Fibrosarkomzelllinie (Gu *et al.*, 2012).

Die Expression von TRIM22 ist Interferon-induziert, und das Protein scheint bei der antiviralen Immunantwort involviert zu sein. Zusätzlich konnte eine aktuelle Studie zeigen, dass TRIM22 den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert (Hui Qiu *et al.*, 2015). Der NF- $\kappa$ B-Signalweg ist wesentlich an dem Abbau der EZM während der OA beteiligt, indem er

## DISKUSSION

die Expression von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und Matrix-abbauenden Enzymen reguliert (Marcu *et al.*, 2010). Somit konnte beispielsweise die Aktivierung von ADAMTS-4 und ADAMTS-5 in den OA Chondrozyten nachgewiesen werden (Bondeson *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2013).

Ob die in den Microarray-Analysen ermittelten Gene tatsächlich im Zusammenhang mit einer Überexpression von DNER in den Chondrozyten stehen, sollte anhand einer weiteren Population von humanen gesunden Chondrozyten analysiert werden. Bei TRIM22 bestätigte sich die Reprimierung der mRNA in den DNER-überexprimierenden Chondrozyten, wohingegen die Expression von SPEN und BST-2 populationsabhängig war. Ob TRIM22 eine Rolle bei dem NF- $\kappa$ B vermittelten Abbau der EZM spielt, müsste in weiteren Untersuchungen eruiert werden, jedoch konnte kein direkter Einfluss auf matrixabbauende Enzyme anhand der Microarray-Analyse beobachtet werden.

### **5.3.3 Einfluss der Transfektionsmethode auf das Transkriptom der Chondrozyten**

Bei der Microarray-Analyse (4.3.7) konnten bis auf TRIM22 keine differenziell exprimierten Gene zwischen den pDNER und Kontrollvektor nukleofizierten Zellen nachgewiesen werden. Allerdings fiel auf, dass sowohl beim Vergleich der pDNER- als auch der Kontrollvektorzellen mit den unbehandelten Zellen extreme Expressionsunterschiede bei einer Reihe von Genen beobachtet werden konnten. Vor allem Zellzyklus- und Apoptose-assoziierte Gene wie beispielsweise Cyclin D2, Cyclin B1, Caspase 1 und TNFSF10 (*Tumor necrose factor (ligand) superfamily, member 10*) wurden differenziell exprimiert (Daten nicht gezeigt) (Frank Jacobsen *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2010). Man konnte aber auch bei SPEN, BST-2 und TRIM22 extrem unterschiedliche Expressionslevel in den unbehandelten Proben im Vergleich zu den pDNER- und Kontrollvektorzellen beobachten (4.3.7; Tabelle 30). Diese Unterschiede ließen auf einen enormen methodischen Einfluss schließen, welcher den Phänotyp und somit auch den Stoffwechsel der Zellen ändert.

Bei Primärzellen handelt es sich um relativ schwer transfizierbare Zellen (Gresch, 2004). Die effektivste Methode mit einer Rate bis nahezu 100% ist die virale Transfektion, welche aufgrund der langen Prozessierung und der anfallenden Kosten sowie der erhöhten Sicherheitsbedingungen gerne vermieden wird (Ueblacker *et al.*, 2007). Eine Alternative bieten lipidbasierte Reagenzien. Der Nachteil dieser chemischen Transfektion ist jedoch, dass die Fremd-DNA zwar in das Zytoplasma, jedoch nicht in den Zellkern transportiert wird, was sowohl die Transfektionsdauer erhöht als auch die Effektivität reduziert (Tae Kyung Kim und Eberwine, 2010). In der Studie von Madry und Trippel (2000) wurden lipidbasierte

## DISKUSSION

Transfektionsreagenzien an humanen gesunden und osteoarthrotischen, als auch an bovinen Chondrozyten untersucht. Als Ergebnis dieser Analyse konnte mit dem effektivsten lipidbasierten Transfektionsreagenz (FuGENE 6; Promega, Mannheim) eine Transfektionsrate für bovine Chondrozyten von 41%, für gesunde Chondrozyten von 20,7% und bei den osteoarthrotischen Chondrozyten von 7,8% erzielt werden. Eine effektivere Methode bietet hierbei die Nukleofektion, bei der mittels Elektroporation die Fremd-DNA zunächst in die Zelle eingeschleust und anschließend anhand des Transfektionsreagenz in den Zellkern transportiert wird. Hierbei konnte eine Transfektionsrate von bis zu 80% mit einer Viabilitätsrate von ca. 70% in primären humanen Chondrozyten erreicht werden (Haag *et al.*, 2009). Auch die in dieser Arbeit ermittelten Daten der Überexpression von AQP1 und DNER konnten dies bestätigen (4.1.2; 4.3.4). Die hier vorliegenden Daten der Microarray-Analyse weisen darauf hin, dass die Auswirkungen der Nukleofektion sehr gravierend für Primärzellen sind und vor allem die vorgeschädigten osteoarthrotischen Chondrozyten stark beeinflusst. Da überwiegend Apoptose-assoziierte Gene differenziell exprimiert worden sind, sollte der Einfluss der Nukleofektionsmethode auf die Zellen im Vergleich zur lipidbasierten Transfektionsmethode mittels X-tremeGENE HP (Roche Diagnostics, Mannheim) anhand einer Annexin-V-FLUOS Färbung untersucht werden (4.4). Hierfür wurden die Zellen entweder mit pDNER oder dem Kontrollvektor nukleofiziert bzw. transfiziert und mit den unbehandelten Zellen verglichen. Das Ergebnis dieser Analyse war, dass die Transfektion 72h nach Versuchsbeginn keinen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen hatte, wohingegen bei den nukleofizierten Zellen lediglich ein Drittel der Zellen gezählt werden konnte (Tabelle 33). Bei der Untersuchung der apoptotischen als auch nekrotischen Zellen konnte man eindeutig erkennen, dass die Zellzahl der apoptotischen als auch nekrotischen Zellen bei der Nukleofektion um das Doppelte erhöht war. Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse, dass es sich bei der Nukleofektion um eine effektive Methode handelt, um Primärzellen wie Chondrozyten mit Fremd-DNA zu transfizieren. Sie löst jedoch zugleich sehr viel mehr Zellstress aus als die lipidbasierenden Methoden (Frank Jacobsen *et al.*, 2006; Haag *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2010). Nicht nur die Elektroporation, vielmehr die vorbereitenden Versuchsschritte, wie beispielsweise der Pronase/Kollagenase-Verdau, scheinen die veränderten osteoarthrotischen Zellen zu beschädigen und ihr Expressionsprofil zu verändern.

### **5.3.4 Lipofektion von pDNER in gesunden und osteoarthrotischen Chondrozyten**

Um den Einfluss der Transfektionsmethode auf die Chondrozyten zu reduzieren, wurde die Überexpression von DNER zusätzlich zur bisherigen Nukleofektion auch mittels chemischer

## DISKUSSION

Transfektion initiiert. Nach 24h konnte eine erfolgreiche Überexpression von DNER auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (4.5). Anschließend wurden typische Stoffwechselfparameter des Knorpels, Mitglieder des Notch- und des Wnt-Signalwegs als auch die drei Gene der Microarray-Analyse (4.3.7) (SPEN, BST-2, TRIM22) in humanen OA Chondrozyten nach 72h analysiert. Als Ergebnis dieser Analyse konnte im Gegensatz zur Nukleofektion eine erhöhte Expression von TRIM22 nach Überexpression von DNER in den OA Chondrozyten nachgewiesen werden. Bei allen anderen untersuchten Parametern kam es zu keiner differenziellen Expression im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen. Um auszuschließen, dass die aus osteoarthrotischem Knorpel stammenden Chondrozyten von vornherein eine erhöhte Expression von DNER besitzen und somit die Überexpression keinen Einfluss zeigt, wurden auch hier gesunde humane Chondrozyten chemisch transfiziert. Im Fall der gesunden humanen Chondrozyten konnte ebenfalls eine Hochregulierung von TRIM22 verzeichnet werden. Auch Kollagen Typ X und  $\beta$ -Catenin wurden hochreguliert. Zusätzlich wurde eine tendenzielle Reprimierung von TIMP-3 beobachtet. Allerdings wurde nur eine Population der kommerziell erworbenen Chondrozyten untersucht, was einen populationsbedingten Effekt nicht ausschließen lässt. Die durchgeführten Versuchsansätze demonstrierten, dass DNER keinen eindeutigen Einfluss auf die kultivierten humanen Chondrozyten, weder bei gesundem noch bei osteoarthrotischem Ursprung hatte. Da die Überexpression von DNER in den lädierten Arealen des osteoarthrotischen Kniegelenksknorpels (4.2.2) weiterhin eine Rolle bei der OA Pathogenese vermuten ließ, und da seit längerer Zeit das Vorhandensein von chondrozytären Vorläuferzellen im Knorpel diskutiert wird, sollte der Einfluss von DNER während der Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen untersucht werden (4.6).

### **5.4 Der Einfluss von DNER auf die *in vitro* Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Obwohl die Pathogenese der Osteoarthrose weiterhin nicht vollständig geklärt ist, scheinen die Schlüsselereignisse einerseits die Expression von matrixabbauenden Enzymen und andererseits die Neusynthese von veränderter extrazellulärer Knorpelmatrix zu sein (Mary B Goldring und Steven R Goldring, 2007). Da neben den matrixabbauenden Enzymen wie beispielsweise MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 und ADAMTS-5 auch die Kollagene Typ X und Typ I verstärkt exprimiert werden, geht man von einer Rekapitulation der enchondralen Ossifikation aus (Blom *et al.*, 2009). Das Vorhandensein von chondrogenen Vorläuferzellen, eine Art Subpopulation von Chondrozyten, welche für die Rekrutierung von weiteren Zellen als auch für die Synthese der veränderten Matrix verantwortlich zu sein scheinen, untermauert diese Hypothese. Diese Vorläuferzellen exprimieren neben typischen

## DISKUSSION

Stammzellmarkern wie z.B. CD105 und CD166 zusätzlich Notch-1 (Alsalameh *et al.*, 2004; Dowthwaite *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2010). Da in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von DNER auf die adulten Chondrozyten nachgewiesen werden konnte, obwohl DNER in den lädierten Arealen des osteoarthrotischen Knorpelgewebes hochreguliert wird, wurde der Einfluss von DNER bei der Chondrogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen untersucht. Hierfür wurden kommerzielle humane mesenchymale Stammzellen mit pDNER oder dem Kontrollvektor nukleofiziert und anschließend *in vitro* mittels Pellet-Kultur differenziert (4.6.2). Die erfolgreiche DNER Überexpression konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (4.6.2.1; 4.6.3). Im Verlauf der Chondrogenese (Tag 0 bis Tag 21) wurden typische Stoffwechselfparameter des Knorpels und Mitglieder des Notch-Signalwegs untersucht. Auch die Anzahl von apoptotischen Zellen wurde in den hMSC-Pellets analysiert. Für Kollagen Typ I, Kollagen Typ X und Sox9 war eine Analyse sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene möglich, wohingegen die GAG Expression als auch der Apoptose-Assay immunhistochemisch und die Expression von MMP-13, ADAMTS-4 und 5, TIMP-3, Notch-1 und 2, Jagged-1, Hes-1 und 2 sowie  $\beta$ -Catenin, aufgrund der hohen Versuchskosten, lediglich auf RNA-Ebene untersucht werden konnten.

