Aus der Klinik für Zahnärztliche Prothetik

(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)

im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss von Rab5c auf die Ciliogenese bei chondrogenen Progenitorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Stella Maria Becker

aus

Fulda

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss	

Betreuer:	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Betreuerin:	Prof. Dr. med. F. Alves

Prüfungskommission

Referent/in:	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. F. Alves
Drittreferent/in:	PD Dr. med. dent. S. Sennhenn-Kirchner

Datum der mündlichen Prüfung: 15.02.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss von Rab5c auf die Ciliogenese bei chondrogenen Progenitorzellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisI		
AbbildungsverzeichnisIII		
TabellenverzeichnisV		
Abkürz	zungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Der Gelenkknorpel	1
1.2	OA im hyalinen Gelenkknorpel	2
1.3	Chondrogene Progenitorzellen	3
1.4	Das primäre Cilium	5
1.5	Der Fibronektinrezeptor Integrin α 5 β 1	6
1.6	Fragestellung dieser Dissertation	7
2	Material	9
2.1	Geräte	9
2.2	Chemikalien	10
2.3	Kits	11
2.4	Verbrauchsmaterialien	12
2.5	Sonstiges	12
3	Methoden	13
3.1	Probengewinnung und Isolierung von chondrogenen Progenitorzellen	13
3.2	Kultivierung und Passagierung von CPCs	13
3.3	ITGA5-Hemmung der CPCs mit ATN 161	14
3.4	qPCR	15
3.4.1	Allgemeines	15
3.4.2	mRNA-Isolation	16
3.4.3	Umschreibung von mRNA in cDNA	17
3.4.4	Protokoll der qPCR	18
3.4.5	Verwendete Proben und Primer	19
3.4.6	Statistische Auswertung nach Pfaffl	20
3.5	Western Blot	20
3.5.1	Allgemeines	20
3.5.2	Herstellung der Polyacrylamid-Gele nach Laemmli	21
3.5.3	Vorbereiten der Proteinproben	23
3.5.4	SDS-PAGE	23
3.5.5	Immunblot – Western Blot	24

3.5.6	Proteindetektion
3.5.7	Immunmarkierung
3.5.8	Verwendete Antikörper28
3.6	ICC
3.6.1	Allgemeines
3.6.2	Protokoll lichtmikroskopische Immunfloureszenz
3.6.3	Verwendete Antikörper31
3.7	Scratch-Assay
3.7.1	Allgemeines
3.7.2	Protokoll Scratch-Assay
4	Ergebnisse
4.1	Ciliennachweis in CPC 241 hT vor und nach dem Knockout von Rab5c
4.1.1	Nachweis auf zellulärer Ebene durch ICC
4.1.2	Cilienachweis auf mRNA Ebene durch qPCR mit IFT8841
4.1.3	Ciliennachweis auf Proteinebene durch Western Blot42
4.2	Ciliennachweis nach der Hemmung von ITGA546
4.2.1	Nachweis auf zellulärer Ebene durch ICC46
4.2.2	Nachweis auf mRNA Ebene durch qPCR vor und nach der Hemmung58
4.2.3	Nachweis auf Proteinebene durch Western Blot mit IFT8860
4.3	Migrationsvergleich der gehemmten und nicht gehemmten Zellen durch Scratch Assay63
5	Diskussion67
5.1	Die Rolle des primären Ciliums bei OA
5.2	Der Einfluss von Rab5c auf die Ciliogenese der CPCs69
5.3	Der Einfluss von ITGA5 und Rab5c auf die Ciliogenese bei CPCs
5.4	Der Einfluss von Rab5c und der Hemmung von ITGA5 auf die Migration von CPCs72
6	Zusammenfassung73
7	Literaturverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT durch IFT8834
Abbildung 2: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT Rab5c KO durch IFT8835
Abbildung 3: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT durch acetyliertes α-Tubulin36
Abbildung 4: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT Rab5c KO durch acetyliertes α-Tubulin
Abbildung 5: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT des Versuchs in 4.1.1.1
Abbildung 6: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO des Versuchs in 4.1.1.1
Abbildung 7: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT in Versuch 4.1.1.1
Abbildung 8: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO in Versuch 4.1.1.1
Abbildung 9: Auswertung der RT-PCR42
Abbildung 10: Western Blot-Analyse – Nachweis von IFT8843
Abbildung 11: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie
Abbildung 12: Western Blot-Analyse – Nachweis von acetyliertem $lpha$ -Tubulin
Abbildung 13: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie
Abbildung 14: Exemplarische ICC - Nachweis von ITGA5 in CPC 241 hT
Abbildung 15: Exemplarische ICC - Nachweis von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO
Abbildung 16: Exemplarische ICC – Nachweis der erfolgreichen Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT durch ATN 16149
Abbildung 17: Exemplarische ICC - Nachweis der erfolgreichen Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO durch ATN 16150
Abbildung 18: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch acetyliertes α-Tubulin nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT51
Abbildung 19: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch acetyliertes α-Tubulin nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO52
Abbildung 20: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch IFT88 nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT53
Abbildung 21: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch IFT88 nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO54
Abbildung 22: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.255
Abbildung 23: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.256
Abbildung 24: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.257
Abbildung 25: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.258
Abbildung 26: Auswertung der RT-PCR59

Abbildung 27: V ITGA5	/ergleich der relativen mRNA-Level von IFT88 vor und nach der Hemmung von 6	0
Abbildung 28: W	Vestern Blot-Analyse – Nachweis von IFT88 nach der Hemmung von ITGA56	1
Abbildung 29: A	uswertung der Western Blots mittels Densitometrie6	2
Abbildung 30: V ITGA5	ergleich der relativen Protein-Level von IFT88 vor und nach der Hemmung von 6	3
Abbildung 31: E	xemplarischer <i>Scratch</i> Assay6	4
Abbildung 32: E	xemplarischer <i>Scratch</i> Assay6	5

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	9
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	10
Tabelle 3: Verwendete Kits	11
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	12
Tabelle 5: Sonstige verwendete Materialien	12
Tabelle 6: Verwendeter ITGA5-Rezeptorantagonist	15
Tabelle 7: Waschschritte mRNA Isolation	17
Tabelle 8: Bestandteile Biozym cDNA Synthesis Kit	18
Tabelle 9: Temperaturprotokoll der PCR (30 Zyklen)	19
Tabelle 10: Zusammensetzung Master-Mix PCR	19
Tabelle 11: Verwendete Primer	20
Tabelle 12: Zusammensetzung 10 %iges Trenngel	22
Tabelle 13: Zusammensetzung 5 %iges Sammelgel	23
Tabelle 14: Dreifach konzentrierter SDS-Probenpuffer	23
Tabelle 15: Zusammensetzung 5 x Laufpuffer	24
Tabelle 16: Zusammensetzung 1 x Transferpuffer	25
Tabelle 17: Zusammensetzung Färbelösung	26
Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärber	26
Tabelle 19: Zusammensetzung 5 %ige Blocklösung, Aufbewahrung im Kühlschrank,	
Verwendung maximal zwei Tage	26
Tabelle 20: Verwendete Primärantikörper Western Blot	28
Tabelle 21: Verwendete Sekundärantikörper Western Blot	28
Tabelle 22: Reagenzien ICC	31
Tabelle 23: Primärantikörper ICC	31
Tabelle 24: Sekundärantikörper ICC	32

Abkürzungsverzeichnis

(Ausgenommen: SI-Einheiten und allgemein bekannte Abkürzungen)

β2Μ	Housekeeping gene beta 2 microglobulin
ATN 161	Trifluoroacetate salt 161
APS	Ammonium per oxodisul fat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
СРС	Chondrogene Progenitorzelle
Ct-Wert	Cycle threshold-Wert, dt.: Schwellenwert-Zyklus
d	Tag
DAPI	4´, 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid, bzwNukleosidtriphosphat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal calf serum, dt.: fetales Kälber-Serum
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transkriptase
ICC	Immuncytochemie
IFT88	Intraflagellares Transportprotein 88
ITGA5	Integrin $\alpha 5\beta 1$
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
OA	Osteoarthrose
р	Signifikanz

PBS	Phosphat gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction,</i> dt.: Polymerasekettenreaktion
Rab5c	Ras-related protein Rab-5C
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SDS	Sodiumdodecylsulfat, dt.: Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, dt.: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOX9	Sex determining region Y-box 9
TBS-T	Tris-buffered saline and tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin: Polymerisationskatalysator

1 Einleitung

Die Geweberegeneration bei Osteoarthrose (OA) des Knie- und Kiefergelenks ist eines der Hauptforschungsgebiete der Arbeitsgruppe "Orale Biologie und Geweberegeneration". Vor allem die Entdeckung und Isolierung der chondrogenen Progenitorzellen (CPC) aus osteoarthritisch verändertem Knorpel im späten Stadium der Arthrose bietet neue Ansatzpunkte für die Entwicklung einer zellbiologischen Therapie (Koelling et al. 2009). Verschiedene Experimente sollen zur Aufklärung der molekularen Pathomechanismen der OA beitragen und Möglichkeiten eröffnen, das chondrogene Potenzial der CPCs positiv zu beeinflussen.

Gegenstand der folgenden Arbeit ist der Einfluss des von Janßen (Janssen et al. 2021) und Christa Bode durchgeführten Knockouts des Proteins *ras-related protein Rab-*5C (Rab5c) sowie die Hemmung des Fibronektinrezeptors Integrin α 5 β 1 (ITGA5) auf die Ciliogenese und Migration der CPCs.

Im Folgenden wird zunächst ein kurzer Überblick über das bisher gesammelte Wissen über die Zusammensetzung des Gelenkknorpels, die Pathologie der OA, den aktuellen Stand der Forschung über die CPCs und das primäre Cilium sowie die Bedeutung von ITGA5 gegeben.

1.1 Der Gelenkknorpel

Die Kenntnis über die Zusammensetzung des Gelenkknorpels ist wichtig, um das Krankheitsbild der OA zu verstehen. Man unterscheidet drei im menschlichen Körper vorkommende Knorpelarten: hyaliner, elastischer und Faserknorpel. Sie unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und ihren biomechanischen Eigenschaften (Morris et al. 2003).

Der Gelenkknorpel, der die meisten Gelenkflächen bekleidet, besteht aus hyalinem Knorpel (Kuettner 1992). Er setzt sich hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix (EZM) und Wasser zusammen. Er besitzt weder Nervenfasern noch Blut- oder Lymphgefäße. Die zellulären Bestandteile des Knorpels bilden die gewebsspezifischen Zellen: die Chondrozyten. Diese sind nicht über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, sondern kommunizieren über die EZM. Sie sind an der Entstehung, der Aufrechterhaltung sowie an Reparaturmechanismen der EZM beteiligt. Die EZM ist aus Wasser (70 %), Kollagen (90 % Kollagen Typ I, 10 % Kollagen Typ IX, X, XI und VI), Glykoproteinen und wasserbindenden Proteoglykanen, v.a. Aggrecan zusammengesetzt (Kuettner 1992; Buckwalter und Mankin 1998). Diese Bestandteile sind Grundlage der biomechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels (Mörgelin et al. 1995). Sie tragen dazu bei, Wasser innerhalb der EZM zu speichern. (Fox et al. 2009) Dadurch ist es möglich, Druckbelastungen durch den Austritt von Wasser geringfügig zu kompensieren und den Ausgangszustand des hyalinen Knorpels bei Druckentlastung wiederherzustellen. Die Druckelastizität führt weiter zu einer gleichmäßigen Kraftübertragung auf subchondrale Knochenanteile (Huber et al. 2000). Für die Zugfestigkeit des Knorpelgewebes bilden die Kollagenanteile ein straffes Netzwerk. Außerdem ist es dem Gewebe so möglich, den Druck der in der EZM eingebetteten Proteoglykane auszugleichen (Knudson und Knudson 2001).

