

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

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

**Expressionsanalyse chondrogener Progenitorzellen
im ex-vivo Migrationsexperiment**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Gunar Joachim Wagner

aus

Hagenow

Göttingen 2014

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

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

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

III. Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:	VI
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion von Knorpelgewebe	1
1.2 Chondrozyten und extrazelluläre Matrixkomponenten.....	3
1.3 Osteoarthritis und Marker	7
1.3.1 Risikofaktoren.....	7
1.3.2 Diagnostik.....	8
1.3.3 Kollagen Typ 2	9
1.3.4 Kollagen Typ 1	10
1.3.5 Matrixproteine.....	12
1.3.6 Runx2/Cbfa1 (run-related protein 2/core binding factor)	12
1.3.7 Sox-9	14
1.4 Regenerative Therapieansätze bei der Osteoarthritis.....	15
1.4.1 Klinische Therapieansätze	16
1.4.2 Zellbasierte Therapieansätze	17
1.4.3 Chondrogene Progenitorzellen.....	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Zellkultur	22
2.2 Gewebepreparation	24
2.3 Ex-vivo-Migrationsexperiment	24
2.3.1 Gewebefixierung	26
2.3.2 Gewebeschnitte der Paraffinblöcke.....	28
2.4 Herstellung von mRNA-Sonden	28
2.4.1 Umschreiben der mRNA in cDNA	28
2.4.2 PCR.....	29
2.4.3 Agarose-Gel (1,5%):.....	31

2.5 Klonierung PCR-Produkte in Vektor pGEM-T easy	32
2.5.1 Ligation	33
2.5.2 Transformation	34
2.5.3 Aufreinigung der Plasmid DNA	36
2.5.4 Enzymatischer Verdau der Plasmid DNA	37
2.5.5 Animpfen großer Mengen Plasmid-DNA	38
2.5.6 Aufreinigung großer Mengen der Plasmid DNA	39
2.5.7 In-Vitro-Transkription	40
2.5.8 Fällern der RNA	42
2.5.9 Dot Blot	43
2.6 In-Situ-Hybridisierung	45
2.6.1 Vorbehandlung der Objektträger	46
2.6.2 Durchführung der In-situ-Hybridisierung	46
2.6.3 Vorbereitung der Sonden	47
2.7 Immunhistochemie	49
2.7.1. AP-Chromogen Methode (GFP-Detektion).....	50
2.7.2 NBT/BCIP -Methode.....	53
2.8 Quantitative real-time Polymerase-Chain-Reaction (PCR)	54
2.8.1 Statistik/Pfaffl.....	56
2.9 Western-Blot.....	56
2.9.1 Proteinprobenvorbereitung	56
2.9.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	57
2.9.3 Immunoblot (Western-Blot).....	59
2.9.4 Proteindetektion	59
2.9.5 Quantitative Analyse der Western Blot Ergebnisse	60
2.9.6 Immunmarkierung	61
2.10 Konfokale Laserscanning Mikroskopie	63
2.10.1 Visualisierung der in-situ-Hybridisierungssignale	64
2.10.2 Konfokalmikroskopie und Reflektionstechnik	65

3. Ergebnisse	66
3.1 Quantitative Real-Time PCR	66
3.2 Western Blot.....	67
3.3 Zellkultur chondrogener Progenitorzellen.....	70
3.4 Gewebeschnitte.....	71
3.5 Ex-vivo-Migrationsexperiment	72
3.6 Immunhistologie	74
3.6.1 Rezeptor PDGF- β	74
3.6.2 Konfokalmikroskopie / Rezeptor PDGF- β	75
3.7 In-situ-Hybridisierung	77
3.7.1 Kollagen Typ 1 an Kontroll CPCs	77
3.7.2 Kollagen Typ 1 (Knockdown Runx2)	79
3.7.3 Kollagen Typ 2 an Kontroll-CPCs.....	80
3.7.4 Kollagen Typ 2 (Knockdown Runx2)	82
4. Diskussion	84
4.1 Einfluss von Runx2 und Sox9 in chondrogenen Progenitorzellen.....	84
4.2 Migration und Detektion chondrogener Progenitorzellen	85
4.3 Expression von Kollagen Typ 1 mRNA chondrogener Progenitorzellen..	87
4.4 Expression von Kollagen Typ 2 mRNA chondrogener Progenitorzellen..	88
5. Zusammenfassung	93
6. Anhang	94
6.1 Abbildungsverzeichnis	94
6.2 Tabellenverzeichnis	95
7. Literaturverzeichnis	96

Diese Arbeit ist in Liebe meinen Eltern
Hendrikje und Dirk Wagner gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis:

BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphat
BMP6	bone morphogenetic Protein
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CPC	chondrogene Progenitorzellen
DDR	dicoidin domain receptor
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESZ	embryonale Stammzellen
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
h	Stunden
HMG	high mobility group
ISH	in-situ-Hybridisierung
IL-1	Interleukin-1
kDA	Kilodalton
kLSM	konfokal Laser Scanning Mikroskop
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
min	Minuten
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
OA	Osteoarthrose
PBS	phosphate buffert saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PSF	Point spread function
PDGF	platlet derived growth factor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time-Polymerase-chain reaction
rpm	rounds per minute
RNA	Ribonukleinsäure
Runx2	run related transcription factor 2
sek	Sekunden
SSC	saline-sodium-citrat
si-RNA	small interfering-Ribonukleinsäure
Sox9	SRY-related HMG-box gene 9
SZ	Stammzellen
TAE	Trishydroxyaminomethan
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β3	Transforming-Growth-Factor β3
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion von Knorpelgewebe

Nur in der Bewegung, so schmerzlich sie sei, ist Leben (Jacob Christoph Burckhardt). Die Bewegung des menschlichen Körpers ist die Interaktion von Knochen und Knorpel, wobei die Knochen mit den Muskeln für die notwendige Stabilität sorgen. An ihren Enden umgibt die meisten der Knochen eine gelenkbildende Knorpelschicht. Das Zusammenwirken der komplexen Gelenkstrukturen, wie Gelenkkapseln, Bänder, Menisken, subchondrale Knochen, Synovialflüssigkeit und hyaliner Knorpel verfeinerte sich evolutionär über tausende von Jahren. Trotz immenser Fortschritte auf dem Gebiet der Arthroplastik, übertrifft der Feinbau des menschlichen Gelenks jeden künstlich hergestellten Ersatz (Buckwalter et al. 2005). Das Knorpelgewebe sorgt durch seine Druck- und Biegeelastizität für eine Kraftverteilung während der Bewegung und durch seine Schmier- und Gleitwirkung für die Verringerung der Friktion zwischen den sich bewegenden Knochen (Kuettner 1992). Knorpel ist Bestandteil verschiedener menschlicher Organe wie Ohren, Nase, Bronchien, Brustkorb und auch in den Zwischenwirbelscheiben zu finden, wo er wichtige Schutzfunktionen gegenüber auftretenden Scherkräften ausübt.

Der in der Ohrmuschel vorkommende elastische Knorpel unterscheidet sich von anderen Knorpeltypen in seinem Aufbau, seine elastischen Fasernetze umspinnen die Chondrone, verlaufen durch die interterritoriale Matrix und stehen in Kontakt mit dem Perichondrium (Yang et al. 2008), was unter anderem die geforderte Elastizität ermöglicht. Der elastische Knorpel wird umhüllt von der Knorpelhaut, die Gefäße und Nervenendungen enthält. Die Aufgabe des Perichondrium besteht in der Ernährung des Knorpels, seine Regeneration wird durch proliferierende Chondrozyten realisiert. Diese regenerative Eigenschaft wurde im Tiermodell am Beispiel des Ohrknorpels erforscht (Mo et al. 2013).

Weiterhin existieren Knorpelarten wie der Faserknorpel, welcher vom Aufbau dem straffen Bindegewebe ähnelt und als Gelenkknorpel einzelner Gelenke, sowie im

Kiefergelenk zu finden ist. In diesem Knorpeltyp gibt es einen Reichtum an Typ 1 Kollagenfasern mit dazwischen liegenden Chondronen und einzelnen Knorpelzellen. Eine gleichmäßige von zahlreichen rundlichen und spindelförmigen Knorpelzellen aufgebaute Matrix findet man im fetalen Knorpel (Salter et al. 1995).

Der am häufigsten vorkommende Typus von Knorpel ist der hyaline, dessen Name sich vom griechischen Wort (hyalos = Glas) ableitet, da er ein glasiges Aussehen und in seinen dünnen Scheiben einen weiß-bläulichen fast durchscheinenden Phänotyp besitzt. Der hyaline Knorpel ist typischerweise im Gelenkknorpel zu finden. Im Gegensatz zum elastischen Knorpel besitzt er kein Perichondrium und kann daraus resultierend normalerweise nicht erneuert werden. Das viskolelastische Gewebe des hyalinen Knorpels besitzt die Fähigkeit komprimierte Proteoglykane einzuschliessen, was einen hohen osmotischen Quelldruck erzeugt und die Absorption der einwirkenden mechanischen Kräfte ermöglicht (Kuettner 1992).

Im Jahr 1969 entdeckten Miller und Matukas, dass hyaliner Knorpel im Vergleich zu allen anderen Bindegeweben des menschlichen Körpers einen unterschiedlichen Kollagentyp besitzt. Die typische Gliederung dieses Knorpeltyps in Territorien und Interterritorien mit einem speziell ausgebildetem arkadenförmigen Verlauf wird durch Fibrillen von Kollagen Typ 2 realisiert. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Synthese von Kollagen Typ 2 nahezu zeitgleich mit der Entwicklung der Zwischenmatrix im chondrogenen Mesenchym der sich entwickelnden Extremitäten stattfindet (Linsenmayer et al. 1973). Bei dem Gelenkknorpel handelt es sich außerdem um avaskuläres Gewebe, welches über zwei mögliche Wege versorgt wird (Jackson und Gu 2009), die Diffusion aus Blutgefäßen des subchondralen Knochens und der Synovialflüssigkeit dienen der Nährstoffversorgung des Knorpelgewebes, wobei die Wichtigkeit dieser beiden Versorgungswege kontrovers diskutiert wird.

Es kann angenommen werden, dass die Nährstoffversorgung des Gelenkknorpels im fortgeschrittenen Alter zumindest bei Tieren ausschliesslich über die Synovialflüssigkeit realisiert wird, da eine progressive Kalzifizierung zur Knochenknorpelgrenze die Versorgung durch subchondrales Gewebe verhindert (McKibbin und Holdsworth 1966). Des Weiteren besitzt der Knorpel keine Lymphgefäße und keine schmerzleitenden Afferenzen, daher treten Schmerzsymptome bei degenerativen Erkrankungen des Gelenkknorpels oft erst in einem späten Stadium auf und sind mit pathologischen Veränderungen assoziiert, welche von fast allen Strukturen der Stütz- und Bewegungsorgane ausgehen können. Im Rahmen dieser Prozesse werden gebildete Abfallprodukte vermutlich durch Diffusion in die extrazelluläre Matrix (EZM) ausgeschleust.

Die metabolisch sehr aktiven Chondrozyten weisen keine Zellteilungsprozesse innerhalb ihrer physiologischen Umgebung auf, ihr Stoffwechsel scheint in der sauerstoffarmen Umgebung über anaerobe Signalwege zu laufen (Kuettner 1992). Weiterhin fehlt eine trennende Basallamina beidseitig des Gewebes. Um die Eigenschaften des Gelenkknorpels verstehen zu können, müssen die Interaktionen zwischen den individuellen Bestandteilen der EZM, ihre Struktur und Zusammensetzung aufgezeigt werden.

1.2 Chondrozyten und extrazelluläre Matrixkomponenten

Der Knorpel stellt eine besondere Art von Bindegewebe dar, welches in Interaktion mit seiner EZM vielen Veränderungen unterworfen ist. Die EZM besteht aus Gewebeflüssigkeit und einem Gerüst aus Strukturproteinen. Die Matrix wird von ortsständigen Bindegewebszellen wie Fibrozyten oder Chondrozyten produziert, wobei Chondrozyten für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Gelenkknorpels sorgen. Die Chondrozyten besitzen einen Anteil von 1 bis 5 Prozent an der gesamten Knorpelmasse, zwischen ihnen kommt es zu keiner Ausbildung von Zellkontakten, daher muss die Kommunikation über die EZM hergestellt werden (Kuettner 1992). Jeder einzelne Chondrozyt ist in die Matrix integriert und verantwortlich für den Stoffwechselumsatz seiner Umgebung.

Verteilung und Form der Chondrozyten im Knorpelgewebe differenzieren sich in verschiedenen Schichten und werden von der Faserorientierung, der Chondrozytenform und ihrer biochemischen Zusammensetzung bestimmt.

In der oberflächlichen Schicht ist vorwiegend ein flacher Phänotyp mit gedrungenem Zellkörper präsent. Die Begrenzung bildet eine dünne Schicht EZM mit flach auslaufendem Kollagen Typ 2 Fasern. Die Anordnung der Kollagen Typ 2 Fasern parallel zur Oberfläche des Gelenkknorpels ist von praktischer Bedeutung, da die oberflächliche Schicht starr ist und relativ geringe Anteile von Proteoglykanen besitzt, wodurch auftretende physikalische Kräfte, welche auf das Gelenk wirken, verteilt werden können. Die Anordnung scheint somit den Aufgaben angepasst (Poole et al. 2001). Mit zunehmender Tiefe der einzelnen Schichten des Knorpelgewebes erscheint die Form der Chondrozyten größer und runder, der Anteil an Proteoglykanen steigt, die Chondrozyten nehmen eine hypertrophe Gestalt an und sind nach außen von einer kalzifizierenden Matrix umgeben. In den tiefen Schichten muss das Gewebe hingegen den Kompressionskräften standhalten, daher sind die Kollagenfasern hier relativ senkrecht zur Oberfläche angeordnet. Der Grad der Kalzifizierung nimmt in Richtung Knochen zu.

Innerhalb der kalzifizierenden Schichten findet eine Verankerung durch die Kollagenfibrillen zum subchondralen Knochen statt. Im Übergang der Knochen-Knorpelgrenze, auch „tide mark“ genannt, werden die auf den Knorpel ausgeübten Scherkräfte in Zugkräfte umgewandelt und an den darunter liegenden Knochen weitergeleitet (Radin et al. 1984). Die Interaktion zwischen Wasser, als Hauptbestandteil mit einem Anteil von 65 bis 80 Prozent zu finden, und den Matrixmolekülen beeinflusst signifikant die mechanischen Eigenschaften des Gewebes (Buckwalter et al. 2005). Diese Gewebeflüssigkeit beinhaltet außerdem kleine Proteine, Metaboliten und eine hohe Konzentration von Kationen um die negativ geladene Proteoglykane auszubalancieren. Ein gewisser Anteil des Wassers kann sich frei innerhalb und ausserhalb des Gewebes bewegen, wobei das Volumen und die Konzentration maßgeblich durch Proteoglykane beeinflusst wird, die sich zu 6 bis 10 Prozent im Knorpelgewebe befinden und von Fibrozyten synthetisiert und sezerniert werden (Moreira-Teixeira et al. 2011).

Proteoglykane bestehen aus einem Core-Protein und vielen langen, mit diesem Protein verbundenen Seitenketten aus Glycosaminoglykanen. Diese Makromoleküle besitzen eine hohe Anzahl von negativ geladenen Ionen, welche die Konzentration von positiv geladenen Ionen wie Natrium und Chlor verringern können, wobei die Zunahme der anorganischen Ionenkonzentration zu einer erhöhten Osmolarität des Gewebes beiträgt. Durch das Kollagennetzwerk kann dem osmotischen Druck, der von den anorganischen Ionen der produzierenden Proteoglykanen verursacht wird, standgehalten werden. (Buckwalter et al. 2005). Glykoproteine und Proteoglykane wie beispielsweise das COMP (cartilage oligomeric Protein), Matrilin1, Perlekan, Versikan, Decorin, Biglykan und Fibromodulin wurden in diesem Netzwerk identifiziert und stehen mit dem Fibrillennetzwerk der Kollagene in Verbindung, auf diesem Wege erfolgt der Transport von Wachstumsfaktoren (Knudson und Knudson 2001).

Der wichtigste Vertreter dieser makromolekularen Komponenten ist das Aggrekan, welches nach der Sekretion durch die Knorpelzellen ein Monomer an zwei weitere Verbindungsproteine bindet. Bis zu hundert solcher Verbindungen können nicht-kovalent mit einem Hyaluronanmolekül verknüpft werden. Wasser und kleine Ionen werden damit gebunden, wodurch ein Quelldruck erzeugt wird und so die dem Knorpel gegebene Eigenschaft der hohen Elastizität entsteht. Glykoproteine haben ebenfalls die Möglichkeit Wasser zu binden und somit Diffusionsräume zu schaffen und kommen zu 2 bis 3,5 Prozent im Knorpel vor. Kollagene und elastische Fasern sind die wichtigsten extrazellulären Substanzen, die eine Gerüstfunktion besitzen und sich mit 12 bis 21 Prozent in der extrazellulären Matrix finden.

Kollagen Typ 2 Moleküle und andere Strukturproteine sind für die funktionelle und strukturelle Integrität des gesamten Knorpels von großer Bedeutung. Kollagen Typ 2 Proteine wurden im Gelenkknorpel des Menschen und vieler verschiedener Arten untersucht, sie gehören zu den Fibrillen bildenden Kollagenen, deren ultrastrukturelle Molekülform erstmals 1961 beschrieben wurde (Rich und Crick 1961).

Die Synthese von Kollagen Typ 2 verläuft nach dem Muster der Proteinbiosynthese, besitzt jedoch im Vergleich mit anderen Matrixproteinen einige unkonventionelle Varianten. Die spontane oft beobachtete Zusammenlagerung von Molekülen ähnelt der Entstehung von Kristallstrukturen (Prockop 1998). Die Faltung des Proteins wird eingeleitet durch die Formatierung eines kleinen Kernes mit verschiedenen Triple Helix Molekülen an den kurzen C-terminalen Enden der Aminosäuresequenzen von Kollagen-Polypeptidketten. Die strukturelle Entwicklung der tripelhelikalen Struktur welche das Prokollagen formiert, erfolgt vom C- zum N-Terminus in einer Art Reißverschlussystem. In einem zweiten Schritt kommt es zur selbständigen Zusammenlagerung der Monomere zu Kollagenfibrillen, ähnlich einer Kristallisation (Prockop et al. 1979).

Zusätzlich zu Kollagen Typ 2 besteht der hyaline Knorpel aus drei weiteren Knorpeltypen, dem Kollagen Typ 9, Typ 10 und Typ 11, die ebenfalls als chondrogene Marker des hyalinen Knorpels bezeichnet werden und mit Kollagen Typ 2 interagieren.

Kollagen Typ 9 besitzt eine einzigartige, sowohl mit Kollagendomänen als auch mit Nicht -Kollagendomänen durchsetzte Struktur, wobei es nicht selbständig Kollagenfibrillen ausbilden kann, sondern sich auf der Oberfläche der Typ 2 Kollagenfibrillen befindet und mit Domänen aus Kollagen Typ 3 und den C-terminalen Enden aus Nicht- Kollagendomänen, sogenannten NC4 Domänen verbunden ist. Die Funktion von Kollagen Typ 9 im hyalinen Knorpelgewebe ist nicht ausreichend erforscht, es wird angenommen, dass dieser Kollagentyp den Kontakt zwischen unterschiedlichen Kollagenfibrillen verhindert, den Fibrillendurchmesser kontrolliert oder in Beziehung mit den Proteoglykanen der extrazellulären Matrix steht (Mayne 2006).

1.3 Osteoarthrose und Marker

Osteoarthrose (OA), die verbreitetste degenerative Gelenkerkrankung, zeigt eine sehr hohe Korrelation mit dem Alter und führt zu vielfältigen Einschränkungen der Lebensqualität von Menschen in den Industrienationen. Nach den Berechnungen bezüglich der Bevölkerungsentwicklung des Statistischen Bundesamtes (Wanderungssaldo: plus 100.000 Personen ab 2014) wird in Deutschland die Zahl der Personen, die 80 Jahre oder älter sind, zwischen 2011 und 2050 von 4,3 Millionen auf 10,2 Millionen steigen und erst danach rückläufig sein (2060: 9,0 Millionen). 2060 werden 14,0 Prozent der Bevölkerung – das ist jeder Siebte – 80 Jahre oder älter sein. Damit wird es fast so viele Menschen in diesem hohen Alter geben wie unter 20-Jährige, die dann 15,6 Prozent der Bevölkerung ausmachen werden (Quelle Bundeszentrale für politische Bildung,bbp;Stand26.09.2012). Diese Daten veranschaulichen die Notwendigkeit die Korrelationen zwischen Erkrankungen des Alters, wie die Osteoarthrose intensiv zu erforschen und mögliche Therapieansätze zu entwickeln.

1.3.1 Risikofaktoren

Obwohl es eine erhöhte Prävalenz für die Ausbildung einer OA im Alter gibt, handelt es sich nicht um eine normale Alterserscheinung. Für die Entstehung einer OA im Kniegelenk gibt es vielfältige Hypothesen. Zur Ergründung des genauen Pathomechanismus werden sowohl genetische Defekte als auch entzündliche Prozesse genauer erforscht. Die häufigsten Risikofaktoren sind neben dem Alter, geschlechtsspezifische Unterschiede, vorausgegangene Gelenkerkrankungen, Adipositas, Stoffwechselerkrankungen und mechanische Faktoren (Felson et al. 2000). Andere Ursachen, die zur Ausbildung der OA führen, wie mechanische Belastungen, eine Änderung der Knochenstruktur und der Zusammensetzung der EZM, sind ebenfalls relevant. Das veränderte Verhalten von Chondrozyten, wie die Ausbildung hypertropher Marker und die Kalzifizierung der Matrix sind oft beobachtete Phänomene, die sich im Bereich der Wachstumsfuge abspielen (Gouttenoire et al. 2004). Neben dem kontinuierlichen Abbau der Matrix des Gelenkknorpels kommt es zu einer

Verdickung des subchondralen Knochens. Im weiteren Verlauf sind verschiedene Entzündungsstadien der Synovia zu beobachten sowie eine Schädigung von Bändern und Menisken und eine Hypertrophie der Gelenkkapsel. Weiterhin kann es zu Veränderungen der periartikulären Muskeln, Nerven und lokalen Fettpolstern kommen (Loeser et al. 2012).

1.3.2 Diagnostik

Ein diagnostisches Merkmal der OA ist die Ausbildung von Osteophyten an der lateralen Peripherie des Tibiaplateaus, ein Resultat chondrogener Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Periost. Eine unkontrollierte Differenzierung von Vorläuferzellen in die chondrogene Richtung führt also nicht automatisch zur Neubildung von Knorpelgewebe sondern zu Knochen (Jeffery 1975). Der Aktivierungsmechanismus der Chondrozyten im Verlauf der im osteoarthrotischen Knorpel stattfindenden Prozesse ist nicht abschliessend erforscht. Altersabhängige Änderungen in der Zusammensetzung der EZM oder die Aktivierung inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) könnten eine Rolle bei der direkten Aktivierung der Chondrozyten spielen (Goldring et al. 2011). Eine Hypothese den Pathomechanismus der OA zu charakterisieren, kann durch den schrittweisen Abbau des Kollagennetzwerkes im Gelenkknorpel erklärt werden (Freeman 1999). Weitere Studien belegen, dass Deformationen und Schwellungen im Knorpel der OA mit einem Zerfall des Kollagennetzwerkes vergesellschaftet sind (Bank et al. 2000). Die unterschiedliche Löslichkeit von Kollagenen in gesundem sowie dem OA veränderten Gewebe nach Behandlung mit 4 M Guanidinchlorid und enzymatischer Behandlung mit Pepsin zeigte, dass mehr als 38 Prozent mehr Kollagen aus OA Gewebeproben gelöst werden konnte (Gouttenoire et al. 2004). Die phänotypischen Expressionsunterschiede mit einem erhöhten Nachweis von Kollagen Typ 1 im OA Gewebe deuten auf die unterschiedliche Regulation der Chondrozyten im Verlauf des Krankheitsprozesses.

1.3.3 Kollagen Typ 2

Kollagen Typ 2 gehört zu einer Superfamilie von extrazellulären Matrixproteinen, welche aus insgesamt 19 verschiedenen Arten aufgebaut ist, wobei die Gewebespezifität für die verschiedenen Arten von Kollagen unterschiedlich ausgeprägt ist. Kollagen Typ 2 ist mit einem Anteil von 50% im Gelenkknorpel enthalten. Das Netzwerk der Knorpelmatrix wird durch dieses Protein geformt und stellt somit den wichtigsten Bestandteil der extrazellulären Matrix im Gelenkknorpel dar (Garvican et al. 2010). Absolute und quantitative Untersuchungen für die Expression von Kollagen Typ 2 im gesunden als auch im OA veränderten Knorpelgewebe auf mRNA und Proteinebene können durch unterschiedliche Methoden durchgeführt werden. Immunhistochemische Untersuchungen konnten sowohl das Vorhandensein von Kollagen Typ 2 als auch von Typ 1 auf Proteinebene in der interterritorialen Matrix des OA-Knorpel nachweisen (Gay et al. 1976). Die verhältnismäßig geringe Menge von Kollagen Typ 2 mRNA in gesunden Chondrozyten kann hingegen durch einen allgemein geringen Umsatz von Kollagenen in nicht verändertem Knorpelgewebe erklärt werden. Während die Präsenz von Kollagen Typ 2 einen unverwechselbaren Bestandteil von hyalinen Knorpel darstellt, kann die Expression von Kollagen Typ 1, ausgehend von hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge, während der Entwicklung der OA zunehmen. Vorhandene Matrixbestandteile und Interaktionen der Zellmatrix sind notwendig, um die Synthese von Kollagen Typ 2 in Chondrozyten aufrecht zu erhalten. Elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Untersuchungen von Kollagen Typ 2 durch In-situ-Hybridisierung (ISH) veranschaulichen die unterschiedliche Verteilung in verschiedenen Stadien der OA. Chondrozyten der tiefen Zone während des späten Stadium der OA weisen verstärkt Kollagen Typ 1 mRNA jedoch kein Kollagen Typ 2 auf (Miosge et al. 1998).

Die Zerstörung von interfibrillärem Kollagen 9 und 11 durch die Wirkung verschiedener Metalloproteinasen, welche durch Interleukin-1 (IL-1) aktiviert wurden, können in diesem Zusammenhang zu einer Destabilisierung des Kollagen Typ 2 Geflechts führen. Die Entdeckung von cystein-reichen Domänen an den Aminoenden der Propeptide von Prokollagen 2 zeigte, dass verschiedene

Spliceformen existieren, welche einen Mechanismus für eine Vielfalt im Gen dieses Kollagentyps darstellen (Ryan und Sandell 1990). Die alternative Splicevariante von Prokollagen Typ 2a ist der Expression von Typ 2b während der enchondralen Skelettentwicklung vorgeschaltet, in Geweben, die sich in die chondrogene Richtung entwickeln, wechselt die Spliceform von Typ 2a zu 2b und führt zur Differenzierung von Chondroblasten (Zhu et al. 1999). Es kann von einer inhibierenden Wirkung durch eine vermehrte Expression von Prokollagen 2a ausgegangen werden, ferner kann es zu einer Kompromittierung der normalen Entwicklung, zu Matrixbildung und zu einem erhöhten Risiko für die Ausbildung von Knorpelerkrankungen kommen, fehlgeleitete Reparaturmechanismen und die Ausbildung von Osteophyten sind möglich (Kuettner 1992). Die Quervernetzung der Kollagenfibrillen aus Typ 2 Kollagen erfolgt durch die Formatierung von 3-Hydroxypyridin mit den Hydroxyllysinen und findet extrazellulär statt. Dieser Prozess nimmt mit steigendem Alter zu, eine Urinuntersuchung kann das Vorhandensein von Peptiden, welche 3-Hydroxypyridin enthalten, nachweisen und damit den Katabolismus von Kollagen Typ 2 markieren. Eine aktuelle Methode um Kollagen Typ 2 Fragmente durch den Urin nachzuweisen, besteht in der Untersuchung von Kollagen Typ 2 C-Telopeptide.

Dies eröffnet die Möglichkeit den erhöhte Zerstörungsgrad des Knorpels durch einen sehr sensitiven Nachweis bei Patienten mit OA frühzeitig zu diagnostizieren und entsprechende Therapiekonzepte zu starten (Christgau et al. 2001).

1.3.4 Kollagen Typ 1

Kollagen Typ 1 ist ein weiteres Mitglied der Familie der Kollagene, welches vorwiegend von Fibroblasten produziert wird und eines der wichtigsten extrazellulären Matrixkomponenten der Haut darstellt. Im Gegensatz zu Kollagen Typ 2 ist dieser Kollagentyp aus einem heterotrimer von zwei alpha1 und einer alpha 2 Kette aufgebaut (Stephan et al. 2004). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte Kollagen Typ 1 im Knorpelgewebe bei OA identifiziert werden, die interstitielle Verteilung von Kollagen Typ 1 zeigte eine unregelmäßige, teilweise zentralisierte Verteilung mit einer signifikanten Heterogenität innerhalb des Gewebes. Bei kleineren OA Läsionen kommt es vorwiegend zu

zentralisierten, perizellulären Ablagerung von Kollagen Typ 1 und 3, während die Mehrheit der interterritorialen Matrix ausschliesslich mit Kollagen Typ 2 reagiert. In fortgeschrittenen Stadien der Osteoarthritis, besonders bei der Ausbildung von Osteophyten wurden extensive Veränderungen der Kollagenexpression innerhalb der perizellulären Matrix ermittelt, wobei es zu einer umfassenden, überlappenden Lokalisierung von Kollagen Typ 1, Typ 2 und Typ 3 im gesamten Knorpel kam. Diese Beobachtungen unterstützen Hinweise, dass es zu einem Wechsel des Expressionsmusters der Kollagentypen während verschiedener Stadien der OA durch degenerative Prozesse kommt. Die interterritoriale Knorpelmatrix besteht während dieser Vorgänge weiterhin zum überwiegenden Teil aus Kollagen Typ 2 (Nerlich et al. 1993). Andere Untersuchungen konnten im fortgeschrittenen Stadium der Osteoarthritis ebenfalls eine hochregulierte Expression von Kollagen Typ 2 auf mRNA Ebene nachweisen, innerhalb der Chondrozyten konnte jedoch keine signifikante Expression von Kollagen Typ 1 auf Protein oder mRNA Ebene ermittelt werden (Aigner et al. 1995).