### **5.4.1 Expressionsanalyse der Strukturproteine während der *in vitro* Chondrogenese nach DNER Überexpression**

Um den erfolgreichen Verlauf der Chondrogenese darzustellen, wurde unter anderem die Glykosaminoglykan (GAG) Expression untersucht. Der konstante Anstieg der strukturgebenden GAG Expression sollte hierbei Aufschluss auf den Matrixaufbau der hMSC Pellets geben, was sowohl in den Kontrollvektorzellen als auch in den DNER überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnte (4.6.2.2). Zwischen den beiden Ansätzen konnte wiederum kein Expressionsunterschied der GAG-Expression nachgewiesen werden, was einen Einfluss von DNER auf die GAG Expression ausschließen lässt.

Des Weiteren wurde der Einfluss von DNER auf die Kollagen Typ I Expression untersucht. Kollagen Typ I gilt als früher Marker der Chondrogenese und wird *in vivo* im Laufe der Differenzierung durch die Synthese von Kollagen Typ II ersetzt. Bei der *in vitro* Chondrogenese ist eher eine Co-Expression von Kollagen Typ I, II sowie Kollagen Typ X im gesamten Zeitverlauf zu erwarten (Mwale *et al.*, 2006; Karlsson *et al.*, 2007). In einem Vorversuch der hMSC Pellet-Kultur (4.6.1) konnte jedoch eine erfolgreiche Reprimierung der Kollagen Typ I Expression nachgewiesen werden, wohingegen in den hMSC-Pellets nach der Nukleofektion von pDNER oder dem Kontrollvektor eine Reprimierung der Expression

## DISKUSSION

lediglich zu Beginn möglich war, welche sich gegen Ende wieder auf das Anfangsniveau regulierte (4.6.4.1). Auf Proteinebene blieb die Kollagen Typ I Expression während des gesamten Zeitverlaufs in beiden Ansätzen relativ konstant mit einer Flächenfärbung zwischen 20-40% (4.6.2.3). Beim Vergleich der DNER überexprimierenden Zellen mit den Kontrollvektorzellen konnte eine tendenziell erniedrigte Kollagen Typ I Expression in den pDNER nukleofizierten Zellen nachgewiesen werden, welche jedoch populationsabhängig war. Die niedrigere Expression von Kollagen Typ I in den pDNER Pellets könnte die Folge einer Änderung des Expressionsprofils der hMSCs sein. Die Zellen exprimierten möglicherweise verstärkt andere strukturgebende Proteine wie beispielsweise Kollagen Typ II oder X, um den terminalen Phänotyp weiter voran zu treiben (Karlsson *et al.*, 2007).

### **5.4.2 Einfluss von DNER auf die Hypertrophie der hMSCs während der *in vitro* Chondrogenese**

Die Expression von Hypertrophie-Markern wie beispielsweise Kollagen Typ X aber auch MMP-13 und die Alkalische Phosphatase sind eine Begleiterscheinung während der *in vitro* Chondrogenese von MSCs, da die Hypertrophie mit der Zelloptose bzw. der Ossifikation der Gewebe einhergeht (Mueller und Tuan, 2008). Interessanterweise ist die Expression von Kollagen Typ X ein primäres Event der *in vitro* Differenzierung, welches schon vor der Expression von Kollagen Typ II beobachtet werden kann. Im weiteren Verlauf bleibt die Expression von Kollagen Typ X entweder konstant oder intensiviert sich im Zeitverlauf (Barry, 2001; Karlsson *et al.*, 2007; Mueller und Tuan, 2008). Bei der *in vitro* Chondrogenese der hMSCs konnte sowohl in den mit Kontrollvektor transfizierten als auch in den DNER überexprimierenden Zellen ein konstanter Anstieg der Kollagen Typ X mRNA beobachtet werden, welcher ab Tag 7 ca. 400fach, im Vergleich zum Beginn der Chondrogenese, erhöht war. Zusätzlich war während des gesamten Zeitverlaufs die Kollagen Typ X mRNA Expression der DNER überexprimierenden Zellen deutlich erhöht (4.6.4.2). Dieser Effekt bestätigte sich auch auf Proteinebene (4.6.2.4). Obwohl in beiden Fällen die Ergebnisse populationsabhängig waren, konnte durch die deutlich erhöhte Expression von Kollagen Typ X in den DNER exprimierenden Zellen von einer physiologischen Relevanz ausgegangen werden. Demnach würde DNER die Expression von Kollagen Typ X positiv beeinflussen und somit die Hypertrophie des Gewebes fördern und folglich den terminalen chondrozytären Zelltyp begünstigen.

Da DNER ein Ligand des Notch-Rezeptors ist, stellt sich die Frage, ob der hypertrophe Status der Chondrozyten durch den Notch-Signalweg beeinflusst wird. Bei der Knochenentwicklung in Hühnerembryonen konnte beispielsweise die negative Regulierung der Differenzierung von prähypertrophen Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten

## DISKUSSION

durch den Delta/Notch-Signalweg ermittelt werden (Crowe *et al.*, 1999). Crowe *et al.*, (1999) stellten fest, dass Delta-1 lediglich in den Kollagen Typ X exprimierenden, hypertrophen Chondrozyten und der Rezeptor Notch-2 in allen Chondrozytenstadien exprimiert wird. Durch die retrovirale Überexpression von Delta-1 kam es zur Entwicklung von verkürzten Embryonenknochen. Während prähypertrophe Chondrozyten nachgewiesen werden konnten, war der Übergang zu den hypertrophen Chondrozyten nicht möglich. Dass der Notch-Signalweg bei der terminalen Differenzierung der Chondrozyten eine Rolle spielen muss, bestätigte das Vorhandensein aller Rezeptoren sowie Liganden in den hypertrophen Chondrozyten der murinen Wachstumsfuge (Hayes *et al.*, 2003). Die Studie von Oldershaw *et al.*, (2008) stützt die Hypothese, dass das Ausschalten des Notch-Signalwegs während der chondrogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen essenziell für die Komplettierung der Chondrogenese ist und die Interaktion von Notch mit seinen Liganden die Differenzierung negativ reguliert.

Neben Kollagen Typ X wurde in der vorliegenden Arbeit auch MMP-13 als Marker für die Hypertrophie der Chondrozyten analysiert (4.6.4.3). Auch hier konnte eine Erhöhung der MMP-13 mRNA im Verlauf der Chondrogenese nachgewiesen werden, welche an Tag 14 sowohl in den DNER überexprimierenden Zellen als auch in den Kontrollvektorzellen mit einer ca. 2400fachen Überexpression am stärksten war. Beim Vergleich der beiden Ansätze konnte zusätzlich an den Tagen 2, 3, 7 und 21 ein deutlicher Expressionsunterschied beobachtet werden. Die DNER überexprimierenden Zellen exprimierten teilweise 400-500fach mehr MMP-13 als die Kontrollvektorzellen. Auch wenn die statistische Signifikanz nicht erreicht werden konnte, decken sich die Beobachtungen eines hypertrophen Phänotyps mit der Expression von Kollagen Typ X. Neben dem Vorkommen von Kollagen Typ X und MMP-13 in den prähypertrophen Chondrozyten, werden beide Proteine in osteoarthrotischem Knorpel verstärkt exprimiert und liegen co-lokalisiert vor (Mark *et al.*, 1992; Bau *et al.*, 2002; Mary B Goldring *et al.*, 2005). In der Osteoarthrose induzieren die Zytokine IL-1 und TNF $\alpha$  die Expression von MMP-13, dessen Hauptsubstrat Kollagen Typ II ist, und somit die Matrixmetalloproteinase zu den Hauptakteuren der Knorpeldegradation macht (Mitchell *et al.*, 1996; Vincenti und Brinckerhoff, 2002). Auch die Mitglieder des Notch-Signalwegs werden sowohl im osteoarthrotischem Knorpel als auch in kultivierten Chondrozyten exprimiert (Karlsson *et al.*, 2008). Obwohl der Notch-Signalweg als Inhibitor der Differenzierung von prähypertrophen zu hypertrophen Chondrozyten während der Chondrogenese gilt, konnte in kultivierten murinen Chondrozyten durch die Inhibierung von Notch durch DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) die Expression von MMP-13 gestoppt werden (Blaise *et al.*, 2009). Man ging davon aus, dass durch die Aktivierung von Notch der dedifferenzierte Zustand der Zelle aufrechterhalten wird, indem es zu einer erhöhten proteolytischen Spaltung von Kollagen Typ II durch MMP-13

## DISKUSSION

kommt. Da die Synthese von MMP-13 durch IL-1 $\beta$  aktiviert werden kann gehen Blaise *et al.*, davon aus, dass es in der OA zum *Crosstalk* zwischen dem Notch-Signalweg und dem NF- $\kappa$ B- als auch dem MAPK-Signalweg kommen könnte. Hierbei würde IL-1 $\beta$  den Notch-Signalweg induzieren, wodurch es zur Synthese von MMP-13 und schlussendlich zum Abbau von Kollagen Typ II und zur Dedifferenzierung der Zellen kommt (Blaise *et al.*, 2009; Borggreffe und Oswald, 2009). Sassi *et al.*, (2014) untersuchten die Rolle von Notch-1 in kultivierten humanen Chondrozyten und kamen zum selben Resultat, dass die Notch-1 Expression proportional zur Expression von Dedifferenzierungsmarkern wie Kollagen Typ I und MMP-13 ist. Durch die Hemmung des Notch-1 Rezeptors mittels DAPT konnte dieser Effekt aufgehoben werden, was zum erneuten Anstieg von Kollagen Typ II und Aggrekan und somit zum ausdifferenzierten chondrozytären Zelltyp führte.

Bei der Identifizierung des DNER-Proteins im Zentralnervensystem stellten Eiraku *et al.*, (2005) fest, dass DNER sowohl den kanonischen als auch den nicht-kanonischen Notch-Signalweg (1.3.1) aktiviert. Da DNER in der lädierten Oberflächenzone des OA Gewebes primär exprimiert wird, ist eine positive Regulierung des Notch-Signalwegs denkbar, welche den dedifferenzierten Phänotyp des Gewebes unterstützt. Dagegen würde sprechen, dass es durch die Überexpression von DNER während der *in vitro* Chondrogenese zu einer tendenziellen Erniedrigung der Kollagen Typ I Expression kam (4.6.2.3; 4.6.4.1). Zusätzlich konnte ein positiver Einfluss auf die MMP-13 (4.6.4.3) als auch auf die Kollagen Typ X (4.6.2.4; 4.6.4.2) Expression nachgewiesen werden, was für ein Vorantreiben des hypertrophen Phänotyps der Chondrozyten spricht. In diesem Fall ist eher von einer Hemmung des Notch-Signalwegs durch DNER auszugehen. DNER könnte beispielsweise über den nicht-kanonischen Signalweg und somit über die Aktivierung von Deltex für den hypertrophen Phänotyp verantwortlich sein. Um den Einfluss von DNER auf den Notch-Signalweg zu überprüfen, wurden neben den Stoffwechselfparametern des Knorpels einige Mitglieder der Notch-vermittelten Signalkaskade während der *in vitro* Chondrogenese näher untersucht.