Die Chondrozyten sind, wie schon erwähnt, unter anderem an der Reparatur der EZM beteiligt. Dabei hat jeder Chondrozyt sein eigenes Mikroumfeld, für dessen Aufrechterhaltung und Regeneration er verantwortlich ist. Um das hyaline Knorpelgewebe zu erhalten, müssen mechanisch und chemisch optimale Bedingungen aufrechterhalten werden. Durch das begrenzte Proliferationspotential der Chondrozyten ist die natürliche intrinsische Heilungskapazität des Knorpels allerdings stark limitiert (Fox et al. 2009).

1.2 OA im hyalinen Gelenkknorpel

Als OA wird eine degenerative, nicht entzündliche Erkrankung eines Gelenks bezeichnet, die vor allem Hand, Knie, Hüfte oder die Wirbelsäule betrifft. Sie ist die am häufigsten vorkommende Gelenkkrankheit und betrifft laut dem Robert-Koch-Institut ab dem 65. Lebensjahr etwa 50 % der Frauen und ein Drittel der Männer in Deutschland (Fuchs et al. 2017).

Die Ursache der Erkrankung ist multifaktoriell. Neben genetischen und Umweltfaktoren zählt dazu vor allem auch jahrelange Über- oder Fehlbelastung z.B. durch Übergewicht, angeborene, nicht behobene Fehlstellungen oder Folgen eines Unfalls (Nuki 1999; Palazzo et al. 2016). Die daraus resultierenden osteoarthritischen Veränderungen führen in Gelenken zur Degeneration des dort vorkommenden hyalinen Knorpels vom Kollagen Typ II und zur Bildung von Kollagen Typ I (Koelling et al. 2009). Es kommt zum Verlust der Gleitfähigkeit und stoßdämpfenden Funktion des hyalinen Gelenkknorpels. Je nach Stadium geht diese Degeneration anfänglich mit Belastungsschmerz und kleineren Einschränkungen, im späten

Stadium jedoch auch mit Ruheschmerz und teilweise totaler Mobilitätsblockade einher (Hunter et al. 2008).

Bisher gibt es kein Therapieverfahren, mit dem dieser pathologische Prozess eingedämmt oder womöglich das Knorpelmaterial wieder vollständig regeneriert werden kann, sondern lediglich physikalische oder invasive Methoden (Buckwalter und Mankin 1998; De Bari 2015).

1.3 Chondrogene Progenitorzellen

Die chondrogenen Progenitorzellen (CPC) wurden erstmals als eigene Zelllinie in osteoarthritisch verändertem Knorpel in späten Stadien der OA von Koelling et al. (2009) identifiziert. Ihnen konnten charakteristische, stammzellähnliche Eigenschaften zugeordnet werden. Dazu zählen vor allem ihre hohe Zellteilungsrate, ihre Multipotenz in Verbindung mit sehr hohem Differenzierungspotenzial und ihre beträchtliche Migrationsfähigkeit. (Koelling et al. 2009) Durch ihr hohes migratorisches Potenzial können die CPCs bis in die EZM eindringen und weisen gegenüber herkömmlichen Chondrozyten eine höhere Aktivität auf (Schminke und Miosge 2014). Weiter ließen sie sich durch *cluster of differentiation* (CD)-Markern von Knochenzellen und Chondrozyten abgrenzen. CPCs sind Teil der natürlichen Regenerationsmechanismen im erkrankten Knorpelgewebe. Allerdings synthetisieren sie im Gegensatz zu Chondrozyten primär Kollagen Typ I, statt des im gesunden Gelenkknorpel vorkommendenden Kollagen Typ II. Dadurch entsteht ein narbenartiges Ersatzgewebe, das die physiologische Funktion des Knorpels beeinträchtigt (Tesche und Miosge 2005).

Allerdings konnte in einem Experiment, bei dem die CPCs in eine 3D-Kultur überführt wurden, beobachtet werden, dass die Möglichkeit besteht, die Synthese von Kollagen Typ II zu erhöhen. Bereits nach drei Wochen zeigte sich eine Veränderung der Zellen mit Chondrozyten-ähnlichem Phänotyp und einem hohen Level an *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) und Protein für Kollagen II. Die Faser-Bildung und die Synthese von Kollagen II konnten noch durch die Zugabe chondrogener Mediatoren verstärkt werden (Koelling et al. 2009).

Hierbei spielen vor allem die Transkriptionsfaktoren *runt-related transcription factor* 2 (RUNX2) und *sex determining region Y-box* 9 (SOX9) eine Rolle. Durch die Herabregulation

von RUNX2 in vitro kommt es zu einer Steigerung der SOX9 Expression, einer erhöhten Produktion von Kollagen Typ II und Aggrecan und somit zum Aufbau einer hyalinen extrazellulären Matrix (Koelling und Miosge 2010).

Um eine Steigerung des chondrogenen Potenzials zu erreichen, wurden durch Jerome Janßen (Janssen et al. 2021) die Auswirkungen durch den Knockout von RUNX2 untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass SOX9 auf Proteinebene nicht erhöht wurde, allerdings die Expression von Kollagen Typ I und II verringert war. Daraus wurde geschlossen, dass statt des Knockouts für therapeutische Zwecke eine Herabregulation von RUNX2 zielführend sein könnte. Als potenzieller Interaktionspartner wurde das Rab5c identifiziert. Zur Feststellung der Veränderungen in Bezug auf Vitalität oder Synthese der Extrazellulären Matrix (EZM) wurde Rab5c zunächst in CPCs ausgeknockt, die anschließend in Form von Alginatkugeln in Hauttaschen von Mäusen transplantiert wurden. Sowohl in vitro als auch in vivo wurde die Bildung von Chondrozytenklastern, die Ablagerung von Kollagen Typ I und II in der EZM sowie die Expression von Aggrecan nachgewiesen. Durch quantitative Analysen der CPC 241 hT Rab5c KO ließ sich eine Erhöhung des chondrogenen Potenzials und die positive Beeinflussung der Expression wichtiger chondrogener Marker feststellen, während die Expression aller mit der Chondrogenese assoziierten Gene nicht schwerwiegend verändert wurden (Janssen et al. 2021). Dies bietet einen vielversprechenden Ansatz für die erfolgreiche Manipulation der durch OA veränderten CPCs.

Um ihr regeneratives Potenzial maximal auszuschöpfen, müssen die CPCs pathologische Veränderungen der EZM durch OA erkennen und darauf entsprechend reagieren. Dabei ist das primäre Cilium der wichtigste Sensor der Zellen. Im osteoarthritischem Knorpel sind mehr cilientragende Chondrozyten zu finden als in physiologischem Knorpelgewebe (McGlashan et al. 2008). Die genauen Hintergründe und Ursachen dessen müssen noch geklärt werden. Allerdings geben diese vielversprechenden Erkenntnisse Grund zur Hoffnung, durch die Erforschung der genauen Mechanismen der CPCs und deren primären Ciliums zur Entwicklung einer regenerativen, non-invasiven Therapie gegen Osteoarthritis nutzen zu können (Koelling et al. 2009; Muhammad et al. 2012).

1.4 Das primäre Cilium

Beim primären Cilium handelt es sich um eine Zellorganelle, die in nahezu allen Körperzellen von Wirbeltieren vorkommt (Singla und Reiter 2006; Valente et al. 2014). Es gibt in der Regel nur ein primäres Cilium pro Zelle (Paridaen et al. 2013).

Man differenziert motile von nicht-motilen Cilien, wobei das primäre Cilium den letzteren zuzuordnen ist. Sie unterscheiden sich sowohl in ihren Funktionen als auch im strukturellen Aufbau. Beide bestehen aus einem Basalkörper mit einem daran befindlichen Axonem aus einem Mikrotubuligerüst, welches aus neun kreisförmig angeordneten Mikrotubuli Paaren besteht. Bei motilen - sekundären - Cilien befindet sich in deren Zentrum ein weiteres Mikrotubuli Paar, das bei primären Cilien nicht vorhanden ist. Diese Anordnung bezeichnet man als "9 x 2 + 2" bzw. "9 x 2 + 0" Struktur. Jedes Axonem ist von einer Ciliarmembran umgeben, die spezifische Rezeptoren und Ionenkanäle enthält (Satir et al. 2010). Der Basalkörper fungiert nicht nur als Anker für das primäre Cilium, das sich von dort ausgehend in den extrazellulären Raum erstreckt, sondern auch als Vorlage für die Ciliogenese (Muhammad et al. 2012).

Das primäre Cilium ist Gegensatz zu anderen Zellorganellen nicht zu jeder Zeit des Zellzyklus vorhanden, sondern nur zwischen zwei mitotischen Teilungen – in der Interphase (Omran und Olbrich 2010). Bei Eintritt in den nächsten Mitosezyklus wird das primäre Cilium resorbiert und auf den neu entstandenen Tochterzellen wieder gebildet (Satir et al. 2010). Dabei wird das primäre Cilium der Mutterzelle asymmetrisch nur an eine der beiden Tochterzellen vererbt, die dadurch schneller als die andere Tochterzelle in der Lage ist, das primäre Cilium wieder auszubilden (Paridaen et al. 2013).

Nachdem dem primären Cilium über lange Zeit in der Forschung keine besondere Funktion zugesprochen wurde, wird ihm nach neueren Daten neben wichtigen sensorischen Funktionen auch eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Zellproliferation und entwicklungsbestimmenden Signalwegen zugeordnet (Seeley und Nachury 2010). Dysfunktionen oder Fehlbildungen primärer Cilien sind Ursache verschiedener organischer Missbildungen oder Dysfunktionen, sogenannter Ciliopathien. Dazu zählen z.B. zystische Nierenerkrankungen, mentale Retardierungen oder skelettale Defekte (Omran und Olbrich 2010; Sharma et al. 2011). Durch die Verwendung von Antikörpern gegen acetyliertes α -Tubulin konnten primären Cilien auch auf der Oberfläche von chondrogenen Progenitorzellen in osteoarthritisch verändertem Gelenkknorpel nachgewiesen werden (Muhammad et al. 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass das primäre Cilium sowohl zahlreiche Zellsignale aus der extrazellulären Matrix (EZM) empfängt, als auch diese an die Zelle weiterleiten kann (Poole et al. 1985; Singla und Reiter 2006). Diese auf der primären Cilienmembran befindlichen EZM-Rezeptoren und die Cilienmembran selber spielen auch eine zentrale Rolle in der Pathogenese von OA (McGlashan et al. 2008; Kinumatsu et al. 2011; Chang et al. 2012). Außerdem konnten auf primären Cilien von Chondrozyten Integrine lokalisiert werden, während wiederum Integrin-abhängige Signalkaskaden in Chondrozyten selbst stattfinden (McGlashan et al. 2006; Ruhlen und Marberry 2014).

Eine große Bedeutung für das primäre Cilium hat das intraflagellare Transportsystem (IFT). Da im primären Cilium selbst keine Proteine synthetisiert werden können, ist es für dessen Bildung und Aufrechterhaltung essentiell. Dieses System leitet die Bewegung der IFT-Komplexe durch molekulare Motorproteine entlang des ciliären Axonems in bidirektionaler Richtung. Dabei transportiert Kinesin II die Proteine in anterograder Richtung und Dynein II in retrograder Richtung. Die ciliären Proteine werden so gezielt in den Basalkörper eingebracht und von dort durch den IFT-Komplex zum distalen Ende befördert (Muhammad et al. 2012). Ein wesentlicher Bestandteil des Prozesses ist das Intraflagellare Transportprotein 88 (IFT88), dessen Fehlen zum Verlust des primären Ciliums führen kann (Murcia et al. 2000). Weiter konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten ohne IFT88 in ihrem Migrationspotenzial beeinflusst werden¹ und dies zu einer frühen OA durch Knorpeldegeneration beiträgt (Thompson et al. 2014).