Innerhalb von Gewebeabschnitten mit Anteilen von Faserknorpel, die charakteristisch in späten Stadien der Osteoarthritis auftreten, konnten innerhalb der tiefen Zonen sekretorische Chondrozyten gefunden werden, welche in der Lage sind Kollagen Typ 1 mRNA zu synthetisieren (Miosge et al. 1998). Der Zusammenhang zwischen der Ausprägung einer OA und einem veränderten Expressionsmuster für Kollagen Typ 1 konnte durch die Etablierung eines Mausmodells mit einem Defizit für den Kollagenrezeptor DDR-1 (discoidin domain receptor 1) beleuchtet werden. DDR-1 Knockout Mäuse zeigen eine erhöhte Ausprägung von Osteoarthritis im Kiefergelenk schon ab der 9 postnatalen Woche, sie wiesen typische histologische Zeichen von Oberflächenfissuren, Verlust von Proteoglykanen, Chondrozyten Clusterformation und eine hochregulierte Expression von Kollagen Typ 1 sowie eine atypische Anordnung der Kollagenfibrillen auf. Aus diesem Modell für die Osteoarthritis konnten einzelne Zellen isoliert werden und zeigten in Kultur eine erhöhte Produktion von Runx 2 und Kollagen Typ 1 sowie niedrigere Level für Sox-9 und Aggrecan (Schminke et al. 2013).

1.3.5 Matrixproteine

Die OA ist auf molekularer Ebene ebenfalls durch ein unterschiedliches Expressionsmuster der ortsständigen Chondrozyten für Matrixproteine charakterisiert. Proteolytische Enzyme, welche für die Zersetzung der Knorpelmatrix verantwortlich zeichnen, sind Matrixmetalloproteinasen (MMPs), dabei handelt es sich um eine Familie von Proteinasen, die Zink als zentrale Domäne ihrer Struktur besitzen. Zu einer fortschreitenden Zerstörung der Matrix kommt es durch Komponenten zu denen Aggrekanasen und Kollagenasen zählen, beide gehören zur Familie der MMPs, verschiedene Serin und Cystein Proteinasen sind ebenfalls in diesen Prozess involviert.

In den frühen Stadien der OA kommt es durch MMP-3, A-Disintegrin und Metalloproteinasen mit Thrombospondin 5 (ADAMTS-5) zum Abbau von Aggrekan, gefolgt von einer erhöhten Aktivität von MMP-13 (Loeser et al. 2012). Ein erhöhtes Vorkommen von MMP13 führt zu einer konsequenten Zerstörung der Knorpelstruktur und damit einhergehend zum Verlust der Gelenkfunktionen (van der Kraan und van den Berg 2012). Vor allem der vermehrte Abbau des wichtigsten Strukturproteins Kollagen Typ 2 wird durch diese Metalloproteinasen bewirkt, wird das Kollagennetzwerk zerstört, ist ein unwiderrufbarer Zustand erreicht.

1.3.6 Runx2/Cbfa1 (run-related protein 2/core binding factor)

Bei der Erforschung von skelettalen Entwicklungsprozessen konnte in den letzten Jahren auf molekularer Ebene das Protein Runx2 identifiziert werden, ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor aus einer Proteinfamilie von der bisher drei verschiedene Subtypen identifiziert wurden (Komori und Kishimoto 1998). Eine hochkonservierte Runt-Domäne aus 128 Aminosäuren innerhalb des Proteins dient im Rahmen der Interaktion der Runx Proteine mit der DNA als Bindungsfaktor und realisiert die Transkriptionsaktivität dieses Proteins (Rath-Deschner et al. 2010).

Das Protein Runx1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese durch Differenzierung von Stammzellen, während der Subtyp Runx3 eines der

wichtigsten Wachstumsregulatoren von Epithelzellen des Magens ist. Runx2 ist von Bedeutung während der desmalen und chondralen Osteogenese und bei skelettalen Wachstumsprozessen. Die wichtigsten Schritte während der skelettalen Entwicklung beinhalten eine Kondensation von mesenchymalen Zellen unterschiedlichen embryonalen Ursprungs und deren Differenzierung, dies geschieht entweder direkt mit der Umwandlung zu Osteoblasten durch Ossifikationsprozesse im Knochen oder indirekt durch Knorpelbildung in den langen Röhrenknochen. Es konnte durch Studien die Beteiligung der drei Transkriptionsfaktoren der Runx-Familie bei diesen Prozessen nachgewiesen werden (Stricker et al. 2002). Mäuse bei denen ein Defizit des Runx2 Gens etabliert wurde, waren nicht in der Lage zur Knochenbildung, eine Mutation des Gens für Runx2 führt bei Menschen zur Ausbildung der Cleidocranialen Dysplasie, einer dominant vererbten skelettalen Erkrankung, die charakterisiert ist durch die Ausbildung großer Fontanellen, Zahnanomalien und einer verzögerten skelettalen Entwicklung (Mundlos et al. 1997). Die gleichzeitige Präsenz von Runx1 und Runx2 konnte in einer Population von Progenitorzellen des Knorpelgewebes von Mäusen analysiert werden, wobei eine unterschiedliche Verteilung mit einer stärkeren Expression von Runx1 im undifferenzierten Mesenchym vorhanden war. In hypertrophen Chondrozyten fehlt dieses Protein und eine Expression von Runx2 wird favorisiert (Wang et al. 2005).

In den frühen Stadien der OA kann eine erhöhte Expression von Runx2 bei hypertrophen Chondrozyten beobachtet werden, welche die Transkription des für Osteoblasten charakteristischen Osteokalzin induziert. Die Funktion von Runx2 während der verschiedenen Stadien der Chondrogenese und sein Einfluss auf chondrogene Progenitorzellen während der enchondralen Ossifikation konnte in der Vergangenheit untersucht werden. Darüber hinaus nimmt die relative Expression von Runx2 während der Entwicklung von Osteoblasten aus chondrogenen Vorläuferzellen mit steigendem Differenzierungsgrad zu und stellt somit einen Marker für die Bildung von Knochengewebe dar (Goldring et al. 2006).

Obwohl Runx2 ein wichtiger Aktivator für spezielle Gene der Osteoblasten und hypertropher Chondrozyten darstellt, ist seine Expression in Osteochondroprogenitorzellen ab Tag 10 der embryonalen Entwicklung nicht isoliert zu beobachten, gleichzeitig findet sich eine erhöhte Expression von Sox9 in diesen Zellen. Jedoch konnte auch eine gegenseitige Beeinflussung durch die Inhibierung von Runx2 durch Sox9 in vitro demonstriert werden (Zhou et al. 2006). Der umgekehrte Mechanismus tritt jedoch nicht ein und es kommt zu keiner Beeinflussung der Transaktivierung von Kollagen Typ 2 durch eine Runx2 dominierte Funktion über Sox9.

Eine Autoregulation der Expression von Runx2 konnte durch weitere Studien untersucht werden (Ducy et al. 1999). Aufgrund der Tatsache, dass sowohl HMG-Domänen (high mobility group) als auch Runt-Domänen evolutionär innerhalb der Sox und Runx Proteine konserviert wurden, scheint es möglich, dass nicht nur Sox-9 sondern auch andere verwandte Mitglieder der HMG Familie als mögliche Repressoren der Runt-Domänen während der Entwicklungsprozesse eine wichtige Rolle spielen (Zhou et al. 2006).

1.3.7 Sox-9

Sox-9 ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren während der Chondrogenese. Als Teil einer Proteinfamilie aus weiteren 20 verschiedenen Isotypen besitzt Sox-9 ein Bindungsdomäne aus 79 Aminosäuren, die mit der DNA interagieren kann. Diese vom Sry-Faktor abgeleitete, als HMG-Box bezeichnete Domäne hat die Eigenschaft bestimmte DNA Strukturen zu erkennen, wobei es während der Bindung der Sry-Domäne des Sox-Proteins zu einer Biegung der DNA von 70 bis- 85 Grad innerhalb der minor-groove und damit zu einem Konformationswechsel kommt. Sox-Proteine können ebenfalls verantwortlich sein für die Rekrutierung weiterer Proteine in diesen Komplex, die andererseits keine Bindung mit der DNA eingehen (Wegner 1999).

Während der skelettalen Entwicklung sind die Sox-Proteine von großer Bedeutung und spielen bei der Differenzierung von Mesenchymzellen in chondrogene Zellen eine wichtige Rolle. Der Transkriptionsfaktor Sox-9 ist ein früher Marker während der Kondensation von Zellen und zeigt sich verantwortlich für die Expression von

Kollagen Typ 2 (Col2a1) und weiteren Matrixproteinen des Knorpels (Cendekiawan et al. 2008, Dy et al. 2012). Es wurde zudem eine Interaktion bei der Bindung von Sox-9 innerhalb von Intronabschnitten des Gens für Kollagen Typ 2, welche für eine verstärkte Gewebeproliferation verantwortlich sind, entdeckt eine Mutation dieser Bindungsabschnitte führte zu einer ernsthaften Störung der Aktivität in vitro und in vivo (Lefebvre et al. 1997)

Während der OA wurde eine reduzierte Expression von Sox-9 im Vergleich mit gesunden Kontrollproben aus dem Gelenkknorpel beobachtet (Brew et al. 2010). In diesem Zusammenhang konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Expression von Kollagen Typ 2 mit Sox-9 nachgewiesen werden, obwohl der Transkriptionsfaktor Sox-9 ein Schlüsselmarker für die Knorpelentwicklung ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass andere Faktoren, welche in osteoarthrotisch verändertem Gewebe vorhanden sind, die Regulation von Kollagen Typ 2 beeinflussen.

1.4 Regenerative Therapieansätze bei der Osteoarthritis

Die Therapie der OA stellt eine große Herausforderungen aufgrund des eingeschränkten Regenerationsvermögens hyalinen Knorpels dar. Pathologische Alterungsprozesse und Verletzungen führen zu einer Zerstörung des natürlichen Knorpelaufbaus und resultieren in Gelenkdysfunktionen. Die Konzepte um Prozesse der Knorpeldegeneration des Kniegelenks zu behandeln verfolgen in erster Linie die Ziele des Ersatzes und der Entlastung der Gelenkoberfläche. Sollten Maßnahmen der Reparatur und Wiederherstellung erfolglos bleiben, besteht in den meisten Fällen nur die Möglichkeit einer Resektion des Gelenks. Um das Ziel einer vollständigen Regeneration zu verwirklichen werden sowohl klinische als auch experimentelle wissenschaftliche Ansätze verfolgt. Konservative und chirurgische Therapieansätze bei der Behandlung der Krankheit führten bisher zu keiner vollständigen Heilung. Der Ersatz von zerstörtem oder verloren gegangenem Knorpelgewebe im Rahmen regenerativer Therapiemaßnahmen bedient sich der Anregung körpereigener Regenerations- und Reparaturprozesse, welche das Ziel einer natürlichen und funktionellen Wiederherstellung von Zellen und Geweben verfolgen.

1.4.1 Klinische Therapiesätze

Aktuelle klinische Therapien können in konservative und operative Behandlungsansätze unterschieden werden (Krugluger und Knahr 2001). In den späten Stadien der OA ist im Rahmen der operativen Behandlungsmöglichkeiten der Einsatz von Endoprothesen die am häufigsten angewandte Methode des Gelenkflächenersatzes um eine anhaltende Gelenkfunktion und Schmerzfreiheit zu ermöglichen. Die durchschnittliche Lebensdauer von Knie-Total-Endoprothesen von 10 bis 15 Jahre stellt einen Impuls für die Suche nach nachhaltigeren, regenerativen Therapiemöglichkeiten dar. Weitere operative Ansätze beinhalten Methoden der Mikrofrakturierung und der Transplantation autologer Knochen-Knorpel Bestandteile.

Die Technik der Mikrofrakturierung basiert auf der Penetration des subchondralen Markraums, welche die Migration von Stammzellen des Knochenmarks ermöglichen soll. Es wird davon ausgegangen, dass diese Zellen durch Differenzierung in die chondrogene Richtung den Aufbau einer funktionellen EZM und somit eine Regeneration von Knorpeldefekten ermöglichen können (Simon und Jackson 2006). Die Abdeckung eines osteochondralen Defekts durch einen Periostlappen, welcher mit einer Suspension aus Chondrozyten kombiniert wird, ist eine Strategie autologer Chondrozytentransplantation (Skoog und Johansson 1976).

Diese Verfahren lieferten bisher keine zufrieden stellenden Ergebnisse, da die Transplantate in ihrer Vitalität limitiert blieben und somit eine nur unzureichende Stabilität und Belastbarkeit des gebildeten Faserknorpels erzielt wurde (Lindahl et al. 2003).

1.4.2 Zellbasierte Therapieansätze

Experimentelle laborgestützte Forschungsprojekte in der Therapie der OA verfolgen das Ziel einer gelenkten Stimulation der natürlichen Regenerationskapazität von ortsständigen mesenchymalen Stammzellen (MSZ), welche den Degradationsprozess des Gewebes begleiten. Nach enzymatischem Verdau von OA Knorpelgewebe konnten Zellen mit typischen Oberflächenmerkmalen für mesenchymale Stammzellen analysiert werden (Alsalameh et al. 2004). Andere Untersuchungen konnten die Existenz von MSZ in der oberflächlichen Zone von gesundem Knorpelgewebe nachweisen. Diese Zellen besitzen die einzigartige Kapazität sich in eine Vielzahl von Bindegewebstypen wie Knochen und Sehnen zu differenzieren (Dowthwaite et al. 2004). Es konnte darüber hinaus durch Experimente an Stammzellen aus dem Knochenmark gezeigt werden, dass sich unter bestimmten Bedingungen eine Zelldifferenzierung zu knorpelähnlichem Gewebe erreichen lässt. Diese Untersuchungen beleuchteten das Potential einer zellbasierten Therapie sowohl unter in-vivo als auch in-vitro Bedingungen (Mackay et al. 1998). Bei der Regeneration von pathologisch zerstörter Knorpelmatrix muss berücksichtigt werden, dass eine adäquate Rehabilitation nur mit Gewebeersatz möglich ist, welches die gleichen biologischen und chemomechanischen Eigenschaften besitzt wie das ursprüngliche Gewebe des Gelenkknorpels. Eine Integration des neuen Reparaturgewebes muss aktiv unterstützt werden.

Verfahren auf dem Gebiet des „tissue-engineering“ verfolgen das Ziel der Gewebezüchtung über eine Stimulation ortsständiger Zellen durch geeignete Bioträgermaterialien mit unterschiedlichen Signalmolekülen unter Verwendung verschiedener Wachstumsfaktoren (Chen et al. 2006). Dabei soll eine funktionierende Matrix für die chondrozytäre Differenzierung von MSZs zur Verfügung gestellt werden. In einer Studie wurde die Injektion eines Agarose-Gels in den Raum zwischen Knochen und Periost durchgeführt, dies führte zu einer Differenzierung der MSZ und machte eine anschließende Defektdeckung durch sich entwickelndes Reparaturgewebe möglich (Emans et al. 2010).

Mithilfe von biologisch aktiven Moleküle wie TGF- β (transforming growth factor beta) können regenerationsfähige embryonale Stammzellen (ESZ) induziert werden um Reparaturprozesse in Knochen-Knorpel Defekten der OA kompromittiertem Gewebe einzuleiten (Nakagawa et al. 2009). Die Ausbildung einer immunologischen Abwehrreaktion nach Therapie mit MSZ ist durch den „major histocompatibility complex“ (MHC) der Zellen gegeben und kann in einer Abstoßungsreaktion oder der Entwicklung von Teratomen gipfeln (Heng et al. 2004). Es ist für eine erfolgreiche zellbasierte Therapie notwendig undifferenzierte Zellen mesenchymaler Herkunft zu manipulieren, um das Risiko für die Entwicklung von Teratomen zu minimieren. Die Entwicklung von effizienten und stabilen Kulturbedingungen, die eine Differenzierung der MSZs in eine gewünschte gewebespezifische Richtung ermöglichen, ist dafür eine unabdingbare Voraussetzung (Muhammad et al. 2013). Die Erkenntnis, dass sich Stammzellen des adulten Gewebes innerhalb einer bestimmten anatomisch abgrenzbaren Region, welche als Stammzellnische bezeichnet wird, aufhalten, führte zu weiteren Untersuchungen der wichtigsten Signalkaskaden dieses Netzwerks (Ohlstein et al. 2004). Hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit sind determinierte Stammzellen, welche als Progenitorzellen bezeichnet werden, als besonders günstig in der zellbasierten Therapie anzusehen. Diese Zellen sind im Gegensatz zu MSZs auf einen bestimmten Funktionsbereich festgelegt, können jedoch noch redifferenziert werden.

1.4.3 Chondrogene Progenitorzellen

Forschungsergebnisse über die Zusammensetzung der EZM bei Patienten mit OA dokumentieren die Ausbildung von Oberflächenfissuren und Zellcluster, die als typische Zeichen der Matrixdegradation gelten (Koelling et al. 2006, Tesche und Miosge 2005). Durch ultrastrukturelle Untersuchungen konnten Brüche in der Knochen-Knorpelgrenze mit einsprossenden Blutgefäßen beobachtet werden, die von länglichen Zellen begleitet wurden und sich von den runden Chondrozyten in der Region um den Gewebedefekt unterschieden. Durch in-vitro Untersuchungen konnte das Migrationspotential dieser Zellen aufgedeckt werden. Nach der Entnahme von Knorpelgewebe aus der Region um einen OA Defekt und einer fünf- bis zehntägigen Kultivierungszeit unter Standardbedingungen wurde eine Migration von Zellen in das Kulturgefäß beobachtet und bildete damit die Grundlage für weitere umfangreiche Expressionsanalysen (Koelling und Miosge 2009). Verschiedene molekularbiologische Analysen hinsichtlich der Oberflächenmarker dieser Zellen zeigten ein Expressionsmuster welches typisch für Stammzellen ist. Das multiple Differenzierungspotential, eines der wichtigsten Merkmale von Stammzellen, konnte sowohl für die adipogenen, osteogenen und chondrogenen Richtung nachgewiesen werden. Durch Transfer in eine 3D-Alginat Kultur konnte das chondrogene Potential dieser Zellen ermittelt werden. Hierbei wurde nach drei Wochen, auch ohne Einfluss von chondrogenem Kulturmedium, die Ausbildung eines runden Phänotyps ähnlich dem von gesunden Chondrozyten beobachtet. Die Expression von Kollagen Typ 2 mRNA wurde über die Methode der ISH und durch die Anwendung ultrastruktureller, lichtmikroskopischer Untersuchungen ermittelt. Eine Analyse der Proteinexpression für diesen Kollagentyp war ebenfalls positiv. Es zeigte sich, dass diese Zellen zusätzlich über eine erhöhte Expression des chondrogenen Transkriptionsfaktors Sox-9 verfügen, jedoch demgegenüber eine erniedrigte Expression für Kollagen Typ 1 und den osteogenen Transkriptionsfaktor Runx-2. Aufgrund ihrer heterogenen Eigenschaften, ihres besonderen chondrogenen Potentials und der Fähigkeit zur Migration wurden diese Zellen als chondrogene Progenitorzellen (CPC) bezeichnet (Koelling et al. 2009).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Durch die Fortschritte in der medizinischen Grundlagenforschung konnten viele Erkenntnisse über den Pathomechanismus der OA gewonnen werden. Die Berücksichtigung individueller molekularbiologischer Konstellationen und genomischer Komponenten, die einen Einfluss auf die Ausprägung und Entwicklung der Krankheit besitzen, führte zu der Erkenntnis, dass in der Entwicklung von Therapieansätzen die Neubildung der EZM mit seinen physikalischen und mechanischen Eigenschaften durch geeignete Strategien verfolgt werden sollte. Ausgehend von diesem Standpunkt sollten zukünftige Bemühungen darin liegen, die Produktion von extrazellulären Molekülen wie Kollagen Typ 2 und Aggrecan durch eine gezielte Manipulation von Zellen zu forcieren. Dies würde zu einer Regeneration der Gelenkoberfläche beitragen und eine Basis für eine zellbiologische Therapie der OA im späten Stadium darstellen (Tesche und Miosge 2005). Vergleichende Studien konnten zeigen, dass Unterschiede in der Eignung verschiedener autologer Zelltypen für die Knorpelregeneration bestehen (Beane und Darling 2012). Die Entdeckung der CPCs bietet in diesem Zusammenhang einen potentiellen Therapieansatz, da sie in erkranktem Knorpelgewebe bereits als physiologische Antwort auf einen biologischen Stimulus vorhanden sind (Koelling und Miosge 2010).

Obwohl chondrogene Progenitorzellen in unterschiedlichen Studien in der Lage waren durch ihre Fähigkeit zur Migration zerstörtes Gewebe zu bevölkern, konnte eine relativ hohe Expression von Chemokinen und Zytokinen sowie eine exzessive Produktion von MMPs beobachtet werden. Chondrogene Signalwege, die verantwortlich für das regenerative Potential der CPCs sind, und die Analyse möglicher Interaktionspartner müssen vor einer möglichen klinischen Anwendung bei der Therapie der OA beleuchtet werden (Muhammad et al. 2013). Die physiologischen Funktionen der CPCs und ihr Einfluss auf den Heilungsprozess in beschädigtem Knorpelgewebe sind bisher nicht genau bekannt. Die Regulation von CPCs- und ihre Differenzierungsmechanismen konnten bisher nur durch in-vitro Experimente analysiert werden und sollten im Rahmen dieser Untersuchung das erste Mal durch ein ex-vivo Migrationsexperiment erforscht werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Regenerationspotentials von CPCs in beschädigtem Knorpelgewebe. Dabei sollten folgende Fragestellungen genauer beleuchtet werden:.

- 1) Wie wirkt sich der Einfluss des Transkriptionsfaktor Runx 2 auf die Expression von Kollagen Typ2 in CPCs aus?
- 2) Kann ein Verfahren zur simultanen Darstellung von GFP markierten CPCs und ihrer mRNA Expression gefunden werden?
- 3) Welches Expressionsmuster für die mRNA von Kollagen Typ 1 und Typ 2 ergeben sich nach der Migration der CPCs in defektes Knorpelgewebe durch in-situ-Hybridisierung?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen, wurden in Vorbereitung für den CPCs chondrogene Progenitorzellen aus Resektaten von Knie-Total-Endoprothesen bei Arthrosepatienten isoliert und in-vitro untersucht.

Da die genaue Herkunft der CPCs unzureichend bekannt ist, sollte eine Strukturanalyse der Zellen für den Rezeptor PDGF- β , welcher verantwortlich für Zellmigration und Proliferation gemacht wird, erfolgen. Diese Untersuchungen dienen der Erforschung von Einflussfaktoren auf das Verhalten der CPCs nach erfolgreicher Migration in beschädigtes Knorpelgewebe und ihrer möglichen klinischen Anwendung in der Therapie der OA.

2. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von chondrogenen Progenitorzellen für Kollagen Typ 1 und Typ 2 nach erfolgter Migration in OA-Knorpel Proben auf mRNA Ebene durch ISH untersucht. Der Nachweis für eine erfolgreiche Migration der chondrogenen Progenitorzellen in OA Gewebe erfolgte mithilfe einer immunhistochemischen Untersuchung des verwendeten Markerproteins GFP durch Lichtmikroskopie und wurde mit der strukturellen Darstellung der mRNA Expression dieser markierten Zellen unter Anwendung der konfokalen Lasermikroskopie kombiniert. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors Runx2 auf die Kollagen Typ 1 und Typ 2 Expression bei der OA des Kniegelenks wurde sowohl durch quantitative RNA Analysen, Proteinnachweis durch Westernblot als auch durch ultrastrukturelle, mikroskopische Verfahren beleuchtet. Die Darstellung des PDGF-Rezeptor- β als ein potentieller Faktor des Migrationsverhaltens der chondrogenen Progenitorzellen konnte durch immunhistochemische Strukturanalysen und unter Anwendung der 3-D-Rekonstruktion der Konfokalmikroskopie realisiert werden.

2.1 Zellkultur

In Vorbereitung der Versuche wurde eine Immortalisierung der für die Experimente verwendeten Zellen durch lentivirale Transfektion mit humaner Telomerase durch das Laborpersonal der Arbeitsgruppe „AG Orale Biologie und Geweberegeneration“ unter der Leitung von Prof. Dr. Miosge durchgeführt. Diese genetische Veränderung ermöglicht die Kultivierung der Zellen in hohen Passagen ohne das Zeichen von Seneszenz eintraten. Des weiteren wurden diese Zellen für das Migrationsexperiment mit GFP-transfiziert um eine örtliche und zeitliche Detektion und Unterscheidung der Zellen nach Migration von den ortsständigen Zellen innerhalb des Gewebes zu ermöglichen (CPC 531).

Die Transfektion der Zellen mit GFP sowie die Durchführung eines Genknockdowns für den Transkriptionsfaktor Runx2 der Zelllinie (CPC-KD) durch molekularbiologische Methoden wurde ebenfalls im Labor von Prof. Dr. Miosge realisiert. Durch diese Maßnahmen konnte zusätzlich der Einfluss dieses Transkriptionsfaktors hinsichtlich osteogener und chondrogener Differenzierung untersucht werden.

Die standardisierten Kulturbedingungen im Inkubator (#C200 von Labotect) betragen 37°C, die Luftsättigung mit CO₂ betrug 5% und die Luftfeuchte lag bei 100%. Während der Kultivierung der Zellen kam es zur Adhäsion an die Kunststoffoberfläche der Kulturschale. Die Zellen, alle 3 Tage mit frischem Medium versorgt, führten kontinuierlich Zellteilungen durch. Regelmäßig fand eine Kontrolle des Zellwachstums unter dem Mikroskop statt. Nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen, betrug die Konfluenz innerhalb des Zellkulturgefäßes 80% und machte eine Passagierung notwendig. Dazu wurde durch Waschen mit einer PBS-Lösung das Kulturmedium (ergänzt durch FCS und dem Antibiotikum Gentamycin) vollständig entfernt, da dies einen hemmenden Einfluss auf die Trypsin-EDTA-Lösung hat. Pro Flasche wurden dann 500 µl T/E pipettiert, die Einwirkzeit belief sich auf 3 bis 5 min und wurde im Inkubator durchgeführt, um eine hohe Effektivität der Trypsin-EDTA-Lösung zu erzielen. Die Auswirkung auf die Zellen konnte unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Anschliessend wurde der Vorgang durch erneute Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Sollte das Trypsin-EDTA-Gemisch zu lange Kontakt mit den Zellen haben, würden diese geschädigt werden. Das korrekte und vollständige Ablösen der Zellen konnte mithilfe des Mikroskops Zeiss (Axiovert 40 CFL) überprüft werden. Die Zellen wurden anschliessend in ein 15 ml Röhrchen überführt und mithilfe einer Zentrifuge an den Boden zentrifugiert, wo sie nach Abschütten des Mediumüberstandes als Zellpellet vorlagen. Die erneute Aussaat erfolgte nach einem Zählvorgang mit 20 µl der in einem Milliliter resuspendierten Zelllösung in neuen Kulturflaschen. So verteilt wurde darauf geachtet, dass die Zellen rechtzeitig bei Erreichen von ungefähr 85% Konfluenz erneut auf die gleiche Weise passagiert wurden.

2.2 Gewebepräparation

Humane Kniepräparate von Tibia und Femur wurden von acht Patienten mit späten Stadien der Osteoarthritis ohne Zeichen rheumatoider Veränderungen gewonnen. Die Patienten, welchen eine Knie-Total-Endo-Prothese eingesetzt wurde waren im Alter zwischen 59 bis 83. Das Knorpelgewebe wurde direkt nach operativer Entnahme in eine 1:1 PBS/DMEM - Lösung gegeben und anschliessend sofort weiterverarbeitet. Alle Patienten entsprachen den „ American College of Rheumatology“- Klassifikationskriterien für Knie-Osteoarthritis (Altman et al. 1986).

Sie gaben vor der Operation ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben und wurden über die Ziele dieser Studie aufgeklärt. Die Studie wurde durch die Ehtikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt (Ethikantrag Nr.: 25/12/10). Für die lichtmikroskopische Gewebepräparation (Koelling et al. 2006) wurden die Osteoarthrose-Knie zuerst makroskopisch in einen noch gesund aussehenden Bereich (= intaktes Areal) und in einen defekten-Bereich (=osteoarthrose-Defekt) eingeteilt. Daraufhin wurden mithilfe einer individuell gefertigten Henkellochstanze aus Stahl Proben in einem Durchmesser von 1 cm und einer Tiefe von 1,5 cm gewonnen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der kaudal liegende Knochen mittels eines Skalpell entfernt und vom Knorpelgewebe getrennt wurde. Diese Präparationsmethode galt auch für den gesunden Knorpel.