### **5.4.3 Einfluss von DNER auf den Notch-Signalweg während der *in vitro* Chondrogenese**

Der Notch-Signalweg ist ein stark konservierter Signaltransduktionsweg, bei dem der Rezeptor Notch über direkten Zell-Zell Kontakt mit seinen Liganden interagiert. Der Notch-Signalweg ist maßgeblich an Prozessen der embryonalen Entwicklung beteiligt, spielt aber auch eine wesentliche Rolle im adulten Gewebe, beispielsweise bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und der Apoptose. Die hier vorliegenden Untersuchungen der Notch-1 mRNA während der *in vitro* Chondrogenese würden die Hypothese unterstreichen, dass

## DISKUSSION

DNER einen inhibierenden Effekt auf den Notch-Signalweg zu haben scheint. Während in den Kontrollvektorzellen, wie erwartet, eine leicht erhöhte Expression von Notch-1 zu Beginn der Chondrogenese beobachtet wurde, welche im Zeitverlauf kontinuierlich abnahm, konnte in den DNER überexprimierenden Zellen kein Anstieg der mRNA Expression zu Beginn nachgewiesen werden (4.6.4.8). Neben Notch-1 wurde auch die mRNA Expression des Notch-2 Rezeptors untersucht (4.6.4.9). Zu Beginn der Chondrogenese konnte eine Hochregulierung der Notch-2 mRNA Expression beobachtet werden, welche gegen Ende der Differenzierung auf das Anfangsniveau zurück sank. Insgesamt lag das Expressionslevel der Notch-2 mRNA während der Chondrogenese höher als von Notch-1 was sich mit den Beobachtungen der Studie von Oldershaw *et al.*, (2008) deckte, bei welcher das Expressionsprofil der Notch- Rezeptoren und Liganden untersucht und anschließend herausgefunden wurde, dass durch die Überexpression des Notch-Liganden Jagged-1 die Chondrogenese der hMSCs gehemmt wird. Beim Vergleich der beiden Versuchsansätze pDNER- und Kontrollvektorzellen konnte eine populationsabhängig erhöhte Expression des Notch-2 Rezeptors in den DNER überexprimierenden Zellen zum Zeitpunkt 1d beobachtet werden, wohingegen im weiteren Zeitverlauf keine Unterschiede nachgewiesen werden konnten. DNER könnte somit theoretisch eine duale Rolle innerhalb der chondrogenen Differenzierung spielen, indem es über Deltex die Expression des Notch-1 Rezeptors reprimiert und somit die Expression von Kollagen Typ X vorantreibt und andererseits durch die Aktivierung des Notch-2 Rezeptors die Expression der MMP-13 mRNA erhöht. Ob Notch-2 generell einen Einfluss auf die MMP-13 Expression hat wurde zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht untersucht. Es ist lediglich bekannt, dass MMP-13 eine vermeintliche CSL-Bindedomäne in der Promotorregion besitzt, durch welche der Notch-Signalweg einen Einfluss auf die Synthese haben könnte (Blaise *et al.*, 2009). Auch in dieser Arbeit wurde die Expression des Notch-Liganden Jagged-1 untersucht (4.6.4.10). Im Gegensatz zu der Studie von Oldershaw *et al.*, (2008) konnte sowohl in den DNER überexprimierenden Zellen als auch in den Kontrollvektorzellen eine Reduktion der Jagged-1 mRNA im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese nachgewiesen werden. Einen Expressionsunterschied gab es hierbei zwischen den beiden Versuchsansätzen pDNER- und Kontrollvektorzellen nicht. Interessanterweise war ein Nachweis von Jagged-1 auch während der murinen Knochenentwicklung nicht möglich (Hayes *et al.*, 2003), was eventuell methodisch bedingt sein könnte.

Um den Einfluss von DNER auf den kanonischen Notch-Signalweg näher zu überprüfen, wurden zusätzlich die Zielgene Hes-1 und Hey-1 während der chondrogenen Differenzierung untersucht (4.6.4.11). Hes-1 wurde im Verlauf der *in vivo* Chondrogenese hochreguliert, wohingegen die Expression von Hey-1 auf einem niedrigen Level verblieb (Karlsson *et al.*,

## DISKUSSION

2007). Auch in der vorliegenden Arbeit blieb die Expression von Hes-1 auf einem sehr niedrigem Niveau im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese. Gegen Ende der chondrogenen Differenzierung kam es sogar zu einer Reprimierung der Hes-1 mRNA Expression. Insgesamt konnte kein Unterschied zwischen den DNER und Kontrollvektor behandelten Zellen nachgewiesen werden, lediglich zum Zeitpunkt 2d wurde die Hes-1 mRNA Expression den DNER überexprimierenden Zellen leicht hochreguliert. Obwohl der Expressionsunterschied statistisch signifikant war, muss bei einem Expressionsunterschied um den Faktor zwei eine physiologische Relevanz kritisch diskutiert werden. Die Expression von Hey-1 war sehr stark populationsabhängig, lag aber zu Beginn der Chondrogenese in beiden Ansätzen unter dem Niveau im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Differenzierung. Erst ab Tag 7 stieg die Expression in beiden Ansätzen wieder leicht an. Das sowohl Hes-1 als auch Hey-1 ab Beginn der Chondrogenese kontinuierlich herunter reguliert wurden, hing vermutlich damit zusammen, dass die beiden, durch Notch aktivierten Repressoren, die Expression von Kollagen Typ II und Aggrekan regulieren (Grogan *et al.*, 2008). Beide Proteine binden an eine N-Box Domäne, eine regulatorische Sequenz, welche sich in der Sox9 *Enhancer*-Bindestelle befindet und im ersten Intron des Kollagen Typ II Gens lokalisiert ist. Durch die Überexpression von Hes-1 und Hey-1 wird die Expression der beiden wichtigsten Matrixkomponenten (Kollagen Typ II, Aggrekan) des Knorpels reprimiert, was eine Runterregulierung dieser beiden Repressoren innerhalb der Chondrogenese unabdingbar macht. Die Studie von Fujimaki *et al.*, (2006) bestätigt die vorliegenden Daten indem sie zeigten, dass durch die Inhibierung der  $\gamma$ -Sekretase, welche für die Spaltung des Notch Rezeptors und somit für die Signaltransduktion verantwortlich ist, die Expression von Sox9 und Kollagen Typ II während der Differenzierung erhöht wurde. Das gegen Ende der Chondrogenese die Expression von Hey-1 wieder anstieg, könnte zum einen populationsbedingt oder aber auch methodisch bedingt sein. Eine weitere Hypothese wäre, dass die Reduktion der Kollagen Typ II Expression mit dem hypertrophen Phänotyp der Zellen gegen Ende der Chondrogenese in Zusammenhang steht.

### **5.4.4 Einfluss von DNER auf Transkriptionsfaktoren während der *in vitro* Chondrogenese**

Sox9, einer der vermutlich wichtigsten Regulatoren der frühen Differenzierungsphase, wird primär in den kondensierenden als auch in den Prächondrozyten exprimiert (Wright *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1997). Neben der positiven regulatorischen Eigenschaft gegenüber Kollagen Typ II und Aggrekan, ist Sox9 mit Sox5 und Sox6 verantwortlich für die Suppression von hypertrophen Markern (Lefebvre und Smits, 2005). Dies ist auch der Grund weshalb die Sox9 Expression zu Beginn der Chondrogenese erhöht ist und währenddessen

## DISKUSSION

kontinuierlich sinkt. Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit anhand der *in vitro* Chondrogenese von humanen MSCs bestätigt werden (4.6.1) (Kulyk *et al.*, 2000; Lefebvre und Smits, 2005). Auch nach der Nukleofektion von pDNER bzw. dem Kontrollvektor war eine kontinuierliche Reduktion der Sox9 mRNA während der Chondrogenese zu beobachten. Obwohl auf mRNA Ebene keine Expressionsunterschiede zwischen den beiden Ansätzen erkennbar waren (4.6.4.4), lagen die Expressionslevel auf Proteinebene weit auseinander (4.6.2.5). Die Analyse ergab, dass die mit Kontrollvektor behandelten Zellen auch auf Proteinebene die Sox9 Synthese kontinuierlich reduzierten, wohingegen es bei den pDNER behandelten Zellen zwischen Tag 7 und 14 zunächst zu einer 2,7fachen Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollzellen kam. Da sowohl die Kollagen Typ X als auch die MMP-13 Expression der DNER überexprimierenden Zellen ab dem Zeitpunkt 7d erhöht war, könnte man anhand der vorliegenden Daten von einem kompensatorischen Effekt der hMSCs ausgehen, bei welchem die Zellen Sox9 und somit auch die Synthese von Kollagen Typ II und Aggrecan hoch regulieren. Dieser müsste jedoch durch weitere Untersuchungen überprüft werden.

Eine weitere Möglichkeit wie DNER die Chondrogenese beeinflussen könnte ist über die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin. Die Signaltransduktion anhand des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist ein wesentlicher Prozess der embryonalen Entwicklung. Innerhalb der Chondrogenese scheint der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg für die säulenförmige Anordnung der Chondroblasten verantwortlich zu sein (Kronenberg, 2003). Unter anderem reguliert der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg die Expression von WISP-1, einem Zielgen, welches die chondrogene Differenzierung hemmt und im osteoarthrotischen Gewebe hochreguliert wird (French *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung von Chondrozyten mit WISP-1 zu einer erhöhten Expression von IL-1 $\beta$  führt und eine Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs die Progression der OA inhibiert (Blom *et al.*, 2009). Zusätzlich scheint es einen *Crosstalk* zwischen dem Notch- und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zu geben, welcher über den kanonischen Notch-Signalweg synergistisch oder über einen Liganden-unabhängigen nicht-kanonischen Notch-Signalweg antagonistisch interagiert. Beim nicht-kanonischen Signalweg geht intrazelluläres Notch direkt eine Interaktion mit den Proteinen des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ein (Andersen *et al.*, 2012). Die Analyse der  $\beta$ -Catenin mRNA Expression während der *in vitro* Chondrogenese in den pDNER und den Kontrollvektorzellen ergab, dass in beiden Ansätzen die Expression konstant im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Differenzierung blieb. Lediglich an Tag 21 konnte eine leichte Erhöhung der  $\beta$ -Catenin mRNA Expression in beiden Ansätzen beobachtet werden. Da durch die Analyse der mRNA Expression keine Hinweise auf die Rolle von  $\beta$ -Catenin während der Differenzierung gegeben werden konnten, wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Proteinexpression von Bedeutung.  $\beta$ -Catenin wird in den Zellen durch

## DISKUSSION

einen Multienzymkomplex gebunden und kann anschließend ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden. Bindet jedoch der extrazelluläre Wachstumsfaktor Wnt an den Wnt-Rezeptor wird der Abbau von  $\beta$ -Catenin unterbrochen, wodurch das Protein in der Zelle angereichert werden kann und durch das Binden an Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen induziert (Cadigan und Nusse, 1997). In diesem Zusammenhang wäre die Analyse der  $\beta$ -Cateninanreicherung während der chondrogenen Differenzierung und nach der DNER Überexpression sehr hilfreich.

