

Identifizierung neuer
Coregulatoren von SOX9 und RUNX2
in chondrogenen Progenitorzellen in der
Osteoarthrose

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsgrundprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Gökhan Cingöz

aus Witzenhausen

Göttingen 2015

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Nicolai Miosge	Orale Biologie und Geweberegeneration Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik Universitätsmedizin Göttingen
Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender	Entwicklungsbiologie Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. Nicolai Miosge (Referent)	Orale Biologie und Geweberegeneration Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik Universitätsmedizin Göttingen
Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender (Koreferentin)	Entwicklungsbiologie Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie Georg-August-Universität Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission

Prof. Dr. Gerhard Braus	Institut für Mikrobiologie und Genetik Molekulare Mikrobiologie und Genetik Georg-August-Universität Göttingen
Prof. Dr. Uwe Groß	Medizinische Mikrobiologie Institut für Medizinische Mikrobiologie Universitätsmedizin Göttingen
Prof. Dr. Michael Kessel	Entwicklungsbiologie Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Georg-August-Universität Göttingen
Prof. Dr. Ernst A. Wimmer	Entwicklungsbiologie Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Gelenke	2
1.2 Gliederung des Gelenkknorpels	3
1.3 Zusammensetzung und Funktion des Gelenkknorpels	4
1.4 Ätiologie und Pathogenese von Osteoarthritis	4
1.5 Therapien in der Behandlung von Osteoarthritis	6
1.6 Tissue Engineering und Stammzelltherapie	8
1.7 Chondrogene Progenitorzellen	10
1.8 Die molekulare Regulation der Chondrogenese	11
1.9 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.2 Geräte	20
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.4 Kits	21
2.1.5 Puffer	22
2.1.6 Antibiotika	22
2.1.7 Zelllinien und Stämme	23
2.1.8 Plasmide	24
2.1.9 Oligonukleotide	25
2.1.10 Antikörper	26
2.2 Zellbiologische Methoden	27
2.2.1 Herkunft humaner Proben und Präparation	27
2.2.2 Isolierung von chondrogenen Progenitorzellen	27
2.2.3 Zellanzucht, Ernte, Zählung und Passagierung	27
2.2.4 Selektionierung transgener Zellen	28
2.2.5 Kryokonservierung und Revitalisierung	28

2.3	Molekularbiologische Methoden	29
2.3.1	Reverse Transcription-gekoppelte quantitative Echtzeit-PCR	29
2.3.2	Primerdesign	32
2.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	32
2.3.4	Präparation von Plasmid-DNA	33
2.3.5	Glycerinkultur	34
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.7	Transfektion humaner Zelllinien	35
2.4	Biochemische Methoden	36
2.4.1	Zelllyse	36
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	36
2.4.3	Immunpräzipitation	37
2.4.4	Nachweis der Protein-Protein Interaktion	38
2.4.5	Pulldown Assay	39
2.4.6	Dialyse	40
2.4.7	Fällung von Proteinen	41
2.4.8	SDS-PAGE	41
2.4.9	Färbung von Polyacrylamid-Gelen	43
2.4.10	Western Blot	43
2.4.11	Strippen und Wiederverwendung der PVDF-Membran	44
2.5	Massenspektrometrische Analysen	45
2.6	Bioinformatische Analysen	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Testung von Antikörpern	47
3.1.1	SOX9 spezifische Antikörper	47
3.1.2	Das Molekulargewicht von SOX9	47
3.1.3	Testung RUNX2 spezifischer Antikörper	48
3.1.4	Das Molekulargewicht von RUNX2	49
3.2	Lentiviraler Knockdown von RUNX2 bzw. SOX9 in CPCs	50
3.2.1	Der Knockdown von RUNX2 reguliert SOX9 hoch	50
3.2.2	Der Knockdown von SOX9 reguliert RUNX2 hoch	50
3.3	Immunpräzipitationen	52
3.3.1	Immunpräzipitation von SOX9	52
3.3.2	LC-MS/MS-Analyse der SOX9-Präzipitate	53
3.3.3	Immunpräzipitationen von RUNX2	56
3.3.4	LC-MS/MS-Analyse der RUNX2-Präzipitate	57
3.4	Pulldown-Versuche	60
3.4.1	Pulldown SOX9-assoziiierter Proteine	60
3.4.2	LC-MS/MS-Analyse des SOX9 Pulldowns	60
3.4.3	Bioinformatische Analyse des Pulldowns von SOX9	63
3.4.4	Pulldown RUNX2-assoziiierter Proteine	66
3.4.5	LC-MS/MS-Analyse des RUNX2 Pulldowns	68
3.4.6	Bioinformatische Analyse des Pulldowns von RUNX2	68

3.5	Knockdown RUNX2-assoziiierter Proteine	71
3.5.1	Knockdown von LEMD2	71
3.5.2	Knockdown von TMPO	72
3.6	Überexpression SOX9-assoziiierter Proteine	74
3.6.1	HSPA8 stimuliert die Expression von RUNX2 und SOX9	74
3.6.2	LASP1 wirkt nicht auf die Expression von RUNX2 oder SOX9	75
3.6.3	RAB5C stimuliert die Genexpression von RUNX2 und SOX9	76
3.6.4	YWHAE stimuliert die Genexpression von SOX9	77
3.6.5	DDX5 stimuliert die Expression von SOX9	78
3.7	Co-Immunpräzipitation von DDX5	78
4	Diskussion	81
4.1	Der Knockdown von RUNX2 reguliert SOX9 hoch	82
4.2	Der Knockdown von SOX9 reguliert RUNX2 hoch	83
4.3	Immunpräzipitationen	84
4.3.1	Immunpräzipitation von SOX9	85
4.3.2	Immunpräzipitation von RUNX2	86
4.4	Pulldown	86
4.4.1	Pulldown von SOX9-Proteinen	87
4.4.2	Pulldown von RUNX2-Proteinen	87
4.5	LC-MS/MS Analyse	88
4.5.1	LC-MS/MS Analyse immunpräzipitierter Proteine	88
4.5.2	LC-MS/MS Analyse Pulldown-isolierter Proteine	89
4.6	Kandidaten	90
4.6.1	Knockdown potentieller Coregulatoren von RUNX2	90
4.6.2	Überexpression potentieller Coregulatoren von SOX9	92
4.7	Fazit und Ausblick	98
	Zusammenfassung	99
	Abstract	101
	Literaturverzeichnis	103

Abbildungsverzeichnis

1.1	Lebenszeitprävalenz der Osteoarthritis	2
1.2	Molekulare Bestandteile und Organisation des Gelenkknorpels	5
1.3	Histologisches Bild der Osteoarthritis	7
1.4	Stadien der osteochondralen Differenzierung	12
1.5	Domänen und posttranslationale Modifikationen von SOX9	14
1.6	Domänen und posttranslationale Modifikationen von RUNX2	15
3.1	Western Blot Analyse SOX9-spezifischer Antikörper	48
3.2	Molekulargewicht von SOX9	48
3.3	Western Blot Analyse RUNX2-spezifischer Antikörper	49
3.4	Molekulargewicht von RUNX2	49
3.5	Genexpression von RUNX2 und SOX9 in CPC241ht-siRUNX2	51
3.6	Genexpression von RUNX2 und SOX9 in CPC241ht-siSOX9	51
3.7	Immunpräzipitation von SOX9	52
3.8	Immunpräzipitation von SOX9 im Gradientengel	53
3.9	MS-Analyse der Immunpräzipitation von SOX9	54
3.10	Immunpräzipitation von RUNX2	56
3.11	Immunpräzipitation von RUNX2 im SDS-Gradientengel	57
3.12	MS-Analyse der Immunpräzipitation von RUNX2	58
3.13	Pulldown SOX9-assoziiierter Zielproteine	61
3.14	LC-MS/MS-Analyse des Pulldowns von SOX9	62
3.15	Gefilterte Differenzial-Bindungsanalyse von SOX9	63
3.16	Pulldown RUNX2-assoziiierter Zielproteine	66
3.17	MS-Analyse des Pulldowns von RUNX2	67
3.18	Gefilterte Differenzial-Bindungsanalyse von RUNX2	68
3.19	Knockdown von LEMD2 und Auswirkungen auf die Expression	71
3.20	Knockdown von TMPO und Auswirkungen auf die Genexpression	72
3.21	Überexpression von HSPA8	74
3.22	Überexpression von LASP1	75
3.23	Überexpression von RAB5C	76
3.24	Überexpression von YWHAE	77
3.25	Überexpression von DDX5	78
3.26	Co-Immunpräzipitation von DDX5 mit SOX9	79

Tabellenverzeichnis

1.1	Therapieformen der Osteoarthrose-Behandlung	9
2.1	Chemikalien und Reagenzien	19
2.2	Geräte	20
2.3	Verbrauchsmaterialien	21
2.4	Kits	21
2.5	Puffer	22
2.6	Antibiotika	22
2.7	ORF Expressionsvektoren	24
2.8	siRNA Lentivektoren	24
2.9	Primer für die RT-qPCR	25
2.10	Primer für Sequenzierungen	25
2.11	Antisense-Oligonukleotide (siRNA)	25
2.12	Antikörper	26
2.13	qPCR-Protokoll	31
2.14	Pipettierschema für SDS-Gele	42
3.1	SOX9-präzipitierte Proteine mit den höchsten logFC-Werten	55
3.2	RUNX2-präzipitierte Proteine mit den höchsten logFC-Werten	59
3.3	SOX9 Pulldown Proteine mit den höchsten logFC-Werten	64
3.4	RUNX2 Pulldown Proteine mit den höchsten logFC-Werten	69
4.1	Übersicht von Proteinen mit einer LEM-Domäne	91

Abkürzungsverzeichnis

Neben den allgemein üblichen Ausdrücken und SI-Einheiten wurden folgende Abkürzungen in dieser Arbeit verwendet.

ACAN	Aggrecan	13
ACI	autologe Chondrozytenimplantation	8
AOT	autologe osteochondrale Transplantation	8
APS	Ammoniumperoxodisulfat	42
BAF	barrier-to-autointegration factor	91
BCA	bicinchoninic acid	36
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	32
BMI	Body-Mass-Index	5
BMP	bone morphogenetic protein	12
bp	Basenpaar	29
CBB	Coomassie-Brillant-Blau	43
CBFA1	core-binding factor subunit alpha-1	15
CBFB	core-binding factor beta subunit	16
CITED1	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	93
COL2A1	collagen, type II, alpha 1	13
CPC	chondrogene Progenitorzelle	11
CREBBP	CREB binding protein	86
DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	96
DIM	Dimerisierungsdomäne	14
Dsh	Dishevelled	95
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	27
DMSO	Dimethylsulfoxid	19
DSS	Disuccinimidyl-Suberat	53
DTT	Dithiothreitol	19

E. coli	<i>Escherichia coli</i>	23
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	19
ERK	extracellular signal-regulated kinases	91
EZM	Extrazelluläre Matrix	4
FCS	Fetales Kälberserum	19
FGF	fibroblast growth factor	12
GAF	GTPase activating protein	95
GEF	Guanine nucleotide exchange factor	95
HDAC4	histone deacetylase 4	96
HEK	human embryonic kidney	23
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee	25
HKG	housekeeping Gene	31
HMG	high-mobility group	13
HSPA8	heat shock 70 kDa protein 8	92
hTERT	human telomerase reverse transcriptase	22
Kan	Kanamycin	24
KAT5	K(lysine) acetyltransferase 5	14
LASP1	LIM and SH3 protein 1	88
LB	Lysogeny Broth	32
LC	Flüssigchromatographie	45
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	45
LEM	lamina-associated polypeptide 2/thymopoetin, emerin, MAN1	91
LEMD2	LEM domain containing 2	71
logFC	log fold change	56
MAPK	mitogen-activated protein kinase	91
MSC	Mesenchymale Stammzelle	4
Na-DOC	Natriumdesoxychololat	20
NEB	New England Biolabs	23
Neo	Neomycin	24
NES	nuclear export signal	14
NKX3-2	NK3 homeobox 2	93
NLS	nuclear localization sequence	15
NMTS	nuclear matrix targeting sequence	15
OA	Osteoarthrose	1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	41

PBS	phosphate buffered saline ‚Phosphatgepufferte Salzlösung‘	20
PCR	polymerase chain reaction ‚Polymerasekettenreaktion‘	29
qPCR	Quantitative Echtzeit PCR	29
RT-qPCR	Reverse Transkription mit qPCR-Kopplung	16
PD	Pulldown	36
PDGF	platelet-derived growth factor	97
PKA	cAMP-dependent protein kinase A	13
PIAS	protein inhibitor of activated STAT	14
POD	Peroxidase	26
PQA	Prolin-, Glutamin- und Alanin-reiche Domäne	14
PST	Prolin-, Serin-, Threonin-reiche Domäne	15
PVDF	Polyvinylidenfluorid	44
QA	Glutamin/Alanin-reiche Domäne	15
Rab	Ras-related proteins in brain	94
RAB5C	Member RAS Oncogene Family	88
RISC	RNA-induced silencing complex	16
RIPA	radio immunoprecipitation assay	36
RNAi	RNA-Interferenz	16
ROCK	Rho-associated protein kinase	13
RT	Raumtemperatur	30
RUNX2	runt-related transcription factor 2	12
SDS	Natriumdodecylsulfat	20
siRNA	small interfering RNA	16
SH3	Src-homology 3	93
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9	12
TA	Transaktivierungsdomäne	14
TAE	Tris-Acetat-EDTA	34
TBS-T	Tris-Buffered Saline and Tween 20	44
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	20
TGF	transforming growth factor	12
TMPO	Thymopoietin	71
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	20
YWHAE	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein, Epsilon	88

1

Einleitung

Osteoarthrose (OA) ist eine degenerative Erkrankung der Gelenke. Sie wird auch als Arthrose oder im Angloamerikanischen als Osteoarthritis bezeichnet. Die sukzessive Destruktion des Gelenkknorpels und der umliegenden Strukturen äußern sich in Schmerzen und Funktionsstörungen. Versteifung der Gelenke und Verlust der Mobilität sind die Folge (Felson 2006). Sie gilt weltweit als die häufigste chronische Gelenkerkrankung des Menschen und tritt insbesondere im hohen Lebensalter auf (Abbildung 1.1). In der Bundesrepublik Deutschland sind in der Altersgruppe ab 60 Jahren etwa die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer von OA betroffen (Reginster 2002). Aufgrund der erhöhten Lebenserwartung und des demographischen Wandels in industrialisierten Ländern ist mit einem Anstieg des Vorkommens zu rechnen. Schätzungen zu Folge wird OA im Jahr 2020 die viert häufigste Ursache für Erwerbsunfähigkeit sein (Woolf und Pfleger 2003). Für die Betroffenen bedeutet die Erkrankung den erheblichen Verlust an Lebensqualität und verursacht zudem einen beträchtlichen volkswirtschaftlichen Schaden. Zum einen werden verstärkt Leistungen des Gesundheitssystems in Anspruch genommen und zum anderen entstehen hohe indirekte Kosten durch Invalidität, Arbeitsunfähigkeit sowie Frühberentungen (Rabenberg 2013).

Die natürliche Regeneration des Gelenkknorpels ist durch die geringe Dichte an Chondrozyten und den niedrigen Metabolismus sowie durch die fehlende Blutversorgung des Gelenkknorpels begrenzt (Kock et al. 2012). Die fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels umfasst den Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) sowie geringe und ineffiziente Regenerationsprozesse (Heinegard und Saxne 2011).

Die derzeit verfügbaren Therapien der Osteoarthrosebehandlung dienen der Verbesserung der Funktionalität und Lebensqualität des Patienten. Sie zielen auf Linderung der Symptome ab und sind eher durch mittelfristigen Behandlungserfolg gekennzeichnet (Lohmander und Roos 2007). In Kurzzeitstudien verliefen regenerative Therapien durch knochenmarkstimulierende Techniken, die Transplantation autologen Knorpels oder biotechnisch hergestellten Transplantaten (engl. *graft*) erfolgreich. Allerdings ist der Erfolg auf kleinere Läsionen beschränkt. Die Wiederherstellung des natürlichen Gelenkknorpels stellt mit seinen besonderen biomechanischen Eigenschaften immer noch eine große Her-

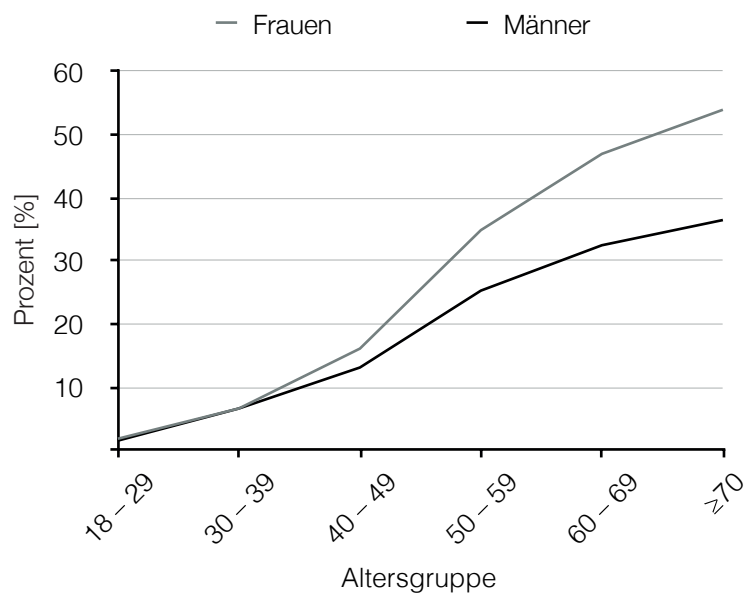


Abbildung 1.1: Lebenszeitprävalenz der Osteoarthritis. Mit steigendem Alter ist eine deutliche Zunahme der Lebenszeitprävalenz der OA zu beobachten. Vor dem 30. Lebensjahr ist eine OA-Erkrankung mit 1,6% bei Frauen sowie Männern verhältnismäßig selten. Zwischen dem 40. und 49. Lebensjahr steigt die Prävalenz auf 14,9% an. Frauen sind mit 16,6% stärker als Männern mit 13,3% betroffen. In der Altersgruppe ab 60 sind etwa die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer betroffen. Grafik entnommen und abgewandelt nach Rabenberg (2013, Abschnitt 8).

ausforderung dar. Angesichts dessen bedarf es weiterhin der Erforschung der Pathogenese der OA und den Ausbau bisheriger und Entwicklung neuer Strategien auf dem Gebiet der regenerativen zellbiologischen Therapien, insbesondere in der Behandlung der OA in den späten Stadien des Krankheitsverlaufs.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst der Aufbau und die Funktion der Gelenke erläutert. Anschließend wird auf die zugrunde liegende Ätiologie und Pathogenese der OA eingegangen. Dabei werden die biochemischen und zellulären Besonderheiten des Gelenkknorpels hervorgehoben und die derzeit verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten und die neuesten Ansätze auf dem Gebiet der regenerativen Zelltherapien in der Behandlung der OA vorgestellt. Anschließend werden die regulatorischen Prozesse der Chondrogenese besprochen und das Ziel dieser Arbeit sowie die Herangehensweise erläutert.

1.1 Aufbau und Funktion der Gelenke

Die Wirbeltiere (*Vertebrata*) entwickelten im Laufe der Evolution ein komplexes System aus Knochen, Knorpel, Bändern, Sehnen und Muskeln, um dem Körper und seinen Organen als Stützgerüst zu dienen und diesem Bewegungen zu ermöglichen. In diesem Muskel-Skelett-System bauen die kontraktile Muskeln Spannungen auf und leiten die entstehenden Kräfte über Bänder und Sehnen an die Knochen weiter. Gelenke verbinden die einzelnen Knochen des Menschen und ermöglichen dem Skelettsystem seine Beweg-

lichkeit. Diese beweglichen Verbindungen zwischen den sonst starren Knochen sind für ihre jeweiligen Funktionen hochspezialisiert und ermöglichen das Auffangen und Verteilen von Zug- und Stoßkräften.

Die Gelenke lassen sich in unechte (Synarthrosen) und echte Gelenke (Diarthrosen) unterscheiden. Während die Knochenenden bei einer Synarthrose über Bindegewebe oder hyalinen Knorpel direkt miteinander verbunden sind, zeichnen sich Diarthrosen durch den Gelenkspalt und die Gelenkkapsel (lat. *Capsula articularis*) aus. Der Gelenkspalt ist Teil der Gelenkhöhle (lat. *Cavitas articularis*) und wird mit dieser von der Gelenkkapsel umschlossen. Die Gelenkkapsel wird in eine äußere Faserschicht (lat. *Membrana fibrosa*) und eine stark durchblutete Gelenkinnenhaut oder Synovialmembran (lat. *Membrana synovialis*) unterschieden (Sobotta et al. 2010). Die Gelenkhöhle ist mit der Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit) gefüllt, die von der Synovialmembran produziert wird. Diese zähflüssige und nährstoffreiche Substanz enthält Hyaluronsäure und Lubricin. Diese Substanzen bilden einen natürlichen Gleitfilm auf der sehr glatten Knorpeloberfläche und ermöglichen eine weitestgehend reibungslose Bewegung zwischen den artikulierenden Elementen (Loeser et al. 2012, Greene et al. 2011). Zudem fängt die Synovialflüssigkeit Druckbelastungen auf und versorgt das gefäßlose Knorpelgewebe mit Nährstoffen und transportiert Stoffwechselprodukte ab (Muir 1995).

1.2 Gliederung des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel weist beim erwachsenen Menschen in den meisten großen Gelenken eine Schichtdicke von 1–4 mm auf (Shepherd und Seedhom 1999, Frisbie et al. 2006). Im Lichtmikroskop ist eine vertikale Gliederung des Knorpels in vier Zonen erkennbar. Diese Zonen weisen eine unterschiedliche Zusammensetzung von Matrixmolekülen und Chondrozyten mit unterschiedlichen Phänotypen auf (Buckwalter und Mankin 1998).

Die Mineralisierungszone enthält Kalziumphosphatkristalle. Sie ist dem subchondralen Knochen aufgelagert und bildet eine Übergangszone zum nicht mineralisiertem hyalinen Knorpel (Goldring 2012). Eine wenige Mikrometer dicke Grenzlinie (engl. *tidemark*) trennt die Mineralisierungszone von der darüber liegenden Radiärfaser- oder Transitionalzone. Aufgrund der radiär verlaufenden Kollagenfasern sind die Chondrone in dieser Zone senkrecht zur Gelenkoberfläche orientiert. In der Übergangs- oder Intermediärzone überkreuzen sich die Kollagenfasern. Hier zeigen die Chondrone keine einheitliche Ausrichtung. Die Gelenkoberfläche wird von der Tangential- oder Superficialzone gebildet. Im Gegensatz zur Intermediärzone sind hier sowohl die Kollagenfasern als auch die Chondrone parallel zu der Gelenkoberfläche ausgerichtet (Poole 1997). Die Chondrone weisen eine flache und ellipsoide Form auf (Buckwalter und Mankin 1998).

Im Gegensatz zum Knochen handelt es sich beim Knorpel um ein avaskuläres Gewebe. Die eingebetteten Chondrozyten sind auf die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch Diffusion von der Synovialflüssigkeit bzw. aus dem subchondralen Knochen angewiesen. So besteht ein Konzentrationsgefälle jeweils von der Tangentialzone sowie der Mineralisierungszone zur Übergangszone. Mit dem Alter können sich jedoch, von dem subchondralen Knochen ausgehend, Blutgefäße und Nervenfasern bilden und in die Mineralisierungszone einwandern (Houard et al. 2013). Der gesunde Knorpel zeichnet sich durch ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Synthese von Matrixkomponenten

aus. Eine Störung dieses Gleichgewichtes, mit Begünstigung katabolischer Prozesse, liegt dem Verlauf von OA zu Grunde.

1.3 Zusammensetzung und Funktion des Gelenkknorpels

Der Gelenkknorpel ist ein gefäßloses Bindegewebe. Sie besteht im wesentlichen aus extrazellulärer Matrix (EZM) und Wasser (Abbildung 1.2). Im menschlichen Körper kommen drei Arten von Knorpelgeweben mit unterschiedlichen biomechanischen Eigenschaften vor. Entsprechend ihrer Zusammensetzung wird zwischen hyalinem, elastischem und Faserknorpel unterschieden (Morris et al. 2003). Der Gelenkknorpel der meisten Gelenkflächen besteht aus hyalinem Knorpel (Kuettner 1992). Die Hauptbestandteile der Matrix machen Kollagene (Kollagen Typ II, Typ IX und Typ XI), Glykoproteine und wasserbindende Proteoglykane (Aggrecan) aus (Heinegard und Saxne 2011). Aggrecan bildet mit Hyaluronan riesige Proteoglykan-Aggregate, die mit den Kollagenfibrillen vernetzt sind und hohe Mengen an Wasser binden. So macht der Wasseranteil ca. 80 % des Feuchtgewichts aus. Diese Zusammensetzung verleiht dem hyalinen Knorpel seine besonderen biomechanischen Eigenschaften (Morgelin et al. 1995). Bei Druckbelastung lässt sich der hyaline Knorpel geringfügig, durch den Austritt von Wasser, komprimieren und nimmt bei Druckentlastung seinen Ausgangszustand wieder ein. Diese Druckelastizität führt außerdem zu einer gleichmäßigen Verteilung der an den Gelenkoberflächen auftretenden Kräfte auf den subchondralen Knochen (Huber et al. 2000).

Neben diesen extrazellulären Bestandteilen enthält der Gelenkknorpel auch eine zelluläre Komponente. Während der Embryonalentwicklung differenzieren mesenchymale Stammzellen (MSCs) zu Chondroblasten und sekretieren die Bestandteile der Knorpelmatrix (Goldring et al. 2006). Die Bildung der ersten Knorpelmatrix lässt die zunächst sehr dicht stehenden Chondroblasten auseinander rücken. Aus den sich noch teilenden Chondroblasten bilden sich isogene Zellgruppen von Chondrozyten. Diese Gruppe wird zusammen mit dem umgebenden Knorpelhof als Chondron bezeichnet. Die Chondrone bilden zusammen mit dem umgebenden territorialen Matrixsaum die Territorien. Die Matrixareale zwischen den Territorien werden als Interterritorien bezeichnet (Poole 1997). Eingebettet in die EZM sind die Chondrozyten verantwortlich für den Umsatz der Matrixbestandteile. In dem gesundem hyalinem Knorpel befinden sich die Chondrozyten in einer stabilen Ruhephase, in der nur ein geringer Umsatz der Matrixkomponenten stattfindet. So beträgt die Halbwertszeit von Aggrecan etwa 120 Tage. Die Beständigkeit von Kollagen Typ II überrascht mit einer extrem langen Halbwertszeit von etwa 120 Jahren (Houard et al. 2013).

1.4 Ätiologie und Pathogenese von Osteoarthritis

OA kann nicht nur als eine degenerative Erkrankung der Gelenke und der umliegenden Strukturen verstanden werden – vielmehr handelt es sich dabei um eine Gruppe von Erkrankungen mit unterschiedlichen Ätiologien, die zu einer Degeneration der Gelenke führen (Moskowitz 2007). Ungünstige mechanische Belastungen, beispielsweise durch Gelenkfehlstellungen oder Trauma-bedingte lokale oder systemische Inflammation, ein

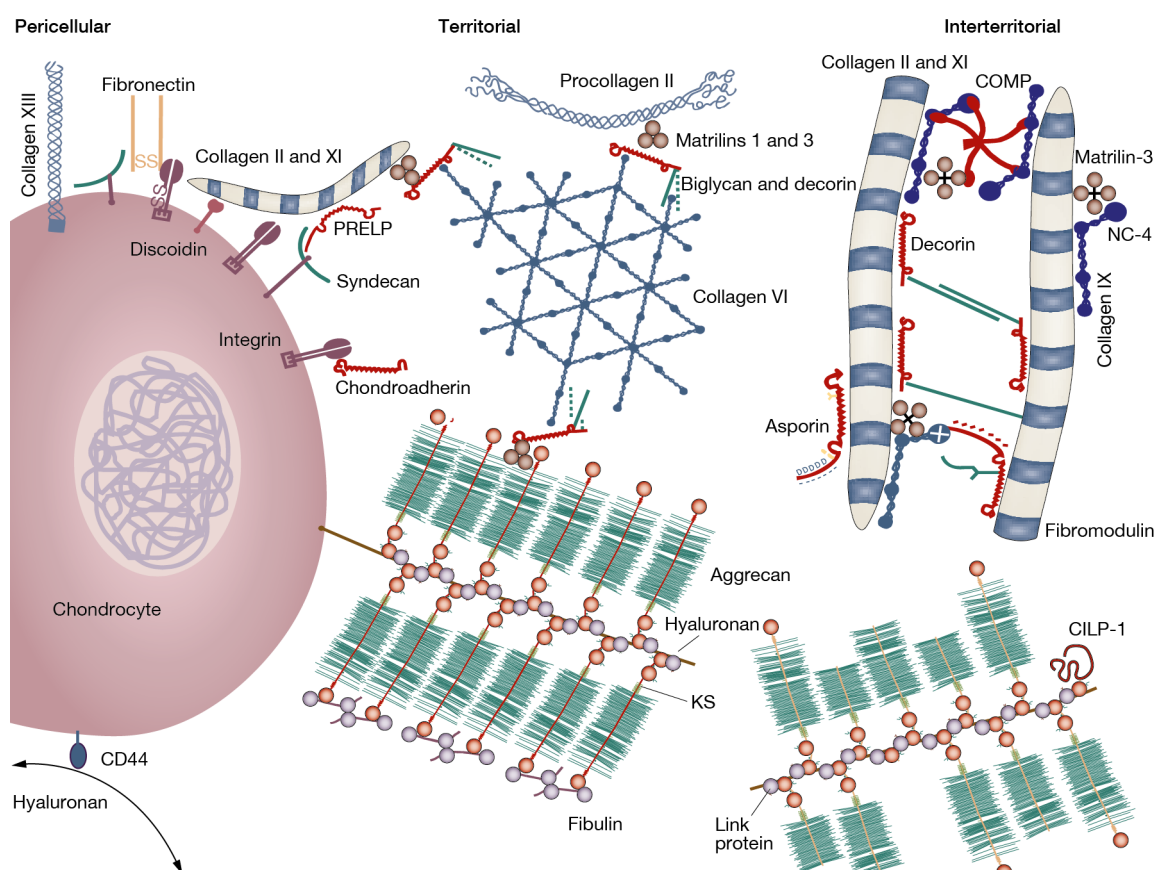


Abbildung 1.2: Molekulare Bestandteile und Organisation des Gelenkknorpels. Die Chondrozyten umgebende Knorpelmatrix wird entsprechend der Distanz zu den Chondrozyten in die perizelluläre, territoriale und interterritoriale Zone unterteilt. Des Weiteren unterscheiden sich die Bestandteile in den verschiedenen Zonen. Die Chondrozyten stehen über Rezeptoren auf der Zelloberfläche unmittelbar mit Bestandteilen der perizellulären Matrix in Kontakt, z. B. über CD44 mit Hyaluronan. Die territoriale Matrix folgt direkt der perizellulären Matrix und ist unweit von der Zelle entfernt. Am weitesten entfernt liegt die interterritoriale Matrix. Abkürzungen: *cartilage intermediate layer protein 1* (CILP-1), *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), *chondroitin sulfate* (CS), *keratan sulfate* (KS), *proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein* (PRELP). Entnommen und abgewandelt nach Heinegard und Saxne (2011).

erhöhter *Body-Mass-Index* (BMI), metabolische Störungen und genetische Prädispositionen können Risikofaktoren für die Entwicklung und Verlauf dieser Erkrankung darstellen (Blagojevic et al. 2010). Die Pathomechanismen umfassen eine Veränderung der Zusammensetzung der Matrixbestandteile – verursacht durch enzymatischen Abbau der EZM, mangelhafte bzw. veränderte Synthese neuer Matrixbestandteile – das Absterben von Zellen und abnormale Aktivierung und hypertrophe Differenzierung der Zellen des Gelenkknorpels (Goldring und Goldring 2010).

Die OA wird in primäre und sekundäre OA unterschieden. Während der primären OA keine eindeutige Ursache zugeordnet werden kann, sind sekundäre Arthrosen die Folgen angeborener oder erworbener Erkrankungen bzw. Verletzungen (Altman 1995). Unabhängig von der Ursache können Stressfaktoren zu Gewebeschäden oder einer Neustruk-

turierung des Gelenkknorpels führen, die sich auf dessen biophysikalische Eigenschaften auswirken. Beispielsweise reagieren die Chondrozyten auf biomechanische Belastungen durch eine erhöhte anabolische Aktivität und der Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Goldring und Goldring 2007). Während dauerhafte schädliche Kompressionen den Gehalt an Proteoglykanen verringern und die Synthese von Matrixkomponenten reduzieren, führen dynamische Kompressionen zu einer erhöhten Syntheseaktivität (Guilak et al. 2004). Ein gestörtes Gleichgewicht des Knorpelstoffwechsels führt zu einem vermehrten Abbau von Kollagen und Aggrecan (Poole 1997). Diesen Abbauprozessen wirken die Chondrozyten durch eine vermehrte Synthese von Matrixkomponenten entgegen. So ist das histologische Bild von geschädigtem Gelenkknorpel geprägt von einem erhöhten Anteil an Faserknorpel (Fibrillation), als Substitut für den degradierten hyalinen Knorpel (Abbildung 1.3 C). Im Gegensatz zu hyalinem Knorpel enthält er weniger Zellen und einen erhöhten Anteil an Kollagen Typ I. Faserknorpel ist ein sehr straffes und druckfestes Bindegewebe und erlaubt zunächst weitgehend normale Gelenkfunktionen. Die geringere Resistenz gegenüber Belastungen macht sich u. U. erst nach Jahren bemerkbar, wenn es zu irreversiblen Schäden kommt. Es bilden sich tiefe Risse (Fissuren) wodurch Reibungskräfte verstärkt auftreten und zu einer Abtragung der Knorpelschichten (Abrasionen) führen (vgl. Abbildung 1.3 A und B). Der dabei entstehende Knorpeldetritus reichert sich in der Synovialflüssigkeit an und kann zu Reizungen an der Synovialmembran führen sowie Entzündungsreaktionen hervorrufen. Die Ausdünnung der Knorpelschicht hat einen Verlust der Druckelastizität und damit auch eine ungleichmäßige Kraftübertragung zwischen den Gelenken sowie eine zunehmende Belastung des subchondralen Knochens zur Folge. Die mineralisierte Zone zeigt eine Verdichtung, Verdickung und Vermehrung der Grenzlinie (Abbildung 1.3 D). Neben dem Gelenkknorpel und der Synovialmembran können auch die stützenden Bänder, Sehnen, Muskeln sowie der subchondrale Knochen in Mitleidenschaft gezogen werden (Goldring und Goldring 2010).

1.5 Therapien in der Behandlung von Osteoarthritis

Das Ziel jeder therapeutischen Behandlung besteht primär in der Linderung von Schmerzen und der Wiederherstellung bzw. Verbesserung der Bewegungsfähigkeit. Die derzeit verfügbaren Therapien umfassen konservative und operative Maßnahmen (Tabelle 1.1). Bei den konservativen Therapien steht die Gewichtsreduktion, Änderung von gelenkbelastenden Verhaltensweisen sowie Physio-, Ergo- und physikalische Therapien im Vordergrund, um ein Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen und eine Linderung zu erreichen. Zusätzliche medikamentöse Therapien sollen Entzündungen und Schmerzen entgegen wirken, eine erhöhte Belastung der Gelenke wieder zulassen und die Lebensqualität der betroffenen Patienten erhöhen (Hochberg et al. 2012). Operative Maßnahmen sind angebracht, wenn die Patienten mit konservativen Methoden nicht mehr behandelbar sind (Altman et al. 2000). Die Art der operativen Maßnahme richtet sich nach dem Schweregrad der Arthritis und dem Beschwerdebild des Patienten. Bei leichter bis mittelgradiger Arthritis werden gelenkerhaltende Operationen und bei schwerer Arthritis werden gelenkersetzende Operationen durchgeführt. Die gelenkerhaltenden Operationen umfassen arthroskopische Methoden zur Beseitigung von mechanischen Irritationen, z. B. störende Knochenwucherungen, Knorpelauffaserungen und -ablösungen (Rabenberg 2013).

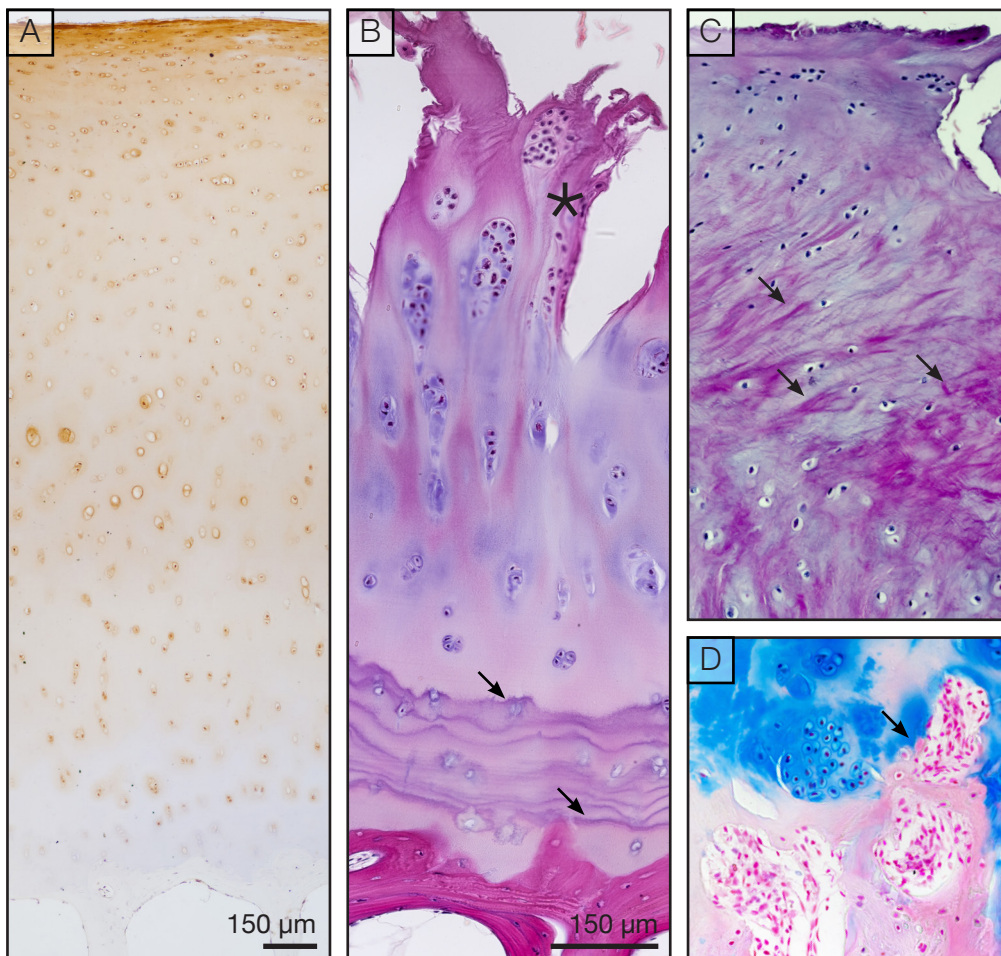


Abbildung 1.3: Histologisches Bild der Osteoarthritis. Senkrechter Schnitt durch den Gelenkknorpel von Patienten, die einer total Kniearthroplastik unterzogen wurden. A. Gesunder Gelenkknorpel. B. Endstadium der OA. Das Bild ist geprägt durch tiefe Fissuren, Bildung von Chondrozyten-Cluster (Stern) und Multiplikation der Grenzlinie (Pfeil). C. Fibrocartilaginäres Ersatzgewebe im hyalinen Knorpel mit narbenartiger Erscheinung. D. Vaskularisierung der Mineralisationszone des Gelenkknorpels mit einwandernden Zellen aus dem Knochenmark (Pfeil). Messbalken (A–D) 150 µm. Abbildung abgewandelt nach freundlicher Bereitstellung von Schminke (2011) sowie Schminke und Miosge (2014).

Die Regenerationsfähigkeit des menschlichen Gelenkknorpels ist sehr stark limitiert. Im Gegensatz zu anderen Knorpelgeweben sind die gefäßlosen artikulierenden Oberflächen des Gelenkknorpels nicht von einem Perichondrium (Knorpelhaut) umschlossen. Eine Versorgung mit MSCs, die zu Chondrozyten differenzieren können ist somit nicht gegeben (Goldring und Goldring 2010). Knochenmarkstimulierende Techniken wie die Pradie-Bohrung, die Mikrofrakturierung und die Abrasionsarthroplastik zielen auf die Perforation der Grenzlinie zwischen Knochen und Knorpel ab, um die Migration von Stammzellen aus dem Knochenmark in das Gelenk zu ermöglichen und eine Neubildung des Knorpels anzuregen (Hunziker 2002, Redman et al. 2005, Kreuz et al. 2006). Der dabei entstehende Knorpel aus fibrocartilaginärem Ersatzgewebe weist jedoch eine andere biochemische Zusammensetzung auf als der natürliche hyaline Knorpel eines gesunden

Gelenkes. Das Ersatzgewebe ist weniger belastbar als das gesunde Gewebe und nur von kurzer Lebensdauer (Temenoff und Mikos 2000).

Weitere gelenkerhaltende operative Maßnahmen sind auf die Wiederherstellung der Gelenkflächen nach Sportverletzungen gerichtet. Dabei wird die Wiederherstellung durch die Transplantation von körpereigenem (autologem) Gewebe oder Chondrozyten angestrebt. Zu nennen sind dabei die *autologe osteochondrale Transplantation* (AOT) und die *autologe Chondrozytenimplantation* (ACI). Bei der AOT werden aus gesunden sowie nicht belasteten Arealen zylinderförmige Knorpel-Knochen-Einheiten entnommen und in beschädigte Areale transplantiert. Die Nachteile bestehen hierbei in einer möglichen Degeneration der Entnahmestelle, in der limitierten Anzahl an Transplantaten sowie den unebenen Oberflächenstrukturen aufgrund der unterschiedlichen Größe der Transplantate und der Entstehung von Faserknorpel an Stelle des erstrebten hyalinen Knorpels (Muller et al. 2010). Bessere Ergebnisse verspricht die ACI, bei der hyalinartiger Knorpel entstehen soll (Peterson et al. 2002, Vasiliadis et al. 2010). Dabei wird per Arthroskopie eine Biopsie durchgeführt, die Chondrozyten aus dem Knorpelgewebe isoliert, in der Zellkultur gezüchtet und in einer zweiten Operation mit oder ohne Trägermaterial in die defekten Areale reimplantiert. Erste klinische Anwendung fand die ACI bereits 1987 (Brittberg et al. 1994). In unkontrollierten Kurz- bis Langzeitbefragungen gaben 74 % der Patienten eine Verbesserung ihrer Erkrankung an (Peterson et al. 2010), jedoch weisen klinische Untersuchungen keinen signifikanten Vorteil der ACI gegenüber der chirurgischen Stimulation des Knochenmarks durch Mikrofrakturierung auf (Knutsen et al. 2004, 2007). Darüber hinaus ist weder die ACI noch die Mikrofrakturierung effektiv bei Patienten über 50 Jahre (Hunziker 2009).

Trotz einiger positiver Ergebnisse sind die Risiken immens. Die Art und Lokalisation der defekten Areale ist ein wichtiger Faktor für die Zugänglichkeit und die Risiken der Behandlung. Das Absterben von Chondrozyten, die weitere Degeneration des Knorpels, die krankhafte Vermehrung des Bindegewebes (Arthrofibrose) sowie die Versteifung des Gelenks, die Bildung krankhafter Ausläufer des Knochengewebes am Rand der Läsionen (Osteophyten), die Entstehung subchondraler Zysten sowie die Bildung von Ödemen im Knochenmark sind häufige Begleiterscheinungen und können erneute Operationen nach sich ziehen (Goldring und Goldring 2007, Vasiliadis et al. 2010, Kon et al. 2012).

Wenn gelenkerhaltende Maßnahmen nicht mehr indiziert sind, kann die Notwendigkeit für das Einsetzen eines künstlichen Gelenks (Alloarthoplastik von Endoprothesen) gegeben sein, um die Gelenkfunktion wiederherzustellen. Allerdings ist diese Maßnahme mit großem Aufwand sowie hohen Kosten verbunden und nur für Patienten bei stark fortgeschrittener OA mit Schmerzen, Behinderung und Leiden gegeben (Lohmander und Roos 2007).

1.6 Tissue Engineering und Stammzelltherapie

Das primäre Ziel therapeutischer Maßnahmen liegt in der Reduzierung von Schmerzen und Wiederherstellung der Bewegungsfähigkeit. Die Regeneration des Gewebeknorpels kann bis zu einem gewissen Grad mithilfe knochenmarkstimulierender Techniken und bei Sportverletzungen durch Transplantation körpereigenen Knorpelgewebes oder Chondrozyten erreicht werden, diese sind jedoch nicht von gleichwertiger Qualität wie der hyaline

Tabelle 1.1: Therapieformen der Osteoarthrose-Behandlung. Eine Auswahl konservativer und operativer Maßnahmen. Entnommen, abgewandelt und ergänzt nach Rabenberg 2013.