2.3 Ex-vivo-Migrationsexperiment

Die durch die Gewebepräparation gewonnenen Stanzproben wurden unter sterilen Bedingungen in eine 6-well Platte mit Zellkulturmedium (DMEM mit 10% FCS) und Gentamycin als Antibiotika überführt. Für das Migrationsexperiment kamen GFP-transfizierte chondrogene Progenitorzellen mit einem Genknockdown von Runx2 (CPC-KD) sowie eine weitere Zelllinie ohne diesen Knockdown (CPC 531) zum Einsatz.

Die Konfluenz der Zellen in den Kulturgefäßen wurde vor Entnahme unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei ausreichender Zelldichte (80% Konfluenz) wurde das Medium aus den Kulturgefäßen entfernt und mehrmals mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsinlösung und einer Inkubation bei 37°C im Brutschrank für maximal 5 min konnten die adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein 15ml Eppendorfcup mit Zellkulturmedium überführt werden. Die CPCs wurden bei 1200 UpM für 10 min abzentrifugiert und anschliessend mit 1 ml Kultivierungsmedium vermischt. Die Zellen wurden mithilfe eines Cellometers gezählt und anschliessend in einer Suspension von jeweils 4.000 GFP-markierten chondrogenen Progenitorzellen auf die Oberseite der Stanzproben mit einer Pipette appliziert. Der Stanzzylinder der Henkellochstanze besitzt an seinem oberen Teil ein konstruktionsbedingtes Reservoir, in welchem die Zellen durch die Aussenwände von einer freien Migration in das Kulturmedium abgehalten werden konnten.

Der gesamte Stanzzylinder mit den nunmehr hinzugefügten Zellen wurde mit Zellmedium überschichtet. Dies ermöglichte die optimale Platzierung und Nährstoffversorgung der Zellen während des Migrationsexperiments. Eine gerichtete Migration in Richtung superfiziale Knorpeloberfläche wurde so sichergestellt. Die erforderliche Migrationszeit der Zellen für das OA Knorpelstück wurde initial durch drei verschiedene Versuch (3-5 Tage) ermittelt und im Konfokalmikroskop kontrolliert. Die optimale Migrationszeit für die Zellen konnte nach regelmäßiger Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 5 Tagen angegeben werden. Die Stanzproben wurden nach dem Migrationsversuch sofort für mindestens sechs h bei 4°C in gepuffertem Formalin inkubiert. Dieser Versuch wurde jeweils dreimal durchgeführt (n=3). In den unterschiedlichen Migrationsversuchen wurden sowohl die Zelllinie (CPC 531) sowie (CPC-KD) eingesetzt. Bei der Verwendung von gesundem Knorpelgewebe im Migrationsexperiment fand keine erneute Migration der Zellen statt. Die restlichen Zellen konnten abzentrifugiert werden und als Zellpellet bei -80°C gelagert werden. Verwendung fanden die Zellen später bei der quantitativen real-time PCR Analyse und der Proteinanalyse mittels Western Blot.

2.3.1 Gewebefixierung

gepuffertes Formalin nach Lillie, pH 7,4:

100 ml 37% Formalin (Merck; # 3997)

333 ml 0,3 M Sörensen Puffer

566 ml aqua dest.

0,3 M Sörensen

Lösung A (Kaliumdihydrogenphosphat) :

0,3 M KH_2PO_4 (41,37 g) (# 3904-1, Roth, Karlsruhe, DE)

mit Aqua dest. auf 500 ml

Lösung B (Di - Natriumhydrogenphosphat) :

0,3 M Na_2HPO_4 (42,58 g) (# A3599,0500, AppliChem, Darmstadt, DE)

mit Aqua dest. auf 200 ml

für fertigen 0,3 M Sörensen Puffer 182 ml Lsg. A + 818 ml Lsg. B auf pH 7,4 einstellen

Nach dem Fixierungsschritt wurden die Stanzzyylinder für acht h in 70% EtOH bei 4°C entwässert. Anschliessend erfolgte die Überführung der Proben in den Einbettautomaten (Duplex Processor, Firma Shandon Elliott) gemäß Protokoll über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin. Die Ethanolverdünnungen wurden mit destilliertem Wasser hergestellt. Die Maschine benötigt für diesen Prozess ungefähr 24 h.

Tabelle 1: Aufsteigende Alkoholreihe im Einbettautomaten

Position	Medium	Inkubationszeit
1	70 % Ethanol	3 h
2	80 % Ethanol	1 h
3	90 % Ethanol	1 h
4	96 % Ethanol	1 h
5	100 % Ethanol	2 h
6	Isopropylalkohol	2 h
7	Isopropylalkohol	1,5 h
8	Xylol	0,5 h
9	Xylol	0,75 h
10	Xylol	0,75 h
11	Paraplast (52 °C)	6 h
12	Paraplast (56 °C)	4,5 h

100% Ethanol (# 603-002-00-5, Chemievertrieb Hannover, Hannover, DE),

Isopropylalkohol (# 67-63-0, Chemievertrieb Hannover, Hannover, DE)

Xylol (# CN80.2, Roth, Karlsruhe, DE)

Paraplast 52°C (# X882.1, Paraplast X-tra, Roth, Karlsruhe, DE)

Paraplast 56°C (# 6774060, ThermoScientific, Runcorn, UK)

Die Stanzproben wurden anschließend mithilfe eines Paraffinerhitzers weiterverarbeitet (# 43900, Medax, Rendsburg, DE). Die Proben wurden dafür in geeignetes Paraffin überführt (1/3 Paraplast 52°C, 2/3 Paraplast 56°C). Ihrer Präparatgröße entsprechend wurden sie für die weitere Verarbeitung in Kunststoffförmchen gegossen und dabei so positioniert, dass die spätere Schnittrichtung von superfizial nach basal durch das Knorpelgewebe verlief. Die Abkühlung der erwärmten Proben wurde mit einer Kälteplatte durchgeführt und ermöglichte eine gleichmäßige Erstarrung (PARA COOLER B, RWW Medizintechnik, Forchheim, DE).

2.3.2 Gewebeschnitte der Paraffinblöcke

Aus den so vorbereiteten Gewebeproben konnte nach einer Abkühlungsphase von 24 h bei Raumtemperatur mithilfe eines Mikrotoms (#Jung Biocut 2035) zahlreiche Schnitte angefertigt werden. Die Dicke pro Schnitt wurde zwischen 5-7 μm festgelegt und wurde so ausgewählt, dass stets nur eine Zellschicht angeschnitten wurde, damit sich nicht mehrere Zellen innerhalb des Präparats überlagern. Die Schnitte wurden für diesen Zweck in ein Wasserbad (# 1052, GFL, Burgwedel, DE) mit 40°C gegeben und anschließend auf SuperFrost® plus Objektträger (J1800AMNZ, Menzel, Braunschweig, DE) überführt. Einer Lagerung auf einem Heiztisch (# 14801, Medax, Rendsburg, DE) bei 37°C schloss sich eine Lagerung der Objektträger im Trockenschrank (# B5042, Heraeus, Hanau, DE) über Nacht bei 37°C an.

2.4 Herstellung von mRNA-Sonden

2.4.1 Umschreiben der mRNA in cDNA

Für die cDNA-Synthese wurde mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit-Mini (Qiagen # 74106), RNA aus humaner Trachea der Konzentration 180ng/ μl (Ambion) verwendet. Im ersten Teil der Reaktion wurde Ansatz 1 mit der RNA für 2 min bei 42°C in einem Thermoblock behandelt. Dies hatte zum Ziel, die DNasen des Wipeout Buffers zur Eliminierung der eventuell vorhanden genomischen DNA zu nutzen. Im Anschluss wurde Ansatz 2, welcher die Polymerase zur Herstellung der cDNA enthält, hinzu pipettiert und bei einem Endvolumen von 40 μl der gesamte Ansatz zunächst für 15 min bei 42°C behandelt. Es folgte anschließend eine nochmalige Temperaturbehandlung bei 95°C für 3 min, welche zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase diente.

Tabelle 2: Reaktionsansatz PCR

Ansatz 1	
RNA (Trachea ; 180ng/μl - Ambion)	2,2 μl
7x gDNA-Puffer	4,0 μl
DEPEC-Wasser	21,8 μl
Totalvolumen	28,0 μl

Ansatz 2	
RT - Polymerase 5x	8,0 μl
RT - Transkriptase	2,0 μl
Primer	2,0 μl
Totalvolumen	12,0 μl

2.4.2 PCR

Die Primer für die PCR wurden lyophilisiert geliefert (Operon Biotechnologie GmbH, Köln, Deutschland) und mit Nuklease-freiem H₂O resuspendiert. Auch hier wurde mittels Gradienten-PCR die Annealing Temperatur ermittelt.

Tabelle 3: Primersequenzen für PCR

Zielgen	forward (5' > 3')	reverse (3' > 5')	Tm (°C)	Basen paare
Kollagen 1 alpha 1	AGCCACAAAGAGTCTACA TG	CTCGACTTGGCCTTCCTC TT	57	100
Kollagen 1 alpha 2	TCCTGGTACAGTTGGACC TG	AAGTCATAACCACCACCG CT	57	100
Kollagen 2 alpha 1	GAGTCAAGGGTGATCGT	CACTTGGTCTCCAGAAGG A	59	280

Für den PCR-Ansatz wurde synthetisierte cDNA aus humaner Trachea verwendet (Ambion). Die PCR wurde mithilfe der Taq-DNA Polymerase aus jeweils zwei kombinierten Mastermix Ansätzen durchgeführt. Das Programm für den 100 µl Ansatz ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Ein Teil des PCR-Produkt (20 µl) wurde anschliessend in einem Agarose-Gel überprüft.

Tabelle 4: Reaktionsansatz PCR

Mastermix pro Well	
DEPEC-Wasser	34 µl
10x PCR Puffer	5 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Primer „forward“ 100 pmol/µl	1 µl
Primer „backward“ 100 pmol/µl	1 µl
Taq DNA Polymerase 1U/µl	3 µl
DNA	1 µl
Totalvolumen	50 µl

Tabelle 5: PCR-Protokoll

	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	2 min	94°C
Zyklus		
Denaturierung	1 min	94°C
Annealing	2 min	55°C
Extension	2 min	72°C
finale Extension	5 min	75°C
Anzahl der Zyklen	30x	

2.4.3 Agarose-Gel (1,5%):

Zur Herstellung des Agarose-Gel wurden 0,75 g Agarose mit 50 ml 1x TAE versetzt und gleichmäßig bei 400 W in der Mikrowelle erhitzt. Beim Aufkochen des Gemisch löste sich die Agarose und bildete mit dem TAE eine schlierenfreie Lösung. Anschliessend wurde die Lösung mit 4 µl Roti-Safe Gel-Stain (Roth # 3865.1) versetzen. Das Detergenz bindet an Nukeinsäuren der doppelsträngigen DNA, welche durch die PCR produziert wurde und emittiert somit eine grüne Fluoreszenzfarbe, dadurch wird eine Detektion im Agarose-Gel möglich gemacht.

50x TAE-Puffer

Trishydroxyaminomethan/ Tris-Base 242,0 g 121,14 g/mol

Eisessig 57,1ml

EDTA 18,61 g + 100 ml aq.dest. auf 1000 ml auffüllen

1x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer 10 ml

aqua.dest. 490 ml

Das noch flüssige Agarose-Gel wurde bei ca. 60°C in einen Gelschlitten gegossen, für die Ausformung der Geltaschen wurde ein Plastikamm in das Gel gehängt. Nach 40 min war das Gel ausgehärtet und die PCR-Produkte konnten jeweils in eine Tasche pipettiert werden. Die Verdünnung betrug jeweils (10 µl PCR-Produkt + 10 µl 6X Ladepuffer). Als Kontrolle wurden 15 µl DNA-Leiter (Fermentas # SM0241) in das Gel pipettiert. Die PCR-Produkte und die DNA-Leiter wurden bei 80 V für ca. 40 min elektrophoretisch in 1x TAE Puffer aufgetrennt.

Nachdem eine deutliche Bande des gewünschten PCR-Produkts im Gel sichtbar war, wurde das restliche PCR-Produkt mit Wizard SV-Gel & PCR Clean-up (Promega # A 9281) aufgereinigt.

Bei der Aufreinigung wurde ein gleiches Volumen an Membran-Binding-Solution zum PCR-Produkt hinzugefügt und in eine Säule überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Lösung bei 16.000 Upm für 1 min abzentrifugiert. Anschliessend erfolgte ein Reinigungsvorgang bei dem 700 µl Membran Wash Solution, welche mit Ethanol versetzt wurde, auf die Säule gegeben und anschliessend bei 16.000 Upm für 1 min zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde mit 500 µl der Waschlösung wiederholt.

Die weiteren Schritte sahen vor die Säule mit offenem Deckel für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zu zentrifugieren um das restliche Ethanol zu entfernen. Dann wurde die Säule in ein neues Eppendorfcup überführt und 50 µl Nuklease freies Wasser auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min wurde bei 16.000 Upm zentrifugiert, der Durchfluss enthielt das nun aufgereinigte PCR-Produkt. Dies wurde in einem weiteren Agarose-Gel überprüft. Wenn die Banden auch nach dem Reinigen gut sichtbar waren, konnte es zum Sondenbau weiterverwendet werden. Zur Kontrolle der Produktion der erwünschten Gensequenz bei der PCR produziert, erfolgte eine Sequenzierung der Produkte bei der in Göttingen ansässigen Firma (Seqlab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH).

2.5 Klonierung PCR-Produkte in Vektor pGEM-T easy

Allgemeines zur Methode

Außer dem bakteriellen Genom existieren in Bakterien noch zahlreiche für die Klonierung verwendbare zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle. Plasmide haben die besondere Eigenschaft sich unabhängig vom Genom zu vermehren. Diese Eigenschaft wird genutzt, um bakterienfremde DNA-Fragmente in Form der beschriebenen PCR-Produkte gezielt in die kompetenten E.coli-Bakterien, NEB 5-alpha (BioLabs # C2987H) einzuschleusen und zu vermehren werden.

2.5.1 Ligation

Zunächst wurde das Plasmid durch den Einsatz von Restriktionsenzymen unter Verwendung des folgenden Ligationsprotokolls in ein lineares DNA-Molekül überführt.

Tabelle 6: Ligationsprotokoll

	PCR-Produkt
2x Rapid Ligations Puffer	5 μ l
pGEM-T (50ng)	1 μ l
PCR-Produkt	3 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
DEPEC-Wasser	0 μ l
Totalvolumen	10 μ l

Restriktionsenzyme werden in der Molekularbiologie aufgrund ihrer Eigenschaft DNA erkennen und schneiden zu können verwendet. Sie spielen in Bakterien eine wichtige Rolle bei der Phagenabwehr. Fremde DNA kann durch die Enzyme aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster oder einer sonst nicht vorkommenden DNA-Sequenz identifiziert und anschliessend hydrolisiert werden.

Bei der Klonierung erfolgen durch die Restriktionsenzyme gezielte Doppelstrangbrüche in der DNA. Die Enden des linearisierten Plasmids finden aufgrund ihrer Kompatibilität oft wieder zueinander, so dass der Einsatz eines weiteren Enzyms nötig wird. Eine alkalische Phosphatase spaltet das 5`-Phosphat des DNA-Fragments enzymatisch ab, womit eine Religation enorm erschwert wird. Um das PCR-Produkt mit dem Plasmid zu verschmelzen, wird dieses mit dem gleichen Restriktionsenzym behandelt, damit die Enden komplementär sind. Die Ausbildung der Phosphodiesterbindung wird durch das Enzym T4 DNA Ligase katalysiert. Falls nötig kann eine Hitzedeaktivierung der Ligase angewendet werden, um die weitere Klonierung nicht zu behindern.

2.5.2 Transformation

Zur Vermehrung der Zielsequenz von Interesse wurde das linearisierte Fragment nun in einem Vektor transformiert. Der Vektor ist ein ringförmiges DNA Molekül mit einem Replikationsursprung, der Ort wo die Replikation der DNA beginnt. Für die Replikation besitzt der Vektor pGEM-T easy zwei Promoterregionen (SP6/T7), welche jeweils spezielle Restriktionsschnittstellen für den Einbau fremder DNA-Abschnitte und dem späteren enzymatischen Verdau aufweisen. Zusätzlich besitzt der hier eingesetzte Vektor pGEM-T easy einige Gene die Antibiotikaresistenz vermitteln. In diesem Beispiel für das Antibiotikum Ampicillin. Dies ermöglicht es nur diejenigen Bakterien auszuwählen, die ein Plasmid tragen, welche unter der Anwesenheit von Ampicillin wachsen. Die Ursprungs-DNA welche in dem Vektor vermehrt werden soll, wird mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt wie das Plasmid. Dadurch entstehen identische Einzelstrangüberhänge, die eine Verschmelzung der beiden ermöglicht.

Die Enden des Insertfragment und des aufgetrennten Vektors können durch Basenpaarung zusammenfinden und werden mithilfe eines Ligase-Enzyms kovalent miteinander verknüpft. Das auf diese Weise synthetisierte ringförmige DNA-Molekül wird in ein Bakterium eingeschleust und auf einer mit Ampicillin versetzten Agarplatte kultiviert. Durch die selektive Vermehrung der E.coli Bakterien kann das Plasmid vermehrt und später durch molekularbiologische Techniken isoliert und weiterverarbeitet werden.

Die NEB 5-alpha kompetente E.coli Bakterien wurden auf Eis für 10 min aufgetaut. Zu den Bakterien wurden im Anschluss 1-5 µl Plasmid-DNA (100 ng) hinzupippettiert. Das Gemisch wurde vorsichtig angetippt um eine gleichmäßige Verteilung zu erzielen. Im Anschluss wurde der Mix für 30 min auf Eis gelagert. Danach wurde eine Hitzeschockbehandlung für 30 sek bei 42°C durchgeführt um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien zu begünstigen. Der Mix kam für 5 min auf Eis und anschliessend wurde 950 µl SOC-Medium, welches Raumtemperatur haben muss, hinzugefügt. SOC ist ein Komplexmedium mit folgenden Inhaltsstoffen.

SOC-Medium:

Glucose 20 mM

Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l)

Trypton 2 % (w/v) (20 g/l)

Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l)

Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l)

Magnesiumchlorid 10 mM

Magnesiumsulfat 10 mM

Das Medium wird ohne Mg^{2+} hergestellt und 20 min bei $121^{\circ}C$ autoklaviert. Vor Gebrauch wird dem Nährmedium 20 mM (10 ml/l) einer 2 M Mg^{2+} -Lösung zugegeben, welche aus 1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ und 1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ hergestellt wurde. Der pH-Wert beträgt 6,8 bis 7. Das gesamte Gemisch wurde für 60 min bei $37^{\circ}C$ in einen Schüttler bei 350 U/min überführt. Von diesem Transformationsansatz wurden 100 μ l mithilfe eines Drigalski-Spatel auf mit Agar benetzten Petrischalen gleichmäßig ausplattiert, eine Inkubation erfolgte über Nacht für ca. 16 h bei $37^{\circ}C$. Die Bakterienkolonien waren als weiße Punkte nach der Inkubation auf der Petrischale sichtbar und konnten mit einem Holz-Zahnstocher aufgenommen und in LB-Medium überführt werden. Das Animpfen der Klone in einem Schüttler erfolgte für 18 h bei $37^{\circ}C$ und einer Frequenz von 200 rpm.

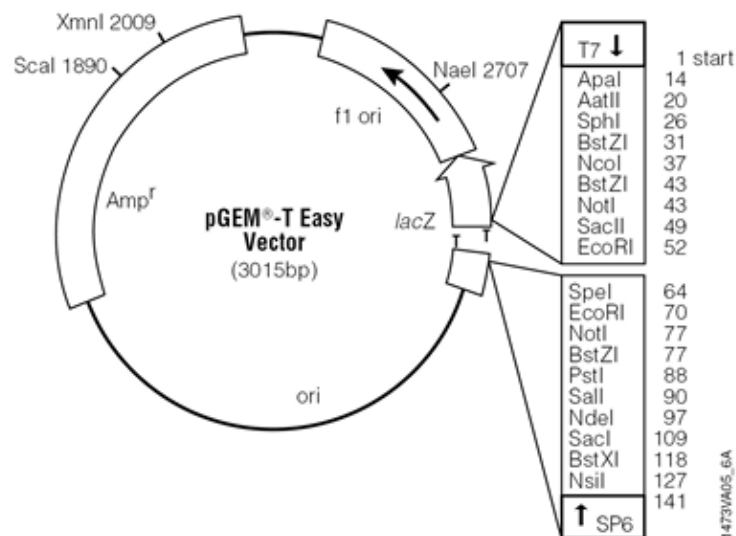


Abb. 1: Vektor pGem-T Easy mit den Restriktionsschnittstellen (NcoI/SpeI/SacII), Promega

2.5.3 Aufreinigung der Plasmid DNA

Bei der Vermehrung der E.coli Bakterien entstehen Klone des Genfragments von Interesse, die in kleinen Mengen in einer passenden Nährlösung amplifiziert werden. Nach einer Aufreinigung wurde kontrolliert, ob die Transformation in den ausgewählten Klonen erfolgreich war. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Pure Yield Plasmid Miniprep System (Promega #A1223). Von der Bakterienkultur wurden 1,5 ml für 30 sek bei Maximalgeschwindigkeit in einem Eppendorfcup zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wiederholte man den Vorgang ein zweites Mal. Das Bakterienpellet wurde mit 600 µl TE-Puffer vollständig resuspendiert und mit 100 µl Cell Lysis Puffer versetzt, danach wurde das Reaktionsgefäß mehrmals auf den Kopf gestellt. Anschliessend wurden 350 µl kalte Neutralisationslösung hinzugefügt und das Eppendorfcup nochmals auf den Kopf gestellt. Bei Maximalgeschwindigkeit wurden die Proben für 3 min zentrifugiert und der Überstand von 900 µl auf eine Säule zur weiteren Reinigung übertragen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 200 µl Endotoxin Removal Wash für 15 sek bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Im folgenden wurde 400 µl Collum Wash Solution zu der Säule hinzugefügt und wiederholt für 30 sek zentrifugiert.

Die Säule wurde in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfcup überführt und mit 30 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde für 15 sek die Plasmid-DNA durch Zentrifugation eluiert. Abschliessend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der Proben.

2.5.4 Enzymatischer Verdau der Plasmid DNA

Das Genfragment (Insert) kann durch die Anwendung eines enzymatischen Verdau mit Restriktionsenzymen aus dem Vektor befreit werden. Der Vektor pGem-T easy besitzt verschiedene Schnittstellen, die Angriffsstellen für Restriktionsenzyme darstellen. Die Methode des enzymatischen Verdau kann auf zwei verschiedene Arten geschehen. Für die Gensequenzen von Kollagen 1 wurde ein schneller Verdau (Fast Digest) gewählt. Bei einem schnellen Verdau kommen die Enzyme SpeI (Thermo Scientific # FD1254) und NcoI (Thermo Scientific # FD0574) zum Einsatz, welche ohne die Gensequenz des Inserts zu manipulieren, die Ringstruktur des Plasmids aufheben. Die Reaktion wird beim Fast Digest bei 37°C für 10 min durchgeführt. Beim Fast Digest kommt der Fast Digest Green Puffer zum Einsatz. Durch den schnellen Verdau ist es möglich jegliche Kombination von Restriktionsenzymen gleichzeitig in einem Reaktionsgefäß ablaufen zu lassen. Ein weiterer Vorteil der Fast Digest Methode liegt in dem Gebrauch des Fast Digest Green Puffer, mit welchem der Reaktionsmix direkt in einem Gel kontrolliert werden kann. Anders als bei konventionellen Restriktionsenzymen besteht beim Fast Digest System keine „Star-Aktivität“. Die Star-Aktivität beschreibt in der Molekularbiologie die Fähigkeit eines Restriktionsenzym, unter speziellen Bedingungen an anderen als den Standarderkennungssequenzen an die DNA zu binden und sie dort zu spalten. Da dies eine nicht erwünschte Reaktion darstellt und eine Star-Aktivität somit die Selektivität eines DNA-Verdau durch das Restriktionsenzym senkt, stellt die Verwendung des Fast Digest Enzym ein geeignetes biotechnologisches Verfahren dar. Das Insert für Kollagen Typ 2 ist durch einen konventionellen Verdau befreit wurden. Es wurden die Enzyme (SacII) (Thermo Scientific # ER0201) und (SpeI) verwendet. Beim konventionellen Verdau wurde (SacII) für 1 h bei 37°C zusammen mit 10x PufferB verwendet. Zur Kontrolle des Reaktionsmix in einem Elektrophoresegel muss zusätzlich ein 6x Ladepuffer eingesetzt werden. Die Kontrolle durch die Gelelektrophorese erfolgte wie unter Kapitel 2.4.3 beschrieben. Zusätzlich wurde durch eine Sequenzierung durch die Firma SeqLab aus Göttingen überprüft, ob es sich bei dem Produkt um das gewünschte Insert handelt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz Enzymatischer Verdau

10x Fast Digest Green Puffer	2,0 µl
Enzym 1 (Spe1)	0,5 µl
Enzym 2 (NcoI,SacII)	0,5 µl
DNA (1 µg)	x µl
DEPEC-Wasser	0 µl
Totalvolumen	10 µl

2.5.5 Animpfen großer Mengen Plasmid-DNA

Nachdem durch einen kleinen Ansatz die Wirksamkeit der Transformation für das gewünschte Genfragment durch Sequenzierung bestätigt wurde, konnten große Mengen Plasmid-DNA mit dem dazugehörigen Vektor hergestellt werden. Dazu benutzte man den Bakterienüberstand einer erfolgreichen Transformation. Für das Animpfen wurde ein Schikanekolben verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus 200 ml LB-Medium versetzt mit 200 µl Ampicillin und 20 µl der positiven Probe. Der Reaktionsansatz wurde für 16 h bei 37°C und 200 rpm in einem Rüttler bearbeitet. Durch die Rüttelbewegungen und der Form des Schikanekolbens entstand ein sehr günstiges Milieu für die Bakterienkultur. Nach der Inkubationszeit wurde mit einem Teil des Reaktionsansatz ein Glycerinansatz zum Lagern der Kulturproben angefertigt. Dazu verwendete man 500 µl Glycerin und 500 µl Plasmid-DNA angesetzt in einem Verhältnis von 1:1. Die Lagerung der Glycerinkultur erfolgte bei - 80°C. Die restliche Menge der Plasmid-DNA wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12362) aufgereinigt.

2.5.6 Aufreinigung großer Mengen der Plasmid DNA

Die Bakterienzellen aus dem Schikanekolben wurden durch Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei einer Umdrehungszahl von 6000 x g geerntet. Bei großen Mengen kam eine große Zentrifuge mit dem SLA 1500 Rotor zum Einsatz. Das Zellpellet wurde im Anschluss mit 10 ml P1 Puffer (LyseBlue) resuspendiert. Für eine längere Stabilität ist darauf zu achten, dass dem Puffer P1 RNase A zugesetzt wird. Das Reaktionsgefäß sollte solange abwechselnd auf den Kopf gestellt werden bis alle Partikel des P1 Puffer vollständig resuspendiert sind.

Anschliessend wurden 10 ml Puffer P2 hinzugefügt und das verschlossene Reaktionsgefäß sorgfältig und energisch mehrmals auf den Kopf gestellt, um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen zu erzielen. Der Reaktionsansatz konnte dann bei 15-25°C für 5 min inkubieren. Es sollte bei diesem Schritt auf keinen Fall gevortext werden, weil dies eventuell in einer zu starken Scherung der genomischen DNA resultieren würde. Das Lysat sollte viskös bleiben und nicht länger als 5 min reagieren dürfen.

Nach diesem Schritt wurde 10 ml gekühlter Puffer P3 zu dem Lysat hinzugefügt und sofort durch mehrmaliges umschwenken des Reaktionsgefäßes gemischt. Eine Lagerung auf Eis sollte vermieden werden. Das so erzeugte Lysat enthält genomische DNA, Proteine und Zelldebris und wurde zeitnah in die QIA-Filter-Kartusche überführt. Nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 10 min kann das Zellysat vorsichtig in eine 50 ml Kanüle filtriert werden. Durchschnittlich werden etwa 25 ml des Lysats bei diesem Vorgang für eine Weiterbehandlung gewonnen. Eine Homogenisierung des filtriertem Lysats wurde durch die Verwendung von 2,5 ml ER Puffer durch mehrmaliges Mischen erreicht. Danach wurde der gesamte Reaktionsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Für das weitere Prozedere der Aufreinigung wurde ein QIAGEN-tip 500 verwendet. In diesem Arbeitsschritt fand die Applikation von 10 ml QBT Puffer statt. Die Lösung passierte durch die Schwerkraft das filtrierte Lysat, dies führte zu einer weiteren Aufreinigung des Lysats. Der QIAGEN-tip wurde anschliessend zweimal mit 30 ml QC Puffer gewaschen.