### **5.4.5 Einfluss von DNER auf die Apoptose der hMSCs während der *in vitro* Chondrogenese**

DNER scheint nach der bisherigen Ergebnislage einen Einfluss auf die Hypertrophie des Knorpelgewebes zu haben. Am Ende der chondrogenen Differenzierung induzieren die hypertrophen Chondrozyten die Mineralisierung des Gewebes und unterliegen im Anschluss der Apoptose um den migrierenden Osteoblasten den Raum für den Knochenaufbau zu geben (Lefebvre und Smits, 2005). Zusätzlich gehört die Apoptose der Chondrozyten zu den pathologischen Befunden der OA (Horton *et al.*, 2005). Da die Chondrozyten aufgrund der Überexpression von DNER mehr Kollagen Typ X und MMP-13 exprimieren, sollte auch die Zelltoderate der hMSC-Pellets untersucht werden (4.6.2.6). In den Kontrollvektorzellen konnte im Zeitverlauf (Tag 7 bis 21) eine Abnahme der apoptotischen Zellen beobachtet werden. Hingegen war die Apoptoserate in den DNER überexprimierenden Zellen zu Beginn der Chondrogenese geringer und erreichte ihr Maximum an Tag 14. Das tendenziell in beiden Ansätzen die Anzahl an apoptotischen Zellen im Verlauf der Differenzierung abnahm, ist vermutlich methodisch bedingt. Wie schon anhand der humanen Chondrozyten gezeigt wurde (3.4.10), unterliegen die Zellen einem enormen Stress durch die Methode (Cao *et al.*, 2010). In der Studie von Grogan *et al.*, (2008) bei der die Rolle des Notch-Signalwegs untersucht worden ist, wurden die Zellen zunächst 4 Tage nach der Nukleofektion kultiviert, bevor sie in die Pellet-Kultur gebracht wurden. Diese Vorgehensweise wurde vermutlich gewählt, um den Zellen nach dem Stress Zeit zur Regeneration zu geben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen 24h nach der Nukleofektion kultiviert um den Effekt von DNER auf die hMSCs direkt untersuchen zu können. Aus diesem Grund regenerierten sich die hMSCs vermutlich innerhalb der Pellet-Kultur was wiederum zu der Abnahme der apoptotischen Zellen im Zeitverlauf führte. Geht man nicht von einem methodischen Effekt aus und betrachtet den Anstieg der Apoptoserate zu Beginn der Chondrogenese in den DNER überexprimierenden Zellen könnte man davon ausgehen, dass diese durch die steigende Hypertrophie des Gewebes bedingt wird (Lefebvre und Smits, 2005). Das sich die Zellen bis Tag 21 wieder zu regenerieren scheinen, liegt gegebenenfalls an der Abnahme

## DISKUSSION

der Hypertrophie-Marker. Vergleicht man die Ergebnisse von Kollagen Typ X sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (4.6.2.4; 4.6.4.2) fällt auf, dass zum Zeitpunkt 21d die Expression innerhalb der Pellets wieder abnahm. Auch bei der Expression von MMP-13 konnte eine Reprimierung der mRNA an Tag 21 im Vergleich zu Tag 14 nachgewiesen werden (4.6.4.3).

### **5.4.6 Einfluss von DNER auf Enzyme der extrazellulären Matrix und deren Gegenspieler während der *in vitro* Chondrogenese**

Neben der Analyse der Strukturproteine, welche als Marker für einen erfolgreichen Aufbau der Knorpelmatrix dienen, als auch der Marker für hypertrophes Gewebe, sollten die matrixabbauenden Enzyme ADAMTS-4, ADAMTS-5 und deren Gegenspieler TIMP-3 auf mRNA Ebene untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von ADAMTS-4 im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Chondrogenese zunächst kontinuierlich anstieg um dann bis Tag 21 wieder langsam abzuflachen (4.6.4.5). Das Expressionsprofil war in beiden Ansätzen annähernd gleich mit dem Unterschied, dass die Kontrollvektorzellen an Tag 3 und die DNER überexprimierenden Zellen an Tag 7 ihr Maximum erreicht haben. Die Hochregulierung von ADAMTS-4 während der *in vitro* Chondrogenese deckt sich mit den Ergebnissen von Boeuf *et al.*, (2012). Sie vermuteten, dass die Hochregulierung von ADAMTS-4 mit dem hypertrophen Phänotyp in Verbindung steht, da Runx2 neben den typischen Hypertrophie-Markern wie Kollagen Typ X und MMP-13 auch die Expression von ADAMTS-5 hochreguliert (Thirunavukkarasu *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte die Expression von ADAMTS-4 in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge von Ratten nachgewiesen werden, was auf eine Rolle der Aggrekanasen bei der Mineralisierung des Knorpels vermuten lässt (Mitani *et al.*, 2006). Da die stärkste Expression von ADAMTS-4 in den DNER überexprimierenden Zellen an Tag 7 nachgewiesen werden konnte und diese zusätzlich doppelt so hoch war wie in den Kontrollvektorzellen, könnte das den Einfluss von DNER auf die Hypertrophie der Zellen unterstreichen. Auch das Expressionsprofil von ADAMTS-5 deckte sich mit den Daten von Boeuf *et al.*, (2012), da in beiden Ansätzen lediglich eine Reprimierung im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Differenzierung nachgewiesen werden konnte (4.6.4.6). Der Vergleich zwischen den pDNER und den Kontrollvektorzellen ergab, dass in den DNER überexprimierenden Zellen das Expressionslevel von ADAMTS-5 bis auf Tag 14 insgesamt höher lag. Dieser Expressionsunterschied war an Tag 2 statistisch signifikant. Das DNER einen geringeren Einfluss auf die ADAMTS-5 als auf die ADAMTS-4 Expression zeigt liegt vermutlich daran, dass die beiden Aggrekanasen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegen. Während die ADAMTS-4 Expression durch die katabolen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , sowie

## DISKUSSION

den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  reguliert wird, konnte für ADAMTS-5 sowohl eine konstitutive Expression in humanem Knorpel als auch eine Zytokin induzierte Expression in den Spezies Maus und Rind nachgewiesen werden (Koshy *et al.*, 2002; Fosang *et al.*, 2008). Dennoch könnte das höhere Expressionslevel von ADAMTS-5 in den DNER überexprimierenden Zellen im Zusammenhang mit der Hypertrophie des Gewebes stehen. Interessanterweise untermauern auch die Ergebnisse der TIMP-3 Expression das destruktive Verhalten der DNER überexprimierenden Zellen. Bei TIMP-3 handelt es sich um einen Inhibitor der MMPs als auch von einigen Mitgliedern der ADAMs und ADAMTS Familien. Innerhalb der vier bislang bekannten Mitglieder der TIMPs (TIMP-1 bis 4) besitzt TIMP-3 das breiteste Wirkungsspektrum (Gendron *et al.*, 2003). Die TIMP-3 Expression nahm sowohl in den Kontrollvektorzellen als auch in den pDNER Zellen kontinuierlich ab, mit dem Unterschied, dass populationsabhängig eine starke Reprimierung der TIMP-3 Expression bei den pDNER Zellen im Vergleich zu den Kontrollvektorzellen nachgewiesen werden konnte (4.6.4.7).

### 5.5 Diskussion der Methodik

Wie schon zuvor in Kapitel 5.3.3 erläutert wurde, konnte der deutliche Einfluss der Transfektionsmethode auch in den hMSCs beobachtet werden. Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurde eine standardisierte *in vitro* Chondrogenese mit den käuflich erworbenen humanen MSCs nach Herstellerangaben (Lonza Cologne GmbH, Köln) durchgeführt (4.6.1). Die Zellen wurden in Passage 2 geliefert und in Passage 4 mittels MSC Differenzierungsmedium (2.5), welches TGF- $\beta$ 3 und Dexamethason enthielt, differenziert. Eingesetzt wurden wie vom Hersteller empfohlen 250.000 Zellen pro Ansatz. Wie zu erwarten, kam es zur Reduktion von Kollagen Typ I und Sox9, wohingegen die Expression von Kollagen Typ X relativ konstant blieb. Kollagen Typ II wurde auf mRNA Ebene sehr stark hochreguliert, konnte auf Proteinebene allerdings nicht nachgewiesen werden, da - wie sich zu späterem Zeitpunkt herausstellte - der Antikörper nicht geeignet war. Dennoch konnte anhand der vorliegenden Daten von einer erfolgreichen Chondrogenese ausgegangen werden. Die Form der hMSC-Pellets war rund bis oval und die Zellen relativ homogen verteilt. Im Vergleich zur standardisierten *in vitro* Chondrogenese der hMSCs mussten für die Nukleofektion der Plasmide mehr Zellen eingesetzt werden. Aufgrund der Beobachtungen bei der Nukleofektion der humanen osteoarthrotischen Chondrozyten (4.4), bei welcher zum Teil 70% tote Zellen pro Ansatz nachgewiesen werden konnten, wurden bei der Differenzierung der hMSCs 300.000 Zellen pro Ansatz verwendet. Eine Reduktion der Zellzahl führte dazu, dass sich keine hMSC-Pellets ausbilden konnten und lediglich tote Zellen aufzufinden waren. Die Erhöhung der Zellzahl pro Ansatz führte zu einem weiteren Problem. Um eine ausreichende Zellzahl für den Zeitverlauf von ursprünglich 28 Tagen

## DISKUSSION

gewährleisten zu können, mussten die Zellen um eine weitere Passage kultiviert werden. Ein weiterer Passagierungsschritt kam hinzu, da die Zellen nach der Nukleofektion für 24 Stunden ruhen sollten, bevor sie durch die Zentrifugation in einer 96well Platte für die Pellet-Formierung komprimiert wurden. Vom Hersteller ist eine Verwendung der Zellen bis Passage 5 empfohlen, was hier aufgrund der Zellzahlmenge nicht eingehalten werden konnte und die Zellen somit in Passage 6 differenziert wurden. Es ist zu vermuten, dass dies der Grund für die zum Teil nekrotischen Areale der Pellets des Zeitpunktes 28d war, weshalb diese nicht in die Analyse mit einbezogen werden konnten.

### 6. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Osteoarthrose handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, deren Pathogenese mit der Degeneration des hyalinen Gelenkknorpels beginnt und sich während des Verlaufs auf weitere Teile des Gelenks ausbreitet. Neben dem altersbedingten Gelenkverschleiß sind Gelenkfehlstellungen, vorhergehende Verletzungen, Übergewicht, das weibliche Geschlecht aber auch genetische Faktoren wesentliche Risikofaktoren (Spector, 2004; Hunter und Felson, 2006). Die Osteoarthrose stellt weltweit ein immer stärkeres ökonomisches Problem dar, da der demographische Wandel die Anzahl der an Osteoarthrose erkrankten Patienten erhöht, jedoch die Krankheit bis heute nicht heilbar ist. Die Therapiemaßnahmen beschränken sich auf Schmerzreduktion und Erhalt der Beweglichkeit, was in der Spätphase der Erkrankung meist mit dem Ersatz des betroffenen Gelenks einhergeht (Bloom *et al.*, 2008). Um die Symptome der Erkrankung zukünftig besser therapieren zu können bzw. um den Erhalt des Gelenks zu ermöglichen, müssen die zugrundeliegenden molekularbiologischen Prozesse während der Pathogenese besser verstanden werden.