1.5 Der Fibronektinrezeptor Integrin $\alpha 5\beta 1$

Integrine sind heterodimere Adhäsionsrezeptoren. Sie bestehen aus zwei nichtkovalent gebundenen Transmembranglykoproteinen: die α - und β -Untereinheiten. Sie sind sowohl für die gegenseitige Bindung der Zellen und die Zell-Zellmatrix-Bindung verantwortlich als auch

¹ Diese Information verdanke ich Herrn Prof. Nicolai Miosge, der mir am 06.01.2020 den Zugriff auf mit Frau Prof. Efrat Monsonego-Ornan gemeinsame, bisher unveröffentlichte Forschungsergebnisse gewährte.

für die Interaktion zwischen dem Zytoskelett und der EZM und induzieren intrazellulare Signalkaskaden (Alberts et al. 2002; Pulai et al. 2002; Olivares-Navarrete et al. 2015).

Beim Integrin $\alpha 5\beta 1$ (ITGA5) handelt es sich um einen Fibronektinrezeptor, der unter anderem in Mesenchymalen Stammzellen und artikulären Chondrozyten vorkommt (Garciadiego-Cazares 2004; Veevers-Lowe et al. 2011). Ihm wird die Beteiligung an der Gelenkentwicklung und an der Matrixproduktion zugeschrieben (Zhang et al. 1993; Garciadiego-Cazares 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von ITGA5 zu einer verminderten Produktion der im arthritisch veränderten Knorpel vorkommenden Prokollagene I und III führt, wohingegen Prokollagen Typ II und Aggrecan weiter exprimiert wurden. So könnte die Dedifferenzierung von Chondrozyten durch die ITGA5 Hemmung vermindert oder verhindert werden und zu einer Verbesserung der EZM führen (Tanaka et al. 2013). Des Weiteren ist Integrin α 5 β 1 auch an der Migration von Zellen beteiligt. Dies konnte unter anderem bereits an retinalen Pigmentepithelzellen (Chen et al. 2010) sowie bei humanen Pulpa-Stammzellen nachgewiesen werden (Xu et al. 2015). In beiden Fällen konnte eine verminderte Migration durch die Hemmung bzw. ein Knockout von ITGA5 beobachtet werden (Chen et al. 2010; Xu et al. 2015).

1.6 Fragestellung dieser Dissertation

In der folgenden Arbeit sollen drei wesentliche Fragen untersucht und beantwortet werden:

- 1. Ist das primäre Cilium in CPCs nach dem Knockout von Rab5c noch existent?
- Ist das primäre Cilium in CPCs nach dem Knockout von Rab5c und der Hemmung von ITGA5 noch existent?
- 3. Wird die Migration der CPCs und der Knockout-Zellen durch das Rab5c Knockout die Hemmung von ITGA5 beeinflusst?

Der Knockout von Rab5c bei CPCs stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um zukünftige Therapieverfahren gegen OA zu entwickeln (Janssen et al. 2021). Das primäre Cilium ist essentiell für die physiologische Zellentwicklung und Steuerung für die Zelle lebenswichtiger Prozesse (Seeley und Nachury 2010). Eine gestörte Ciliogenese oder die Abwesenheit des primären Ciliums infolge des Knockouts wäre also ein limitierender Faktor in Bezug auf die zukünftige therapeutische Nutzung der CPC 241 hT Rab5c KO. Die Existenz des primären Ciliums nach dem Knockout von Rab5c wird im Folgenden durch Versuche auf unterschiedlicher zellulärer Ebene bewiesen.

Darüber hinaus wird der Einfluss auf die Ciliogenese durch die Hemmung von ITGA5 in den CPC 241 hT Rab5c KO beschrieben. Dafür wurden die CPCs erstmals mit dem ITGA5 Rezeptorantagonist *trifluoroacetate salt* 161 (ATN 161) behandelt. ATN 161 ist ein ITGA5 Antagonist, bei dem bisher die Hemmung der Angiogenese und des Wachstums von Lebermetastasen beobachtet werden konnte (Wang et al. 2011). Zuletzt wird die Migration der CPCs nach dem Knockout sowie nach der ITGA5 Hemmung untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zur Erforschung der CPCs nach dem Knockout von Rab5c bei und bieten einen Ansatz, in Zukunft weitere Rückschlüsse auf cilienabhängige Prozesse in den CPCs ziehen zu können. Weiter können diese Erkenntnisse im Rahmen der Weiterentwicklung verschiedener zellbiologischer Therapieverfahren gegen OA genutzt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
Blot-Scanner	#9000F Mark II, Canon, Krefeld, D
Blot-Transferkammer	PerfektBlue, peqLab, Erlangen, D
Elektrophoresekammer	Nachbau, wissenschaftliches Labor UMG, Göttingen, D
Herafreeze -86 °C	HerasafeTM KS12, Thermo Fisher, Waltham, USA
Inkubator	C200 # 13946, Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Ros- dorf, D
Kamera Nikon D90	D90, Nikon, Düsseldorf, D
Lumineszenz-Scanner	C-DiGit, LI-COR, Bad Homburg, D
Mikroskop (für Objektträger)	#415500-0004-000, Carl Zeiss, Jena, D
Mikroskop (für Zellkultur)	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Jena, D
Nanodrop	TM 1000 Spectrophotometer, 7, Waltham, USA
Software Lumineszenz-Scanner	ImageJ Studio Digits
Software Gel-Scanner	Canon Scan IJ
Software Thermocycler	Mastercycler ep gradient S realpex 2
Software Zellometer	Cellometer Auto
Stempel	Eigenbau (Wissenschaftliches Labor, UMG, Göttingen)
Thermocycler comfort	Mastercycler #4345 epgradient s, Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer	#5000-1012, Eppendorf AG, Hamburg, D
Wasserbad	#TW12 GB, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
Wippe	Duomax 1030 #543-32205-00-3, Heidolph instruments, Schwabach, D
Zellometer	Cellometer Auto T4, Nexcelom, Lawrence MA, USA
Zentrifuge	#58100011535, Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	#5426 no.: 0015772, Eppendorf AG, Hamburg, D

2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort, Land
Aceton	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Annealing Puffer	Promega, Fitchburg, USA
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Blockingreagenz	MACS Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DAPI	KPL, Gaithersburg, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Me- dium (DMEM)	Gibco, Paisley, UK
Essigsäure 100 %	AppliChem, Darmstadt, D
Ethanol	Chemosolute, Renningen, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Paisley, UK
Gentamycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
4 x Laemmli Puffer	Bio-Rad, Hercules, USA
Magermilchpulver	AppliCHem, Darmstadt, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Mowiol	Hoechst, Frankfurt-Hoechst, D
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
PageRuler PRestained Protein LAdder	Thermo Fisher, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, D
PeqGOLD Universal Agarose	peqLab, Erlangen, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlö- sung (PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Tetramethylethylendiam (TE- MED)	Roth, Karlsruhe, D
Tris-(hydroxymethyl)-aminome- than (Tris)	Roth, Karlsruhe, D
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, D

Chemikalien	Hersteller, Ort, Land
WesternBright Chemilumines- zenz Substrat Sirius	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
WesternSure Pen	LI-CORE, Lincoln NE, USA
Xylol	Roth, Karlsruhe, D

2.3 Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
Biozym cDNA Synthesis Kit	Biozym, Oldendorf, D
KAPA SYBR FAST Universal	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PeqGOLD Total RNA Kit	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Quanti-Tect-Reverse-Transkription-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
WesternBright [™] Sirius	Biozym, Oldendorf, D
WesternBright [™] ECL	Biozym, Oldendorf, D

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
15ml-Falcon-Tube-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
50ml-Falcon-Tube-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
24-Well Platte	Starlab, Hamburg, D
96-Well-PCR-Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olendorf, D
Einmal-Skalpell	Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, D
Flasche (25cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Flasche (75cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mowiol	Hoechst, Frankfurt-Hoechst, D
Objektträger	Labsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG, Rennin- gen, D
PVDF-Membran	Merck KGaA Millipore, Darmstadt, D
Safe-Lock Tube	Eppendorf AG, Hamburg, D
Schutzfolie	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
<i>ThinCert</i> [®] , 0,4μm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

2.5 Sonstiges

Tabelle 5: Sonstige verwendete Materialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort, Land
Coomassie-Blau-Färbung	Roth, Karlsruhe, D
hTERT, Lentivirus-Genexpressions-Vektor	amsbio, Abingdon, GB
Protein-Größenstandard (Western Blot)	Thermo Fisher, Bremen, D
SDS-PAGE-Größenmarker	Fermentas, Waltham, USA

3 Methoden

Die folgenden Versuchsmethoden sind bereits allgemein erprobt und wurden nach einem Standardprotokoll verrichtet. Alle Versuche wurden mit den Zellreihen CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO jeweils dreimal zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

3.1 Probengewinnung und Isolierung von chondrogenen

Progenitorzellen

Für die nachfolgenden Versuche wurden humane chondrogene Progenitorzellen (CPCs) verwendet, die aus osteoarthritisch verändertem hyalinem Knieknorpel isoliert wurden. Die Proben stammen aus dem Kniegelenk eines Patienten, der sich bereits im späten Stadium der OA befand. Die Probenentnahme erfolgte im Lehrkrankenhaus Neu-Mariahilf. Bevor die Proben an die Universitätsmedizin Göttingen übergeben wurden, wurden die Patientendaten entsprechend des Ethikantrags vom 25.12.2010 anonymisiert. Bei der Zelllinie CPC 241 hT handelt es sich um eine immortalisierte Zellinie von CPCs. Dies geschah durch lentiviralen Gentransfer mit dem Gen für humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) und wurde von Frau Christa Bode durchgeführt. Bei der Zelllinie CPC 241 hT Rab5c KO wurde der Knockout des Proteins Rab5c im Rahmen seiner Masterarbeit von Jerome Janßen vorgenommen.

3.2 Kultivierung und Passagierung von CPCs

Die immortalisierten Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C + 5 % CO + Luftgemisch im Kultivierungsmedium aufbewahrt. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Vor jedem Mediumwechsel oder Passagierung wurden die Zellen mikroskopisch kontrolliert, um Qualität und Quantität zu überprüfen. Bei einer Konfluenz von 85 % wurden die Zellen mit Trypsin (PAN Biotech, Aidenbach, DE) unter der Sterilbank geerntet.

Im ersten Schritt wurde das Medium in ein Auffangbehältnis abgeschüttet, bevor die Flaschen zwei Mal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen wurden, um das Medium zu entfernen. Um die noch adhärenten Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurde jede Flasche mit 2 ml Trypsin versetzt und für maximal fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden 50 ml-Röhrchen vorbereitet und mit *Dulbecco's* *Modified Eagle's Medium* (DMEM) + 10 % f*etal calf serum* (FCS) befüllt. Hierbei war zu beachten, dass Trypsin mit der äquivalenten Menge DMEM + 10 % FCS abgestoppt wird. Danach wurden die Flaschen zweimal mit 2 – 3 ml DMEM + 10 % FCS gewaschen und ebenfalls in die Röhrchen gegeben. Nach diesem Schritt wurden die Röhrchen für zehn Minuten bei 300 g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgeschüttet und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert.