Der erste Waschschrift ist ausreichend für eine suffiziente Entfernung aller Kontaminationen in der Mehrzahl der Plasmid Präparationen. Der zweite

Waschschrift ist vereinzelt notwendig, wenn eine große Menge an Kulturflüssigkeit verwendet wird, da diese besonders kohlenhydratreich ist. Die Plasmid-DNA wird mit 15 ml QN Puffer eluiert und durch den Zusatz von 10,5 ml Isopropanol gefällt. Das Reaktionsprodukt wurde gemischt und anschliessend bei 15.000x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Da die DNA in einem anderen Reaktionsgefäß als zuvor zentrifugiert wurde, wechselte man den Rotor zugunsten eines HB6 Rotor. Der Überstand der Zentrifugation wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet mit 5 ml Endotoxin freiem Wasser welchem 70% Ethanol zugesetzt war gewaschen. Das Ethanol dient der Entfernung des ausgefallenen Salz und ersetzt Isopropanol mit dem flüchtigerem Ethanol um die DNA leichter wieder aufzulösen. Im weiteren Verlauf erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 15.000x g, der sich eine weitere Dekantierung angeschlossen hatte. Danach wurde das Zellpellet für 10 min an der Luft getrocknet. DNA wurde in einer passenden Menge mit Endotoxin freiem Wasser aufgelöst. Ein kurze Lufttrocknung und gewissenhafte Benetzung der Reaktionswände steigerte die Menge gelöster DNA. Abschliessend erfolgt eine genaue Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA.

2.5.7 In-Vitro-Transkription

Allgemeines zur Methode

Die In-vitro-Transkription wird in der Molekularbiologie angewendet, um aus einer vorhandenen DNA-Sequenz RNA zu synthetisieren. Es ist der erste Schritt zur In-vitro-Translation und dient zur Herstellung der für die ISH nötigen Sense bzw. Antisense-Sonde. Jede DNA, welche eine RNA-Polymerase Bindungsstelle besitzt, kann somit transkribiert werden. Der zur Transkription verwendete Vektor pGEM-T easy besitzt eine Sp6 bzw. eine T7 Polymerase Bindungsstelle, welche den Transkriptionsstart bestimmen. Bei der Technik der nicht radioaktiven ISH verwendet man Digoxigenin was die Markierung der RNA-Sonden ermöglicht.

Digoxigenin ist ein Steroid aus den Blättern des roten Fingerhut. Es ist das Aglykon des Herzglykosids Digoxin. Bei RNA-Sonden wird DIG üblicherweise an Uridintriphosphat (UTP) gekoppelt. Es ist auch möglich eine Hybridisierung mit DNA-Sonden durchzuführen. Bei DNA-Sonden bindet Digoxigenin an Desoxy-

uridintriphosphat (dUTP). Über eine Immunreaktion wird bei der späteren Detektion der Sonden ein Anti-Digoxigenin-Antikörper eingesetzt, welcher mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Bei der In-vitro-Transkription wird ein Reaktionsansatz vorbereitet der mindestens 1 µg der linearisierten DNA enthält. Da zwei verschiedenen Restriktionsenzyme benutzt wurden um das Insert aus dem Vektor zu befreien sind pro Sonde zwei Proben transkribiert wurden. Eine der beiden Proben kann sich bei der Hybridisierungsreaktion dem genauen Hybrid der gesuchten mRNA anlagern und wird als Antisense-Sonde bezeichnet. Die Sense-Sonde die der gesuchten mRNA ähnelt, dient als Kontrolle.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für In-vitro-Transkription

DNA linearisiert NcoI (1µg) x µl	DNA linearisiert Sac2 x µl
10x dNTP-DIG (1mM E.K.) 2µl	10x dNTP-DIG (1mM E.K.) 2µl
5x Transkriptionspuffer 4µl	5x Transkriptionspuffer 4µl
DEPEC-H2o x µl	DEPEC-H2o x µl
RNA-Polymerase-Spe6 2µl	RNA-Polymerase-T7 2µl
RNA`sin (Ribolock) 1µl	RNA`sin (Ribulock) 1µl
Totalvolumen 21µl	21µl

5x Transkriptionspuffer (Fermentas, # 00110695)

T7- Polymerase (Thermo Scientific, # EP0111)

SP6 RNA-Polymerase (Thermo Scientific, # EP0131)

10x dNTP DIG RNA Labeling Mix (Roche, # 11277073910)

RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, # E00381)

DNase (Qiagen, # 79254)

DEPC-Wasser:

5ml DEPC (= Diethylpyrocarbonat; kanzerogen)

1l aqua.dest.

über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, autoklaviert

Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und anschliessend für 2 h bei 37°C in einem Thermoblock inkubiert. Die Desoxyribonuclease I (DNase) ist ein einzelglykolisiertes Polypeptid, mit der Eigenschaft besitzt nicht erwünschte einzel- und doppelsträngige DNA zu degradieren. Beim Einsatz der DNase wurde eine Inaktivierung durch 10 min Hitzebehandlung bei 70°C notwendig. Die Polymerasen erkennen die Polymerase Bindungsstellen aus dem Vektor pGEM-T easy und stellen die Sense bzw. Antisense-Sonde durch Reverse Transkription her. Gleichzeitig wird bei der Reaktion im Standardverfahren ca. 10 µg Digoxigenin markierte RNA synthetisiert wobei DIG-11-UTP an jedem 20. bis 25. Nukleotid durch die SP6 bzw. T7 RNA-Polymerase integriert wird.

2.5.8 Fällern der RNA

Um die entstandene RNA auszufällen, wurde den Proben eine 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl abs.Ethanol hinzugefügt und über Nacht für ca. 16 h bei -20°C aufbewahrt.

In dieser Zeit fällt die RNA aus und kann durch eine folgende Zentrifugation von den übrigen Lösungsbestandteilen getrennt werden. Die Zentrifugation fand für 30 min bei 13.000 g und einer Temperatur von 4°C statt. Der Überstand wurde aus dem Eppendorfcup abgenommen und das zurückbleibende Pellet mit 50 µl 70% Ethanol p.a. welches bei -20°C gelagert wurde resuspendiert.

Das neue Gemisch wurde anschliessend für 5 min bei 4°C mit 13.000 g zentrifugiert.

Wiederum wurde der Überstand abgenommen und das Pellet durch Vakuumzentrifugation getrocknet. Die Vakuumbehandlung erfolgte mit geöffnetem Eppendorfcup für 10 min um den Restalkohol vollständig verdunsten zu lassen. Das getrocknete Pellet wurde im Anschluss mit 75 µl DEPC-Wasser aufgenommen und die so entstandene Sonden konnte bei -80°C eingefroren und gelagert werden.

2.5.9 Dot Blot

Die Effizienzprüfung der Sondenmarkierung durch die DIG-Markierungsreaktion erfolgte mithilfe einer punktförmigen Farbreaktion durch Immunmarkierung. Der Dot Blot gibt dabei eine Auskunft über die Konzentration der Sonden und ermöglicht den effizienten Einsatz der RNA-Sonden bei der späteren ISH. Es wurde eine Nylon Membran (Roche,#11 209 299 001) in ein 5x8 cm grosses Stück zugeschnitten. Mit einem Bleistift wurden jeweils 6 Quadrate für die RNA-Proben und eine Kontroll-RNA (Roche, # 11585746910) eingeteilt. Zunächst wurde eine unverdünnte Probe und anschliessend die Verdünnungsreihe auf die Membran zu je 1 µl aufgetragen. Die Tropfen liess man bei Raumtemperatur eintrocknen. Kontroll-RNA bekannter Konzentration wurde in gleicher Weise bearbeitet um einen direkten Vergleich zu erhalten.

Tabelle 9: Verdünnungsreihe Dot-Blot

	Verdünnungsreihe /Kontroll-RNA	
1 µl Sonde		1 µl K-RNA
1 µl Sonde + 9 µl DEPC-Wasser 1:10	=	1 µl K-RNA + 9 µl DEPC-Wasser = 1:10
1 µl Sonde (1:10) + 9 µl DEPC-Wasser 1:100	=	1 µl K-RNA(1:10) + 9 µl DEPC-Wasser = 1:100
1 µl Sonde(1:100) + 9 µl DEPC-Wasser 1:1000	=	1 µl K-RNA(1:100) + 9 µl DEPC-Wasser = 1:1000
1 µl Sonde(1:1000) + 9 µl DEPC-Wasser 1:10000	=	1 µl K-RNA(1:1000) + 9 µl DEPC-Wasser = 1:10000

Die Membran wurde auf einem passendem Stück Aluminiumfolie zum Trocknen in einen Ofen für 30 min bei 80°C gesetzt. Nach dem Trockenvorgang legte man die Membran in eine passende Petrischale für die weiteren Reaktionen. Es musste sichergestellt werden, dass während des folgenden Detektionsverfahrens die Nylonmembran ständig mit Flüssigkeit umspült wurde, um ein Austrocknen zu verhindern. Alle folgenden Reaktionsschritte fanden bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler statt. Die Membran wurde kurz in 5 ml Puffer I gespült.

Danach wurden 5 ml Puffer II, welcher Milchpulver zum Blocken unspezifischer Bindungen enthält, auf die Membran gegeben und diese für 30 min inkubiert. Ein Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper wurde im Verhältnis 1:5000 mit Puffer II gemischt und 5 ml dieser Lösung mit der Membran für 30 min inkubiert. Danach wurde 2x mit Puffer I für 15 min gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit Puffer III für 5 min inkubiert und in dieser Zeit das Färbereagenz vorbereitet. Hierzu wurden in 5 ml Puffer III 17,5 µl BCIP (50mg/ml) und 17,0 µl NBT (100mg/ml) Färbereagenz gelöst. Diese Lösung wurde auf die Membran gegeben und für maximal 1 h inkubiert. Danach wurde die Färbung mit sterilem Aqua dest. gestoppt. Nun wurden durch die Farbintensität die hergestellten Kollagen-Sonden mit der Kontroll-RNA verglichen. So konnte die Konzentration der Sonden semi-quantitativ bestimmt werden.

Puffer 1 (pH 7,4) :

12 g Trishydroxyaminomethan / Tris-Base (Merck,# 1.08219)
8,8 g NaCl
1000 ml aqua dest. pH einstellen / autoklavieren 30min bei 3bar

Puffer 2:

In 10 ml Puffer I werden ca.500 mg Milchpulver gegeben um eine gesättigte Lösung herzustellen

Puffer 3 (pH 9,5):

6,0 g Trishydroxyaminomethan / Tris-Base (Merck,# 1.08219)
2,9 g NaCl
2,4 g MgCl₂ 6H₂O
in 500 ml aqua dest. pH 9,5 einstellen / Lösung nicht autoklaviert (MgCl₂ kann ausgefällt werden)

Anti-DIG- alk.Phosphatase

1 µl von der Anti-DIG-AP in 4999 µl Puffer II mischen

NBT/BCIP-Färbelösung:

17 µl NBT
17,5 µl BCIP in 5ml Puffer 3

2.6 In-Situ-Hybridisierung

Allgemeines zur Methode

Der Sondenbau diente der Herstellung spezifischer Nukleotidsequenzen bei der die hergestellten Antisense-Sonden den exakten komplementären Gegenstücken (Hybriden) für Kollagen 1 alpha1/alpha 2 bzw. Kollagen 2 mRNA entsprechen. Die Sense-Sonde hingegen ist zu dem mRNA-Strang identisch, kann somit nicht an diesen binden und wird als Kontrolle genutzt. Innerhalb dieses Arbeitsschritts müssen die Schnitte erst mit der Sonde inkubiert werden, wobei sowohl die richtige Temperatur (37-55°C), Zeit (1-16h) und die Sondenkonzentration für die Hybridisierung gefunden werden muss. Je höher die Temperatur desto spezifischer wäre die Reaktion, da die Basen bei hoher Temperatur beweglicher sind und sich somit schneller wieder lösen. Nach der Hybridisierung folgt ein Waschschrift mit unterschiedlichem saline-sodium-citrat (SSC), welches auch individuell eingestellt werden muss. Das SSC dient zur Abwaschung der überschüssigen, nicht gut passenden Basenpaarungen d.h. je mehr gewaschen wird und je höherer die Temperatur dabei ist, desto spezifischer die Reaktion. Auch die Konzentration des SSC ist hierbei von Bedeutung, je niedriger die Konzentration des SSC desto stärker wird gewaschen und desto höher ist am Ende die Spezifität der Reaktion. Prinzipiell sollte man mit niedrigen Hybridisierungstemperaturen, und hohen SSC-Konzentrationen beginnen, um zu sehen, wie gut und ob die Sonde bindet.

Auch bei der ISH sind wie bei der IHC verschiedene Vorverdaue möglich, falls die Anitsense-Sonde keine oder nur sehr schwache Reaktionen zeigt. Das Digoxigenin der Sonden wird mithilfe eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers nachgewiesen.

Hierdurch kann die Sonde später durch einen Antikörper (Anti-DIG; Alkalische-Phosphatase-gekoppelt) markiert und die Alkalische Phosphatase mittels NBT/BCIP-Färbelösung angefärbt werden. Beim Sondenbau ist die Färbung zum Abschluss für die Ermittlung der Konzentration der Sonden, bzw. der Effizienz der Sondenmarkierung wichtig

2.6.1 Vorbehandlung der Objektträger

Die Gewebepräparation ist identisch mit dem Verfahren für die lichtmikroskopischen Immunhistochemie auf Protein-Ebene. Die Paraffin-Schnitte wurden mithilfe eines Mikrotoms (Jung Biocut 2035-Leica), für die gesunden (n=1) und auch Osteoarthritis- (intaktes Areal und Defekt) Knorpelpräparat (n=3) angefertigt. Die Schnitte wurden für die ISH auf Poly-D-Lysin beschichtete Superfrost Objektträger überführt. Die Beschichtung der Objektträger dient der Verbesserung der Adhäsion von Gewebeschnitten und Zellen. Für die Herstellung der Objektträger der ISH wurde darauf geachtet immer RNase-frei zu arbeiten. Die Objektträger wurden für 4 h in 25% Salzsäure eingelegt und anschliessend im RNase-freiem Wasser zweimal gespült. Danach trocknet man die Objektträger bei 180°C in einem Ofen.

Nachdem die Objektträger auf Raumtemperatur abgekühlt sind, erfolgte eine Behandlung mit 0,25 M Ammoniumacetat für 30 sek. Anschliessend wurde für 2 h eine Trockenbehandlung bei 60°C durchgeführt. Die Poly-D-Lysin Stammlösung wurde auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml gebracht. Eine Beschichtung der Objektträger erfolgte für 30 min in einer Trogkuvette mit dem Lösungsreagenz. Nach der Beschichtung wurden die Objektträger für mindestens 16 h bei 42°C getrocknet. Die so hergestellten Objektträger sind bei 4°C für 4 Wochen haltbar.

2.6.2 Durchführung der In-situ-Hybridisierung

Um die Gewebeschnitte zu Entparaffinieren wird mit einer absteigenden Alkoholreihe gearbeitet. Initial werden die Schnitte für jeweils 10 min zweimal mit Xylol behandelt. Danach erfolgte eine jeweils fünfminütige Behandlung der Schnitte mit 100% / 90% / 80% / 60% Ethanol. Um eine störungsfreie Hybridisierung zu gewährleisten erfolgte ein Vorverdau. Im ersten Schritt verwendet man für 5 min eine Lösung aus 0,1 M Glycin in 0,1 molarem Tris bei einem pH von 7,0.

Die Permeabilisierung der Gewebeschnitte geschah mit 0,3% Triton-x-100 in PBS für 10 min wobei ein zusätzlicher Waschschrift, bei dem dreimal für 5 min mit PBS gespült wird, zwischen den einzelnen Behandlungen erforderlich war.

Der Verdau der endogenen Proteasen erfolgte mit Proteinase K bei 37°C für 5 min. Die Konzentration und die Zeit des Einsatzes der Proteinase ist sehr genau zu beachten. Eine Endkonzentration von 10 µg/ml in einer Tris-EDTA Lösung bei pH 8 für 5 min ist bei Knorpelschnitten, wie sie im Migrationsexperiment eingesetzt werden, empfehlenswert.

Paraformaldehyd in einer Konzentration von 4% dient der Postfixierung der Präparate. Da sich bei der Hybridisierungsreaktion oftmals eine unspezifische Hintergrundreaktion bei der Detektion einstellt, wurde vor der Inkubation mit den Sonden eine Behandlung mit 0,25% Essigsäureanhydrid für 15 min durchgeführt. Auch hier muss die Zeit für die optimale Reduzierung des „Backgrounds“ experimentell für jede Gewebeart ermittelt werden.

2.6.3 Vorbereitung der Sonden

Die Konzentration für den Einsatz der Sonden, wurde durch den Dot-Blot getestet.

RNA-Sonden für Kollagen 2 wiesen eine sehr gute Effektivität nach der In-vitro-Transkription auf wodurch eine Verdünnung von 1:10 ausreichend für optimale Hybridisierungsergebnisse waren. Kollagen 1 alpha Typ 1 und alpha Typ 2 wurden aufgrund der geringeren Effektivität unverdünnt verwendet.

Die Sonden wurden in einem 0,5 ml Eppendorfcup für 3 min in einem Thermoblock mit 65°C behandelt. Diese Maßnahme soll sicherstellen, dass die RNA-Sonden einzelsträngig vorliegen und sich nicht unspezifisch zusammen-gelagert haben.

Die Konzentration der Sonden sollte 50-100 ng/µl betragen. Die vorliegenden Sonden wurden je zu 1 µl mit 29 µl Hybridisierungslösung verdünnt und nach dem Vorverdau auf die Präparate pipettiert. Die Hybridisierung fand bei einer Ofentemperatur von ca. 39°C für 16 h statt, dies gewährleistet eine effektive Hybridisierung der Antisense-Sonde. Das Waschen wurde weniger stringent durchgeführt, jedoch keineswegs zu einer unspezifischen Reaktion führte. Es wurde zweimal für 5 min mit 2 x SSC gewaschen.

Ein zusätzlicher Waschschrift, bei dem dreimal für 5 min mit PBS gespült wird ist zwischen den einzelnen Behandlungen erforderlich. Beim Blocken von

unspezifischen Hintergrundsignalen, die durch endogene Phosphatasen hervorgerufen werden könnten, benutzte man ein Gemisch aus PBS und Levamisol. Die Detektion der Anti-DIG-Antikörper erfolgt mit NBT/BCIP, da eine Doppellokalisierung mit GFP in der Analyse stattfinden sollte. Aus diesem Grund kamen im weiteren Verlauf Puffer zum Einsatz, welche die Reaktion mit NBT/BCIP begünstigen. Zunächst wurde der Puffer 1 für 5 min eingesetzt und danach Puffer 2 für 30 min auf das Präparat gegeben.

Der primäre Antikörper Anti-DIG-alkalische Phosphatase (Roche # 11093274910) wurde in einer Konzentration von 1:500 mit Puffer 2 verdünnt und für 2 h inkubiert. Puffer 1 wurde dreimal zu je 10 min eingesetzt um die Antikörperreaktion zu stoppen. Zum wiederholten Blocken des Hintergrunds wurde der Colour-Reaction- Buffer für 5 min verwendet. Es wurden 3,4 µl NBT mit 3,5 µl BCIP mit 1 ml Puffer 3 gemischt. Nach Sicht wurden die Präparate für mindestens 20 min mit dem NBT/BCIP inkubiert, welches zu einer dunkelblauen Farbreaktion führte. Die Gegenfärbung fand mit Eosin für 20 min statt, welches einen roten Kontrast ergab. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt eingedeckt.

Tabelle 10: Hybridisierungslösung (Ansatz für 10 ml)

Menge		Endkonzentration
5ml	Formamid deionisiert	50 %
2ml	20xSSC	4x
0,2ml	50x Denhardt (Invitrogen)	1x
0,5ml	Lachsspermien DNA (10mg/ml)	0,5 mg/ml
0,25 ml	t-RNA (10mg/ml)	0,25 mg/ml
2 ml	50% Dextransulfat	10 %

10x PBS

81,8 g NaCl (1,4 M)

2,01g KCL (27 mM)

12,78g Na₂HPO₄ (90 mM)

2,04g KH₂PO₄ (15 mM) mit H₂O auf 1000 ml auffüllen pH 7,4

Puffer 1

12,1 g Tris (100 mM)

8,7 g NaCL (150 mM)

in 900 ml auffüllen pH 7,5

Puffer 2 (Puffer 1 mit 2% FCS)

Puffer 3

12,1 g Tris (100 mM)

5,8 g NaCl (100 mM)

4,7 g MgCl₂ (100 mM)

NBT 300mg/3ml (Roche# 11383213001)

BCIP 150mg/3ml (Roche# 11383221001)

20x SSC

175,32 g NaCl (3 M)

88,23 g Na₃-Citrat (0,3 M)

2.7 Immunhistochemie

Es konnten in der vorliegenden Arbeit verschiedene Strukturanalysen an den Präparaten des Migrationsexperiments durch immunhistochemische Methoden durchgeführt werden. Für die unterschiedlichen Strukturen wie Rezeptoren oder Proteine kamen je nach Lokalisation verschiedene Techniken zum Einsatz. Alle hier aufgeführten Techniken dienen der Detektion von Strukturen auf den hergestellten Schnitten

Tabelle 11: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Wirtstier	Herkunft
PDGF-β	Human	monoklonal	Maus	BD Bioscience
Runx2 (27-K)	Human, Maus	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology/ Dallas, Texas, USA
GFP-turbo (Ab513)	Human,	polyklonal	Kaninchen	Evrogen, Moskau, Russland
Kollagen Typ 2 C1C1	Human, Maus, Rind	monoklonal	Maus	Hybridoma bank, Iowa-City, USA
Kollagen Typ 1 alpha 1 (C-18)	Human, Maus, Ratte	polyklonal	Ziege	Santa Cruz, Biotechnology/ Dallas, Texas, USA

2.7.1. AP-Chromogen Methode (GFP-Detektion)

Der AP-Chromogen Methode zur Detektion von GFP geht eine allgemeine immunhistochemische Behandlung der Präparate zuvor. Sie umfasst die Entparaffinierung sowie die Antigendemaskierung der eingebetteten Gewebe. Die Entparaffinierung erfolgt anhand eines Standardprotokoll.

Tabelle 12: Entparaffinierung

Position	Medium	Inkubationszeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Ethanol 100 %	3 min
4	Ethanol 80 %	3 min
5	Ethanol 60 %	3 min
6	Aqua dest.	3 min

Im letzten Schritt dieser vorbereitenden Maßnahme erfolgt eine Behandlung der Präparate mit TBS-T für 5 min. Nachfolgend muss das Präparat durch experimentell ermittelte Maßnahmen für die Aufnahme der Antikörper vorbereitet werden. Ziel ist eine größtmögliche Genauigkeit der Antikörpersignale ohne unspezifische Hintergrundreaktionen. Die Methode, welche mit AP-Chromogen durchgeführt wird erfolgt durch eine Alkalische-Phosphatase Reaktion. Als erstes wird ein Arbeitsschritt zum Blocken endogener Peroxidasen/Phosphatasen mit Universalblock (KPL# 110995) durchgeführt. Eine Antigendemaskierung ist notwendig um Zugang zu den Antigenen der Paraffineingebetteten Gewebeproben zu erhalten. Eine Kreuzreaktion zwischen dem für die Fixierung verwendeten Formalin und Proteinen führt dazu dass trotz verschiedenster Maßnahmen keine immunhistologischen Darstellungen durchführbar sind. Viele Untersuchungen haben Lösungsansätze für dieses Phänomen gesucht, eine Möglichkeit stellt die Bearbeitung der Paraffinpräparate mit Hitze über 100°C, eine weitere eine starke alkalische Behandlung dar (Shi et al. 2011). In dieser Untersuchung kam der Einsatz von 0,1 molarem Citratpuffer bei einer Temperatur von 90-94°C als optimale Maßnahme für die Antigendemaskierung zum Einsatz. Die Präparate wurden für 40 min inkubiert und anschliessend für 9 min in TBS-T gewaschen.

Die folgenden Schritte könnten in ihrer Reihenfolge sowie der Dauer der Inkubationszeiten unterschiedlich sein und sind stets experimentell für das zu untersuchende Protein zu ermitteln. Eine Vorbehandlung mit Protease 24 für 2 min wurde durchgeführt. Zum Blocken der endogenen Phosphatasen wurde Levamisol für mindestens 30 min. eingesetzt. Diesem folgte ein weiterer Blockschritt mit 1% BSA für 10 min. Anschliessend wird der gewünschte Primär-Antikörper in Diamond Antibody Diluent (Cell Marque, Rocklin, USA) gelöst und über Nacht auf dem Präparat inkubiert. Der Antikörper für GFP wurde in einem Verhältnis von 1:200 angesetzt und über Nacht für ca. 16 h inkubiert. Die Negativ-Kontrollen wurden an Stelle des primären Antikörpers mit 1% BSA inkubiert und sollten bei der Farbreaktion somit keine Ergebnisse bringen. Dies spricht dafür, dass die Ergebnisse spezifisch sind und nicht eine unklare Hintergrundreaktion stattfindet. Die Detektion wurde mit dem Flaschensystem des Hi-Def Amplifier (Cell Marque, #1225101/A) und Hi-Def Polymer (Cell Marque, #1225101/B) durchgeführt. Diese beiden Flüssigkeiten wurden zu jeweils 50 µl auf den Schnitt gegeben und für 10 min inkubiert. Sie bilden den sekundären Antikörper und ermöglichen die anschliessende Farbreaktion mit dem Chromogen. Die Chromogenfärbung wurde aus zwei Komponenten angesetzt, die jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Das Perma Red AP Substrat (Emergo, #U 776-A) und Perma Red AP Buffer (Emergo, #U 392-C) ist als einfach zu verarbeitendes Flaschensystem bei dieser Reaktion zum Einsatz gekommen. Die Farbreaktion fand auch im Dunkeln statt und wurde regelmäßig unter Sicht kontrolliert um eine optimale Färbung der Präparate zu realisieren. Für die Gegenfärbung wurde frisch gefiltertes Hämalaun in einem Verhältniss von 1:4 verwendet und später mit Leitungswasser abgespült. Die Objektträger wurden dehydriert und nach dem letzten Xylolbad vorsichtig entnommen. Um das Präparat haltbar zu machen, wurde ein kleiner Tropfen Eukitt aufgebracht und die Präparate mit einem Deckgläschen luftdicht verschlossen. Dieser Versuch wurde an mindestens drei Schnitten jeweils dreimal durchgeführt (n=3).

Citratpuffer, pH 6:

Lösung A: 4,2 g Zitronensäuremonohydrat (# 100244.0500, Merck, Darmstadt, DE) 200 ml Aqua dest.

Lösung B: 29,4 g Trinatriumdicitrat (#3580.3, Roth, Karlsruhe, DE) 1000 ml Aqua dest.

18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B mit 900 ml Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 6 einstellen

1 % TBS/BSA:

1 g BSA (# A9647-50G, Sigma-Aldrich, St.-Louis, USA) mit 100 ml 1xTBS mischen

Protease 24:

25 mg Protease XXIV (# P8038, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

45 ml Aqua dest.

25 mg CaCl₂

5 ml 0.05 M Tris-HCl

pH 7,6 einstellen

0.05 M Tris-HCl:

6 g Tris (# 5429.3, Roth, Karlsruhe, DE)

250 ml Aqua dest.

36 ml 1N HCl

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, pH 7,6 einstellen

2.7.2 NBT/BCIP -Methode

Die NBT/BCIP Methode kann über eine alkalische-phosphatase Reaktion erfolgen. Es handelt sich hierbei um eine sehr sensitive Methode, wobei das Präzipitat aus den Redoxkomponenten eine hohe Auflösung durch die Bildung eines dunkelblauen Farbstoffs ermöglichen kann. Die Anwendung dieser Nachweismethode wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur für die ISH zur Darstellung der mRNA benutzt sondern ermöglichte zudem auch die gleichzeitige Lokalisation des Proteins für den Rezeptor PDGF- β an markierten CPC. Da durch die Reflektionsmethode (Jékely und Arendt 2007) auch eine Visualisierung durch die konfokale Laserscanning Mikroskopie (kLSM) geschehen kann, wurde auch bei der IHC dieses Detektionsverfahren angewendet. Die Farbreaktion mittels NBT/BCIP wird ähnlich wie die Immunreaktion vom AP-Chromogen über das Enzym alkalische Phosphatase durchgeführt. Bei der Vorbehandlung zur Antigendemaskierung und den verschiedenen Blockschritten gegen die vorhandenen endogenen Enzyme wurde sich an das Protokoll für die AP-Chromogen Methode gehalten. Wie bei der AP-Chromogen Methode wurden gebrauchsfertige Lösungen aus dem Flaschensystem eingesetzt um den sekundären Antikörper für die Immunreaktion zu generieren. Nach der Anwendung des HiDef-Amplifier und Substrat Systems konnten die Komponenten NBT/BCIP in einem definierten Mischungsverhältnis eingesetzt werden. Für die Farbreaktion wurde NBT zu 3,4 μ l und BCIP zu 3,5 μ l in 1 ml TBS-T gelöst. Ein wichtiger Unterschied lag in der Farbreaktion, die nun keine dunkelroten Signale lieferte, sondern ein dunkelblaues Präzipitat. Man sollte beachten, die optimale Gegenfärbungsmethode zu wählen. Eine Hämalaunfärbung bietet sich aufgrund des fehlenden Kontrast nicht an, eine Färbung mit Kernechtrot oder Eosin konnte in diesem Fall bevorzugt werden. Dieser Versuch wurde mehrmals an jeweils 2 verschiedenen Schnitten durchgeführt (n=20).