Um weitere Erkenntnisse über die pathogen veränderte Molekularbiologie während der Knorpeldegeneration zu erlangen, wurde in der vorhergehenden Arbeit von Geyer *et al.*, (2009) eine vergleichende Genexpressionsanalyse makroskopisch lädierter und nicht-lädierter Areale des osteoarthrotischen humanen Kniegelenkknorpels durchgeführt. Neben vier weiteren Genen (IGFBP-3, WISP-1, DAF, CIF) konnte eine Überexpression des Wasserkanals AQP1 als auch des Notch-Liganden DNER in den makroskopisch lädierten Bereichen beobachtet werden.

Darauf aufbauend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Notch-Rezeptor-Ligand DNER auch auf Proteinebene eine erhöhte Expressionsrate in den stärker lädierten Knorpelarealen im Vergleich zu den weniger lädierten Bereichen aufweist. Die erhöhte Expression war überwiegend in der Oberflächenzone zu beobachten, wo in vorhergehenden Studien chondrozytäre Vorläuferzellen lokalisiert werden konnten, welche neben einem erhöhten Migrations- und Proliferationsverhalten auch eine erhöhte Expressionsrate des Rezeptors Notch aufwiesen (Alsalameh *et al.*, 2004; Dowthwaite *et al.*, 2004). Um den Einfluss von DNER auf den Kniegelenkknorpel untersuchen zu können, wurde DNER in kultivierten humanen osteoarthrotischen und gesunden Chondrozyten überexprimiert und der Einfluss auf unterschiedliche Stoffwechselfparameter, aber auch auf Mitglieder des Notch-Signalwegs untersucht. Die Überexpression von DNER zeigte keinen Einfluss auf die adulten Chondrozyten, was eine Expression von DNER in den chondrozytären Vorläuferzellen vermuten ließ. Da diese Progenitorzellen in der Lage sind, zu

## ZUSAMMENFASSUNG

Chondrozyten-ähnlichen Zellen zu differenzieren, wurde die Funktion von DNER innerhalb der *in vitro* Chondrogenese untersucht. Hierfür wurden humane mesenchymale Stammzellen mit einem DNER überexprimierenden Plasmid nukleofiziert und die Expression unterschiedlicher Stoffwechselfparameter, Transkriptionsfaktoren und Mitglieder des Notch-Signalwegs analysiert. Dies ergab, dass DNER die Hypertrophie des Gewebes begünstigte, indem es zu einer deutlichen Überexpression der Hypertrophie-Marker Kollagen Typ X und von MMP13 in den DNER exprimierenden Zellen, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene kam. Unterstrichen wurde dies durch die erhöhte Expression der Aggrecanasen ADAMTS-4 und ADAMTS-5, welche ebenfalls mit dem hypertrophen Phänotyp in Verbindung stehen (Thirunavukkarasu *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2008). Die DNER-überexprimierenden Zellen zeigten auch eine höhere Apoptoserate und eine Reprimierung des MMP- und Aggrecanasehemmers TIMP-3. Ob der Einfluss von DNER durch die Interaktion mit dem Rezeptor Notch einhergeht, müsste in weiteren Studien näher untersucht werden, da in den DNER überexprimierenden Zellen der Rezeptor Notch-1 leicht reprimiert und im Gegensatz dazu der Rezeptor Notch-2 leicht hochreguliert wurde.

Obwohl AQP1 ebenfalls in der Oberflächennzone des osteoarthrotischen Knorpels nachgewiesen wurde, konnte der Einfluss von AQP1 auf die Expression unterschiedlicher Stoffwechselfparameter und Transkriptionsfaktoren aber auch auf Gerüstproteine, welche mit dem Migrationsverhalten der Zellen in Verbindung stehen, nicht gezeigt werden. Da die Chondrozyten eine Vielzahl an Transportkanälen besitzen, welche an der Volumenregulation beteiligt sind, ist eine Kompensation des AQP1-Effektes als Ursache hierfür denkbar (Barrett-Jolley, 2010).

## 7. SUMMARY

Osteoarthritis is a multifactorial joint disease which is based on the degeneration of the hyaline cartilage but also affecting other parts of the joint. Beside the age-related degeneration of the joint, other causes including previous injuries, overweight, female gender and genetic factors are key risk factors (Spector, 2004; Hunter and Felson, 2006). Osteoarthritis represents a substantial economic problem due to the demographic change and the associated increasing number of patients to be expected in the future. The disease is still incurable, and the therapeutical options are limited to pain relief and to the maintenance of physical mobility (Bloom *et al.*, 2008). To avoid joint replacement surgery and treatment options of the osteoarthritic symptoms, the underlying pathogenic processes have to be better understood.

In the previous work of Geyer *et al.*, (2009) a differential gene expression analysis of macroscopically intact versus affected human OA articular cartilage samples was performed. It was found that beside four other genes (IGFBP-3, WISP-1, DAF, CIF) the genes for the water channel AQP1 and the notch-receptor-ligand DNER were upregulated in the affected areas.

Based on the previous results we could show for the first time that the DNER protein is overexpressed in the superficial zone of the macroscopically affected articular cartilage. Next we overexpressed DNER in cultured osteoarthritic and normal human chondrocytes and analysed the influence on specific cartilage metabolic parameters and members of the notch-signaling pathway. Because there were no measurable effects on mature chondrocytes we assumed that DNER could be expressed in mesenchymal progenitor cells located in the superficial zone of the articular cartilage. These cells differentiate to chondrocyte-like cells and have a high potential for migration and proliferation. Additionally Dowthwaite *et al.*, (2004) showed that these progenitor cells overexpress Notch-1.

To investigate the role of DNER on these chondrocyte-like cells, we overexpressed DNER in human mesenchymal stem cells and measured metabolic- and transcription factors and members of the notch-signaling during *in vitro* chondrogenesis. The result of the experiment was that DNER favored the hypertrophic phenotype of the tissue by upregulating collagen type X and MMP13. The results were supported by the upregulation of the aggrecanases ADAMTS-4 and ADAMTS-5, which are known to be associated with the hypertrophic phenotype (Thirunavukkarasu *et al.*, 2007; Solomon *et al.*, 2008). The DNER expressing cells also showed a higher rate of apoptosis and a reduction of the main MMP- and aggrecanase inhibitor TIMP-3. If DNER interacts with the receptor Notch has to be examined

## SUMMARY

in further studies, since there was only a slight downregulation of Notch-1 and an upregulation of Notch-2 in the DNER-expressing cells.

Although AQP1 was expressed in the superficial zone of the articular cartilage of OA patients, we could not observe any influence on metabolic parameters, transcription factors or on structure proteins known for a role on cell migration.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., *et al.* (2002) Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology* **542**: 3–16.

Aigner, T., and STOVE, J. (2003) Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**: 1569–1593.

Aigner, T., Fundel, K., Saas, J., Gebhard, P.M., Haag, J., Weiss, T., *et al.* (2006) Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **54**: 3533–3544.

Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004) Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* **50**: 1522–1532.

Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L.T., and Kwon, C. (2012) Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends in Cell Biology* **22**: 257–265.

Archer, C.W., and Francis-West, P. (2003) The chondrocyte. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **35**: 401–404.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995) Notch signaling. *Science* **268**: 225–232.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770–776.

Barrett-Jolley, R. (2010) The emerging chondrocyte channelome. *Front Physio* **1**.

Barry, F. (2001) Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Exp Cell Res* **268**: 189–200.

Bau, B., Gebhard, P.M., Haag, J., Knorr, T., Bartnik, E., and Aigner, T. (2002) Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* **46**: 2648–2657.

Behrens, P., Bitter, T., Kurz, B., and Russlies, M. (2006) Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee* **13**: 194–202.

Bell, D.M., Leung, K.K., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Ling, K.W., *et al.* (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* **16**: 174–178.

Benito, M.J., Veale, D.J., FitzGerald, O., van den Berg, W.B., and Bresnihan, B. (2005) Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **64**: 1263–1267.

Benya, P.D., Padilla, S.R., and Nimni, M.E. (1978) Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* **15**: 1313–1321.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Berenbaum, F. (2008) New horizons and perspectives in the treatment of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* **10 Suppl 2**: S1.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**: 85–89.
- Bigg et al., 2007 MMP9 cleave collagen type 1 and 3 (2015) Bigg et al., 2007 MMP9 cleave collagen type 1 and 3. 1–1.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) *Birnboim: Isolation of bacterial plasmid by alkali...* - *Google Scholar*. *Nucleic Acid Res.*
- Blaise, R., Mahjoub, M., Salvat, C., Barbe, U., Brou, C., Corvol, M.-T., et al. (2009) Involvement of the Notch pathway in the regulation of matrix metalloproteinase 13 and the dedifferentiation of articular chondrocytes in murine cartilage. *Arthritis Rheum* **60**: 428–439.
- Blanco Garcia, F.J. (1999) Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* **7**: 308–309.
- Blaney Davidson, E.N., van der Kraan, P.M., and van den Berg, W.B. (2007) TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**: 597–604.
- Blom, A.B., Brockbank, S.M., van Lent, P.L., van Beuningen, H.M., Geurts, J., Takahashi, N., et al. (2009) Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: Prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum* **60**: 501–512.
- Boeuf, S., Graf, F., Fischer, J., Moradi, B., Little, C.B., and Richter, W. (2012) Regulation of aggrecanases from the ADAMTS family and aggrecan neopeptide formation during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* **23**: 320–332.
- Bondeson, J., Wainwright, S., Hughes, C., and Caterson, B. (2008) The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin Exp Rheumatol* **26**: 139–145.
- Borg, J.P., Straight, S.W., Kaeche, S.M., de Taddéo-Borg, M., Kroon, D.E., Karnak, D., et al. (1998) Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 31633–31636.
- Borggreffe, T., and Oswald, F. (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1631–1646.
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., and Agre, P. (1999) Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu Rev Biochem* **68**: 425–458.
- Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kim, G., Takagi, S., Okumura, M., and Fujinaga, T. (2006) Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol Bioeng* **93**: 1152–1163.
- Brandt, K.D., Radin, E.L., Dieppe, P.A., and van de Putte, L. (2006) Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* **65**: 1261–1264.
- Brew, K., and Nagase, H. (2010) The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**: 55–71.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* **331**: 889–895.
- Brochhausen, C., Lehmann, M., Zehbe, R., Watzer, B., Grad, S., Meurer, A., and Kirkpatrick, C.J. (2009) [Tissue engineering of cartilage and bone : growth factors and signaling molecules]. *Orthopade* **38**: 1053–1062.
- Buckwalter, J., Mow, V., and Ratcliffe, A. (1994) Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. *J Am Acad Orthop Surg* **2**: 192–201.
- Buckwalter, J.A., and Mankin, H.J. (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* **47**: 477–486.
- Buckwalter, J.A., Lotz, M.K., and Stoltz, J.F. (2007) *Osteoarthritis, Inflammation and Degradation*. IOS Press.
- Butz, S., Okamoto, M., and Südhof, T.C. (1998) A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* **94**: 773–782.
- Cadigan, K.M., and Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Development* **11**: 3286–3305.
- Cancedda, R., Descalzi Cancedda, F., and Castagnola, P. (1995) Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* **159**: 265–358.
- Cao, F., Xie, X., Gollan, T., Zhao, L., Narsinh, K., Lee, R.J., and Wu, J.C. (2010) Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Mol Imaging Biol* **12**: 15–24.
- Cohen, A.R., Woods, D.F., Marfatia, S.M., Walther, Z., Chishti, A.H., Anderson, J.M., and Wood, D.F. (1998) Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* **142**: 129–138.
- Craven, S.E., and Brecht, D.S. (1998) PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* **93**: 495–498.
- Crowe, R., Zikherman, J., and Niswander, L. (1999) Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development* **126**: 987–998.
- D, S.W.J.P., Watkins, G., Le Good, N., Sc, S.R.B., D, C.L.M.P., Sc, S.M.V.B.B., *et al.* (2009) The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritic tissue that modulate the production of TNF- $\alpha$ ; and MMP13. *Osteoarthritis and Cartilage* **17**: 464–472.
- de Graaff, E., Maat, P., Hulsenboom, E., van den Berg, R., van den Bent, M., Demmers, J., *et al.* (2012) Identification of delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor as the Tr antigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* **71**: 815–824.
- de Groot, B.L., and Grubmüller, H. (2001) Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. *Science* **294**: 2353–2357.
- de Groot, B.L., Frigato, T., Helms, V., and Grubmüller, H. (2003) The Mechanism of Proton Exclusion in the Aquaporin-1 Water Channel. *Journal of Molecular Biology* **333**: 279–293.
- Delgado-Calle, J., Fernández, A.F., Sainz, J., Zarrabeitia, M.T., Sañudo, C., García-Renedo, R., *et al.* (2012) Genome-wide profiling of bone reveals differentially methylated regions in osteoporosis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **65**: 197–205.