Therapieform	Beschreibung
Konservative OA-Therapien	
Physiotherapie	Konventionelle Bewegungstherapie Unterwasserbewegungstherapie
Physikalische Therapie	Kälte- und Wärmebehandlung, Massagen
Ergotherapie	Gelenkschutztraining Hilfsmittelversorgung und -gebrauchsschulung
Orthopädische Hilfsmittel	Entlastung durch Gehhilfen Orthopädische Schuheinlagen
Medikamentöse Therapien	Nichtsteroidale Antirheumatika
Operative OA-Therapien	
Arthroskopische Methoden	Lavage (Gelenkspülung) Shaving (Glättung der Knorpeloberfläche) Débridement (Entfernung von Gewebetrümmern)
Stimulierung des Knochenmarks	Pridie-Bohrung Mikrofrakturierung Abrasionsarthroplastik
Gelenkflächenwiederherstellung	autologe osteochondrale Transplantation (AOT) autologe Chondrozytenimplantation (ACI)
Gelenkersatz	Endoprothetik

Knorpel des gesunden Gelenks und die Prozedur ist häufig mit Risiken und Nebenwirkungen verbunden (Hunziker 2002). Das klinische Ziel der regenerativen Behandlung von Knorpeldefekten liegt nicht nur in der Reduzierung von Schmerzen und der Wiederherstellung der Bewegungsfähigkeit, sondern auch in einer erhöhten Belastbarkeit und langfristigen Funktion der Gelenke und Verhinderung des Fortschreitens der Erkrankung. Ansätze auf dem Gebiet des Tissue Engineering bestehen in der Einbettung von Zellen in ein dreidimensionales Gerüst (engl. *scaffold*) aus verschiedensten Polymeren, z. B. Alginate, Hyaluronsäure und Kollagen. Diese Substanzen sollen während der Zellanzucht die natürliche dreidimensionale Struktur des Gewebes simulieren und damit die Transplantation erleichtern. Zusätzlich werden die Zellen durch Wachstumsfaktoren, Gentransfer sowie mechanische Reize stimuliert, um das chondrogene Potential der verwendeten Zellen zu erhöhen (Temenoff und Mikos 2000, Caplan 2005). Anstelle von Chondrozyten wurden auch adulte MSCs aus dem Knochenmark extrahiert, in eine Matrix eingebettet und transplantiert (Buda et al. 2010, Cole et al. 2011, Gobbi et al. 2011). MSCs kommen in verschiedenen Geweben vor, sind an regenerativen Prozessen nach traumatischen Ereignissen beteiligt und werden in regenerativen Therapien von erkranktem Knorpel eingesetzt (Keerthi et al. 2013, Savkovic et al. 2014). Der Vorteil von MSCs gegenüber Chondrozyten liegt in ihrem schnellen Wachstum unter *in vitro* Bedingungen, während sie ihr Differenzierungspotential weitestgehend beibehalten und somit in kürzester Zeit in umfangreichen Mengen für therapeutische Maßnahmen gezüchtet werden können (Redman et al. 2005). Ihre Extraktion aus dem Knochenmark, dem Fettgewebe, der Synovialmembran und Synovialflüssigkeit ist nur mit relativ geringem Aufwand verbunden (Prockop 1997, Pittenger et al. 1999, Punwar und Khan 2011). Unter geeigneten Bedin-

gungen können sich MSCs in Zellen verschiedener Bindegewebe, z. B. Knochen, Knorpel, Fett, Bänder und Sehnen differenzieren (Prockop 1997, Pittenger et al. 1999, Barry und Murphy 2004, Grove et al. 2004, Caplan 2005). Zu den regenerativen Fähigkeiten von MSCs kommt zusätzlich ihr immun-modulatorischer und anti-inflammatorischer Einfluss durch Zell-Zellkontakt oder Sekretion bioaktiver Moleküle zur Geltung (Caplan 2007, Chen und Tuan 2008). Die Implantation von MSCs in beschädigtes Knorpelgewebe wurde bereits in den 1990er Jahren in einem Kaninchenmodell mit Knochen-Knorpel-Defekten durchgeführt und die Wiederherstellung des Knorpels mit fibrocartilaginärem Ersatzgewebe aus Kollagen Typ I demonstriert (Wakitani et al. 1994, Caplan et al. 1997). In einer späteren klinischen Studie isolierten Wakitani et al. MSCs aus dem Knochenmark, expandierten diese *in vitro*, betteten sie in Kollagen und pflanzten diese Transplantate in die defekten Areale ein. Obwohl arthroskopische und histologische Untersuchungen ein hyalinartiges Reparaturgewebe erahnen lassen, konnten durch klinische Untersuchungen im Durchschnitt keine signifikanten Verbesserungen der Symptome festgestellt werden (Wakitani et al. 2002). Auch wenn viele dieser vorgestellten Strategien vereinzelt eine Linderung der Symptome verschaffen und die Gelenkfunktion verbessern, wird langfristig weder die Degeneration des fibrocartilaginären Ersatzgewebes, noch der umliegenden Gewebe verhindert; sei es durch die fehlende horizontale und territoriale Gliederung des natürlichen hyalinen Knorpels oder durch die schwache laterale Integration des Ersatzgewebes in den beschädigten Arealen (Redman et al. 2005).

1.7 Chondrogene Progenitorzellen

Auf dem Gebiet des Tissue Engineering wurden verschiedene Methoden und Strategien entwickelt, um eine Regeneration des Gelenkknorpels zu erreichen. Trotz der vielen und bemerkenswerten Fortschritten stellt die Restauration des hyalinartigen Knorpels immer noch eine große und unerreichte Herausforderung dar. Bisher wurden Chondrozyten und MSCs als erfolgsversprechende Kandidaten zur Erzeugung von hyalinem Knorpel verwendet. Die Zellen wurden auf vielfältige Weise mit Wachstumsfaktoren stimuliert, genetisch manipuliert, in Biomaterialien eingebettet und mechanisch gereizt. Trotz der bisher verwendeten Zellen und Methoden entsteht weiterhin fibrocartilaginäres Ersatzgewebe an Stelle des hyalinen Knorpels (Cucchiari et al. 2014). Während die Chondrozyten im gesunden hyalinen Knorpel in Chondronen aus ein oder mehreren Zellen organisiert sind, zeigen ultrastrukturelle Studien von fibrocartilaginärem Ersatzgewebe das Vorkommen weiterer morphologisch distinkter Zelltypen (Kouri et al. 1996). In späten Stadien der OA erscheinen die Chondrozyten vereinzelt oder in Clustern (vgl. Abbildung 1.3 B bis D). Daneben kommen noch fibroblastenartige sekretorische Zellen mit einem markanten rauhen endoplasmatischem Retikulum sowie unregelmäßig geformte, in Degeneration und Apoptose befindliche Chondrozyten vor (Kouri et al. 1996). Die fibroblastenartigen Zellen erscheinen am häufigsten in Ersatzgewebe und in tiefer gelegenen Zonen, in der die Grenzlinie zwischen Mineralisierungszone und Radiärfaser- oder Transitionalzone durchbrochen ist (vgl. Abbildung 1.3 B und D). Zunächst wurden diese Zellen als *elongated secretory type 2 cells* (Kouri et al. 1996) und später als fibroblastenartige Chondrozyten (engl. *fibroblast-like chondrocytes*) bezeichnet (Tesche und Miosge 2005).

Untersuchungen des fibrocartilaginären Ersatzgewebes aus humanem Gelenkknorpel zeigten sowohl Zeichen von Degeneration als auch Regeneration (Tesche und Miosge 2005). So konnte die Synthese von Kollagen Typ I und Typ III in fibroblastenartigen Chondrozyten nachgewiesen werden (Miosge et al. 1998, Sandell und Aigner 2001, Miosge et al. 2004), während der Anteil an Kollagen Typ II im Gewebe insgesamt sinkt (Poole 1999) und die Expression in den fibroblastenartigen Chondrozyten nur gering ist (Miosge et al. 1998). Spätere Untersuchungen konnten noch die Expression von Proteoglykanen, wie Biglycan, Decorin und Perlekan nachweisen und diesen Zelltypen zuordnen (Bock et al. 2001, Tesche und Miosge 2005). Die Synthese dieser Moleküle kann als Versuch verstanden werden, den Verlust von Matrixmolekülen zu kompensieren und die verbleibende extrazelluläre Matrix zu stabilisieren (Tesche und Miosge 2005).

Koelling et al. isolierten diese fibroblastenartigen Chondrozyten aus osteoarthrotischem Gelenkknorpel und konnten typische Eigenschaften von Vorläufer- oder Progenitorzellen nachweisen (Koelling et al. 2009). So zeigen diese Zellen ein hohes migratorisches Potential, haben eine hohe Zellteilungsrate und lassen sich in Zellkultur bis zu 64 Passagen halten bevor sie Zeichen von Seneszenz zeigen. Die Fähigkeit zur Differenzierung ist eine für Progenitor- oder Stammzellen charakteristische Eigenschaft, um verbrauchte Zellen zu ersetzen und geschädigte Gewebe zu regenerieren (Hsu und Fuchs 2012). Unter geeigneten Bedingungen lassen sich diese Zellen in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenzieren und offenbaren ihren multipotenten Stammzellcharakter. In immunhistochemischen Untersuchungen und in fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie-Analysen können die Stammzellmarker STRO-1 und CD29 sowie CD13, CD44, CD73, CD90 und CD105 nachgewiesen werden. Jedoch unterscheiden sich diese Zellen von MSCs. Sie sind CD34, CD31 und CD117 sowie CD271, CD18 und CD31 negativ. Um diesen neu hinzugekommenen Erkenntnissen auch namentlich gerecht zu werden, wurde diese Zellpopulation als chondrogene Progenitorzelle (CPC) benannt.

Das chondrogene Potential und die Fähigkeit erkranktes Gewebe *ex vivo* zu besiedeln und dabei tief in das Gewebe vorzudringen, machen diese Zellen zu neuen potentiellen Werkzeugen in der Entwicklung von regenerativen Therapien zur Behandlung der OA.

Zum Verständnis der Rolle von CPCs sowie möglichen Ansätzen zur Entwicklung von therapeutischen Maßnahmen, werden im nächsten Abschnitt die regulatorischen Prozesse vorgestellt und insbesondere auf die Rolle von den beiden Transkriptionsfaktoren SOX9 sowie RUNX2 eingegangen.

1.8 Die molekulare Regulation der Chondrogenese

Die Skelettentwicklung ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Prozesse, Wachstumsfaktoren und Signalwege, die eine koordinierte Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und Osteozyten steuern (Goldring 2012, Long 2012). Die Entwicklung der Chondrozyten wird durch die Kondensation mesenchymaler Zellen eingeleitet. Die Chondrogenese umfasst die Differenzierung dieser Zellen und die sukzessive Synthese von Matrixkomponenten, bei der die Knorpelanlagen für die sich entwickelnden Knochen und Gelenke gebildet werden (Bi et al. 1999, Goldring et al. 2006, Goldring 2012). Die Differenzierung mesenchymaler Zellen wird in der Chondrogenese

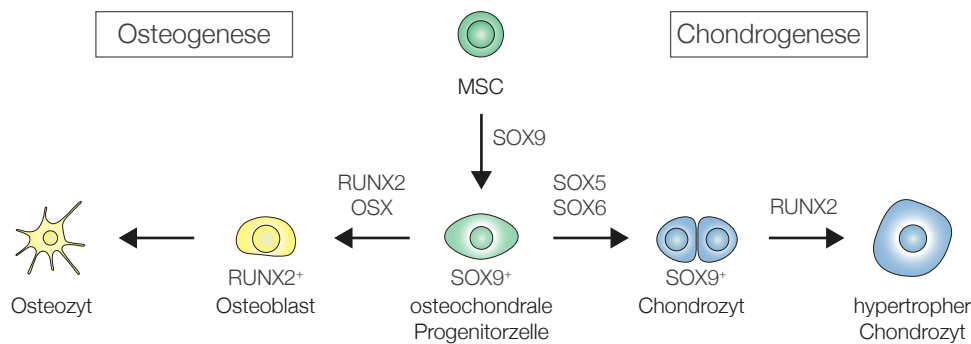


Abbildung 1.4: Stadien der osteochondralen Differenzierung. Mesenchymale Stammzellen bilden bei der osteochondralen Differenzierung den Ursprung für die Entwicklung von Chondrozyten und Osteozyten. Die osteochondralen Progenitorzellen sind $SOX9^+$. Diese differenzieren sich unter dem Einfluss von $SOX5$ und $SOX6$ nach der mesenchymalen Kondensation zu Chondrozyten. $SOX9$ wird in allen chondrogenen Zellen exprimiert und verhindert die Proliferation zu hypertrophen Chondrozyten, ein Schritt der unter der Kontrolle von $RUNX2$ steht (Akiyama et al. 2005b, 2002). Die Expression von $RUNX2$ und Osterix (OSX) führt hingegen zur Entwicklung von Osteoblasten. Einige der Osteoblasten bilden durch Einbettung in die Knochenmatrix Osteozyten. Abbildung selbst erstellt in Anlehnung an Long (2012).

bzw. Osteogenese (Abbildung 1.4) durch die kooperative Aktivität der Wachstumsfaktoren *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor* (TGF)- β , *bone morphogenetic protein* (BMP) sowie den Hedgehog-, Wnt- und Smad-Signalkaskaden kontrolliert. Die beiden Transkriptionsfaktoren *SRY* (*sex determining region Y*)-*box 9* ($SOX9$) und *runt-related transcription factor 2* ($RUNX2$) nehmen bei der osteochondralen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen eine Schlüsselrolle als Master-Regulatoren ein (Lefebvre und Smits 2005, Wuelling und Vortkamp 2011, Long 2012, Chan und Kyba 2013). Für die ordnungsgemäße Embryogenese ist die Koordination der räumlichen und zeitlichen Expression sowie die Regulation der Aktivität von $SOX9$ und $RUNX2$ unerlässlich (Cheng und Genever 2010). Störungen ihrer Expression führen u. a. unweigerlich zu Entwicklungsstörungen des Skelettsystems. Im folgenden werden $SOX9$ und $RUNX2$ näher vorgestellt und ihre Rolle bei der Osteochondrogenese erläutert.

SOX9 $SOX9$ ist für die Ausdifferenzierung von Chondrozyten und damit für die Bildung des Knorpelgewebes durch chondrale Ossifikation unentbehrlich (Bi et al. 1999, Akiyama et al. 2002). Heterozygote Mutationen in $SOX9$ oder Veränderungen in der Chromosomenregion 17q24 führen zu einer kampomelen Dysplasie (Wagner et al. 1994). Aufgrund der unzureichenden Entwicklung der Knorpelgewebe kommt es hierbei zu langen Röhrenknochen, die sich unter dem eigenen Gewicht verbiegen (gr. *campo* ‚gebogen‘, gr. *melia* ‚Glieder‘). Aufgrund der auftretenden Lungeninsuffizienz wird der erste Lebensmonat vom Neugeborenen kaum überlebt (Foster et al. 1994).

$SOX9$ ist ein Mitglied der *SRY-related HMG-box* (SOX)-Genfamilie (Guth und Wegner 2008). Das 1990 entdeckte *SRY*-Protein war das erste Mitglied und Namensgeber dieser Familie von Transkriptionsfaktoren (Gubbay et al. 1990, Sinclair et al. 1990). Die Mit-

glieder zeichnen sich durch die Präsenz einer *high-mobility group* (HMG)-Box aus, die für die DNA-bindende Domäne des Proteins kodiert. Proteine mit einer HMG-Domäne, deren Sequenz mindestens 50 % mit der von dem SRY-Protein übereinstimmt, werden als SOX-Proteine bezeichnet (Wright et al. 1993). Basierend auf der HMG-Domäne wird diese Familie in die Gruppen SOXA bis SOXH untergliedert. Dabei gehört SOX9 zur SOX E-Gruppe (Bowles et al. 2000). Die SOX-Proteine sind an verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt, z. B. an der Keimblattbildung, der Organentwicklung und der Zelldifferenzierung.

Während der Chondrogenese sind die drei Transkriptionsfaktoren *SOX9*, *SOX5* und *SOX6* für die Differenzierung von MSCs verantwortlich (Abbildung 1.4). Die Expression von *SOX9* beginnt bereits auf Stufe des osteochondralen Progenitors und wird weiterhin in allen differenzierten Chondrozyten gebildet bis die Zellen hypertroph werden, z. B. in der Wachstumsfuge (Akiyama und Lefebvre 2011). *SOX9* induziert die Kondensation mesenchymaler Zellen und Differenzierung von osteochondralen Progenitorzellen, wohingegen *SOX5* und *SOX6* (Mitglieder der SOX D Gruppe) mit *SOX9* kooperieren und die Bindung des Transkriptionskomplexes an Enhancer erhöhen – und damit auch die Expression für knorpelspezifische Gene wie *collagen, type II, alpha 1 (COL2A1)* und *aggrecan (ACAN)*. Kollagen Typ I, Typ III und Typ V werden zunächst von mesenchymalen Zellen synthetisiert und nach der Differenzierung durch die Synthese der knorpelspezifischen Kollagene Typ II, Typ IX und Typ XI ersetzt (Goldring 2012). Untersuchungen in Mäusechimären zeigen, dass *SOX9* $-/-$ Zellen aus allen Knorpelgeweben ausgeschlossen sind. Stattdessen liegen sie als ein loser Zellverband mesenchymaler Zellen vor, die keine der chondrozytenspezifischen Marker wie *COL2A1*, *COL9A2*, *COL11A2* und *ACAN* exprimieren (Bi et al. 1999). Darüber hinaus ist *SOX9* nicht nur für die Entwicklung von Chondrozyten und die Synthese gelenkknorpelspezifischer Matrixbestandteile verantwortlich, sondern verhindert auch die Reifung proliferierender Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten und damit den Beginn der chondralen Ossifikation (de Crombrughe et al. 2001).

Die Aktivität von *SOX9* und *RUNX2* wird durch posttranslationale Modifikationen und durch die Kontrolle ihrer Expression bzw. ihrer Degradation gesteuert. Seit ihrer Entdeckung wurden viele Positionen mit Aminosäuren für posttranslationale Modifikationen beschrieben (Abbildung 1.5 und 1.6). Huang et al. konnten die spezifische Interaktion von *SOX9* mit *cAMP-dependent protein kinase A* (PKA) nachweisen und führten Untersuchungen an den beiden Konsensussequenzen bei S61 (KKES) und S181 (RRKS) durch. Dabei stellten sie fest, dass die Phosphorylierung dieser Serinreste die Bindung an die DNA erhöht und die Expression von *COL2A1* verstärkt (Huang et al. 2000). Die HMG-Domäne von *SOX9* enthält eine Kernlokalisationssequenz (NLS2), die direkt an S181 angrenzt (Preiss et al. 2001) und daher mit der Kernlokalisierung durch Importin β in Verbindung gebracht wurde. Untersuchungen in NT2/D1 Zellen konnten sowohl die verstärkte Bindung von pSOX9^{S61,S181} zu Importin β , als auch die vermehrte Kernlokalisierung zeigen (Malki et al. 2005). Die Konsensussequenz RRKS181 ist auch ein Motif für *Rho-associated protein kinase* (ROCK) und könnte eine Verlinkung zwischen der Synthese von Matrixbestandteilen und der Aktivierung von *SOX9* als Antwort zu mechanischer und chemischer Stimulation darstellen (Haudenschield et al. 2010). Neben den Serinresten wurden die drei Lysinreste K61, K253 und K398 als potentielle SUMOylierungs- (*small ubiquitin-like modification*) und Ubiquitinierungsstellen in der Entwicklung der Neural-

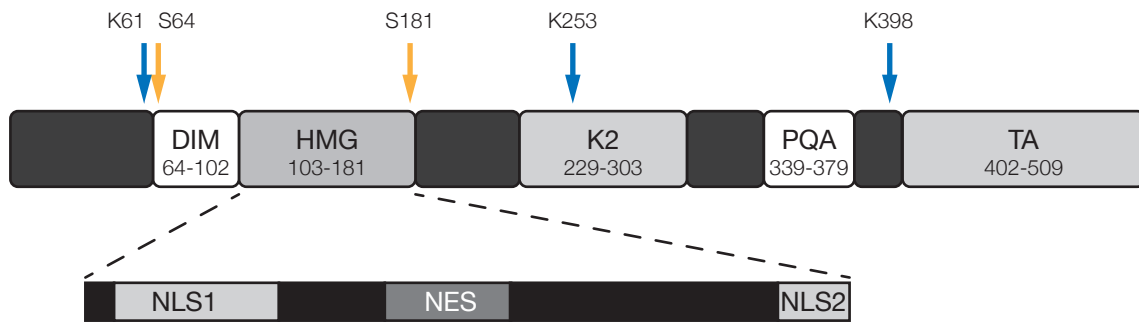


Abbildung 1.5: Die Domänen und posttranslationalen Modifikationen von SOX9. Am N-Terminus enthält SOX9 eine Dimerisierungsdomäne (DIM) und eine angrenzende HMG-Domäne. Die hochkonservierte HMG-Domäne enthält eine Kernexportsequenz (NES), die durch zwei unabhängige Kernlokalisationssequenzen (NLS1 sowie NLS2) flankiert wird. Eine Prolin-, Glutamin- und Alanin-reiche Domäne (PQA) mit unbekannter Funktion liegt zwischen einer zentralen (K2) und einer C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA). Die Position der phosphorylierten Serinreste (orange) und der drei Lysinreste (blau), die als Sumoylierungs- oder Ubiquitinierungs- und Acetylierungsstellen dienen, sind in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet. Abbildung selbst erstellt in Anlehnung an Kist R: SOX9 in Yusuf et al. (2012).

leiste bei *Xenopus* und der Chondrogenese von Säugetieren identifiziert (Hattori et al. 2006, Taylor und Labonne 2005). Die *protein inhibitor of activated STAT* (PIAS) Proteine sind SUMO E3 Ligasen und modulieren in vielen wichtigen Signalwegen (z. B. im Wnt-Signalweg) die transkriptionelle Aktivität in dem sie die Assemblierung von Coaktivator- oder Corepressorkomplexen beeinflussen (Schmidt und Müller 2003). Die SUMOylierung von Lysin K398 inhibiert den proteosomalen Abbau von SOX9; das Ergebnis ist eine erhöhte subzelluläre Konzentration und Aktivität (Hattori et al. 2006). Im Gegensatz dazu bewirkt die Ubiquitinierung von K398 den proteosomalen Abbau von SOX9 (Akiyama et al. 2005a, Sim et al. 2008). Die selben Lysinreste sind auch das Ziel für die nukleäre *K(lysine) acetyltransferase 5* (KAT5). Die Acetylierung durch KAT5 (vormals Tip60) ruft eine erhöhte Aktivität von SOX9 hervor und könnte ein Coaktivator in Chondrozyten sein (Hattori et al. 2008).

RUNX2 RUNX2 ist für die Entwicklung von Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen und die Bildung der Knochen unentbehrlich. Bei homozygoten *RUNX2* $-/-$ Mäusen bilden sich keine Knochen, da die Entwicklung von Osteoblasten gestört ist. Aufgrund von Atmungsschwierigkeiten sterben die Mäuse kurz nach der Geburt (Otto et al. 1997). Heterozygote Mutationen in *RUNX2* rufen cleidocraniale Dysplasie (altgr. *cleidos* ‚Schlüsselbein‘, lat. *cranium* ‚Schädel‘) hervor, die v. a. durch Fehlbildungen an Schädel und Schlüsselbein charakterisiert sind (Lee et al. 1997, Mundlos und Olsen 1997).

RUNX2 ist ein Transkriptionsfaktor aus der *runt-related transcription factor* (RUNX)-Genfamilie. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren enthalten die evolutionär hochkonservierte Proteindomäne *Runt*. Diese Domäne ist homolog zum Paarregel-Gen *Runt* aus *Drosophila melanogaster* (Ito 1999). Die Runt-Domäne ist für die DNA-Bindung und Protein-Protein Interaktion wichtig (Schroeder et al. 2005). RUNX2 wird während der

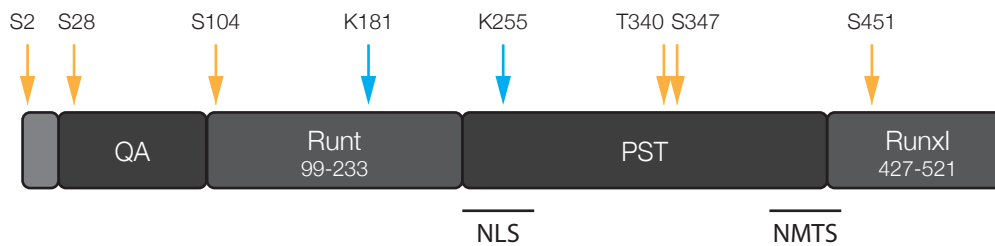


Abbildung 1.6: Die Domänen und posttranslationalen Modifikationen von RUNX2. Dargestellt sind die verschiedenen Domänen von RUNX2 für Isoform 1 (CBFA1a). Am N-Terminus befindet sich eine Glutamin/Alanin-reiche Domäne (QA). Diese wird dicht gefolgt von der hochkonservierten DNA-bindenden Runt-Domäne. Die Prolin-, Serin-, Threonin-reiche Domäne (PST) befindet sich zwischen der Kernlokalisationssequenz (NLS) und der Kernmatrix-Zielsequenz (NMTS). Die Inhibitionsdomäne Runxl befindet sich C-terminal. Die Position der phosphorylierten Serin- und Threoninreste (orange) und der acetylierten bzw. SUMOylierten Lysinreste (blau) sind mit farbigen Pfeilen gekennzeichnet (Wee et al. 2002, Schroeder et al. 2005, Selvamurugan et al. 2009, Kim et al. 2014). Abbildung selbst erstellt in Anlehnung an Schroeder et al. (2005).

prechondralen Kondensation mesenchymaler Zellen (Otto et al. 1997), in allen Osteoblasten (Ducy et al. 1997) aber auch in hypertrophen Chondrozyten (Inada et al. 1999, Kim et al. 1999) exprimiert.

Das *RUNX2*-Gen kodiert in Säugetieren mehr als 12 Transkriptvarianten, die durch die Aktivität von zwei Promotoren (P1 und P2) und alternatives Spleißen herrühren (Schroeder et al. 2005). Die Transkriptvariante 1 und 2 liefern dabei die beiden wichtigsten Isoformen. Die Transkriptvariante 1 ist das längste Transkript und kodiert das längste Proteinprodukt mit einer Länge von 521 Aminosäuren. Diese Isoform wird als *core-binding factor subunit alpha-1 Isoform 1* (CBFA1a) bezeichnet und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 56,65 kDa. Daneben existiert noch die Transkriptvariante 2. Diese unterscheidet sich von der Transkriptvariante 1 durch das Fehlen eines Exons in der 3'-Region des fertigen Transkripts. Die Translation liefert hierbei ein verkürztes Proteinprodukt mit der Bezeichnung CBFA1b mit einem Molekulargewicht von 54,75 kDa.

Die Aktivität von RUNX2 wird ebenso auf vielfältige Weise reguliert wie SOX9. Die Mechanismen beinhalten: Inhibition der DNA Bindung, Translokation und Expression sowie Degradation von RUNX2 (Long 2012). Bemerkenswert ist hierbei insbesondere die wechselseitige Beziehung zwischen RUNX2 und SOX9. Diese interagieren direkt miteinander über ihre evolutionär konservierte HMG bzw. Runt-Domäne, und inhibieren die gegenseitige Aktivität (Zhou et al. 2006). RUNX2 inhibiert die Translokation von SOX9 in den Zellkern und unterdrückt dadurch SOX9-abhängige Prozesse. Während der endochondralen Ossifikation überwiegt die Aktivität von SOX9 über der von RUNX2 in mesenchymalen Progenitorzellen, aus denen sich die Chondrozyten entwickeln (Zhou et al. 2006). Im Gegensatz zu RUNX2 wirkt SOX9 nicht in dem es die Translokation von RUNX2 inhibiert, sondern in dem es den Abbau fördert. Für gewöhnlich wird RUNX2 ubiquitiniert und über die Proteasomen abgebaut (Tintut et al. 1999, Zhao et al. 2003, Shen et al. 2006). SOX9 scheint jedoch nicht die Ubiquitinierung und damit den proteasomalen Abbau zu steigern, sondern eher die Ubiquitinierung zu senken und einen lysosomalen Abbau zu fördern. Die genauen Gründe sind wenig erforscht und liegen hier

noch im Unklaren (Cheng und Genever 2010). Zusätzlich kann die Phosphorylierung der Serin- bzw. der Threoninreste S104, S541 sowie S28, S347 und T340 die Aktivität von RUNX2 stark vermindern (Wee et al. 2002, Selvamurugan et al. 2009). S104 befindet sich innerhalb der Runt-Domäne. Diese Domäne vermittelt die Protein-DNA-Interaktion sowie die Heterodimerisierung mit *core-binding factor beta subunit* (CBFB), wodurch RUNX2 vor dem proteosomalen Abbau geschützt wird (Huang et al. 2001, Zhou et al. 2006). Die Phosphorylierung von S104 inhibiert die Heterodimerisierung und destabilisiert damit RUNX2 und ermöglicht dessen proteosomalen Abbau. S451 befindet sich innerhalb der RunxI-Domäne und könnte die RUNX2 Aktivität inhibieren (Wee et al. 2002).

1.9 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertation sollen aus den CPCs regulatorische Proteine isoliert und identifiziert werden, die mit den Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2 direkt interagieren oder über Coaktivatoren bzw. Corepressoren in Verbindung stehen. Das Ziel besteht in der Identifizierung von Faktoren, die eine differentielle Regulation der Genexpression, mit Begünstigung des chondrogenen Potentials von CPCs, erlauben.

Diese Proteine sollen aus CPCs isoliert werden, in denen die Expression von RUNX2 oder SOX9 durch RNA-Interferenz (RNAi) runterreguliert ist. Dazu sollen lentiviral transduzierte CPCs verwendet werden, die spezifische *small interfering RNA* (siRNA) gegen RUNX2 oder SOX9 produzieren. Bei siRNA handelt es sich um kleine doppelsträngige RNA-Moleküle, die mit Argonautenproteinen den *RNA-induced silencing complex* (RISC) bilden und durch den Abbau komplementärer mRNA die Expression spezifischer Gene hemmen. Dazu soll der Knockdown in den entsprechenden Zellen per reverse Transkription mit qPCR-Kopplung (RT-qPCR) und Western Blot überprüft und die Auswirkung auf den jeweiligen Antagonisten untersucht werden. Hierbei soll die Frage geklärt werden, ob der Knockdown von RUNX2 eine Hochregulation von SOX9 in CPCs bewirkt und ob umgekehrt das gleiche für SOX9 gilt, d. h. eine Hochregulation von RUNX2 bewirkt.

Ziel dieses Vorgehens ist es, die regulatorischen Mechanismen in CPCs so zu beeinflussen, dass das chondrogene Potential erhöht wird. Es wird angenommen, dass dabei insbesondere Signalwege und damit Proteine hochreguliert werden, die mit SOX9 interagieren und sich positiv auf das chondrogene Potential von CPCs auswirken. Umgekehrt sollen auch regulatorische Mechanismen durch den Knockdown von SOX9 und den Wegfall seines inhibitorischen Einflusses auf die osteogenen Faktoren hochreguliert werden, die für die Aktivität von RUNX2 wichtig sind. Dies soll die Identifizierung von Proteinen ermöglichen, die RUNX2 positiv regulieren, damit SOX9 inhibieren und somit die chondrogene Differenzierung von CPCs hemmen.

Proteine, die mit SOX9 bzw. RUNX2 direkt oder indirekt interagieren und regulatorisch wirken, sollen per Co-Immunpräzipitation bzw. Pulldown von SOX9 und RUNX2 isoliert, massenspektrometrisch analysiert und identifiziert werden. Anschließend sollen die ausgewählten Kandidaten in CPCs überexprimiert oder durch siRNA runterreguliert werden, um die Auswirkungen auf das Expressionsniveau von SOX9 und RUNX2 zu untersuchen. Bei positiven Resultaten sollen Co-Immunpräzipitations- und Pulldown-Experimente Hinweise liefern, ob eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen den

Kandidaten und SOX9 bzw. RUNX2 besteht, oder ob diese möglicherweise durch andere Faktoren vermittelt wird. Zusammenfassend sollen in der vorliegenden Dissertation folgende Fragen geklärt werden:

1. Wirkt sich der Knockdown von RUNX2 auf das Expressionsniveau von SOX9 aus?
2. Wie verhält es sich umgekehrt? Wirkt sich der Knockdown von SOX9 auch auf das Expressionsniveau von RUNX2 aus?
3. Welche Proteine stehen in Verbindung mit SOX9 – welche mit RUNX2?
4. Können die identifizierten Proteine einen *cross-talk*, d. h. ein antagonistisches Verhältnis zwischen RUNX2 and SOX9 vermitteln?
5. Kommen diese Proteine auch als therapeutische Ziele in Betracht?
6. Besteht auch *in vivo* eine Interaktion oder ist sie eine artifizielle *in vitro* Erscheinung?

2

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.1: Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose-LE ultrapure MB-Grade	USB
Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Ammoniumperoxodisulfat 98 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampicillin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Blasticidin S HCl	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blau G 250	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blau R 250	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ciprofloxacin HCl	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Disuccinimidyl-Suberat	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
DNA Loading Dye (6 ×)	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure 100 %	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol abs. p. a.	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Gentamycin	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 2.1

Chemikalie	Hersteller
Glycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Guanidinhydrochlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
IGEPAL (NP-40)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Imidazol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kalium-Dihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin (Sulfat)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
LB-Agar	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
LB-Medium	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdesoxycholat (Na-DOC)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
PolyFect® Transfection Reagent	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
2-Propanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RNA Gel Loading Dye (2 ×)	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-EDTA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Tween-20	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: Geräte

Produkt	Hersteller
Axiovert 40 CFL Zeiss	Zeiss (Göttingen, Deutschland)
CanoScan 9000F Mark II	Canon (Krefeld, Deutschland)
Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Herasafe™ KS12	Thermo Fisher (Wilmington, USA)
inoLab pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Labotect C200 Inkubator	Labotect (Göttingen, Deutschland)
Mastercycler® ep gradient S realplex ²	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher (Wilmington, USA)
Nexcelom Cellometer™ Auto T4 peqlab	peqlab (Erlangen, Deutschland)

Weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 2.2

Produkt	Hersteller
Nikon D90	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Olympus CX40	Olympus (Hamburg, Deutschland)
PerfectBlue™ Tank-Elektroblotter	peqLab (Erlangen, Deutschland)
PURELAB Ultra	ELGA LabWater (Celle, Deutschland)
Röntgenkassette	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Sartorius Extend	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
TW8 und TW12	Julabo (Seelbach, Deutschland)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Eppendorf Safe-Lock Tube	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Immobilon-P Membran aus PVDF, 0,45 µm	Millipore Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mikro-Dialysierkapsel QuixSep®	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Multiplate 96, weiß, unskirted	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
Tissue Culture Flask T25 Vent Cap Red	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
ZelluTrans Dialyseschlauch 3,5	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
15 ml Zentrifugenröhre	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
50 ml Zentrifugenröhre	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Kits

Kit	Hersteller
EndoFree® Plasmid Purification Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
HotStar Taq DNA Polymerase Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
Human MSC Nucleofector® Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
Pierce™ BCA Protein Assay kit	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Pierce® Crosslink Immunoprecipitation Kit	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland)
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)

2 Material und Methoden

2.1.5 Puffer

Tabelle 2.5: Puffer. Aufgeführt ist die Zusammensetzung der selbst hergestellten und die der erworbenen Puffer.

Puffer	Zusammensetzung	pH
Zellkultur		
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Phosphatpuffer	7,4
Agarose-Gelelektrophorese		
MOPS (5 ×)	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA	7,0
TAE (50 ×)	2 M Tris, Eisessig, 0,1 M EDTA	8,5 ¹
Immunpräzipitation		
Kopplungspuffer (20×)	200 mM NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffer, 3 M NaCl	7,2
Modifiziertes Kopplungspuf.	1:20 Kopplungspuffer (20×) + 1:20 IP-Lyse/Wasch Puffer	7,2
Pulldown		
PBS-PD ² (5 ×)	0,5 M Phosphatpuffer ³ , 0,75 M NaCl	8,0
Äuilibrierungspuffer	PBS-PD, 0,05 % Tween-20, 10 mM Imidazol	8,0
Waschpuffer	PBS-PD, 0,05 % Tween-20, 50 mM Imidazol	8,0
Lysepuffer		
IP-Lyse/Wasch Puffer	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 5 % Glycerin	7,4
PD-Lyse Puffer	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 5 % Glycerin	7,4
RIPA-Puffer	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % Na-DOC, 0,1 % SDS	7,4
SDS-PAGE		
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl	6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl	8,9
Laufpuffer	50 mM Tris-HCl, 380 mM Glycin, 0,1 % SDS	8,7
Western Blot		
TBS-T (10 ×)	200 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 0,5 % Tween 20	7,4
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % Methanol	8,3
Immunkomplex-Waschpuf.	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, 0,2 % SDS	7,4
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 150 mM 2-Mercaptoethanol	6,7

¹ Der pH-Wert wird mit KOH adjustiert.

² PBS-Puffer für den Pulldown.

³ Der pH-Wert wird mit 0,5 M NaH₂PO₄, 0,75 M NaCl und 0,5 M Na₂HPO₄, 0,75 M NaCl adjustiert.

2.1.6 Antibiotika

Tabelle 2.6: Antibiotika

Antibiotikum	Verwendung	Arbeitskonzentration µg · ml ⁻¹
Blasticidin S HCl	Selektion immortalisierter Zellen (hTERT ¹)	10
Ciprofloxacin HCl	Zellkulturbehandlung gegen Mycoplasmen	10
Gentamycin	Behandlung der Zellkultur	50
Kanamycin	Selektion transformierter Bakterien (Tabelle 2.7)	25
Puromycin	Selektion pLenti-siRNA-GFP transfizierter Zellen	0,3 – 0,5

¹ *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT)

2.1.7 Zelllinien und Stämme

HEK293T Die Zelllinie 293T (DSMZ no.: ACC 635) ist ein Derivat der menschlichen embryonalen Nierenzelllinie 293 (DSMZ no.: ACC 305). 293T trägt ein Plasmid mit der temperatursensitiven Mutante des SV-40 *large T-antigen* (tsA1609neo). Diese Modifikation ermöglicht der Zelle die DNA-Replikation von Plasmiden mit dem SV40 Replikationsursprung und macht die Zellen zu einem geeigneten System für die Vermehrung von lenti- oder retroviralen Vektoren (Graham et al. 1977). Darüber hinaus eignen sich die HEK-Zellen für die Expression von rekombinanten humanen Proteinen (Thomas und Smart 2005). Um den Ursprung dieser Zelllinie zu verdeutlichen, wurde in dieser Arbeit die Abkürzung *HEK293T* für *human embryonic kidney* (HEK)-293T verwendet. Die Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erworben.

CPC241ht Die Zelllinie CPC241ht ist eine immortalisierte Zelllinie chondrogener Progenitorzellen. Sie wurde durch lentiviralen Gentransfer mit dem Gen für die *humane Telomerase Reverse Transkriptase* (hTERT) erzeugt und von Christa Bode (AG Orale Biologie und Geweberegeneration der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt.

CPC241ht-siSOX9-23 Diese Zelllinie wurde durch lentiviralen Gentransfer des siRNA Expressionsvektors piLenti-RNAi-GFP-SOX9-23 aus CPC241ht durch Christa Bode erzeugt und bereit gestellt (Tabelle 2.8). In nachfolgenden Abschnitten dieser Dissertation wird die Zelllinie als *CPC241ht-siSOX9* bezeichnet.

CPC241ht-siRUNX2-1472 Diese Zelllinie wurde durch lentiviralen Gentransfer mit dem siRNA Expressionsvektor piLenti-RNAi-GFP-RUNX2-1472 (Tabelle 2.8) durch Christa Bode erzeugt und bereit gestellt. In nachfolgenden Abschnitten dieser Dissertation wird der Stamm als *CPC241ht-siRUNX2* bezeichnet.

DH5 α Der bakterielle Stamm DH5 α wurde aus *Escherichia coli* (*E. coli*) entwickelt. Sie enthält multiple Mutationen, die u. a. zu einer hohen Transformationseffizienz und Klonierung führen (Hanahan 1983, Taylor et al. 1993). Chemisch kompetente DH5 α TM C2987H wurden von New England Biolabs (NEB) erworben.

Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*) *U169 phoA glnV44* ϕ *80* Δ (*lacZ*) *M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

2.1.8 Plasmide

Tabelle 2.7: ORF Expressionsvektoren. Die Accession No. verweist auf das ORF-Produkt der Plasmide und nicht auf die Plasmide selbst. Der Vektor enthält den Selektionsmarker Kanamycin (Kan) für *E. coli* und Neomycin (Neo) für Säugetierzellen.

Plasmid	Marker	NCBI Accession	Herkunft
pCMV6-DDX5-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_004396	OriGene (Rockville, USA)
pCMV6-HSPA8-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_006597	OriGene (Rockville, USA)
pCMV6-LASP1-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_006148	OriGene (Rockville, USA)
pCMV6-RAB5C-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_201434	OriGene (Rockville, USA)
pCMV6-SFPQ-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_005066	OriGene (Rockville, USA)
pCMV6-STMN1-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_203401	OriGene (Rockville, USA)
pCMV6-YWHAE-C-Myc-DDK	Kan/Neo	NM_006761	OriGene (Rockville, USA)
pmaxGFP®	Kan		Lonza (Basel, Schweiz)
pPM-hRUNX2-His	Kan/Neo	NM_001024630.3	BioCat (Heidelberg, DE)
pPM-hSOX9-His	Kan/Neo	NM_000346.3	BioCat (Heidelberg, DE)

Tabelle 2.8: siRNA Lentivektoren. Bei den aufgelisteten siRNA Lentivektoren handelt es sich um iLenti-GFP-Konstrukte. Der Selektionsmarker für *E. coli* ist Kanamycin, für Säugetierzellen ist er Puromycin. Die Konstrukte enthalten das Reporterogen *GFP*. Die Plasmide wurden von BioCat (Heidelberg, Deutschland) erworben.

Zielgen	Plasmid	Zielsequenz
SOX9	piLenti-siRNA-GFP-SOX9-23	TGAAGATGACCGACGAGCAGGAGAAGGGC
	piLenti-siRNA-GFP-SOX9-478	CGGCTGCGCGTGCAGCACAAGAAGGACCA
	piLenti-siRNA-GFP-SOX9-836	GCAGCGACGTCATCTCCAA
	piLenti-siRNA-GFP-SOX9-873	CAACGAGTTTGACCAGTAC
RUNX2	piLenti-siRNA-GFP-RUNX2-635	CCTATCACAGAGCAATTAAAGTTACAGTA
	piLenti-siRNA-GFP-RUNX2-1013	GCATTTTCAGGTGCTTCAGAACTGGGCCCT
	piLenti-siRNA-GFP-RUNX2-1371	CAGCACGCTATTAAATGCAAATT
	piLenti-siRNA-GFP-RUNX2-1472	TGGATGAATCTGTTTGGCGACCATATTGA

2.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 2.9: Primer für die RT-qPCR. Unter *Symbol* sind die offiziellen Abkürzungen der *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) aufgeführt (Gray et al. 2013). Aufgelistet sind die Primerpaare mit der entsprechenden Produktgröße und der optimalen Annealing-Temperatur (AT). Das Entwerfen und Testen der Primer wird in Abschnitt 2.3.2 beschrieben.

Symbol	Forward Primer 5' → 3' Reverse Primer 5' → 3'	Produkt [bp]	AT [°C]	Accession
ACAN	CTTGACTTGGGCAAACCTGC CACTAAAGTCAGGCAGGCCA	143	59,4	NM_001135.3
B2M	TGCTGTCTCCATGTTTGTATGTATCT TCTCTGCTCCCCACCTCTAA	86	61	NM_004048
COL1A1	TTCCCCCAGCCACAAAGAGTC CGTCATCGCACAAACACCT	266	61	NM_000088.3
COL2A1	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC ACCACGATCACCCCTTGACTC	152	63	NM_001844.4
LEMD2	CTTCAGAGGAGTTCGGCTCG GTTTCTGCCAGCACAAACAGG	103	60	NM_181336.3
RUNX2	CAGACCAGCAGCACTCCATA CAGCGTCAACACCATCATTC	178	63	NM_004348
SOX9	CAGGCTTTGCGATTTAAGGA CCGTTTTAAGGCTCAAGGTG	155	60	NM_000346.3
TMPO	ATCTCCACCCGTCCTCCTTT AAGTTTGTGGCAACAAGAGGC	104	60	NM_003276.2

Tabelle 2.10: Primer für die Sequenzierung der ORF cDNA Klone.

Primer	Sequenz 5' → 3'	AT [°C]	Hersteller
VP1.5 (forward)	GGACTTTCCAAAATGTCTG	51	OriGene (Rockville, USA)
XL39 (reverse)	ATTAGGACAAGGCTGGTGGG	60	OriGene (Rockville, USA)

Tabelle 2.11: Antisense-Oligonukleotide (siRNA).

Ziel	Produktname	Zielsequenz 5' → 3'	Hersteller
TMPO	Hs_TMPO_7	CCGGACTTCTCCAGTGACGAA	QIAGEN (Hilden)
	Hs_TMPO_8	GACAGATACAGTGACAATGAA	QIAGEN (Hilden)
	Hs_TMPO_12	AAAGATGATCTAGATGTAACA	QIAGEN (Hilden)
	Hs_TMPO_13	AACCAGGAAGCTATATGAGAA	QIAGEN (Hilden)
LEMD2	Hs_LEMD2_5	GACCTGGATACTGAGCAGTAA	QIAGEN (Hilden)
	Hs_LEMD2_6	CTCGTCCTGACACGATTCCAA	QIAGEN (Hilden)
	Hs_LEMD2_7	ATGGAAGCCCAAGAATATATA	QIAGEN (Hilden)
	Hs_LEMD2_8	AAGGTGCTAGAAATTAGAACA	QIAGEN (Hilden)

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2.12: Verwendete Antikörper für Western Blots und Immunpräzipitation. Alle aufgeführten Antikörper sind gegen die jeweiligen humanen Antigene und in Teilen gegen Maus und Ratte spezifisch.