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

Allgemeines zur Methode

Die quantitative real-time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) amplifiziert cDNA-Abschnitte mithilfe synthetischer Primer und dient der Bestimmung der quantitativen Genexpression. Mithilfe dieser Methode lassen sich mRNA-Sequenzen nachweisen, welche aus Zellen gewonnen werden. Eine Durchführung der Reaktion wird mit einer hitzestabilen Taq-Polymerase und des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green) realisiert. Für die PCR-Versuche wurden spezielle Primer hergestellt, welche die gewünschten mRNA-Abschnitte der Kollagensequenzen wiedergeben. Zur Primerherstellung ist es notwendig spezifische Aminosäuresequenzen des gesuchten Antigens zu finden. Die Sequenzen werden auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information zur Verfügung gestellt und können über ein Alignmentprogramm (Basic Local Alignment Search Tool) auf ihre Signifikanz untersucht werden. Die Generierung der Primer wird über die Internetseite (frodo.wi.mit.edu) ermöglicht. Die Anforderungen an die Primer sind sehr klar definiert und sollten eine möglichst kurze Sequenz aufweisen. Die Enden sollten möglichst wenig antiparallel sein und werden durch den GC%-Wert bestimmt, der bei 40-60% liegen sollte. Die maximale Länge der Primersequenzen sollte 18-23 Basen nicht überschreiten. Hohe Annealingtemperaturen können sich negativ auf das Produkt auswirken und sollten vermieden werden. Kann über eine Kontrolle der NCBI Blast Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ausgeschlossen werden, dass unspezifische Alignments bei den ausgewählten Primersequenzen gefunden werden, können die so designten Primer zur Synthetisierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Köln, Deutschland) gesendet werden. Es wird vor der Durchführung der qRT-PCR eine Gradienten-PCR vorgeschaltet, die der Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur dient. Anhand der automatisch durchgeführten Fluoreszenzmessung durch die eingesetzte Chemikalie (SYBR-Green) kann man anschliessend eine hohe Produktmenge einer bestimmten Temperatur zuordnen. Das Sequenzieren wurde von der Firma SeqLab aus Göttingen übernommen.

Tabelle 13: qRT-PCR Pipettierschema Master-Mix-Ansatz

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

Der Master-Mix wurde unter ständiger Kühlung in einer PCR-96-Well-Platte (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olendorf, DE) pipettiert. Anschliessend mit Opticat Flat Cape (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olendorf, DE) verschlossen und abzentrifugiert. Der auf dies Weise hergestellte Reaktionsansatz wurde in ein Mastercycler-Gerät der Firma Eppendorf platziert und eine RT-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt. Alle Versuche wurden zur Kontrolle an drei unterschiedlichen Tagen jeweils dreimal durchgeführt (n=9).

Tabelle 14: qRT-PCR-Protokoll

	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	95°C
Zyklus		
Denaturierung	15 sec	95°C
Annealing	15 sec	53-59°C
Extension	20 sec	72°C
finale Extension	10 min	72°C
Anzahl der Zyklen	45x	

2.8.1 Statistik/Pfaffl

Die Daten aus der qRT-PCR werden für eine statistische Auswertung und Quantifizierung der Pfaffl-Methode unterzogen. Bei der Methode wird durch ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) welches eine konstante Expression in bestimmten Geweben aufweist als Grundlage für eine Quantifizierung der Untersuchungsergebnisse erzielt. Die Bezeichnung dieser Gene geht auf die Eigenschaft zurück, dass sie keinen internen oder externen regulatorischen Einflüssen unterliegen. Die in dieser Untersuchung gewonnenen PCR-Daten wurden gegen die cDNA von CPCs mittels der Housekeeping-Gene β 2-Mikro oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Der relative Expressionsunterschied zwischen dem Housekeeping-Gen zur Referenzprobe, normalisiert durch das Referenzen wurde aus der arithmetischen Formel: $E^{-\Delta\Delta Ct}$ (E = Effizienz der PCR) berechnet (Pfaffl 2001).

2.9 Western-Blot

2.9.1 Proteinprobenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung wurden ca. 300.000 Zellen aus der unter (2.1) beschriebenen Methode gewonnen. Diese Zellen wurden mithilfe von Trypsin-EDTA geerntet, anschliessend abzentrifugiert und lagen danach als Zellpellet vor. Zur weiteren Verarbeitung des Zellpellets verwendete man 3fach konzentrierten SDS-Probenpuffer. Der SDS-Probenpuffer wurde mit 50 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, DE) lysiert, indem man die Lösung auf das Zellpellet gibt und vorsichtig auf- und abpipettiert. Dies sollte unter dem Abzug erfolgen, da die Chemikalie β -Mercaptoethanol flüchtig und giftig für den menschlichen Organismus ist. Nach erfolgter Resuspension konnte das Probengemisch mittels Heizblock (Thermocycler comfort, Eppendorf, Hamburg, DE) für 5 min bei 95°C erhitzt werden. Durch dieses Verfahren kam es zur Denaturierung der Proben, was einer Auftrennung der Proteine durch die SDS-Page Methode vereinfacht.

3 x SDS-Probenpuffer:

3,6 g 0,3 M Tris (Roth, Karlsruhe, DE)
9 g 9% SDS (Roth, Karlsruhe, DE)
22,5g 22,5% Glycerin (Roth, Karlsruhe, DE)

Spatelspitze Bromphenolblau vor SDS-Zugabe mit HCL auf pH 6,7 auf 100 ml mit dest. H₂O auffüllen

2.9.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Allgemeines zur Methode

Zum Nachweis eines Proteins bestimmter molekularer Grösse werden zwei Gele auf Polyacrylamidbasis hergestellt. Die Auftrennung der Moleküle erfolgt diskontinuierlich, dabei setzt sich das Gel aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Die Porengrösse des Trenngels wird durch den Einsatz eines günstigen Prozentsatzes an Acrylamid variiert und bestimmt somit die Auftrennungsscharakteristik. Die SDS-Page fand in einer Reaktionskammer aus zwei Glasplatten, die über eine Gummidichtung abgedichtet waren, statt. Es wurden zwei Reaktionszonen bestehend aus Sammelgel und Trenngel, in der Kammer aufgebaut, die anhand der Tabelle 6. hergestellt wurden. Das Ammonium-Peroxodisulfat (APS) (Roth,Karlsruhe,DE) bestimmt den Polymerisationsstart der Lösungen. Die Reaktion im Sammelgel, welches ohne Unterbrechung in das Trenngel mit einer höheren Porengrösse übergeht, erfolgt bei 15 mA. Es besitzt die Aufgabe alle Moleküle einer Probe an der Übergangszone zu sammeln. Dadurch wird gewährleistet, dass der Startpunkt der Auftrennung für alle Proteine nahezu identisch ist. Dem Gel ist SDS (Natriumdodecylsulfat) zugesetzt, wodurch in der Folge die Ladungen sämtlicher Proteine negativ überlagert werden. Zusätzlich zu den Proben wird eine genormte Proteinleiter (Fermentas,#SM0671) pipettiert, welche Fragmente für verschiedene Molekülmassen aufweist. Dadurch ist es später möglich jede Proteinbande einer Molekülmasse in kDA zuzuordnen.

Das Probenvolumen beträgt je nach Konzentration der Proteine zwischen 5 μ l und 20 μ l. Wenn die Lauffront die Grenze der beiden Gele erreicht, wird die angelegte Spannung auf 25 mA erhöht und die Trennung beginnt. Durch eine regelmäßige Kontrolle der Lauffront, einem sichtbaren Farbstoff kleiner Molekülmasse, der sich stets vor den Banden befindet, wird der Endpunkt der Reaktion und somit die vollständige elektrophoretische Auftrennung der Proteine überprüft. Hat das Proteingemisch das Ende des Gels erreicht, wird der Strom ausgeschaltet.

Tabelle 15: Western Blot: Gelzusammensetzung

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

Sammelgel-Puffer:

15,1 g Tris (0,5 M)
250 ml dest. H₂O
mit HCL auf pH 6,8 einstellen

Trenngel-Puffer:

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

5x SDS Laufpuffer:

30,3 g Tris (0,25 M)
142,6 g Glycin (1,9M)
0,5 % SDS (50ml 10% SDS)
mit H₂O auf 1000 ml auffüllen
800 ml H₂O mit 200 ml 5x Laufpuffer

2.9.3 Immunoblot (Western-Blot)

Für den Immunoblot kam eine PVDF-Membran (Milipore) zum Einsatz. Die besondere Eigenschaft dieser Folie erlaubt das Ausprobieren verschiedener Antikörper. Als Zwischenschritt ist hier lediglich die Reinigung, also das Strippen der Membran vom verwendeten Antikörper mit Methanol erforderlich. Die PVDF-Membran muss vor der Blotreaktion für 15 sek in 100% Methanol getränkt werden und anschliessend in für 2 min im Wasserbad geschwenkt werden. Für den Versuch werden Filterpapiere verwendet, die der Größe der Transfermembran angepasst sind. Der Zusammenbau der Blot-Kassette bestehend aus dem Gel, der Transfermembran und Filterpapieren mit dazugehörigen Schwämmen, erfolgte unter ständiger Benetzung mit Transferpuffer. Unter anhaltender Wasserkühlung erfolgte die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran durch die Blotreaktion für circa 120 min bei 350 mA. Als Erfolgskontrolle werden alle Proteinbanden durch die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht.

Transferpuffer:

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

2.9.4 Proteindetektion

Durch ein Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau-Färbung (Roth, Karlsruhe, DE) ist es möglich die übertragenen Proteine auf der PVDF-Membran sichtbar zu machen um eine Erfolgskontrolle des Immunoblots durchzuführen. Die Membran wurde dazu mit einer Färbelösung inkubiert, welche gleichmäßig auf einer Wippe geschwenkt wurde. Nachdem die Proteinbanden sichtbar gemacht wurden, musste durch zwei Entfärbelösungen unterschiedlicher Konzentration der Hintergrund reduziert werden. Durch die Bearbeitung mit den verschiedenen Lösungen kommt die Membran in Kontakt mit Methanol und Essigsäure, zur Entfernung wurde eine zweimalige Behandlung der Membran mit TBS-T bei 5 min durchgeführt. Nach dieser Behandlung konnte die Membran später eingescannt werden.

Färbelösung:

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

Entfärbelösung 1:

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

Entfärbelösung 2:

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

2.9.5 Quantitative Analyse der Western Blot Ergebnisse

Die quantitative Analyse der Westernblot Reaktion erfolgte unter der Verwendung des Housekeeping Gens alpha Tubulin. Es handelt sich dabei um ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Durch die gleichmäßige Expression kann es in Verhältnis zu Ergebnissen der Proteinexpression von Interesse gesetzt werden. Die Auswertung erfolgte durch die Verwendung der Software Image J64. Es wurden dabei die Ergebnis der Immunmarkierung eingescannt und ausgewertet. Durch die Ermittlung der absoluten Werte konnten statistische Abweichung der Proteinexpression unter Berücksichtigung signifikanter Werte untersucht werden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Students-t-Test. Eine Signifikanzuntersuchung ($p < 0,05$) ermöglichte eine eindeutige graphische Darstellung der quantitativen Untersuchung.

2.9.6 Immunmarkierung

Um die Proteindetektion erfolgreich durchzuführen, erfolgte eine erste Inkubation der Membran mit einer Blocklösung um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blocken. Der Primärantikörper wurde anschliessend zusammen mit der Blocklösung in einer Verdünnung entsprechend der Empfehlung des Herstellers für 1 h auf die Membran aufgebracht. Die Verdünnung muss im Einzelfall experimentell ermittelt werden. Anschliessend konnte der erste Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht auf der Membran unter ständigem Schwenken durch eine elektronische Wippe inkubiert werden. Nach einigen Waschschritten mit TBS-T wurde der Sekundärantikörper inkubiert der ebenfalls in einer Blocklösung verdünnt wurde. Er ist an ein Enzym gekoppelt welches ein Substrat zu einer Fluoreszenz anregen kann. Die Antikörper konnten mit dem ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham) nachgewiesen werden. Die Detektionlösungen wurden nach ihrer Öffnung auf Raumtemperatur äquilibriert und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und anschliessend mit der Membran inkubiert. Die gesamte Reaktion sollte lichtgeschützt erfolgen. Die entstehende Fluoreszenz wurde durch Auflegen einer fotosensiblen Folie aufgenommen, dazu wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien innerhalb einer Röntgenkassette gelegt und ein Röntgenfilm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) aufgelegt. Die Banden des Proteinleiter müssen auf die Fotofolie übertragen werden um festzustellen in welcher Höhe, also bei welcher Molekülmasse das gesuchte Protein aufzufinden ist. Die Zeit, mit der die Fotofolie in Kontakt mit der Membran steht um optimale Ergebnis zu liefern, kann stark variieren. Im Anschluss wurde der Film für einige Minuten in einer Wanne mit Entwickler (Kodak, Rochester, USA) gelegt. Anschliessend wurde ein Waschschrift mit Wasser eingelegt und abschliessend die Membran für ca. 10 min in Fixierer (Kodak, Rochester, USA) belassen. Alle Westernblot Reaktionen wurden zur Kontrolle an drei unterschiedlichen Tagen jeweils dreimal durchgeführt (n=3).

10x TBS-T

24,2 g Tris (200 mM)

87,6 g NaCl (1,5 M), 0,5% Tween 20 Methanol (5g)

mit H₂O auf 1 Liter auffüllen, pH 7,4

Blocklösung (5%-ige Milch)

2,5 g Milchpulver

50 ml 1x TBS

Tabelle 16: Western-Blot: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Wirtstier	Herkunft
alpha Tubulin	Human, Maus	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich, St.Louis,USA
Runx2 (C-12): sc-390715	Huma	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology/ Dallas,Texas,USA
Sox-9 (H-90): sc-20095	Human, Maus	polyklonal	Hase	Santa Cruz Biotechnology/ Dallas,Texas,USA
Kollagen Typ 2 CII Cl	Human, Maus, Ratte	monoklonal	Maus	Hybridoma bank Iowa-City,USA

Tabelle 17: Western-Blot: Verwendete Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Wirtstier	Herkunft
anti-Maus IgG	1:40000	Ziege	Sigma-Aldrich, A9917 St.Louis,USA
anti-Kaninchen IgG	1:100000	Ziege	Sima-Aldrich, A0545 St.Louis,USA

2.10 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Allgemeines zur Methode

Die Bedeutung von dreidimensionalen Genexpressionsanalysen mit hochauflösenden Techniken ist aktuell ein sehr wichtiges Ziel in der Entwicklungsbiologie und hat in die letzten 20 Jahre an enormer Bedeutung gewonnen. Die Generierung zwei,- oder dreidimensionaler Objektinformationen aus der Objektebene kann durch die verschiedene Verarbeitungsschritte eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (kLSM) realisiert werden. Strukturen in biologischen Präparate werden nur dann scharf abgebildet wenn sie in Fokus, d.h. ihre Ausdehnung nicht größer als die wellenoptische Tiefenschärfe ist. Im Konfokalmikroskop wird die Abbildung aus dem Fokuspunkt des Präparats selektiert und „Out-of-Focus“ Informationen ausgeblendet. Die Besonderheit des kLSM ist die konfokale Blende, auch „Pinhole“ genannt. Sie ist eine zur Zwischenbildebene und damit auch zur Objektebene des Mikroskops konjugierte Ebene. In der konfokalen Mikroskopie kommen Laser verschiedener Wellenlängen zur Fluoreszenzanregung zum Einsatz, welche in das Präparat fokussiert werden. Die emittierte Fluoreszenz wird hinter der konfokalen Lochblende durch einen lichtempfindlichen Sensor detektiert. Nur Licht, welches diese variable Blende passiert, kann von dem Detektor erfasst werden, wobei Signale außerhalb der Fokusebene ausgeblendet werden. Somit kann dieses optische System als inhärent tiefendiskriminierend bezeichnet werden und ermöglicht die Reduzierung störender Hintergrundinformationen, um eine optimale Darstellung von Objekten in der Z-Ebene auch ohne Anfertigung besonders dünner Schnitte zu realisieren. Unter dem Begriff Punktbildfunktion „Point Spread Function“ (PSF) wird der Einfluss der Lichtverteilung des Laserspots, die Wellenlänge des Laserlichts sowie die numerische Apertur des Objektivs zusammengefasst und bestimmt die maximal erreichbare Auflösung eines Objektivs. Zusätzlich muss beachtet werden, dass durch die serielle Abtastung der Objekte eine Auflösung entsprechend der Zahl der Abtastpunkte pro aufzulösende Struktur erreicht wird. Die erhöhte z-Auflösung ermöglicht es dicke Präparate in viele optische Schnitte zu zerlegen um komplexe 3D-Informationen zu erhalten.

2.10.1 Visualisierung der in-situ-Hybridisierungssignale

Eine regelmäßig angewandte Methode um zur Durchführung von Genexpressionsanalysen durch ISH, erfolgt wie in dieser Untersuchung gezeigt, über eine Markierung von (DIG)-11-UTP RNA-Sonden und einer Detektion durch einen alkalische-Phosphatase gekoppelten Antikörper. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird bei dieser Technik mit den chromogenen Substraten 5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau- Tetrazoliumchlorid (NBT) evaluiert. Bei der chemischen Reaktion des farblosen Substrat (BCIP) kommt es durch eine Phosphatase zur Oxidation. Die Farbreaktion wird durch das gelbliche Substrat (NBT) erzielt, welches durch Reduktion einen dunkelblauen Farbausschlag ergibt. Die Markierung über NBT/BCIP besitzt im Vergleich zu anderen Detektionsmethoden welche über eine alkalische Phosphatase gekoppelt werden eine besonders hohe Sensitivität und Präzision. Darüber hinaus ist im Rahmen der vorliegenden Studie eine weitere besondere Eigenschaft dieser Farbreaktion genutzt wurden. Eine Darstellung der markierten Sonden kann durch die Reaktion mit NBT/BCIP nicht nur lichtmikroskopisch sondern auch durch das kLSM erfolgen. Eine effiziente Technik zur Detektion und Visualisierung mittels konfokaler Mikroskopie konnte erstmals 2007 beschrieben werden (Jékely and Arendt 2007). Hier wird das vom Substrat reflektierte Laserlicht durch die Lochblende gelassen und aufgenommen. Dieses als Reflektionsmethode bezeichnete Verfahren ermöglicht die Kombination der Vorteile der verschiedenen Visualisierungstechniken, was sowohl eine topographische Lokalisierung im Gesamtgewebe als auch eine hochauflösende Unterscheidung in den verschiedenen Zellkompartimenten realisierbar macht. Eine besondere Herausforderung bei der vorliegenden Untersuchung war die Detektion von GFP markierten CPCs, welche in das zu untersuchende Gewebe migriert waren und die Unterscheidung anderer ortsständiger Zellen. Eine Kombination der Signale für GFP und der zu untersuchenden mRNA nach ISH in den Zellen ist durch die Anwendung der Reflektionsmethode möglich gewesen.

2.10.2 Konfokalmikroskopie und Reflektionstechnik

Bilder wurden mit einem Fluoview 1000 Konfokalmikroskop, ausgestattet mit einem spektral Scan-Kopf, (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg Germany) erzeugt. Es kam ein Luft- Objektiv mit einer 40-fachen Vergrößerung und eine NA von 0.9 zur Anwendung. Für die dreidimensional Darstellung und z-Achsen Projektion wurde ein Öobjektiv mit einer 60-fachen Vergrößerung (NA 1.35) gewählt. Die durchschnittliche Bildgröße betrug 1024 x 1024 Pixel bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von 12.5 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$. Für die Detektion der mit GFP transfizierten CPCs kam ein Laser mit einer Excitationswellenlänge von 488 nm zum Einsatz. Durch einen weiteren Laser mit einer Excitationswellenlänge von 633 nm wurde die Reflektionstechnik angewendet. Das NBT/BCIP Präzipitat besitzt die Eigenschaft den anregenden Laserpuls mit einer Emissionswellenlänge gleich der Excitationswellenlänge zu reflektieren. Das reflektierte Licht wird über einen dichroitischen Ablenkspiegel und ein Detektionsfenster von 630 bis 640 nm auf den Detektor gelenkt. Zusätzlich wurde zur Unterdrückung von Rausch ein 2-facher „Kalmanfilter“ verwendet. Bei der Darstellung der mit DAPI markierten Zellkerne wurde ein Laser der Excitationswellenlänge von 405 nm und ein Detektionsfenster von 410 bis 500 nm verwendet. Bei der 3D-Darstellung des PDGF-Rezeptors konnten mit einem 2-fachen Übersampling nach Niquist Theory, Aufnahmen in der z-ebene gemacht wurden. Die plastische 3D-Darstellung des Rezeptors wurde mit der Bearbeitungssoftware Imaris 5.5 realisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Quantitative Real-Time PCR

In dieser Arbeit wurden Expressionsanalysen an zwei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit PCR (qRT-PCR) stellen den Einfluss des Transkriptionsfaktors Runx2 auf die mRNA Expression für Kollagen Typ 1 und Typ 2 an CPCs dar. Bei Zellen mit einem Genknockdown für Runx2 (CPC-KD) kommt es zu einer signifikant geringeren Expression von Kollagen Typ 1 im Vergleich mit Zellen bei dem dieser Transkriptionsfaktor vorhanden ist (Abbildung 2A). Ein gegensätzliches Bild zeigt sich in der Expression von Kollagen Typ 2. Wenn Runx2 herab reguliert ist, kommt es zu einer signifikant stärkeren Expression für Kollagen Typ 2, wohingegen diese an nicht beeinflussten Zellen (CPC 531), welche als Kontrolle dienen, kaum messbar ist (Abbildung 2B). Die quantitative Auswertung der qRT-PCR mit dem Student's t-Test zeigt eine Signifikanz in der Kollagenverteilung der untersuchten Zelllinien der CPCs. Ein Knockdown von Runx2 führt zu einer stärkeren Kollagen Typ 2 Expression und herabregulierten Kollagen Typ 1 Werten.

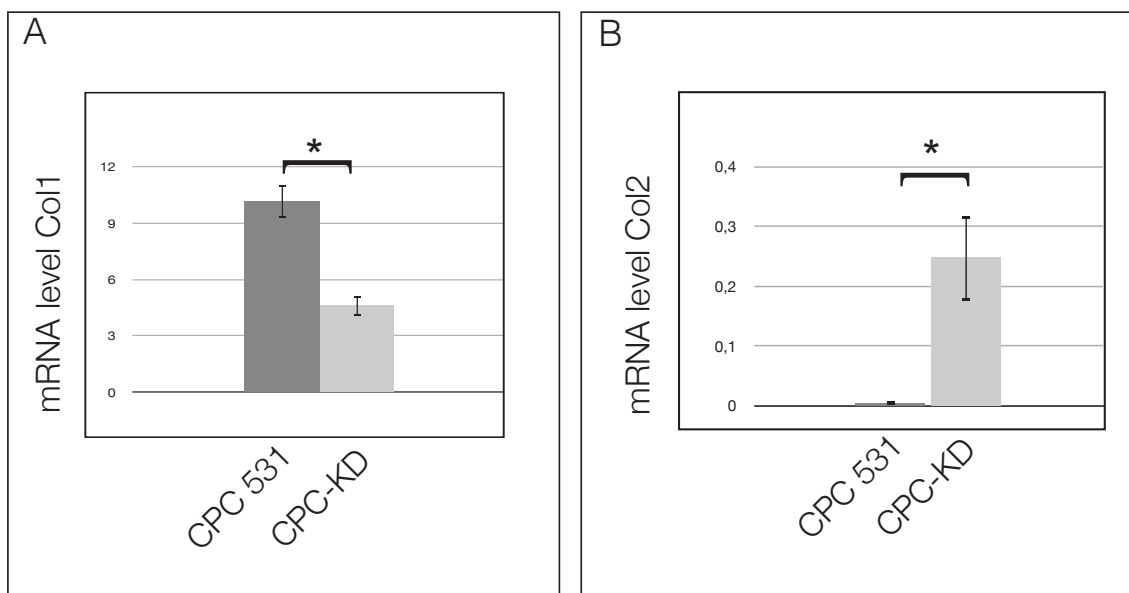


Abb.2: Quantitative Auswertung der qRT-PCR Analysen mit relativen mRNA-Level

(A) mRNA Level für Kollagen Typ 1 in CPCs mit einem Genknockdown für Runx2 (KD) und ohne einen Knockdown (CPC 531). (B) mRNA Level für Kollagen Typ 2 der beiden Zelllinien zeigen im t-Test signifikante Expressionsunterschiede.

Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$).

3.2 Western Blot

Die Untersuchung der CPCs auf Proteinebene mithilfe des Western Blot wurde an beiden Zelllinien (CPC 531) und (CPC-KD) durchgeführt.

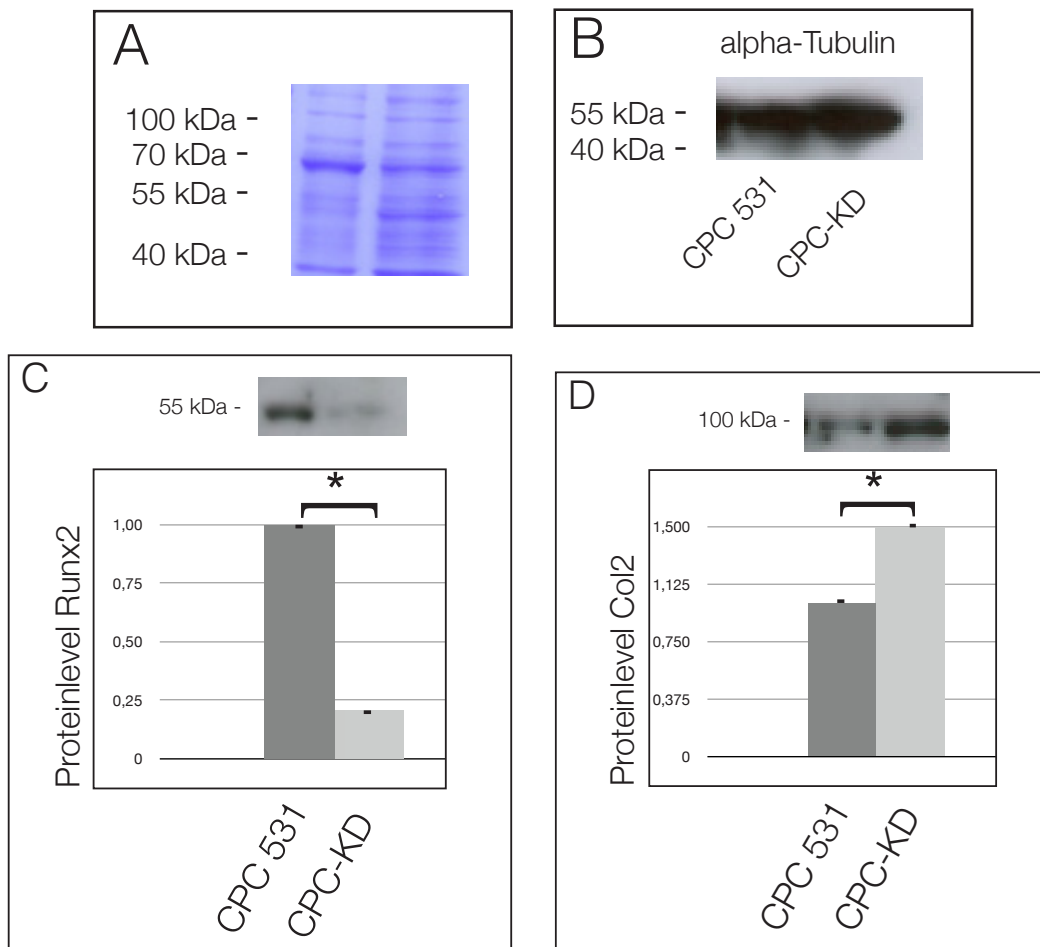


Abb.3: Western Blot für Kollagen Typ 2 und Runx2 an transfizierten CPCs mit (KD) und ohne Genknockdown von Runx-2

(A) Commassie-Brilliant-Blau Färbung zeigt erfolgreich Übertragung der Proteine auf Blotmembran.(B) Proteinlevel des Housekeeping Gen alpha-Tubulin dient der Ladungskontrolle. (C) Proteinbanden für Runx2 in Kontrollzellen bei typischem Molekulargewicht von ca.55 kDa. In Knockdown CPCs (KD) nur schwache Ausprägung der Proteinbanden für Runx2. Die quantitative Auswertung mithilfe des Student`s-t-Test zeigt das Runx2 signifikant in CPC (KD) herunterreguliert ist. (D) Proteinbanden für Kollagen Typ 2 bei ca.100 kDa mit starker Expression in CPCs (KD). Die quantitativen Werte zeigen die signifikante Verteilung für Kollagen Typ2 Proteinlevel für Kollagen Typ 2 der CPC (KD) sind im Vergleich zu Kontrollzellen hochreguliert.

Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. * = signifikant ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der Comassie-Färbung zeigen die erfolgreiche Übertragung der Proteine aus dem Zelllysat der jeweiligen CPCs auf die PVDF-Membran (Abbildung 3A). Zur Kontrolle, ob die gleiche Menge beider Zellproben für den jeweiligen Versuch verwendet wurde, erfolgte eine Reaktion mit dem Housekeeping-Gen alpha-Tubulin (Abbildung 3B). Dies bildet die Grundlage für die quantitativen Auswertungen der Western-Blot-Reaktionen. Abbildung 2D zeigt die Proteinbanden für Kollagen Typ 2 und bestätigt die Präsenz in den Kontroll-CPCs, welche im Western-Blot zum Einsatz gekommen sind. Die Proteinbanden für Zellen mit einem transienten Knockdown für Runx2 sind deutlich stärker ausgeprägt als in Zellen ohne diesen Knockdown (CPC 531). Sie finden sich bei dem für Kollagen Typ 2 typischen Level von 100 kDa. Durch die quantitative Auswertung wird das Vorhandensein einer signifikant höheren Menge an Kollagen Typ 2 in Zellen mit dem Genknockdown für Runx2 deutlich. Die Kontrolle für das Fehlen von Runx2 in Zellen mit einem Genknockdown für diesen Transkriptionsfaktor wird in Abbildung 2C gezeigt. Es liegt eine eindeutig stärkere Proteinbande für Runx2 an Zellen ohne Genknockdown für diesen Faktor vor. Das Molekulargewicht befindet sich hier auf einem für Runx2 typischen Wert von 55 kDa. Für die quantitative Auswertung der Proteinlevel wurde die Software ImageJ64 verwendet, welche mithilfe des Housekeeping-Gen (alpha-Tubulin) relative Expressionsunterschiede der Proteinbanden analysieren konnte. Unter Anwendung des Student's-t-Test konnten in der vorliegenden Arbeit signifikante Expressionsunterschiede ermittelt werden.