Anschließend wurden 20 μl der Zellsuspension in eine Zählkammer gegeben und mit einem Zellometer (*Cellometer* Auto T4 *Cell Counter*) die Zellzahl bestimmt. Zur Zählung der Zellzahl pro 1 ml PBS wurden je 20 μl entnommen, auf Zählkammern aufgetragen und mithilfe eines Zellometers bestimmt.

Zur weiteren Kultivierung wurden 10 ml DMEM + 10 % FCS pro Zellkulturflasche vorgelegt und eine entsprechende Menge von Zellen dazugegeben. Zur Dokumentierung wurden die Flaschen mit Datum, ausgesäter Zellzahl und der neuen Passage beschriftet.

Die übrigen Zellen wurden auf Eppendorf-*Cups* (E-*Cups*) aufgeteilt, erneut abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit Datum, Passage und Zellzahl versehen und bei - 80 °C eingefroren.

3.3 ITGA5-Hemmung der CPCs mit ATN 161

Neben dem Einfluss des Knockouts von Rab5c auf die Ciliogenese sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Wirkung durch eine zusätzliche Hemmung von ITGA5 untersucht werden. Dazu wurde ein Teil der Zellinie CPC 241 hT als auch der Linie CPC 241 hT Rab5c KO mit ATN 161 behandelt. Zunächst wurden je 1 x 10⁵ ausgesät und zwei Tage bei 37 °C in DMEM + 10 % FCS inkubiert, um eine Anhaftung der Zellen zu gewährleisten und eine vorzeitige Destruktion durch die Hemmung zu vermeiden.

Es wurden verschiedene Konzentrationen und Inkubationszeiten angewendet (s. 1.5) und die Wirksamkeit durch eine Immuncytochemie (ICC) validiert. (s.4.2.1.1)

Als effektiv zeigte sich die Zugabe von $30 \,\mu$ l des zuvor gelösten Hemmstoffs in 10 ml DMEM + 10 % FCS und eine Inkubation von 72 h, bei einem Mediumwechsel mit erneuter Impfung durch ATN 161 nach 48 h. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden

die Zellen geerntet, als Pellets bei - 80 °C eingefroren und für die folgenden Versuche verwendet.

Tabelle 6: Verwendeter ITGA5-Rezeptorantago	nist
---	------

Produktname	Firma/Nummer	Konzentration
ATN 161	Tocris/6058	1:333

3.4 qPCR

3.4.1 Allgemeines

Durch die *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qPCR) können spezifische Gensequenzen innerhalb vorhandener aus den Zellproben gewonnenen RNA quantitativ anhand von Fluoreszenzmessungen verglichen werden. Hierfür muss zuerst aus den zu untersuchenden Zellen mRNA isoliert und zu *complementary* Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden.

Die cDNA durchläuft dann zusammen mit einem spezifischen Primer-Mix, Desoxy-Nukleosidtriphosphat (dNTP), H₂O und dem interkalierenden DNA-Farbstoff SYBR-Green drei, sich wiederholende Phasen in einem *Thermocycler* (*Mastercycler Realpex*², Eppendorf).

Die erste Phase ist die Denaturierung, bei der die DNA bei 95 °C in ihre Einzelstränge aufgespalten wird. Im Anschluss erfolgt das *Annealing*. Hierbei lagert sich der Primer bei einer für ihn spezifischen Temperatur an die DNA an. Die letzte Phase bildet die DNA-Synthese, bei der die Taq-Polymerase bei 72 °C neue DNA-Doppelstränge amplifiziert und die Bindung des SYBR-Green an die Doppelstränge erfolgt. Dieser Zyklus wird zwischen 30- und 40-mal durchlaufen.

Bei der Taq-Polymerase handelt es sich um eine aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene DNA-Polymerase, die besonders thermostabil ist und deren Arbeitsoptimum bei 72 °C liegt.

Der DNA-Farbstoff SYBR-Green bindet an die gebildeten Doppelstränge und steigt somit proportional zu deren Synthese an. Dadurch kann während der qPCR ein Fluoreszenzsignal in Echtzeit gemessen werden. Dieses lässt allerdings keine Rückschlüsse auf die Menge der Ziel-DNA während der Zyklen gebildet wurde, sondern bestimmt viel mehr, wann durch das Signal ein bestimmter Schwellenwert (Ct-Wert, *cycle threshold* = Schwellenwert-Zyklus) überschritten wird. Dieser Ct-Wert wiederum gibt Aufschluss über die Menge an Ziel-DNA, die sich in der Probe befindet. Je höher die Menge an DNA des Zielgens, umso weniger Zyklen werden benötigt, bis dieser Schwellenwert erstmals erreicht wird. Umgekehrt werden mehr Zyklen benötigt, je weniger Ziel-DNA vorhanden ist, womit der Ct-Wert steigt.

Um zu verifizieren, dass die Amplifikation spezifisch für die Ziel-DNA erfolgt ist, wird am Ende der qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird Temperatur im *Thermocycle*r sukzessive erhöht bis eine für das Amplifikat spezifische Temperatur erreicht ist und die Doppelstränge aufgeschmolzen werden. Durch die Trennung der beiden Stränge wird das zuvor eingelagerte SYBR-Green freigesetzt und eine Abnahme des Fluoreszenzfarbstoffs detektiert. Der charakteristische Verlauf der Schmelzkurve gibt Auskunft über die Spezifität der Ziel-DNA.

3.4.2 mRNA-Isolation

Die Isolation der mRNA wurde mit dem *peqGOLD Total RNA Kit* (peqlab) durchgeführt. Dafür wurde zunächst ein zuvor bei - 80 °C eingefrorenes Zellpellet auf Eis liegend aufgetaut. Danach wurde dieses zur vollständigen Lyse mit 400 µl RNA *Lysis Buffer T* resuspendiert, auf ein 2 ml-*collection-tube* in einer DNA *Removing Column* überführt und bei 12 000 g für eine Minute zentrifugiert. Die nicht mehr benötigte DNA und übrige Bestandteile der Probe befanden sich danach in der DNA *Removing Column* und wurden verworfen. Der Durchfluss wurde, äquivalent zur Menge an *Lysis Buffer T*, mit 400 µl 70 %igem Ethanol versetzt. Das gesamte Lysat wurde anschließend auf eine sich in einem neuen 2 ml-*collection-tube* befindliche *PerfectBind RNA Column* übertragen und für eine Minute bei 10 000 g zentrifugiert. Die RNA wurde dabei an die Silikatmembran der *PerfectBind RNA Column* gebunden. Um die Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurden drei Waschschritte durchgeführt, zwischen denen die *Column* jeweils für 15 Sekunden bei 10 000 g zentrifugiert wurde. Dafür wurden zwei unterschiedliche Waschpuffer verwendet. Der jeweilig entstandene Durchfluss wurde verworfen.

1. Waschschritt	2. Waschschritt	3. Waschschritt
500 μl RNA Waschpuffer I	600 μl RNA Waschpuffer II	Wiederholung Schritt 2
	(Puffer Konzentrat + 4 Volu-	
	men 100 %igen Ethanols)	

Tabelle 7: Waschschritte mRNA Isolation

Im Anschluss folgte ein Trocknungsschritt, bei dem das Ganze für zwei Minuten bei 10 000 g zentrifugiert wurde.

Um die RNA von der Silikatmembran zu eluieren, wurde die *PerfectBind RNA Column* in ein 1,5 ml-Ribonuklease (RNase)-freies-*Cup* umgesetzt und 30 µl RNase-freiem Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte das erneute Zentrifugieren für eine Minute allerdings bei 5 000 g. Aufgrund der Instabilität der RNA wurde das *Cup* sofort auf Eis gelagert, bevor die Messung der RNA-Konzentration mithilfe des *Nanodrops* 1000 *Spectrophotometers* durchgeführt wurde.

3.4.3 Umschreibung von mRNA in cDNA

Die Umschreibung von mRNA zu cDNA erfolgte wie auch die RNA Isolation mit Hilfe eines Kits. Hierbei wurde das cDNA *Synthesis Kit* (Biozym) verwendet. Der gesamte Prozess wurde nach wie vor auf Eis durchgeführt, um einer Destruktion der mRNA vorzubeugen. Außerdem wurden während der Umschreibung RNase freie Handschuhe getragen und ein RNase - freies *Cup* benutzt, um eine Kontamination zu vermeiden. Bei dieser Methode geht man davon aus, dass die mRNA im Verhältnis 1:1 zu cDNA umgesetzt wurde.

Zunächst wurde ein Mastermix aus dNTP Mix, RNase Inhibitor, einem Hexamer Primer, 5x cDNA Synthese Puffer, Reverse Transkriptase und PCR *Grade Water* hergestellt. Nach Zufügen des Mastermix zur mRNA wurde das Gemisch zunächst für zehn Minuten bei 30 °C und im Anschluss für 30 Minuten bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde die mRNA mit dem Mastermix anschließend für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Zuletzt wurde die Probe mit PCR *Grade Water* auf eine Endkonzentration von 1 ng cDNA/µl aufgefüllt. Im Anschluss konnte die cDNA direkt für qPCR verwendet oder bei - 20 °C gelagert.

Tahelle	Q٠	Restandtaila	Riozva		Synthesis	: Kit
labelle	ο.	Destanutelle	DIOZYII	ICDINA	Synthesis	

Bestandteil	Menge	Finale Konzentration
dNTP Mix (10 mM pro)	2 μΙ	1 mM (pro dNTP)
RNase Inhibitor	0.5 μΙ	1 U/µl
Hexamer Primer (25 μ M)	1 μΙ	1.25 μΜ
5x cDNA Synthese Puffer	4 μΙ	1x
mRNA Template	50 – 500 μl	-
Reverse Transkriptase	1 μΙ	10 U/µl
PCR Grade Water	Variabel	-
Gesamtvolumen	20 µl	-

3.4.4 Protokoll der qPCR

Die qPCR wurde nach dem Protokoll des KAPA SYBR *Fast* qPCR *Kit Master Mix Universal* (peqlab KK4602) durchgeführt. Hiernach wurde zunächst ein Primer-Mix hergestellt, der im Anschluss Teil des Mastermix sein wird. Dafür wurden 20 µl des *forward* Primers und die äquivalente Menge des *reverse* Primers zu 160 µl H₂O hinzugefügt und gründlich durchmischt.

Die Menge der jeweiligen Bestandteile des Mastermix wurden nach Anzahl der Proben berechnet, wobei stets ein zusätzlicher Ansatz einberechnet wurde, um etwaigen Pipettierfehlern vorzubeugen. Der Mastermix bestand aus *SYBR-green*, dem Primer-Mix und RNase freiem H₂O und wurde in ein 0,5 ml *Cup* pipettiert, gemischt und kurz abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5819). Die Menge für einen Ansatz ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Um die PCR durchzuführen wurden 96-*Well*-PCR-Platten verwendet. In jedes *Well* wurden 9 μl des Mastermix und 1 μl der entsprechenden cDNA Probe hineinpipettiert. Dabei werden immer drei *Wells* pro Probe beschickt. Im Anschluss wurden die mit den Proben gefüllten *Wells* mit verschlossen und bei 1000 rpm für ca. 30 Sekunden zentrifugiert, um zu gewährleisten, dass sich alle Ansätze am Boden der *Wells* abgesetzt haben.

Die Platte wurde anschließend in den *Thermocycler* eingesetzt und die PCR gestartet.