Antikörper	Wirt	Firma
Primärantikörper		
α -Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-6 \times His tag [®] [HIS.H8]	Maus	abcam (Cambridge, UK)
4c5 anti-DDK (IgG2a)	Maus	OriGene (Rockville, USA)
SOX9 (H-90): sc-20095	Kaninchen	Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, USA)
SOX9 Kat. Nr. AP06583PU-N	Kaninchen	Acris (Herford, UK)
SOX9 (M01) Klon 2A2	Maus	Abnova (Taipai City, Taiwan)
SOX9 (M02) Klon 3C10	Maus	Novus Biologicals (Cambridge, UK)
RUNX2 (27-K): sc-101145	Maus	Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, USA)
RUNX2 AS110	Maus	Merck Millipore (Nottingham, UK)
RUNX2 (C-12): sc-390 715	Maus	Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, USA)
RUNX2 [EPR6544]	Kaninchen	abcam (Cambridge, UK)
RUNX2 (M70): sc-10 758	Kaninchen	Santa Cruz Biotech. (Santa Cruz, USA)
Sekundärantikörper		
Anti-Maus IgG (Fab spezifisch)–POD ¹	Ziege	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Anti-Kaninchen IgG	Ziege	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

¹ Peroxidase (POD)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Herkunft humaner Proben und Präparation

Die humanen CPCs wurden aus hyalinem Knorpel arthrotischer Kniegelenke isoliert. Die Patienten waren zwischen 65 bis 75 Jahre alt und befanden sich in einem späten Stadium der Arthrose. Alle Patienten erfüllten die Klassifikationskriterien der *American College of Rheumatology* (Altman et al. 1986) für Osteoarthritis im Knie. Vor der Operation wurden die Patienten über die Ziele dieser Studien aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung der Proben ab. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen genehmigt (Antragsnummer 25/12/10). Die total Kniearthroplastik wurde in dem akademischen Lehrkrankenhaus Neu-Mariahilf durchgeführt. Die Proben wurden nach Entnahme in eine Nährlösung aus PBS und Dulbecco's Modified Eagle's Medium+GlutaMaxTM (DMEM+GlutaMaxTM) im Verhältnis 1:1 (v/v) gegeben und zur Verarbeitung an die UMG weitergeleitet.

2.2.2 Isolierung von chondrogenen Progenitorzellen

Die CPCs wurden aus dem degenerativen Randbereich des verbliebenen Knorpels gewonnen. Zum Isolieren der Zellen wurde der degenerative Bereich mit einem Skalpell angeritzt und im Durchmesser wenige Millimeter große Stücke abgeschabt. Die Explantate wurden in 75 cm² große Gewebekulturflaschen mit DMEM+GlutaMaxTM (zugesetzt mit 10 % FCS und 50 µg · ml⁻¹ Gentamycin) gegeben und 7 bis 10 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert bis die Zellen aus den Explantaten auswanderten und die Kulturflaschen besiedelten. Nach dieser Anzuchtzeit wurde die Migration der Zellen aus dem Gewebe mikroskopisch (Axiovert 40 CFL Zeiss, Göttingen, DE) überprüft. Die Explantate wurden mit PBS abgespült. Bei dichter Besiedlung wurden die Zellen zunächst mithilfe eines Zellschabers vereinzelt und ab einer Konfluenz von etwa 70 bis 80 % geerntet.

2.2.3 Zellanzucht, Ernte, Zählung und Passagierung

Die Anzucht humaner Zellen erfolgte stets mit DMEM+GlutaMaxTM (zugesetzt mit 10 % FCS) bei 37 °C sowie 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Auf den präventiven Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet. Diese wurden nur bei Primärkulturen, d. h. frisch isolierten Zellen, eingesetzt. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Zellkulturen wurden nach Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % passagiert. Die adhärenenten Zellen wurden nach der Behandlung mit Trypsin geerntet. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um das inhibitorische FCS zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin von den Kulturflaschen abgelöst. Das Ablösen der Zellen von der Kunststoffoberfläche der Kulturflasche wurde mikroskopisch überprüft und durch Inkubation bei 37 °C für 3 bis 7 min unterstützt. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von DMEM+GlutaMaxTM (supplementiert mit 10 % FCS) gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in Rundboden-Zentrifugenröhrchen gesammelt, 10 min bei 300 g abzentrifugiert und anschließend in

PBS resuspendiert um die Lebendzellzahl zu bestimmen. Die Lebendzellzahl wurde mithilfe einer CellometerTM Zählkammer nach Gebrauchsanweisung des Herstellers bestimmt. Zur Fortführung der Zellkultur wurden 5 bis $8 \cdot 10^4$ Zellen wieder ausgesät. Die restlichen Zellen wurden erneut abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und schlagartig mit flüssigem Stickstoff eingefroren, um sämtliche Stoffwechselfvorgänge zu stoppen und die Einflüsse nach der Zellkultivierung möglichst schnell zu minimieren. Bis zu ihrer weiteren Verwendung, z. B. für Protein- oder RNA-Extraktion, wurden die Zellpellets bei -80°C gelagert.

2.2.4 Selektionierung transgener Zellen

Immortalisierte Zellen Die immortalisierten Zellen (hTERT) wurden mit $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Blasticidin selektioniert.

Lentiviral transfizierte Zellen Die lentiviral transfizierten Zellen wurden mit $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Blasticidin und $0,3 - 0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Puromycin selektioniert.

2.2.5 Kryokonservierung und Revitalisierung

Zur langfristigen Lagerung von Zellen und Aufrechterhaltung von Zelllinien wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Konservieren der Zellen wurden $5 \cdot 10^5$ bis max. $1 \cdot 10^6$ Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das Einfriermedium setzte sich aus 10 % DMSO als Gefrierschutzmittel, 20 % FCS und 70 % DMEM+GlutaMaxTM zusammen. Die präparierten Zellen wurden zunächst mithilfe einer Einfrierbox langsam von Raumtemperatur bis auf -80°C für 24 h bis max. 5 Tage runtergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Kryokulturen erfolgte möglichst schnell in einem auf 37°C geheiztes Wasserbad. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in eine Gewebekulturflasche mit DMEM+GlutaMaxTM (supplementiert mit 10 % FCS) überführt. Das Medium wurde nach 24 bis 48 h gewechselt, um abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Die weitere Zellanzucht erfolgte entsprechend Abschnitt 2.2.3 auf Seite 27.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Reverse Transcription-gekoppelte quantitative Echtzeit-PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine hocheffiziente Methode zum Amplifizieren von selbst kleinsten Mengen von Nukleinsäuren (Mullis et al. 1986). Die *real-time* PCR oder quantitative Echtzeit PCR (qPCR) ist eine Methode, die eine Quantifizierung der Ausgangsmenge von Nukleinsäuren in einer Probe ermöglicht. Der große Vorteil im Vergleich zu anderen quantifizierenden Methoden besteht darin, dass die Quantifizierung in Echtzeit (*real-time*) abläuft und die Entwicklung der PCR zeitgleich verfolgt werden kann. Kombiniert mit einer vorausgehenden reversen Transkription wird es auch möglich den mRNA-Gehalt einer Probe mit der RT-qPCR zu quantifizieren (Nolan et al. 2006). Durch Normalisierung kann das Transkriptionsniveau der mRNA aus verschiedenen Patienten, Zelllinien und Behandlungen verglichen und untersucht werden.

Der Versuchsablauf der RT-qPCR setzt sich aus folgenden Versuchsabschnitten zusammen:

1. Aufreinigung von RNA
2. Bestimmung der RNA-Konzentration
3. Reverse Transkription
4. Quantifizierung durch qPCR
5. Normalisierung der Ct-Werte

In den folgenden Paragraphen werden die einzelnen Versuchsabschnitte genauer dargestellt.

Aufreinigung von RNA Die Gesamt-RNA aus humanen CPCs wurde mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Hierzu wurden die Zellpellets – mit einer Zellzahl von mindestens $1 \cdot 10^5$ bis höchstens $5 \cdot 10^6$ Zellen – zunächst in 350 μ l RLT-Puffer (zugesetzt mit 1 % 2-Mercaptoethanol) aufgenommen und zum Homogenisieren sowie Lysieren 1 min lang gevortext. Dieser Puffer enthält das chaotrope Guanidiniumthiocyanat-Salz wodurch sämtliche Proteine – einschließlich RNasen – denaturiert werden. Das Lysat wurde in QIAshredder Säulen überführt und 2 min bei höchster Drehzahl zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf), um unlösliche Zelltrümmer zu entfernen, die Viskosität des Lysats zu reduzieren und die Ausbeute an RNA zu erhöhen.

Der Durchfluss wurde 1:1 (v/v) mit 70 % Ethanol versetzt, durch Pipettieren gemischt, auf die RNeasy spin Säule überführt und 30 s bei 8000 g abzentrifugiert. Das Ethanol erhöht die Affinität der RNA zur Membran aus Siliciumdioxid und damit die Ausbeute. RNA > 200 Basenpaar (bp) – und damit die mRNA-Fraktion – wird dabei vor dem Durchfluss zurückgehalten, während RNA < 200 bp (rRNA, tRNA, usw.) ungehindert die Membran passiert und verworfen wird. Im nächsten Schritt wurde die Säule zunächst 12 s bei 8000 g mit 700 μ l RW1 und anschließend zweimal 30 s bei 8000 g mit 500 μ l RPE-Puffer gewaschen. Vor der Elution wurden die Pufferreste 1 min bei voller Drehzahl

abzentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 30 bis 50 μl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der RNeasy spin Säule pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um ein vollständiges lösen der RNA zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben 1 min bei voller Drehzahl zentrifugiert und das Eluat in einem 1,5 ml Biopur Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) aufgefangen. Die RNA Konzentration wurde entsprechend des folgenden Paragraphen bestimmt und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration Die Konzentration und der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren wurde mit dem UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop 1000 nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde mit der Option ‚RNA-40‘, doppelsträngige DNA (dsDNA) mit der Option ‚DNA-50‘ und einzelsträngige DNA (ssDNA) mit der Option ‚DNA-33‘ bestimmt. Die Qualität der Probe wurde anhand der 260/280 oder 260/230 Verhältnisse beurteilt. Die Absorption von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm und die von Proteinen sowie phenolischen Verbindungen bei 280 nm. Verantwortlich für die Absorption bei 280 nm sind die aromatischen Reste Tryptophan, Tyrosin und Histidin. Ein 260/280 Ratio von $\sim 2,0$ wird generell als „reine“ RNA und ein Ratio von $\sim 1,8$ als „reine“ DNA akzeptiert. Typische Werte streuen zwischen 2,1 und 1,8 (Wilfinger et al. 1997, Desjardins und Conklin 2010). Als weiteres Kriterium dient das 260/230 Ratio, bei der die Absorption von vielen organischen Verbindungen, inklusive der Peptidbindung, im ultravioletten Bereich gemessen wird. Typische Werte liegen im Bereich von 1,8–2,2.

Qualitätskontrolle der RNA Die Integrität der extrahierten RNA wurde durch ein denaturierendes Formaldehyd RNA-Agarosegel überprüft, bevor sie zur reversen Transkription und qPCR verwendet wurde. Dazu wurde 0,5 g Agarose mit 31 ml Reinstwasser aufgeköcht. Anschließend wurden 10 ml $5 \times$ MOPS (Tabelle 2.5) hinzugefügt und nach Abkühlen auf etwa 60°C um 9 ml 37 %-iges Formaldehyd ergänzt. Zur Analyse der Proben wurden 0,25–1 μg RNA in 4 μl DEPC-behandeltes Reinstwasser aufgenommen und mit 4 μl $2 \times$ RNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher) gemischt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren enthält der RNA Loading Dye Ethidiumbromid. Die Proben wurden 10 min bei 70°C erhitzt, 3 min auf Eis abgekühlt und anschließend auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 90–100 V durchgeführt. Als Laufpuffer wurde $1 \times$ MOPS verwendet.

Reverse Transkription In der qPCR wird eine DNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet. Daher ist es erforderlich zunächst die mRNA-Transkripte in cDNA umzuschreiben. Die reverse Transkription wurde mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) durchgeführt. Hierzu wurden 200 ng mRNA mit 2 μl $7 \times$ gDNA Wipeout-Puffer versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 14 μl verdünnt. Dieser Ansatz wurde 2 min bei 42°C erhitzt, um Kontaminationen durch genomische DNA zu beseitigen. Anschließend wurde dem Ansatz 1 μl QuantiScript Reverse Transcriptase, 4 μl QuantiScript RT-Puffer ($5 \times$), und 1 μl RT Primer Mix hinzugesetzt. Die reverse Transkription wurde 15 min bei 42°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 95°C für 3 min abgestoppt. Nach der reverse Transkription wurde die Probe

Tabelle 2.13: Standardisiertes qPCR-Protokoll. Die Annealing-Temperatur hängt von den verwendeten Primerpaaren ab. Üblich sind Temperaturen zwischen 53 und 63°C

Schritt	Zeit [s]	Temp. [°C]	Zyklen
Initiale Denaturierung	3	95	1
Denaturierung	20	95	} 45
Hybridisierung (Annealing)	20	53–63	
DNA-Polymerisation (Elongation)	20	72	
Abschlussynthese	10 min	72	1

mit RNase-freiem Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Ausgehend von einer 100 %-igen reverse Transkription der mRNA in cDNA, beträgt die Konzentration der cDNA 1 ng · µl⁻¹. Bis zur Verwendung wurde die cDNA auf Eis bewahrt bzw. für eine langfristige Lagerung bei -20 °C eingefroren.

Quantifizierung durch qPCR Der Reaktionsansatz für die PCR enthielt pro Reaktion 1 µl (1 ng · µl⁻¹) cDNA, 2 µl (10 pmol · µl⁻¹) forward und reverse Primer-Mix, 2 µl RNase-freies Wasser und 5 µl 2× Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Der Reaktionsansatz wurde in eine PCR-96-Well-Platte (MJ, white flat cap) pipetiert, mit optical flat caps verschlossen und für 10 s bei 1000 rpm abzentrifugiert. Jede Probe wurde 9-Fach (3×3 Ansätze) mithilfe des Mastercycler[®] ep gradient S realplex² (Eppendorf) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Das PCR-Protokoll ist der Tabelle 2.13 zu entnehmen. Die Quantifizierung der Ausgangsmenge erfolgte anhand des Ct- oder CP- (*crossing point*) Werts. Der Ct-Wert entspricht der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstantes Fluoreszenzniveau zu erreichen (Pfaffl 2001).

Normalisierung der Messwerte Die Messwerte wurden nach Pfaffl (2001) normalisiert. Bei dieser Methode handelt es sich um eine relative Quantifizierung der Genexpression. Dabei wird die Expression der Zielgene mit einem konstitutiv exprimiertem Gen (HKG) als Referenzgen normalisiert und die relative Expression des zu untersuchenden Zielgens auf eine Kontrollprobe bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes und des p-Werts erfolgte mit der Software REST2009 (QIAGEN) auf folgender Basis:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}}(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}$$

Der Vorteil der Normalisierung liegt in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da die Einflüsse durch Gewebe, der Matrix, der RNA-Extraktion und Fehler bei der PCR innerhalb des Experiments das Zielgen sowie das HKG gleichermaßen betreffen (Pfaffl 2001).

2.3.2 Primerdesign

Die Auswirkungen der Überexpression und des Knockdowns von Kandidaten wurde per RT-qPCR überprüft (Abschnitt 2.3.1). Dazu wurden die zielspezifischen Primer mit den Web-Programmen Primer3web Version 4.0.0 (Koressaar und Remm 2007, Untergasser et al. 2012) oder Primer-Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) entworfen (Ye et al. 2012). Folgende Parameter wurden dabei eingestellt: Maximale Länge von 18–22 Basen, GC-Gehalt 50 %, Annealingtemperatur von etwa 60°C. Die entworfenen Primer wurden *in silicio* auf die Bildung von Homo- und Heterodimere überprüft (Owczarzy et al. 2008).

Überprüfung auf Hybridisierungsstellen Die entworfenen Primersequenzen wurden in BLAST geladen und mit der NCBI Datenbank abgeglichen. Dabei wurde überprüft, ob die Sequenzen spezifisch sind, d. h. nur mit ihrer Zielsequenz hybridisieren. Die Primer wurden von Operon Biotechnologie GmbH (Köln, Deutschland) bezogen.

Schmelzkurvenanalyse Die Spezifität eines Primers hängt von einer optimalen Annealing-Temperatur ab. Die Spezifität der erstellten Primer und die optimale Annealing-Temperatur wurde per Gradienten PCR und einer Schmelzkurvenanalyse ermittelt. Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Punkt 2.3.1 angesetzt. Für die Gradienten PCR wurden folgende Annealing-Temperatur eingestellt: 50,7 °C, 53,1 °C, 55,5 °C, 57,9 °C, 60 °C, 61,6 °C, 62,7 °C und 63 °C. Bei mehr als einem PCR-Produkt wurden die Primer als unspezifisch betrachtet und verworfen.

Sequenzierung der PCR-Produkte Die PCR-Produkte mit der höchsten Produktmenge wurden vereinigt und durch SeqLab (Göttingen) sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mithilfe von UGENE (Okonechnikov et al. 2012) begutachtet. Die überprüfte Sequenz wurde anschließend mithilfe von Clustal Omega (Goujon et al. 2010, Sievers et al. 2011) mit der bei NCBI (Benson et al. 2009, Sayers et al. 2009) hinterlegten Sequenz abgeglichen.

2.3.3 Transformation von *E. coli* DH5 α

Für die Transfektion von CPCs und HEK293T-Zellen (Abschnitt 2.3.7) wurden die Plasmide in chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α (Abschnitt 2.1.7) entsprechend des *High Efficiency Transformation Protocol* (C2987H/C2987I) von NEB amplifiziert.

Die kompetenten Bakterien wurden zunächst 10 min auf Eis aufgetaut. Zum Transformieren wurden 1 μ l (50 bis 100 ng) Plasmid-DNA zu der Bakteriensuspension hinzugefügt, durch Schnippen der Mikroreaktionsgefäße gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde der Ansatz einem kurzen Hitzeschock (42 °C für 30 s) unterzogen und anschließend 5 min auf Eis ruhen gelassen. Für die phänotypische Genexpression wurde dem Ansatz 950 μ l SOC Outgrowth Medium (2 % Pepton aus Sojamehl, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, NEB) hinzugefügt und im Thermoblock 60 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Zum Selektionieren wurden die antibiotikahaltigen *lysogeny broth* (LB)-Agarplatten auf 37 °C vorgewärmt. Es wurden 25, 50 und 100 μ l des

Transformationsansatzes mithilfe eines Trigalski-Spatens auf den Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden zum Animpfen von flüssigem LB-Medium für die Plasmidpräparation (Abschnitt 2.3.4) und Glycerinkultur verwendet (Abschnitt 2.3.5).

2.3.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die amplifizierte Plasmid-DNA wurde mithilfe des EndoFree® Plasmid Maxi Purification Kit (QIAGEN) isoliert. Sämtliche Lösungen wurden entsprechend der Herstellerangaben präpariert und eingesetzt.

Die Plasmidpräparation setzt sich aus folgenden Versuchsabschnitten zusammen:

1. Selektive Kultivierung der Bakterien
2. Zellernte und Zellaufschluss
3. Aufreinigung der Plasmid-DNA
4. Verifikation

Selektive Kultivierung der Bakterien Zur Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden 200 ml LB-Medium mit den transformierten Bakterien aus Abschnitt 2.3.3 angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter schütteln bei 180 rpm inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt (Abschnitt 2.1.7 und Tabelle 2.6).

Zellernte und Zellaufschluss Die Zellen der Übernachtskultur wurden bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C 15 min mit 6000 × g zentrifugiert (SORVALL RC 5B Plus, Rotor SLA1500, 6300 rpm) und vom Medium getrennt. Für den Zellaufschluss wurde das Bakterienpellet zunächst mit 10 ml Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 µg · ml⁻¹ RNAase A) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit 10 ml Puffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS w:v) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml gekühltem Puffer P3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde der pH-Wert des alkalisierten Lysats neutralisiert. Das Lysat wurde mithilfe des QIAfilter Cartridge von genomischer DNA, ausgefallenen Proteinen und Salzen nach Angaben des Herstellers geklärt.

Aufreinigung der Plasmid-DNA Das geklärte Lysat wurde mit 2,5 ml ER-Puffer (Endotoxin Removal Buffer) versetzt, durch mehrfaches Invertieren gemischt und 30 min auf Eis inkubiert, während dessen die QIAGEN-tip 500 Silikatsäule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert wurde. Das geklärte Lysat wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben und die Plasmide an das Säulenmaterial gebunden. Das Säulenmaterial wurde vor der Elution der Plasmid-DNA zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen, um Kontaminanten zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml QN-Puffer in 30 ml COREX®-Röhrchen (USA) eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei 4 °C und 9500 rpm (SORVALL RC 5B Plus, Rotor HB-6, 13 000) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70 %-igem endotoxinfreiem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet.

Bestimmung der DNA-Konzentration Das trockene DNA-Pellet wurde in 150 μl Nuklease-freies Wasser aufgenommen, die Konzentration sowie der Reinheitsgrad mit dem UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop 1000 nach Angaben des Herstellers bestimmt (Punkt 2.3.1) und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert.

Verifikation Die isolierten Plasmide wurden zunächst durch Restriktion und anschließend durch Sequenzierung auf das korrekte Insert überprüft. Es wurden je Restriktion 1 μg Plasmid-DNA entsprechend den Herstellerangaben der Restriktionsenzyme verdaut und entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.3.6). Zur Sequenzierung wurden 12 μl ($80\text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) Plasmid-Lösung mit 3 μl Sequenzierungsprimer ($10\text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) gemischt und durch SeqLab (Göttingen) sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mithilfe von UGENE begutachtet und anschließend mithilfe von Clustal Omega mit der bei NCBI hinterlegten Sequenz abgeglichen.

2.3.5 Glycerinkultur

Von den transformierten Bakterien wurden für spätere Plasmidpräparationen Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 500 μl frische Bakteriensuspension, z. B. vor der Plasmidpräparation entnommen (Abschnitt 2.3.4), 1:1 mit 100 % Glycerin verdünnt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert. Für eine erneute Plasmidpräparation wurde mithilfe eines sterilen Zahnstochers etwas Zellmaterial abgekratzt und flüssiges LB-Medium, supplementiert mit entsprechendem Antibiotikum, angeimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode. Mithilfe eines elektrischen Feldes ermöglicht sie die Auftrennung von polymeren Nukleinsäuren nach dem Molekulargewicht. Bei dieser Methode wird die negative Eigenladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats genutzt. Die Nukleinsäuren werden dabei entsprechend ihrer Kettenlänge – und damit proportional zur Molekülmasse – aufgetrennt.

Die amplifizierten und aufgereinigten Plasmide sowie die Proben aus den Kontrollrestriktionen (Abschnitt 2.3.4) wurden mithilfe dieser Methode analysiert. Die Proben wurden mit $6 \times$ DNA Loading Dye (Thermo Fisher) versetzt. Die DNA-Fragmente wurden entsprechend der erwarteten Größe mit 0,7 bis 1,2 %-igen Agarosegelen aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wurde Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Tabelle 2.5) verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde Roti-Safe GelStain (Roth) direkt in das Gel gegeben. Als DNA Standard wurde der GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer (Tabelle 2.5). Die Elektrophorese wurde mit 100 mA in horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Je nach Größe der Gele wurde die Elektrophorese 20 min bis 1,5 h durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Banden durch UV-Licht bei 302 nm visualisiert und fotografisch dokumentiert.

2.3.7 Transfektion humaner Zelllinien

Nukleofektion von CPCs Die Elektroporation ist eine gängige Methode für die Transformation von prokaryotischen bzw. Transfektion von eukaryotischen Zellen. Mithilfe eines Kondensators wird ein kurzer elektrische Puls erzeugt, der zur vorübergehenden Permeabilisierung der Zellmembran führt und die Aufnahme von DNA oder RNA in die Zelle ermöglicht. Eine spezielle Form der Transfektion stellt die Nukleofektion dar. Die spezielle Zusammensetzung des Transfektionsreagenzes ermöglicht dabei die direkte Aufnahme von DNA oder RNA in den Zellkern.

Die Transfektion von CPCs wurde mit dem Human MSC Nucleofektor[®] Kit (Lonza) durchgeführt. Es wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen mit PBS gewaschen und 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Zur Transfektion wurde das Transfektionsreagenz *Human MSC Nucleofector Solution* entsprechend den Herstellerangaben supplementiert. Pro Transfektion wurden 90 μ l Reagenz mit 20 μ l Supplement gemischt, um die optimale Konzentration der Substanzen zu erreichen. Das Zellpellet wurde mit 100 μ l des supplementierten Transfektionsreagenzes resuspendiert. Zur Transfektion wurden 2 μ g Plasmid DNA bzw. 0,2 nmol siRNA hinzugefügt. Der fertige Transfektionsansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt. Für eine hohe Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit dem U-23 Programm einem elektrischen Puls ausgesetzt. Die behandelten Zellen wurden mit 500 μ l Medium aus der Küvette ausgeschwemmt und tropfenweise in eine bereits mit 1 ml Medium äquilibrierte 6-Well-Platte gegeben. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium mit den abgestorbenen Zellen entfernt und gegen frisches Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden nach weiteren 24 h Inkubation entweder direkt mit eiskaltem Lysispuffer aufgelöst oder für spätere Versuche geerntet und eingefroren (Abschnitt 2.2.3).

Polyfektion von HEK239T mit PolyFect[®] Das PolyFect Transfektionsreagenz ist u. a. für die Transfektion von HEK293 Zellen optimiert und wurde entsprechend den Herstellerangaben für HEK293T Zellen durchgeführt. Im folgenden wird die Transfektion in einer 6-Well-Platte beschrieben. Am Tag vor der Transfektion wurden $6 \cdot 10^5$ Zellen pro Well ausgesät. Die Anzucht erfolgte über Nacht in 3 ml DMEM+Glutamax[™] (supplementiert mit 10 % FCS und Gentamycin) bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Erreichen von 40 bis 80 % Konfluenz wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden 2 μ g DNA mit einer Minimalkonzentration von $0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ mit DMEM+GlutaMax[™] ohne FCS und Antibiotika auf ein Gesamtvolumen von 100 μ l verdünnt. Anschließend wurden 20 μ l PolyFect Transfektionsreagenz hinzugefügt und durch 5-faches Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Transfektionsansatz wurde zur Bildung der Dendromer-DNA-Komplexe 5 bis 10 min bei RT inkubiert. Während dessen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und gegen 3 ml frisches Medium ausgetauscht sowie im Brutschrank aspiriert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz mit 600 μ l DMEM+GlutaMax[™] (supplementiert mit 10 % FCS und Gentamycin) versetzt, durch Pipettieren gemischt und auf die Zellkultur gegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die Komplexe gleichmäßig verteilt. Die Inkubation erfolgte 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Zellyse

Die Zellen wurden entsprechend den Anforderungen nachfolgender Versuche aufgeschlossen. Den Lysepuffern wurden dabei stets Protease und Phosphatase Inhibitoren beige-mischt (Pierce Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail). Die Zusammensetzung der Lysepuffer ist Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Immunpräzipitation Für die Immunpräzipitation wurden die mediumfreien Zellpellets mit Pierce IP-Lysis/Wash Buffer resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Das Verhältnis von Puffer zu Zellmasse betrug 10:1 (v/w). Nach der Lyse wurden die Zelltrümmer 10 min bei $13\,000 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration und die Immunpräzipitation abgenommen.

Pulldown Für den Pulldown wurden die mediumfreien Zellpellets in Pulldown (PD)-Lysepuffer aufgenommen. Das Verhältnis von Puffer zu Zellen betrug 10:1 (v/w). Die Zellsuspension wurde im Wechsel dreimal mithilfe von flüssigem Stickstoff schlagartig eingefroren und in einem $20\,^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei $13\,000 \times g$ sedimentiert und der Überstand für die Bestimmung der Proteinkonzentration und den Pulldown abgenommen.

Denaturierende Zellyse Überexprimierte Proteine wurden mithilfe des *radio immunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffers freigesetzt. Die Zelltrümmer wurden 10 min bei $13\,000 \times g$ sedimentiert und der Überstand für die Bestimmung der Proteinkonzentration und SDS-PAGE abgenommen.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits bestimmt. Die Messung erfolgte mit Nanodrop 1000 (Thermo Fisher). Der BCA Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Detektion und Quantifizierung des Gesamtproteins. Diese Methode basiert auf der *Biuret-Reaktion*. Unter alkalischen Bedingungen werden zweiwertige Kupferkationen reduziert (Cu^{2+} zu Cu^{+}) und bilden mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen (BCA) einen lilafarbenen Komplex. Die Absorption dieses Komplexes wird bei 562 nm gemessen und ist von $20\,\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ bis $2\,\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ nahezu linear. Verantwortlich für die Reduktion sind Proteinstruktur, Zahl der Säureamidbindungen sowie die Cystein-, Cystine-, Tryptophan- und Tyrosinreste.

Der BCA-Assay setzt sich aus folgenden Abschnitten zusammen:

1. Ansetzen der Reaktionslösung
2. Erstellen einer Eichgeraden
3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Ansetzen der Reaktionslösung Die Reaktionslösung setzt sich aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B zusammen. Für jede Reaktion wurden 10 μl Probe mit 200 μl Reaktionslösung versetzt, d. h. im Verhältnis 1:20. Bei einer hohen Proteinkonzentration wurde die Probe ggf. verdünnt.

Erstellen einer Eichgerade Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichgeraden mit bekannter BSA-Konzentration. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von BSA erstellt und die Absorption (Ordinate) gegenüber der Konzentration (Abszisse) aufgetragen. Die unbekannte Konzentration der Probe wurde anhand dieser Eichgeraden abgeleitet.

Bestimmung der Proteinkonzentration der Probe Entsprechend der zu erwartenden Proteinkonzentration wurden zwei Protokolle mit unterschiedlichen Messbereichen verwendet. Der Messbereich liegt beim *test tube protocol* zwischen 20 und 2000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ und dem sensitiveren *enhanced test tube protocol* zwischen 5 und 250 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Für den Assay wurden 10 μl Probe mit 200 μl Reaktionslösung gemischt und im Wasserbad bei 37 °C (*test tube protocol*) bzw. 60 °C (*enhanced test tube protocol*) 30 min lang inkubiert. Vor der Messung der Proteinkonzentration wurde zunächst das Kondenswasser abzentrifugiert und die Proben auf RT abgekühlt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mithilfe des Nanodrop1000 entsprechend den Herstellerangaben gemessen.

2.4.3 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation eine weitverbreitete affinitätschromatographische Methode, die zur Untersuchung und Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet wird (Phizicky und Fields 1995). Bei der Immunpräzipitation wird die Affinität eines spezifischen Antikörpers für sein Antigen (Zielprotein) genutzt. Grundsätzlich wird hierbei ein Gewebe- oder Zelllysate mit einem spezifischen Antikörper versetzt und mit einer Protein A/G gekoppelten Säule immobilisiert. Gemäß einer chromatographischen Methode entspricht das Zelllysate der flüssigen Phase und die Säule der stationären Phase. Der Antikörper kann hierbei direkt oder zuvor an die Säule gebunden werden bevor er zu dem Lysat gegeben wird. Nach der Bildung des Immunkomplexes werden unspezifisch gebundene Proteine von der Säule abgewaschen und spezifisch gebundene Proteine durch Senkung des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenkonzentration eluiert. Die Proteine im Eluat können im Western Blot (Abschnitt 2.4.10) oder in der Massenspektrometrie (Abschnitt 2.5) nachgewiesen bzw. identifiziert werden (Free et al. 2009).

Der Versuchsablauf der Immunpräzipitation setzt sich aus folgenden Versuchsabschnitten zusammen:

1. Freisetzung des Antigens
2. Immobilisierung des Antikörpers
3. Immun- bzw. Co-Immunpräzipitation
4. Elution der Proteinkomplexe

Freisetzung des Antigens Für die Aufreinigung der Proteinkomplexe ist die Erhaltung der nativen dreidimensionalen Struktur der Proteine erforderlich (Phizicky und Fields 1995, Ji 2010). Daher wurden die frischen oder die tiefgefrorenen mediumfreien Zellpellets mit dem milden IP-Lysis/Wash Buffer (zugesetzt mit Protease und Phosphatase Inhibitoren) in einem 10:1 (v:w) Verhältnis von Puffer zu Zellpellet lysiert (Abschnitt 2.4.1).

Immobilisierung des Antikörpers Zunächst wurden die abgesetzten magnetischen Beads (engl. *beads* ‚Kügelchen‘) durch Schütteln oder kurzes Vortexen resuspendiert. Von der Suspension wurden 25 µl pro Immunpräzipitation in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die Beads wurden zweimal mit 500 µl modifiziertem Kopplungspuffer (Tabelle 2.5) gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper mit modifiziertem Kopplungspuffer auf eine Endkonzentration von 5 µg pro 100 µl verdünnt und mit den Beads 15 min rotierend bei RT inkubiert. Die Beads wurden alle 5 min durch Pipettieren resuspendiert. Ungebundene Antikörper wurden zunächst einmal mit 100 µl und anschließend zweimal mit 300 µl modifiziertem Kopplungspuffer gewaschen.

Immun- bzw. Co-Immunpräzipitation Das Lysat wurde mit IP-Lysis/Wash Buffer und Protease-Inhibitoren auf 500 µl verdünnt und mit den Beads 1 h rotierend bei RT inkubiert. Die Beads wurden alle 10 bis 15 min kurz durch Pipettieren resuspendiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen und für weitere Analysen aufbewahrt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch zweimaliges Waschen der Beads mit 500 µl IP-Lysis/Wash Buffer entfernt.

Elution der Proteinkomplexe Vor der Elution wurden die Beads mit 500 µl Reinstwasser gewaschen. Die Proteinkomplexe wurden mit 100 µl Elution Puffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieser Schritt wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Um eine Hydrolyse der Proteine zu verhindern und den störenden Einfluss des niedrigen pH-Wertes in nachfolgenden Versuchen zu beseitigen, wurden den Eluat 1:1 Neutralisierungspuffer (1 M Tris, pH 9,5) hinzugefügt.

2.4.4 Nachweis der Protein-Protein Interaktion

Das Ziel einer Immunpräzipitation ist die Aufreinigung eines Antigens. Im Gegensatz dazu dient die Co-Immunpräzipitation der Isolierung von Proteinkomplexen und ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Die Durchführung ist bei den beiden Methoden identisch, da die Immunpräzipitation prinzipiell nicht zwischen einem Protein und Proteinkomplexen diskriminiert. Im folgenden wird die Verifikation potentieller Interaktionspartner von SOX9 und RUNX2 durch Co-Immunpräzipitation beschrieben. Der Versuchsablauf der Co-Immunpräzipitation setzt sich aus folgenden Versuchsabschnitten zusammen:

1. Überexpression der Bait- und Prey-Proteine in HEK293T
2. Bildung des Bait-Prey-Proteinkomplexes
3. Co-Immunpräzipitation der Proteinkomplexe
4. Aufreinigung der Proteinkomplexe

Überexpression der Bait- und Prey-Proteine in HEK293T Die HEK293T-Zellen wurden mit den Vektoren (Tabelle 2.7) entsprechend Abschnitt 2.3.7 transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen entsprechend Abschnitt 2.4.1 lysiert. Abweichend hiervon enthielt der Lysepuffer für Immunpräzipitation 100 mM NaCl statt den üblichen 150 mM. Mit der geringeren NaCl-Konzentration sollten die möglicherweise auftretenden schwachen Wechselwirkungen in den Proteinkomplexen stabilisiert werden.

Bildung des Bait-Prey-Proteinkomplexes Nach der Proteinbestimmung wurden jeweils 200 µg Bait-Proteinlysate mit dem Prey-Proteinlysate vereinigt und mit dem oben beschriebenen Lysepuffer auf 1 ml Gesamtvolumen verdünnt. Um die Bildung eines Bait-Prey-Proteinkomplexes zu ermöglichen, wurde der Ansatz 2 h bei 4–8 °C rotierend inkubiert. Im Anschluss wurde das Lysat für die Immunpräzipitation der Proteinkomplexe aufgeteilt.

Co-Immunpräzipitation Die Hälfte des Lysats wurde zur Präzipitation von SOX9 bzw. RUNX2 und der andere Teil zur Präzipitation des untersuchten Interaktionspartners verwendet. Die Antikörper wurden zum Präzipitieren der Proteinkomplexe direkt zu dem Lysat hinzugefügt und 2 h bei 4–8 °C rotierend inkubiert. Für die Präzipitation wurden 2 µg IgG Antikörper eingesetzt. Für die Präzipitation von SOX9 wurde Sox-9 (H-90): sc-20095 und für RUNX2 (M-70): sc-10758 verwendet. Für die Präzipitation von DDK-Fusionsproteinen (DDK ist der selbe Protein-Tag wie FLAG[®]) wurden 2,5 µl 4C5 Anti-DDK verwendet (Tabelle 2.12).

Aufreinigung der Proteinkomplexe Der Immunkomplex – bestehend aus Antikörper, Bait- und Prey-Protein(en) – wurde mithilfe von Protein A/G gekoppelten magnetischen Beads (Thermo Fisher) aufgereinigt. Hierzu wurden 25 µl Beads zunächst 3 mal mit 500 µl Lysepuffer äquilibriert, zu dem Lysat hinzugefügt und anschließend über Nacht bei 4–8 °C rotierend inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen. Die Beads wurden 5 mal mit obigem Lysepuffer gewaschen, um unspezifische Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die Proteinkomplexe direkt mit NuPAGE[®] LDS Sample Buffer eluiert (Tabelle 2.4.8) und im Immunblot nachgewiesen.

2.4.5 Pulldown Assay

Der Pulldown Assay ist wie die Immunpräzipitation eine affinitätschromatographische Methode, der zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen oder zur Isolierung und Identifizierung von Interaktionspartnern genutzt wird. Im Gegensatz zur Immunpräzipitation wird hier das zu untersuchende Protein gentechnisch am N- oder C-Terminus mit einem Affinitäts-Tag versehen und in einem geeigneten System exprimiert. Dieses rekombinante Protein wird im nächsten Schritt freigesetzt und an eine geeignete Matrix einer Affinitätssäule immobilisiert. Diese immobilisierten Proteine dienen als Köder (engl. *bait*) für bekannte oder potentielle Interaktionspartner (engl. *prey* ‚Beute‘). Zum *Pulldown* der Prey-Proteine wird das Säulenmaterial mit einem Zell- oder Gewebelysate inkubiert. Protein-Protein-Interaktionen können nach Waschen und Elution per SDS-PAGE analysiert werden (Brymora et al. 2001).

Die Prey-Proteine sowie bekannte als auch potentielle Interaktionspartner können in der Massenspektrometrie nachgewiesen bzw. identifiziert werden.

Der Versuchsablauf des Pulldowns setzt sich aus folgenden Versuchsabschnitten zusammen:

1. Überexpression und Immobilisierung des Bait-Proteins
2. Freisetzung und Bindung der Prey-Proteine
3. Elution der Proteinkomplexe
4. Aufarbeitung der Eluate für Folgeexperimente und Analysen

Überexpression und Immobilisierung des Bait-Proteins Für den Pulldown wurden SOX9 und RUNX2 gentechnisch mit einem Polyhistidin-Hexapeptid rekombiniert und exprimiert. Dazu wurden HEK293T-Zellen transient transfiziert, um das Bait-Protein zu überexprimieren. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, um das Bait-Protein freizusetzen und über Affinitätschromatographie aufzureinigen (Abschnitt 2.3.7 und 2.4.1). Vor der Immobilisierung des Bait-Proteins wurden die Beads (HisPur™ Ni-NTA Magnetic Beads, Thermo Fisher) mit Äquilibrierungspuffer (Tabelle 2.5) gewaschen. Das geklärte Lysat wurde 1:1 mit Äquilibrierungspuffer verdünnt. Es wurde die 10-fache Menge an Volumen des Lysats mit den Beads eingesetzt und 30 min bei RT in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde das Lysat wieder abgenommen und unspezifisch an das Säulenmaterial gebundene Proteine wurden von den Beads dreimal mit Waschpuffer (Tabelle 2.5) entfernt.

Freisetzung und Bindung der Prey-Proteine Parallel zu der Proteinextraktion aus den HEK293T-Zellen wurden auch die CPCs lysiert und anschließend mit den immobilisierten Bait-Proteinen über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert.

Elution und Aufarbeitung der Proteinkomplexe Unspezifische Proteine wurden durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer von den Beads abgewaschen, nach dem das CPC-Lysat entfernt wurde. Die Bait-Prey-Komplexe wurden zweimal mit 50 µl Elutionspuffer (PBS pH 8,0, 250 mM Imidazol) von den Beads gelöst. Die Eluate wurden anschließend dialysiert (Abschnitt 2.4.6), mithilfe von Ethanol ausgefällt (Abschnitt 2.4.7) und im Western Blot (Abschnitt 2.4.10) oder in der Massenspektrometrie analysiert.

2.4.6 Dialyse

Die Proteinproben mit hohen Salzkonzentrationen wurden vor der SDS-PAGE dialysiert. Vor Gebrauch wurde die Membran (ZelluTrans/Roth®, MWCO 3500) nach Herstellerangaben vorbehandelt und aktiviert. Dazu wurde die Membran zunächst 15 min bei RT in Reinstwasser eingeweicht und 30 min unter rühren bei 80 °C in 10 mM Natriumhydrogencarbonat-Lösung gekocht. Anschließend wurde die Membran in 10 mM Na₂EDTA-Lösung überführt und 30 min entmineralisiert. Schließlich wurde die Membran weitere 30 min unter rühren bei 80 °C in Reinstwasser gekocht. Nach langsamen auskühlen der

Membran wurde diese in 50 % Ethanol aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4 bis 8 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde die aktivierte Membran nach Bedarf zugeschnitten und 15 bis 20 min in Reinstwasser eingeweicht und gespült.

Für Proteinproben mit Volumina um die 100 bis 500 µl wurden 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße als Dialysesystem verwendet, in deren Deckel ein großes Loch gefräst und die aufgequollene Membran zwischen Deckel und Gefäß gespannt wurde. Die Gefäße wurden in einen Schwimmer eingesetzt und schräg in den Puffer eingeführt, um das Entweichen von Luftblasen zu ermöglichen. Dialysiert wurde mit dem 1000-fachen Volumen der Proben, z. B. 200 µl Probe gegen 200 ml Puffer. Die Dialyse wurde bei 4 bis 8 °C auf einem Magnetrührer durchgeführt. Der Puffer wurde einmal pro Stunde ausgewechselt. Die Gesamtdauer richtete sich nach Anzahl der gleichzeitig dialysierten Proben und Volumina.

2.4.7 Fällung von Proteinen

Zur Konzentrierung und Entfernung von Salzen, die bei der Bestimmung der Proteinkonzentration sowie der Gelelektrophorese interferieren können, wurden die Proben mithilfe von Ethanol gefällt. Dazu wurde 1 Teil Proteinlösung tropfenweise mit 9 Teilen 100 % eiskaltem Ethanol gemischt und mindestens 30 min bis über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällten Proteine wurden anschließend 15 min bei 4 °C und 15 000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Proteinpellet kopfüber auf einem saugfähigem Tuch getrocknet. Das Pellet wurde ggf. mit 90 % eiskaltem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet. Das trockene Proteinpellet wurde anschließend für die SDS-PAGE-Analyse direkt in Probenpuffer (Sample Buffer) aufgenommen und gekocht (Tabelle 2.4.8).

2.4.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld. Der Einsatz des anionischen Tensides SDS und der Zusatz von Reduktionsmitteln machen sie zu einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Unterstützt durch das Kochen der Proben, lagern sich etwa 1,4 g SDS-Moleküle pro Gramm Protein an. Durch den anionischen Anteil der Tenside wird die Eigenladung der Proteine überlagert. Die gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen löst die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur auf. Stabilisierende Disulfidbrücken werden durch das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol oder DTT zu den korrespondierenden Sulfhydrylgruppen reduziert. Dadurch werden die Proteine komplett in ihre Primärstruktur entfaltet. Die vollständige Entfaltung und die Überlagerung der Eigenladung ermöglichen eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse.

Tabelle 2.14: Pipettierschema für SDS-Gele. Die folgenden Mengen beziehen sich auf die Präparation eines Mini-Gels.

Lösung	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
Reinstwasser	2,00 ml	1,35 ml
Puffer ^{1,2}	1,40 ml	625 µl
NF-Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	1,85 ml	400 µl
SDS (10 %)	55 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl
APS (10 %)	250 µl	200 µl
Endvolumen	5,3 ml	2,4 ml

¹Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,9)

²Sammelgelpuffer (0,50 M Tris-HCl pH 6,8)

Probenvorbereitung Pro Probentasche wurden 10 bis 15 µg Protein aus Zelllysaten und 5 bis 10 µg durch Immunpräzipitation oder Pulldown aufgereinigtes Protein aufgetragen. Die Probenvorbereitung für die Analyse per SDS-PAGE variierte in Abhängigkeit von der verwendeten Methode zur Extraktion bzw. Aufreinigung der Proteinproben. Aufgereinigte Proteine aus der Immunpräzipitation wurden mit 5× Lane Marker Sample Buffer von Pierce® (0,3 M Tris-HCl, 5 % SDS, 50 % Glycerin; pH 6,8) und dem Zusatz von 100 mM DTT (20 mM Endkonzentration) versetzt und 5 min bei 70 °C gekocht. Aufgereinigte Proteine aus dem Pulldown wurden mit 4× NuPAGE® LDS Sample Buffer und dem Zusatz von 100 mM DTT (25 mM Endkonzentration) versetzt und 5 min bei 70 °C gekocht. Gesamtzellextrakte wurden mit 3 bis 5× Laemmli Sample Buffer (Enkonzentration: 100 mM Tris-HCl, 3 % SDS, 7,5 % Glycerin, 0,001 % Bromphenolblau, pH 6,8; 2-Mercaptoethanol wurde 10:1 (v:v) immer frisch hinzugefügt) versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht.

Herstellung der Gele Die Gele setzten sich entsprechend Tabelle 2.14 zusammen. Der Polymerisationsinitiator Ammoniumperoxodisulfat (APS) wurde erst kurz vor dem Gießen der Gele zugesetzt, um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern. Zur Erzeugung einer scharfen Trennlinie zwischen Trenn- und Sammelgel, wurde das Trenngel bis zur Auspolymerisation mit 100 %-igem Ethanol überschichtet.