## LITERATURVERZEICHNIS

Dowthwaite, G.P., Bishop, J.C., Redman, S.N., Khan, I.M., Rooney, P., Evans, D.J.R., *et al.* (2004) The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *Journal of Cell Science* **117**: 889–897.

Eiraku, M., Hirata, Y., Takeshima, H., Hirano, T., and Kengaku, M. (2002) Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 25400–25407.

Eiraku, M., Tohgo, A., Ono, K., Kaneko, M., Fujishima, K., Hirano, T., and Kengaku, M. (2005) DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci* **8**: 873–880.

Farnum, C.E., and Wilsman, N.J. (2011) Orientation of Primary Cilia of Articular Chondrocytes in Three-Dimensional Space. *Anat Rec* **294**: 533–549.

Felson, D.T., and Neogi, T. (2004) Osteoarthritis: Is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis Rheum* **50**: 341–344.

Fosang, A.J., Rogerson, F.M., East, C.J., and Stanton, H. (2008) ADAMTS-5: the story so far. *Eur Cell Mater* **15**: 11–26.

French, D.M., Kaul, R.J., D'Souza, A.L., Crowley, C.W., Bao, M., Frantz, G.D., *et al.* (2004) WISP-1 is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am J Pathol* **165**: 855–867.

Galasso, O., Familiari, F., De Gori, M., and Gasparini, G. (2012) Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. *Advances in Orthopedics* **2012**: 1–7.

Gelse, K. (2003) Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**: 1531–1546.

Gelse, K., Ekici, A.B., Cipa, F., Swoboda, B., Carl, H.D., Olk, A., *et al.* (2012) Molecular differentiation between osteophytic and articular cartilage - clues for a transient and permanent chondrocyte phenotype. *Osteoarthritis and Cartilage* **20**: 162–171.

Gendron, C., Kashiwagi, M., Hughes, C., Caterson, B., and Nagase, H. (2003) TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. *FEBS Letters* **555**: 431–436.

Gendron, C., Kashiwagi, M., Lim, N.H., Enghild, J.J., Thøgersen, I.B., Hughes, C., *et al.* (2007) Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 18294–18306.

Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* **5**: 623–628.

Geyer, M., Grässel, S., Straub, R.H., Schett, G., Dinser, R., Grifka, J., *et al.* (2009) Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthr Cartil* **17**: 328–335.

Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B.A., Blanchet, T., Ma, H.-L., *et al.* (2004) Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* **50**: 2547–2558.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Goldring, M.B. (2009) The link between structural damage and pain in a genetic model of osteoarthritis and intervertebral disc degeneration: a joint misadventure. *Arthritis Rheum* **60**: 2550–2552.
- Goldring, M.B. (2012) Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **4**: 269–285.
- Goldring, M.B., and Goldring, S.R. (2007) Osteoarthritis. *J Cell Physiol* **213**: 626–634.
- Goldring, M.B., Birkhead, J.R., Suen, L.F., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., *et al.* (1994) Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* **94**: 2307–2316.
- Goldring, M.B., Otero, M., Plumb, D.A., Dragomir, C., Favero, M., Hachem, El, K., *et al.* (2011) Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater* **21**: 202–220.
- Goldring, M.B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2005) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**: 33–44.
- Goldring, S.R., and Goldring, M.B. (2006) Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **6**: 376–378.
- Gresch, O. (2004) New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* **33**: 151–163.
- Grogan, S.P., Olee, T., Hiraoka, K., and Lotz, M.K. (2008) Repression of chondrogenesis through binding of notch signaling proteins HES-1 and HEY-1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer site. *Arthritis Rheum* **58**: 2754–2763.
- Gu, G., Zhao, D., Yin, Z., and Liu, P. (2012) BST-2 binding with cellular MT1-MMP blocks cell growth and migration via decreasing MMP2 activity. *J Cell Biochem* **113**: 1013–1021.
- Guerne, P.A., Carson, D.A., and Lotz, M. (1990) IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J Immunol* **144**: 499–505.
- Guilak, F., and Mow, V.C. (2000) The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J Biomech* **33**: 1663–1673.
- Guilak, F., Ratcliffe, A., Lane, N., Rosenwasser, M.P., and Mow, V.C. (1994) Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* **12**: 474–484.
- Haag, J., Voigt, R., Soeder, S., and Aigner, T. (2009) Brief report Efficient non-viral transfection of primary human adult chondrocytes in a high-throughput format. *Osteoarthritis and Cartilage* **17**: 813–817.
- Hagiwara, K., Shinozaki, T., Matsuzaki, T., Takata, K., and Takagishi, K. (2013) Immunolocalization of water channel aquaporins in human knee articular cartilage with intact and early degenerative regions. *Med Mol Morphol* **46**: 104–108.
- Harley, V.R., and Goodfellow, P.N. (1994) The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol Reprod Dev* **39**: 184–193.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Hayes, A.J., Dowthwaite, G.P., Webster, S.V., and Archer, C.W. (2003) The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *Journal of Anatomy* **202**: 495–502.
- Horton, W.E., Yagi, R., Lavery, D., and Weiner, S. (2005) Overview of studies comparing human normal cartilage with minimal and advanced osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol* **23**: 103–112.
- Hulejová, H., Barešová, V., Klézl, Z., Polanská, M., Adam, M., and Šenolt, L. (2007) Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine* **38**: 151–156.
- Hunter, D.J., and Felson, D.T. (2006) Osteoarthritis. *BMJ* **332**: 639–642.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., *et al.* (2004) The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* **50**: 3561–3573.
- Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, B.O., Kobune, Y., Inazawa, J., *et al.* (1995) Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics* **26**: 527–534.
- Iwamoto, M., Kitagaki, J., Tamamura, Y., Gentili, C., Koyama, E., Enomoto, H., *et al.* (2003) Runx2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis and Cartilage* **11**: 6–15.
- Izon, D.J., Aster, J.C., He, Y., Weng, A., Karnell, F.G., Patriub, V., *et al.* (2002) Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity* **16**: 231–243.
- Jacobsen, F., Mertens-Rill, J., Beller, J., Hirsch, T., Daigeler, A., Langer, S., *et al.* (2006) Nucleofection: A New Method for Cutaneous Gene Transfer? *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2006**: 1–8.
- Jacobsen, J., Visse, R., Sørensen, H.P., Enghild, J.J., Brew, K., Wewer, U.M., and Nagase, H. (2008) Catalytic Properties of ADAM12 and Its Domain Deletion Mutants †. *Biochemistry* **47**: 537–547.
- Jayasuriya, C.T., and Chen, Q. (2012) *Cartilage Extracellular Matrix Integrity and OA*.
- Joos, H., Albrecht, W., Laufer, S., Reichel, H., and Brenner, R.E. (2008) IL-1beta regulates FHL2 and other cytoskeleton-related genes in human chondrocytes. *Mol Med* **14**: 150–159.
- Jordan, J.M., Kraus, V.B., and Hochberg, M.C. (2004) Genetics of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* **6**: 7–13.
- Jung, J.S., Preston, G.M., Smith, B.L., Guggino, W.B., and Agre, P. (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 14648–14654.
- Kaech, S.M., Whitfield, C.W., and Kim, S.K. (1998) The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* **94**: 761–771.
- Kamekura, S., HOSHI, K., SHIMOAKA, T., CHUNG, U., CHIKUDA, H., YAMADA, T., *et al.* (2005) Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis and Cartilage* **13**: 632–641.

## LITERATURVERZEICHNIS

Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., and Fahmi, H. (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **7**: 33–42.

Karlsson, C., Brantsing, C., Egell, S., and Lindahl, A. (2008) Notch1, Jagged1, and HES5 are abundantly expressed in osteoarthritis. *Cells Tissues Organs* **188**: 287–298.

Karlsson, C., Brantsing, C., Svensson, T., Brisby, H., Asp, J., Tallheden, T., and Lindahl, A. (2007) Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: Analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *J Orthop Res* **25**: 152–163.

Kashiwagi, M., Enghild, J.J., Gendron, C., Hughes, C., Caterson, B., Itoh, Y., and Nagase, H. (2004) Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 10109–10119.

Kashiwagi, M., Tortorella, M., Nagase, H., and Brew, K. (2001) TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *Journal of Biological Chemistry* **276**: 12501–12504.

KELLGREN, J.H., and LAWRENCE, J.S. (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **16**: 494–502.

Kevorkian, L., Young, D.A., Darrah, C., Donell, S.T., Shepstone, L., Porter, S., *et al.* (2004) Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum* **50**: 131–141.

Kim, K.S., Lee, Y.-A., Choi, H.M., Yoo, M.C., and Yang, H.-I. (2012) Implication of MMP-9 and urokinase plasminogen activator (uPA) in the activation of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-13. *Rheumatol Int* **32**: 3069–3075.

Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* **397**: 3173–3178.

King, L.S., Choi, M., Fernandez, P.C., Cartron, J.P., and Agre, P. (2001) Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N Engl J Med* **345**: 175–179.

Kitagawa, F., Takei, S., Imaizumi, T., and Tabata, Y. (2013) Chondrogenic Differentiation of Immortalized Human Mesenchymal Stem Cells on Zirconia Microwell Substrata. *Tissue Engineering Part C: Methods* **19**: 438–448.

Knudson, C.B., and Knudson, W. (2001) Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* **12**: 69–78.

Kobayashi, H., Hirata, M., Saito, T., Itoh, S., Chung, U.-I., and Kawaguchi, H. (2013) Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem* **288**: 28620–28629.