Tabelle 9: Temperaturprotokoll der PCR (30 Zyklen)

Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Aktivierung	2 min	95 °C
Denaturierung	15 sec/Zyklus	95 °C
Annealing	30 sec/Zyklus	Primer-abhängig
Elongation	60 sec/Zyklus	72 °C
Finale Elongation	2 min	72 °C

Je Primer und Probe werden insgesamt drei mal drei Versuche an unterschiedlichen Tagen durchgeführt, sodass insgesamt neun Ct-Werte pro Ziel-Gen vorliegen.

Tabelle 10: Zusammensetzung Master-Mix PCR

Bestandteil	Menge
SYBR-green	5 μl
Primer-Mix	2 μΙ
20 µl forward	
+ 20 μl reverse	
+ 160 μl H₂O	
H ₂ O	2 μΙ
Gesamtmenge	9 µl

3.4.5 Verwendete Proben und Primer

Für jeden Primer und jede der vier Zelllinien (s. Kapitel 2.2 und 2.3) wurden je drei Durchgänge mit drei Proben an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Somit ergaben sich pro Zelllinie und Primer insgesamt neun Ergebnisse.

Zielgen	Forward Primer	<i>Reverse</i> Primer	Annealing-Temp.
ITGA5	AGACATACTT-	GAAACTCTCCAAAAT-	53 °C
	GAAGGGCCA	GCAA	
IFT88	GAATGGCTAAT-	TCCCAAAATT-	63 °C
	GCAGGTGGT	GGGTGTCAAT	
β2m	TGCTGTCTCCATGTTT-	TCTCTGCTCCCCAC-	61 °C
	GATGTATCT	СТСТАА	

Tabelle 11: Verwendete Primer

3.4.6 Statistische Auswertung nach Pfaffl

Zur Auswertung der PCR wurden die Ergebnisse der jeweiligen Primer ins Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen *beta* 2 *microglobulin* (β 2M) gesetzt und somit nach Pfaffl (2001) normalisiert. Als Referenz- oder *Housekeeping*-Gene werden Gene verwendet, die konstant exprimiert werden, unabhängig von Zelltyp, Stadium des Zellzyklus oder anderen äußeren Umständen. Die Berechnung des Signifikanzlevels und des Expressionsunterschieds erfolgte mit Hilfe einer auf der unten stehenden Formel basierenden Computersoftware (Pfaffl 2001).

Eine Normalisierung ist notwendig, um eventuelle Ungenauigkeiten beim Pipettieren oder andere Anwendungsfehler auszugleichen.

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

3.5 Western Blot

3.5.1 Allgemeines

Beim Western Blot handelt es sich um eine biochemische Methode zum gezielten, spezifischen Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran. Dabei werden die gesuchten Proteine zunächst auf ein diskontinuierliches Gel aufgetragen und durch Anlegen elektrischer Spannung nach ihrem Molekulargewicht aufgeteilt. Die auf dem Gel befindlichen Proteine werden danach auf die entsprechende Trägermembran transferiert und angefärbt. Für die folgenden Versuche wurde dafür eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran verwendet. Im nächsten Schritt werden die Proteine mit je einem primären und sekundären Antikörper nacheinander inkubiert und temporär angefärbt. Der spezifische Nachweis erfolgt durch das Scannen der PVDF-Membran auf einem speziellen Scanner (C-Digit von LI-COR) und dem Programm *Image Studio Digits,* mit dem auch die Auswertung der folgenden Blots durchgeführt wurde.

Die einzelnen Schritte werden im Folgenden detailliert erläutert.

3.5.2 Herstellung der Polyacrylamid-Gele nach Laemmli

Für die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mussten zunächst Gele hergestellt werden, die sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammensetzen. Dabei unterschieden sich Trenn- und Sammelgel in ihrer Glycin-Konzentration und dem pH-Wert. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden Gele mit einer 10 %igen Acrylamidkonzentration hergestellt. Die Konzentration bestimmt die Porengröße bei der Vernetzung des Gels.

Zuerst wurden Glasplatten (je eine Ohrenplatte und eine Platte mit Spacern) mit 100 % Ethanol (AppliChem, Darmstadt, DE) gereinigt, um eventuelle Verunreinigungen der Gele zu vermeiden. Zwischen die Platten wurde eine Gummidichtung gelegt und beide Platten mit Klammern befestigt. Um die Dichtigkeit zu testen, wurde H₂O oder Ethanol in den entstandenen Zwischenraum geschüttet. Bei austretender Flüssigkeit wurden die Platten neu fixiert und der Test wiederholt. Sobald beide Platten richtig abgedichtet waren, wurde im Abstand von 6 cm vom unteren Plattenrand eine parallele Linie gezogen, um die spätere Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu markieren.

Im Anschluss wurden zuerst die Bestandteile des Trenngels (s. Tabelle 12) zusammen pipettiert, vorsichtig gemischt und zwischen die Glasplatten bis zur Markierung gegossen. Um eine klare, gerade Grenze zwischen den Gelkomponenten herzustellen, wurde das Trenngel mit 100 % Ethanol überschichtet, das nach der Polymerisation wieder abgegossen wurde.

Zur Herstellung des Sammelgels wurden ebenfalls die jeweiligen Bestandteile (s.

Tabelle 13) zusammen pipettiert, gemischt und oberhalb des Trenngels bis zum oberen Rand der Glasplatten eingefüllt. Um die Taschen für die späteren Proben zu formen, wurden Kämme mit zehn Zinken eingesetzt.

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämme gezogen, die Klammern und Dichtungsgummis entfernt und die Taschenböden außen markiert.

Die Aufbewahrung der Gele ist zwischen feuchtem Papier für maximal zwei Wochen im Kühlschrank möglich.

Bestandteile	Menge
Trenngelpuffer	1,4 ml
- 1,5 M Tris	
- pH 8,9 mit HCl	
10 % SDS in H ₂ O	55 μl
TEMED	5 μl
Acrylamid	1,85 ml
- 30 % Acrylamid	
- 0,8 % Bisacrylamid	
H ₂ O	2,0 ml
Gesamt	5,3 ml
+ 10 % Ammoniumperoxidsulfat (APS)	0,25 ml
- 1 g/ 10 ml H ₂ O	

Tabelle 12: Zusammensetzung 10 %iges Trenngel

Tabelle 13: Zusammensetzung 5 %iges Sammelgel

Bestandteile	Menge für 2 Gele
Sammelgelpuffer	1,25 ml
- 0,5 M Tris	
- pH 6,8 mit HCl	
10 % SDS in U O	EQ.ul
	50 μι
TEMED	5 μl
Acrylamid	0,8 ml
H ₂ O	2,7 ml
Gesamt	4,8 ml
+ 10 % APS	0,2 ml

3.5.3 Vorbereiten der Proteinproben

Für die SDS-PAGE wurden zunächst Zellpellets, die zuvor bei - 80 °C eingefroren waren, bei Raumtemperatur aufgetaut. Pro Tasche wurden 2 x 10⁵ Zellen mit 25 μ l dreifach konzentriertem Probenpuffer (s. Tabelle 14) resuspendiert, gevortext und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Das zuvor im 9:1 Verhältnis zum Probenpuffer zugefügte β -Mercaptoethanol spaltete die Disulfidbrücken. Das SDS lagerte sich an die Proteine an und bewirkte so eine zur Masse proportionale Negativ-Ladung, sodass die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten.

Tabelle 14: Dreifach konzentrierter SDS-Probenpuffer

Bestandteile	Menge	
0,3 M TRIS (MG 121, 14)	3,6 g	
9 % SDS (Sodiumdodecylsulfate)	9 g	
22,5 % Glycerin	22,5 g	
vor SDS-Zugabe mit HCl auf pH 6.7 einstellen und mit 100 ml H ₂ O auffüllen		

3.5.4 SDS-PAGE

Während die Proben im Heizblock denaturiert wurden, wurde ein Nachbau der Biometra Elektrophoresekammer vorbereitet und die untere Kammer mit 1 x Laufpuffer (s. Tabelle 15) befüllt. Dann wurden die Gele vorsichtig hineingestellt und mit Klammern befestigt. Dabei war besonders zu beachten, dass sich keine Luftblasen unter dem Gel bildeten, um später einen gleichmäßigen Stromfluss zu gewährleisten. Danach wurde auch in die obere Kammer bis zum oberen Rand der Geltaschen mit 1 x Laufpuffer eingefüllt.

Die denaturierten Proben wurden in die jeweiligen Taschen der Gele pipettiert. In jede Tasche wurden 25 μ l pipettiert, was einer ungefähren Zellzahl von 2 x 10⁵ entsprach. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde pro Gel eine Proteinleiter (*Page RulerTM*, *Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific,* #26616) mit aufgetragen.

Tabelle 15: Zusammensetzung	5	х	Laufpuffer
-----------------------------	---	---	------------

Bestandteile	Menge
0,25 M Tris (MG 121, 14)	30,3 g
1,9 M Glycine (MG 75,07)	142,6 g
0,5 % SDS (10 %)	50 ml
+ H_2O auf 1000 ml auffüllen	
	c cc

für 1x Laufpuffer 800 ml H2O + 200 ml 5x Laufpuffer

Danach wurde an die Kammer Strom angelegt. Die Proben wurden im Sammelgel zwischen 10 und 15 mA pro Gel konzentriert, bevor die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 20 – 25 mA pro Gel erfolgte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten herausgetrennt und konnten nun für den eigentlichen Immunblot verwendet werden.

3.5.5 Immunblot – Western Blot

Der Immunblot wurde als Nass-Blot durchgeführt. Dafür wurden zunächst pro Gel sechs Filterpapiere und eine Transfermembran zugeschnitten, sodass sie die Ränder der Gele um wenige mm überragten. Filterpapiere und Schwämme wurden dann für mindestens 15 Minuten in kalten Transferpuffer (s. Tabelle 16) eingelegt.

Die Transfermembran wurde für 15 Sekunden in Methanol aktiviert und ebenfalls für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer gelegt. Um das Gelsandwich zusammen zu bauen wurde eine Schale mit Transferpuffer gefüllt und die Blotkassette hineingelegt. Darauf positionierte man einen Schwamm auf die rote Seite der Kassette, darauf drei getränkte Filterpapiere und eine Transfermembran. Auf diese wurde das Gel gelegt. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde eine Pasteurpipette zum herausrollen der Blasen verwendet. Das Gel wurde danach mit den übrigen drei Filterpapieren und dem zweiten Schwamm abgedeckt und die Kassette geschlossen. Zur Fixierung wurden zwei Gummibänder über Kreuz gespannt.

Der Tank wurde anschließend bis zur Hälfte mit Transferpuffer gefüllt und die Kassette eingesetzt. Dabei war die Farbkodierung zu beachten, sodass die rote Seite der Kassette mit der Membran zur Anode und das Gel, das sich auf der schwarzen Kassettenseite befand, zur Katode zeigte. Danach wurde der Puffertank bis zur oberen Kante der Elektrodenplatten aufgefüllt und ein Magnetstäbchen in den Tank gegeben, der während des Laufes rühren konnte und das Kühlwasser angeschlossen. Beides diente dazu, eine gleichmäßige Temperatur und Ionenkonzentration zu gewährleisten. Der Blot wurde bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 90 Minuten durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung 1 x Transferpuffer

Bestandteile	Menge
25 mM Tris (MG 121, 14)	6,05 g
192 mM Glycine (MG 75,07)	28,8 g
20 % (v/v) Methanol 100 %	400 ml

+ H₂O auf 2000 ml auffüllen, pH 8,3; Lagerung bei 4 °C, zweimalige Benutzung

3.5.6 Proteindetektion

Um einen erfolgreichen Transfer und eine vollständige Auftrennung der Proteine zu überprüfen, wurde zunächst die Blotkassette geöffnet, das Gel verworfen und die verwendete Membran in eine Kiste mit 1 x *tris-buffered saline and tween 20* (TBS-T) gelegt. Um die Proteine anzufärben, wurde sie für ca. fünf bis zehn Minuten in Coomassie-Blau Färbelösung (s. Tabelle 17) eingelegt und auf eine Wippe gestellt. Der Färbevorgang erfolgte unter Sicht. Nach ausreichender Blaufärbung der Proteinbanden, wurde das Coomassie Blau wieder abgeschüttet und Entfärber (s.Tabelle 18) aufgetragen. Dadurch wurde die Blaufärbung des Hintergrundes wieder reduziert und somit die Banden deutlicher sichtbar. Auch die Entfärbung erfolgte unter Sicht und wurde währenddessen mehrfach gewechselt. Nach abgeschlossener Entfärbung wurde die Membran eingescannt und in 1 x TBS-T gewaschen, bevor sie weiterverwendet wurde. Durch das Waschen der Membran wurden die Entfärber Bestandteile ausgewaschen, um eine spätere Wirksamkeit der Blocklösung nicht zu beeinträchtigen.