Elektrophorese Die Auftrennung der Proteine wurde in einem diskontinuierlichen Gel nach Laemmli (1970) durchgeführt. In diesem diskontinuierlichen System werden die Proteine zunächst in einem sauren Tris-Glycin gepufferten Sammelgel (pH 6,8) mit 4 % Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid bei 10 mA pro Gel konzentriert und anschließend in einem alkalischen Trenngel (pH 8,9), entsprechend ihrer Molekularmasse, bei 20 bis 25 mA pro Gel aufgetrennt. Die Trennungsschärfe hängt hierbei von der Konzentration von Acrylamid sowie N,N'-Methylenbisacrylamid im Trenngel ab und wird für Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 bis 120 kDa mit 10 % empfohlen. Die Elektrophorese wurde mit SDS-haltigem Laufpuffer durchgeführt. Die 5× konzentrierte Stammlösung enthielt 0,25 M Tris-HCl pH 8,7, 1,9 M Glycine, 0,5 % SDS.

2.4.9 Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Um die Effizienz des Blottens zu beurteilen wurden die Gele nach dem Western Blot mit kolloidalem Coomassie-Brillant-Blau (CBB) nach Neuhoff et al. (1988) gefärbt. Die Empfindlichkeit liegt bei $40 - 100 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-1}$ Bande.

Ansetzen der Färbelösung Die Färbelösung wurde nach einer festen Reihenfolge angesetzt, um die Bildung kolloidaler Partikel mit geringem Durchmesser zu ermöglichen. Für 1 L Färbelösung wurden portionsweise 80 g Ammoniumsulfat in 768 ml Reinstwasser gelöst. Anschließend wurden 200 ml Methanol und 16 ml CBB Stammlösung (5 % CBB G250 gelöst in Methanol) hinzugefügt. Nach vollständigem Lösen des Farbstoffs wurden 16 ml ortho-Phosphorsäure tropfenweise zugesetzt und die Partikel gebildet. Die kolloidalen Partikel sind von entscheidender Bedeutung für die Sensitivität der Färbelösung und wurden nicht filtriert. Die Färbelösung wurde in braunen Flaschen gelagert.

Endkonzentration:

- 0,08 % (w/v) CBB G250
- 1,6 % (v/v) ortho-Phosphorsäure
- 8 % (w/v) Ammoniumsulfat
- 20 % (v/v) Methanol

Färbung SDS interferiert mit der Färbung der Gele. Um die Effizienz und die Sensitivität der Färbung zu erhöhen, wurden die Gele nach der SDS-PAGE oder nach dem Blotten dreimal mit 10 min mit Reinstwasser gewaschen. Vor Benutzung wurde die Färbelösung geschüttelt, um abgesetzte kolloidale Partikel zu homogenisieren. Anschließend wurden die Gele großzügig mit der Färbelösung überschichtet und über Nacht schwenkend bei RT gefärbt.

Entfärbung Kolloidales CBB färbt den Hintergrund nur sehr schwach. Durch mehrmaliges Waschen mit Reinstwasser wurde der Hintergrund vollkommen entfärbt. Die Dauer der Entfärbung richtet sich nach Intensität der Färbung des Gels und Häufigkeit der Waschungen.

2.4.10 Western Blot

Western Blot bezeichnet eine Technik, bei der Proteine auf eine adsorbierende Membran übertragen (engl. *blot*) werden. In der Regel findet die Übertragung elektrophoretisch statt und folgt einer vorherigen Trennung der Proteine in einer Trägermatrix. Die Trennung kann nach physikalischen Parametern wie Größe (SDS-PAGE), Eigenladung (isoelektrische Fokussierung) oder der Kombination aus dieser (2D-Gelelektrophorese) erfolgen. Übertragene oder geblottete Proteine, werden durch Antikörper nachgewiesen. Daher ist auch die Bezeichnung Immunblot (engl. *immunoblot*) gebräuchlich.

Proteintransfer Die Proteine wurden durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt und in einem Tank-Elektroblotter auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran übertragen. Dazu wurde die hydrophobe Membran mit Methanol aktiviert, mit Reinstwasser hydrophilisiert und in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Blot-Einheit aus Schwamm, drei Lagen Whatman Pappe, PVDF-Membran, Gel, drei weiteren Lagen Whatman Pappe und abschließend mit einem weiteren Schwamm gespannt und in die Transferkammer überführt. Der Transfer wurde bei 350 mA durchgeführt. Die Transferzeit betrug bei 1 bis 2 Gelen 1,5 h und bei 3 bis 4 Gelen 2 h.

Unspezifische Proteindetektion Die Blots wurden nach dem Transfer etwa 5 – 10 min in einer Färbelösung aus 0,1 % CBB R-250, 50 % Methanol und 7 % Essigsäure geschwenkt. Anschließend wurden die Blots mit einer wässrigen Lösung aus 50 % Methanol und 7 % Essigsäure gewaschen bis der Hintergrund vollständig entfärbt war und sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Für die nachfolgende spezifische Proteindetektion durch Antikörper wurden die Blots mehrfach mit *Tris-Buffered Saline and Tween 20* (TBS-T)-Puffer (Tabelle 2.5) gewaschen.

Spezifische Proteindetektion Die Immundetektion erfolgte indirekt über einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Zunächst wurden die freien Bindestellen auf der Membran durch eine Blocklösung (5 % (w/v) Milchpulver gelöst in TBS-T) maskiert. Für die Detektion der Zielproteine wurden die Blots über Nacht bei 4 – 8 °C mit ungekoppelten Primärantikörpern schwenkend inkubiert. Unspezifisch gebundene Primärantikörper wurden mit TBS-T (5 × 5 min) abgewaschen. Anschließend wurden die Blots 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Unspezifisch gebundene Sekundärantikörper wurden wie zuvor beschrieben abgewaschen bevor die Blots mit dem Detektionsreagenz (Amersham ECL) bedeckt und 5 min bei RT inkubiert wurden. Durch den Umsatz des Substrats wird Chemolumineszenz erzeugt. Diese wurde mithilfe von Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm™ ECL) dokumentiert. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Intensität der Chemolumineszenz. Nach der Belichtung wurden die Filme nacheinander in ein Bad aus Entwickler, Wasser und Fixierer getaucht (Kodak).

Quantifizierung Die Röntgenfilme wurden zur Quantifizierung der abgelichteten Proteinbanden eingescannt. Die Dichte und Größe der abgelichteten Banden wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Schneider et al. 2012) gemessen. Zur Normalisierung wurde der Quotient aus Zielprotein und Ladungskontrolle gebildet (relative Dichte). Nach der Normalisierung wurde der relative Proteingehalt berechnet. Dieser ist der Quotient aus der relativen Dichte der Probe und Kontrolle.

2.4.11 Strippen und Wiederverwendung der PVDF-Membran

Zur Wiederverwendung mit einem anderen Antikörper oder zur Aufbewahrung wurde die PVDF-Membran 15 min bei 65 °C (Wasserbad) in Stripping-Puffer (Tabelle 2.5) inkubiert und alle 5 min geschwenkt. Anschließend wurde die PVDF-Membran zweimal 10 min mit TBS-T bei RT gewaschen und entsprechend Abschnitt 2.4.10 für eine erneute Immundetektion verwendet oder mit 100 % Methanol getrocknet und bei –20 °C eingefroren.

2.5 Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von der Serviceeinheit Proteomanalyse der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Proben Verarbeitung Die Eluate oder gewaschenen Beads aus Abschnitt 2.4.3 bzw. 2.4.5 wurden in 1×NuPAGE® LDS Probenpuffer (Invitrogen) aufgenommen und die Proteine in 4–12 % NuPAGE Novex Bis-Tris Gelen (Invitrogen) aufgetrennt. Die Gele wurden entsprechend Abschnitt 2.4.9 mit Coomassie gefärbt. Für die Analyse der Immunpräzipitate wurde das Gel in 23 Fraktionen unterteilt. Für die Analyse der Bait-Prey-Komplexe wurde das Gel in 11 Fraktionen unterteilt. Die Fraktionen wurden extrahiert, mit DTT reduziert, mit 2-Iodacetamid alkyliert und über Nacht trypsinisiert. Anschließend wurden die trypsinisierten Peptide extrahiert, getrocknet, in wässrigem Acetonitril aufgenommen und per Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) analysiert (Atanassov und Urlaub 2013).

LC-MS/MS-Analyse Bei der LC-MS/MS-Analyse sind mehrere Massenspektrometer-Einheiten hinter ein flüssigchromatographisches (LC)-Trennsystem geschaltet. Daraus ergibt sich eine Kopplungsmöglichkeit, die als Tandem-MS oder MS/MS bezeichnet wird und die exakte Identifizierung und Quantifizierung der Proben ermöglicht. Zur massenspektrometrischen Analyse wurden die trypsinisierten Peptide zunächst auf einer Reversed Phase C18-Vorsäule (0,15 mm ID × 20 mm, selbst gepackt mit Reprosil-Pur120 C18-AQ 5 µm, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) aufkonzentriert. Anschließend wurden die Peptide auf einer Reversed Phase-C18 analytischen Säule (0,075 mm ID × 200 mm, Pico frit-Säule; New Objective, Woburn/MA, USA) gepackt mit Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 5 µm) mit einem linearen Gradienten von 37 min Länge getrennt (5–35 % Acetonitril vs. 0,1 mm Ameisensäure, 300 nl/min). Der Eluent wurde auf einem Q Exactive Massenspektrometer (Thermo Fisher) mit einer FlexIon-Nanosprayquelle unter Verwendung einer Top10-Methode analysiert.

Datenbankabfrage Für die Datenbanksuche wurden die Peaklisten mit dem Programm Raw2MSM (Version v1.10) aus den Tandem-Massenspektren extrahiert und mithilfe von Mascot (Version 2.4.1, Matrix Science, London, UK) analysiert. Die Suche erfolgte gegen die SwissProt 2014_08 (*Homo sapiens*, 546 790 Einträge) Datenbank mit den Parametern Enzym = Trypsin, Massentoleranz MS = 10 ppm, Massentoleranz MS/MS = 0,020 Da, feste Modifikation = Carbamidomethylierung (Cystein) und variable Modifikation = Oxidation (Methionin).

Kriterien für die Identifikation von Proteinen Die MS/MS-basierte Peptid- und Proteinidentifikation aus der Mascot-Datenbanksuche wurde mit *Scaffold* (Version 4.3.4, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA) validiert. Die Identität eines Peptides wurde nur dann akzeptiert, wenn der Score-Wert des *Peptide Prophet* Algorithmus (Keller et al. 2002) mit der *Scaffold delta-mass* Korrektur bei größer als 95,0 % lag. Die Identität von Proteinen wurde nur dann akzeptiert wenn der Nachweis der Wahrscheinlichkeit

bei größer als 99,0% lag und mindestens zwei Peptide identifiziert wurden. Die Wahrscheinlichkeit der Proteinidentifizierungen wurde mithilfe des *Protein Prophet* Algorithmus (Nesvizhskii et al. 2003) errechnet. Proteine, die ähnliche Peptide enthielten und anhand der MS/MS-Analyse nicht voneinander unterschieden werden konnten, wurden nach dem Prinzip der Parsimonie (Sparsamkeitsprinzip) gruppiert. Peptide, die verschiedenen Proteinen zugeordnet werden können, wurden in Clustern zusammengefasst.

Quantifizierung Die massenspektrometrische Quantifizierung differenziell präzipitierter Proteine erfolgte isotopenfrei (engl. *label-free quantitation*) aus dem Massenspektrum (Lundgren et al. 2010). Der *total spectrum count* ist definiert als die Summe aller Spektren der Peptide eines Proteins. Diese Methode wird in Proteomstudien als semiquantitative Messung des Proteinvorkommens verwendet.

2.6 Bioinformatische Analysen

Die bioinformatischen Analysen wurden von der Serviceeinheit Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Normalisierung Die Rohdaten (*spectral counts*) aus Abschnitt 2.5 wurden nach der DESeq Methode normalisiert (Anders und Huber 2010). Diese Methode wurde ursprünglich zur Normalisierung von Count-Daten in Hochdurchsatz-Sequenzier-Experimenten entwickelt und später auch für die Normalisierung der *spectral count data* von Proteomanalysen empfohlen (Anders et al. 2013).

Filterung Anschließend wurden interagierende Proteine aus den SOX9 und RUNX2 Pulldowns in einem zweistufigen Poisson Modell getrennt identifiziert, das eigens für *spectral count data* angepasst wurde (Fischer et al. 2014). Des Weiteren umfasste der Arbeitsablauf einen biologischen Filter und einen statistischen Varianzfilter. Mithilfe des biologischen Filters werden Proteine als Kontaminanten betrachtet und entfernt, die in der Kontrollgruppe häufiger vorkommen als in der Bait-Gruppe. Proteine, die mit einer niedrigen Varianz der Counts in allen Proben vorkommen, werden als Kontaminanten betrachtet und wurden mithilfe eines Varianzfilters aus den Datensätzen aussortiert.

Quantifizierung Die differentiale Bindung zwischen der Kontroll- und der Bait-Gruppe wurde durch die Veränderung in den log-Verhältnissen quantifiziert. Um den Anteil der falsch positiven Resultate zu reduzieren wurden die p-Werte aus dem Poisson Modell zur Kontrolle einer *false-discovery-rate* (FDR) von 5% angepasst (Benjamini und Hochberg 1995).

3

Ergebnisse

3.1 Testung von Antikörpern

Für die Durchführung der Immunpräzipitationen und Western Blots wurden zunächst verschiedene SOX9 und RUNX2 spezifische Antikörper im Western Blot getestet.

3.1.1 SOX9 spezifische Antikörper

Es wurden vier SOX9 spezifische Antikörper im Western Blot getestet. Das theoretische Molekulargewicht von SOX9 beträgt 56,15 kDa. Die Antikörper wiesen jedoch sowohl um die 55 kDa als auch um die 70 kDa-Marke Immunreaktionen auf (Abbildung 3.1). Die schwächste Reaktion, und bei längerer Belichtung mit dem stärksten Hintergrund, wurde mit dem Antikörper Anti-SOX9 (M02) Klon 3C10 (Novus Biologicals) bei 55 kDa festgestellt. Die stärkste Immunreaktion rief der Antikörper Anti-SOX9 (M01) Klon 2A2 (Abnova) bei 70 kDa hervor. Dieser erwies sich als besonders effizient und zuverlässig. In den nachfolgenden Western Blots wurde ausschließlich der Anti-SOX9 (M01) Antikörper von Abnova verwendet.

3.1.2 Das Molekulargewicht von SOX9

Um die Diskrepanz zwischen dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 56 kDa und den beobachteten 70 kDa zu untersuchen, wurde SOX9 durch Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem Expressionsvektor pPMh-SOX9-His (Abschnitt 2.3.7) überexprimiert und im Western Blot analysiert. Von dem Zelllysate wurden 5 µg in der SDS-PAGE eingesetzt und mit dem SOX9 Antikörper von Abnova im Western Blot detektiert. Es trat eine sehr starke Reaktion bei 70 kDa auf (Abbildung 3.2). Um zu überprüfen, ob die Überexpression von SOX9 auch in CPCs zu einer verstärkten Reaktion bei 70 kDa hervorruft oder daneben auch bei 55 kDa auftritt, wurden CPC241ht-Zellen mit dem selben Plasmid transfiziert und SOX9 überexprimiert. Im Western Blot konnte die selbe Reaktion wie bei den HEK293T-Zellen beobachtet werden. SOX9 wurde erneut bei 70 kDa detektiert.

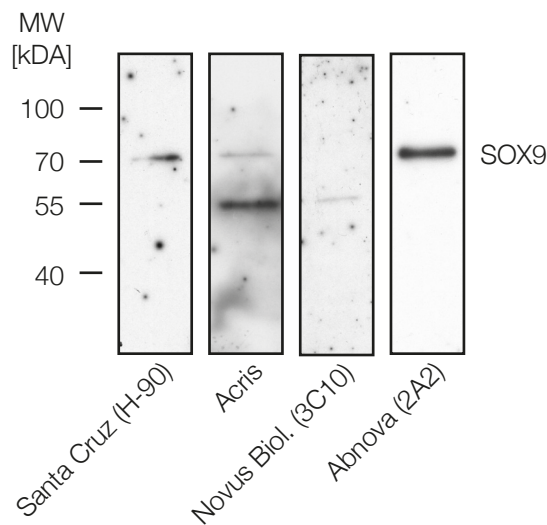


Abbildung 3.1: Western Blot Analyse SOX9-spezifischer Antikörper. CPC241ht-Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert. Es wurden 20 µg Proteinlysate pro Spur in 10%-igen Gelen durch SDS-PAGE getrennt. Die Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt.

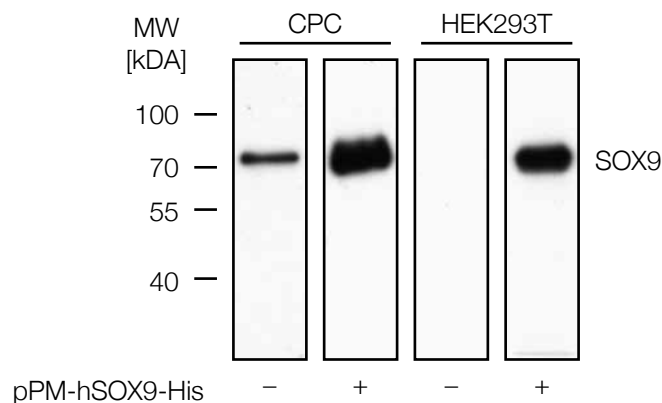


Abbildung 3.2: Das Molekulargewicht von SOX9 wurde im Western Blot überprüft. CPC241ht und HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pPM-hSOX9-His transfiziert und SOX9 überexprimiert. Pro Spur wurden 5 µg Proteinlysate in 10%-igen Gelen durch SDS-PAGE getrennt. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Die Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen Anti-SOX9 (M01) Klon2A2 (Abnova) in einer 1:2000 Verdünnung.

3.1.3 Testung RUNX2 spezifischer Antikörper

Für den Nachweis von RUNX2 wurden fünf Antikörper im Western Blot getestet. Das theoretische Molekulargewicht von RUNX2 Isoform 1 (CBFA1a) beträgt 56,65 kDa. Mit allen Antikörpern konnte eine Immunreaktion etwas oberhalb des Markers für die 55 kDa Bande festgestellt werden (Abbildung 3.3). Der Anti-RUNX2 Antikörper von Abcam stellte sich als besonders unzuverlässig bei der Detektion von RUNX2 heraus. Der monoklonale Santa Cruz Antikörper Anti-RUNX2 (C-12) war hingegen besonders effizient sowie zuverlässig und wurde in den nachfolgenden Western Blots verwendet.

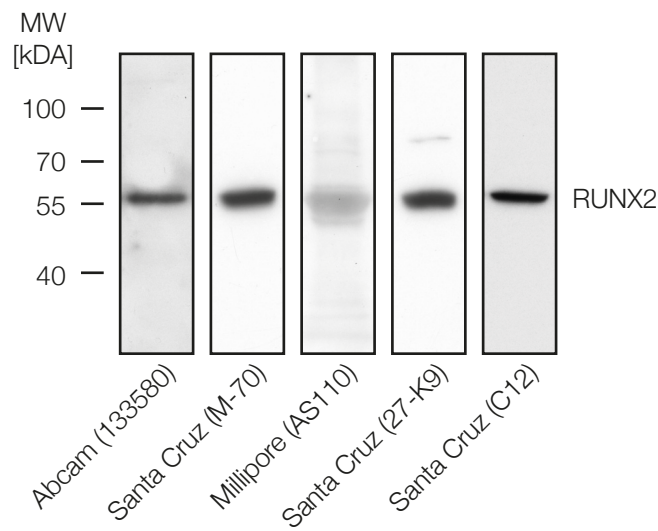


Abbildung 3.3: Western Blot Analyse RUNX2-spezifischer Antikörper. CPC241ht-Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert. Es wurden 20 µg Proteinlysate pro Spur in 10%-igen Gelen durch SDS-PAGE getrennt. Die Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt.

3.1.4 Das Molekulargewicht von RUNX2

Auch RUNX2 wurde in CPCs und in HEK293T-Zellen überexprimiert und im Western Blot analysiert. Zur Überexpression von RUNX2 wurden die Zellen mit pPMh-RUNX2-His transfiziert und das exprimierte Protein mit Anti-RUNX2 (C-12) im Western Blot bei gleichbleibendem Molekulargewicht nachgewiesen. Die Expression ist im Vergleich zu den Kontrollen durch die deutlich stärkere Immunreaktion zu sehen.

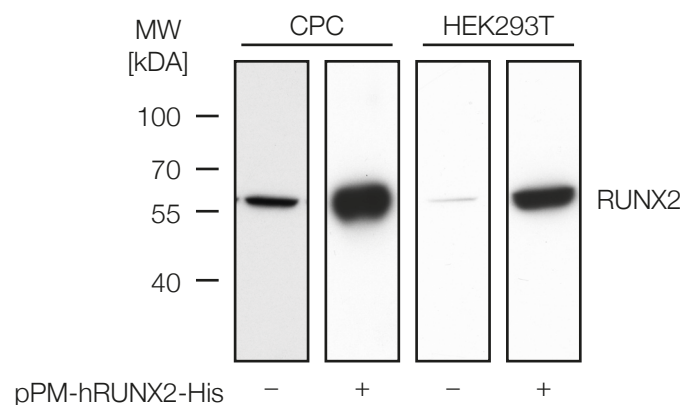


Abbildung 3.4: Das Molekulargewicht von RUNX2 wurde im Western Blot überprüft. CPC241ht und HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pPM-hRUNX2-His transfiziert und RUNX2 überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert. Pro Spur wurden 5 µg Proteinlysate in 10%-igen Gelen durch SDS-PAGE getrennt. Die Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen Anti-RUNX2 (Santa Cruz) in einer 1:1000 Verdünnung.

3.2 Lentiviraler Knockdown von RUNX2 bzw. SOX9 in chondrogenen Progenitorzellen

Die Isolierung von Proteinen, die auf SOX9 und RUNX2 modulatorisch wirken, sollte aus Zelllinien erfolgen, in denen das Gleichgewicht zwischen den chondrogenen und den osteogenen Faktoren durch die RNA-Interferenz gestört wurde. Mithilfe der RNA-Interferenz zeigten bereits Koelling et al., dass die chondrogene Differenzierung durch den transienten Knockdown von SOX9 und RUNX2 reguliert werden kann (Koelling et al. 2009). Die Isolierung modulatorischer Proteine sollte jedoch aus transgenen Zelllinien erfolgen, in denen die Genexpression von SOX9 bzw. RUNX2 persistent inhibiert ist. In dieser Arbeit wurden daher zunächst lentiviral transfizierte CPC-Zelllinien auf das Expressionsniveau von SOX9 und RUNX2 untersucht, bei denen die Expression der siRNA durch die viralen hH1 und hU6 Promotoren gesteuert werden.

3.2.1 Der Knockdown von RUNX2 reguliert SOX9 hoch

Die Expression von RUNX2 und SOX9 wurde durch Western Blot und RT-qPCR untersucht. In CPC241ht-siRUNX2 wurde eine deutliche Reduktion von RUNX2 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene festgestellt (Abbildung 3.5). Die Expression von RUNX2 ist auf mRNA-Ebene um etwa 75 % und auf Proteinebene um etwa 60 % reduziert. Die Reduktion von RUNX2 wirkt sich auf die Expression von SOX9 auf mRNA- und auf Proteinebene aus. Im Vergleich zur Kontrolle konnte eine Reduktion der SOX9 mRNA um etwa 25 % festgestellt werden. Der verringerte mRNA-Gehalt korreliert jedoch nicht mit dem SOX9-Proteingehalt. Trotz des reduzierten mRNA-Gehalts wurde ein erhöhter Gehalt vom SOX9 Protein festgestellt. Diese ist in der Knockdown-Zelllinie um das 10-Fache erhöht.

3.2.2 Der Knockdown von SOX9 reguliert RUNX2 hoch

In CPC241ht-siSOX9 wurde eine Reduktion von SOX9 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene festgestellt (Abbildung 3.6). Die Expression von SOX9 ist auf mRNA-Ebene um etwa 20 % reduziert. Eine deutlich stärkere Reduktion von SOX9 lässt sich auf Proteinebene beobachten. Die densitometrische Auswertung ergab hier eine Reduktion des Proteingehalts an SOX9 um etwa 80 %.

Auch hier konnte eine reziproke Wechselwirkung zwischen SOX9 und RUNX2 festgestellt werden. Die Inhibition der SOX9-Expression durch siRNA hat jedoch keine Auswirkung auf den mRNA-Gehalt von RUNX2. Es konnte hier keine Änderung der RUNX2-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Anders verhält es sich auf Proteinebene. Die Inhibition der SOX9-Expression führt zu einem höheren RUNX2-Gehalt auf Proteinebene. Im Vergleich zur Kontrolle ist der RUNX2-Gehalt um annähernd das 8-Fache gesteigert. Dies lässt auf eine Regulation auf Ebene der Proteinbiosynthese oder eine Regulation durch proteolytischen Abbau synthetisierten Proteins schließen.

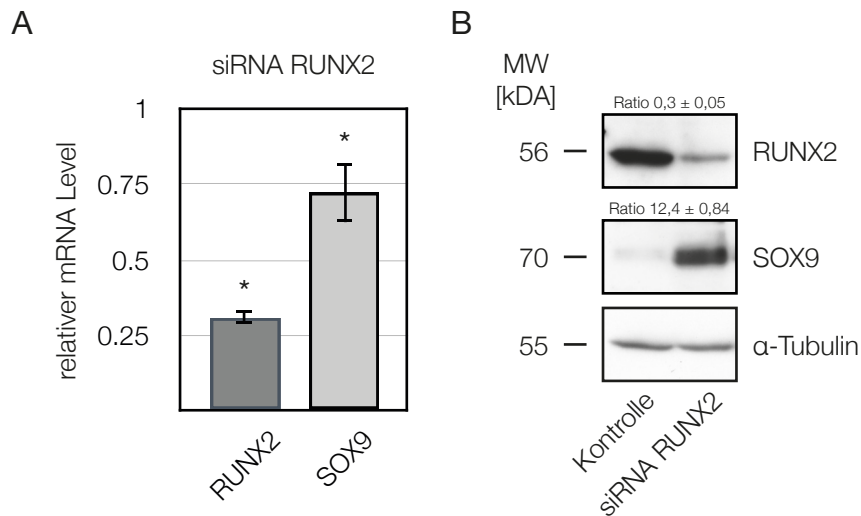


Abbildung 3.5: Genexpression von RUNX2 und SOX9 in CPC241ht-siRUNX2. Die CPCs wurden lentiviral transfiziert und die Genexpression von RUNX2 und SOX9 durch RT-qPCR und Western Blot analysiert. A. Relativer mRNA-Level von RUNX2 und SOX9 in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Die Werte wurden gegen β_2 -Mikroglobulin normalisiert. B. Immunblot von RUNX2 und SOX9. Die Bandenintensität wurde mit ImageJ gemessen. Das Verhältnis von RUNX2 und SOX9 wurde zwischen unbehandelter Kontrolle sowie der erzeugten Zelllinie gegen α -Tubulin normalisiert und wird als relativer Zahlenwert mit Standardabweichung aufgeführt.

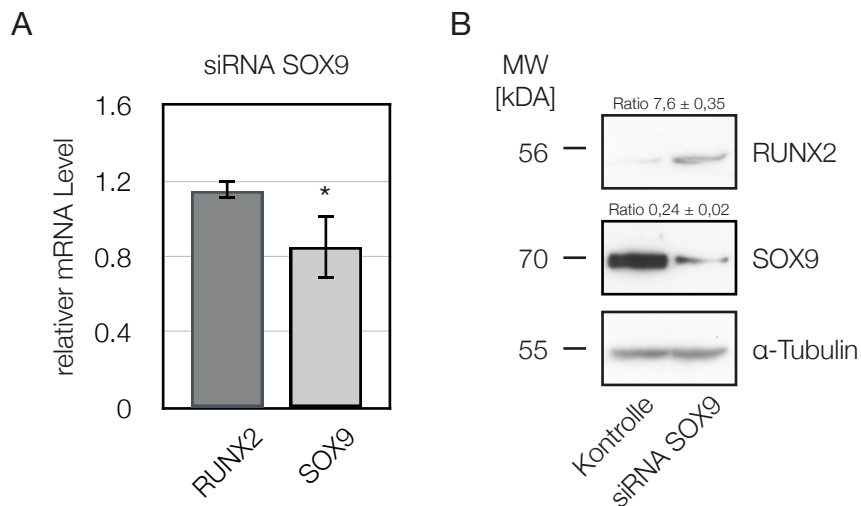


Abbildung 3.6: Genexpression von RUNX2 und SOX9 in CPC241ht-siSOX9. Die CPCs wurden lentiviral transfiziert und die Genexpression von SOX9 und RUNX2 durch RT-qPCR und Western Blot analysiert. A. relativer mRNA Level von RUNX2 und SOX9 in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Die Werte wurden gegen β_2 -Mikroglobulin normalisiert. B. Immunblot von RUNX2 und SOX9. Die Bandenintensität wurde mit ImageJ gemessen. Das Verhältnis von RUNX2 und SOX9 wurde zwischen unbehandelter Kontrolle sowie der erzeugten Zelllinie gegen α -Tubulin normalisiert und wird als relativer Zahlenwert mit Standardabweichung aufgeführt.

3.3 Isolierung von neuen Interaktionspartnern durch Co-Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation von SOX9 bzw. RUNX2 wurde zum Auffinden von neuen Interaktionspartnern durchgeführt (Abschnitt 2.4.3). Der Nachweis einer erfolgreichen Immunpräzipitation erfolgte im Western Blot durch einen zweiten Primärantikörper aus einer anderen Wirtsspezies. Diese Kombination sollte Hintergrundbanden und falschpositive Resultate durch den Präzipitations-Antikörper verhindern.

3.3.1 Co-Immunpräzipitation von SOX9-assoziierten Proteinen

Die Immunpräzipitation von SOX9 und mit SOX9 interagierenden Proteinen erfolgte unter physiologischen Bedingungen bei 150 mM NaCl aus der lentiviral persistent transfizierten Zelllinie CPC241ht-siRUNX2. In dieser Zelllinie wurde RUNX2 durch RNA-Interferenz herabreguliert und die Proteinexpression von SOX9 hochreguliert (Abbildung 3.5). Es wird angenommen, dass dabei weitere Proteine hochreguliert werden, die durch eine Interaktion mit SOX9 einen stimulierenden Einfluss auf das chondrogene Potential der CPCs haben. Durch die Immunpräzipitation von SOX9 sollten diese Proteine co-präzipitiert und anschließend in der Massenspektrometrie identifiziert werden.

Für die Immunpräzipitation von SOX9 und den Nachweis im Western Blot wurden verschiedene SOX9-spezifische Antikörperkombinationen getestet (Tabelle 2.12). Die Präzipitation von SOX9 konnte mit dem polyklonalen Kaninchen Anti-SOX9 (H-90) erreicht werden (Abbildung 3.7). Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit dem monoklonalen Maus Anti-SOX9 (M01) Antikörper. Mit den anderen verfügbaren Antikörpern konnte keine Präzipitation erreicht werden (Daten nicht abgebildet). Entsprechend den vorherigen Untersuchungen konnte SOX9 sowohl in der Positivkontrolle sowie im Überstand vor der Immunpräzipitation, als auch im Präzipitat selbst bei 70 kDa nachgewiesen werden.

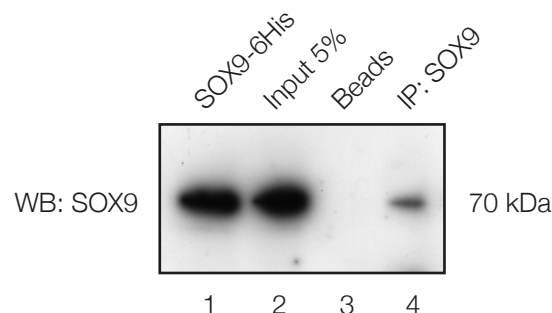


Abbildung 3.7: Immunpräzipitation von SOX9 aus CPC241ht-siRUNX2 Zellysat. Für die Immunpräzipitation wurde der SOX9 (H-90) Antikörper (Kaninchen) mit den Agarose-Beads quervernetzt und mit CPC241ht-siRUNX2 Zellysat inkubiert. Der Nachweis von SOX9 erfolgte im Western Blot mit dem SOX9 (M01) Antikörper (Maus). Als Positivkontrolle wurden 5 % Lysat von pPMh-SOX9-His transfizierten HEK293T-Zellen aufgetragen (Spur 1). Als Negativkontrolle wurden ungekoppelte Agarose-Beads verwendet (Spur 3).

Als Positivkontrolle wurde HEK293T-Lysat mit überexprimiertem SOX9 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde *Pierce Control Agarose Resin* verwendet. Hier war keine Reaktion, die auf unspezifische Bindungen deuten würde, erkennbar. Die Immunreaktion von SOX9 war im Präzipitat schwächer als im Zelllysat.

3.3.2 LC-MS/MS-Analyse der SOX9-Präzipitate

Für die LC-MS/MS wurden die Proteinkomplexe zunächst von dem Säulenmaterial eluiert und in einem Gradientengel unter reduzierenden sowie denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Eine kovalente Quervernetzung durch Disuccinimidyl-Suberat (DSS) wurde zwischen dem Präzipitationsantikörper und dem Säulenmaterial nicht durchgeführt. Die Präzipitation des Antikörpers ist daher in dem Coomassie-gefärbten Gel deutlich anhand der schweren sowie der leichten Kette des Antikörpers bei 50 bzw. 22 kDa zu sehen (Abbildung 3.8 Spur 2). Die Negativkontrolle wurde mit dem selben Säulenmaterial, jedoch ohne Antikörper durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde vor der Elution der Proteinkomplexe intensiv mit IP-Lysis/Wash Buffer gewaschen, um die unspezifischen Proteine zu entfernen. In der Probe mit der Immunpräzipitation sind deutlich mehr Banden zu sehen, als in der Negativkontrolle. Die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel extrahiert und entsprechend Abschnitt 2.5 präpariert. Die dabei erzeugten Peptide wurden im Massen-

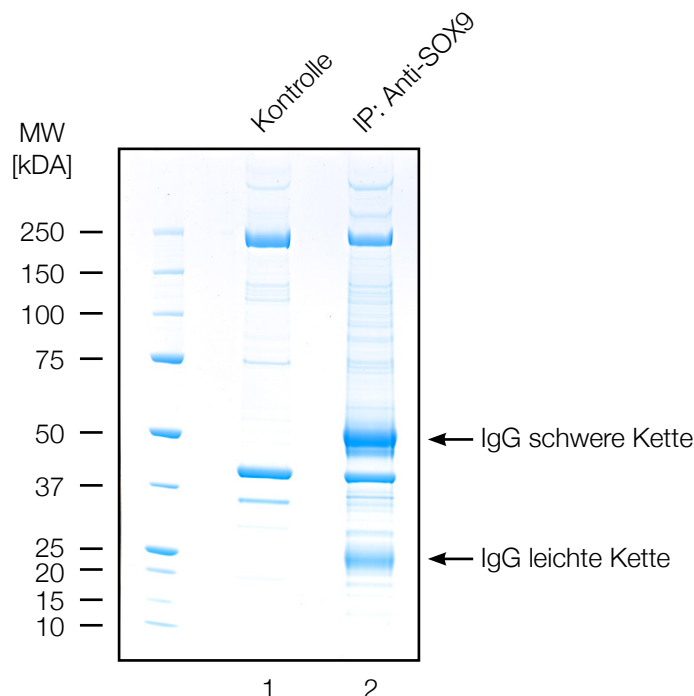


Abbildung 3.8: Coomassie-gefärbtes SDS-Gradientengel der Immunpräzipitation (IP) von SOX9 aus CPC241ht-siRUNX2 Zelllysat. Für die IP wurde der Anti-SOX9 (H-90) Antikörper (Kaninchen) verwendet (Spur 2). Die Kontrolle enthielt kein Antikörper (Spur 1).

3 Ergebnisse

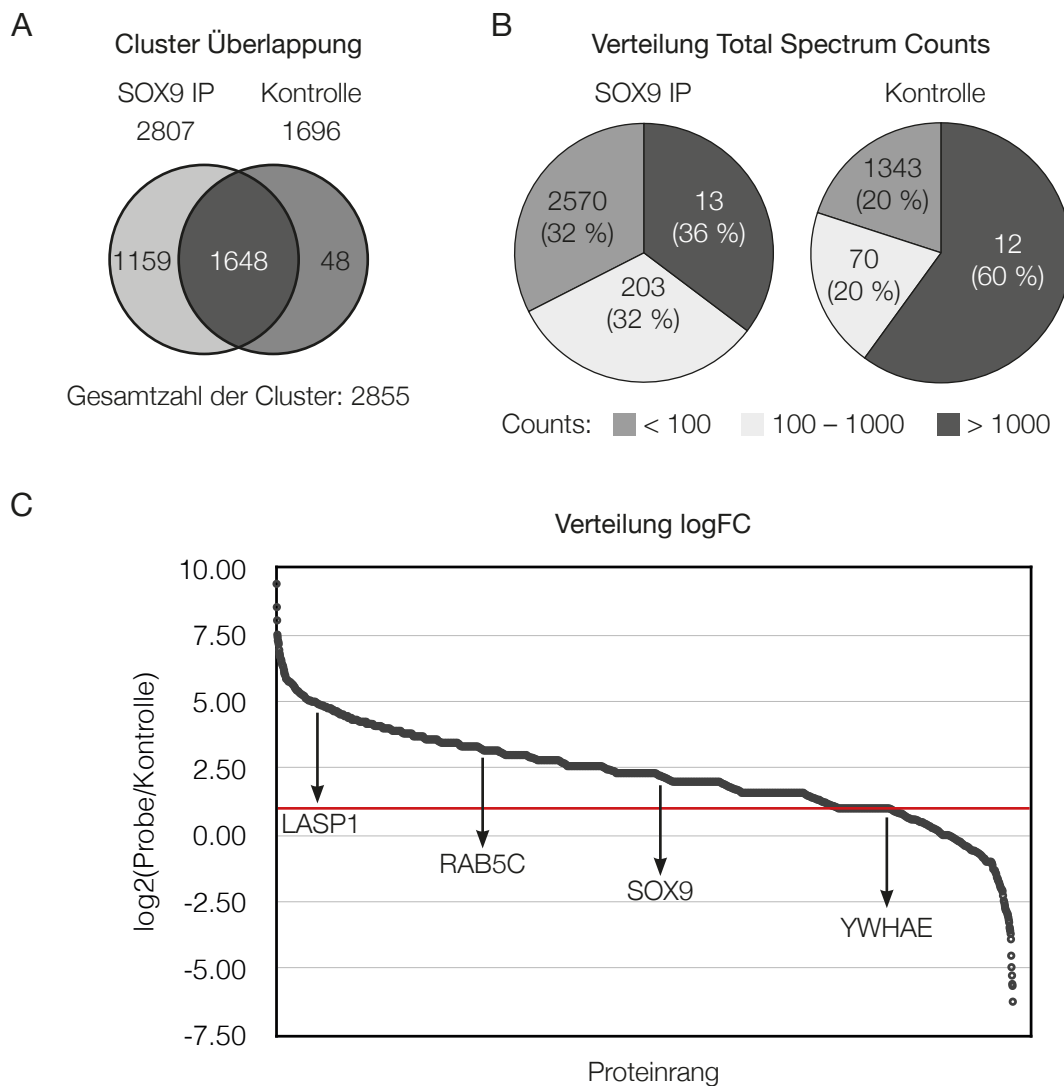


Abbildung 3.9: MS-Analyse der Immunpräzipitation (IP) von SOX9. A. Venn-Diagramm der Differenzial-Bindungsanalyse von SOX9. B. Prozentuale Verteilung des Total Spectrum Counts. C. Verteilung des logFC mit der Position biologisch relevanter Proteine.

spektrometer analysiert. In der LC-MS/MS-Analyse wurden in der Kontrolle $6,70 \cdot 10^5$ und in der Immunpräzipitation von SOX9 $6,71 \cdot 10^5$ Spektren gemessen. Die generierten MS/MS-Massenspektren wurden, wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, für die Datenbankabfrage präpariert. Mithilfe der Suchmaschine *Mascot* (Abschnitt 2.5) wurde die IPI human Proteindatenbank (Version 3.87, 91 464 Einträge) nach den gemessenen Spektren durchsucht und die analysierten Peptide identifiziert. Die Daten und Ergebnisse, die mit der Protein- bzw. Peptididentifikation verbunden sind, wurden mithilfe der frei erhältlichen Software *Scaffold* validiert und visualisiert (Abschnitt 2.5). In *Scaffold* wurden die identifizierten Proteine anhand gemeinsamer Peptide gruppiert und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer gültigen Proteinidentifikation erhöht. Darüber hinaus wurden die identifizierten Proteine anhand der gemeinsamen Peptide in Cluster sortiert. Ein Cluster ist dabei die Summe von Proteinen mit überlappenden Peptidnachweisen und wird

Tabelle 3.1: SOX9-präzipitierte Proteine mit den höchsten logFC-Werten. Als „relevant“ wurden solche Proteine eingestuft, die räumlich mit SOX9 interagieren können. Als „biologisch relevant“ wurden solche Proteine eingestuft, deren Interaktion mit SOX9 biochemisch sinnvoll ist. Unter ‚Symbol‘ sind die offiziellen Abkürzungen der HGNC aufgeführt (Gray et al. 2013). MW = Molekulargewicht.

Symbol	Beschreibung	logFC	MW	Acc. No.
Relevante Proteine mit dem höchsten logFC				
TBD2A	TBC1 domain family member 2A	7,29	105	IPI00097495
A7BI36	p180/ribosome receptor	6,53	166	IPI00856098
HERC4	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4	6,41	119	IPI00333067
Biologisch relevante Proteine				
LASP1	LIM and SH3 protein 1	4,72	29,5	IPI00000861
ZYX	Zyxin	5,83	5,8	IPI00926625
RAB5C	RAB5C, member RAS oncogene family	3,08	23	IPI00016339
YWHAE	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon	0,83	29	IPI00000816

Die vollständige Liste ist auf der Internetpräsenz der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration unter <http://www.miosge.med.uni-goettingen.de/de/?id=42> verfügbar.

für die Identifikation eines Proteins herangezogen. Es wurden insgesamt 3418 Proteine identifiziert, die sich auf 2855 Cluster verteilen (Abbildung 3.9 A). Unter diesen Clustern befinden sich sowohl die Proteine aus der Immunpräzipitation als auch die unspezifisch gebundenen Proteine aus der Kontrolle. In der Immunpräzipitation von SOX9 wurden 2807 Cluster identifiziert. Darunter befinden sich 1159 Cluster, die ausschließlich mit SOX9 co-präzipitierten. In der Kontrolle wurden 1696 Cluster identifiziert und damit deutlich weniger als in der Immunpräzipitation. So gut wie jedes dieser Cluster kommt auch in der Immunpräzipitation vor. Dies entspricht 57,7 % der gesamten Cluster. Das Verhältnis der Cluster spiegelt damit die Intensität der Coomassie-Färbung in dem Gradientengelen wieder (Abbildung 3.8). Damit wird deutlich, dass mehr als die Hälfte der identifizierten Proteine auch unspezifisch an das Säulenmaterial während der Immunpräzipitation binden bzw. von Kontaminationen herrühren. Allerdings berücksichtigt die Verteilung der Cluster nicht die Quantität oder die Spezifität. Selbst wenn ein Protein spezifisch präzipitiert wurde, könnte dieses auch unspezifisch an das Säulenmaterial binden, sollte aber häufiger in der Probe als in der Kontrolle vorkommen.

Zur weiteren Analyse wurde die Menge der identifizierten Proteine semiquantitativ bestimmt. Der *Total Spectrum Count* ist die Summe der Spektren, die einem Protein zugeordnet werden können. Je höher die Ausgangsmenge der Proteine, desto höher ist der Total Spectrum Count. Die Analyse der Proteinintensitäten machte eine sehr asymmetrische Verteilung der Counts deutlich. In der Immunpräzipitation von SOX9 waren 13 Proteine für 36 % der gesamten Spektren mit mehr als 1000 Counts verantwortlich (Abbildung 3.9 B). Allerdings waren darunter typische Kontaminanten wie Keratin für den größten Teil der Spektren verantwortlich. Beispielsweise machten Keratin (Hodge et al. 2013) und Myosin 28 % der Spektren in dem Präzipitat von SOX9 aus. Für ein Drittel der gesamten Spektren waren 203 Clustern mit Counts zwischen 100 und 1000 verantwortlich. Der weit

größte Anteil der Cluster (2570) teilte sich die das restliche Drittel der Spektren. Diese waren mit Counts < 100 vertreten. Im Gegensatz dazu waren in der Kontrolle 12 Cluster mit sehr hohen Intensitäten für 60 % der gesamten Spektren verantwortlich – darunter die Kontaminanten Keratin und Myosin.

Die spezifisch gebundenen Proteine sollten trotz unspezifischer Bindung häufiger in der Immunpräzipitation vorkommen als in der Probe. Um die spezifisch gebundenen Proteine zu identifizieren und den Hintergrund zu minimieren, wurde der Total Spectrum Count in Relation zur Kontrolle gesetzt und aus dem Verhältnis der log fold change (logFC) gebildet. Der logFC ist der logarithmierte Quotient aus dem *Total Spectrum Count* der Probe und Kontrolle mit der Basis 2 (Abbildung 3.9 C). In Tabelle 3.1 ist eine Auswahl mit den höchsten logFC-Werten gelistet. SOX9 wurde selbst mit einem logFC von 2 in der Immunpräzipitation identifiziert.

3.3.3 Co-Immunpräzipitation von RUNX2-assoziierten Proteinen

Die Immunpräzipitation von RUNX2 und mit RUNX2 interagierenden Proteinen erfolgte entsprechend der Immunpräzipitation von SOX9 (Abschnitt 3.3.1). Jedoch wurde hier die lentiviral persistent transfizierte Zelllinie CPC241ht-siSOX9 verwendet. In dieser Zelllinie wurde SOX9 durch RNA-Interferenz herabreguliert und die Proteinexpression von RUNX2 hochreguliert (Abbildung 3.6). Es wird angenommen, dass dabei weitere Proteine hochreguliert werden, die durch eine Interaktion mit RUNX2 einen inhibierenden Einfluss auf das chondrogene Potential der CPCs haben. Durch die Immunpräzipitation von RUNX2 wurden diese Proteine co-präzipitiert und anschließend in der Massenspektrometrie identifiziert.