Die Verteilung von Runx2 liegt eindeutig auf Seiten der Zelllinie (CPC 531), ist jedoch nicht komplett ausgeschaltet. Dieses Phänomen würde nur bei einem völligen Genknockout auftreten (Abbildung 3C).

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Proteinanalyse für den chondrogenen Marker Sox-9 spiegeln den wechselseitigen Einfluss von Runx2 auf CPCs wieder. Zellen, in denen der Transkriptionsfaktor Runx2 herunter reguliert ist, zeigen auf der Proteinebene eine verstärkte Expression für Sox-9, dies lässt sich aus den Proteinbanden des Western Blot und der quantitativen Analyse (Abbildung 4B) darstellen. Sox-9 wird in beiden Zelllinien exprimiert (Abbildung 4B). Es kommt jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der Proteinlevel für Sox-9 an Zellen mit einem herunter regulierten Transkriptionsfaktor Runx2. Die Proteinbanden von Sox-9 befinden sich leicht unter dem regulären Wert des Molekulargewichts von 56kDa. Die Übertragung der Gesamtproteine auf die PVDF-Membran verlief erfolgreich und ist aus der Comassie-Färbung ersichtlich (Abbildung 4A). Alpha-tubulin als Housekeeping-Gen ermöglicht eine quantitative Analyse der Proteinlevel für Sox-9 zu (Abbildung 4C).

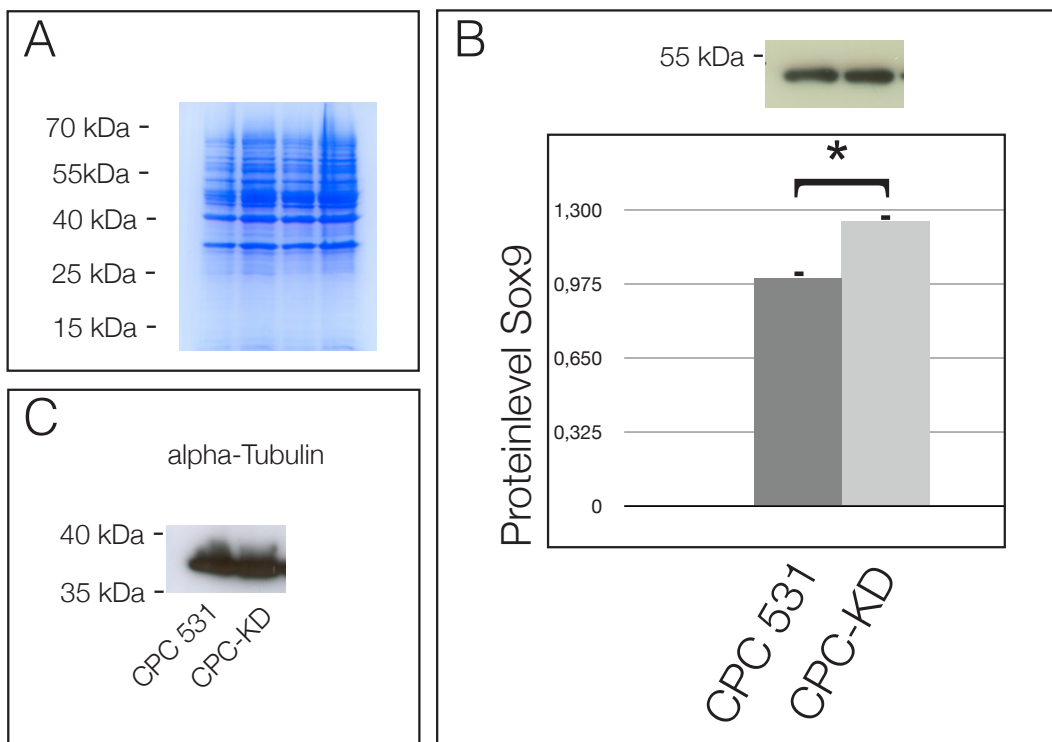


Abb.4: Western Blot für Sox-9 transfizierter CPCs mit (KD) und ohne Genknockdown von Runx2

(A) Comassie-Brilliant-Blau Färbung zeigt erfolgreiche Übertragung der Proteine auf Blotmembran. (B) Proteinbanden für Sox 9 bei einem typischen Wert von ca.55 kDa mit deutlicher Expression in beiden Zelllinien. Die quantitativen Werte der Proteinlevel für Sox-9 zeigen im t-Test signifikante Unterschiede. Sox9 ist in CPC (KD) stärker exprimiert als in Kontrollzellen CPC (531) (C) Proteinlevel des Housekeeping Gen alpha-Tubulin dient der Ladungskontrolle.

Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. * = Signifikant ($p < 0,05$)

3.3 Zellkultur chondrogener Progenitorzellen

Die Migration von CPCs aus osteoarthrotisch verändertem Knorpelgewebe ermöglicht die Gewinnung und Kultivierung einer großen Anzahl von Zellen. Nach einer gewissen Kultivierungszeit in Standardmedium können adhärenente Zellen in einem Kulturgefäß unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden (Abbildung 5A). Der typische spindelförmige Phänotyp dieser Zellen mit langen Zellfortsätzen ist charakteristisch für diese Zellart. Die transiente Transfektion der Zellen mit GFP erfolgt lentiviral und ermöglicht eine grüne Fluoreszenz der Zellen, durch welche die zu untersuchenden CPCs markiert und von anderen Zellen zu unterscheiden sind. Der Nachweis erfolgte bei UV-Licht-Bestrahlung (Wellenlänge 395 nm) und lässt sich durch das Fluoreszenzmikroskop kontrollieren (Abbildung 5B). Die Transfektion der CPCs mit GFP erlaubt eine räumliche und zeitliche Detektion der Zellen und wird in der vorliegenden Studie zur Unterscheidung von ortständigen Zellen nach den Migrationsversuchen verwendet.

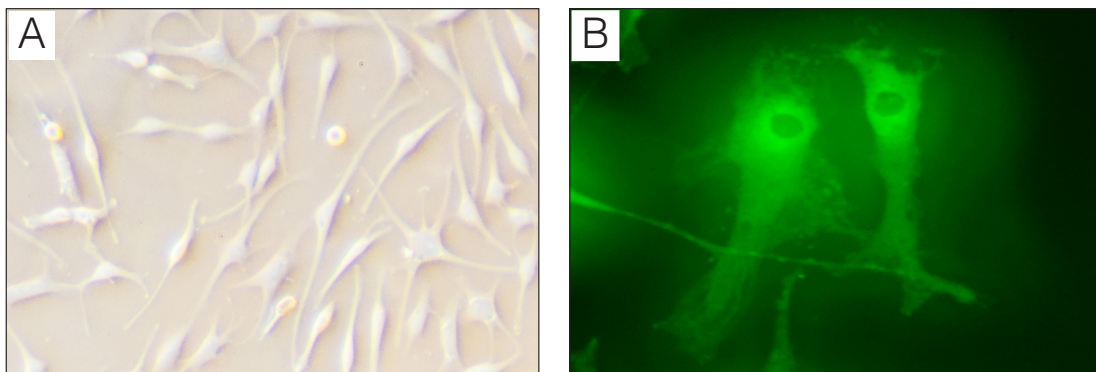


Abb. 5: Zellkultur chondrogener Progenitorzellen vor und nach Transfektion mit GFP
(A) Lichtmikroskopische Darstellung CPCs unter Kulturbedingungen nach Migration aus Knorpelproben und 10 tägiger Kultivierungszeit, Vergrößerung 100x.
(B) Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der transienten Transfektion von CPCs mit GFP, Vergrößerung 200x.

3.4 Gewebeschnitte

Für die histologische Untersuchung der Knorpelpräparate wurden Gewebeschnitte angefertigt. Diese Schnitte fanden sowohl Anwendung bei der immunhistologischen Analyse ausgewählter Markerproteine, als auch bei der ISH in Kombination mit den Migrationsexperimenten. Die Schnitte der Präparate verliefen in der Sagittalebene, um den typischen Aufbau von OA Knorpelgewebe und die Migrationstiefe der CPCs darstellen zu können. Abbildung 6A zeigt die Verteilung von Kollagen Typ 2 in gesundem hyalinem Knorpel ohne Migration. In der oberflächlichen zellarmen Schicht konnte kein Kollagen Typ 2 lokalisiert werden, während sich in der mittleren Schicht eine deutliche Färbung an Chondrozyten mit einem runden Phänotyp erkennen lässt. Es zeigt sich, dass in gesundem Knorpelgewebe Kollagen Typ 2 vermehrt nachzuweisen ist. Die Negativkontrolle zeigt keine Färbung und bestätigt, dass es zu keinen unspezifischen Signalen während der Antikörperreaktion gekommen ist (Abbildung 6)

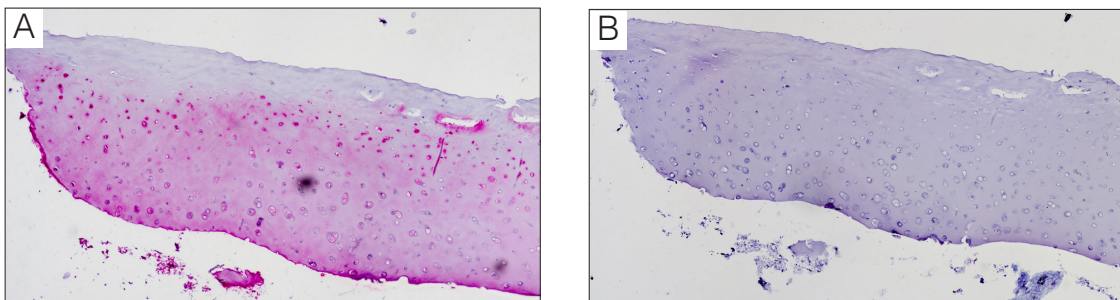


Abb 6: Immunhistologie von Kollagen Typ 2 in gesundem Knorpel

(A) Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen Typ 2. Eine positive Reaktion für Kollagen Typ 2 ist in der mittleren Knorpelschicht dargestellt, Vergrößerung 40x.

(B) Die Negativkontrolle besitzt keine unspezifischen Hintergrundreaktionen.

3.5 Ex-vivo-Migrationsexperiment

Nach einer fünftägigen Migrationszeit in das durch OA veränderte Knorpelgewebe konnte eine immunhistochemische Färbung der CPCs für das Markerprotein GFP erfolgen. Abbildungen 7A und 7B zeigen die Antikörperreaktion aus der immunhistologischen Untersuchung. Die GFP markierten CPCs, können bis in die mittleren und tiefen Schichten des defekten Knorpels migrieren und sind deutlich innerhalb der Knorpelmatrix zu lokalisieren. Die Migrationsrichtung erfolgte von links nach rechts. Die oberflächliche Schicht des Knorpels zeigt die typische Ausbildung von Fissuren, wobei der kaudale Anteil durch die Präparation mittels Skalpell scharf abgegrenzt bleibt. Die ortsständigen Zellen des Gewebes sind aufgrund der fehlenden Reaktion für GFP nicht angefärbt (Abbildung 7A). In der Detailvergrößerung wird deutlich, dass lediglich die Zellen des Gewebes welche GFP-positiv sind, angefärbt werden können. Die EZM bleibt ungefärbt und zeigt keinerlei unspezifische Hintergrundsignale (Abbildung 7B).

Abbildung 7C zeigt die Detektion der CPCs über das Konfokalmikroskop. Es ist eine grün-fluoreszierende, kreisförmige Reaktion zu beobachten ausgehend von den mit GFP markierten Zellen. Im Knorpelschnitt sind weitere lakunenförmige Areale zu beobachten in denen keine Migration der Zellen stattgefunden hat und die damit keine grünen Signale aufweisen. Durch eine Färbung der Schnitte mit DAPI kann zusätzlich der Nukleus der Zellen markiert werden. In der Detailvergrößerung ist diese zusätzliche Markierung gut von der GFP-Markierung durch eine blaue Färbung zu unterscheiden (Abbildung 7D). Die Migrationstiefe der Zellen ist von der Inkubationszeit sowie von den Eigenschaften des im Migrationsversuch verwendeten Knorpelpräparats abhängig, was die unterschiedliche Lokalisation der Zellen in Abbildung 7A und 7B erklären kann.

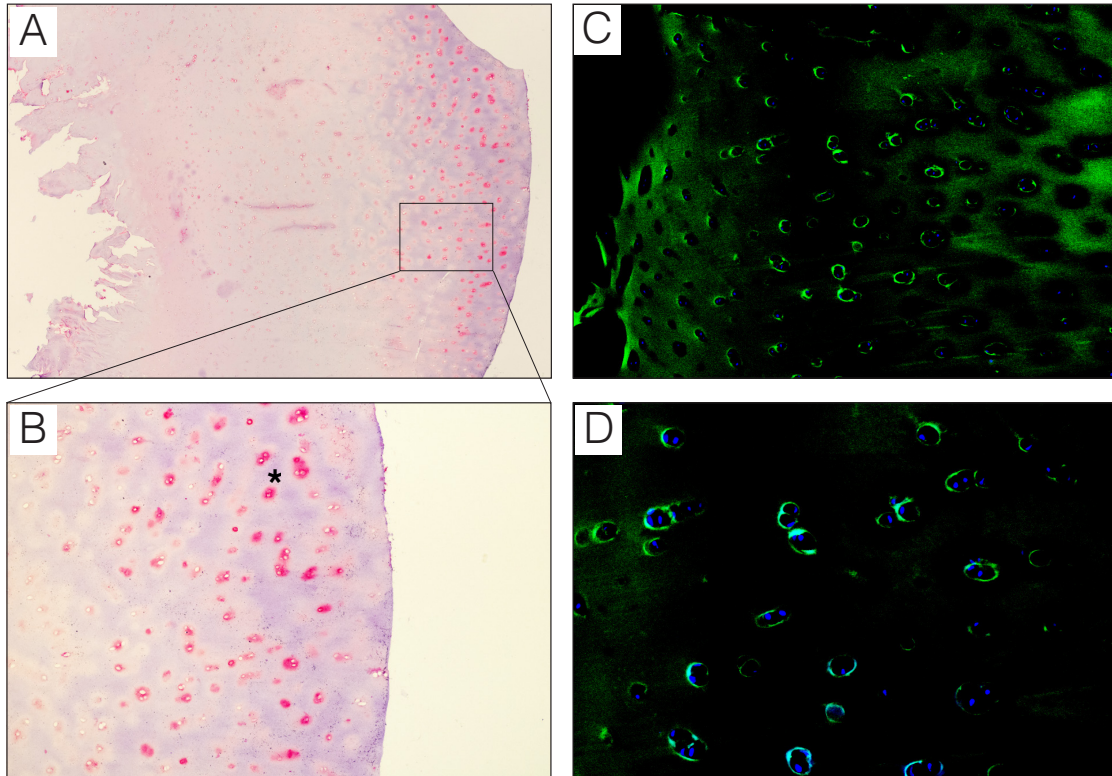


Abb. 7: Immunhistologie GFP markierte CPCs nach Migrationsexperiment ,Licht und Konfokalmikroskopie

(A) Lichtmikroskopische Darstellung der migrierten CPCs nach immunhistologischer Färbung für GFP, Vergrößerung 40x. (B) Detailvergrößerung des Migrationsversuchs mit Markierung der CPC, Vergrößerung 100x. (C) Darstellung der GFP markierte CPCs nach Migration im Konfokalmikroskop, Vergrößerung 40x. (D) Detailvergrößerung der GFP markierten CPCs mit zusätzlicher Markierung der Nuklei über DAPI, Vergrößerung 100x.

* = Positivfärbung.

3.6 Immunhistologie

3.6.1 Rezeptor PDGF- β

Durch lichtmikroskopische Darstellung konnte an CPCs, nach dem erfolgreichen Migrationsexperiment, der Rezeptor PDGF- β lokalisiert werden. Die immunhistologische Reaktion erfolgte an 7 μ m dicken Schnitten die mithilfe der NBT/BCIP Methode gefärbt wurden. In den mittleren Schichten des Gewebeschnitts sind positive Reaktionen für den Rezeptor nachzuweisen (Abbildung 8A). In der Detailvergrößerung (Abbildung 8B) ist zu erkennen, dass nicht alle Zellen des Gewebeschnitts nach dem Migrationsexperiment eine Expression des Rezeptors aufwiesen.

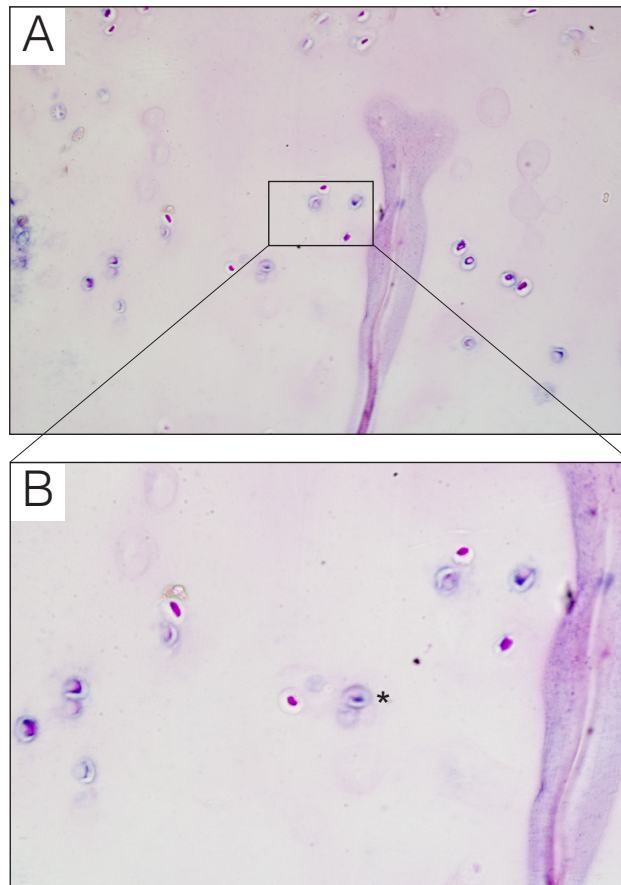


Abb. 8: Immunhistologie für Rezeptor PDGF- β nach Migrationsexperiment

(A) Lichtmikroskopische Darstellung des Rezeptor PDGF- β an CPCs nach Migration über immunhistologische Färbung mit NBT/BCIP, Vergrößerung 100x. (B) Detailvergrößerung der CPCs nach positiver Reaktion für den Rezeptor PDGF- β Vergrößerung 150x.

* = Positivfärbung.

3.6.2 Konfokalmikroskopie / Rezeptor PDGF- β

Bei der Darstellung des Rezeptors PDGF- β an CPCs nach Migration wurde die Reflektionsmethode angewendet. Nach einer immunhistologischen Markierung über NBT/BCIP konnte eine detaillierte Lokalisation an GFP markierten CPCs durchgeführt werden.

Abbildung 9A zeigt die GFP markierten CPCs nach Migration. Innerhalb eines dunkel abgesetzten Areals kann eine positive Reaktion für GFP beobachtet werden, welche sich von der EZM abgrenzt. Die Lokalisation für den Rezeptor PDGF- β ist an diesen Zellen möglich und kann durch eine kontrastreiche Fluoreszenz im Konfokalmikroskop erreicht werden (Abbildung 9C). Durch die Kombination der Laserlinien im Konfokalmikroskop ist eine gleichzeitige Darstellung des Rezeptors PDGF- β und GFP möglich. Die Doppelmarkierung bestätigt die Präsenz des Rezeptors PDGF- β an GFP positiven CPCs (Abbildung 9E). Eine dreidimensionale Darstellung der Zellen, die durch das kLSM erzielt wurde, zeigt die räumliche Orientierung der CPCs. Durch diese Technik wird eine präzise Darstellung von Zellstrukturen ermöglicht, dabei wurde das Präparat in der z-Ebene gescannt. Für eine exakte Lokalisation des GFP innerhalb der Zellen wird zusätzlich eine DAPI Markierung durchgeführt, welche den Zellkern der Zellen darstellt (Abbildung 9B). Der Rezeptor PDGF- β kann in Kombination mit der DAPI Markierung in einer dreidimensionalen Darstellung gezeigt werden (Abbildung 9D). Durch die dreidimensionale Darstellung von GFP, dem DAPI gefärbten Zellkern und dem Rezeptor PDGF- β wird eine detaillierte Strukturanalyse der migrierten CPCs ermöglicht (Abbildung 9F).

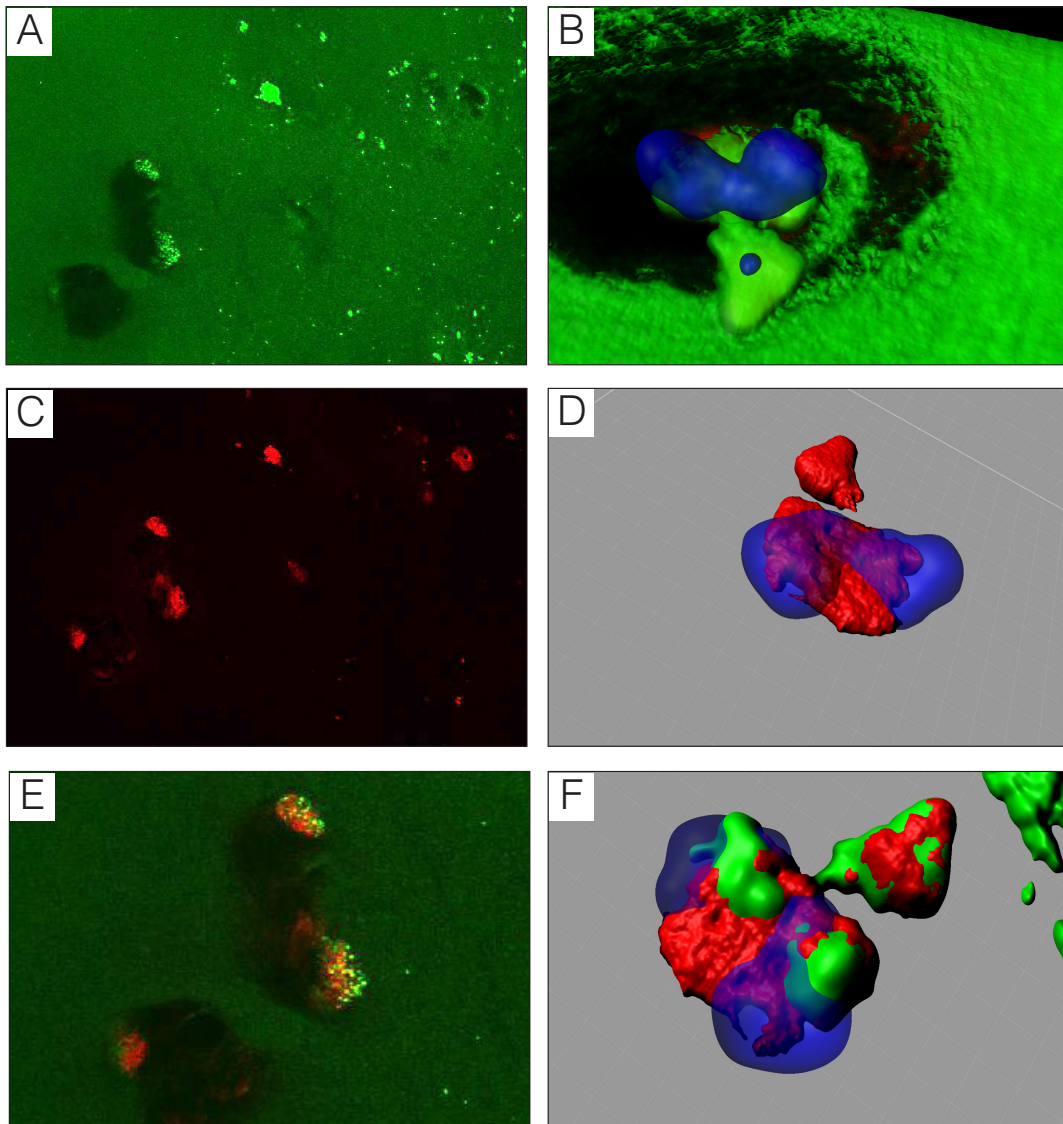


Abb. 9: Reflektionsmethode im Konfokalmikroskop und 3D-Darstellung des Rezeptors PDGF- β

(A) Darstellung von GFP an markierten CPCs im Konfokalmikroskop. (B) Doppelmarkierung von GFP und DAPI an CPCs durch eine 3D-Darstellung. (C) Darstellung des Rezeptor PDGF- β an CPCs nach Migration durch Konfokalmikroskop. (D) Doppelmarkierung des Rezeptor PDGF- β und DAPI an CPCs mithilfe der 3D-Darstellung. (E) Doppelmarkierung von GFP und des Rezeptor PDGF- β im Konfokalmikroskop. (F) Mehrfachmarkierung von GFP, Rezeptor PDGF- β und DAPI unter Anwendung der 3D-Darstellung im Konfokalmikroskop.

3.7 In-situ-Hybridisierung

3.7.1 Kollagen Typ 1 an Kontroll CPCs

Zunächst wurden CPCs ohne Knockdown für den Transkriptionsfaktor Runx2 untersucht. Abbildung 10A zeigt einzelne positiv markierte Zellen, die in der Nähe der oberflächlichen Schicht des Knorpelschnitts liegen. Der Kontrast gegenüber der Hintergrundreaktion ist deutlich. Die Detailvergrößerung in Abbildung 10B zeigt positive Reaktionen für Kollagen Typ 1 innerhalb eines Zellclusters, angrenzende Zellen weisen keine positive Reaktion auf. Die Darstellung in Abbildung 10C zeigt die Doppelmarkierung mit GFP und verdeutlicht, dass es sich um CPCs handelt, welche in das Gewebe migriert sind. Die Signale für GFP befinden sich im Zytosol der Zellen und lassen sich trotz der Eigenfluoreszenz des Gewebes von der EZM unterscheiden.

Die Negativkontrolle (Abbildung 10D-F) zeigte keine Reaktionen nach der ISH. Es sind Zellcluster zu erkennen die keine Färbung aufweisen und es kommt zu keinen unspezifischen Reaktionen (Abbildung 10D). In der Detailvergrößerung wird deutlich, dass die Sense-Sonde keine Reaktion mit der mRNA für Kollagen Typ 1 eingeht, Zellen und EZM blieben ohne Reaktion (Abbildung 10E).

Nach Anwendung der Reflektionsmethode konnten keine Signale für Kollagen Typ 1 in der Reaktion mit der Sense-Sonde identifiziert werden. Die GFP markierten Zellen waren nachweisbar und zeigen grün-fluoreszierende Signale, die sich von der EZM abgrenzen lassen. In Abbildung 10F kann man ein kreisrundes, grünes Signal innerhalb des Knorpelschnitts identifizieren.