Tabelle 17: Zusammensetzung	Färbelösung
-----------------------------	-------------

Bestandteile	Menge
0,1 % Coomassie brilliant blue R250	0,1 g
50 % Methanol	50 ml
7 % Essigsäure	7 ml
+ H_2O auf 100 ml auffüllen	
Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärber	
Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärber Bestandteile	Menge
Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärber Bestandteile 50 % Methanol	Menge 50 ml
Tabelle 18: Zusammensetzung Entfärber Bestandteile 50 % Methanol 7 % Essigsäure	Menge 50 ml 7 ml

3.5.7 Immunmarkierung

Die folgenden Schritte und Inkubationen erfolgten auf einer Wippe. Zur weiteren Verwendung der Membran mussten zunächst unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran geblockt werden. Dafür musste sie für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur frisch angesetzte Blocklösung (s. Tabelle 19) gelegt werden.

Tabelle 19: Zusammensetzung 5 %ige Blocklösung, Aufbewahrung im Kühlschrank, Verwendung maximal zwei Tage

Bestandteile	Menge
5 % Magermilchpulver (<i>Nonfat dried milk</i>	2,5 g
powder)	
1 x TBS-T	50 ml

Nach dem Blockvorgang konnte die Blocklösung abgeschüttet werden und der Primärantikörper (s. Tabelle 20) entsprechend des Datenblatts verdünnt auf die Membran aufgetragen werden. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einer Wippe im Kühlraum bei 4 °C.
Nach Abschluss der Inkubation wurde der Primärantikörper abgeschüttet und verworfen oder zur späteren Wiederverwendung eingefroren. Die Membran wurde dann bei Raumtemperatur fünfmal für je fünf Minuten mit 1 x TBS-T gewaschen.

Danach wurde je nach Herkunft des Primärantikörpers der dazu passende an Peroxidase gesekundäre Antikörper koppelte (s. Tabelle 21) ausgewählt und entsprechend der Angaben mit Blocklösung verdünnt. Dieser inkubierte auf der Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran fünfmal für fünf erneut Minuten mit ie 1 x TBS-T gewaschen wurde.

Anschließend erfolgte die Detektion der Antikörper mit dem *advansta Western Bright* Chemilumineszenz Substrat Sirius bzw. ECL. Dabei weist Sirius eine höhere Empfindlichkeit auf als ECL. Sie bestehen jeweils aus zwei Komponenten, die im Verhältnis 1 : 1 gemischt werden mussten. Bevor das jeweilige Substrat auf die Proteinseite der Membran gegeben werden konnte, mussten die darauf befindlichen Markerbanden mit einem Peroxidasestift (*WesternBright Chemi Pen*) markiert werden. Danach konnte die gemischte Detektionslösung dazugegeben werden und für fünf Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubieren.

Vor dem Scannen ließ man die Detektionslösung abtropfen und legte die Membran mit Proteinseite nach unten auf den Scanner (*C-Digit* von LI-COR). Als Scan-Programm wurde *Image Studio Digits* verwendet. Der Scanvorgang dauerte insgesamt zwölf Minuten, wonach der erfasste Blot mit *Image Studio Digits* quantitativ ausgewertet werden konnte.

Die statistische Auswertung und Überprüfung der Signifikanz der Western Blot Ergebnisse erfolgte über mit dem Einstichproben-t-Test.

3.5.8 Verwendete Antikörper

Primärantikör-	Firma/Nummer	Herkunft,	Konzentration	Proteingröße
per		Klonalität		
ITGA5	BD Biosciences	Maus, IgG,	1:2000	150 kDa
	/610633	monoklonal		
IFT88	Proteintech,	Kaninchen, IgG,	1:1000	94 kDa
	13967-1-AP	polyklonal		
Acet. α -Tubulin	Santa	Maus, IgG,	1:1000	55 kDa
	Cruz/sc23950	monoklonal		
Anti- α -Tubulin	Sigma-	Maus, IgG,	1:2000	55 kDa
	Aldrich/DM1A	monoklonal		

Tabelle 20: Verwendete Primärantikörper Western Blot

Tabelle 21: Verwendete Sekundärantikörper Western Blot

irma/Nummor	Horkupft	Konzontration
iiiid/iiuiiiiiei	ΠΕΙΚΟΠΙ	KUIIZEIILI ALIUII
igma-Aldrich	Ziege, IgG	1:40 000
49917		
igma-Aldrich	Ziege, IgG	1:100 000
0545		
	rma/Nummer gma-Aldrich 9917 gma-Aldrich 0545	rma/Nummer Herkunft gma-Aldrich Ziege, IgG 9917 gma-Aldrich Ziege, IgG

3.6 ICC

3.6.1 Allgemeines

Bei der ICC handelt es sich um eine spezifische visuelle Nachweismethode vorhandener Proteine. Dabei wird zunächst ein primärer Antikörper aufgetragen, an den das Protein spezifisch bindet. Danach folgt die Zugabe eines mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpers, der wiederum mit der Primärantikörper-Protein-Verbindung einen Komplex bildet. Im Anschluss kann dieser durch ein Fluoreszenzmikroskop mit UV-Licht sichtbar gemacht und somit innerhalb der Zelle genau lokalisiert werden.

3.6.2 Protokoll lichtmikroskopische Immunfloureszenz

Zunächst wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1 beschrieben geerntet und gezählt. Danach wurden 24-*Wells*-Platten vorbereitet und pro *Well* ein steriles Deckgläschen eingelegt, mit 1 ml Medium befüllt und je 3 x 10³ Zellen hineinpipettiert. Die Platten wurden dann bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Unter täglicher mikroskopischer Kontrolle wurde das Wachstum der Zellen beobachtet und in der Regel nach zwei Tagen der eigentliche Versuch durchgeführt.

Dafür wurden zuerst die Deckgläschen mit einer Pinzette auf Parafilm gelegt und zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen. Die Wasch- und Inkubationslösungen wurden während des Versuchs zwischen den einzelnen Schritten mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Nach dem Waschen der Deckgläschen, mussten die Zellen zunächst mit 2 % Paraformaldehyd (s. Tabelle 22) in PBS bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubieren. Um das Paraformaldehyd vollständig zu entfernen, wurden die Deckgläschen erneut zweimal mit je 100 μl PBS gewaschen. Im nächsten Schritt mussten die Zellen permeabilsiert werden. Dazu wurden jeweils 100 μl 0,25 % Triton-X100 (s. Tabelle 22) auf die Zellen gegeben und für zehn Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur darauf belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläschen mehrfach mit PBS gewaschen. Der Waschvorgang wurde so oft wiederholt, bis Triton komplett entfernt war. Dies konnte dadurch kontrolliert werden, dass Triton die Oberflächenspannung auf den Deckgläschen auflöste und bei vollständiger Entfernung diese wiederhergestellt war.

Vor der Antikörperreaktion mussten die Zellen zunächst geblockt werden. Dafür wurde 1 % BSA (s. Tabelle 22) in PBS für 15 Minuten auf die Zellen gegeben.

Währenddessen konnte der ausgewählte Primärantikörper (s. Tabelle 23) mit 1 % BSA in PBS auf die erforderliche Konzentration verdünnt werden. Von der hergestellten Konzentration wurden anschließend 30 μ l auf jedes Deckgläschen pipettiert und für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

Zu beachten war dabei, mindestens ein Deckgläschen pro Antikörperwirt als Kontrolle ohne Primärantikörper mit 1 % BSA in PBS zu belassen. Der Primärantikörper wurde durch erneutes zweimaliges Waschen mit PBS von den Deckgläschen entfernt, bevor der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper (s.

Tabelle 24) aufgetragen werden konnte. Dieser wurde nach Herkunft des Wirts des Primärantikörpers ausgewählt und dementsprechend mit 1 % BSA in PBS verdünnt und erneut je 50 µl pro Deckgläschen, inklusive der Kontrollen, appliziert. Zu der Antikörperverdünnung wurde zusätzlich 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in der Konzentration 1 : 1000 zugefügt. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der die Zellkerne der CPCs anfärben sollte.

Es folgte erneut eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

Bevor die Deckgläschen auf einen Objektträger übertragen werden konnten, erfolgte ein weiterer zweimaliger Waschschritt mit PBS.

Vor dem Absaugen der Waschlösung wurden die Objektträger beschriftet und vorbereitet. Um die abgesaugten Deckgläschen darauf befestigen zu können, wurde jeweils ein Tropfen Mowiol (s. Tabelle 22) pro Deckgläschen auf den Objektträger gegeben, das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gegeben, angedrückt und das überschüssige Eindeckmedium abgesaugt.

Im Anschluss konnten die Zellen unterm Mikroskop fotografiert bzw. im Kühlschrank für einige Zeit aufbewahrt werden. Tabelle 22: Reagenzien ICC

Reagenz	Zusammensetzung
2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS	 0,5 g PFA in 25 ml PBS Bei ca 70 °C im Wasserbad lösen Lagerungsstabil für ca. vier Wochen bei 4 °C
0,25 % Triton X-100 in PBS	0,125 g Triton X-100 in 50 ml PBS - Lagerungsstabil für mehrere Wochen bei 4 °C
1 % Bovines Serumalbumin (BSA) in PBS	0,5 g BSA in 50 ml PBS sterifiltriert - Lösung aliquotiert bei - 20 °C
Mowiol	 20 g Mowiol in 80 ml PBS für 24 h rühren 40 ml Glycerin hinzugeben weitere 24 h rühren Lösung 15 Minuten bei 10 000 g zent- rifugieren Überstand in 1 ml Aliquots bei - 20 °C
ΠΑΡΙ	-

3.6.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 23: Primärantikörper ICC

Firma/Nummer	Herkunft, Klonalität	Konzentration
BD Biosciences/610	Maus, IgG,	1:2000
633	monoklonal	
Proteintech, 13967-	Kaninchen, IgG,	1:1000
1-AP	polyklona	
Santa Cruz/sc23950	Maus, IgG,	1:1000
	monoklonal	
	Firma/Nummer BD <i>Biosciences</i> /610 633 <i>Proteintech</i> , 13967- 1-AP Santa Cruz/sc23950	Firma/NummerHerkunft, KlonalitätBD Biosciences/610Maus, IgG,633monoklonalProteintech, 13967-Kaninchen, IgG,1-APpolyklonaSanta Cruz/sc23950Maus, IgG,monoklonalmonoklonal