Für die Immunpräzipitation von RUNX2 und den Nachweis im Western Blot wurden ebenso verschiedene RUNX2-spezifische Antikörperkombinationen getestet (Tabelle 2.12). Die Präzipitation von RUNX2 konnte mit dem polyklonalen Kaninchen Anti-

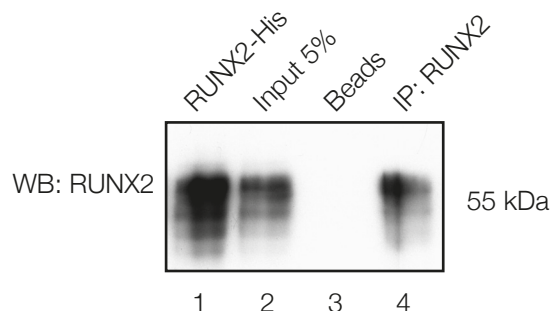


Abbildung 3.10: Immunpräzipitation (IP) von RUNX2 aus CPC241ht-siSOX9-23 Zelllysate. Für die IP wurde der RUNX2 (M70) Antikörper (Kaninchen) mit den Agarose-Beads quervernetzt und mit CPC241ht-siSOX9-23 Zelllysate inkubiert. Der Nachweis von RUNX2 erfolgte im Western Blot (WB) mit dem RUNX2 (C-12) Antikörper (Maus). Als Positivkontrolle wurden 5 % Lysat von pPMh-RUNX2-His transfizierten HEK293T-Zellen aufgetragen (Spur 1). Als Negativkontrolle wurden ungekoppelte Agarose-Beads verwendet (Spur 3).

RUNX2 (M70) Antikörper erreicht werden (Abbildung 3.10). Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit dem monoklonalen Maus Anti-RUNX2 (C-12) Antikörper. Andere Kombinationen der Antikörper verliefen ohne eine funktionierende Präzipitation bzw. positiven Nachweis der Präzipitation in der Western Blot Analyse (Daten nicht abgebildet).

RUNX2 wurde in der Positivkontrolle und im Überstand vor der Immunpräzipitation sowie im Präzipitat selbst bei 56 kDa nachgewiesen. Auffallend ist ein „Schmier“ der Proteinbanden mit Abnahme der Intensität von etwa 56 kDa bis etwa 54 kDa. Da alle Spuren betroffen sind, könnte es sich hierbei um posttranslational modifizierte Formen oder um Präzipitate der verschiedenen Isoformen von RUNX2 handeln. Als Positivkontrolle wurde HEK293T-Lysat mit überexprimiertem RUNX2 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde „Pierce Control Agarose Resin“ verwendet. Hier war keine Reaktion, die auf unspezifische Bindungen deuten würde, erkennbar. Die Intensität der Immunreaktion von RUNX2 war im Präzipitat vergleichbar mit der Intensität im Zelllysate.

3.3.4 LC-MS/MS-Analyse der RUNX2-Präzipitate

Die Präparation der eluierten Proteinkomplexe wurde für die LC-MS/MS-Analyse analog zu Abschnitt 3.3.2 durchgeführt. Durch die Quervernetzung des Antikörpers mit dem

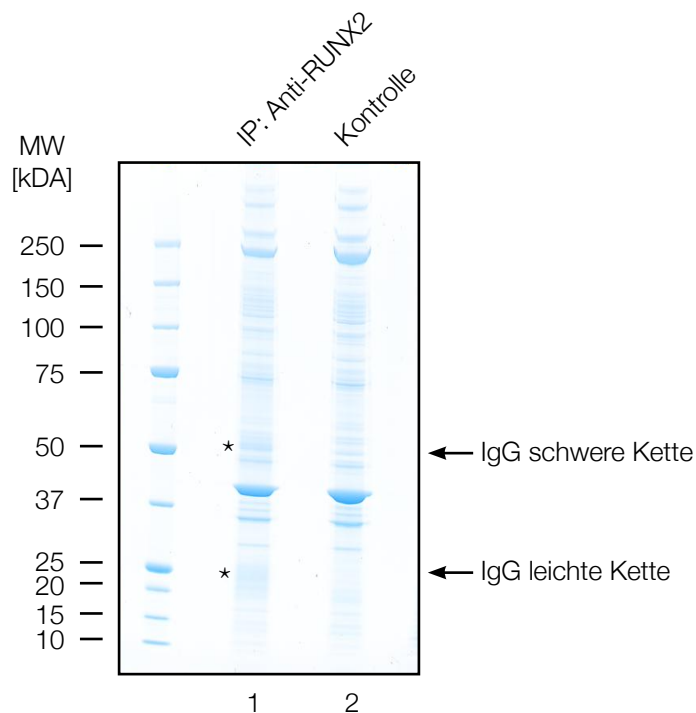


Abbildung 3.11: Coomassie-gefärbtes SDS-Gradientengel der Immunpräzipitation (IP) von RUNX2 aus CPC241ht-siSOX9 Zelllysate. Für die IP wurde der RUNX2 (M70) Antikörper (Kaninchen) mit dem Säulenmaterial durch DSS kovalent quervernetzt und mit dem Zelllysate von CPC241ht-siSOX9 inkubiert. Die schwere bzw. leichte Kette des Antikörpers ist durch ein Stern (*) markiert (Spur 1). Die Kontrolle enthielt kein Antikörper (Spur 2).

3 Ergebnisse

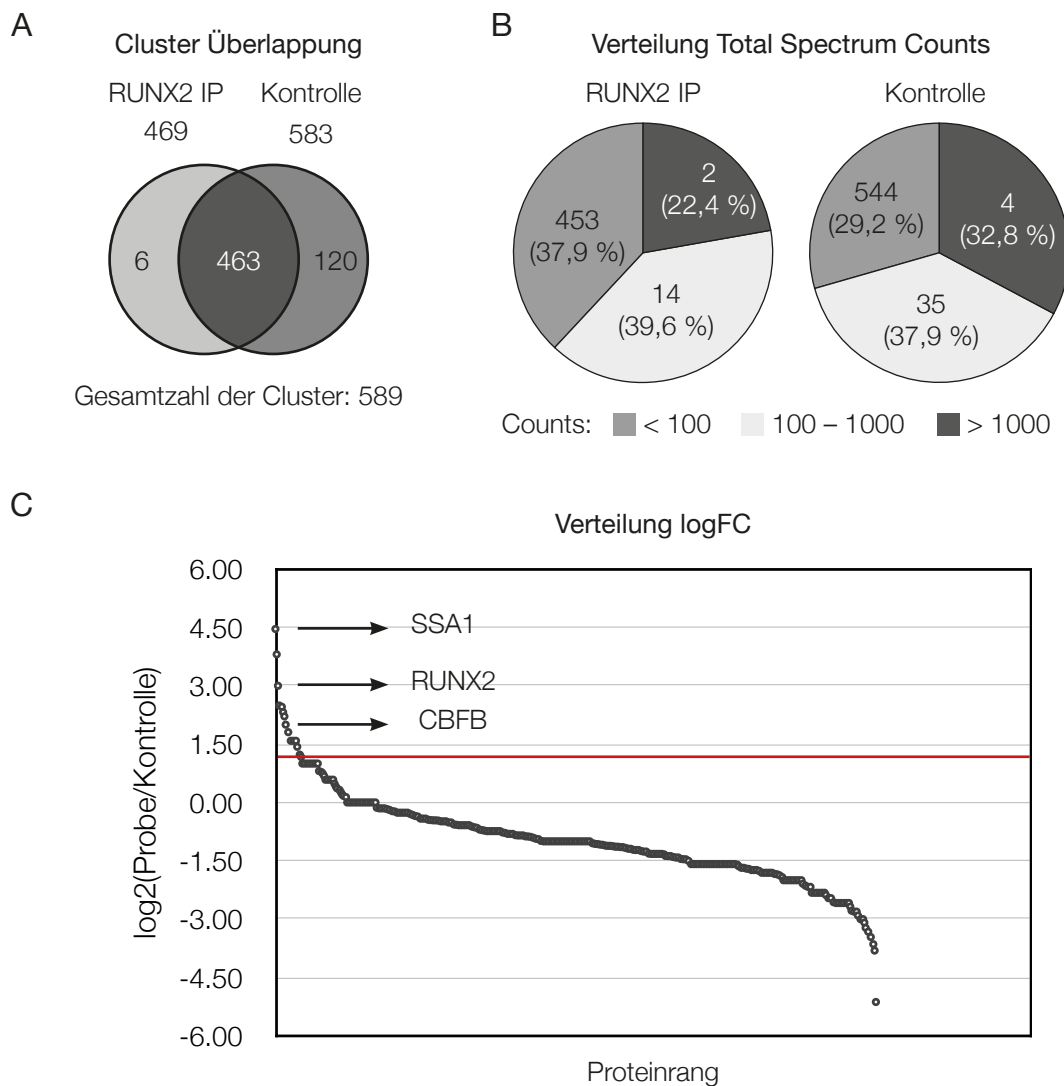


Abbildung 3.12: MS-Analyse der Immunpräzipitation (IP) von RUNX2. A. Venn-Diagramm der Differenzial-Bindungsanalyse von RUNX2. B. Prozentuale Verteilung des Total Spectrum Counts. C. Verteilung des logFC mit der Position biologisch relevanter Proteine.

Säulenmaterial durch DSS konnte die Co-Elution des Antikörpers deutlich gegenüber der Immunpräzipitation ohne Quervernetzung reduziert werden (vgl. Abbildung 3.8). Im Coomassie-gefärbten Gel war sowohl die leichte als auch die schwere Kette des Präzipitationsantikörpers nur sehr schwach zu erkennen (Abbildung 3.11 Spur 1). Die Kontrolle wurde mit ungekoppeltem Säulenmaterial, d. h. ohne Antikörper, durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde vor der Elution der Proteinkomplexe intensiv mit IP-Lysis/Wash Buffer (Pierce) gereinigt, um unspezifische Proteine zu entfernen. Trotz dessen ist in der Coomassie-Färbung ein sehr ähnliches Bandenmuster zwischen der Immunpräzipitation und der Kontrolle zu sehen. Die Proteinbanden wurden wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben extrahiert und per LC-MS/MS analysiert. In der Kontrolle wurden $5,00 \cdot 10^5$ Spektren gemessen. In der Immunpräzipitation von RUNX2 waren es $5,02 \cdot 10^5$ Spektren. Mithilfe der Suchmaschine *Mascot* wurde die NCBI Nr_20130301 Datenbank nach den entspre-

Tabelle 3.2: RUNX2-präzipitierte Proteine mit den höchsten logFC-Werten. Als „relevant“ wurden solche Proteine eingestuft, die sich im Zellkern bzw. im Zytoplasma befinden und mit RUNX2 interagieren können. Als „biologisch relevant“ wurden solche Proteine eingestuft, deren Interaktion mit RUNX2 biochemisch sinnvoll bzw. belegt ist. Unter ‚Symbol‘ sind die offiziellen Abkürzungen der HGNC aufgeführt (Gray et al. 2013). MW = Molekulargewicht.

Symbol	Beschreibung	logFC	MW	Acc. No.
Relevante Proteine mit dem höchsten logFC				
TRIM21	tripartite motif containing 21 (SSA1)	4,46	54	gij14994115
RUNX2	runt-related transcription factor 2 isoform c	3,00	55	gij66934969
DSG4	Desmoglein 4	2,00	114	gij124376626
	selenium-binding protein	1,00	52	gij1374792
Biologisch relevante Proteine				
CBFB	core-binding factor subunit beta isoform 1	2,46	22	gij13124881
MTAP	methylthioadenosine phosphorylase	2,32	31	gij11602392
LRRC15	Lib	1,81	64	gij18565270
	histone H3	1,58	15	gij1568559
EMD	emerin (LEM domain containing 5)	1,58	29	gij4557553
	JUP protein	1,42	82	gij15080189

Die vollständige Liste ist auf der Internetpräsenz der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration unter <http://www.miosge.med.uni-goettingen.de/de/?id=42> verfügbar.

chenden Spektren durchsucht und die Peptide bzw. die zugehörigen Proteine identifiziert. Anschließend wurden die Daten mit *Scaffold* validiert und visualisiert. Dabei wurden insgesamt 698 Proteine identifiziert und in 589 Cluster gruppiert (Abbildung 3.12). Davon können 463 Cluster sowohl der Immunpräzipitation als auch der Kontrolle zugeordnet werden. Weitere 6 Cluster wurden exklusiv in der Immunpräzipitation von RUNX2 identifiziert, darunter RUNX2 selbst sowie der zur Präzipitation verwendete Antikörper (Tabelle 3.2). Die restlichen 120 Cluster beinhalten unspezifisch gebundene Proteine, z. B. verschiedene Isoformen von Aktin, Myosin, Keratin und anderen Komponenten des Zytoskeletts, die sich ausschließlich in der Kontrolle finden.

Die Menge der identifizierten Proteine wurde, wie in Abschnitt 3.3.2 auf S. 55 erläutert, semiquantitativ über den *Total Spectrum Count* bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass in dem Präzipitat der RUNX2-Immunpräzipitation die Proteine β -Aktin, Myosin und Keratin mehr als 1000-Counts sehr intensive Signale produzierten und für ein Viertel der gesamten gemessenen Spektren verantwortlich sind. In der Kontrolle ist ihr Anteil an den gesamten Spektren mit ein Drittel sogar höher (Tabelle 3.2 B). Insgesamt waren verschiedene Isoformen und weitere Zytoskelettkomponenten für etwa 60 % der gemessenen Spektren mit jeweils mehr als 100 Counts verantwortlich.

Nach Bildung des logFC konnte der Anteil unspezifischer Proteine deutlich gesenkt werden (Abbildung 3.12 C). In Tabelle 3.2 sind die Proteine mit den höchsten logFC-Werten aufgelistet. Neben RUNX2 findet sich in der Immunpräzipitation auch das Kernprotein CBFB mit einem logFC von 2,46. CBFB ist die β -Untereinheit des heterodimeren *core-binding* Transkriptionsfaktors. Dieser Transkriptionsfaktor gehört zu der *PEBP2/CBF* Familie von Transkriptionsfaktoren und ist zusammen mit der α -Untereinheit RUNX2 als Masterregulator während der Osteogenese aktiv.

3.4 Isolierung von neuen Interaktionspartnern durch Pulldown

Der Pulldown von Proteinen, die mit SOX9 bzw. RUNX2 interagieren wurde als eine Alternative zu der Immunpräzipitation (Abschnitt 3.3) durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Bait-Proteine SOX9 und RUNX2 mit einem Polyhistidin-Tag in HEK293T-Zellen exprimiert und an eine Ni-NTA beschichtete Matrix (HisPurTM Ni-NTA Magnetic Beads, Thermo Fisher) immobilisiert. Anschließend wurde die Säule mit einem Lysat aus CPCs inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurden die verbliebenen Interaktionspartner von der Säule eluiert und per LC-MS/MS analysiert. Der Pulldown wurde für die statistische Analyse insgesamt dreimal durchgeführt.

3.4.1 Pulldown SOX9-assoziiierter Proteine

Die HEK293T-Zellen wurden mit pPM-hSOX9-His (Tabelle 2.7) transfiziert und die Expression des Bait-Proteins SOX9-6His im Western Blot kontrolliert. Das Bait-Protein wurde dabei sowohl über den Polyhistidin-Tag als auch über den SOX9 (M01) Antikörper nachgewiesen (Abbildung 3.13 B Spur 2). Als Negativkontrolle wurde das Säulenmaterial mit unbehandeltem HEK293T-Zylyllysat inkubiert (Spur 1). In der Western Blot Analyse konnte hier keine Reaktion festgestellt werden, die auf eine unspezifische Reaktion hindeuten würde. Damit wird die erfolgreiche Expression von SOX9-6His bestätigt. Das Bait-Protein wurde an die Beads gekoppelt, um eine Affinitätssäule zu erhalten. Der Pulldown von Proteinen, die mit SOX9 interagieren erfolgte, wie in Abschnitt 3.3.1 auf S. 52 beschrieben, aus der lentiviral persistent transfizierten Zelllinie CPC241ht-siRUNX2. Für die MS-Analyse wurden die gebundenen Proteine mit Probenauftragspuffer direkt von der Säule eluiert und im Gradientengel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Abweichend zu den zuvor beschriebenen Immunpräzipitationen (Abschnitt 3.3) wurde die Elektrophorese nicht über die volle Länge des Gels durchgeführt, da für die nachfolgende LC-MS/MS-Analyse insgesamt 11 Banden anstatt 23 Banden analysiert werden sollten. In der Coomassie-Färbung sind trotz der vielen Waschschriffe sowohl in der Kontrolle als auch in den Pulldowns, multiple Proteinbanden sichtbar (Abbildung 3.13 C). Das Bait-Protein sollte während der Wasch- und Inkubationsschritte an der Säule haften bleiben und erst im Elutionsschritt gelöst werden. Von der MS-Analyse angefallene Restmengen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Das Bait-Protein wurde im Immunblot deutlich über den Polyhistidin-Tag und mithilfe des SOX9 (M01) Antikörpers nachgewiesen (Abbildung 3.13 D Spur 2).

3.4.2 LC-MS/MS-Analyse des SOX9 Pulldowns

Die Proteinbanden wurden, wie in Abschnitt 3.3.2 auf S. 53 beschrieben, aus dem Gel extrahiert, aufgearbeitet und im Massenspektrometer analysiert. In der LC-MS/MS-Analyse wurden in der Kontrolle insgesamt $6,25 \cdot 10^5$ und in dem Pulldown von SOX9 insgesamt $7,42 \cdot 10^5$ Spektren gemessen. Mithilfe der Suchmaschine *Mascot* wurde die SwissProt Datenbank (Version 2014_08, *Homo sapiens*, 546 790 Einträge) nach den gemessenen Spektren durchsucht und die analysierten Peptide identifiziert. Mithilfe von *Scaffold* wurden die Daten validiert und visualisiert. Zur Auswertung wurden die Datensätze der einzelnen Wiederholungen integriert. Es konnten somit insgesamt 3647 Proteine identifiziert

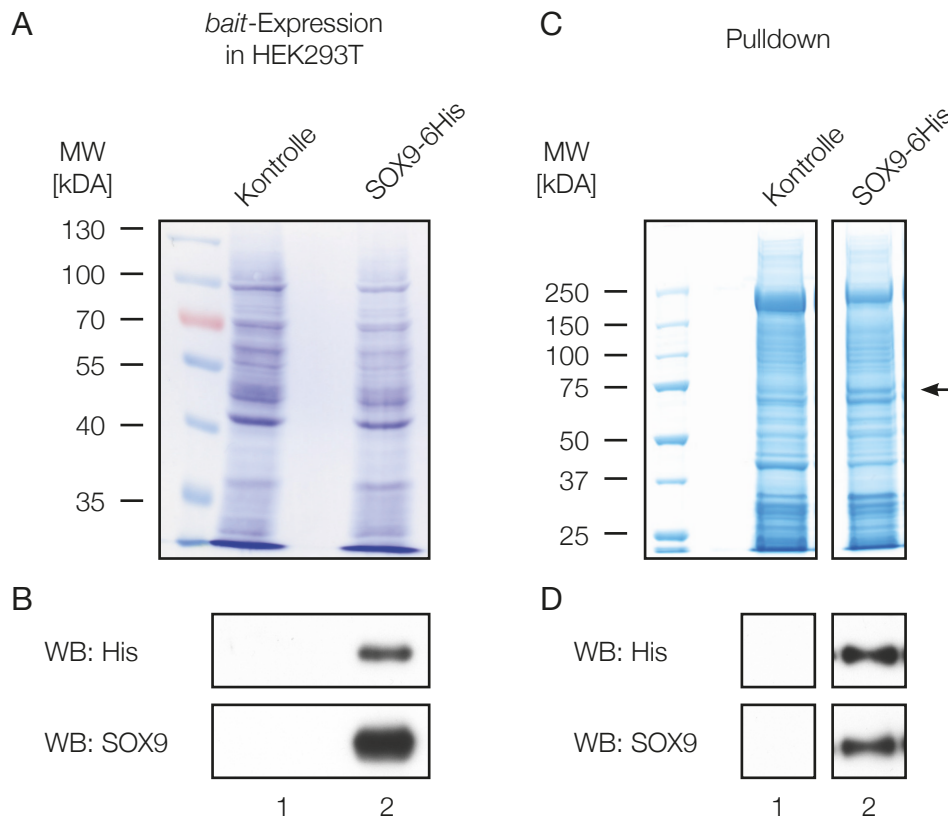


Abbildung 3.13: Pulldown SOX9-assoziierter Zielproteine. A. Coomassie gefärbter Western Blot (WB) des Totallysats (20 µg) von HEK293T-Zellen mit und ohne Expression des Bait-Proteins, B. Western Blot eines Aliquots und Nachweis von SOX9-6His über einen His-Tag bzw. SOX9-spezifischen Antikörper vor dem Pulldown (PD), C. Coomassie gefärbtes SDS-Gradientengel der Eluate nach dem Pulldown von Zielproteinen aus CPC241ht-siRUNX2. Es fällt eine 70 kDA schwere Bande auf (Pfeil). D. Western Blot eines Aliquots und Nachweis von SOX9-6His über einen His-Tag bzw. SOX9-spezifischen Antikörper nach dem Pulldown. Der Pulldown wurde mit gleichbleibendem Ergebnis wiederholt (n = 3). Darstellung typischer Proteinbanden.

und in 3448 Cluster gruppiert werden (Abbildung 3.14 A). Hiervon tauchen 2711 Cluster sowohl in den Kontrolle als auch in den Pulldowns auf. 344 Cluster, darunter SOX9 selbst, wurden exklusiv in den Pulldowns und 393 Cluster exklusiv in den Kontrollen identifiziert.

Die Menge der identifizierten Proteine wurde, wie in Abschnitt 3.3.2 auf S. 55 erläutert, semiquantitativ über den *Total Spectrum Count* bestimmt. Dazu wurden aus den integrierten Datensätzen der durchschnittliche *Total Spectrum Count* für jedes Cluster berechnet. In den Pulldowns waren die beiden Proteine Myosin-9 (MYH9_HUMAN) und Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4_HUMAN) die einzigen Proteine, die mit mehr als > 1000 Counts in den Analyten vertreten waren (Abbildung 3.14 B). Mit 0,5 % waren sie nur für einen sehr geringen Anteil der Spektren verantwortlich. Im Gegensatz dazu, waren 150 Cluster für 93,2 % – und damit für den deutlich überwiegenden Anteil der Spektren – verantwortlich. Die meisten identifizierten Proteine (2903) nahmen 6,3 % der Spektren ein. Aus dem Verhältnis von Probe zu Kontrolle wurde der logFC berechnet

3 Ergebnisse

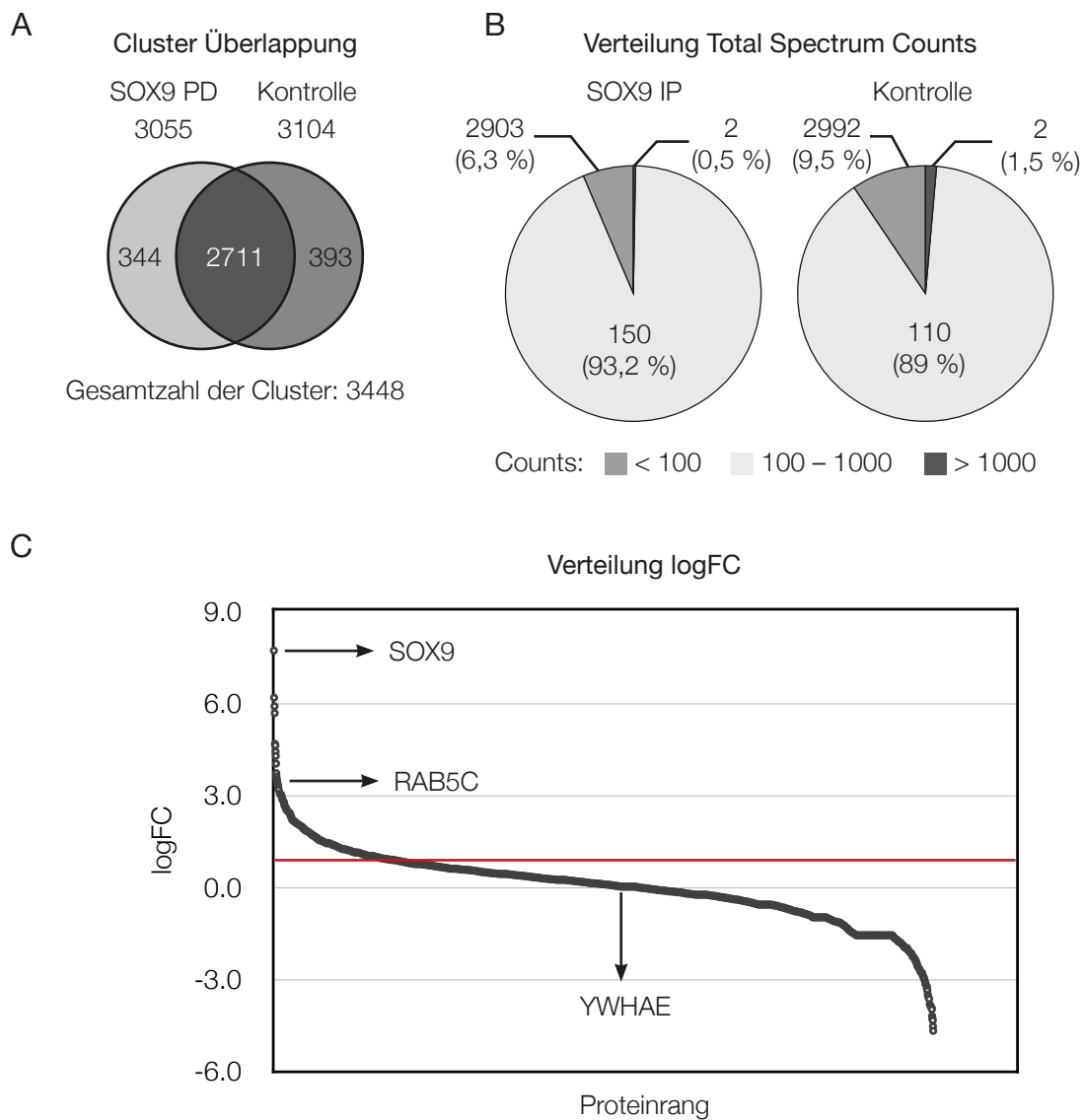


Abbildung 3.14: LC-MS/MS-Analyse des Pulldowns von SOX9. A. Venn-Diagramm der Differenzial-Bindungsanalyse von SOX9. B. Prozentuale Verteilung des Total Spectrum Counts. C. Verteilung des logFC mit der Position biologisch relevanter Proteine.

(Abbildung 3.14 C). SOX9 war mit durchschnittlich $207,33 \pm 17,87$ Counts in den Pulldowns vorhanden. Es konnte ein logFC von 7,7 berechnet werden. In Bezug zur Kontrolle war SOX9 damit das häufigste Protein.

3.4.3 Bioinformatische Analyse des Pulldowns von SOX9

Der SOX9-Pulldown-Assay wurde mit statistischen und bioinformatischen Mitteln analysiert, um die Zahl der potentiellen Bindungspartner zu reduzieren und einzugrenzen. Dazu wurden die 3448 Cluster mithilfe des Poisson Modells auf ihr Vorkommen in den Pulldowns durchsucht und mit der Kontrollgruppe verglichen. Dabei zeigten 391 Proteine einen adjustierten p-Wert $< 0,05$ und $\log_{FC} > 2$. Ein \log_{FC} von 2 bedeutet hierbei eine 7,4-fache Änderung von Probe zu Kontrolle. Da in der Pulldown-Gruppe höhere Counts erwartet werden, empfehlen Fischer et al. (2014) die Anwendung eines *biologischen Filters*, um Proteine zu entfernen, die in der Kontrollgruppe mit höheren Counts vorkommen. Mithilfe des biologischen Filters (Abschnitt 2.6) wurden die Proteine entfernt, die häufiger in der Kontrollgruppe vorkamen als in der Pulldown-Gruppe. Daneben wurde, entsprechend den Empfehlungen der Autoren, ein *Varianzfilter* angewendet, die alle Proteine mit ähnlichen Counts in allen Proben als Kontaminanten betrachtet. Nach dem Filtern blieben 1349 Proteine für weitere Analysen mithilfe des Poisson Modells übrig. Von diesen konnten 359 Proteine mit einem adjustierten p-Wert $< 0,05$ und $\log_{FC} > 2$ ermittelt werden (Abbildung 3.15). Hierbei wurde eine Gruppe von 35 Proteinen mit einer sehr hohen statistischen Signifikanz und einem $\log_{FC} > 5$ identifiziert. In dem SOX9-Pulldown-Assay wurden MX2 ($\log_{FC} = 26,6$) und PAR14 ($\log_{FC} = 24,4$) mit der höchsten Signifikanz selektioniert. Interessanterweise tauchen beide Proteine auch an der Spitze der Liste für den RUNX2-Pulldown mit einer ebenfalls starken Abgrenzung durch ihre hohe statistische Signifikanz und \log_{FC} auf (vgl. Abschnitt 3.4.6).

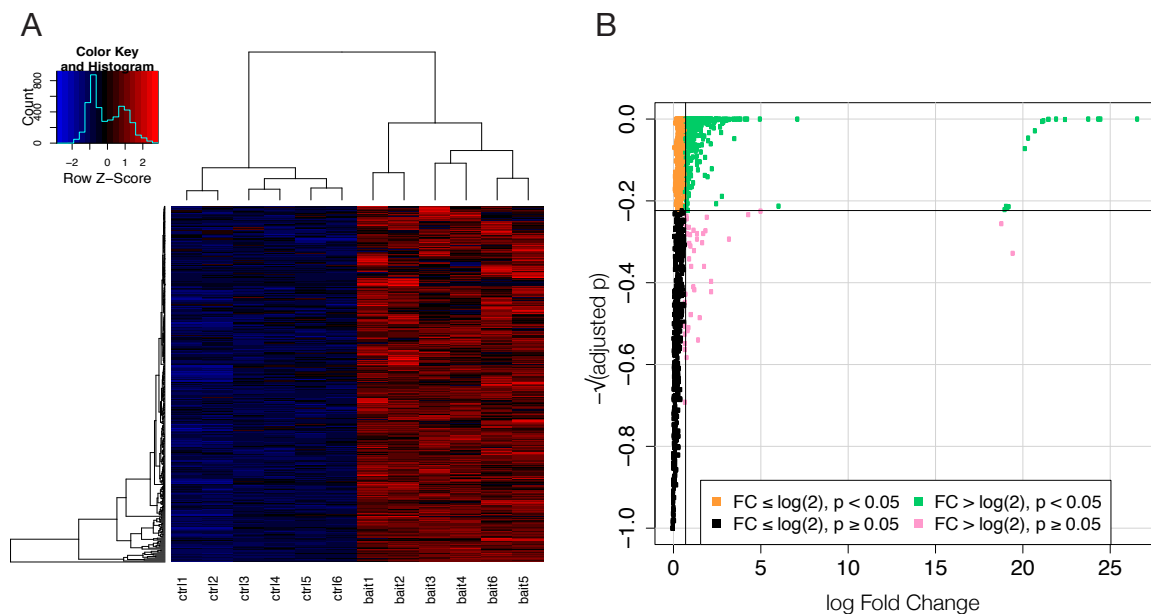


Abbildung 3.15: Darstellung der Differenzial-Bindungsanalyse von SOX9 nach Anwendung des biologischen Filters und des Varianzfilters. A. Heatmap der differentiellen Bindungsaktivität zwischen Probe und Kontrolle. B. Volcano plot adjustierter p-Werte (negative Wurzel) von dem Poisson Modell gegenüber dem \log_{FC} zur Basis e. Die horizontale Linie markiert die 5%-Schwelle der FDR Kontrolle, die vertikale Linie markiert einen \log_{FC} Schwellenwert von 2.

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: SOX9 Pulldown Proteine mit den höchsten logFC-Werten. Aufgeführt sind statistisch signifikante Proteine mit dem größten logFC-Wert.

Symbol	Beschreibung	logFC	p-Wert	adj. p-Wert	MW
Statistisch signifikante Proteine mit den höchsten logFC-Werten					
MX2	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	26.6	7.160E-134	5.263E-131	82
GDN	Glia-derived nexin	24.5	8.342E-18	1.226E-16	44
PAR14	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	24.4	2.179E-40	1.068E-38	203
ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15	23.8	1.276E-23	2.842E-22	18
CFA20	Cilia- and flagella-associated protein 20	22.0	4.924E-11	3.934E-10	23
DOC11	Dedicator of cytokinesis protein 11	21.5	1.294E-07	6.650E-07	238
SPTC3	Serine palmitoyltransferase 3	21.5	1.294E-07	6.650E-07	62
SAP18	Histone deacetylase complex subunit SAP18	21.2	4.822E-06	1.846E-05	18
NRDC	Nardilysin	21.2	9.992E-06	3.548E-05	132
SI1L2	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2	20.7	1.476E-04	8.314E-04	190
RAB23	Ras-related protein Rab-23	20.3	5.180E-04	2.163E-03	27
NU214	Nuclear pore complex protein Nup214	20.2	1.622E-03	5.215E-03	214
SOX9	Transcription factor SOX-9	7.1	1.937E-11	1.189E-08	56
KRT85	Keratin, type II cuticular Hb5	6.1	2.339E-02	4.531E-02	56
LAMB2	Laminin subunit beta-2	5.0	7.415E-44	4.955E-42	196
DDX60	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	4.3	2.374E-99	5.816E-97	198
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein	4.1	1.312E-18	2.143E-17	59
MAP1A	Microtubule-associated protein 1A	3.9	2.015E-14	2.244E-13	305
NOTC2	Neurogenic locus notch homolog protein 2	3.8	6.253E-13	6.296E-12	265
FAT1	Protocadherin Fat 1	3.6	3.828E-11	3.126E-10	506
CNTP1	Contactin-associated protein 1	3.5	5.576E-04	2.283E-03	156
OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthase 2	3.5	1.171E-09	7.968E-09	82
STING	Stimulator of interferon genes protein	3.2	1.383E-07	6.980E-07	42
TB10A	TBC1 domain family member 10A	3.2	1.383E-07	6.980E-07	57
LAMB1	Laminin subunit beta-1	3.1	1.981E-36	7.663E-35	198
RAB2A	Ras-related protein Rab-2A	3.1	2.088E-06	8.574E-06	24
MKRN2	Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-2	2.9	1.586E-05	5.371E-05	47
RASK	GTPase KRas	2.9	1.032E-09	7.157E-09	22
KRT84	Keratin, type II cuticular Hb4	2.8	1.748E-02	3.565E-02	65
GP124	G-protein coupled receptor 124	2.8	2.115E-04	1.091E-03	143
NEO1	Neogenin	2.7	1.015E-07	5.289E-07	160
AGRIN	Agrin	2.7	3.637E-29	1.215E-27	217
CAV1	Caveolin-1	2.6	6.185E-08	2.921E-06	20
QSOX1	Sulfhydryl oxidase 1	2.5	2.945E-11	2.460E-10	83
FINC	Fibronectin	2.5	8.489E-09	5.199E-08	263
DDX6L	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60-like	2.5	5.233E-69	7.693E-67	198
EI2BE	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	2.5	5.528E-11	4.369E-10	80
BACH	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	2.4	9.287E-06	3.330E-05	42
PRDBP	Protein kinase C delta-binding protein	2.4	4.809E-08	2.732E-06	28
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	2.4	4.508E-06	6.920E-05	183
ZFPL1	Zinc finger protein-like 1	2.4	6.113E-05	4.692E-04	34
SC11A	Signal peptidase complex catalytic subunit SEC11A	2.2	6.047E-03	1.479E-02	21

Weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung vorherige Seite

Gen Name	Beschreibung	logFC	p-Wert	adj. p-Wert	MW
SHRM3	Protein Shroom3	2.2	1.160E-21	2.243E-20	217
LAMC1	Laminin subunit gamma-1	2.2	2.049E-09	3.146E-07	178
ACBD5	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5	2.2	1.169E-04	3.594E-04	60
SYNJ2	Synaptojanin-2	2.2	6.188E-09	7.599E-07	166
RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	2.2	1.047E-03	3.673E-03	23
CP135	Centrosomal protein of 135 kDa	2.2	8.373E-11	6.547E-10	133
FGF2	Fibroblast growth factor 2	2.1	8.105E-06	2.934E-05	31
CCPG1	Cell cycle progression protein 1	2.1	2.238E-37	9.678E-36	87
MAP4	Microtubule-associated protein 4	2.1	3.554E-07	1.149E-05	121
GRDN	Girdin	2.0	7.717E-04	2.820E-03	216
XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	2.0	9.455E-27	2.673E-25	70
SACS	Sacsin	2.0	3.802E-12	3.493E-11	521
SAFB1	Scaffold attachment factor B1	2.0	1.575E-19	2.756E-18	103
E41L2	Band 4.1-like protein 2	1.9	7.279E-06	9.509E-05	113
CKAP5	Cytoskeleton-associated protein 5	1.9	8.677E-17	1.119E-15	226
E2AK2	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase	1.9	3.672E-13	3.801E-12	62
PININ	Pinin	1.9	1.533E-20	2.889E-19	82
FIBP	Acidic fibroblast growth factor intracellular-binding protein	1.9	3.198E-03	8.767E-03	42
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta	1.8	6.075E-06	8.477E-05	87
RPA43	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA43	1.8	3.759E-06	6.238E-05	37
FKB11	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP11	1.8	8.025E-03	1.895E-02	22
SNX18	Sorting nexin-18	1.8	5.807E-07	1.550E-05	69
REN3A	Regulator of nonsense transcripts 3A	1.8	6.916E-08	3.657E-07	55
TEP1	Telomerase protein component 1	1.8	3.910E-04	1.727E-03	290
AHNK2	Protein AHNK2	1.8	9.637E-07	4.142E-06	617
SAC31	SAC3 domain-containing protein 1	1.8	4.691E-08	2.652E-07	44
GNA12	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-12	1.8	3.318E-16	4.065E-15	44
PTRF	Polymerase I and transcript release factor	1.7	3.172E-10	9.739E-08	43
ZC3HD	Zinc finger CCCH domain-containing protein 13	1.7	4.638E-23	9.739E-22	197
DEK	Protein DEK	1.7	5.342E-08	2.975E-07	43
ZNFX1	NFX1-type zinc finger-containing protein 1	1.7	8.276E-74	1.521E-71	220
PSD3	PH and SEC7 domain-containing protein 3	1.7	7.265E-05	2.302E-04	116
CC106	Coiled-coil domain-containing protein 106	1.6	6.039E-04	1.580E-03	32
ABI1	Abl interactor 1	1.6	6.039E-04	1.580E-03	55
GFOD2	Glucose-fructose oxidoreductase domain-containing protein 2	1.6	1.336E-04	8.055E-04	42
MEST	Mesoderm-specific transcript homolog protein	1.6	3.097E-11	2.557E-10	39
GAR1	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1	1.6	6.039E-04	1.580E-03	22
NBAS	Neuroblastoma-amplified sequence	1.6	2.975E-03	6.488E-03	269
LAMA5	Laminin subunit alpha-5	1.6	6.159E-08	2.921E-06	400

Die vollständige Liste ist auf der Internetpräsenz der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration unter <http://www.miosge.med.uni-goettingen.de/de/?id=42> verfügbar.

3.4.4 Pulldown RUNX2-assoziiierter Proteine

Der Pulldown RUNX2-assoziiierter Proteine erfolgte analog zu Abschnitt 3.4.1. Dazu wurden die HEK293T-Zellen mit pPM-hRUNX2-His (Tabelle 2.7) transfiziert und die Expression des Bait-Proteins RUNX2-6His im Western Blot kontrolliert (Abbildung 3.16 B). RUNX2-6His wurde sowohl über den Polyhistidin-Tag, als über den RUNX2 (C12) Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde das Säulenmaterial mit unbehandeltem HEK293T-Zytllysat inkubiert und im Western Blot auf die Expression von RUNX2 überprüft. RUNX2 konnte in der Kontrolle nachgewiesen werden. RUNX2 wird auch in HEK-Zellen exprimiert, jedoch ist die Überexpression von RUNX2-6His im Vergleich deutlich höher und gut von der Kontrolle unterscheidbar. Zudem bestätigt der Nachweis über den Polyhistidin-Tag die Identität und damit die erfolgreiche Expression des RUNX2-6His Proteins.

Der Pulldown RUNX2-assoziiierter Proteine erfolgte, wie in Abschnitt 3.3.3 auf S. 56

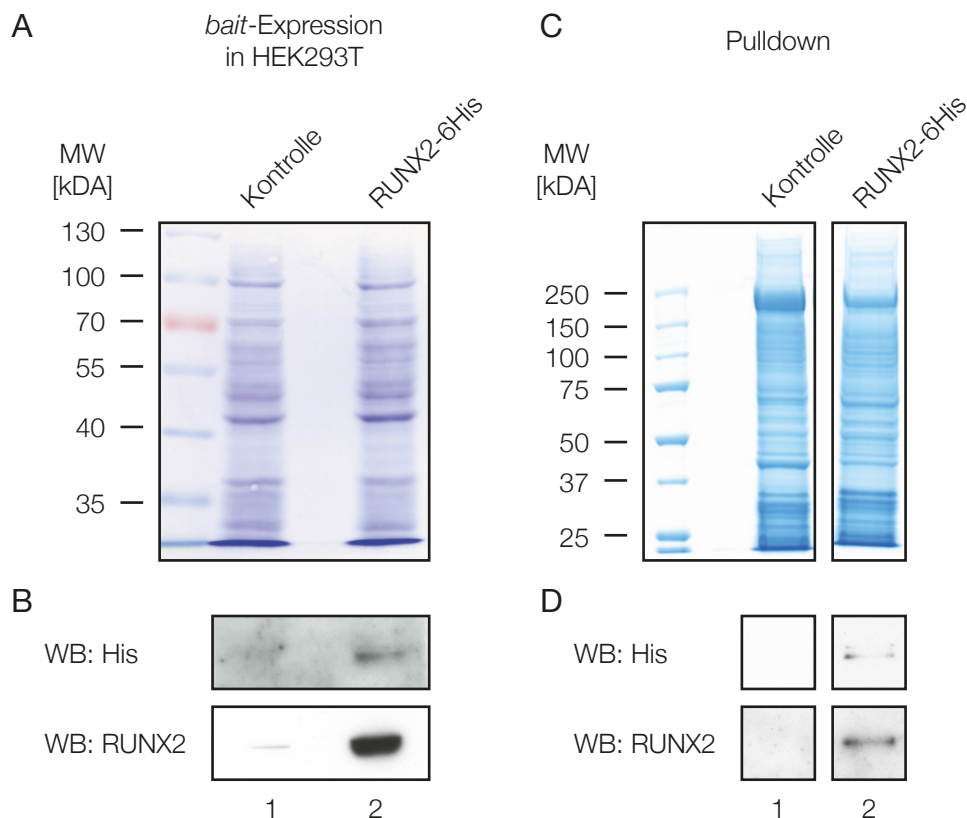


Abbildung 3.16: Pulldown (PD) RUNX2-assoziiierter Zielproteine. A. Coomassie gefärbter Western Blot des Totallysats (20 µg) von HEK293T-Zellen mit (Spur 2) und ohne (Spur 1) Expression des Bait-Proteins, B. Western Blot eines Aliquots und Nachweis von RUNX2-6His über einen His-Tag bzw. RUNX2-spezifischen Antikörper vor dem Pulldown, C. Coomassie gefärbtes SDS-Gradientengel der Eluate nach dem Pulldown von Zielproteinen aus CPC241ht-siSOX9, D. Western Blot eines Aliquots und Nachweis von RUNX2-6His über einen His-Tag- bzw. RUNX2-spezifischen Antikörper nach dem Pulldown. Der Pulldown wurde mit gleichbleibendem Ergebnis wiederholt (n = 3). Darstellung typischer Proteinbanden.

beschrieben, aus der lentiviral persistent transfizierten Zelllinie CPC241ht-siSOX9. Im Gradientengel sind nach der Coomassie-Färbung sowohl in der Kontrolle als auch in den Pulldowns multiple Proteinbanden zu sehen (Abbildung 3.16 C). Aufgrund der kurzen Trennstrecke sind anhand der Färbung keine Unterschiede in der Expression erkennbar. Von der MS-Analyse übergebliebene Restmengen wurden im Western Blot auf das Vorhandensein des Bait-Proteins überprüft. Das Bait-Protein konnte wegen den sehr geringen Mengen nur schwach in einem Aliquot über den Hexahistidin-Tag und etwas intensiver über RUNX2 (C12) Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.16 D).