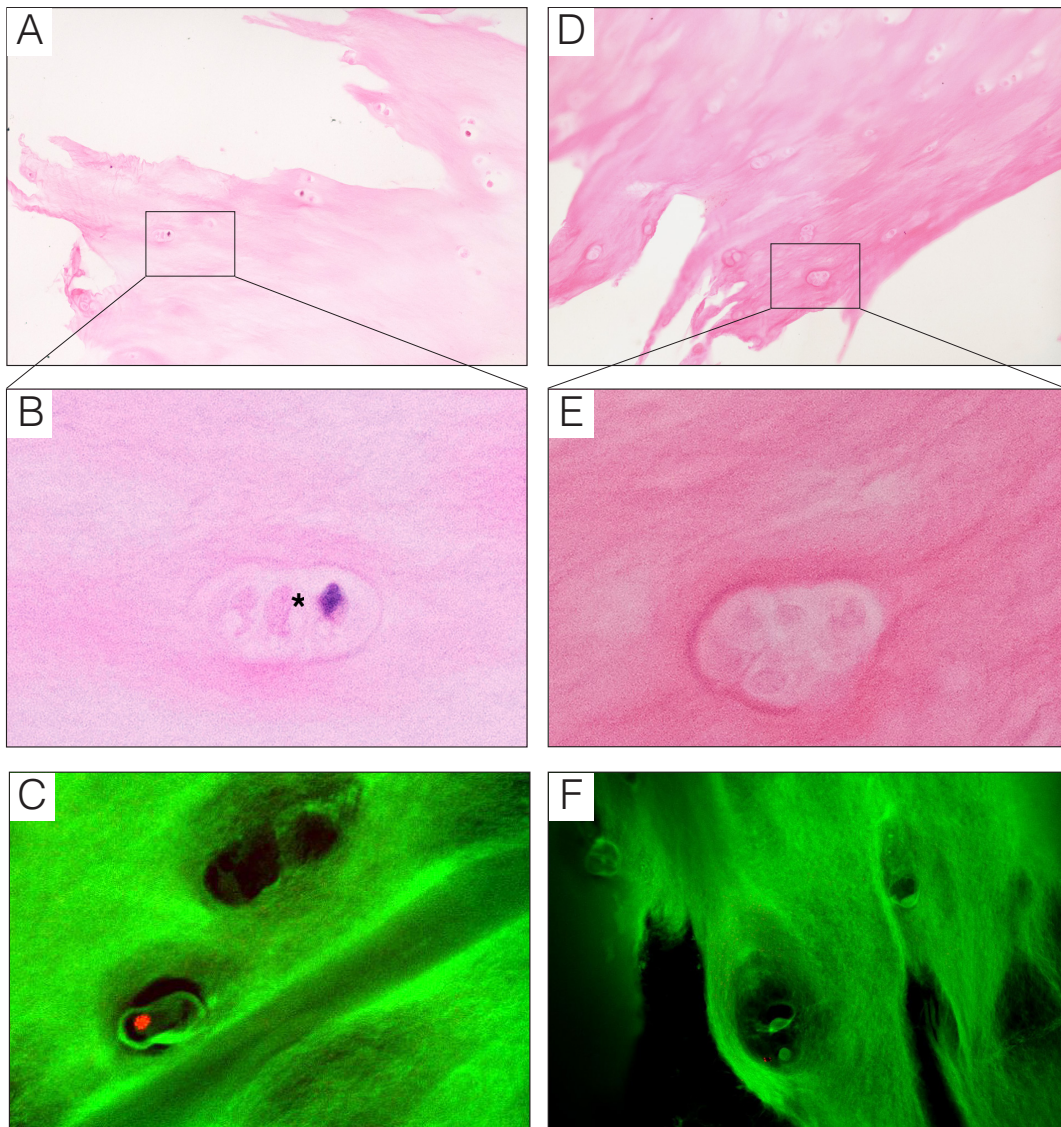


Abb. 10: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 1, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie

(A) Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen Typ 1 nach ISH, Vergrößerung 40x. (B) Detailvergrößerung der Kollagen Typ 1 Antisense-Sonde, Vergrößerung 200x. (C) Doppelmarkierung von Kollagen Typ 1 mit GFP im Konfokalmikroskop, Vergrößerung 200x. (D) Lichtmikroskopische Darstellung der Negativkontrolle für Kollagen Typ 1 durch die Sense-Sonde nach ISH, Vergrößerung 40x. (E) Detailvergrößerung der Kollagen Typ 1 Sense-Sonde, Vergrößerung 200x. (F) Doppelmarkierung von Kollagen Typ 1 und GFP in der Negativkontrolle durch Konfokalmikroskop, Vergrößerung 100x.

* = Positivfärbung

3.7.2 Kollagen Typ 1 (Knockdown Runx2)

Die ISH Reaktion für Kollagen Typ 1 bei Zellen mit einem transienten Genknockdown für den Transkriptionsfaktor Runx2 zeigt positive Reaktionen. Es können einzelne angefärbte Zellen innerhalb der oberflächlichen Knorpelschicht nach Migrationsexperiment lokalisiert werden (Abbildung 11A). In der Detailvergrößerung wird deutlich, dass sich sowohl isolierte als auch Zellen innerhalb eines Zellclusters durch die ISH mithilfe der Antisense-Sonden nachweisen lassen und sich gut von Kollagen Typ 1 negativen Zellen differenzieren lassen (Abbildung 11B). In der EZM sind keine Reaktionen nachzuweisen, dies verdeutlicht die Spezifität der Reaktion. Die Doppelmarkierung mit GFP ermöglicht eine erfolgreich Lokalisation von Kollagen Typ 1 an CPCs (KD) (Abbildung 11C). Es zeigen sich einzelne positive Reaktionen innerhalb der Zellen, die sich von der GFP Markierung abheben. Bei der Verwendung der Sense-Sonde als Negativkontrolle, zeigten sich bei diesem Versuch keine positiven Reaktionen.

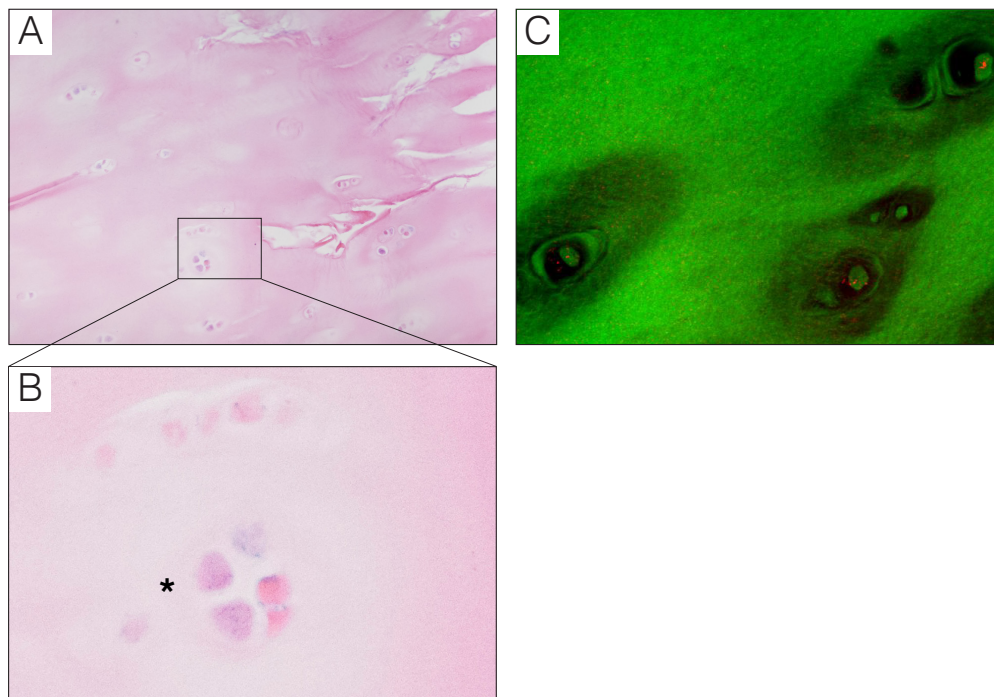


Abb 11: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 1 bei Knockdown für Runx2(KD) Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie

(A) Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen Typ 1 an CPCs (KD) nach ISH durch Antisense-Sonde, Vergrößerung 40x. (B) Detailvergrößerung von Kollagen Typ 1 innerhalb der Zellcluster von CPCs (KD) nach Migration, Vergrößerung 200x.(C) Doppelmarkierung Kollagen Typ 1 und GFP an CPCs (KD) durch Konfokalmikroskopie

* = Positivfärbung.

3.7.3 Kollagen Typ 2 an Kontroll-CPCs

Die Ergebnisse für die Kollagen Typ 2 mRNA Expression an Gewebeschnitten nach dem ex-vivo Migrationsexperiment zeigen nur sehr vereinzelt positive Reaktionen. In der Abbildung 12A kann gezeigt werden, dass es in der mittleren Gewebeschicht der Knorpelschnitte überwiegend zu keiner Reaktion für Kollagen Typ 2 durch die Antisense-Sonde der ISH Reaktion gekommen ist. In der Detailvergrößerung (Abbildung 12B) ist nur ein einzelnes Signal an einer Zelle lokalisierbar. Generell zeigt sich, dass eine Detektion von Kollagen Typ 2 nach ISH bei CPCs ohne einen Knockdown für den Transkriptionsfaktor Runx2 kaum möglich ist. Durch die kLSM kann verdeutlicht werden, dass innerhalb eines Zellclusters nur einzelne CPCs, welche gleichzeitig eine Markierung für GFP aufweisen, positiv auf die Antisense-Sonde reagieren (Abbildung 12C). Es handelt sich bei den untersuchten Zellen somit um CPCs, welche in das Knorpelgewebe migriert sind.

Die Negativkontrollen durch die Sense-Sonden in Abbildung 12D-F zeigt, dass es nicht zu unspezifischer Bindung im Rahmen der ISH gekommen ist. Die Zellen und EZM blieben frei von positiven Reaktionen. Die Effektivität der Hybridisierungsreaktion kann auch in der Detailvergrößerung (Abbildung 12E) bestätigt werden. Bei der Doppelmarkierung der CPCs von GFP und Kollagen Typ 2 durch kLSM ist in der Negativkontrolle lediglich GFP innerhalb der Zellen lokalisierbar (Abbildung 12F).

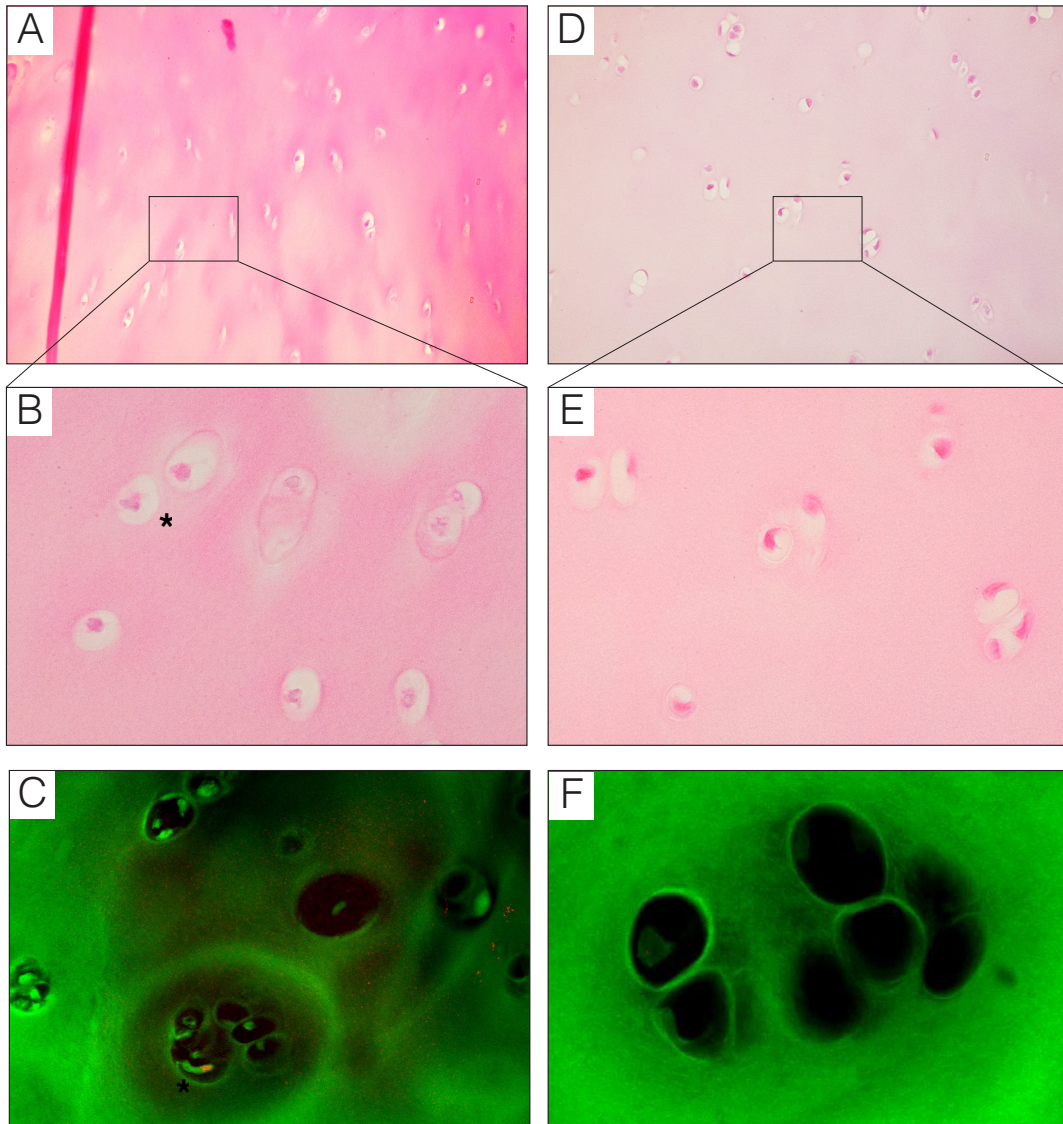


Abb. 12: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 2, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie

(A) Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen Typ 2 nach ISH, Vergrößerung 40x. (B) Detailvergrößerung der Kollagen Typ 2 Antisense-Sonde, Vergrößerung 200x. (C) Doppelmarkierung von Kollagen Typ 1 mit GFP im Konfokalmikroskop, Vergrößerung 200x. (D) Lichtmikroskopische Darstellung der Negativkontrolle für Kollagen Typ 2 durch die Sense-Sonde nach ISH, Vergrößerung 40x. (E) Detailvergrößerung der Kollagen Typ 1 Sense-Sonde, Vergrößerung 200x. (F) Doppelmarkierung von Kollagen Typ 1 und GFP in der Negativkontrolle durch Konfokalmikroskopie, Vergrößerung 200x.

* = Positivfärbung.

3.7.4 Kollagen Typ 2 (Knockdown Runx2)

Die folgenden Abbildungen zeigen Paraffinschnitte von Knorpelgewebe nach Migration von CPCs, die einen Knockdown des Transkriptionsfaktors Runx2 aufweisen und deren Expression für Kollagen Typ 2 mRNA. Von links nach rechts erkennt man die oberflächliche Schicht des Knorpelgewebes gefolgt von einer mittleren Schicht, in der eine vermehrte Ausbildung von Zellcluster festzustellen war (Abbildung 13A). Der kaudale Anteil bleibt durch die Präparation scharf abgegrenzt. Innerhalb der Zellcluster konnten durch die Detailvergrößerung einige CPCs mit positiven Reaktionen für Kollagen Typ 2 lokalisiert werden (Abbildung 13B). Es zeigte sich in Abbildung 13C, dass diese Zellen ebenfalls positiv für GFP waren. Dies verdeutlicht, dass es sich um migrierte CPCs handelt, bei denen eine eindeutige Lokalisation von Kollagen Typ 2 möglich ist. Die Reaktion für Kollagen Typ 2 lässt sich innerhalb der Zellen gut von GFP unterscheiden.

Um die Signifikanz der Untersuchung zu untermauern wurde ein weiteres Experiment an einem anderen Knorpel dargestellt. Hier konnte die Ausbildung von Zellclustern nicht festgestellt werden. Die Reaktion für Kollagen Typ 2 nach ISH konnte jedoch nachgewiesen werden. Es sind positive Reaktionen an einzelnen Zellen zu beobachten (Abbildung 13D). Ein Unterschied zu der Reaktion mit Zellen ohne Knockdown für Runx2 aus Abbildung 12 wird deutlich. In der Detailvergrößerung (Abbildung 13E) werden Zellen mit einer positiven Reaktion für Kollagen Typ2 neben negativen Reaktionen nachgewiesen. In der Doppelmarkierung ist eine gleichzeitige Darstellung von GFP mit den ISH-Reaktionen für Kollagen Typ 2 an den Runx2 Knockdown CPCs möglich (Abbildung 13F). Es ist festzustellen, dass die Reaktion für Kollagen Typ 2 in diesem Experiment an GFP markierten CPCs positiv ist.

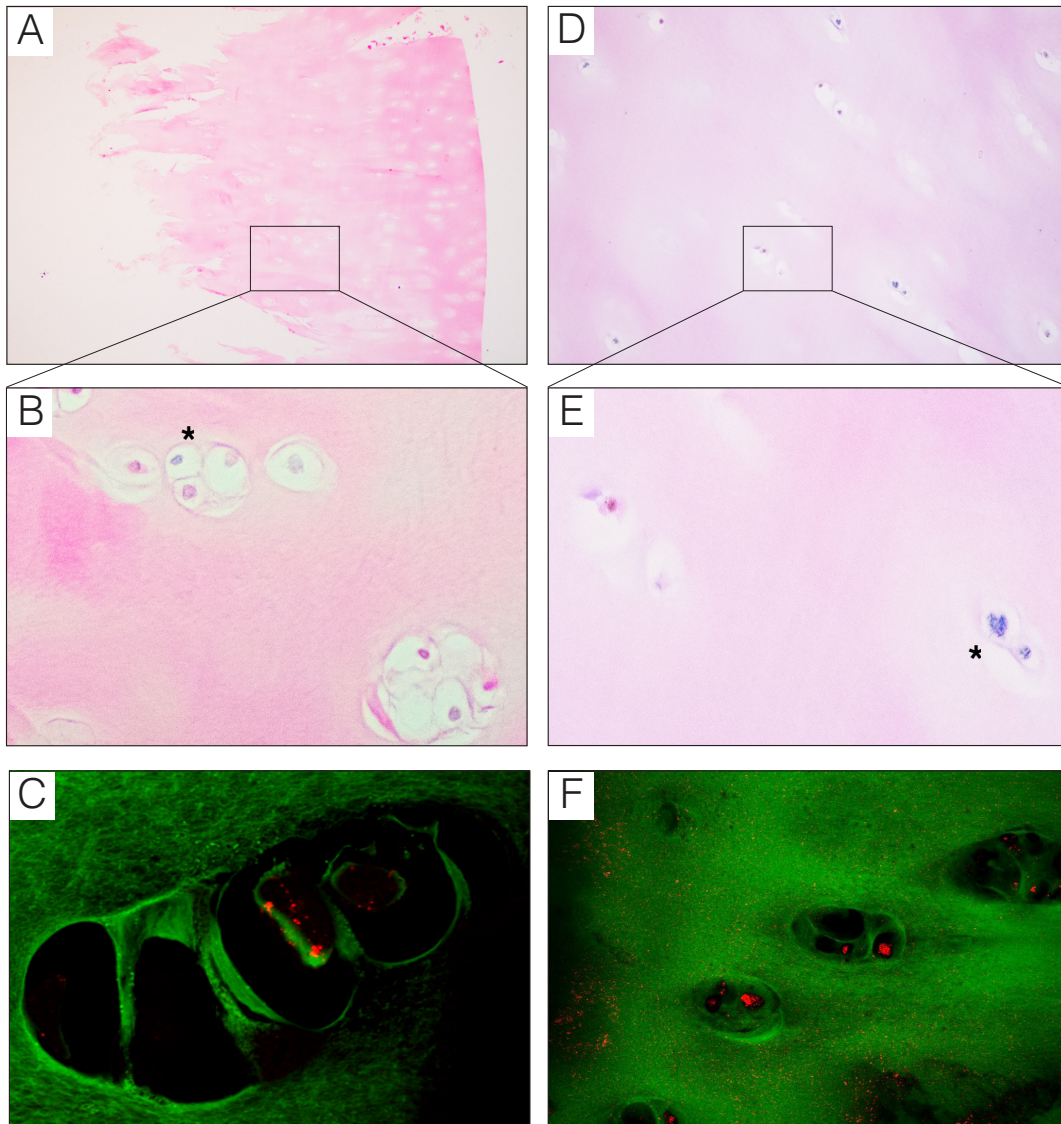


Abb. 13: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 2 bei Knockdown für Runx2, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie

(A) Lichtmikroskopische Darstellung von Kollagen Typ 2 nach ISH an CPCs (KD), Vergrößerung 40x. (B) Detailvergrößerung der Kollagen Typ 2 Antisense-Sonde innerhalb von Zellclustern, Vergrößerung 100x. (C) Doppelmarkierung von Kollagen Typ 2 mit GFP im Konfokalmikroskop, Vergrößerung 200x. (D) Lichtmikroskopische Darstellung für Kollagen Typ 2 durch die Antisense-Sonde nach ISH, Vergrößerung 40x. (E) Detailvergrößerung der Kollagen Typ 2 Antisense-Sonde an einzelnen CPCs, Vergrößerung 100x. (F) Doppelmarkierung von Kollagen Typ 2 und GFP durch Konfokalmikroskopie, Vergrößerung 100x.

* = Positivfärbung.

4. Diskussion

4.1 Einfluss von Runx2 und Sox9 in chondrogenen Progenitorzellen

Der Pathomechanismus der OA ist durch zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen sehr detailliert aufgedeckt wurden. Bei der OA kommt es zu degenerativen Prozessen des Knorpelgewebes, die durch zwei Phasen charakterisiert sind. Während der Abbauphase kommt es zur Verdauung der Matrix durch die Aktivität der Enzyme, welche von ortsständigen Chondrozyten produziert werden. Die Matrixsynthese ist gehemmt und der Zerfall des Knorpelgewebes wird beschleunigt. In der biosynthetischen Phase versuchen die ortsständigen Chondrozyten die zerstörte EZM zu reparieren (Goldring und Goldring 2007). Der Abbau von Kollagen Typ 2 als eines der wichtigsten Hauptbestandteile des hyalinen Knorpels durch MMP-13 und eine gleichzeitig stattfindende vermehrte Expression von Runx2 durch Chondrozyten des osteoarthrotischen Knorpelgewebes, welche durch Stress und unterschiedliche Entzündungssignale reguliert werden, ist ein wichtiger Mechanismus bei der OA (Goldring 2012). Wenn man den Transkriptionsfaktor Runx2 in diesen Zellen herunterreguliert, kommt es gleichzeitig zu einer vermehrten Expression von Kollagen Typ 2 (Wang et al. 2004). Weitere Untersuchungen zeigen den Einfluss von Sox9 auf eine gesteigerte Expression von Kollagen Typ 2 und Proteoglykanen in Chondrozyten des OA-Defekts und auf normale Chondrozyten (Cucchiari et al. 2007). In Chondrozyten und chondrogenen Progenitorzellen der Maus kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung von Runx2 auf den chondrogenen Marker Sox9 mit gesteigerter Expression für Kollagen Typ 2 (Lefebvre et al. 1997). Es ist momentan noch nicht realisierbar eine große Menge kompetenter Chondrozyten für eine zellbasierte Reparaturstrategie zu generieren, da es in Kultur zu einem Verlust von Sox9 und des knorpelähnlichen Phänotyps in diesen Zellen kommt (Khan et al. 2009).

Die Verwendung von Stammzellen zur Behandlung von Krankheiten wie der OA spielt in Zukunft eine wichtige Rolle. Für eine gezielte Therapie ist ein effizienter Gentransport zum besseren Verständnis der Zellbiologie von entscheidender Bedeutung (Kobayashi et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden humane chondrogene Progenitorzellen, die sowohl unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors Runx2 stehen, als auch Progenitorzellen mit einem Knockdown für diesen Transkriptionsfaktor verwendet. Der Einfluss von Runx2 und Sox9 auf CPCs und ihre Expression der wichtigsten Strukturproteine des hyalinen Knorpels, Kollagen Typ 2 und Kollagen Typ 1, können so näher beleuchtet werden. Die Stabilität des Knockdowns für den Transkriptionsfaktor Runx2 über einen iLenti-GFP-siRNA-Expression-Vektor konnte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt werden und ist 12 h nach Transfektion am größten. Durch die in-vitro Untersuchungen zeigte sich, dass ein Knockdown von Runx2 zu einer verstärkten Expression von Sox9 beiträgt und damit das chondrogene Potential dieser Zellen positiv beeinflusst wird. Die Expression für Kollagen Typ 2 in CPCs mit einem Knockdown für Runx2 nimmt zu. Gleichzeitig ist Kollagen Typ 1 in diesen Zellen herunterreguliert. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Untersuchung sowohl auf mRNA Ebene durch eine qRT-PCR Untersuchung sowie auf Proteinebene durch Western-Blot-Reaktion für die verwendeten CPCs bestätigt werden. Ergebnisse aus früheren Untersuchungen stehen im Einklang mit diesen Befunden (Koelling et al. 2009).

4.2 Migration und Detektion chondrogener Progenitorzellen

Eine weitere wichtige Eigenschaft der CPCs ist ihre Fähigkeit zur Migration. Eine Migration der CPCs aus osteoarthrotisch verändertem Knorpelgewebe bildete die Grundlage für umfangreiche Expressionsanalysen. Zusätzlich wurde durch ex-vivo Experimente die Fähigkeit zur Migration in erkranktes Knorpelgewebe erforscht. Der Knockdown von Runx2 führte dabei zu keiner Veränderung des Migrationspotentials von CPCs (Koelling et al. 2009)

Unter Anwendung der Reflektionsmethode (Jékely und Arendt 2007) wurde in dieser Arbeit der Rezeptor PDGF- β an CPCs dargestellt. PDGF ist ein effizientes Chemoattraktant für unterschiedliche Zelltypen. Die Stimulation von CPCs mit PDGF zeigt eine starke chemotaktische Reaktion. Die verschiedenen Liganden und Isoformen von PDGF besitzen unterschiedliche Affinität zu den PDGF-Rezeptoren (Tallquist und Kazlauskas 2004). Die spezifische Bindung an den Rezeptor und die damit verbundenen Unterschiede in der Signaltransduktion wirken sich auf die zelluläre Antwort aus. Auch die Rezeptordichte kann die migratorischen Eigenschaften der Zellen entscheidend beeinflussen. Es kommt zu einem Zusammenspiel von PDGF mit seinem Rezeptor. Das natürliche Vorkommen von PDGF im Nährmedium der Zellkultur, welches fetales Kälberserum (FCS) enthält, bietet eine Erklärung für die Migration der CPCs aus defektem Knorpelgewebe. Ein migratorisches Potential der CPCs, welches einzig von dem Mediumüberstand der Zellkultur herrührt, konnte in früheren Untersuchungen ebenfalls festgestellt werden (Joos et al. 2013). Die Migration der Zellen in Knorpelgewebe mit einem OA-Defekt könnte dementsprechend ebenfalls durch PDGF hervorgerufen werden.

Zellnekrosen, die mit Verletzungen des Knorpelgewebes assoziiert sind, können intrazelluläre Bestandteile freisetzen, welche als chemotaktische Signale für Progenitorzellen, Stammzellen und Leukozyten dienen. Zu diesen als „Alarmine“ bezeichneten Strukturmolekülen zählen sowohl mitochondriale DNA und Peptide, die Methionin enthalten sowie DNA-bindende Proteine wie das high-mobility group box Protein 1 (HMGB-1). Ihre Interaktion mit Rezeptoren wie RAGE (receptor for advanced glycation end products) und Toll-like Rezeptoren können ebenfalls die Migration von Progenitorzellen und Stammzellen initiieren (Seol et al. 2012). Lösliche Faktoren aus traumatisierten Knorpel freigesetzt, wirken somit chemoattraktiv auf CPCs, gleichzeitig führt die Freisetzung von IL-1 β und TNF- α zu einer reduzierten Migrationskapazität und einem reduziertem regenerativen Potential von Knorpel in vivo (Joos et al. 2013).

In der vorliegenden Untersuchung konnte zum ersten Mal mithilfe der Reflektionsmethode das Expressionsverhalten von GFP markierten CPCs in einem ex-vivo Migrationsexperiment untersucht werden.

4.3 Expression von Kollagen Typ 1 mRNA chondrogener Progenitorzellen

CPCs bei denen der Transkriptionsfaktor Runx2 nicht herunterreguliert ist, exprimieren nach einem Migrationsversuch in defektes Knorpelgewebe mRNA für Kollagen Typ 1. Sie zeigen ein übereinstimmendes Expressionsverhalten mit den in-vitro Untersuchungen für diesen Kollagentyp. Die Translation der mRNA in das Protein für Kollagen Typ 1 ist so wahrscheinlich. Da in den späten Stadien der OA Kollagen Typ 1 exprimierende Chondrozyten gefunden wurden, welche zur Bildung von Faserknorpel beitragen, kann angenommen werden, dass CPCs mit einer Expression für diesen Kollagentyp ein geringeres regeneratives Potential besitzen (Miosge et al. 1998). Die Untersuchung von Kollagen Typ 1 mRNA Expression ist wichtig, da es nicht nur in Faserknorpel gefunden wird sondern auch während der frühen Chondrogenese als Teil der Transformation von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten gebildet wird. In diesem Sinne stellt Kollagen Typ 1 auch einen Marker der frühen Chondrogenese dar. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, die bei der pränatalen Entwicklung des Kniegelenks gemacht wurden, wobei es vor der Entwicklung der Gelenkflächen zu einer Kondensation des Mesenchyms zwischen den langen Knochen kommt (Merida-Velasco et al. 1997).

Viele Studien konnten phänotypische Veränderungen während der Differenzierung von Chondrozyten im fetalen Knorpel der Wachstumsfuge in vivo und des in-vitro Verhaltens von Chondrozyten aufdecken. Einige Faktoren wie IL-1 führten zur Dedifferenzierung oder Modulation des Phänotyps der Chondrozyten und zu einem für Fibroblasten ähnlichen Phänotyp. Es kam zu einer ausbleibenden Expression von Kollagen Typ 2 in diesen Zellen und einer vermehrten Expression von Kollagen Typ 1 und 3 (von der Mark et al. 1977). In diesem Sinne könnte die Expression von Kollagen Typ 1 in CPCs als ein Zeichen der Dedifferenzierung zu einem fibroblastenähnlichen Phänotyp interpretiert werden. Durch die Präsenz von IL-1 β und TNF- α im arthrotischen Gelenk (Irie et al. 2003) könnte der pathogenetische Prozess begünstigt und die Regenerationskapazität der CPCs gehemmt werden indem die Expression von Kollagen Typ 1 forciert wird.

Zellen mit einem Knockdown für Runx2 sind in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls in der Lage Kollagen Typ 1 mRNA nach dem Migrationsexperiment zu synthetisieren.