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

Kon, E., Filardo, G., Gobbi, A., Berruto, M., Andriolo, L., Ferrua, P., *et al.* (2016) Long-term Results After Hyaluronan-based MACT for the Treatment of Cartilage Lesions of the Patellofemoral Joint. *Am J Sports Med* 0363546515620194.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Koshy, P.J.T., Lundy, C.J., Rowan, A.D., Porter, S., Edwards, D.R., Hogan, A., *et al.* (2002) The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* **46**: 961–967.
- Kramm I. 2014. Experimentelle Untersuchungen zur Funktion von Aquaporin 1 in der Pathogenese der Osteoarthritis [Dissertation]. Giessen: Justus-Liebig-Universität Giessen
- Kraus, V.B., Jordan, J.M., Doherty, M., Wilson, A.G., Moskowitz, R., Hochberg, M., *et al.* (2007) The Genetics of Generalized Osteoarthritis (GOGO) study: study design and evaluation of osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis and Cartilage* **15**: 120–127.
- Kronenberg, H.M. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**: 332–336.
- Krukemeyer, M.G., and Möllenhoff, G. (2013) *Endoprothetik*. Walter de Gruyter.
- Kuettner, K.E. (1992) Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* **25**: 155–163.
- Kulyk, W.M., Franklin, J.L., and Hoffman, L.M. (2000) Sox9 expression during chondrogenesis in micromass cultures of embryonic limb mesenchyme. *Exp Cell Res* **255**: 327–332.
- Lambert, C., Dubuc, J.E., Montell, E., Vergés, J., Munaut, C., Noël, A., and Henrotin, Y. (2013) Investigation of potential new targets for the diagnosis and/or the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **21**: S285.
- Lane, N.E., Nevitt, M.C., Lui, L.-Y., de Leon, P., Corr, M., for the Study of Osteoporotic Fractures Research Group (2007) Wnt signaling antagonists are potential prognostic biomarkers for the progression of radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women. *Arthritis Rheum* **56**: 3319–3325.
- Lee, G.M., and Loeser, R.F. (1999) Cell surface receptors transmit sufficient force to bend collagen fibrils. *Exp Cell Res* **248**: 294–305.
- Lefebvre, V., and Smits, P. (2005) Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defect Res C* **75**: 200–212.
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., and de Crombrughe, B. (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Molecular and Cellular Biology* **17**: 2336–2346.
- Leivonen, S.-K., Lazaridis, K., Decock, J., Chantry, A., Edwards, D.R., and Kähäri, V.-M. (2013) TGF- $\beta$ -Elicited Induction of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-3 Expression in Fibroblasts Involves Complex Interplay between Smad3, p38 $\alpha$ , and ERK1/2. *PLoS ONE* **8**: e57474.
- Liang, H.-T., Feng, X.-C., and Ma, T.-H. (2008) WATER CHANNEL ACTIVITY OF PLASMA MEMBRANE AFFECTS CHONDROCYTE MIGRATION AND ADHESION. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **35**: 7–10.
- Liu-Bryan, R., and Terkeltaub, R. (2015) Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **11**: 35–44.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R., and Goldring, M.B. (2012) Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* **64**: 1697–1707.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Mahjoub, M., Sassi, N., Driss, M., Laadhar, L., Allouche, M., Hamdoun, M., *et al.* (2012) Expression patterns of Notch receptors and their ligands in human osteoarthritic and healthy articular cartilage. *Tissue and Cell* 1–13.
- Maldonado, M., and Nam, J. (2013) The Role of Changes in Extracellular Matrix of Cartilage in the Presence of Inflammation on the Pathology of Osteoarthritis. *BioMed Research International* **2013**: 1–10.
- Malfait, A.-M., Liu, R.-Q., Ijiri, K., Komiyama, S., and Tortorella, M.D. (2002) Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 22201–22208.
- Malfait, A.M., Ritchie, J., Gil, A.S., Austin, J.S., Hartke, J., Qin, W., *et al.* (2010) ADAMTS-5 deficient mice do not develop mechanical allodynia associated with osteoarthritis following medial meniscal destabilization. *Osteoarthr Cartil* **18**: 572–580.
- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L., and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* **53**: 523–537.
- Marcu, K.B., Otero, M., Olivetto, E., Borzì, R.M., and Goldring, M.B. (2010) NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets* **11**: 599–613.
- Mark, Von der, K., Kirsch, T., Nerlich, A., Kuss, A., Weseloh, G., Glückert, K., and Stöss, H. (1992) Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum* **35**: 806–811.
- Martel-Pelletier, J. (2004) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* **12 Suppl A**: S31–3.
- Martel-Pelletier, J., McCollum, R., DiBattista, J., Faure, M.P., Chin, J.A., Fournier, S., *et al.* (1992) The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* **35**: 530–540.
- Martin, I., Jakob, M., Schäfer, D., Dick, W., Spagnoli, G., and Heberer, M. (2001) Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthritis and Cartilage* **9**: 112–118.
- Martinek, V. (2003) *Anatomy and pathophysiology of articular cartilage*. DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR ....
- Mayne, R. (1989) Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum* **32**: 241–246.
- Meng, J.-H., Ma, X.-C., Li, Z.-M., and Wu, D.-C. (2007) Aquaporin-1 and aquaporin-3 expressions in the temporo-mandibular joint condylar cartilage after an experimentally induced osteoarthritis. *Chin Med J* **120**: 2191–2194.
- Mitani, H., Takahashi, I., Onodera, K., Bae, J.-W., Sato, T., Takahashi, N., *et al.* (2006) Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol* **126**: 371–380.
- Mitchell, P.G., Magna, H.A., Reeves, L.M., Lopresti-Morrow, L.L., Yocum, S.A., Rosner, P.J., *et al.* (1996) Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **97**: 761–768.

## LITERATURVERZEICHNIS

Mobasheri, A. (2004) Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *AJP: Cell Physiology* **286**: 529C–537.

Mollenhauer, J., Bee, J.A., Lizarbe, M.A., and Mark, Von der, K. (1984) Role of anchorin CII, a 31,000-mol-wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol* **98**: 1572–1579.

Monzani, E., Bazzotti, R., Perego, C., and La Porta, C.A.M. (2009) AQP1 Is Not Only a Water Channel: It Contributes to Cell Migration through Lin7/Beta-Catenin. *PLoS ONE* **4**: e6167.

Morales, T.I. (2007) Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis and Cartilage* **15**: 861–871.

Morgan, T.H. (2014) *The Theory of the Gene - Primary Source Edition*. Nabu Press.

Morris, K.J., Cs-Szabo, G., and Cole, A.A. (2010) Characterization of TIMP-3 in human articular talar cartilage. *Connect Tissue Res* **51**: 478–490.

Mueller, M.B., and Tuan, R.S. (2008) Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* **58**: 1377–1388.

Murakami, S., Lefebvre, V., and de Crombrughe, B. (2000) Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 3687–3692.

Mwale, F., Stachura, D., Roughley, P., and Antoniou, J. (2006) Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. *J Orthop Res* **24**: 1791–1798.

Nagase, H., and Kashiwagi, M. (2003) Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Research & Therapy* **5**: 94–103.

Ng, L.J., Wheatley, S., Muscat, G.E., Conway-Campbell, J., Bowles, J., Wright, E., *et al.* (1997) SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology* **183**: 108–121.

Nixon, A.J., Sams, A.E., Lust, G., Grande, D., and Mohammed, H.O. (1993) Temporal matrix synthesis and histologic features of a chondrocyte-laden porous collagen cartilage analogue. *Am J Vet Res* **54**: 349–356.

Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, K., Tomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., *et al.* (1992) Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 21712–21719.

Oldershaw, R.A., and Hardingham, T.E. (2010) Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells. *Bone* **46**: 286–293.

Oldershaw, R.A., Tew, S.R., Russell, A.M., Meade, K., Hawkins, R., McKay, T.R., *et al.* (2008) Notch Signaling Through Jagged-1 Is Necessary to Initiate Chondrogenesis in Human Bone Marrow Stromal Cells but Must Be Switched off to Complete Chondrogenesis. *Stem Cells* **26**: 666–674.

Olsen, B.R., Reginato, A.M., and Wang, W. (2000) Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 191–220.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Pan, Q., Yu, Y., Chen, Q., Li, C., Wu, H., Wan, Y., *et al.* (2008) Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* **217**: 228–241.
- Panoutsopoulou, K., and Zeggini, E. (2013) Advances in osteoarthritis genetics. *Journal of Medical Genetics* **50**: 715–724.
- Panula, H.E., Nieminen, J., Parkkinen, J.J., Arnala, I., Kröger, H., and Alhava, E. (1998) Subchondral bone remodeling increases in early experimental osteoarthrosis in young beagle dogs. *Acta Orthop Scand* **69**: 627–632.
- Park, J.R., Jung, J.W., Seo, M.S., Kang, S.K., Lee, Y.S., and Kang, K.S. (2010) DNER modulates adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via regulation of cell proliferation. *Cell Prolif* **43**: 19–28.
- Pearle, A.D., Warren, R.F., and Rodeo, S.A. (2005) Basic Science of Articular Cartilage and Osteoarthritis. *Clinics in Sports Medicine* **24**: 1–12.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., and Abramson, S.B. (2001) Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* **44**: 1237–1247.
- Poole, C.A. (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of Anatomy* **191 ( Pt 1)**: 1–13.
- Poole, C.A., Ayad, S., and Gilbert, R.T. (1992) Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of Cell Science* **103 ( Pt 4)**: 1101–1110.
- Poole, C.A., Ayad, S., and Schofield, J.R. (1988) Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *Journal of Cell Science* **90 ( Pt 4)**: 635–643.
- Preston, G.M., and Agre, P. (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11110–11114.
- Qiu, H., Huang, F., Gong, J., Xiao, H., Sun, B.-L., and Yang, R.-G. (2015) TRIM22 can activate the noncanonical NF- $\kappa$ B pathway by affecting IKK $\alpha$ . *Journal of Receptors and Signal Transduction* 1–6.
- Qiu, W., Murray, M.M., Shortkroff, S., Lee, C.R., Martin, S.D., and Spector, M. (2000) Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of alpha-smooth muscle actin. *Wound Repair Regen* **8**: 383–391.
- Raleigh, E.A., Trimarchi, R., and Revel, H. (1989) Genetic and physical mapping of the mcrA (rgIA) and mcrB (rgIB) loci of Escherichia coli K-12. *Genetics* **122**: 279–296.
- Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L.C., Shoelson, S., and Kirchhausen, T. (1997) Regulatory interactions in the recognition of endocytic sorting signals by AP-2 complexes. *EMBO J* **16**: 2240–2250.
- Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., and Martel-Pelletier, J. (1996) The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* **97**: 2011–2019.

## LITERATURVERZEICHNIS

RKI, R.K.-I. (2012) Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010." 1–5.

RKI, R.K.-I. (2013) Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54. 1–40.

Roughley, P.J., and Lee, E.R. (1994) Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* **28**: 385–397.

Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Hara-Chikuma, M., and Verkman, A.S. (2005a) Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* **434**: 786–792.

Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Hara-Chikuma, M., and Verkman, A.S. (2005b) Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* **434**: 786–792.

Saklatvala, J. (1986) Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* **322**: 547–549.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning*.

Schnermann, J., Chou, C.L., Ma, T., Traynor, T., Knepper, M.A., and Verkman, A.S. (1998) Defective proximal tubular fluid reabsorption in transgenic aquaporin-1 null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9660–9664.

Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P.J., and Stock, C. (2012) Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration. *Physiological Reviews* **92**: 1865–1913.

Seeliger, D., Zapater, C., Krenc, D., Haddoub, R., Flitsch, S., Beitz, E., *et al.* (2013) Discovery of Novel Human Aquaporin-1 Blockers. *ACS Chem Biol* **8**: 249–256.

Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., *et al.* (2000) SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 10738–10744.

Solomon, L.A., Bérubé, N.G., and Beier, F. (2008) Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Birth Defect Res C* **84**: 123–130.

Sophia Fox, A.J., Bedi, A., and Rodeo, S.A. (2009) The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* **1**: 461–468.

Söder, S., and Aigner, T. (2011) Osteoarthritis. *Pathologe* **32**: 183–192.

Spahn, G. (2006) Knorpelschaden und Gonarthrose. *Akt Traumatol* **36**: 195–207.

Spector, T. (2004) Risk factors for osteoarthritis: genetics1. *Osteoarthritis and Cartilage* **12**: 39–44.

Spector, T.D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J., and Hart, D. (1996) Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**: 940–943.

Spector, T.D., Dacre, J.E., Harris, P.A., and Huskisson, E.C. (1992) Radiological progression of osteoarthritis: an 11 year follow up study of the knee. *Annals of the Rheumatic Diseases* **51**: 1107–1110.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Stanton, H., Rogerson, F.M., East, C.J., Golub, S.B., Lawlor, K.E., Meeker, C.T., *et al.* (2005) ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **434**: 648–652.
- Sulzbacher, I. (2012) Arthrose: Histologie und Pathogenese. *Wien Med Wochenschr* **163**: 212–219.
- Sumer, E.U., Qvist, P., and Tankó, L.B. (2007) Matrix metalloproteinase and aggrecanase generated aggrecan fragments: implications for the diagnostics and therapeutics of destructive joint diseases. *Drug Development Research*.
- Thirunavukkarasu, K., Pei, Y., and Wei, T. (2007) Characterization of the human ADAMTS-5 (aggrecanase-2) gene promoter. *Mol Biol Rep* **34**: 225–231.
- Trujillo, E., González, T., Marín, R., Martín-Vasallo, P., Marples, D., and Mobasheri, A. (2004) Human articular chondrocytes, synoviocytes and synovial microvessels express aquaporin water channels; upregulation of AQP1 in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* **19**: 435–444.
- Tsezou, A. (2014) Osteoarthritis Year in Review 2014: genetics and genomics. *Osteoarthritis and Cartilage* **22**: 2017–2024.
- Tyler, J.A. (1989) Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J* **260**: 543–548.
- Ueblacker, P., Wagner, B., Vogt, S., Salzmann, G., Wexel, G., Krüger, A., *et al.* (2007) In vivo analysis of retroviral gene transfer to chondrocytes within collagen scaffolds for the treatment of osteochondral defects. *Biomaterials* **28**: 4480–4487.
- Ustunel, I., Ozenci, A.M., Sahin, Z., Ozbey, O., Acar, N., Tanriover, G., *et al.* (2008) The immunohistochemical localization of notch receptors and ligands in human articular cartilage, chondroprogenitor culture and ultrastructural characteristics of these progenitor cells. *Acta Histochemica* **110**: 397–407.
- Verkman, A.S. (2005) More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science* **118**: 3225–3232.
- Verkman, A.S. (2008) Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert Rev Mol Med* **10**: e13.
- Verma, P., and Dalal, K. (2011) ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem* **112**: 3507–3514.
- Vincenti, M.P., and Brinckerhoff, C.E. (2002) Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* **4**: 157–164.
- Wang, M., Sampson, E.R., Jin, H., Li, J., Ke, Q.H., Im, H.-J., and Di Chen (2013) MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* **15**: R5.
- Watanabe, N., Tezuka, Y., Matsuno, K., Miyatani, S., Morimura, N., Yasuda, M., *et al.* (2003) Suppression of differentiation and proliferation of early chondrogenic cells by Notch. *J Bone Miner Metab* **21**: 344–352.
- Weber, D., Wiese, C., and Gessler, M. (2014) Hey bHLH transcription factors. *Curr Top Dev Biol* **110**: 285–315.

## LITERATURVERZEICHNIS

Werb, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**: 439–442.

Wight, T.N. (2005) The ADAMTS proteases, extracellular matrix, and vascular disease: waking the sleeping giant(s)! *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 12–14.

Williams, R., Khan, I.M., Richardson, K., Nelson, L., McCarthy, H.E., Anabalsi, T., *et al.* (2010) Identification and Clonal Characterisation of a Progenitor Cell Sub-Population in Normal Human Articular Cartilage. *PLoS ONE* **5**: e13246.

Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., *et al.* (1995) The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* **9**: 15–20.

Wright, E.M., Snopek, B., and Koopman, P. (1993) Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res* **21**: 744.

Xu, H., Edwards, J., Banerji, S., Prevo, R., Jackson, D.G., and Athanasou, N.A. (2003) Distribution of lymphatic vessels in normal and arthritic human synovial tissues. *Annals of the Rheumatic Diseases* **62**: 1227–1229.

Xu, Y., Barter, M.J., Swan, D.C., Rankin, K.S., Rowan, A.D., Santibanez-Koref, M., *et al.* (2012) Identification of the pathogenic pathways in osteoarthritic hip cartilage: commonality and discord between hip and knee OA. *Osteoarthr Cartil* **20**: 1029–1038.

Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K.-I., *et al.* (2004) Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & Development* **18**: 952–963.

Zeidel, M.L., Ambudkar, S.V., Smith, B.L., and Agre, P. (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* **31**: 7436–7440.

Zervos-Kopp, J. (2013) *Anatomie, Biologie und Physiologie*. Georg Thieme Verlag.

Zhang, P., Yang, Y., Nolo, R., Zweidler-McKay, P.A., and Hughes, D.P.M. (2010) Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness. *Oncogene* **29**: 2916–2926.

Zheng, Q., Zhou, G., Morello, R., Chen, Y., Garcia-Rojas, X., and Lee, B. (2003) Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* **162**: 833–842.

## 9. ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
APS	Amoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
CASK	<i>calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CMV	Cytomegalovirus
CFI	<i>complement factor I</i>
Coll	Kollagen Typ
COX	Cyclooxygenase
ct	<i>cycle treshold</i>
DAF	decay accelerating factor, CD55
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNER	Delta/Notch like EGF-related receptor
cDNA	complementary DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal groth factor</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
for	<i>forward</i>
g	Gramm sowie Erdschleunigung
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

## ANHANG

Ig	Immunglobulin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria broth
M	molar; Moleklgewicht
mA	Miliampere
mM	Milimolar
mm	Milimeter
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	<i>membrane-type</i> MMP
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPA	Asparagin-Prolin-Alanin
OA	Osteoarthritis
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
rev	<i>reward</i>
RF	Regulationsfaktor
mRNA	<i>messenger</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	SodiumDodecyl Sulfate/Natriumlaurylsulfat
SOX	<i>sex determining region Y (SRY)- box</i>

## ANHANG

SRY	<i>sex determining region of Y</i>
Ta	<i>annealing</i> Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>tris buffered saline with tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i>
TMA	<i>tissue microarray analysis</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFSF10	<i>tumor necrose factor (ligand) superfamily, member 10</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl-aminomethan)
U	Unit
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	Western Blot
WISP	<i>Wnt-induced signaling protein</i>
ZNS	Zentralnervensystem

## 9.2 Publikationen

### Artikel:

Hacker C, Christ N.A., Duchardt-Ferner E., Korn S., Berninger L., Kötter P., Entian K.-D., Wöhnert J.: *NMR resonance assignments of the lantibiotic immunity protein Nisl from Lactococcus lactis*. *Biomol NMR Assign* (2015), 8(16): 1874-2718

### Kongressbeiträge:

Berninger L., Balkenhol A, Baier C, Rehart S, Rickert M, Müller-Ladner U, Neumann E, Geyer M: *Investigation On The Role Of Delta/Notch Like EGF-Related Receptor In The Pathogenesis Of Osteoarthritis*. *Arthritis Rheumatism* (2013), 65 (Suppl 10) Poster

Berninger L., Balkenhol A, Baier C, Müller-Ladner U, Neumann E, Geyer M: *Investigation On The Role Of Delta/Notch Like EGF-Related Receptor In The Pathogenesis Of Osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage* (2014), 22 (Suppl) Poster

### Abstract:

Berninger L., Balkenhol A, Müller-Ladner U, Neumann E, Geyer: *The Role of Delat/Notch Like EGF-Related Receptor In Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells*. *Ann Rheum Dis* (2014); 73 (Suppl 2)

## **Erklärung**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 15.2.2016

Lucija Berninger

## *Dankeschön...*

Prof. Müller-Ladner möchte ich ganz herzlich für die Betreuung meiner Promotion im medizinischen Bereich danken und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat am Institut für Rheumatologie und klinische Immunologie des Lehrstuhls für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der JLU Gießen meine Arbeit durchzuführen.

Frau Prof. Tina Trenczek danke ich für die Betreuung und Prüfung meiner Arbeit im Fachbereich Biologie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med Matthias Geyer der mir vor vier Jahren das Vertrauen geschenkt hat seine Arbeit fortzuführen und mir während dieser Zeit mit Geduld und Verständnis zur Seite stand. Weiterhin bin ich ihm sehr dankbar dafür, dass er mir die Teilnahme an sehr interessanten Kongressen ermöglicht hat.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Elena Neumann für ihre Unterstützung im Labor und für ihre Teilnahme an unseren Gesprächen sowie für ihre kompetenten Ratschläge.

Mein spezieller Dank geht an Anna Balkenhol und Ina Kramm die unsere Arbeitsgruppe vervollständigt haben. Anna danke ich für ihre Unterstützung bei der Materialbesorgung als auch für die Verarbeitung des Gewebes. Ina möchte ich ganz herzlich für ihr offenes Ohr und ihre ganz besonders herzliche Art danken – danke das du mir in verzweifelten Stunden mit einer Tasse Kaffee beigestanden hast!

Rosel möchte ich ganz besonders dafür danken, dass sie mich zu Beginn meiner Promotion so freundlich im Labor eingewiesen hat. Außerdem danke ich ihr für ihre fabelhaften Ratschläge und ihre Hilfe in allen Lebenssituationen.

Ein sehr großes Dankeschön geht an das ganze Laborteam und hier speziell an Maria die mich immer wieder zum Lachen gebracht hat, an Grit die sich meine Texte immer zuerst durchlesen musste, an Sina und Birgitt für eine wundervolle Zeit in San Diego, an Klaus und Christiane für ihr Fachwissen, an Carina für ihre kreative und herzliche Art.

MEIN ALLERALLERALLERGRÖßTER DANK geht an meine wundervolle Familie und hier speziell an meine Eltern die sich während dieser Zeit liebevoll um meine Kinder gekümmert haben, an meinen Mann Jens der mich täglich mit aufmunternden Worten und Kraft motiviert hat und an meine beiden Töchter Elena und Emma die sehr viel Verständnis für ihre Mama hatten. Ohne eure Unterstützung wäre das niemals möglich gewesen.....DANKE!!!!!!