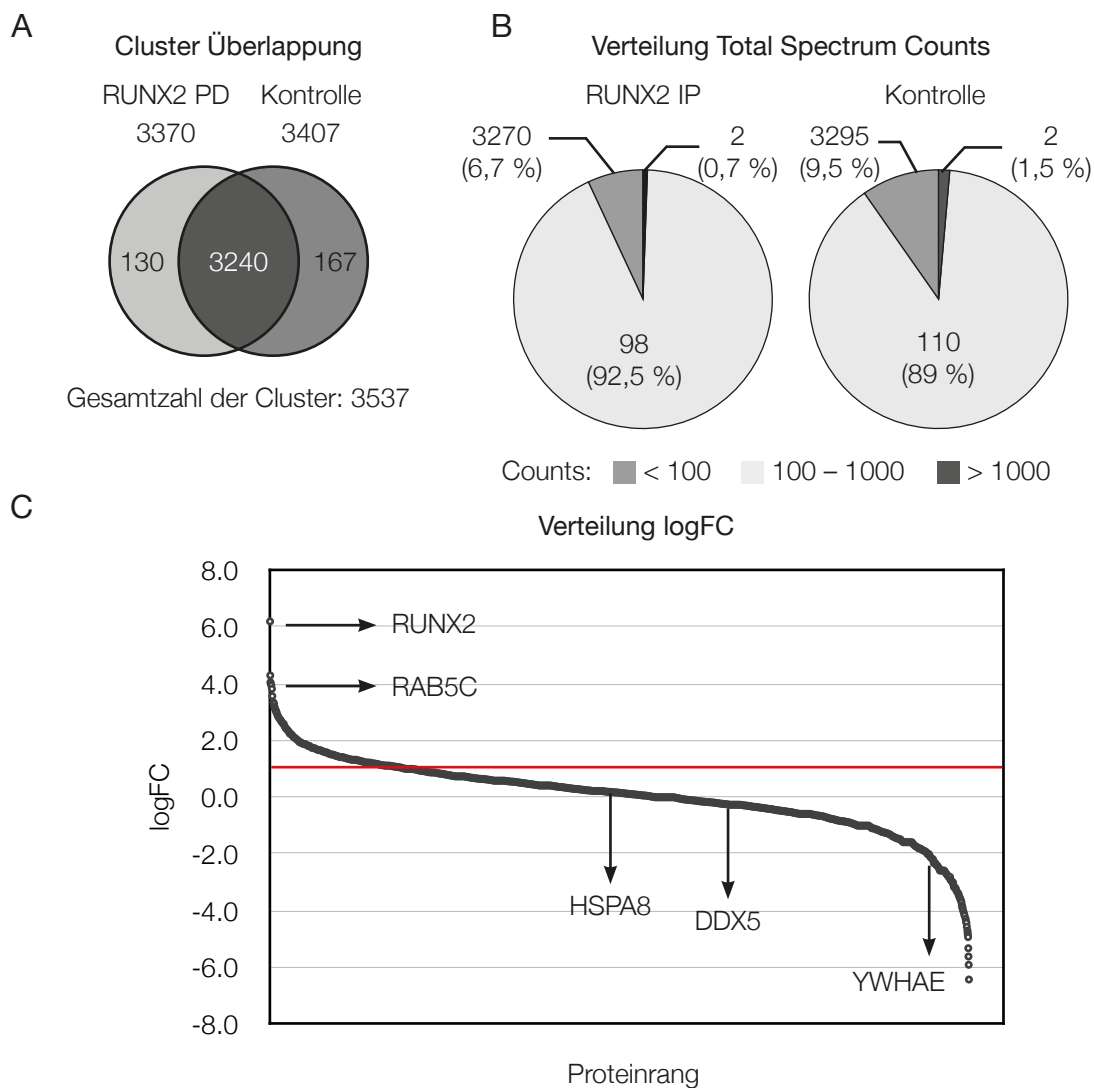


Abbildung 3.17: LC-MS/MS-Analyse des Pulldowns von RUNX2. A. Venn-Diagramm der Differenzial-Bindungsanalyse von RUNX2. B. Prozentuale Verteilung des Total Spectrum Counts. C. Verteilung des logFC mit der Position biologisch relevanter Proteine.

3.4.5 LC-MS/MS-Analyse des RUNX2 Pulldowns

Die Proteinbanden wurden entsprechend Abschnitt 3.4.2 aus dem Gel extrahiert und analysiert. Mithilfe der Suchmaschine *Mascot* wurde die SwissProt Datenbank (Version 2014_08, *Homo sapiens*, 546 790 Einträge) nach den gemessenen Spektren durchsucht und die analysierten Peptide identifiziert. Die Datensätze wurden mithilfe von *Scaffold* validiert und visualisiert. Zur Analyse der Datensätze des Pulldowns von RUNX2 wurde die selbe Kontrollgruppe aus dem Pulldown von SOX9 geladen.

Die identifizierten Proteine wurden in 3537 Clustern gruppiert (Abbildung 3.17 A). 130 Cluster wurden exklusiv in den Pulldowns von RUNX2 und 167 Cluster in den Kontrollen identifiziert. RUNX2 wurde ausschließlich in dem Pulldown identifiziert. 3240 Cluster können sowohl der Probe als auch der Kontrolle zugeordnet werden.

In dem Pulldown waren 98 Proteine für 92,5 % der Spektren verantwortlich (Abbildung 3.17 B). Der Großteil der Proteine (3270 Cluster) war hingegen mit weniger als 100 Counts für nur 6,7 % der Spektren verantwortlich. Unter diesen war RUNX2 mit $73,5 \pm 10$ Counts vertreten, jedoch wurde ein logFC von 6,2 berechnet. Im Vergleich zur Kontrolle ist RUNX2 erwartungsgemäß das häufigste identifizierte Protein in dem Pulldown gewesen (Abbildung 3.17 C).

3.4.6 Bioinformatische Analyse des Pulldowns von RUNX2

Um potentielle Bindungspartner für RUNX2 zu identifizieren wurden 3537 Cluster mithilfe des Poisson Modells auf ihr Vorkommen in den Pulldowns durchsucht und mit der

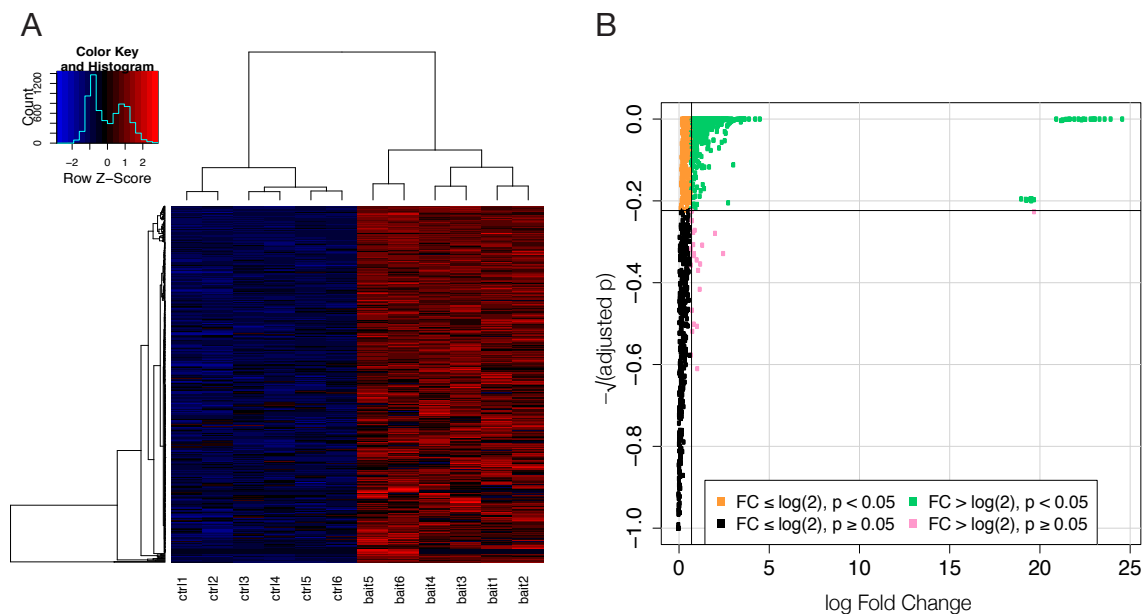


Abbildung 3.18: Darstellung der Differenzial-Bindungsanalyse von RUNX2 nach Anwendung des biologischen Filters und des Varianzfilters. A. Heatmap der differenziellen Bindungsaktivität zwischen Probe und Kontrolle. B. Volcano plot adjustierter p-Werte (negative Wurzel) von dem Poisson Modell gegenüber dem logFC zur Basis e . Die horizontale Linie markiert die 5%-Schwelle der FDR Kontrolle, die vertikale Linie markiert einen logFC Schwellenwert von 2.

Kontrollgruppe verglichen. Unter diesen zeigten 703 einen adjustierten p-Wert $< 0,05$ und $\logFC > 2$. Nach dem Anwenden des biologischen Filters und des Varianzfilters (Abschnitt 2.6) konnte der Hintergrund von unspezifischen Proteinen reduziert werden.

Nach dem Filtern blieben 1436 Proteine für weitere Analysen übrig. Unter diesen zeigten 580 einen adjustierten p-Wert $< 0,05$ und $\logFC > 2$ (Abbildung 3.18). Bei genauerer Betrachtung fällt eine 85 Proteine umfassende Gruppe jenseits eines \logFC Schwellenwertes > 5 auf. RUNX2 ($\logFC = 24,6$) wurde mit der größten Signifikanz, dicht gefolgt von PAR14 ($\logFC = 23,0$), selektioniert. Bemerkenswert ist die starke Abgrenzung dieser hochregulierten Gruppe mit einer hohen statistischen Signifikanz und \logFC gegenüber den anderen hochregulierten Proteinen mit einem geringerem \logFC .

Tabelle 3.4: RUNX2 Pulldown Proteine mit den höchsten \logFC -Werten. Aufgeführt sind statistisch signifikante Proteine mit dem größten \logFC -Wert.

Symbol	Beschreibung	\logFC	p-Wert	adj. p-Wert	MW
Statistisch signifikante Proteine mit den höchsten \logFC -Werten					
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	24.6	7.454E-136	1.481E-133	57
MX2	Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	24.0	1.271E-27	2.296E-26	82
G45IP	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1	23.3	1.129E-15	1.020E-14	25
PAR14	Poly [ADP-ribose] polymerase 14	23.0	9.247E-30	2.162E-28	203
RAB5B	Ras-related protein Rab-5B	22.9	4.081E-10	2.301E-09	24
PRAF2	PRA1 family protein 2	22.6	6.183E-08	2.521E-07	19
COX6C	Cytochrome c oxidase subunit 6C	22.4	3.278E-17	3.257E-16	9
ARMX2	Armadillo repeat-containing X-linked protein 2	22.2	1.616E-13	1.259E-12	66
ASAP1	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	21.7	1.467E-08	6.546E-08	126
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	21.5	1.271E-07	4.906E-07	31
TFAM	Transcription factor A, mitochondrial	21.5	2.616E-07	9.673E-07	29
LSM4	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	21.3	2.299E-06	7.369E-06	15
MD13L	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13-like	21.3	2.299E-06	7.369E-06	243
TRAP1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	21.0	4.793E-11	3.024E-10	80
SBSN	Suprabasin	19.6	2.537E-02	3.892E-02	61
POF1B	Protein POF1B	19.6	2.650E-02	3.997E-02	68
DSC1	Desmocollin-1	19.5	2.451E-02	3.814E-02	100
CDSN	Corneodesmosin	19.5	2.553E-02	3.896E-02	52
CALL5	Calmodulin-like protein 5	19.3	2.564E-02	3.903E-02	16
LEG7	Galectin-7	19.3	2.606E-02	3.949E-02	15
FABP5	Fatty acid-binding protein, epidermal	19.3	2.478E-02	3.847E-02	15
TB10A	TBC1 domain family member 10A	3.6	3.709E-11	2.398E-10	57
STING	Stimulator of interferon genes protein	3.6	1.461E-10	8.867E-10	42
RAB5C	Ras-related protein Rab-5C	3.5	1.067E-05	4.993E-05	23
RASK	Cluster of GTPase KRas	3.4	5.516E-17	5.347E-16	22
THIL	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	3.3	6.854E-08	2.752E-07	45
QKI	Protein quaking	3.3	6.854E-08	2.752E-07	38
GFOD1	Glucose-fructose oxidoreductase domain-containing protein 1	3.1	1.041E-06	3.552E-06	43
RIN1	Ras and Rab interactor 1	3.1	2.051E-06	6.629E-06	84
MED31	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 31	3.0	7.946E-06	2.357E-05	16
PPIL1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 1	3.0	2.671E-10	1.546E-09	18

Weiter auf der nächsten Seite

3 Ergebnisse

Fortsetzung vorherige Seite

Gen Name	Beschreibung	logFC	p-Wert	adj. p-Wert	MW
DDX60	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX60	2.9	2.174E-08	3.840E-07	198
RT06	28S ribosomal protein S6, mitochondrial	2.9	1.562E-05	4.403E-05	14
GSE1	Genetic suppressor element 1	2.8	3.066E-05	8.072E-05	136
TOM22	Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog	2.8	3.066E-05	8.072E-05	16
PRDBP	Protein kinase C delta-binding protein	2.8	6.728E-09	1.540E-07	28
TOM20	Mitochondrial import receptor subunit TOM20 homolog	2.8	1.393E-08	6.257E-08	16
TREX1	Three prime repair exonuclease 1	2.8	6.013E-05	1.503E-04	39
STK19	Serine/threonine-protein kinase 19	2.8	2.682E-08	1.134E-07	41
RAB2A	Cluster of Ras-related protein Rab-2A	2.7	1.178E-04	2.786E-04	24
ATF6A	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	2.6	4.497E-04	9.433E-04	75
MFGM	Lactadherin	2.6	2.249E-12	1.640E-11	43
GANP	Germinal-center associated nuclear protein	2.5	3.812E-09	1.062E-07	NA
SKIV2	Helicase SKI2W	2.5	1.555E-08	6.870E-08	138
SNX18	Sorting nexin-18	2.5	7.608E-10	5.849E-08	69
ZFPL1	Zinc finger protein-like 1	2.4	4.544E-05	1.609E-04	34
PININ	Pinin	2.3	2.518E-09	8.766E-08	82
GNA13	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	2.3	2.520E-03	5.000E-03	44
PZRN3	Cluster of E3 ubiquitin-protein ligase PDZRN3	2.3	6.137E-05	1.525E-04	120
EI2BE	Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon	2.2	2.679E-08	1.134E-07	80
SAFB1	Scaffold attachment factor B1	2.2	5.886E-28	1.141E-26	103
RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	2.1	3.383E-04	9.227E-04	24
CAV1	Caveolin-1	2.1	2.448E-07	2.414E-06	20
PSD3	PH and SEC7 domain-containing protein 3	2.1	1.209E-08	5.522E-08	116
RAP1B	Ras-related protein Rap-1b	2.1	4.856E-10	2.718E-09	21
DEK	Protein DEK	2.1	3.346E-14	2.742E-13	43

Die vollständige Liste ist auf der Internetpräsenz der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration unter <http://www.miosge.med.uni-goettingen.de/de/?id=42> verfügbar.

3.5 Knockdown RUNX2-assoziierter Proteine

Durch die Immunpräzipitation von RUNX2 sollten Interaktionspartner identifiziert werden, die einen Einfluss auf das chondrogene Potential von CPCs ausüben. Die Immunpräzipitation erfolgte aus der Zelllinie CPC241ht-siRNA-SOX9. In dieser Zelllinie ist die Expression von SOX9 durch RNA-Interferenz herabreguliert und die Proteinexpression von RUNX2 hochreguliert (Abbildung 3.6). Durch die RNA-Interferenz wurden RUNX2-assozierte Proteine stimuliert, durch Immunpräzipitation isoliert und anschließend durch Massenspektrometrie identifiziert.

Im nachfolgenden Versuchsabschnitt sollte die Funktion der identifizierten Proteine mithilfe der RNA-Interferenz, im Kontext der Chondrogenese, untersucht werden. Als potentielle Interaktionspartner mit einer hohen biologischen Relevanz wurden *LEM domain containing 2* (LEMD2) und Thymopoietin (TMPO), letzteres ist auch unter dem Synonym LEMD4 bekannt, identifiziert.

3.5.1 Knockdown von LEMD2

Um die Funktion von LEMD2 in CPCs zu untersuchen, wurde dessen Expression durch RNA-Interferenz runterreguliert und die Expression von *RUNX2*, *COL1A1*, *SOX9* und *ACAN* untersucht. Um einen effektiven Knockdown von LEMD2 zu erreichen, wurden die CPCs mit drei verschiedenen siRNAs (LEMD2_6, 7 und 8) transfiziert, die spezifisch gegen LEMD2 gerichtet sind. Die Expression von LEMD2 wurde per RT-qPCR quantifiziert, und die siRNA mit dem größten Knockdown-Effekt identifiziert. Mit der siRNA

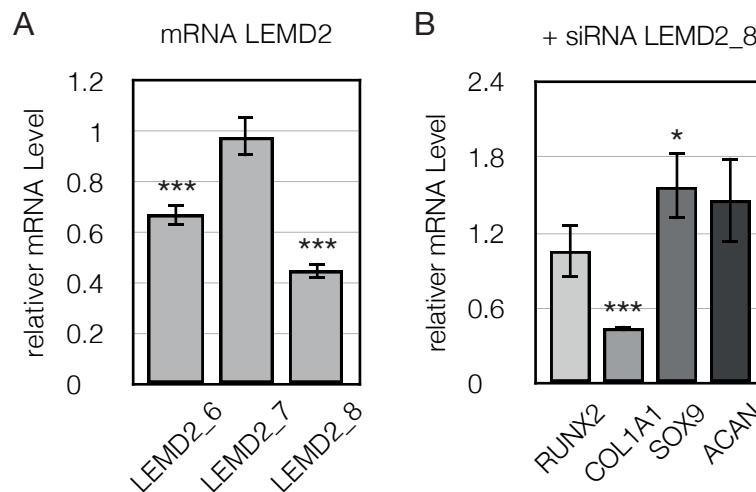


Abbildung 3.19: Der Knockdown von *LEMD2* wirkt auf die Expression von *SOX9*, *ACAN* und *COL1A1*. Die CPCs wurden transient mit siRNA transfiziert und die Genexpression durch RT-qPCR analysiert. A. Relative Quantifizierung des mRNA Levels von *LEMD2* nach Knockdown mit verschiedenen siRNAs. Die Proteinexpression von *LEMD2* konnte mit der siRNA *LEMD2_8* am stärksten reduziert werden ($P < 0,001$). B. Relative Quantifizierung des mRNA Levels von *RUNX2*, *COL1A1*, *SOX9* und *ACAN* in CPCs mit runterreguliertem *LEMD2*. Die Standardabweichung ist durch die Fehlerbalken gekennzeichnet. * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,01$.

LEMD2_8 konnte die Expression, im Vergleich zur Kontrolle, um mehr als die Hälfte ($0,45 \pm 0,03$, $P < 0,001$) reduziert werden (Abbildung 3.19 A). Mit der siRNA LEMD2_6 konnte eine Senkung der Genexpression um ein Drittel ($0,67 \pm 0,04$, $P = 0,001$) erreicht werden. Mit LEMD2_7 wurde keine Änderung der Genexpression von LEMD2 ($0,978 \pm 0,08$, $P = 0,676$) festgestellt.

Nach dem mit der siRNA LEMD2_8 der stärkste Knockdown erreicht werden konnte, wurde die Genexpression von *RUNX2*, *SOX9*, *ACAN* und *COL1A1* überprüft (Abbildung 3.19 B). Während die Expression von *RUNX2* ($1,06 \pm 0,21$, $P = 0,274$) unverändert blieb, führte der Knockdown von LEMD2 zu einer erhöhten Expression von *SOX9* ($1,57 \pm 0,27$, $P = 0,039$) und *ACAN* ($1,45 \pm 0,34$, $P = 0,28$). Interessanterweise reduzierte sich die Genexpression von *COL1A1* ($0,44 \pm 0,03$, $P < 0,001$) um die Hälfte.

3.5.2 Knockdown von TMPO

Neben LEMD2 wurde in der Immunpräzipitation von *RUNX2* das Protein *TMPO* als potentieller Interaktionspartner identifiziert. Mit der siRNA *TMPO_13* konnte der stärkste Knockdown-Effekt erreicht werden (Abbildung 3.20 A). Die Genexpression von *TMPO* konnte um gut 90 % ($0,11 \pm 0,02$, $P < 0,001$) runterreguliert werden. Die anderen siRNAs zeigten einen ähnlich starken Effekt. Mit der siRNA *TMPO_7* konnte die Genexpression von *TMPO* um 80 % ($0,2 \pm 0,02$, $P < 0,001$) und mit *TMPO_8* um 85 % ($0,15 \pm 0,01$, $P < 0,001$) runterreguliert werden.

Nach dem mit der siRNA *TMPO_13* der stärkste Knockdown erreicht werden konnte, wurde die Genexpression von *RUNX2*, *SOX9*, *ACAN* und *COL1A1* untersucht (Abbil-

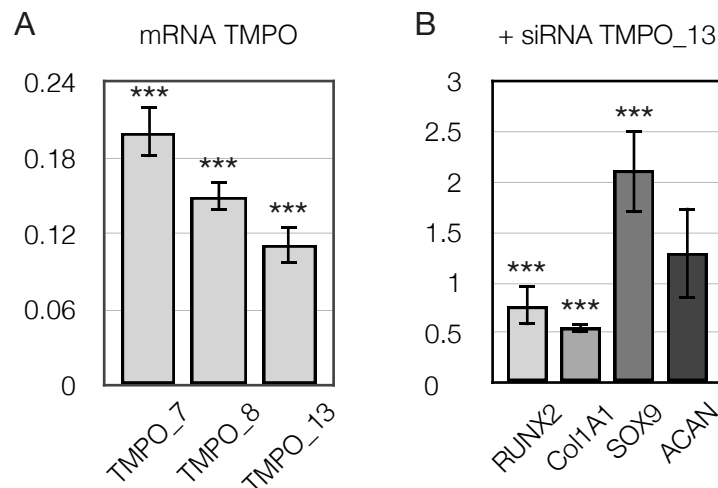


Abbildung 3.20: Der Knockdown von *TMPO* wirkt auf die Genexpression von *RUNX2*, *COL1A1*, *SOX9* und *ACAN* aus. Die CPCs wurden transient mit siRNA transfiziert und die Genexpression durch RT-qPCR analysiert. A. Relative Quantifizierung des mRNA Levels von *TMPO* nach Knockdown mit verschiedenen siRNAs in CPCs. *TMPO* konnte mit der siRNA *TMPO_13* um etwa 90 %, reduziert werden. B. Relative Quantifizierung des mRNA Levels von *RUNX2*, *COL1A1*, *SOX9* und *ACAN* nach dem Knockdown von *TMPO*. Die Standardabweichung ist durch die Fehlerbalken gekennzeichnet. * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,01$.

dung 3.20 B). Dabei konnte eine Reduktion der Genexpression von *RUNX2* um ein Drittel ($0,77 \pm 0,2$, $P = 0,001$) und von *COL1A1* um die Hälfte ($0,54 \pm 0,05$, $P < 0,001$) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu stieg die Genexpression von *SOX9* signifikant an ($2,1 \pm 0,42$, $P < 0,001$). Die Expression von *ACAN* war leicht erhöht jedoch nicht signifikant ($1,29 \pm 0,46$, $P = 0,275$).

3.6 Überexpression SOX9-assoziiierter Proteine

Durch die massenspektrometrische Analyse der Immunpräzipitation von SOX9 wurden Proteine identifiziert, die mit SOX9 direkt oder indirekt durch andere Proteine interagieren könnten. Unter den identifizierten Proteinen wurden diejenigen herausgesucht, die laut Literatur mit Signalwegen der Osteo- oder Chondrogenese verbunden sind. Um die Funktion in CPCs zu untersuchen, wurden biologisch relevante Proteine in CPCs überexprimiert und der Einfluss auf die Expression von SOX9 und RUNX2 im Western Blot analysiert. Die entsprechende cDNA wurde mithilfe des Expressionsvektors pCMV6 (Origene) durch Polyfektion in die CPCs eingebracht. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert (Abschnitt 2.4.1) und das Gesamtzelllysat im Western Blot analysiert. Die überexprimierten Proteine sind rekombinante Fusionsproteine mit einem C-terminalen c-Myc-DDK-Tag. Der Nachweis des Fusionsproteins erfolgte mit dem 4c5 anti-DDK (IgG2a) Antikörper.

3.6.1 HSPA8 stimuliert die Expression von RUNX2 und SOX9

Das Protein HSPA8 konnte im Western Blot entsprechend seines theoretischen Molekulargewichts von 70,7 kDa auf Höhe des 70 kDa Proteinmarkers über seinen DDK-Tag nachgewiesen werden (Abbildung 3.21 A). Die Expression von RUNX2 und SOX9 wurden analog zu DDX5 untersucht. Nach densitometrischer Analyse der Western Blots ist eine Erhöhung der Genexpression sowohl von RUNX2, als auch SOX9 feststellbar (Abbildung 3.21 B). Gegenüber der Kontrolle ist RUNX2 um das 1,8-Fache und SOX9 um das 1,9-Fache erhöht.

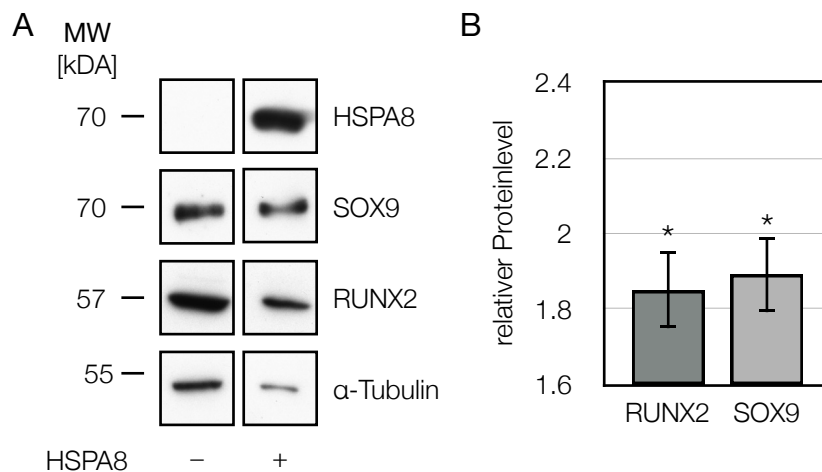


Abbildung 3.21: Überexpression von HSPA8 in CPCs. A. Western-Blot-Analyse von RUNX2 und SOX9 nach Überexpression von HSPA8. Die Proben liefen im selben Gel bzw. Blot. B. Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz von (A) und Darstellung des relativen Proteinlevels in Bezug zur Kontrolle. Normalisiert wurde nach α -Tubulin.

3.6.2 LASP1 wirkt nicht auf die Expression von RUNX2 oder SOX9

LASP1 konnte entsprechend des theoretischen Molekulargewicht bei 29,5 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 3.22 A). In der densitometrischen Analyse der Western Blots wurde ein etwas intensiveres, jedoch nicht signifikantes Signal von RUNX2 gemessen. Eine Veränderung der Genexpression von RUNX2 und SOX9 war auf Proteinebene nicht feststellbar (Abbildung 3.21 B).

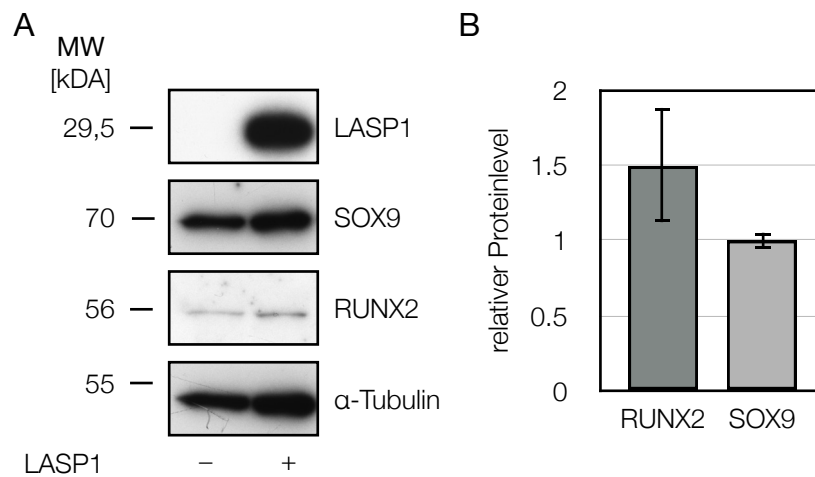


Abbildung 3.22: Überexpression von LASP in CPCs. A. Western-Blot-Analyse von RUNX2 und SOX9 nach Überexpression von LASP1. B. Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz von (A) und Darstellung des relativen Proteinlevels in Bezug zur Kontrolle.

3.6.3 RAB5C stimuliert die Genexpression von RUNX2 und SOX9

RAB5C wurde bei 23,3 kDa im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.23 A). Die Überexpression von RAB5C führte sowohl zu einer Erhöhung der Genexpression von RUNX2 als auch von SOX9. Die Expression von RUNX2 wurde um das 1,5-Fache und das von SOX9 um das Doppelte erhöht (Abbildung 3.23 B).

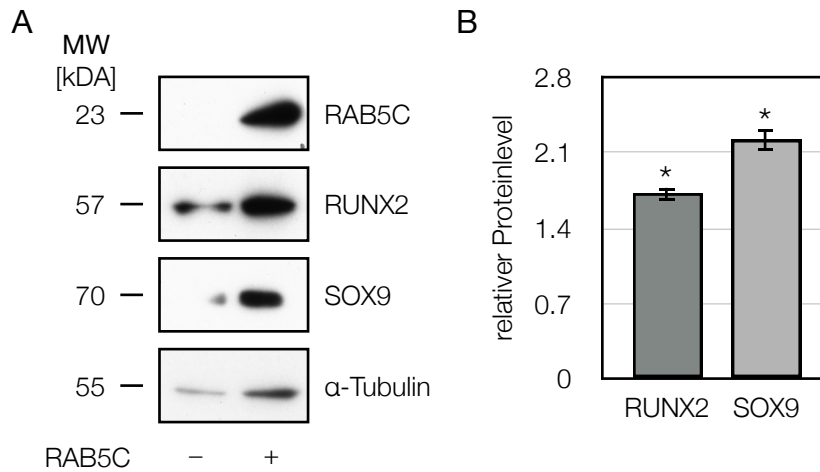


Abbildung 3.23: Überexpression von RAB5C in CPCs. A. Western-Blot-Analyse von RUNX2 und SOX9 nach Überexpression von RAB5C. B. Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz von (A) und Darstellung des relativen Proteinlevels in Bezug zur Kontrolle.

3.6.4 YWHAE stimuliert die Genexpression von SOX9

Die Überexpression von YWHAE konnte im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 3.24 A). Entsprechend seines theoretischen Molekulargewichts wurde ein sehr starkes Signal bei 29 kDa festgestellt. Die Überexpression führte zu einer Veränderung der Genexpression von RUNX2 und SOX9. Während sich die Expression von RUNX2 im Vergleich zur Kontrolle um 30 % reduzierte, stieg die Expression von SOX9 etwa um das 2,5-Fache (Abbildung 3.24 B).

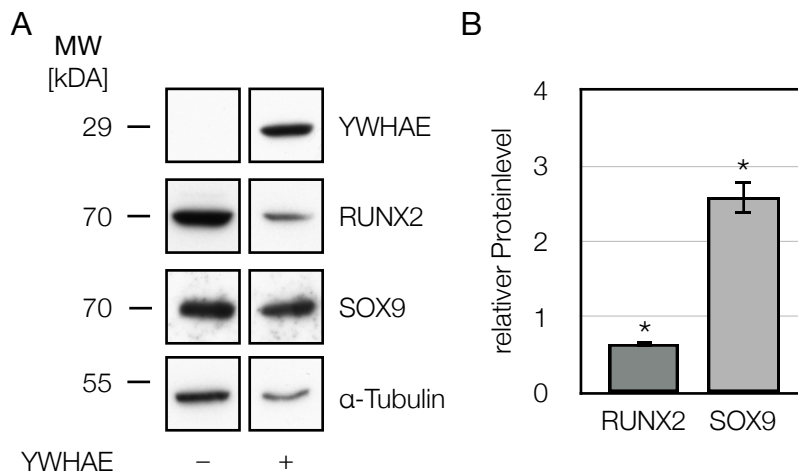


Abbildung 3.24: Überexpression von YWHAE in CPCs. A. Western-Blot-Analyse von RUNX2 und SOX9 nach Überexpression von YWHAE. Die Proben liefen im selben Gel bzw. befanden sich auf dem selben Blot. B. Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz von (A) und Darstellung des relativen Proteinlevels in Bezug zur Kontrolle. Normalisiert wurde gegen α -Tubulin.

3.6.5 DDX5 stimuliert die Expression von SOX9

Im Western Blot wurde das überexprimierte DDX5-c-Myc-DDK übereinstimmend mit seinem theoretischen Molekulargewicht bei 69 kDa nachgewiesen (Abbildung 3.25 A). Der spezifische Nachweis erfolgte über den DDK-Tag. Entsprechend den Erwartungen ist in der Kontrolle keine Reaktion feststellbar. Anschließend wurde der Blot gestrippt und auf die Expression von RUNX2 und SOX9 untersucht. Die Überexpression von DDX5 wirkte sich auf Proteinebene nicht auf die Expression von RUNX2 aus. Anders verhält es sich mit der Expression von SOX9. Diese ist gegenüber der Kontrolle um annähernd das 3-Fache erhöht (Abbildung 3.25 B).

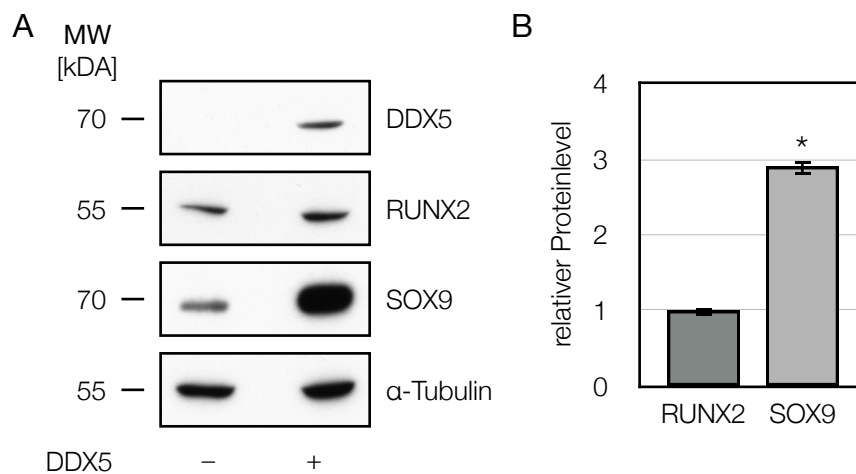


Abbildung 3.25: Überexpression von DDX5 in CPCs. A. Western-Blot-Analyse von RUNX2 und SOX9 nach Überexpression von DDX5. B. Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz von (A) und Darstellung des relativen Proteinlevels in Bezug zur Kontrolle.

3.7 Co-Immunpräzipitation von DDX5

Bei der Immunpräzipitation von SOX9 wurde das Protein DDX5 in den massenspektrometrischen Analysieren identifiziert. Durch die Überexpression von DDX5 wurde eine erhöhte Genexpression von SOX9 in CPCs festgestellt (Abbildung 3.25). Um eine Wechselwirkung zwischen DDX5 und SOX9 nachzuweisen wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden beide Proteine zunächst getrennt voneinander in HEK293T-Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate vereinigt. Ein Teil des Lysats wurde für die Immunpräzipitation von DDX5 und das andere für die Immunpräzipitation von SOX9 verwendet.

Im Western Blot wurde die Überexpression von SOX9 und DDX5 nachgewiesen (Abbildung 3.26 A. Spur 2 unten, B. Spur 2 oben). Das rekombinante DDX5-C-Myc-DDK Protein wurde mit dem DDK-Tag-spezifischen 4c5 Anti-DDK Antikörper präzipitiert (Abbildung 3.26 A. Spur 3 und 4 oben). Die erfolgreiche Co-Immunpräzipitation von SOX9 konnte mit dem Anti-SOX9 (H-90) Antikörper bestätigt werden (Abbildung 3.26 A Spur 4 unten).

Die Immunpräzipitation von SOX9 wurde mit dem polyklonalen Anti-SOX9 (H-90) durchgeführt. Das Präzipitat aus SOX9 und DDX5 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.26 B. Spur 3 und 4). Eine mögliche Ursache könnte in einer Maskierung des Epitops liegen, verursacht durch die Bildung eines Proteinkomplexes (Abschnitt 4.6.2).

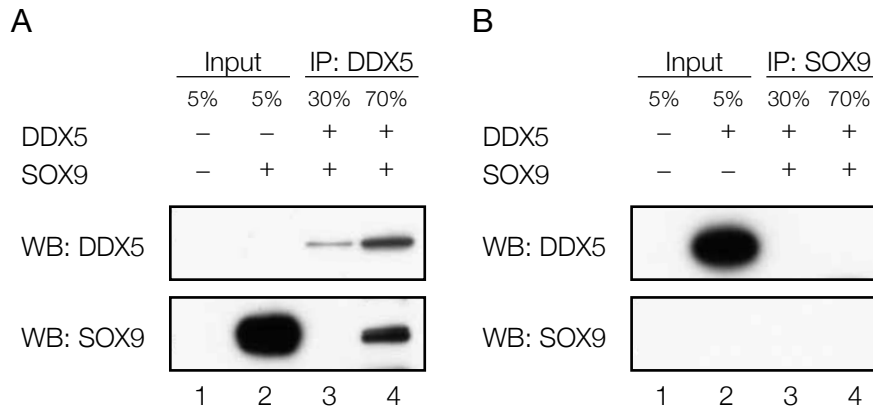


Abbildung 3.26: Co-Immunpräzipitation von DDX5 mit SOX9. HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV6-DDX5-C-Myc-DDK und pPM-hSOX9-His transfiziert. Die Zelllysate wurden zur Bildung der Proteinkomplexe vereinigt. DDX5 wurde mit dem 4c5 Anti-DDK (Maus) und SOX9 mit dem SOX9 (H-90) Antikörper (Kaninchen) präzipitiert. Die in der SDS-PAGE eingesetzten Aliquots werden als prozentualer Anteil aus dem Zelllysate vor der Vereinigung (Input) bzw. der Immunpräzipitation aufgeführt. Der Nachweis von SOX9 erfolgte mit SOX9 (M01) Antikörper (Maus) und DDX5 mit 4c5 Anti-DDK (Maus). A. Immunpräzipitation von DDX5 und Co-IP Untersuchung von SOX9. B. Immunpräzipitation von SOX9 und Co-IP Untersuchung von DDX5.

4

Diskussion

Auf dem Gebiet der Stammzellforschung und der regenerativen Medizin wird intensiv an der Entwicklung von Methoden gearbeitet, die zu einer Regeneration der von OA betroffenen Gelenkflächen führen sollen. Dabei werden verschiedene Zelllinien verwendet und mechanisch sowie chemisch stimuliert, um das chondrogene Potential der Zellen zu erhöhen und transplantationsfähiges Material zu generieren (Temenoff und Mikos 2000, Caplan 2005). Die Chondrozyten galten lange Zeit als die einzige im Knorpel eingebettete Zellart. Die Entdeckung von CPCs in fibrokartilaginärem Ersatzgewebe bringt einen neuen und wenig erforschten zellulären Mitspieler ein, der in den Verlauf der OA involviert ist und zu dem über typische Eigenschaften von Progenitor- oder Stammzellen verfügt. Aufgrund ihres osteochondrogenen Charakters lassen sich CPCs durch Wachstumsfaktoren in Chondrozyten und Osteozyten differenzieren. Angesichts dieser besonderen Eigenschaften könnten die CPCs zu Durchbrüchen bei der Entwicklung von regenerativen Therapien verhelfen (Koelling et al. 2009).

Obwohl die Osteo- und die Chondrogenese, d. h. die Entwicklung von Osteozyten und Chondrozyten, seit langem ein intensiv erforschtes Gebiet ist, geben die vielen beteiligten regulatorischen Prozesse immer noch Rätsel auf. Es ist noch nicht klar, in wie weit sich die bekannten Signalwege und Faktoren in die Entwicklung und Steuerung von CPCs einbringen und welche noch unbekannt Faktoren und regulatorischen Mechanismen einbezogen werden. Die Klärung der beteiligten Faktoren und Mechanismen bietet eine neue Grundlage für das Verständnis der Entwicklung dieser Zellarten sowie für die zellulären Vorgänge in den von OA betroffenen Geweben.

Der hyaline Knorpel zeichnet sich bei der OA durch ein gestörtes Gleichgewicht aus. Bei ihr überwiegen katabole Prozesse und führen langfristig zu einem Verlust der EZM (Goldring und Goldring 2010). Im gesunden hyalinen Knorpel ist die EZM mit Aggrecan und Kollagen Typ II angereichert, wohin gegen fibrokartilaginäres Ersatzgewebe im Wesentlichen Kollagen Typ I enthält (Heinegard und Saxne 2011). Eine Verschiebung der zellulären Prozesse zu Gunsten anaboler Vorgänge wird zur Regeneration des hyalinen Knorpels angestrebt. Die beiden Transkriptionsfaktoren SOX9 und RUNX2 sind maßgeblich in der osteochondrogenen Differenzierung beteiligt. Dabei ist SOX9

ein potentieller Aktivator der Transkription von Chondrozyten-spezifischen Genen, wie *COL2A1* und *COL11A1*, und wird für die Entwicklung von Chondrozyten sowie bei der Bildung des hyalinen Knorpels benötigt (Zhou et al. 2006). Die Hochregulation von SOX9 führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Hochregulation von chondrogenen Markern wie Aggrecan und Kollagen Typ II (Cucchiari et al. 2007). Ein besonderer Gegenspieler von SOX9 ist RUNX2. Während SOX9 für die Aktivierung chondrogener Faktoren verantwortlich ist spielt RUNX2 bei der Aktivierung von osteogenen Faktoren eine Schlüsselrolle (Bruderer et al. 2014).

Aufgrund der direkten wechselseitigen Beeinflussung der beiden Faktoren wurden siRNA-vermittelte Knockdowns von RUNX2 bzw. SOX9 durchgeführt, um entweder das chondrogene oder das osteogene Potential von CPCs zu erhöhen. Ziel war es hierbei Zelllinien zu generieren, in denen Coaktivatoren oder Corepressoren von SOX9 oder RUNX2 stimuliert werden, die in der gewöhnlichen CPC nicht oder nur schwach ausgeprägt sind. Mit anderen Worten sollten aus der RUNX2-Knockdown-Zelllinie Proteine isoliert werden, die mit SOX9 in Verbindung stehen. Umgekehrt sollten aus der SOX9-Knockdown-Zelllinie Proteine isoliert werden, die mit RUNX2 in Verbindung stehen. Die Isolation erfolgte durch Immunpräzipitationen sowie Pulldown-Experimente. Die Proben wurden per LC-MS/MS analysiert und die Proteine durch Datenbankabgleich identifiziert. Nach Auswertung der Proteinlisten wurden mögliche Kandidaten in Überexpressions- und Knockdown-Versuchen auf einen Einfluss auf die Expression von SOX9 und RUNX2 in CPCs untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es Faktoren zu identifizieren, die das chondrogene Potential von CPCs – und damit die regenerative Kapazität dieser Zellen erhöhen. Statt dem fibrokartilaginärem Ersatzgewebe, das fast ausschließlich Kollagen Typ I enthält soll ein Gewebe mit einem deutlich höheren Kollagen Typ II Anteil entstehen.

4.1 Der Knockdown von RUNX2 reguliert SOX9 hoch

Die Regulation der Genexpression mittels RNA-Interferenz ist eine etablierte Methode, um die Funktion eines Proteins abzuleiten und zu untersuchen. In vorhergehenden Studien zu dieser Dissertation wurde die wechselseitige Beziehung der beiden Kernproteine SOX9 und RUNX2 in CPCs mittels RT-qPCR untersucht (Koelling et al. 2009). Durch den transienten Knockdown des osteogenen Faktors RUNX2 konnten Koelling et al. (2009) mittels spezifischer siRNA eine Hochregulation des chondrogenen Faktors SOX9 sowie von Kollagen Typ II und Aggrecan nachweisen. Allerdings wurden diese Untersuchungen von Zellen in 3D-Kulturen durchgeführt und konnten unter 2D-Bedingungen nicht reproduziert werden.

Für die Immunpräzipitations- und Pulldown-Versuche wurden jedoch große Mengen an Zellen benötigt, die durch 3D-Kultur nicht erreicht werden können. Daher war es besonders wichtig, eine Zelllinie zu etablieren, in denen der Knockdown von RUNX2 auch unter 2D-Bedingungen nachweislich funktioniert und die benötigten Zellmengen liefert. Ausserdem sollte die Isolierung und Identifizierung von Faktoren, die einen Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen bieten bzw. zu solchen Hinweise liefern, aus stabilen Zelllinien erfolgen, in denen die Expression von SOX9 oder RUNX2 dauerhaft vermindert ist. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit der Knockdown von RUNX2 oder SOX9 in 2D-

Kultur mit immortalisierten CPCs untersucht. Für diese Arbeit wurden CPCs bereitgestellt, die lentiviral transfiziert wurden und eine RUNX2- bzw. SOX9 spezifische siRNA produzieren. Die Genexpression von den beiden Transkriptionsfaktoren wurde in diesen Zellen mithilfe der RT-qPCR und Western Blot untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von RUNX2 in CPCs auch in 2D-Kultur reduziert werden kann. Darüber hinaus konnte erstmals die deutliche Reduktion durch RNA-Interferenz von RUNX2 auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Mit der Reduktion von RUNX2 konnte gemäß Zhou et al. (2006) gleichzeitig eine deutlich erhöhte Expression von SOX9 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die erhöhte Expression von SOX9 liefert einen Hinweis darauf, dass durch die RNA-Interferenz nicht nur die Expression von RUNX2 sondern auch weitere beteiligte Prozesse vermindert wurden, die sonst inhibitorisch auf die Expression von SOX9 wirken.

Die meisten Knochen bilden sich während der Embryogenese durch die endochondrale Ossifikation. Bei diesem Entwicklungsprozess differenzieren die mesenchymalen Progenitorzellen zu Chondrozyten und werden anschließend durch Osteoblasten ersetzt (Zhou et al. 2006). Interessanterweise wird RUNX2 bereits in sehr frühen Phasen der Embryonalentwicklung gebildet. Untersuchungen in Mäusen zeigen, dass RUNX2 auch in den sukzessiven Schritten der Chondrogenese benötigt wird (Ducy et al. 1997, Smith et al. 2005). Die kontextabhängige gegenseitige Inhibition von SOX9 und RUNX2 ist ein wesentliches Merkmal der osteochondrogenen Differenzierung während der Embryonalentwicklung. Sie ermöglicht bei der mesenchymalen Kondensation von Osteochondroprogenitorzellen eine Ausdifferenzierung zu Chondrozyten (Zhou et al. 2006) und verhindert gleichzeitig die fortschreitende Entwicklung zu hypertrophen Chondrozyten (de Crombrugge et al. 2001). SOX9 tritt nicht nur als ein transkriptioneller Aktivator der Chondrogenese auf, sondern auch als ein Repressor der Differenzierung von Osteoblasten in dem es die RUNX2-abhängige Transaktivierung von Zielgenen unterdrückt. Während RUNX2 die Translokation von SOX9 in den Zellkern inhibiert, wirkt SOX9 in dem es den lysosomalen Abbau von RUNX2 fördert (Zhou et al. 2006). Demnach wäre eine dosisabhängige Rückkopplung denkbar. Durch die verminderte Expression von RUNX2 könnte die inhibitorische Wirkung auf SOX9 sinken, wodurch die Aktivität von SOX9 steigt und den Abbau von RUNX2 zusätzlich fördert. Interessanterweise unterscheiden sich die Ergebnisse von SOX9 zwischen der RT-qPCR Untersuchung und dem Western Blot. Auf transkriptionaler Ebene ist die mRNA-Konzentration von SOX9 in der RUNX2 Knockdown-Zelllinie vermindert. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine negative Rückkopplung, in der die Zelle auf den stark erhöhten SOX9-Gehalt auf Proteinebene reagiert und entweder die Transkription von *SOX9* vermindert oder den Abbau der mRNA erhöht. Diese Ergebnisse sind nicht nur übereinstimmend mit der aufgeführten Literatur, sondern belegen auch den inhibitorischen Einfluss von RUNX2 auf SOX9 in CPCs.