Es wird deutlich, dass die so veränderten Zellen die Expression für Kollagen Typ 1 nicht vollständig inhibieren. Nach der Migration von CPCs (KD) konnte die Formation von Zellcluster beobachtet werden, einzelne Zellen innerhalb dieser Cluster waren für Kollagen Typ 1 jedoch nicht positiv. Eine Ausbildung von Zellclustern kann mit einer erhöhten Stammzellaktivität erklärt werden. Die zweidimensionale Kultivierungsmethode der verwendeten CPCs kann dazu geführt haben, dass eine vermehrte Expression für Kollagen Typ 1 möglich wurde. Dieser Einfluss kann durch die Verwendung einer dreidimensionalen Matrix während der Kultivierungszeit der CPCs abgeschwächt werden. Nach der Kultivierung von Chondrozyten in einer dreidimensionalen Umgebung unter der Präsenz von Nidogen-2, BMP-6 oder Laminin-1 konnte ein positiver Einfluss auf das chondrogene Potential dieser Zellen beobachtet werden. Nidogen-2 und Laminin-1 führten dabei zu einer signifikanten Reduktion von Runx2 und Kollagen Typ 1 (Schminke et al. 2013).

4.4 Expression von Kollagen Typ 2 mRNA chondrogener Progenitorzellen

Nach dem Migrationsversuch konnten in der ISH Reaktion nur sehr vereinzelt Zellen mit einer mRNA Expression für Kollagen Typ 2 nachgewiesen werden, diese besitzen keinen Genknockdown für Runx2. Die Translation in das Strukturprotein für Kollagen Typ 2, welches Hauptbestandteil gesunden hyalinen Knorpels darstellt, ist wenig wahrscheinlich. Das regenerative Potential und die Fähigkeit dieser Zellen zur Wiederherstellung der Knorpelmatrix kann somit als gering eingeschätzt werden. Statistische Microarrayanalysen konnten in früheren Untersuchungen eine erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-13 in chondrogenen Progenitorzellen nachweisen. Gene, welche für die Bildung von extrazellulären Matrixkomponenten des Knorpels, wie das cartilage oligomeric matrix protein (COMP) und Kollagen Typ 2a verantwortlich sind, zählten zu den Gene mit der geringsten Expression in CPCs (Seol et al. 2012).

Die Verwendung von CPCs nach Migration aus osteoarthrotischem Knorpelgewebe in der Therapie der OA ist ohne vorherige Beeinflussung des Expressionsverhaltens als fragwürdig einzuschätzen. Es kann im klinischen Einsatz zu einer vermehrten Produktion von den destruktiven Prozess begünstigenden Matrixproteinen kommen. Eine Untersuchung der migrierten Zellen auf Markerproteine wie MMP-13 könnten weitere Erkenntnisse über diesen Zusammenhang liefern. Der Einfluss verschiedener Faktoren wie Isolations- oder Kultivierungsbedingungen sowie das Geschlecht der Spender auf die CPCs können die Eigenschaften der Zellen modifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die physiologische Produktion von Testosteron bei Männern und die prämenopausale Konzentrationen von Östrogen in Frauen das chondrogene Potential der Zellen *in vitro* moduliert (Koelling und Miosge 2010). Die verringerte Expression von Kollagen Typ 2 in diesen Zellen kann auch durch einen reduzierten mechanischen Stimulus in den Knorpelproben hervorgerufen worden sein. Es ist bekannt, dass im Knorpelgewebe des Kniegelenks wichtige mechanische Regulationsmechanismen ausgeprägt sind, welche die Entwicklung von Gelenkknorpel beeinflussen (Khan et al. 2007). Mechanische Belastung kann effektiv die Synthese der beiden Hauptstrukturbestandteile des Knorpels, Glykosaminoglykan und Kollagen Typ 2 induzieren. Bei der Verwendung von PGA-Materialien zur Kultivierung von Zellen können Zeichen der Redifferenzierung von Zellen durch erhöhte Kollagen Typ 2 Werte im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe beobachtet werden. Die Anwendung simulierter mechanischer Scherkräfte und Kompressionsmodelle, welche die physiologischen Belastungen im Kniegelenk sehr genau wiedergeben, können das Expressionsmuster dieser Zellen entscheidend verändern (Shahin und Doran 2012). Dieser Einfluss könnte sich auch auf die Kollagenexpression der CPCs nach Migration auswirken und sollte in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden. Die Ergebnisse für CPCs mit einem Knockdown für Runx2 zeigen demgegenüber eine andere Expression für Kollagen Typ 2 nach Migration. Es kommt zur Bildung von Zellclustern mit vielfältigen Kollagen Typ 2 exprimierenden Zellen, die sich von Kollagen Typ 2 negativen Zellen unterscheiden lassen.

Die ultrastrukturelle Untersuchung dieser Zellen im Konfokalmikroskop zeigt, dass es innerhalb der mit GFP markierten Zellen zu einer eindeutigen Lokalisation der mRNA für Kollagen Typ 2 gekommen ist. Zur Kontrolle wurde in analogen Migrationsexperimenten dieses Ergebnis wiederholt (n=5). Dabei konnte mehrfach gezeigt werden, dass CPCs (KD) in der Lage sind nach Migration in Knorpelgewebe Kollagen Typ 2 auf mRNA Ebene zu synthetisieren. Eine Translation mit Bildung des Strukturproteins kann als wahrscheinlich eingeschätzt werden. Damit besitzen diese Zellen wahrscheinlich ein erhöhtes regeneratives Potential. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese CPCs in der Lage sind die Neubildung von Knorpelmatrix zu ermöglichen. Eine Vergleichsanalyse, welche eine quantitative Veränderung für Kollagen Typ 2 im Untersuchungsgewebe ermitteln kann, würde eine abschliessende Einschätzung dieser Hypothese ermöglichen. Ein zeitlicher Verlauf des Expressionsniveaus für Kollagen Typ 2 nach erfolgreicher Integration der Zellen könnte Aufschluss über die Stabilität der transfizierten Zellen im osteoarthrotischen Gewebe liefern. Die Methode des Knockdowns des Transkriptionsfaktors Runx2 mithilfe von siRNA ist eine labortechnische Methode, um das chondrogene Potential der CPCs zu erhöhen. Diese Technik kann bei CPCs in-vivo nicht angewendet werden und macht die Suche nach Alternativen erforderlich. Um das Ziel zu erreichen, das chondrogene Potential von CPCs auf anderem Wege zu erhöhen, könnten tissue engineering Verfahren angewendet werden, welche eine Kultivierung der Zellen in einer 3D-Matrix nach erfolgter Migration aus dem Knorpelgewebe verfolgen. Eine 3D-Matrix ist der physiologischen in-vivo Situation des Knorpelgewebes ähnlicher als die oft angewendete zweidimensionale Kultivierungsmethode.

Unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen konnte ein unterschiedliches Verhalten der CPCs beobachtet werden. Auf Genexpressionsebene konnte die Induktion von Kollagen Typ 2 sowohl in 2D, als auch in 3D gezeigt werden. In einem Kollagen-Gel fand eine gesteigerte Expression statt (Joos et al. 2013). In Kombination mit ausgewählten Wachstumsfaktoren wie TGF- β 3 sowie BMP-6 kann unter 3D-Kultivierungsmethoden ein erhöhtes chondrogenes Potential in den CPCs erzielt werden, die Expression für Runx2 war reduziert (Koelling et al. 2009).

Die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in Knorpeldefekte wurde erstmals erfolgreich in der Verbindung mit einer Kollagenmatrix und anderen Biomaterialien durchgeführt und zeigt, dass die Anwendung von gewebespezifischen Kultivierungsmethoden einen wichtigen Einfluss auf den Erfolg einer zellbasierten Therapie besitzt (Skowronski und Rutka 2013). Um festzustellen, ob Progenitorzellen des Gelenkknorpels geeignete Kandidaten für die Reparatur von Knorpelgewebe darstellen, wurde eine Pilotstudie an Ziegen durchgeführt, welche den experimentellen Beweis der prinzipiellen Machbarkeit liefern sollte. Es konnte in dieser Studie eine Identifikation und Charakterisierung einer Subpopulation von Progenitorzellen in gesundem Gelenkknorpel durchgeführt werden. Die in-vivo Reparaturstudie bietet ein Beispiel für eine exzellente Integration von Biomembranen, in welchen sich Progenitorzellen der Ziege aufhielten, in defektes Knorpelgewebe. Es konnten jedoch kein Unterschiede im Reparaturprozess zwischen diesen Zellen und expandierten, tiefen Chondrozyten gefunden werden, welche momentan als Goldstandard für solche Versuche gelten (Williams et al. 2010). In weiteren Zellanalysen konnte demonstriert werden, dass Progenitorzellen des Knorpels durch ihre hohe Verdoppelungsrate und der Zellkulturbedingungen Anomalien aufweisen. Es kann zum Verlust des kurzen Arms für Chromosom 20 kommen und unterstreicht die Dringlichkeit eine Untersuchung des Karyotyps dieser Zellen vor ihrer klinischer Anwendung durchzuführen (Williams et al. 2010).

Ein weiterer Effekt der Langzeitkultivierung ist die Zellseneszenz, bei der es zu einer Verkürzung der Telomere kommt. Stammzellen behalten ihre Telomerlänge und zeigen eine unendliche Replikationskapazität. Dadurch besteht die Möglichkeit eine isolierte Population von Progenitorzellen zu charakterisieren und deren Eignung für eine zellbasierte Therapie festzustellen (Allen und Baird 2009).

Verschiedene Studien konnten eine Subpopulation von Progenitorzellen in der oberflächlichen Zone der Knorpelmatrix identifizieren (Dowthwaite et al. 2004, Grogan et al. 2009). Durch quantitative Real time PCR Versuche konnte im Vergleich mit anderen Zelltypen ein Expressionsprofil für CPCs ermittelt werden, welches eine große Ähnlichkeit mit Synovialzellen besitzt. Im Vergleich mit Chondrozyten waren wichtige Strukturprotein wie Kollagen Typ2a gegenüber CPCs 20-fach, in Synovialzellen um den Faktor 34 erhöht. Die Expression von Sox9 war in dieser Untersuchung im Vergleich von Chondrozyten mit CPCs nicht signifikant verändert. Gene, welche in Beziehung zu Inflammationsprozessen stehen, wie Interleukin 6 (IL-6), sind in CPCs im Vergleich zu Chondrozyten hoch reguliert. Es kann spekuliert werden, dass CPCs in die oberflächennahe Knorpelschicht migrieren und durch eine lokalisierte Gewebsverletzung eine Aktivierung und Proliferation erfahren. Es deutet in dieser Untersuchung vieles darauf hin, dass CPCs ohne vorherige Manipulation nicht besonders geeignet sind, um eine Matrixregeneration im Knorpelgewebe anzuregen. Es scheint eher das CPCs Teil einer proinflammatorischen Signalkaskade sind und auf sezernierte Alarmine in beschädigtem Knorpel reagieren. Durch das Zusammenspiel mit HMGB-1 könnten sie zu einer verstärkten proinflammatorischen Reaktion im Knorpelgewebe beitragen (Zhou et al. 2014). Eine Analyse des Einflusses von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren auf migrierte CPCs, die während der OA eine Rolle spielen, kann weitere Erkenntnisse über die Nische, in der sich die Zellen aufhalten, liefern.

In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass CPCs mit einem Runx2 Knockdown, die in OA Knorpelgewebe ex-vivo migriert sind in der Lage sind Kollagen Typ 2 mRNA zu synthetisieren. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen CPCs mit einem Knockdown von Runx2 als geeignete Kandidaten für die Regeneration des Gelenkknorpel erscheinen.

5. Zusammenfassung

Osteoarthritis ist eine degenerative Gelenkerkrankung mit einer langsamen Zerstörung von Knorpel und umliegendem Gewebe, sie führt zu Bewegungseinschränkungen und Schmerzen. Das Ziel der Wiederherstellung von Knorpelgewebe nach traumatischen Verletzungen befasst sich im Rahmen von alternativen Therapiekonzepten mit der Rekrutierung von Zellen mit Stammzellcharakteristika, welche die Selbstregeneration des Gewebes unterstützen. Die Verwendung von chondrogenen Progenitorzellen bildet dabei einen innovativen, vielversprechenden Therapieansatz bei der Suche nach einer erfolgreichen Methode der Knorpelneubildung. In dieser Untersuchung konnte zum ersten Mal erfolgreich das regenerative Potential von CPCs in einem ex-vivo Migrationsexperiment dargestellt werden. Zellen mit einem Genknockdown des Transkriptionsfaktors Runx2 sind in der Lage nach Migration in osteoarthrotisches Knorpelgewebe Kollagen Typ 2 auf mRNA Ebene zu exprimieren. Der wechselseitige Einfluss der Transkriptionsfaktoren Runx2 und Sox9 wird beleuchtet und es kann eine Runx2 vermittelte Abhängigkeit der Expression von Kollagen Typ 2 dokumentiert werden. Die Neubildung von hyalinem Knorpelgewebe mithilfe migrationsfähiger Zellen wird dadurch wahrscheinlicher. Differenzierte Stammzellen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen klinischer Therapieansätze der Osteoarthritis und ihre chondrogene Prägung kann sicherstellen, dass es zu keiner ungewollten Bildung von Narbengewebe kommt. Es ist von enormer Bedeutung therapeutisch wichtige Gene in CPCs zu identifizieren und eine sichere und effiziente Methode zur Genmanipulation zu finden. Dadurch kann eine langfristige und stabile Expression von Matrixproteinen für eine erfolgreiche Knorpelregeneration sichergestellt werden. Darüber hinaus muss untersucht werden, wie eine Kombination von genetisch modifizierten CPCs mit tissue Engineering Konzepten für eine optimale Synthese von Reparaturgewebe in-vivo zu realisieren ist. Das Ziel einer natürlichen und funktionellen Wiederherstellung von Gelenkknorpeldefekten mithilfe körpereigener Zellen rückt damit näher.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Transfektionsvektor pGem-T Easy zur Klonierung der PCR Produkte für die Herstellung von mRNA Sonden der in-situ-Hybridisierung	S.35
Abbildung 2	Quantitative Auswertung der qRT-PCR Analysen für Kollagen Typ 1 und 2 an CPCs	S.66
Abbildung 3	Western Blot für Kollagen Typ 2 und Runx2 an transfizierten CPCs und ihre quantitative Auswertung	S.67
Abbildung 4	Western Blot für Sox-9 an transfizierten CPCs und ihre quantitative Auswertung	S.69
Abbildung 5	Zellkultur chondrogener Progenitorzellen vor und nach Transfektion mit GFP	S.70
Abbildung 6	Immunhistologie von Kollagen Typ 2 in gesundem Knorpel mit Negativkontrolle	S.71
Abbildung 7	Immunhistologische Darstellung von GFP an CPCs nach Migration Lichtmikroskop und Konfokalmikroskop der CPCs mit GFP und DAPI Markierung	S.73
Abbildung 8	Immunhistologie für Rezeptor PDGF- β nach Migrationsexperiment. Darstellung mit NBT/BCIP Methode	S.74
Abbildung 9	Reflektionsmethode im Konfokalmikroskop und 3D-Darstellung des Rezeptors PDGF- β . Doppelfärbung mit GFP	S.76
Abbildung 10	In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 1, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie. Reflektionsmethode für Doppelmarkierung	S.78
Abbildung 11	In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 1 bei Knockdown mit Runx2(KD) für CPCs Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie. Reflektionsmethode für Doppelmarkierung	S.79
Abbildung 12	In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 2, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie an CPCs ohne Knockdown Reflektionsmethode für Doppelmarkierung	S.81
Abbildung 13	In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ 2 bei Knockdown für Runx2, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie. Reflektionsmethode für Doppelmarkierung	S.83

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Protokoll für das Einbetten von Gewebeproben	S.27
Tabelle 2	Reaktionsansatz für PCR zum Umschreiben von mRNA in cDNA	S.29
Tabelle 3	Primersequenzen für qRT PCR	S.29
Tabelle 4	Reaktionsansatz für PCR	S.30
Tabelle 5	Protokoll für qRT-PCR	S.30
Tabelle 6	Ligationsprotokoll für Klonierung der PCR Produkte in Vektor pGEM-T easy	S.33
Tabelle 7	Reaktionsansatz für den enzymatischen Verdau der Plasmid DNA	S.38
Tabelle 8	Reaktionsansatz für in-vitro Transkription	S.41
Tabelle 9	Verdünnungsreihe für die Kontrolle der effizienten Sondenmarkierung mithilfe des Dot-Blot	S.43
Tabelle 10	Zusammensetzung der Hybridisierungslösung für die in-situ-Hybridisierung	S.48
Tabelle 11	verwendete Antikörper der Immunhistochemie	S.49
Tabelle 12	Protokoll für die Entparaffinierung der Gewebeproben vor Immunhistologie	S.50
Tabelle 13	Pipettierschema des Master Mix Ansatzes für qRT-PCR	S.55
Tabelle 14	Protokoll für qRT-PCR	S.55
Tabelle 15	Western Blot Gelzusammensetzungen	S.58
Tabelle 16	verwendete Primärantikörper für Western Blot	S.62
Tabelle 17	verwendete Sekundärantikörper für Western Blot	S.62

7. Literaturverzeichnis

Aigner T, Dietz U, Stoss H, von der Mark K (1995): Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes. *Lab Invest* 73, 236-43

Allen ND, Baird DM (2009): Telomere length maintenance in stem cell populations. *Biochim Biophys Acta* 1792, 324-8

Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M (2004): Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 50, 1522-32

Bank RA, Soudry M, Maroudas A, Mizrahi J, TeKoppele JM (2000): The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis Rheum* 43, 2202-10

Beane OS, Darling EM (2012): Isolation, characterization, and differentiation of stem cells for cartilage regeneration. *Ann Biomed Eng* 40, 2079-97

Brew CJ, Clegg PD, Boot-Handford RP, Andrew JG, Hardingham T (2010): Gene expression in human chondrocytes in late osteoarthritis is changed in both fibrillated and intact cartilage without evidence of generalised chondrocyte hypertrophy. *Ann Rheum Dis* 69, 234-40

Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005): Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54, 465-80

Cendekiawan T, Wong RW, Rabie AB (2008): Temporal expression of SOX9 and type II collagen in speno-occipital synchondrosis of mice after mechanical tension stimuli. *Angle Orthod* 78, 83-8

Chen FH, Rousche KT, Tuan RS (2006): Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 373-82

Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, Rosenquist C, Qvist P (2001): Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone* 29, 209-15

Cucchiaroni M, Thurn T, Weimer A, Kohn D, Terwilliger EF, Madry H (2007): Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* 56, 158-67

van der Kraan PM, van den Berg WB (2012): Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 20, 223-32

von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Muller P (1977): Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* 267, 531-2

Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B (2004): The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 117, 889-97

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999): A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13, 1025-36

Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, Lefebvre V (2012): Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 22, 597-609

Emans PJ, van Rhijn LW, Welting TJ, Cremers A, Wijnands N, Spaapen F, Voncken JW, Shastri VP (2010): Autologous engineering of cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3418-23

- Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y (2000): Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 133, 635-46
- Freeman MA (1999): Is collagen fatigue failure a cause of osteoarthrosis and prosthetic component migration? A hypothesis. *J Orthop Res* 17, 3-8
- Garvican ER, Vaughan-Thomas A, Innes JF, Clegg PD (2010): Biomarkers of cartilage turnover. Part 1: Markers of collagen degradation and synthesis. *Vet J* 185, 36-42
- Gay S, Muller PK, Lemmen C, Remberger K, Matzen K, Kuhn K (1976): Immunohistological study on collagen in cartilage-bone metamorphosis and degenerative osteoarthrosis. *Klin Wochenschr* 54, 969-76
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97, 33-44
- Goldring MB, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626-34
- Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzi RM (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, 202-20
- Goldring MB (2012): Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4, 269-85
- Gouttenoire J, Valcourt U, Ronziere MC, Aubert-Foucher E, Mallein-Gerin F, Herbage D (2004): Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage. *Biorheology* 41, 535-42

- Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK (2009): Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 11, R85
- Heng BC, Cao T, Lee EH (2004): Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells* 22, 1152-67
- Irie K, Uchiyama E, Iwaso H (2003): Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee* 10, 93-6
- Jackson A, Gu W (2009): Transport Properties of Cartilaginous Tissues. *Curr Rheumatol Rev* 5, 40
- Jeffery AK (1975): Osteophytes and the osteoarthritic femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 57, 314-24
- Jékely G, Arendt D (2007): Cellular resolution expression profiling using confocal detection of NBT/BCIP precipitate by reflection microscopy. *BioTechniques* 42, 751-755
- Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner RE (2013): Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* 15, R119
- Khan IM, Redman SN, Williams R, Dowthwaite GP, Oldfield SF, Archer CW (2007): The development of synovial joints. *Curr Top Dev Biol* 79, 1-36
- Khan IM, Bishop JC, Gilbert S, Archer CW (2009): Clonal chondroprogenitors maintain telomerase activity and Sox9 expression during extended monolayer culture and retain chondrogenic potential. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 518-28

Knudson CB, Knudson W (2001): Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 69-78

Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Fukazawa T, Chen Y, Navarro-Alvarez N, Tanaka N (2005): Gene delivery to embryonic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75, 10-8

Koelling S, Clauditz TS, Kaste M, Miosge N (2006): Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 8, R56

Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4, 324-35

Koelling S, Miosge N (2009): Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1399-405

Koelling S, Miosge N (2010): Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62, 1077-87

Komori T, Kishimoto T (1998): Cbfa1 in bone development. *Curr Opin Genet Dev* 8, 494-9

Krugluger J, Knahr K (2001): Minimally invasive disc surgery: a review. *Int Orthop* 24, 303-6

Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155-63

Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B (1997): SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17, 2336-46

- Lindahl A, Brittberg M, Peterson L (2003): Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp* 249, 175-86; discussion 186-9, 234-8, 239-41
- Linsenmayer TF, Toole BP, Trelstad RL (1973): Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. *Dev Biol* 35, 232-9
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012): Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64, 1697-707
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998): Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4, 415-28
- Mayne R (2006): Collagen Types and Chondrogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 599,
- McKibbin B, Holdsworth FW (1966): THE NUTRITION OF IMMATURE JOINT CARTILAGE IN THE LAMB. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 48-B, 793-803
- Merida-Velasco JA, Sanchez-Montesinos I, Espin-Ferra J, Rodriguez-Vazquez JF, Merida-Velasco JR, Jimenez-Collado J (1997): Development of the human knee joint. *Anat Rec* 248, 269-78
- Miosge N, Waletzko K, Bode C, Quondamatteo F, Schultz W, Herken R (1998): Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 6, 278-85

- Mo JH, Lee DJ, Chung PS, Chung YJ (2013): Regenerative and proliferative activities of chondrocyte based on the degree of perichondrial injury in rabbit auricular cartilage. *Eur Arch Otorhinolaryngol*,
- Moreira-Teixeira LS, Georgi N, Leijten J, Wu L, Karperien M (2011): Cartilage tissue engineering. *Endocr Dev* 21, 102-15
- Muhammad H, Schminke B, Miosge N (2013): Current concepts in stem cell therapy for articular cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 13, 541-8
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH (1997): Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-9
- Nakagawa T, Lee SY, Reddi AH (2009): Induction of chondrogenesis from human embryonic stem cells without embryoid body formation by bone morphogenetic protein 7 and transforming growth factor beta1. *Arthritis Rheum* 60, 3686-92
- Nerlich AG, Wiest I, von der Mark K (1993): Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthritis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63, 249-55
- Ohlstein B, Kai T, Decotto E, Spradling A (2004): The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol* 16, 693-9
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45
- Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S (2001): Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33

Prockop DJ (1998): What holds us together? Why do some of us fall apart? What can we do about it? *Matrix Biol* 16, 519-28

Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA (1979): The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N Engl J Med* 301, 13-23

Radin EL, Martin RB, Burr DB, Caterson B, Boyd RD, Goodwin C (1984): Effects of mechanical loading on the tissues of the rabbit knee. *J Orthop Res* 2, 221-34

Rath-Deschner B, Daratsianos N, Duhr S, Girmann N, Winter J, Kroll F, Reichert C, Jager A, Gotz W (2010): The significance of RUNX2 in postnatal development of the mandibular condyle. *J Orofac Orthop* 71, 17-31

Rich A, Crick FH (1961): The molecular structure of collagen. *J Mol Biol* 3, 483-506

Ryan MC, Sandell LJ (1990): Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J Biol Chem* 265, 10334-9

Salter DM, Godolphin JL, Gourlay MS (1995): Chondrocyte heterogeneity: immunohistologically defined variation of integrin expression at different sites in human fetal knees. *J Histochem Cytochem* 43, 447-57

Schminke B, Muhammad H, Bode C, Sadowski B, Gerter R, Gersdorff N, Burgers R, Monsonogo-Ornan E, Rosen V, Miosge N (2013): A discoidin domain receptor 1 knock-out mouse as a novel model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Cell Mol Life Sci*,

Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA (2012): Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum* 64, 3626-37

- Shahin K, Doran PM (2012): Tissue engineering of cartilage using a mechanobioreactor exerting simultaneous mechanical shear and compression to simulate the rolling action of articular joints. *Biotechnol Bioeng* 109, 1060-73
- Shi SR, Shi Y, Taylor CR (2011): Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem* 59, 13-32
- Simon TM, Jackson DW (2006): Articular cartilage: injury pathways and treatment options. *Sports Med Arthrosc* 14, 146-54
- Skoog T, Johansson SH (1976): The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts. *Plast Reconstr Surg* 57, 1-6
- Skowronski J, Rutka M (2013): Osteochondral lesions of the knee reconstructed with mesenchymal stem cells - results. *Ortop Traumatol Rehabil* 15, 195-204
- Stephan S, Sherratt MJ, Hodson N, Shuttleworth CA, Kielty CM (2004): Expression and supramolecular assembly of recombinant alpha1(viii) and alpha2(viii) collagen homotrimers. *J Biol Chem* 279, 21469-77
- Stricker S, Fundele R, Vortkamp A, Mundlos S (2002): Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 245, 95-108
- Tallquist M, Kazlauskas A (2004): PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 205-13
- Tesche F, Miosge N (2005): New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. *Histol Histopathol* 20, 329-37

- Wang X, Manner PA, Horner A, Shum L, Tuan RS, Nuckolls GH (2004): Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 963-73
- Wang Y, Belflower RM, Dong YF, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H (2005): Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis. *J Bone Miner Res* 20, 1624-36
- Wegner M (1999): From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1409-20
- Williams R, Khan IM, Richardson K, Nelson L, McCarthy HE, Anabalsi T, Singhrao SK, Douthwaite GP, Jones RE, Baird DM (2010): Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PLoS One* 5, e13246
- Yang QH, Zhuang HX, Zeng YJ, Guo BY, Guo WH, Xie X (2008): [Biomechanical properties of the costal cartilage and its significance in the timing of ear reconstruction]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 24, 104-7
- Zhou C, Zheng H, Seol D, Yu Y, Martin JA (2014): Gene expression profiles reveal that chondrogenic progenitor cells and synovial cells are closely related. *J Orthop Res* 32, 981-8
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006): Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19004-9
- Zhu Y, Oganessian A, Keene DR, Sandell LJ (1999): Type IIA procollagen containing the cysteine-rich amino propeptide is deposited in the extracellular matrix of prechondrogenic tissue and binds to TGF-beta1 and BMP-2. *J Cell Biol* 144, 1069-80

Danksagung

Mein besonderer Danke gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für seine uneingeschränkte Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit. Ich danke ihm, dass ich durch ihn die Freude und das Interesse an wissenschaftlichen Arbeiten entdeckt habe.

Ich danke Frau Christa Bode, die mich mit ihrer großartigen Kompetenz und Erfahrung bei der Arbeit im Labor unterstützt hat und mir bei allen zellbiologischen Experimenten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Andrea Bernhard möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistologischen Experimente danken. Frau Dr. Gertrude Bunt und den Mitarbeitern am MOLCI (Molecular and Optical Live Cell Imaging) möchte ich für die Hilfe bei der Arbeit am Konfokalmikroskop danken.

Herrn Dr. Hayat Muhammad möchte ich für seine ständige Hilfe und wissenschaftlichen Beitrag danken. Der Gedankenaustausch mit ihm war sehr wertvoll und hat mir stets positive Impulse gegeben.

Meinen Mitdoktoranden und den Mitarbeitern der AG Orale Biologie und Geweberegeneration danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Ich danke meiner Familie für ihre Geduld und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 04.09.1985 wurde ich als zweites Kind meiner Eltern Dr. Dirk Wagner und Dr. Petra Angela Wagner, geborene Kuhn, in Hagenow geboren. Mein Vater ist Zahnarzt, meine Mutter starb im Oktober 1986. Aus zweiter Ehe mit Hendrikje Wagner, geborene Asmus habe ich zwei weitere Geschwister.

Von 1992 bis 1996 besuchte ich die Grundschule Annastraße in Magdeburg. Anschließend wechselte ich auf das Hegelgymnasium in Magdeburg, an dem ich im Jahre 2005 mein Abitur ablegte. Von Oktober 2005 bis August 2006 absolvierte ich meine Wehrdienstzeit bei der Bundeswehr. Meine berufliche Ausbildung zum Zahntechniker, von November 2006 bis Februar 2009, im Dentallabor (Zahntechnik Wilmerstaedt) in Magdeburg, konnte ich erfolgreich abschließen.

Zum Sommersemester 2009 nahm ich das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität in Göttingen auf. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im März 2010 ab, das Physikum im September 2011. Im April 2013 begann ich mit den experimentellen Arbeiten zu meiner Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. med Nicolai Miosge in der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration der Abteilung Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik. Das zahnärztliche Staatsexamen werde ich im Sommersemester 2015 ablegen.