Sekundärantikörper	Firma/Nummer	Herkunft	Konzentration
Anti-Kaninchen	H&L Alexa-	Esel, IgG, polyklonal	1:1000
	Fluor/555 ab35p		
Anti-Maus	H&L Alexa-	Ziege, IgG,	1:1000
	Fluor/555 ab36p	polyklonal	

3.7 Scratch-Assay

3.7.1 Allgemeines

Das *Scratch-Assay* ist eine Methode, um die Migrationsrate von Zellen in vitro nachzuweisen. Dafür werden Zellen ausgesät und mit einem Stempel ein *Scratch* in der Zellmonoschicht erzeugt. In vorher festgelegten Zeitintervallen wird der dadurch zunächst zellfreie Korridor wiederholt unterm Lichtmikroskop fotografiert. So kann die Migration der Zellen in diesen Korridor dokumentiert und anschließend visuell quantifiziert werden. Der Versuch wurde jeweils drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

3.7.2 Protokoll Scratch-Assay

Die Zellen für den Assay wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben geerntet und in spezielle 24-*Wells*-Platten mit 1 ml Medium pro *Well* ausgesät. In der Regel wurden in jedes *Well* 3 x 10⁴ Zellen hineinpipettiert. Die Platten wurden dann bei 37 °C im Inkubator gelagert und regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Nach ca. 48 h war eine Konfluenz von 80 % erreicht, wonach der *Scratch* mit einem speziell dafür ausgelegten Stempel horizontal in jedes *Well* gesetzt wurde. Der durch den Stempel gebildete zellfreie Korridor entspricht einer Größe von 9,75 mm². Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und neues Kultivierungsmedium appliziert. Jeder *Scratch* wurde anschließend kontrolliert und bei Stunde null unter dem Lichtmikroskop bei 50-facher Vergrößerung fotografiert. Dabei wurden Vergrößerung, Helligkeit und Belichtungszeit dokumentiert, um spätere Bilder unter gleichbleibenden Bedingungen machen zu können. Zwischen den einzelnen Bildintervallen wurden die Platten wieder im Inkubator gelagert. Die Fotografien wurden nach 6, 24 und 48 h wiederholt. Die Auswertung erfolgte visuell durch Ausmessen des vorher definierten *Scratch*-Korridors und Auszählen der darin befindlichen Zellen.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die zu Beginn gestellten Forschungsfragen durch diverse Nachweismethoden beantwortet.

Der für die erste und zweite Forschungsfrage relevante Nachweis des primären Ciliums in den Zelllinien CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO wurde sowohl vor als auch nach einer ITGA5 Hemmung durch drei unterschiedliche Nachweismethoden erbracht. Ferner erfolgte der Nachweis sowohl auf zellulärer Ebene mit Hilfe der ICC als auch auf mRNA Eben durch qPCR und schließlich auf Proteinebene durch den Western Blot.

Um die dritte Forschungsfrage nach der Migration der Zelllinien vor und nach der Hemmung von ITGA5 zu lösen, wurde ein *Scratch-Assay* durchgeführt.

Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die qPCR-Ergebnisse beruhen auf drei Mittelwerten aus drei Triplets, während auch bei den Western Blots mindestens drei Werte aufgenommen wurden. Auch die ICC wurde an drei unterschiedlichen Tagen mit je drei Proben pro Zelllinie pro Antikörper durchgeführt, wobei jeweils eine repräsentative Abbildung dargestellt wird. In allen für die ICC ausgewählten Abbildungen zeigt Bild A die jeweilige Overlaydarstellung, Bild B die reine Alexa-Fluor[®] 555 Färbung und Bild C die durch DAPI blau angefärbten Zellkerne.

In den grafischen Darstellungen der statistischen Auswertungen der qPCR und der Western Blots wurde die Signifikanz mit p < 0,05 mittels des Zeichens "*" oder p < 0,01 mit "**" dargestellt, während hochsignifikante Ergebnisse p < 0,001 durch "***" gekennzeichnet wurden. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben.

Die detaillierten Beschreibungen zur jeweiligen Versuchsdurchführung sind Kapitel 3 zu entnehmen.

4.1 Ciliennachweis in CPC 241 hT vor und nach dem Knockout von Rab5c

4.1.1 Nachweis auf zellulärer Ebene durch ICC

Im Rahmen dieses Versuchs wurden alle Zellkerne zur besseren Orientierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau angefärbt.

4.1.1.1 Das primäre Cilium in CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO

Die Abbildung 1 zeigt den Nachweis des primären Ciliums durch die Primärantikörper IFT88 in den Zellen der Zelllinie CPC 241 hT, Abbildung 2 in den CPC 241 hT Rab5c KO. Der rote Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor[®] 555 markiert in den jeweiligen Overlay-Darstellungen das primäre Cilium und ermöglicht so die eindeutige Lokalisierung.



Abbildung 1: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT durch IFT88. Die primären Cilien sind als rote Fluoreszenz sowohl in der Overlay-Darstellung (A) als auch in der reinen Alexa-Fluor® 555-Färbung (B) zu erkennen. Die Zellkerne sind durch die blaue DAPI-Färbung gekennzeichnet (A, A', C). Der Pfeil zeigt auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen und primären Cilien aus dem Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 1000 Verdünnung.



Abbildung 2: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT Rab5c KO durch IFT88.

Die rote Fluoreszenz zeigt in der Overlay-Darstellung (A) und in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (B) primäre Cilien. Durch den blauen Farbstoff DAPI sind die Zellkerne der CPCs gekennzeichnet (A, A', C). Der Pfeil verweist auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen und primären Cilien aus dem Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 1000 Verdünnung.

Ein weiterer Ciliennachweis erfolgte über den Antikörper gegen acetyliertes α -Tubulin gerichtet, dessen Lokalisation sowohl in Abbildung 3 bei den CPC 241 hT als auch in Abbildung 4 bei den CPC 241 hT Rab5c KO zu erkennen ist.



Abbildung 3: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT durch acetyliertes α -Tubulin.

In der Overlay-Darstellung (A) und in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (B) zeigen sich die primären Cilien durch den roten Fluoreszenznachweis des acetylierten α -Tubulins. Der blaue Farbstoff DAPI kennzeichnet die Zellkerne der CPCs (A, A', C). Der Pfeil weist auf einen vergrößerten Ausschnitt mit Zellkernen und primären Cilien aus dem Bild A hin. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 1000 Verdünnung.



Abbildung 4: Exemplarische ICC – Nachweis sowie Lokalisation des primären Ciliums in CPC 241 hT Rab5c KO durch acetyliertes α -Tubulin.

Die Lokalisation der primären Cilien ist sowohl In der Overlay-Darstellung (A) als auch in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (B) durch die rote Fluoreszenz des acetylierten α -Tubulins zu erkennen. Die Zellkerne der CPCs sind durch DAPI blau angefärbt (A, A', C). Der Pfeil verweist auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen und primären Cilien aus dem Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 1000 Verdünnung.

4.1.1.2 Negativkontrollen

Für die Negativkontrollen wurden beide Zelllinien ohne Primärantikörper und stattdessen nur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert.

Abbildung 5 zeigt die Negativkontrolle der Zelllinien CPC 241 hT, Abbildung 6 zeigt die Negativkontrolle der CPC 241 hT Rab5c KO nach Inkubation mit dem *anti-mouse*-Sekundärantikörper. Weder in der Overlay-Darstellung (jeweils A) noch in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (jeweils B) ist die rote Fluoreszenz des primären Ciliums sichtbar.



Abbildung 5: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT des Versuchs in 4.1.1.1. In der Negativkontrolle ist keinerlei Fluoreszenz der primären Cilien zu erkennen. Weder die Overlay-Darstellung (A) noch die reine Alexa-Fluor® 555-Färbung (B) zeigen rote Fluoreszenz. Die Zellkerne sind durch den blauen Farbstoff DAPI angefärbt (A, C). Vergrößerung x 20.



Abbildung 6: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO des Versuchs in 4.1.1.1.

Die Negativkontrolle zeigt weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (B) rote Fluoreszenz der primären Cilien. Lediglich die Zellkerne der CPCs sind durch den blauen Farbstoff DAPI gekennzeichnet (A, C). Vergrößerung x 20.

In der Abbildung 7 und Abbildung 8 wurden beide Zelllinien jeweils mit dem *anti-rabbit*-Sekundärantikörper inkubiert. Wie der Overlay-Darstellung (jeweils A) und der Färbung Alexa-Fluor[®] 555 (jeweils B) zu entnehmen ist, ist auch hier keine Fluoreszenz des primären Ciliums zu erkennen.



Abbildung 7: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT in Versuch 4.1.1.1. Die Negativkontrolle der CPC 241 hT weit weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der reinen Alexa-Fluor® 555-Färbung (B) eine rote Fluoreszenz der primären Cilien auf. Durch den blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI sind die Zellkerne markiert (A, C). Vergrößerung x 20.



Abbildung 8: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO in Versuch 4.1.1.1. In der Negativkontrolle ist keine rote Fluoreszenz der primären Cilien in der Overlay-Darstellung (A) oder in der reinen Alexa-Fluor® 555-Färbung (B) zu erkennen. Die blaue Fluoreszenz zeigt die durch DAPI markierten Zellkerne (A, C). Vergrößerung x 20.

4.1.2 Cilienachweis auf mRNA Ebene durch qPCR mit IFT88

Für den Ciliennachweis auf mRNA Ebene wurde mit der qPCR das Genexpressionslevel von IFT88 in der unbehandelten Zelllinie CPC 241 hT und der durch den Knockout modifizierten Zelllinie CPC 241 hT Rab5c KO untersucht (Abbildung 9). Die erste Säule stellt den mRNA-Level in den unbehandelten CPCs dar. Anhand der zweiten Säule kann eine Abnahme des mRNA-Levels für IFT88 festgestellt werden. Sie zeigt eine hochsignifikante Abnahme des Genexpressionslevels von ca. 80 % (0,24 ± 0,07; p < 0,001).



Abbildung 9: Auswertung der RT-PCR

Relative Quantifizierung des mRNA-Levels von IFT88 in CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 27.

4.1.3 Ciliennachweis auf Proteinebene durch Western Blot

4.1.3.1 Ciliennachweis auf Proteinebene mit IFT88

Die Abbildung 10 zeigt die Existenz des primären Ciliums durch den Nachweis von IFT88 auf Proteinebene. Die Proben wurden aus CPC's aus CPC 241 hT Rab5c KO (2) entnommen und mit den Kontrollzellen der CPC 241 hT (1) verglichen. Der Proteinmarker zeigt in der Coomassie-Färbung die verschiedenen Molekulargewichte (*molecular weight* = MW) der aufgetrennten Proteine (A). Dabei liegt das MW von IFT88 bei 94 kDa. Als Kontrollbande dient α -Tubulin mit einem MW von 55 kDa (B).



Abbildung 10: Western Blot-Analyse – Nachweis von IFT88

Der Nachweis von IFT88 konnte sowohl in den CPC 241 hT (1) als auch in den CPC 241 hT Rab5c KO (2) erbracht werden. A zeigt die aufgetrennten Proteine in der Coomassie-Färbung nach der Protein-Gelelektrophorese. B stellt die antikörpermarkierte Proteinbanden von IFT88 bei 95 kDa und der Kontrollbande α -Tubulin bei 55 kDa dar. n = 3.

IFT88 konnte sowohl in den CPC 241 hT als auch in CPC 241 hT Rab5c KO nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch ein hochsignifikanter Anstieg (p < 0,001) von IFT88 um knapp 60 % (1,56 ± 0,08) durch den Rab5c Knockout wie Abbildung 11 zu entnehmen ist. Der Western Blot wurde drei Mal durchgeführt mit drei unterschiedlichen Zellpassagen.