4.2 Der Knockdown von SOX9 reguliert RUNX2 hoch

SOX9 und RUNX2 interagieren direkt über ihre evolutionär konservierte HMG bzw. Runt-Domäne und inhibieren gegenseitig ihre Aktivität (Zhou et al. 2006). Durch die Inhibition der Genexpression von SOX9 könnte somit nicht nur die Bindungsstelle der Runt-Domäne, die für die Bindung der DNA benötigt wird, frei gesetzt werden, sondern

auch für die Interaktion mit regulatorischen Proteinen, wie z. B. CBF β verfügbar werden. In dieser Arbeit wurde daher nicht nur das Ziel verfolgt, Coaktivatoren zu isolieren und zu identifizieren, die direkt stimulierend auf die Expression von SOX9 bzw. dessen Transaktivität wirken sondern auch diejenigen, die mit RUNX2 interagieren und ebenso einen Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen bieten bzw. zu solchen Hinweise liefern. Die Isolation dieser Proteine sollte ebenfalls aus stabilen Zelllinien erfolgen in denen jedoch die Expression von SOX9 durch RNA-Interferenz dauerhaft vermindert ist.

Neben dem Knockdown von RUNX2 untersuchten Koelling et al. (2009) auch den reziproken Versuch, nämlich den transienten Knockdown von SOX9 und stellten dabei eine starke Verminderung der Genexpression von Aggrecan und RUNX2 auf mRNA-Ebene fest, was wiederum für eine starke Verkettung dieser Transkriptionsfaktoren und ihre Rolle in CPCs bestätigt. Die Untersuchung der Genexpression per RT-qPCR ergab in dieser Arbeit ein anderes Bild. Es konnte zwar eine Reduktion von SOX9 auf mRNA-Ebene festgestellt werden, jedoch keine Änderung der Genexpression von RUNX2. Anders verhält es sich auf Proteinebene. Im Western Blot konnte eine starke Verminderung von SOX9 bei gleichzeitiger Erhöhung von RUNX2 festgestellt werden. Wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, äußert sich die reprimierende Wirkung von SOX9 durch die Förderung der lysosomalen Degradation von RUNX2. Die Inhibition von SOX9 könnte somit eine Zunahme der RUNX2-Konzentration bewirkt haben.

Mithilfe der RNA-Interferenz konnten Zelllinien von CPCs identifiziert werden in denen die Genexpression von RUNX2 oder SOX9 mittels RNA-Interferenz inhibiert ist. Darüber hinaus konnte die Frage geklärt werden, ob das reziproke Verhältnis von SOX9 und RUNX2 auch in CPCs gilt. Diese Beziehung konnte in CPCs sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Vermutlich führte der Eingriff mittels RNAi zu einer Verschiebung der regulatorischen Prozesse innerhalb des Transkriptionsnetzwerkes und wirkte sich somit auf die Expression von SOX9 bzw. RUNX2 aus – ein wichtiger Schritt bei der Einflussnahme auf das chondrogene Potential der CPCs. Dies wirft die Frage auf, welche Proteine an diesem Prozess beteiligt sind und ob sich darunter Proteine befinden, die durch den Knockdown hochreguliert werden und ein Ziel möglicher Therapien darstellen. Letzterer Frage wurde zunächst durch Immunpräzipitation und später durch Pulldown von SOX9 bzw. RUNX2 nachgegangen.

4.3 Immunpräzipitationen

Die Isolierung von Interaktionspartnern erfolgte aus den Knockdown-Zelllinien mithilfe der Immunpräzipitation von SOX9 bzw. RUNX2. Die Immunpräzipitation ist eine affinitätschromatographische Methode, die auf der Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen basiert (Bonifacino et al. 2001). Sie wird zur Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, posttranslationalen Modifikationen aber auch zur Isolierung und Aufkonzentrierung von Proteinen verwendet (Phizicky und Fields 1995). Mit der Immunpräzipitation ist es prinzipiell auch möglich Proteine zu präzipitieren, die mit dem Antigen in Wechselwirkung stehen. Das Antigen nimmt dabei die Rolle des Köderproteins (engl. Bait) ein während das co-präzipitierte Protein die Rolle des Jägerproteins (engl. prey) übernimmt. In diesem Fall wird von einer Co-Immunpräzipitation gesprochen. Ziel war es, native Proteinkomplexe von SOX9 bzw. RUNX2 direkt zu isolieren, die unter den

künstlich erzeugten Bedingungen, d. h. in den Knockdown-Zelllinien, gebildet werden. Der große Vorteil einer Immunpräzipitation bzw. Co-Immunpräzipitation liegt darin, dass zur Isolierung des gewünschten Proteins sowie seiner Interaktionspartner kein Affinitäts-Tag benötigt wird. Stattdessen wird die natürliche Affinität eines Antikörpers zu seinem Epitop genutzt.

Für die Isolierung von Proteinkomplexen ist die Aufrechterhaltung der nativen dreidimensionalen Struktur entscheidend (Phizicky und Fields 1995), denn erst diese Konformation verleiht dem Protein seine biologische Funktion und ermöglicht spezifische Protein-Protein-Interaktionen. Für eine erfolgreiche Immunpräzipitation wird demnach ein Antikörper benötigt, der die dreidimensionale Struktur eines gefalteten Proteins erkennt, jedoch darf es sich bei dem Epitop nicht um eine Bindungsstelle für einen Interaktionspartner des untersuchten Proteins handeln. In dem Fall würde der verwendete Antikörper mit einem möglicherweise gesuchten Interaktionspartner um die Bindungsstelle konkurrieren. Daher wurden für die Präzipitationen polyklonale Antikörper ausgewählt. Dadurch sollte das Risiko einer Konkurrenz zwischen dem Epitop des Antikörpers und der Bindungsstelle für ein interagierendes Protein minimiert werden.

Die beiden Kernproteine SOX9 und RUNX2 konnten erfolgreich mithilfe der polyklonalen Antikörper präzipitiert und im Western Blot nachgewiesen werden. Allerdings stellte sich der Nachweis einer erfolgreichen Präzipitation als eine große Herausforderung heraus. Häufig war der Nachweis des eluierten Antigens im Western Blot nicht möglich oder unspezifische Reaktionen interferierten mit dem Nachweis der Proteine. Ein häufiges Problem der Immunpräzipitation ist die Verschleppung von unlöslichen Proteinen aus dem Zellpellet (Bonifacino et al. 2001). Nach der Zellyse waren trotz rascher und vorsichtiger Abnahme des Überstandes schwache Trübungen zu sehen, die auf unlösliche Proteine deuteten. Trotz verlängerten und wiederholten Zentrifugationsschritten bis zu 30 min bei 4 °C und bei voller Drehzahl waren weiterhin leichte Trübungen im Lysat auszumachen. Diese könnten sich in den nachfolgenden Präzipitationsschritten an den Agarosekügelchen des Säulenmaterials abgesetzt und die Proben kontaminiert haben. Erst durch die Verwendung der superparamagnetischen Agarose-Beads (Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads, Thermo Fisher) konnte eine hinreichende Präzipitation des Antigens erreicht werden. Die magnetischen Beads zeichnen sich durch einfache und schnelle Handhabung aus. Die Beads können sehr einfach von dem übrigen Probenmaterial getrennt werden und ermöglichen dadurch auch schnelle, schonende und effiziente Waschschriffe. Zu dem ist die magnetische Oberfläche geblockt, wodurch der Hintergrund unspezifischer Reaktionen im Immunblot deutlich gegenüber den Proben mit nicht-magnetischen Beads sank und dadurch auch nicht mehr mit dem Nachweis von SOX9 bzw. RUNX2 durch unspezifischen Hintergrund interferierte.

4.3.1 Immunpräzipitation von SOX9

SOX9 konnte in dem Präzipitat nur schwach nachgewiesen werden. Durch die Immunpräzipitation wurde eine Anreicherung des Antigens und dementsprechend eine intensive Reaktion im Immunblot erwartet. Die starke Immunreaktion im Lysat weist auf eine ausreichende Menge an präzipitierbarem SOX9 hin und kann als limitierender Faktor ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die schwache Präzipitation durch eine schwache Affinität des verwendeten Antikörpers oder durch die Maskierung des Epitops durch Co-

regulatoren begründet (Harlow und Lane 1999). Beispielsweise wurden einige Proteine beschrieben, die mit der C-terminalen Domäne von SOX9 interagieren und seine transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Dazu gehören TRAP230 (Zhou et al. 2002), *CREB binding protein* (CREBBP)/p300 (Tsuda et al. 2003), PGC-1 α (Kawakami et al. 2005), PIAS (Hattori et al. 2006) und Tip60 (Hattori et al. 2008).

Für die Immunpräzipitation von SOX9 wurde ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen verwendet, der gegen die Aminosäurereste 407 – 496 von SOX9 humaner Herkunft gerichtet ist. Dieser Abschnitt befindet sich innerhalb der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von SOX9 und könnte mit den aufgeführten Proteinen um die Bindungsstellen konkurrieren (vgl. Abbildung 1.5). Dies würde auch erklären, warum diese Proteine in der LC-MS/MS-Analyse nicht identifiziert werden konnten. Eine Abhilfe könnte die Immunpräzipitation mit einem anderen geeigneten Antikörper verschaffen. Bis auf die genannte Antikörperkombination gestaltete sich die Immunpräzipitation mit den anderen verwendeten Antikörpern als erfolglos.

4.3.2 Immunpräzipitation von RUNX2

Ähnliche Ergebnisse und Schwierigkeiten stellten sich bei der Immunpräzipitation von RUNX2 ein. RUNX2 konnte wie SOX9 mithilfe eines polyklonalen Antikörpers präzipitiert werden, jedoch wurde auch hier keine Anreicherung von RUNX2 – und damit keine Anreicherung von möglichen Coregulatoren, erreicht. Vermutlich verhinderten auch hier Konkurrenzreaktionen zwischen Coregulatoren und dem verwendeten Antikörper eine ausreichende Präzipitation. Auch für RUNX2 wurden weitere Antikörperkombinationen getestet, die sich allesamt als nicht geeignet erwiesen.

Eine weitere Ursache für die geringe Ausbeute könnte in den Puffer-Bedingungen liegen. Die Protein-Protein-Interaktionen hängen wesentlich von den Bestandteilen der Umgebung ab, sei es die Salzkonzentration oder der pH-Wert (Phizicky und Fields 1995). Eine Optimierung dieser Bedingungen könnte die Ausbeute an den Proteinkomplexen deutlich erhöhen – ist aber auch mit sehr intensiven Versuchsreihen verbunden.

4.4 Pulldown

Neben der Immunpräzipitation von SOX9 und RUNX2 wurde zusätzlich ein *Pulldown* zur Isolierung und späteren Identifizierung von präzipitierten Proteinen sowie Proteinkomplexen durch LC-MS/MS-Analysen durchgeführt. Beim Pulldown handelt es sich, wie bei der Immunpräzipitation, um eine affinitätschromatographische Methode (Phizicky und Fields 1995). Allerdings werden die Bait/Antigen-Prey-Komplexe nicht aufgrund der Affinität zwischen Antikörper und Antigen isoliert. An Stelle des Antikörpers wird ein Protein-Tag verwendet. Diese wird zur Immobilisierung des Bait-Proteins an eine Affinitätssäule verwendet. Dabei wird das Bait-Protein gentechnisch mit einem Affinitäts-Tag versehen, in einem geeigneten System exprimiert und mithilfe einer Affinitätssäule immobilisiert. Die Bildung der Bait-Prey-Komplexe wird durch die Inkubation des Säulenmaterials mit einem Zelllysats, das das Bait-Protein enthält, ermöglicht. Die Komplexe können anschließend per Western Blot oder Massenspektrometer identifiziert werden.

Der Pulldown wurde als Alternative zu der Immunpräzipitation gewählt, um dessen Schwächen zu überwinden. Bei der Immunpräzipitation kann es zu einem bedeutenden *Flaschenhalseffekt* kommen, wenn in der untersuchten Zelllinie das Expressionsniveau des Bait-Proteins/Antigens niedrig ist und die Ausgangsmenge nur zu einer geringen Ausbeute an Immunpräzipitaten führt (Bonifacino et al. 2001). Die Identifizierung der Proteinkomplexe in der nachfolgenden LC-MS/MS-Analyse hängt wesentlich von der zur Verfügung gestellten Ausgangsmenge ab. Je geringer die Konzentration des verfügbaren Bait-Proteins ist, desto geringer fällt die Ausbeute an Proteinkomplexen aus, die durch die LC-MS/MS-Analyse identifiziert werden können (Atanassov und Urlaub 2013). Im Gegensatz zu der normalen Zelle stehen, durch die Überexpression, mehr Bait-Proteine für den Pulldown zur Verfügung und umgehen hier diesen Flaschenhalseffekt.

Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass kein Antikörper zum Binden des Bait-Proteins benötigt wird. Dadurch wird der Bedarf zu einem effizienten Antikörper überflüssig. Ein weiterer Nebeneffekt ist die verminderte Konkurrenz zwischen dem Antikörper und den Coregulatoren um mögliche gemeinsame Bindestellen, da der Protein-Tag am N- oder C-Terminus und nicht in einer Bindedomäne lokalisiert ist.

4.4.1 Pulldown von SOX9-Proteinen

Für den Pulldown von Proteinen, die mit SOX9 interagieren wurde das Polyhistidin markierte SOX9-6His in HEK293T-Zellen überexprimiert. Diese Zelllinie wurde als Expressionssystem ausgewählt da sie, aufgrund ihrer biochemischen Maschinerie, in der Lage ist viele der posttranslationalen Modifikationen durchzuführen und funktionelle Proteine zu produzieren. Darüber hinaus zeichnet sie sich durch schnelles Wachstum und der Eignung zur schnellen sowie effizienten Transfektion aus (Thomas und Smart 2005). Die Zelllinie HEK293T exprimiert zwar in geringen Mengen endogenes SOX9 (Blache et al. 2004), aber gemessen an dem zusätzlich exprimiertem SOX9-6His sind diese Mengen vernachlässigbar. Das endogene SOX9 konnte ausserdem erst durch längere Belichtungszeiten im Western Blot nachgewiesen werden. Zusammen mit dem Nachweis über den Polyhistidin-Tag konnte die erfolgreiche Expression von SOX9-6His bestätigt werden. Auch der Nachweis nach dem Pulldown war erfolgreich. Obwohl aus dem Eluat nur wenige Mikroliter Aliquot für den Western Blot Nachweis entnommen wurde, deutet die intensive Reaktion auf eine hohe Konzentration des Bait-Proteins und bestätigt damit auch die erfolgreiche Immobilisierung dieser vor dem Pulldown. Dieses Ergebnis verdeutlicht den Vorteil dieser Methode gegenüber der Immunpräzipitation sowie der erfolgreichen Umgehung des beschriebenen Flaschenhalseffekts.

4.4.2 Pulldown von RUNX2-Proteinen

Das Bait-Protein RUNX2-6His wurde mit ähnlichen Ergebnissen wie SOX9-6His in den HEK293T-Zellen exprimiert und konnte deutlich im Western Blot nachgewiesen werden. In der Kontrolle wurde eine sehr schwache Bande für RUNX2 festgestellt. Im Gegensatz zu SOX9 soll die Zelllinie über kein endogenes RUNX2 verfügen. In der Literatur findet sich jedoch nur eine Beschreibungen, in der dies am Rande erwähnt wird (Zheng et al. 2007). Um die Identität der Bande zu überprüfen, wurde der Blot gestripped. Mit einem Anti-His-Tag-Antikörper konnte das Bait-Protein über den His-Tag nachgewiesen und

die erfolgreiche Expression bestätigt werden. Auch hier konnte das Bait-Protein nach dem Pulldown nachgewiesen werden. Damit wird auch die erfolgreiche Immobilisierung durch die Affinitätssäule belegt.

4.5 LC-MS/MS Analyse

Die großangelegte Profilierung des Proteoms basiert auf der massenspektrometrischen Analyse von Proteinfragmenten. Für die Analyse werden die Proteine zunächst isoliert und mit eindimensionaler oder zweidimensionaler Gelelektrophorese getrennt. Mithilfe von Proteasen werden die Proteine zu den korrespondierenden Peptiden hydrolysiert und anschließend im Massenspektrometer analysiert (Fenyó 2000). Bei diesem als *fingerprinting* oder *peptide mapping* bezeichneten Verfahren erzeugen die Peptide für jedes Protein eine charakteristische Massenverteilung, die sich mithilfe von Datenbanken, in denen die Profile hinterlegt sind, eindeutig identifizieren lassen (Mortz et al. 1994). Der Erfolg hängt bei diesem Verfahren von dem Protein- bzw. Peptid-Trennverfahren vor der MS Analyse ab. Durch die SDS-PAGE wird das komplexe Proteingemisch fraktioniert und erhöht deutlich die Anzahl der identifizierbaren Proteine (Atanassov und Urlaub 2013). Die modulare Bauweise der Massenspektrometer erlaubt es einen Peak aus dem Spektrum auszufiltern und diesen weiter zu fragmentieren, wodurch in dieser MS/MS-Kopplung oder Tandem-MS die exakte Identifizierung sowie Quantifizierung der Proben möglich wird (Finehout und Lee 2004). Die Fähigkeit Proteinkomplexe aufzulösen und die Bestandteile zu analysieren macht die Massenspektrometrie zu einer attraktiven Methode zur Identifizierung von interagierenden Proteinen aus Co-Immunpräzipitations- oder Pulldown-Experimenten (Brymora et al. 2004, Free et al. 2009). Darüber hinaus erlaubt die Summierung der Spektren (*spectral counting*) eine, wenn auch nur eine semi-quantitative aber isotopefreie Quantifizierung (Lundgren et al. 2010). Die quantitativen Informationen können durch Gegenüberstellung der Counts von Immunpräzipitaten oder Pulldowns gegen die Counts von Negativkontrollen verwendet werden, um wirklich interagierende von falschpositiven Proteinen zu unterscheiden (Fischer et al. 2014). Dies erlaubt eine differenzielle Analyse der identifizierten Peptide bzw. der daraus abgeleiteten Proteine.

4.5.1 LC-MS/MS Analyse immunpräzipitierter Proteine

Mithilfe der massenspektrometrischen LC-MS/MS-Analyse wurde im Immunpräzipitat SOX9 und eine Vielzahl weiterer Proteine identifiziert. Im Präzipitat waren dabei insbesondere die Proteine *LIM and SH3 protein 1* (LASP1), *Member RAS Oncogene Family* (RAB5C) und *Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein, Epsilon* (YWHAE) auffallend. Im Präzipitat von RUNX2 wurde RUNX2 selbst aber auch *core-binding factor beta subunit* (CBFB) identifiziert – eine wichtige regulatorische Einheit von RUNX2.

Der hohe Hintergrund unspezifischer Proteine erschwerte die Auswertung der massenspektrometrischen Datensätze. Mithilfe der Counts konnte der logFC zwischen Kontrolle und Probe berechnet und der Anteil unspezifischer Proteine herausgerechnet werden. Durch die Präzipitation mithilfe spezifischer Antikörper wurde eine Konzentrierung von

SOX9 bzw. RUNX2 erwartet, die sich in hohen logFC-Werten äußern. Obwohl SOX9 und RUNX2 in den Immunpräzipitationen identifiziert wurden, zeigt ihr logFC-Wert von 2 für SOX9 und 3 für RUNX2 nur ein geringes Vorkommen dieser in den analysierten Proben an. Für die sichere Detektion und Quantifizierung potentieller Interaktionspartner ist eine hohe Konzentration des Bait-Proteins während der Immun- bzw. Co-Immunpräzipitation erforderlich. Wenn das Bait-Protein nicht den limitierenden Faktor darstellt, können sowohl häufige als auch selten vorkommende Interaktionspartner in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Umgekehrt führt eine mittlere oder niedrige Konzentration des Bait-Proteins zu einem schwachen MS-Signal der interagierenden Partnerproteine und erschwert oder verhindert deren Detektion sowie Quantifizierung.

Der geringe Anteil der Transkriptionsfaktoren an dem Gesamtproteingehalt einer Zelle erfordert das Einsetzen sehr hoher Zellmengen. Für die vorgestellten Immunpräzipitationen wurden bereits bis zu $3 \cdot 10^7$ Zellen lysiert und für die Präzipitation und Kontrolle verwendet, um für die Immunpräzipitation genug Ausgangsmaterial zu bieten. Allerdings führt der Einsatz hoher Proteinkonzentrationen zu einer Zunahme von unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen (Bonifacino et al. 2001).

Da hier auch die verfügbare Menge an primären Zellen begrenzt ist, wurde der Pull-down über Polyhistidin markierte Bait-Proteine als Alternative zu den Immunpräzipitationen zur Massenspektrometer unterstützten Identifizierung von Interaktionspartnern gewählt. Im Gegensatz zur Immunpräzipitation unterliegt der Pulldown nicht den genannten Limitierungen.

4.5.2 LC-MS/MS Analyse Pulldown-isolierter Proteine

Die massenspektrometrischen Analysen der Pulldowns von SOX9 und RUNX2 spiegeln das Bild in den Western Blot Untersuchungen wieder. Als überexprimierte Bait-Proteine waren diese in den Counts besonders häufig vertreten. Daher überrascht es nicht, dass diese mit ihren hohen logFC-Werten von 7,7 für SOX9 und 6,2 für RUNX2 nicht nur die Liste anführen sondern auch reichlich in den Analysen – und damit in den Pulldowns vorkamen. Damit wird deutlich, dass – im Gegensatz zur Immunpräzipitation – für die Isolation von Prey-Proteinen ausreichend Bait-Proteine produziert sowie eingesetzt wurden und per Pulldown aufgereinigt werden konnten.

Proteine des Zytoskeletts wie Aktin und Myosin oder Kontaminanten wie Keratin waren in den Analysen der Immunpräzipitationen für einen erheblichen Teil der gemessenen Counts verantwortlich. Dieser Anteil konnte zwar durch Berechnung des logFC erheblich herausgefiltert werden, jedoch bestand weiterhin das Risiko falschpositiver Ergebnisse aufgrund unspezifischer Bindungen. Beim Pulldown waren Proteine des Zytoskeletts und typische Kontaminanten weiterhin vertreten, jedoch mit einem erheblich geringeren Anteil an den gesamten Counts. Das Risiko falschpositiver Ergebnisse war demnach geringer. Zudem wurden die Pulldowns in drei technischen Replikaten angefertigt. Zusätzlich wurden die Proben in der LC-MS/MS in zwei weiteren technischen Replikaten analysiert.

Durch bioinformatische Analysen, gestützt durch statistische Tests, wurde die Zahl der potentiellen Bindungspartner drastisch reduziert. Dabei kam ein biologischer und ein Varianzfilter zum Einsatz. Mit dem biologischen Filter wurden Proteine ausgeschlossen, die in den Kontrollen häufiger vorkamen als in den Pulldowns. Die Kontrollen wurden mit den selben magnetischen Beads angefertigt wie die Pulldowns. Allerdings wurden

die Beads mit einem HEK293T-Lysat inkubiert, das keine Polyhistidin markierten Bait-Proteine enthielt. Proteine, die eine höhere Bindung zu der Matrix aufweisen als zu den Bait-Proteinen, deuten eindeutig auf Kontaminanten hin (Fischer et al. 2014) und wurden von den Datensätzen ausgeschlossen. Der Varianzfilter basiert auf der Hypothese, dass sich interagierende Proteine in der Bait-Gruppe anreichern und zu höheren Counts als in der Kontrollgruppe führen (Fischer et al. 2014). Dies resultiert bei interagierenden Proteinen in einer höheren Varianz zwischen den beiden Gruppen. Mit dem Varianzfilter wurden alle Proteine ausgeschlossen, die mit einer geringen Varianz der Counts zwischen Proben und Kontrollen erschienen.

4.6 Kandidaten

Die Auftrennung von komplexen Proteingemischen und die Analyse mittels Massenspektrometrie ist mittlerweile soweit ausgereift, dass Methoden wie die LC-MS/MS-Analyse mit einer sehr hohen Sensitivität Proteine zu identifizieren vermögen. Dies ist einerseits wünschenswert da sie die Identifizierung von spezifischen Proteinen ermöglicht, die in nur sehr geringen Mengen in der Zelle vorkommen, andererseits treibt sie auch die Zahl der identifizierten Proteine deutlich in die Höhe. Dies ist gerade bei unspezifischen Proteinen oder solchen, die mit den spezifischen Bait-Prey-Komplexen interagieren der Fall. Mithilfe der bioinformatischen Analysen und statistischen Tests der Pulldowns konnten die rund 3448 Proteincluster für SOX9 und die 3537 für RUNX2 auf wenige hundert Proteincluster reduziert werden, die eine hohe statistische Signifikanz aufweisen sowie häufiger in den Proben gemessen wurden und dadurch hohe logFC-Werte besitzen. Je höher der logFC ist, desto höher ist die Spezifität der möglichen Protein-Protein-Interaktion. Allerdings müssen die identifizierten Proteine nicht zwangsläufig auch *in vivo* miteinander interagieren. Durch die Zellyse werden die membranumschlossenen Kompartimente mit beschädigt und ihr Inhalt freigesetzt. Dadurch können Proteine miteinander in Berührung kommen, die sonst räumlich voneinander getrennt sind. Auch die Pufferbedingungen können Interaktionen begünstigen, die unter physiologischen Bedingungen nicht stattfinden können (Phizicky und Fields 1995).

Daher wurden in dieser Arbeit die nachfolgenden Kandidaten, basierend auf ihrem logFC und Berücksichtigung ihrer vielfältigen Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen ausgewählt und zunächst in CPCs überexprimiert bzw. durch RNAi herabreguliert, um ihren Einfluss auf die Expression von RUNX2 und SOX9 zu untersuchen. Anschließend sollten per Co-Immunpräzipitation die Protein-Protein-Interaktion *in vitro* untersucht werden.

4.6.1 Knockdown potentieller Coregulatoren von RUNX2

Ausgehend von dem Knockdown von SOX9 und der Hochregulation osteogener Faktoren wurden durch die Immunpräzipitation oder Pulldown von RUNX2 Aktivatoren der Osteogenese isoliert. Um die Funktion dieser Faktoren zu überprüfen, wurden diese durch siRNA inhibiert und die Auswirkungen auf die Expression von SOX9 und RUNX2 überprüft. Durch den Knockdown wurde eine Herabregulation der Genexpression von RUNX2 und eine Hochregulation von SOX9 erwartet.

Tabelle 4.1: Übersicht von Proteinen mit einer LEM-Domäne

Symbol	Empfohlener Name	Synonym
LEMD1	LEM domain containing 1	cancer/testis antigen 50, CT50, LEMP-1
LEMD2	LEM domain containing 2	dJ482C21.1, NET25
LEMD3	LEM domain containing 3	MAN1
TMPO	thymopoietin	LEM domain containing 4 (LEMD4), TP, LAP2 (<i>Mus musculus</i>)
EMD	emerin	LEM domain containing 5 (LEMD5), STA

Für die Knockdown-Experimente wurden LEMD2 und TMPO ausgewählt. Beide Proteine sind nicht miteinander verwandte Proteine der inneren Membran des Zellkerns und zeichnen sich durch eine LEM-Domäne aus. Die LEM-Domäne ist ein Motif, das von einer Gruppe von (z. T. integralen) Lamin-interagierenden Proteinen der inneren Membran der Kernhülle geteilt wird (Lin et al. 2000). Über diese Domäne findet die Interaktion mit DNA-Überbrückungsproteinen der *barrier-to-autointegration factor* (BAF)-Familie statt (Cai et al. 2001), wodurch eine Verbindung zwischen der inneren Seite der inneren Membran des Zellkerns und des Chromatins geschaffen wird. Dieser Verbindung werden wichtige Rollen bei der Regulation der Kernfunktion und Organization des Chromatins zugeschrieben (Furukawa et al. 2003).

Zu den Proteinen mit einer *lamina-associated polypeptide 2/thymopoietin, emerin, MAN1* (LEM)-Domäne gehören beim Menschen LEMD2, LEMD3, LEMD4/ TMPO und LEMD5/Emerin (Letunic et al. 2015). Tabelle 4.1 bietet eine Übersicht bekannter humaner Proteine mit einer LEM-Domäne. Die Verbindung von Mutationen in Emerin und den nuklearen Laminen mit Muskel- und Lipodystrophie wirft neue Fragen über die Funktion von Proteinen der inneren Kernhülle auf (Holmer und Worman 2001). Proteine mit einer LEM-Domäne sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehört die DNA-Replikation, die Kontrolle des Zellzyklus, die Organisation des Chromatins sowie Assemblierung des Zellkerns, Regulation der Genexpression und die Signaltransduktion (Wagner und Krohne 2007).

Im folgenden werden die beiden Proteine LEMD2 und LEMD4/TMPO getrennt voneinander diskutiert.

LEMD2 LEMD2 ist ein konserviertes transmembranes Protein, das ubiquitär exprimiert wird und strukturelle Ähnlichkeiten zu MAN1 aufweist (Brachner et al. 2005). Untersuchungen in der Differenzierung von Myoblasten zeigen, dass der siRNA-vermittelte Knockdown von LEMD2 (NET25) zu einer erhöhten Aktivität von *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) und *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) führt und als ein Repressor der MAPK/ERK-Signalkaskade dient (Huber et al. 2009). Die MAPK-Signalkaskade wird u. a. durch BMP stimuliert und verhindert den proteosomalen Abbau von SOX9 durch Inhibition der Wnt-7a/ β -Catenin Signaltransduktion (Jin et al. 2006).

Um den Einfluss von LEMD2 in CPCs zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit LEMD2 durch siRNA herabreguliert und die Expression der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 sowie der Matrixproteine COL1A1 und ACAN per RT-qPCR untersucht. Dabei konnte eine deutliche Zunahme der Genexpression von SOX9 festgestellt werden. Mögli-

cherweise führte der Knockdown von LEMD2 ebenfalls zu einer Stimulation der MAPK-Signalkaskade und damit zu einer Hochregulation der Genexpression von SOX9. Dieser Pathway ist bereits für die Hochregulation von SOX9 durch FGF-Stimulation bekannt (Murakami et al. 2000). Mit der Genexpression von SOX9 stieg auch die Expression von ACAN an. Interessanterweise führte der Knockdown von LEMD2 zu einer verminderten Expression von COL1A1, obwohl die Expression von RUNX2 gegenüber der Kontrolle unverändert blieb. LEMD2 könnte auch in CPCs als ein Repressor der MAPK/ERK-Signalkaskade funktionieren. Durch den Knockdown von LEMD2 könnten die CPCs weniger sensibel für die Inhibition von SOX9 durch den Wnt-7a/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg geworden sein. Um dies zu überprüfen könnten LEMD2-Knockdownzellen mit BMP2 stimuliert und die Auswirkungen auf die Regulation von SOX9 sowie des Wnt-7a/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges weiter untersucht werden. Möglicherweise besteht hier ein Ansatz für eine Kombinationstherapie, bei der LEMD2 inhibiert und die Stimulation von SOX9 durch BMP2 zusätzlich gefördert wird.

TMPO Thymopoietin (TP) wurde ursprünglich als ein 49 Aminosäure langes und 5 kDa großes Protein aus dem bovinen Thymus isoliert, das stimulierend auf die Differenzierung und Funktion von T-Zellen wirkt (Goldstein 1974). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass dieses Protein artifiziellen Ursprungs ist und durch die Isolierungsschritte erzeugt wird (Dechat et al. 2000). Durch alternatives Spleißen vom Gen TMPO werden drei Isotypen mit 75 kDa (alpha), 51 kDa (beta) und 39 kDa (gamma) gebildet. Diese besitzen einen identischen N-Terminus, unterscheiden sich jedoch durch verschiedene C-terminale Domänen (Harris et al. 1994). TMPO alpha (LAP2A) ist diffus im Zellkern verteilt während TMPO beta/gamma (LAP2B) mit der inneren Kernmembran assoziiert sind (Dechat et al. 2000). TMPO beta ist das humane Homolog zu dem Mausprotein *lamina-associated polypeptide 2* (LAP2), das an der Namensgebung der LEM-Domäne beteiligt ist (Weber et al. 1999). Für den Knockdown von TMPO wurden nur siRNAs verwendet, die die TMPO-Isoformen beta und gamma erkennen. Der Knockdown von TMPO konnte dabei deutlich vermindert werden. Im Gegensatz zum Knockdown von LEMD2 führte der Knockdown von TMPO zu einer Hochregulation von SOX9 bei gleichzeitiger Verringerung der Genexpression von RUNX2 und vor allem COL1A1. Die Änderung der Genexpression von ACAN war zwar erhöht aber nicht signifikant. Der Einfluss von TMPO auf SOX9 und den Wnt-7a/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg ist nicht erforscht. Aufgrund der gemeinsamen LEM-Domäne könnte auch TMPO wie LEMD2 in diesem wichtigen Signaltransduktionsweg beteiligt sein. Gerade die Hochregulation von SOX9 stellt ein interessantes Ergebnis dar, dessen Einfluss auf die Genexpression von COL2A1 und weiteren Matrixkomponenten in diesen Knockdown-Zellen untersucht werden sollte.

4.6.2 Überexpression potentieller Coregulatoren von SOX9

HSPA8 Das Hitzeschockprotein *heat shock 70 kDa protein 8* (HSPA8) wurde in den ersten Pulldown-Versuchen von SOX9 als ein hochreguliertes Protein identifiziert. Eine direkte Interaktion zwischen HSPA8 mit SOX9 oder RUNX2 wurde bisher nicht beschrieben. Aufgrund seiner Verbindung zum Smad-Signalweg wurde HSPA8 überexprimiert und die Auswirkungen auf SOX9 und RUNX2 im Western Blot untersucht. Die Überexpression von HSPA8 führte zu einer Hochregulation von SOX9, aber auch von RUNX2.

Das Gen *HSPA8* kodiert für ein Mitglied der HSP70-Hitzeschockproteine. Die Hitzeschockproteine werden nach ihrem Molekulargewicht in Familien zusammengefasst, aus der sich auch ihr Familienname herleitet. Entsprechend den Richtlinien für humane Gene (Wain et al. 2002) wird diese Familie inzwischen als HSPA-Hitzeschockproteine neu bezeichnet. Die Familien der Hitzeschockproteine sind untereinander weder genetisch noch funktionell verwandt, während sie innerhalb der Familie sehr homolog sind. Aufgrund der lange währenden inkonsistenten Nomenklatur existieren für die einzelnen Mitglieder viele Synonyme (Kampinga et al. 2009). So findet sich *HSPA8* auch unter den Synonymen *HSC70*, *HSC71* oder *HSP73* (Gray et al. 2013). Diese Familie enthält sowohl Hitze induzierbare als auch konstitutiv exprimierte Mitglieder, wobei *HSPA8* zu letzteren gehört (Kampinga et al. 2009). Hitzeschockproteine wie *HSPA8* werden aufgrund dessen abgrenzend auch als Hitzeschock-ähnliche Proteine bezeichnet. Funktionell sind es Chaperone und helfen als solche bei der Faltung von Proteinen während der Proteinbiosynthese. Es wurde aber auch der Einfluss auf die Transkription beschrieben. Beispielsweise funktioniert *HSPA8* als Repressor bei der Aktivierung der Transkription durch den Smad-Signalweg in dem es *Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1* (CITED1) bindet und die Interaktion mit den transkriptionellen Coaktivatoren CREBBP/p300 sowie den Smad-Proteinen stört (Yahata et al. 2000). Die transkriptionelle Aktivität von SOX9 ist ebenso wie *HSPA8* mit CREBBP/p300 sowie dem Smad-Signalweg verbunden (Tsuda et al. 2003, Pan et al. 2008).

Der Smad-Signalweg wird von Liganden der TGF- β Familie von Wachstumsfaktoren stimuliert – zu denen auch BMP gehört. Diese aktivieren die Transkription einer Vielzahl von Faktoren, die mit Entwicklungsprozessen, zellulärer Proliferation, Apoptose, Differenzierung sowie Migration verbunden sind (Schmierer und Hill 2007, Horbelt et al. 2012). Darunter fällt auch die Aktivität von SOX9 und RUNX2 während der Chondrogenese. Beispielsweise sorgt BMP in der frühen Phase der Chondrogenese – genauer, während der Kondensation undifferenzierter mesenchymaler Zellen – für die Aufrechterhaltung einer positiven Rückkopplung zwischen SOX9 und *NK3 homeobox 2* (NKX3-2); einem Repressor von RUNX2, das auch unter dem Synonym *Bapx1* bekannt ist, wodurch die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten verhindert wird und die Chondrozyten länger erhalten bleiben (Kawato et al. 2011, Yamashita et al. 2009).

LASP1 LASP1 ist ein 261 Aminosäure-langes Protein, das über eine N-terminale LIM- und eine C-terminale *Src-homology 3* (SH3)-Domäne sowie zwei zentrale Aktinbinde-Domänen verfügt und eine neue Unterfamilie von LIM-Proteinen definiert (Tomasetto et al. 1995a). Das LIM-Motif wurde als erstes in den Homeodomäne-enthaltenden Proteinen *Lin-11*, *Isl-1* sowie *Mec-3* identifiziert. Die LIM-Domäne setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Zinkfingerdomänen zusammen, die durch einen Linker aus zwei hydrophoben Aminosäureresten verbunden sind und Proteine mit Tyrosin-Resten binden (Michelsen et al. 1993). Die LIM-Domäne findet sich in vielen Schlüsselregulatoren verschiedener Entwicklungsprozesse wieder (Letunic et al. 2015). SH3-Domänen binden Proteine mit Sequenzen aus Prolin- sowie anderen hydrophoben Aminosäureresten (PXXP) und wirken bei vielen biologischen Prozessen, angefangen bei der Regulation von Enzymen, Erhöhung der lokalen Konzentration oder Änderung der subzellulären Lokalisation von Komponenten der Signalwege sowie der Assemblierung von großen Multiproteinkomplexen (Mayer 2001).

LASP1 ist ein Protein, das zwischen dem Zellkern und dem Zytosol pendelt und in Migration, Adhäsion, Proliferation und dem Zellzyklus von vielen Krebszellen involviert ist (Grunewald und Butt 2008). Ursprünglich wurde LASP1 als ein hochreguliertes Protein in humanen metastatischen Lymphknoten bei Brustkrebs identifiziert (Tomasetto et al. 1995b). Spätere Untersuchungen zeigten eine homogene Verteilung von LASP1 im Zytoplasma aber auch eine Kolo-kalisation mit Aktin und insbesondere der Akkumulation an Ausläufern der Zellmembran bei malignen Zellen, das eine Beteiligung an der Zellmigration nahe legte (Schreiber et al. 1998). Durch den Knockdown von LASP1 in einer metastatischen Brustkrebszelllinie konnte die Inhibition der Proliferation und Migration auch gezeigt werden (Grunewald et al. 2006). Neuste Untersuchungen identifizierten phosphoryliertes pLASP1^{T171} im Zellkern und identifizierten eine Kernexportsequenz (NES). Es wird die Funktion eines Signalproteins diskutiert, das die Weiterleitung von Signalen zwischen Zellmembran und Zellkern vermittelt, wodurch eine Adhäsion stimulierte Veränderung der Genexpression möglich wird (Mihlan et al. 2013).

Obwohl LASP1 in allen Geweben exprimiert wird (Schreiber et al. 1998) konzentrierte sich die bisherige Forschung nur auf die Rolle von LASP1 in Tumorzellen, insbesondere was die Zellmigration angeht. Das Vorkommen von LASP1 wurde im Muskel-Skelett-System oder gar im Kontext der Osteochondrogenese, mit einer Ausnahme, nicht erforscht. Es gibt eine Publikation, in der LASP1 in dem Kontext untersucht wurde. Hermann-Kleiter et al. (2009) beschreiben, dass bei der Integration eines Reportergenkonstrukts, bestehend aus dem *Colla1*-Promotor und dem *lacZ*-Reporter-Gen, eine transgene Maus (*wavy tail* Tg(Coll1a1-lacZ)304ng) mit einem deformierten Skelettsystem erzeugt wurde (Hermann-Kleiter et al. 2009). Untersuchungen der Insertionsstelle identifizierten *LASP1* als das einzige betroffene Gen. Die Integration hatte eine Deregulation der Genexpression von LASP1 zur Folge, die mit einer Deregulation der Chondrogenese während der Skelettentwicklung zusammenhängt. Das Ergebnis ist eine deformierte Wirbelsäule aufgrund unzureichend ausgebildeter Bandscheiben.

Interessanterweise wurde LASP1, zusammen mit Zyxin, in der Immunpräzipitation von SOX9 mit einem der höchsten logFC-Werten identifiziert. Zyxin ist ein Protein, das mit LASP1 interagiert und an der Zellmigration und Proliferation beteiligt ist (Li et al. 2004, Grunewald et al. 2006). Die Überexpression von LASP1 führte allerdings nicht zu einer erhöhten Genexpression von SOX9. Stattdessen wurde im Western Blot ein leichter Anstieg von RUNX2 festgestellt. Aufgrund dieser Befunde ist davon auszugehen, dass LASP1 zumindest in CPCs keine bedeutende Rolle einnimmt.

RAB5C In der Immunpräzipitation von SOX9 wurden 12 verschiedene Rab-GTPasen identifiziert. Dabei wies RAB5C den höchsten logFC auf. Interessanterweise wurden in der Immunpräzipitation von RUNX2 kaum Rab-GTPasen identifiziert. Generell waren hier die wenigen identifizierten Rab-GTPasen häufiger in der Kontrolle als in dem Immunpräzipitat von RUNX2 vorhanden. Dies könnte ein Hinweis für eine direkte oder indirekte Interaktion von Rab-GTPasen mit SOX9 sein.

Member RAS Oncogene Family ist ein 23,3 kDa großes Protein der Rab Protein Familie, das von dem Gen *RAB5C* kodiert wird (Han et al. 1996). Die Rab Proteine gehören neben Ras, Rho, Ran und Arf zur Ras Superfamilie von kleinen GTPasen, die als Modulatoren von komplexen und vielfältigen zellulären Prozessen dienen (Wennerberg et al. 2005). In der Erstbeschreibung wurden die Rab Proteine als *Ras-related proteins in*

brain (Rab) bezeichnet. In Anlehnung an die Erstbeschreibung wird RAB5C häufig unter der Bezeichnung *Ras-related protein Rab-5C* aufgeführt.

Die Rab GTPasen sind Schlüsselelemente des intrazellulären Vesikeltransports. Sie ermöglichen die Bildung sowie die Abschnürung von Vesikeln und stellen das Andocken sowie die Fusionierung mit den richtigen Zielkompartimenten sicher (Zerial und McBride 2001). Dadurch regulieren die Rab GTPasen den Lipid- sowie den Proteinaustausch zwischen den verschiedenen Organellen des endozytotischen und sekretorischen Weges. Die kleinen GTPasen kommen in zwei Formen vor und entfalten ihre Wirkung als „molekulare Schalter“ durch das alternierende Binden von GTP und GDP. In der inaktiven Form liegen sie GDP-gebunden vor. Das Protein *Guanine nucleotide exchange factor* (GEF) katalysiert den Austausch von GDP gegen GTP, wodurch eine Transition in die aktive Form stattfindet. Diese wird von verschiedenen Effektor-Proteinen wahrgenommen. Mithilfe des *GTPase activating proteins* (GAP) wird die Hydrolyseaktivität der GTPase stimuliert wodurch das Protein unter Freisetzung eines anorganischen Phosphats (P_i) wieder in die GDP-gebundene – und damit inaktive Form überführt wird (Stenmark 2009).

Aktivierte Rab GTPasen regulieren über ihre Effektoren die Bildung von Vesikeln, den aktin- und tubulinabhängigen Vesikeltransport sowie die Fusionierung mit der Zielmembran (Stenmark und Olkkonen 2001). RAB5C kommt an der Plasmamembran der Zelle, Clathrin-umhüllten Vesikeln sowie frühen Endosomen vor und ist für deren Fusionierung verantwortlich. Zu den Effektoren gehören EEA1, Rabaptin-5/5 β , Rabex-5, Rabenosyn-5, INPP5B, OCRL1, PI3 kinases (hVPS34-p150, p110 β -p85 α), Rabankyrin-5, APPL1, APPL2, Huntingtin-HAP40, caveolin-1, angiotensin II type 1A receptor und Rabip4' (für ein ausführliches Review siehe Hutagalung und Novick 2011).

Die direkte Interaktion von Rab-Proteinen mit Transkriptionsfaktoren, wie z. B. SOX9 oder RUNX2, wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch finden sich Hinweise über die Beteiligung von Rab-Proteinen an Signalkaskaden und Entwicklungsprozessen. Zum Beispiel ist Rab23 ein Antagonist der *Sonic hedgehog* Signalkaskade und wirkt bei der dorsoventralen Entwicklung des Rückenmarks der Maus (Eggenchwiler et al. 2001). In *Xenopus* ist XRab40 essentiell für die Gastrulation. XRab40 ist dabei an der Bildung eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes beteiligt und wirkt regulatorisch auf die nicht-kanonische Wnt-Signalkaskade in dem es die Lokalisation des Schlüsselproteins *Dishevelled* (Dsh) steuert (Lee et al. 2007). In ATDC5 Chondroprogenitorzellen der Maus wurde Rab23 mit der *Indian hedgehog* Signalkaskade und der Chondrogenese in Verbindung gebracht (Yang et al. 2008). Der siRNA vermittelte Knockdown von Rab23 führte dabei zu einer Inhibition der Transkription von Gli1, einem Effektor der *Indian hedgehog* Signalkaskade, und SOX9. Die Beteiligung von Rab-Proteinen an den Hedgehog Signalkaskaden ist bemerkenswert, zu mal diese die Chondrogenese und die Osteogenese miteinander verbinden (Chung et al. 2001). Da verschiedene Rab-Proteine sowohl in der Immunpräzipitation als auch in dem Pulldown von SOX9 vorkamen und die Überexpression von RAB5C zu einer Zunahme der Genexpression von SOX9 führte, könnte nicht nur ein weiterer Hinweis für die Verknüpfung zwischen Zellentwicklung und den Vesikeltransport sein, sondern auch potentielle Ziele für therapeutische Maßnahmen darstellen.

YWHAE Das Gen YWHAE kodiert für das Protein 14-3-3 ϵ , ein Genprodukt der 14-3-3 Familie von Proteinen. Die Mitglieder dieser Familie sind sehr homolog und werden von verschiedenen Genen kodiert. Die einzelnen Isoformen werden mit griechischen Buchstaben (β/α , γ , ϵ , η , σ , τ , ζ/δ) bezeichnet (Yaffe et al. 1997). Die Genprodukte sind konservierte regulatorische Moleküle, die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert werden und an der Kontrolle des Zellzyklus sowie der Apoptose beteiligt sind (Fu et al. 2000). Die 14-3-3 Proteine bilden Hetero- oder Homodimere und binden Liganden mit phosphorylierten Serin- sowie Threoninresten und integrieren die Informationen verschiedener Signalkaskaden, an denen Proteinkinasen beteiligt sind (Gardino und Yaffe 2011). Darunter befinden sich Transkriptionsfaktoren, metabolische Enzyme, Proteine des Zytoskeletts, Kinasen und Phosphatasen (Yaffe 2002, Dougherty und Morrison 2004). Aufgrund der vielen verschiedenen Isoformen, ihren diversen Interaktionen und ihrer ubiquitären Verbreitung werden sie als potentielle Ziele medikamentöser Therapien von Erkrankungen diskutiert, die mit einer übermäßigen Zellproliferation, wie Krebs, oder Erkrankungen, die durch übermäßige Entzündungen und Apoptose bedingt sind, einschließlich degenerativer Erkrankungen, die mit dem Alter einher gehen (Gardino und Yaffe 2011).

Mit Ausnahme von 14-3-3 σ wurden alle 14-3-3 Proteine in der Immunpräzipitation von SOX9, jedoch nicht in der Immunpräzipitation von RUNX2, identifiziert. Auch in den ersten Analysen der Pulldowns von SOX9 konnten 14-3-3 Proteine identifiziert werden. Unter diesen war 14-3-3 ϵ am intensivsten. Aufgrund der weitreichenden Interaktionen dieser Proteine, wurde 14-3-3 ϵ in CPCs überexprimiert. Mit der Überexpression konnte das Gleichgewicht zwischen SOX9 und RUNX2 deutlich zu Gunsten von SOX9 verschoben werden. Während sich die Expression von SOX9 auf das 2,5-Fache erhöhte, sank die Expression von RUNX2 um annähernd ein Drittel.

Eine mögliche Interaktion zwischen SOX9 und 14-3-3 ϵ wurde bisher nicht beschrieben. In der BioGRID-Datenbank (Stark et al. 2006) fanden sich ebenso wenig Hinweise über eine direkte Interaktion. Jedoch wurden in transgenen Mäusen mit der Alzheimer-Krankheit eine Überexpression von SOX9 und 14-3-3 ϵ festgestellt (Gatta et al. 2014). Daneben könnte auch *histone deacetylase 4* (HDAC4) als ein Bindeglied fungieren, da diese sowohl mit SOX9 als auch mit 14-3-3 ϵ interagiert (Wang et al. 2000).

DDX5 *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5* (DDX5), vormals unter dem Synonym *p68* bekannt, ist eine ATP-abhängige RNA Helikase. Die RNA Helikasen bilden eine große Superfamilie von Proteinen, die von Bakterien und Viren bis zum Menschen konserviert sind (Tanner und Linder 2001). Basierend auf der Sequenz ihrer Helikasedomäne, werden diese in verschiedene Familien unterschieden. Sie sind an Transkription, RNA-Editing, Splicing, Ribosomen-Biogenese, RNA-Export, Translation und an RNA-Umsatz beteiligt (Abdelhaleem 2005). *DDX5* gehört zur *DDX*-Genfamilie. Diese wurde nach dem konserviertem Motif *Asp-Glu-Ala-Asp* (DEAD-box) ihrer Mitglieder benannt. Funktionell wurde die Mehrzahl der DEAD-box Mitglieder mit der Ribosomen-Biogenese und der Initiation der Translation in Verbindung gebracht (Abdelhaleem et al. 2003). Verschiedene Studien deuten auf eine Beteiligung von *DDX5* an der Differenzierung hin. Beispielsweise ist die Expression von *Ddx5* mit dem Beginn der Organentwicklung in der Maus verbunden (Stevenson et al. 1998). In Untersuchungen der männlichen Keimzellen wurde ebenso eine starke Expression festgestellt (Lemaire und Heinlein 1993). Die genaue Rolle von *DDX5* wurde noch nicht bestimmt. Untersuchungen deu-

ten auf eine wichtige Funktion während der Assemblierung des Spliceosoms hin (Liu 2002). In anderen Untersuchungen ist DDX5 an der Regulation der Transkription beteiligt. Beispielsweise kolokalisiert DDX5 mit dem transkriptionellen Coaktivator p300 und co-präzipitiert mit dem paralogen CREBBP; das vormals unter den Synonymen *CBP*, *KAT3A* oder *RTS* aufgeführt ist. Zusätzlich deuten *in vitro* Untersuchungen auf die Existenz eines Multiproteinkomplexes hin in dem DDX5, CBP/p300 sowie die RNA Pol II synergetisch wirken und die Genexpression steuern (Rossow und Janknecht 2003).

In Untersuchungen der osteogenen Differenzierung wurde DDX5 als Coregulator von RUNX2 identifiziert und die Interaktion durch Co-Immunpräzipitation bestätigt (Jensen et al. 2008). Weitere Untersuchungen zu DDX5 in der osteogenen oder gar in der chondrogenen Differenzierung wurden bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurde DDX5 in dem Pulldown von RUNX2 identifiziert und konnte interessanterweise auch in dem Pulldown von SOX9 identifiziert werden.

Um eine Beteiligung von DDX5 an dem regulatorischen Netzwerk von SOX9 und RUNX2 zu überprüfen wurde DDX5 überexprimiert und der Einfluss auf die Expression von SOX9 und RUNX2 in CPCs untersucht. Dabei konnte ein deutlicher Anstieg der Genexpression von SOX9 auf Proteinebene festgestellt werden. Dieser Anstieg deutet auf eine mögliche Beteiligung von DDX5 an dem regulatorischen Netzwerk von SOX9 und RUNX2 hin. Allerdings wirkte sich die Überexpression nicht auf RUNX2 aus. Es konnte keine Inhibition der Genexpression von RUNX2 durch die Überexpression von DDX5 beobachtet werden.

Um zu prüfen, ob SOX9 und DDX5 überhaupt miteinander interagieren, wurde eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde SOX9 mit einem His-Tag und DDX5 mit einem DDK-Tag (DDK ist der selbe Tag wie FLAG[®]) in HEK293T-Zellen exprimiert und mit entsprechenden Antikörpern präzipitiert. In dem Präzipitat von DDX5 wurde SOX9 identifiziert, allerdings war die umgekehrte Immunpräzipitation, d. h. die Immunpräzipitation von SOX9 und der Nachweis von DDX5, nicht erfolgreich. Da SOX9 ebenfalls in der umgekehrten Immunpräzipitation nicht identifiziert werden konnte, kann von einer nicht funktionierenden Immunpräzipitation ausgegangen werden. Ein erneuter Versuch blieb hier ebenfalls erfolglos. Für die Immunpräzipitation von SOX9 wurde derselbe Antikörper benutzt, mit der vorherige Präzipitationen erfolgreich verliefen. Möglicherweise war das Epitop des verwendeten Antikörpers durch bestimmte Proteine maskiert, wodurch die Präzipitation verhindert wurde. Ob SOX9 und DDX5 miteinander interagieren, kann daher weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden. Zumindest deutet die Co-Präzipitation von DDX5 auf eine physiologische Interaktion beider Proteine, zu mal sich auch die Überexpression in CPCs positiv auf die Expression von SOX9 auswirkte.

Daneben ist DDX5 an der mesenchymalen Transition von Epithelzellen beteiligt; ein unerlässlicher Prozess für die Morphogenese während der Embryonalentwicklung und Remodelierung von Geweben (Kalluri und Neilson 2003, Savagner 2001). Unter der Stimulation von *platelet-derived growth factor* (PDGF) wurde die Beteiligung von DDX5 an einem Wnt-unabhängigen Signalweg beschrieben, unter der die Translokation von β -Catenin und damit die mesenchymale Transition von Epithelzellen gefördert wird (Yang et al. 2006).

4.7 Fazit und Ausblick

Mithilfe der affinitätschromatographischen Aufreinigung von SOX9 sowie RUNX2 konnten mögliche Interaktionspartner durch massenspektrometrische Analysen der isolierten Proteinkomplexe identifiziert werden. Dabei konnte die geringe Zahl an immunpräzipitierbarem SOX9 bzw. RUNX2 durch die Überexpression und den Pulldown überwunden werden. Durch Überexpression und Knockdown einiger Kandidaten konnte die Expression von SOX9 stimuliert und die von RUNX2 teilweise inhibiert werden. Inwieweit die Änderung der Genexpression von SOX9 oder RUNX2 sich auf das chondrogene Potential der CPCs auswirkt muss noch geklärt werden. Bereits eine geringfügige Änderung der Genexpression könnte sich auf die Synthesekapazität der extrazellulären Matrix auswirken. Die bisherigen Untersuchungen wurden in 2D-Zellkulturen durchgeführt, bei der die Syntheseaktivität der CPCs geringer als in 3D-Zellkulturen ist. Daher ist die Untersuchung der Syntheseaktivität von Kollagenen und Proteoglykanen transfizierter CPCs in 3D-Zellkultur nötig. Darüber hinaus ist es erforderlich die Art der Interaktion zu untersuchen. Mithilfe von Copräzipitationen, Pulldown Assays oder mit dem Yeast-Two-Hybrid System könnte die Frage geklärt werden, ob SOX9 oder RUNX2 direkt mit den Kandidaten interagieren, oder ob diese Teil übergeordneter Proteinkomplexe sind.

Zusammenfassung

Die Osteoarthritis ist eine degenerative Erkrankung der Gelenke. Sie zeichnet sich durch eine sukzessive Destruktion des Knorpels sowie der umliegenden Strukturen aus. Die Osteoarthritis ist die häufigste Gelenkerkrankung des Menschen und tritt insbesondere im hohen Lebensalter auf. Schätzungen zu Folge wird Osteoarthritis im Jahr 2020 zu der viert häufigsten Ursache für Erwerbsunfähigkeit aufsteigen. Neben dem Leidensdruck für den Patienten ist dies auch mit erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden.

Die natürliche Regeneration des avaskulären hyalinen Knorpels ist aufgrund der geringen Zelldichte und dem niedrigen Metabolismus der Zellen beschränkt. Es fehlt ein Perichondrium das den Knorpel stabilisiert und mit undifferenzierten Mesenchymzellen, als Quelle für frische Chondroblasten bzw. Chondrozyten, versorgt. Das fibrocartilaginäre Ersatzgewebe im erkrankten artikulären Knorpel beherbergt eine Population von Vorläuferzellen mit chondrogenen Eigenschaften. Die Herkunft dieser Zellen ist wenig erforscht. Es wird vermutet, dass diese durch Einsprossungen von Blutgefäßen aus dem subchondralen Knochen in die beschädigten Areale migrieren. Diese chondrogenen Progenitorzellen (CPCs) könnten sich als zugänglich für medikamentöse Therapien zur Stimulation ihres Reparaturpotentials erweisen.

In dieser Arbeit sollten Coaktivatoren von dem chondrogenen Transkriptionsfaktor SOX9 oder Corepressoren von dem osteogenen Transkriptionsfaktor RUNX2 identifiziert werden. Dazu wurden CPCs verwendet, die durch siRNA-vermittelten Knockdown von RUNX2 in der Produktion von chondrogenen Faktoren stimuliert werden sollten. Auch der umgekehrte Versuch wurde durchgeführt. Durch den Knockdown von SOX9 sollten osteogene Faktoren stimuliert werden, die als Ziel inhibitorischer Therapien dienen könnten. Dabei konnte zunächst der antagonistische Zusammenhang zwischen SOX9 und RUNX2 in CPCs gezeigt werden. Der Knockdown von RUNX2 führte zu einer Hochregulation von SOX9 und damit zu einer Erhöhung des chondrogenen Potentials der Zellen. Umgekehrt führte der Knockdown von SOX9 zu einer Hochregulation von RUNX2 und damit zu einer Verringerung des chondrogenen Potentials der CPCs.

Mithilfe massenspektrometrischer Analysen konnten aus Immunpräzipitationen und Pulldown-Isolaten von SOX9 und RUNX2 eine Vielzahl von Proteinen isoliert werden, die mit Signaltransduktionen und der Transkription in Verbindung stehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der möglichen Coaktivatoren von SOX9 in CPCs überexprimiert und mögliche Corepressoren von SOX9 durch siRNA in ihrer Expression inhibiert. Die Überexpression von DDX5, HSPA8, RAB5C und YWHAE führte zu einer Zunahme der Genexpression von SOX9. Während HSPA8 auch eine Zunahme der Genexpression von RUNX2 bewirkte, führte YWHAE zu dessen Herabregulation und damit zu einer Er-

höhung des chondrogenen Potentials von CPCs. Durch den Knockdown von LEMD2 und TMPO konnte ebenfalls eine Hochregulation von SOX9 erreicht werden. Ein Anzeichen für die Erhöhung des chondrogenen Potentials bot hierbei zusätzlich die erhöhte Expression der extrazellulären Bestandteile ACAN und die verminderte Expression von COL1A1. Darüber hinaus wurde zum ersten Mal die Interaktion zwischen SOX9 und DDX5 durch Coimmunpräzipitation untersucht. SOX9 konnte dabei copräzipitiert werden allerdings war der umgekehrte und damit der validierende Versuch nicht erfolgreich und bedarf weiterer Untersuchung, z. B. mithilfe einer anderen Methode wie Yeast-Two-Hybrid, um die tatsächliche Protein-Protein-Interaktion zu bestätigen bzw. um sie auszuschließen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mithilfe der affinitätschromatographischen Aufreinigung von SOX9 sowie RUNX2 mögliche Interaktionspartner durch massenspektrometrische Analysen der isolierten Proteinkomplexe identifiziert werden können. Inwieweit diese Proteine direkt auf SOX9 einwirken oder Teil einer übergeordneten Transkriptionsmaschinerie sind muss in weiteren Studien untersucht werden, um die Frage zu beantworten, ob diese auch als potentiell Ziel für therapeutische Maßnahmen in Betracht kommen. Darüber hinaus muss die Frage geklärt werden, inwieweit sich die identifizierten Proteine auf die Expression von nachgeschalteten chondrogenen Faktoren auswirken. Diese Arbeiten könnten einen wichtigen Beitrag in der Entwicklung von neuen Therapeutika gegen Osteoarthritis leisten.

Abstract

Osteoarthritis is a degenerative disease of the joints. It is characterized by a successive destruction of the articular cartilage and surrounding structures. Osteoarthritis is the most common musculoskeletal joint disease of humans and affects in particular the elderly. According to estimates, osteoarthritis will be the fourth most common cause of disability by the year 2020. In addition to patients suffering, osteoarthritis causes substantial costs to the health system and contributes to significant economic damage.

As an avascular tissue, the natural regeneration of hyaline cartilage is limited due to the low cell density and the low metabolism of the cells. It lacks a perichondrium which could stabilize and supply chondrocytes or chondroblasts by its source of undifferentiated mesenchymal cells. The fibrocartilaginous repair tissue in diseased articular cartilage harbors a population of progenitor cells with chondrogenic properties. The origin of these cells is poorly understood. It is assumed that these cells migrate through blood vessels from the subchondral bone into the damaged areas by vascularization and breaks in the tidemark. These chondrogenic progenitor cells (CPCs) could prove to be accessible to drug therapies to stimulate their potential for regeneration attempts.

The aim of this work was to identify co-activators of the chondrogenic transcription factor SOX9 or co-repressors of the osteogenic transcription factor RUNX2. For this approach, CPCs were used, which are stimulated in the production of chondrogenic factors by siRNA-mediated knockdown of RUNX2. The reverse experiment was also carried out. Osteogenic factors, which could serve as a target of inhibitory therapies, should be stimulated by the knockdown of SOX9. At first, the antagonistic relationship between SOX9 and RUNX2 were shown in CPCs. The knockdown of RUNX2 led to an upregulation of SOX9 and thus to an increase in the chondrogenic potential of the cells. Conversely, the knockdown of SOX9 led to an up-regulation of RUNX2 and thus to a reduction in the chondrogenic potential of CPCs.

By mass spectral analysis, various proteins associated with signal transduction and transcription could be isolated from immunoprecipitation and pull-down-isolates of SOX9 and RUNX2. In this work, some of the potential co-activators of SOX9 were overexpressed and potential co-repressors of SOX9 were downregulated by siRNA in CPCs. Overexpression of DDX5, HSPA8, RAB5C and YWHAE led to an increase in the gene expression of SOX9. RUNX2 was also upregulated by the overexpression of HSPA8. In contrast, the overexpression of YWHAE downregulated RUNX2 which could have enhanced the chondrogenic potential of CPCs. The upregulation of SOX9 was also achieved by the knockdown of LEMD2 and TMPO. In this case, the expression of ACAN was upregulated while COL1A1 was downregulated. This is an indication of the increased chon-

drogenic potential of CPCs. In addition, the protein-protein interaction between SOX9 and DDX5 was for the first time examined by co-immunoprecipitation. SOX9 was able to be co-precipitated. However, the reverse experiment was unsuccessful and thus, the interaction could not be validated. Further investigations, e. g. by using another method such as yeast-two-hybrid are needed to confirm the actual protein-protein interaction.

These results show that the identification of possible cofactors by affinity chromatographic purification of SOX9 and RUNX2 can be achieved by mass spectrometric analysis of the isolated protein complexes. The extent to which these proteins act, whether directly on SOX9 or as part of an overall transcription machinery needs to be investigated in further studies to answer the question if they are suitable targets for therapeutic approaches.

Furthermore, the question needs to be clarified to what extent the identified proteins affect the expression of downstream chondrogenic factors. This work may be relevant to the development of new agents and strategies in osteoarthritis relevant therapies.

Literaturverzeichnis

- Abdelhaleem M (2005): RNA helicases: regulators of differentiation. *Clin Biochem* 38:499–503.
- Abdelhaleem M, Maltais L, Wain H (2003): The human {DDX} and {DHX} gene families of putative {RNA} helicases. *Genomics* 81:618 – 622.
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002): The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16:2813–2828.
- Akiyama H, Kamitani T, Yang X, Kandyil R, Bridgewater LC, Fellous M, Mori-Akiyama Y, de Crombrughe B (2005a): The transcription factor Sox9 is degraded by the ubiquitin-proteasome system and stabilized by a mutation in a ubiquitin-target site. *Matrix Biol* 23:499–505.
- Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, et al. (2005b): Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14665–14670.
- Akiyama H, Lefebvre V (2011): Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Miner Metab* 29:390–395.
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M (1986): Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29:1039–1049.
- Altman RD (1995): The classification of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 43:42–43.
- Altman RD, Hochberg MC, Moskowitz RW, J. ST (2000): Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. *Arthritis Rheum* 43:1905–1915.
- Anders S, Huber W (2010): Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106.

- Anders S, McCarthy DJ, Chen Y, Okoniewski M, Smyth GK, Huber W, Robinson MD (2013): Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat Protocols* 8:1765–1786.
- Atanassov I, Urlaub H (2013): Increased proteome coverage by combining PAGE and peptide isoelectric focusing: comparative study of gel-based separation approaches. *Proteomics* 13:2947–2955.
- Barry FP, Murphy JM (2004): Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36:568–584.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B Methodological* 57:289–300.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2009): GenBank. *Nucleic Acids Res* 37:D26–31.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B (1999): Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–89.
- Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P (2004): SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* 166:37–47.
- Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP (2010): Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 18:24–33.
- Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N (2001): The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9:654–663.
- Bonifacino JS, Dell’Angelica EC, Springer TA (2001): *Immunoprecipitation*. John Wiley & Sons, Inc.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000): Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227:239–255.
- Brachner A, Reipert S, Foisner R, Gotzmann J (2005): LEM2 is a novel MAN1-related inner nuclear membrane protein associated with A-type lamins. *J Cell Sci* 118:5797–5810.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994): Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331:889–895.
- Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ (2014): Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 28:269–286.

- Brymora A, Cousin MA, Roufogalis BD, Robinson PJ (2001): Enhanced protein recovery and reproducibility from pull-down assays and immunoprecipitations using spin columns. *Anal Biochem* 295:119–122.
- Brymora A, Valova VA, Robinson PJ (2004): Protein-protein interactions identified by pull-down experiments and mass spectrometry. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 17:Unit 17.5.
- Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47:487–504.
- Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S (2010): Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. *J Bone Joint Surg Am* 92 Suppl 2:2–11.
- Cai M, Huang Y, Ghirlando R, Wilson KL, Craigie R, Clore GM (2001): Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J* 20:4399–4407.
- Caplan AI (2005): Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11:1198–1211.
- Caplan AI (2007): Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341–347.
- Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM (1997): Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 254–269.
- Chan SSK, Kyba M (2013): What is a Master Regulator? *Journal of stem cell research therapy* 3:114.
- Chen FH, Tuan RS (2008): Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res Ther* 10:223.
- Cheng A, Genever PG (2010): SOX9 determines RUNX2 transactivity by directing intracellular degradation. *J Bone Miner Res* 25:2680–2689.
- Chung Ui, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM (2001): Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *Journal of Clinical Investigation* 107:295–304.
- Cole BJ, Farr J, Winalski CS, Hosea T, Richmond J, Mandelbaum B, De Deyne PG (2011): Outcomes after a single-stage procedure for cell-based cartilage repair: a prospective clinical safety trial with 2-year follow-up. *Am J Sports Med* 39:1170–1179.
- Cucchiari M, Madry H, Guilak F, Saris DB, Stoddart MJ, Koon Wong M, Roughley P (2014): A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 27:12–16.
- Cucchiari 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* 56:158–167.

- de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K (2001): Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13:721–727.
- Dechat T, Vlcek S, Foisner R (2000): Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol* 129:335–345.
- Desjardins P, Conklin D (2010): NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments JoVE* 2565.
- Dougherty MK, Morrison DK (2004): Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* 117:1875–1884.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747–754.
- Eggenchwiler JT, Espinoza E, Anderson KV (2001): Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* 412:194–198.
- Felson DT (2006): Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 354:841–848.
- Fenyó D (2000): Identifying the proteome: software tools. *Curr Opin Biotechnol* 11:391–395.
- Finehout EJ, Lee KH (2004): An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem Mol Biol Educ* 32:93–100.
- Fischer M, Zilkenat S, Gerlach RG, Wagner S, Renard BY (2014): Pre- and post-processing workflow for affinity purification mass spectrometry data. *J Proteome Res* 13:2239–2249.
- Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, et al. (1994): Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525–530.
- Free RB, Hazelwood LA, Sibley DR (2009): Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 5:Unit 5.28.
- Frisbie DD, Cross MW, McIlwraith CW (2006): A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19:142–146.
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000): 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617–647.

- Furukawa K, Sugiyama S, Osouda S, Goto H, Inagaki M, Horigome T, Omata S, McConnell M, Fisher PA, Nishida Y (2003): Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci* 116:3811–3823.
- Gardino AK, Yaffe MB (2011): 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Seminars in Cell Developmental Biology* 22:688 – 695.
- Gatta V, D’Aurora M, Granzotto A, Stuppia L, Sensi SL (2014): Early and sustained altered expression of aging-related genes in young 3xTg-AD mice. *Cell Death Dis* 5:e1054.
- Gobbi A, Karnatzikos G, Scotti C, Mahajan V, Mazzucco L, Grigolo B (2011): One-step cartilage repair with bone marrow aspirate concentrated cells and collagen matrix in full-thickness knee cartilage lesions results at 2-year follow-up. *Cartilage* 2:286–299.
- Goldring MB (2012): Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4:269–285.
- Goldring MB, Goldring SR (2007): Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213:626–634.
- Goldring MB, Goldring SR (2010): Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1192:230–237.
- Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97:33–44.
- Goldstein G (1974): Isolation of Bovine Thymin: a Polypeptide Hormone of the Thymus. *Nature* 247:11–14.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R (2010): A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38:W695–9.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59–74.
- Gray KA, Daugherty LC, Gordon SM, Seal RL, Wright MW, Bruford EA (2013): Genenames.org: the HGNC resources in 2013. *Nucleic Acids Res* 41:D545–52.
- Greene GW, Banquy X, Lee DW, Lowrey DD, Yu J, Israelachvili JN (2011): Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5255–5259.
- Grove JE, Bruscia E, Krause DS (2004): Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 22:487–500.
- Grunewald TG, Butt E (2008): The LIM and SH3 domain protein family: structural proteins or signal transducers or both? *Molecular Cancer* 7:31–31.
- Grunewald TGP, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M, Butt E (2006): Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells. *Exp Cell Res* 312:974–982.

- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990): A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245–250.
- Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB (2004): The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res* 17–26.
- Guth SIE, Wegner M (2008): Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci* 65:3000–3018.
- Han HJ, Sudo K, Inazawa J, Nakamura Y (1996): Isolation and mapping of a human gene (RABL) encoding a small GTP-binding protein homologous to the Ras-related RAB gene. *Cytogenet Cell Genet* 73:137–139.
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166:557–580.
- Harlow ED, Lane D (1999): *Using antibodies: a laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- Harris CA, Andryuk PJ, Cline S, Chan HK, Natarajan A, Siekierka JJ, Goldstein G (1994): Three distinct human thymopoietins are derived from alternatively spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6283–6287.
- Hattori T, Coustry F, Stephens S, Eberspaecher H, Takigawa M, Yasuda H, de Crombrughe B (2008): Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 via chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Research* 36:3011–3024.
- Hattori T, Eberspaecher H, Lu J, Zhang R, Nishida T, Kahyo T, Yasuda H, de Crombrughe B (2006): Interactions between PIAS proteins and SOX9 result in an increase in the cellular concentrations of SOX9. *J Biol Chem* 281:14417–14428.
- Haudenschild DR, Chen J, Pang N, Lotz MK, D’Lima DD (2010): Rho kinase-dependent activation of SOX9 in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 62:191–200.
- Heinegard D, Saxne T (2011): The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7:50–56.
- Hermann-Kleiter N, Ghaffari-Tabrizi N, Blumer MJF, Schwarzer C, Mazur MA, Artner I (2009): Lasp1 misexpression influences chondrocyte differentiation in the vertebral column. *Int J Dev Biol* 53:983–991.
- Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, Towheed T, Welch V, Wells G, Tugwell P (2012): American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res Hoboken* 64:465–474.
- Hodge K, Have ST, Hutton L, Lamond AI (2013): Cleaning up the masses: Exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS(). *Journal of Proteomics* 88:92–103.

- Holmer L, Worman HJ (2001): Inner nuclear membrane proteins: functions and targeting. *Cell Mol Life Sci* 58:1741–1747.
- Horbelt D, Denkis A, Knaus P (2012): A portrait of Transforming Growth Factor beta superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol* 44:469–474.
- Houard X, Goldring MB, Berenbaum F (2013): Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 15:375.
- Hsu YC, Fuchs E (2012): A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:103–114.
- Huang G, Shigesada K, Ito K, Wee HJ, Yokomizo T, Ito Y (2001): Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J* 20:723–733.
- Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrughe B (2000): Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* 20:4149–4158.
- Huber M, Trattnig S, Lintner F (2000): Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35:573–580.
- Huber MD, Guan T, Gerace L (2009): Overlapping functions of nuclear envelope proteins NET25 (Lem2) and emerin in regulation of extracellular signal-regulated kinase signaling in myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 29:5718–5728.
- Hunziker EB (2002): Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10:432–463.
- Hunziker EB (2009): The elusive path to cartilage regeneration. *Adv Mater* 21:3419–3424.
- Hutagalung AH, Novick PJ (2011): Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 91:119–149.
- Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, et al. (1999): Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn* 214:279–290.
- Ito Y (1999): Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 4:685–696.
- Jensen ED, Niu L, Caretti G, Nicol SM, Teplyuk N, Stein GS, Sartorelli V, van Wijnen AJ, Fuller-Pace FV, Westendorf JJ (2008): p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 103:1438–1451.
- Ji H (2010): Lysis of cultured cells for immunoprecipitation. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.prot5466.

- Jin EJ, Lee SY, Choi YA, Jung JC, Bang OS, Kang SS (2006): BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway. *Mol Cells* 22:353–359.
- Kalluri R, Neilson EG (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776–1784.
- Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE (2009): Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* 14:105–111.
- Kawakami Y, Tsuda M, Takahashi S, Taniguchi N, Esteban CR, Zemmyo M, Furumatsu T, Lotz M, Izpisua Belmonte JC, Asahara H (2005): Transcriptional coactivator PGC-1alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2414–2419.
- Kawato Y, Hirao M, Ebina K, Tamai N, Shi K, Hashimoto J, Yoshikawa H, Myoui A (2011): Nkx3.2-induced suppression of Runx2 is a crucial mediator of hypoxia-dependent maintenance of chondrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 416:205–210.
- Keerthi N, Chimutengwende-Gordon M, Sanghani A, Khan W (2013): The potential of stem cell therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Curr Stem Cell Res Ther* 8:444–450.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R (2002): Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74:5383–5392.
- Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S (1999): Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80:159–170.
- Kim JH, Jang JW, Lee YS, Lee JW, Chi XZ, Li YH, Kim MK, Kim DM, Choi BS, Kim J, et al. (2014): RUNX family members are covalently modified and regulated by PIAS1-mediated sumoylation. *Oncogenesis* 3:e101–.
- Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O (2007): A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 89:2105–2112.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O (2004): Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 86-A:455–464.
- Kock L, van Donkelaar CC, Ito K (2012): Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res* 347:613–627.

- 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* 4:324–335.
- Kon E, Filardo G, Roffi A, Andriolo L, Marcacci M (2012): New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr Rev Musculoskelet Med* 5:236–243.
- Koressaar T, Remm M (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289–1291.
- Kouri JB, Jimenez SA, Quintero M, Chico A (1996): Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 4:111–125.
- Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, Sudkamp N (2006): Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage* 14:1119–1125.
- Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clinical Biochemistry* 25:155 – 163. {NACB} 15th Annual Symposium: Advances in Clinical Laboratory Evaluation of Cartilage, Bone, and Systemic Rheumatic Diseases.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducey P, Karsenty G (1997): Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 16:307–310.
- Lee RHK, Iioka H, Ohashi M, Iemura Si, Natsume T, Kinoshita N (2007): XRab40 and XCullin5 form a ubiquitin ligase complex essential for the noncanonical Wnt pathway. *The EMBO Journal* 26:3592–3606.
- Lefebvre V, Smits P (2005): Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:200–212.
- Lemaire L, Heinlein UA (1993): High-level expression in male germ cells of murine P68 RNA helicase mRNA. *Life Sci* 52:917–926.
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2015): SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Research* 43:D257–D260.
- Li B, Zhuang L, Trueb B (2004): Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1. *J Biol Chem* 279:20401–20410.
- Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW, Paulin-Levasseur M, Worman HJ (2000): MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 275:4840–4847.

- Liu ZR (2002): p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol Cell Biol* 22:5443–5450.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012): Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64:1697–1707.
- Lohmander LS, Roos EM (2007): Clinical update: treating osteoarthritis. *Lancet* 370:2082–2084.
- Long F (2012): Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:27–38.
- Lundgren DH, Hwang SI, Wu L, Han DK (2010): Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics* 7:39–53.
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Mejean C, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B (2005): Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* 24:1798–1809.
- Mayer BJ (2001): SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* 114:1253–1263.
- Michelsen JW, Schmeichel KL, Beckerle MC, Winge DR (1993): The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4404–4408.
- Mihlan S, Reiss C, Thalheimer P, Herterich S, Gaetzner S, Kremerskothen J, Pavenstadt HJ, Lewandrowski U, Sickmann A, Butt E (2013): Nuclear import of LASP-1 is regulated by phosphorylation and dynamic protein-protein interactions. *Oncogene* 32:2107–2113.
- Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R (2004): Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 122:229–236.
- 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* 6:278–285.
- Morgelin M, Paulsson M, Heinegard D, Aebi U, Engel J (1995): Evidence of a defined spatial arrangement of hyaluronate in the central filament of cartilage proteoglycan aggregates. *Biochem J* 307 (Pt 2):595–601.
- Morris NP, Keene DR, Horton WA (2003): Morphology and Chemical Composition of Connective Tissue: Cartilage. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, 41–65. John Wiley & Sons, Inc.
- Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P (1994): Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* 23:249–261.

- Moskowitz R (2007): Osteoarthritis. *Diagnosis and Medical/surgical Management*, LWW Doody's all reviewed collection. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 4 Auflage.
- Muir H (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 17:1039–1048.
- Muller S, Breederveld RS, Tuinebreijer WE (2010): Results of osteochondral autologous transplantation in the knee. *Open Orthop J* 4:111–114.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263–273.
- Mundlos S, Olsen BR (1997): Heritable diseases of the skeleton. Part II: Molecular insights into skeletal development-matrix components and their homeostasis. *FASEB J* 11:227–233.
- Murakami S, Kan M, McKeehan WL, de Crombrughe B (2000): Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1113–1118.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R (2003): A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75:4646–4658.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255–262.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006): Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559–1582.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M (2012): Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28:1166–1167.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, et al. (1997): Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765–771.
- Owczarzy R, Tataurov AV, Wu Y, Manthey JA, McQuisten KA, Almagbrazi HG, Pedersen KF, Lin Y, Garretson J, McEntaggart NO, et al. (2008): IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research* 36:W163–W169.
- Pan Q, Yu Y, Chen Q, Li C, Wu H, Wan Y, Ma J, Sun F (2008): Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* 217:228–241.

- Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A (2002): Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 30:2–12.
- Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A (2010): Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 38:1117–1124.
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Phizicky EM, Fields S (1995): Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 59:94–123.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.
- Poole AR (1999): An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* 4:D662–70.
- Poole CA (1997): Review. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *Journal of Anatomy* 191:1–13.
- Preiss S, Argentaro A, Clayton A, John A, Jans DA, Ogata T, Nagai T, Barroso I, Schafer AJ, Harley VR (2001): Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 276:27864–27872.
- Prockop DJ (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71–74.
- Punwar S, Khan WS (2011): Mesenchymal Stem Cells and Articular Cartilage Repair: Clinical Studies and Future Direction. *The Open Orthopaedics Journal* 5:296–301.
- Rabenberg M (2013): Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54. RKI, Statistisches Bundesamt, Berlin.
- Redman SN, Oldfield SF, Archer CW (2005): Current strategies for articular cartilage repair. *Eur Cell Mater* 9:23–32.
- Reginster JY (2002): The prevalence and burden of arthritis. *Rheumatology Oxford* 41 Supp 1:3–6.
- Rosow KL, Janknecht R (2003): Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* 22:151–156.
- Sandell LJ, Aigner T (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3:107–113.
- Savagner P (2001): Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23:912–923.

- Savkovic V, Li H, Seon JK, Hacker M, Franz S, Simon JC (2014): Mesenchymal stem cells in cartilage regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 9:469–488.
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, et al. (2009): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 37:D5–15.
- Schmidt D, Müller S (2003): PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci* 60:2561–2574.
- Schmierer B, Hill CS (2007): TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:970–982.
- Schminke B (2011): *Laminins during cartilage development in healthy cartilage and their role in the pathogenesis of osteoarthritis of the human*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Schminke B, Miosge N (2014): Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. *Curr Rheumatol Rep* 16:461.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9:671–675.
- Schreiber V, Moog-Lutz C, Regnier CH, Chenard MP, Boeuf H, Vonesch JL, Tomasetto C, Rio MC (1998): Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions. *Mol Med* 4:675–687.
- Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ (2005): Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:213–225.
- Selvamurugan N, Shimizu E, Lee M, Liu T, Li H, Partridge NC (2009): Identification and characterization of Runx2 phosphorylation sites involved in matrix metalloproteinase-13 promoter activation. *FEBS Lett* 583:1141–1146.
- Shen R, Chen M, Wang YJ, Kaneki H, Xing L, O’keefe RJ, Chen D (2006): Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation. *J Biol Chem* 281:3569–3576.
- Shepherd DE, Seedhom BB (1999): Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Ann Rheum Dis* 58:27–34.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
- Sim H, Argentaro A, Harley VR (2008): Boys, girls and shuttling of SRY and SOX9. *Trends Endocrinol Metab* 19:213–222.

- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990): A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240–244.
- Smith N, Dong Y, Lian JB, Pratap J, Kingsley PD, van Wijnen AJ, Stein JL, Schwarz EM, O’Keefe RJ, Stein GS, et al. (2005): Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. *J Cell Physiol* 203:133–143.
- Sobotta J, Paulsen F, Waschke J (2010): Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen. Elsevier, Urban & Fischer, München, 23 Auflage.
- Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M (2006): BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* 34:D535–9.
- Stenmark H (2009): Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513–525.
- Stenmark H, Olkkonen VM (2001): The Rab GTPase family. *Genome Biology* 2:reviews3007.1–reviews3007.7.
- Stevenson RJ, Hamilton SJ, MacCallum DE, Hall PA, Fuller-Pace FV (1998): Expression of the ‘dead box’ RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. *J Pathol* 184:351–359.
- Tanner NK, Linder P (2001): DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* 8:251–262.
- Taylor KM, Labonne C (2005): SoxE factors function equivalently during neural crest and inner ear development and their activity is regulated by SUMOylation. *Dev Cell* 9:593–603.
- Taylor RG, Walker DC, McInnes RR (1993): E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res* 21:1677–1678.
- Temenoff JS, Mikos AG (2000): Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21:431–440.
- 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* 20:329–337.
- Thomas P, Smart TG (2005): HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods* 51:187–200.
- Tintut Y, Parhami F, Le V, Karsenty G, Demer LL (1999): Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *J Biol Chem* 274:28875–28879.

- Tomasetto C, Moog-Lutz C, Regnier CH, Schreiber V, Basset P, Rio MC (1995a): Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains. *FEBS Lett* 373:245–249.
- Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R, Basset P, Rio MC (1995b): Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* 28:367–376.
- Tsuda M, Takahashi S, Takahashi Y, Asahara H (2003): Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J Biol Chem* 278:27224–27229.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012): Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115.
- Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L (2010): Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging technique. *Am J Sports Med* 38:943–949.
- Wagner N, Krohne G (2007): LEM-Domain proteins: new insights into lamin-interacting proteins. *Int Rev Cytol* 261:1–46.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, et al. (1994): Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111–1120.
- Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S (2002): Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79:464–470.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM (1994): Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76:579–592.
- Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M (2002): Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10:199–206.
- Wang AH, Kruhlak MJ, Wu J, Bertos NR, Vezmar M, Posner BI, Bazett-Jones DP, Yang XJ (2000): Regulation of Histone Deacetylase 4 by Binding of 14-3-3 Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 20:6904–6912.
- Weber PJ, Eckhard CP, Gonser S, Otto H, Folkers G, Beck-Sickinger AG (1999): On the role of thymopoietins in cell proliferation. Immunochemical evidence for new members of the human thymopoietin family. *Biol Chem* 380:653–660.
- Wee HJ, Huang G, Shigesada K, Ito Y (2002): Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms. *EMBO Reports* 3:967–974.

- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005): The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118:843–846.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Technischer Bericht 3, Molecular Research Center, Cincinnati, OH 45212, USA. billw@mrcgene.com.
- Woolf AD, Pflieger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81:646–656.
- Wright EM, Snopek B, Koopman P (1993): Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res* 21:744.
- Wuelling M, Vortkamp A (2011): Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocr Dev* 21:1–11.
- Yaffe MB (2002): How do 14-3-3 proteins work?– Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513:53–57.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997): The Structural Basis for 14-3-3:Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* 91:961 – 971.
- Yahata T, de Caestecker MP, Lechleider RJ, Andriole S, Roberts AB, Isselbacher KJ, Shioda T (2000): The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors. *J Biol Chem* 275:8825–8834.
- Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Sato T, Miyaki S, Asahara H (2009): Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Experimental Cell Research* 315:2231 – 2240.
- Yang L, Clinton JM, Blackburn ML, Zhang Q, Zou J, Zielinska-Kwiatkowska A, Tang BL, Chansky HA (2008): Rab23 regulates differentiation of ATDC5 chondroprogenitor cells. *J Biol Chem* 283:10649–10657.
- Yang L, Lin C, Liu ZR (2006): P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* 127:139–155.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134.
- Yusuf D, Butland SL, Swanson MI, Bolotin E, Ticoll A, Cheung WA, Zhang XYC, Dickman CTD, Fulton DL, Lim JS, et al. (2012): The transcription factor encyclopedia. *Genome Biol* 13:R24.
- Zerial M, McBride H (2001): Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107–117.

- Zhao M, Qiao M, Oyajobi BO, Mundy GR, Chen D (2003): E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 278:27939–27944.
- Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K, Nakashima M (2007): Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells. *Biochem J* 405:69–75.
- Zhou G, Zheng Q, Engin F, Munivez E, Chen Y, Sebald E, Krakow D, Lee B (2006): Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19004–19009.
- Zhou R, Bonneaud N, Yuan CX, de Santa Barbara P, Boizet B, Schomber T, Scherer G, Roeder RG, Poulat F, Berta P (2002): SOX9 interacts with a component of the human thyroid hormone receptor-associated protein complex. *Nucleic Acids Res* 30:3245–3252.

Danksagung

Hiermit möchte ich die Gelegenheit ergreifen und mich bei allen Menschen bedanken, die mich in all den Jahren unterstützt und diese Arbeit ermöglicht haben. An erster Stelle geht mein herzlicher Dank an Prof. Dr. Nicolai Miosge. Ich danke ihm für die Übernahme der Betreuung dieser Doktorarbeit, aber vor allem möchte ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine wissenschaftliche Anleitung bedanken.

Bei Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender vom Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie der Georg-August-Universität Göttingen möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats und die hilfreichen Anregungen sowie die konstruktiven Kritiken im Laufe meiner Promotion bedanken.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen bedanke ich mich bei Dr. Christoph Lenz und Lisa Neuenroth von der Zentralen Serviceeinheit Proteomanalyse der Universitätsmedizin Göttingen. Bei PD Dr. Klaus Jung von der Zentralen Serviceeinheit Medizinische Biometrie und Statistische Bioinformatik der Universitätsmedizin Göttingen möchte ich mich für die bioinformatischen Analysen und seine Hilfe sowie seine Geduld bei den statistischen Analysen herzlich bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe und der Abteilung möchte ich mich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit, die wertvollen Ratschläge und die Hilfsbereitschaft bedanken. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Christa Bode für die Einarbeitung ins Labor sowie ihre wertvollen Ratschläge und Dr. Boris Schminke für die zahlreichen Diskussionen sowie seine stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch Christl Gaubitz, Dr. Arne G. Schmeisky und Philipp Buderer für die Korrekturlesungen und Anregungen bei der Anfertigung dieser Dissertation. Zu guter letzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und ihren starken Rückhalt bedanken.

Gökhan Cingöz

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Gökhan Cingöz
Geburtsdatum: 30. September 1983
Geburtsort: Witzenhausen

Akademischer Werdegang

- 09/2012 – 05/2015 **Promotion an der Georg-August-Universität Göttingen**
AG Orale Biologie und Geweberegeneration, Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen
Thema der Dissertation: Identifizierung neuer Coregulatoren von SOX9 und RUNX2 in chondrogenen Progenitorzellen in der Osteoarthritis
- 09/2011 – 09/2012 **Wissenschaftliche Hilfskraft**
AG Orale Biologie und Geweberegeneration der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik im Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen
- 10/2011 – 03/2012 **Dozent für medizinische Mikrobiologie**
Bildungszentrum der Asklepios Psychiatrie Niedersachsen GmbH, Göttingen
- 11/2010 – 02/2011 **Forschungspraktikum**
Untersuchung von DNA-Reparatur und UV-induzierter Karzinogenese in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsmedizin Göttingen
- 04/2007 – 05/2010 **Studium der Biologie (Diplom)**
Universität Osnabrück
Thema der Diplomarbeit: Biochemische und molekulargenetische Studien von neuen Sporenproteinen in Streptomycceten
Schwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biochemie und Zellbiologie
- 10/2004 – 03/2007 **Studium der Biologie (Vordiplom)**
Georg-August-Universität Göttingen
- 08/2001 – 06/2004 **Berufliches Gymnasium** an den Beruflichen Schulen des Werra-Meißner-Kreises in Witzenhausen

Studienbegleitende Praktika und Auslandserfahrungen

09/2008 – 02/2009	Auslandsstudium der Biologie an der Universidad de Oviedo/Spanien
06/2008 – 07/2008	Forschungspraktikum am Institut für Biochemie und Zellbiologie Universität Osnabrück Thema: Knockout von Klasse C Kernproteinen der Tethering-Komplexe CORVET und HOPS
03/2008 – 04/2008	Forschungsexkursion Biologische Anstalt Helgoland (BAH), Stiftung Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung Erfassung und Untersuchung des Makrobenthos und der Bodenfauna von Helgoland

Persönliche Fähigkeiten und Kompetenzen

Sprachen	Deutsch und Türkisch (Muttersprache) Englisch and Spanisch (fortgeschritten)
IT-Kenntnisse	Adobe Photoshop, InDesign, Illustrator (fortgeschritten) LaTeX, MS Office, Apple iWork (fortgeschritten bis Expertenkenntnisse)
Hobbys und Interessen	Klettern, Bouldern, Schwimmen, IT