Abbildung 11: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie

Die Darstellung zeigt den relativen Proteinlevel von IFT88 der CPC 241 hT Rab5c KO (rechter Balken) im Vergleich zur Kontrolle CPC 241 hT (linker Balken). Es wurde gegen α -Tubulin normalisiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 3.

4.1.3.2 Ciliennachweis auf Proteinebene mit acetyliertem α -Tubulin

Abbildung 12 beweist das Vorhandensein des primären Ciliums durch den Nachweis von acetyliertem α -Tubulin. Für die Proben wurden CPCs aus CPC 241 hT (1) und CPC 241 hT Rab5c KO (2) verwendet. Probe 1 dient hierbei als Kontrolle, indem sie mit der Probe 2 verglichen wurde. In der Coomassie-Färbung zeigt der Proteinmarker die unterschiedlichen MW der aufgetrennten Proteine (A). Das MW von acetyliertem α -Tubulin liegt bei 55 kDa (B), ebenso wie das MW von α -Tubulin, das als Kontrollbande dient (C).



Abbildung 12: Western Blot-Analyse – Nachweis von acetyliertem α -Tubulin

Acetyliertes α -Tubulin konnte in CPC 241 hT (1) und CPC 241 hT Rab5c KO (2) nachgewiesen werden. Die Coomassie-Färbung zeigt die Aufteilung der Proteine durch die Protein-Gelelektrophorese (A). B zeigt die antikörpermarkierte Proteinbanden des acetylierten α -Tubulins bei 55 kDa. Die in C abgebildeten antikörpermarkierte Proteinbanden durch α -Tubulin ebenfalls bei 55 kDa dienen als Kontrolle. n = 3.

Acetyliertes α -Tubulin wurde in beiden Proben nachgewiesen. Allerdings ist bei der durch den Rab5c Knockout modifizierten Probe 2 eine hochsignifikante Abnahme (p < 0,001) von acetylierten α -Tubulin um mehr als 50 % (0,45 ± 0,10) zu erkennen (Abbildung 13). Der Western Blot wurde mit drei unterschiedlichen Zellpassagen drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.



Abbildung 13: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie

Die Darstellung zeigt den relativen Proteinlevel von acetyliertem α -Tubulin in den CPC 241 hT Rab5c KO (rechter Balken) im Vergleich zur Kontrolle (linker Balken). Es wurde gegen α -Tubulin normalisiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 3.

4.2 Ciliennachweis nach der Hemmung von ITGA5

Um die Existenz des primären Ciliums bei CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO auch nach der Hemmung von ITGA5 nachzuweisen, wurden die äquivalenten Nachweismethoden wie in Kapitel 4.1 verwendet.

4.2.1 Nachweis auf zellulärer Ebene durch ICC

Für alle unter Kapitel 4.2.1 aufgeführten Versuche wurden die Zellkerne zur besseren Orientierung mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt.

4.2.1.1 Die erfolgreiche Hemmung von ITGA5

Um den Erfolg der wie in Kapitel 3.3 beschriebenen ITGA5 Hemmung der Zelllinien CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO zu überprüfen, wurden für beide Zelllinien sowohl vor als auch nach der Hemmung die ICC als Kontrolle durchgeführt.

Dabei zeigen die folgenden beiden Abbildungen das durch Alexa-Fluor[®] 555 rot markierte ITGA5 sowohl in den CPC 241 hT (Abbildung 14) als auch in den CPC 242 hT Rab5c KO (Abbildung 15) vor der Hemmung durch ATN 161.



Abbildung 14: Exemplarische ICC - Nachweis von ITGA5 in CPC 241 hT.

ITGA5 zeigt sich als rote Fluoreszenz sowohl in der Overlay-Darstellung (A) als auch in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (B). Die Zellkerne sind durch die blaue DAPI-Färbung gekennzeichnet (A, A', C). Der Pfeil zeigt auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen aus dem Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 2000 Verdünnung.



Abbildung 15: Exemplarische ICC - Nachweis von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO.

Sowohl die Overlay-Darstellung (A) als auch die reine Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (B) weist die rote Fluoreszenz von ITGA5 auf. Die Markierung der Zellkerne erfolgt durch die blaue DAPI-Färbung (A, A', C). Der Pfeil zeigt auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen aus dem Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 2000 Verdünnung.

Die Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen beide Zelllinien nach der Hemmung. Weder in der Overlaydarstellung der CPC 241 hT (Abbildung 16 A) noch in der der CPC 241 hT Rab5c KO (Abbildung 17 A) lässt sich ITGA5 lokalisieren, es sind einzig und allein die durch DAPI markierten blauen Zellkerne zu sehen.



Abbildung 16: Exemplarische ICC – Nachweis der erfolgreichen Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT durch ATN 161.

Nach der Hemmung von ITGA5 durch ATN 161 ist weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der reinen Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) eine rote Fluoreszenz zu erkennen. ITGA5 kann nicht mehr nachgewiesen werden. Lediglich die Zellkerne sind in Bild A und C durch die blaue DAPI-Färbung zu erkennen. Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 2000 Verdünnung.



Abbildung 17: Exemplarische ICC - Nachweis der erfolgreichen Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO durch ATN 161.

ITGA5 ist weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der reinen Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) durch rote Fluoreszenz zu erkennen. Als blaue Fluoreszenz zeigen sich die durch den blauen Farbstoff DAPI markierten Zellkerne (A, C). Vergrößerung x 20, n = 9, hier: 1 : 2000 Verdünnung.

Die Negativkontrollen sind exemplarisch in Kapitel 4.1.1.2 für die ungehemmten CPCs und in Kapitel 4.2.1.3 für die gehemmten CPCs je beider Zelllinien dargestellt.

4.2.1.2 Das primäre Cilium nach der Hemmung von ITGA5

Um die Existenz des primären Ciliums nach der Hemmung von ITGA5 zu überprüfen, wurden erneut die in Kapitel 4.1.1.1 gebrauchten Antikörper für die nun erfolgreich gehemmten Zelllinien (s. Kapitel 4.2.1.1) verwendet.

Den folgenden beiden Abbildungen ist der Nachweis acetylierten α-Tubulins zu entnehmen. Sowohl in den Zellen der gehemmten CPC 241 hT (Abbildung 18) als auch in denen der gehemmten CPC 241 hT Rab5c KO (Abbildung 19) lässt sich dadurch das primäre Cilium als rote Fluoreszenz lokalisieren.



Abbildung 18: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch acetyliertes α -Tubulin nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT.

Auch nach der Hemmung von ITGA5 zeigen sich sowohl in der Overlay-Darstellung (A) als auch in der reinen Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) primäre Cilien als rote Fluoreszenz. Zur besseren Übersicht sind die Zellkerne durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau angefärbt (A, C). Der Pfeil zeigt auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen und primären Cilien aus Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier 1 : 1000 Verdünnung.



Abbildung 19: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch acetyliertes α -Tubulin nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO.

Trotz Hemmung von ITGA5 weist sowohl die Overlay-Darstellung (A) als auch die reine Alexa-Fluor®-Färbung (B) primäre Cilien als rote Fluoreszenz auf. Die Zellkerne sind durch den blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt (A, C). Der Pfeil verweist auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen und primären Cilien aus Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier 1 : 1000 Verdünnung.

Auch IFT88 konnte nach der Hemmung in beiden Zelllinien nachgewiesen und so das primäre Cilium lokalisiert werden, wie Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen.



Abbildung 20: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch IFT88 nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT.

IFT88 konnte nach Hemmung von ITGA5 sowohl in der Overlay-Darstellung (A) als auch in der reinen Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) in den primären Cilien als rote Fluoreszenz nachgewiesen werden. Als blaue Fluoreszenz sind die durch den Farbstoff DAPI markierten Zellkerne zu erkennen (A, C). A' zeigt einen vergrößerten Ausschnitt mit Zellkernen und primären Cilien aus Bild A. Vergrößerung x 20, n = 9, hier 1 : 1000 Verdünnung.



Abbildung 21: Exemplarische ICC - Nachweis und Lokalisation des primären Ciliums durch IFT88 nach der Hemmung von ITGA5 in CPC 241 hT Rab5c KO.

Die rote Fluoreszenz der primären Cilien zeigt sich auch nach der Hemmung in der Overlay-Darstellung (A) und in der reinen Alexa-Fluor[®]-Färbung (B). Die blaue Fluoreszenz markiert die durch den Farbstoff DAPI angefärbten Zellkerne (A, C). Durch den Pfeil wird auf einen vergrößerten Ausschnitt (A') mit Zellkernen und primären Cilien aus Bild A verwiesen. Vergrößerung x 20, n = 9, hier 1 : 1000 Verdünnung.

4.2.1.3 Negativkontrollen

Die Negativkontrollen für die Darstellungen mit beiden nicht gehemmten Zelllinien sind Kapitel 4.1.1.2 zu entnehmen.

Auf den folgenden beiden Abbildungen sind die jeweiligen Negativkontrollen der gehemmten Zelllinien CPC 241 hT (Abbildung 22) und CPC 241 hT Rab5c KO (Abbildung 23) nach alleiniger Inkubation mit dem *anti-mouse*-Sekundärantikörper zu sehen. Die rote Fluoreszenz zeigt sich weder in der Overlay-Darstellung (jeweils A) noch in der reinen Alexa-Fluor[®] 555-Färbung (jeweils B).



Abbildung 22: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.2.

Es zeigt sich keinerlei rote Fluoreszenz in der Negativkontrolle. Weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) sind primäre Cilien zu sehen. Durch DAPI wurden die Zellkerne blau markiert (A, C). Vergrößerung x 20.



Abbildung 23: Negativkontrolle anti-mouse-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.2.

Die Negativkontrolle weist weder in der Overlay-Darstellung noch in der Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) eine rote Fluoreszenz der primären Cilien auf. Lediglich in Bild A und C zeigt sich die blaue Fluoreszenz der durch DAPI markierten Zellkerne (A, C). Vergrößerung x 20.

Abbildung 24 und Abbildung 25 präsentieren die nur mit *anti-rabbit*-Sekundärantikörper inkubierten Zellen der CPC 241 hT (Abbildung 24) und der CPC 241 hT Rab5c KO (Abbildung 25). Auch hier ist bei der Overlay-Darstellung (jeweils A) und der Färbung mit Alexa-Fluor[®] 555 (jeweils B) keinerlei rote Fluoreszenz zu erkennen.



Abbildung 24: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.2.

Die Negativkontrolle zeigt keine Fluoreszenz der primären Cilien – weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der reinen Alexa-Fluor®-Färbung (B). Durch DAPI sind die Zellkerne der CPCs blau markiert (A, C). Vergrößerung x 20.



Abbildung 25: Negativkontrolle anti-rabbit-Sekundärantikörper der CPC 241 hT Rab5c KO der Versuche in 4.2.1.1 und 4.2.1.2.

In der Negativkontrolle ist keinerlei Fluoreszenz der primären Cilien zu erkennen. Weder in der Overlay-Darstellung (A) noch in der reinen Alexa-Fluor[®]-Färbung (B) sind rote Fluoreszenzen zu sehen. Durch DAPI sind die Zellkerne der CPCs blau markiert (A, C). Vergrößerung x 20.

4.2.2 Nachweis auf mRNA Ebene durch qPCR vor und nach der

Hemmung

Nach der Hemmung durch ATN 161 wurde erneut das Genexpressionslevel von IFT88 der CPCs mit Hilfe der qPCR bestimmt, was der Abbildung 26 zu entnehmen ist. Die erste Säule stellt den mRNA-Level der gehemmten CPC 241 hT dar. Die zweite Säule zeigt eine hochsignifikante Zunahme der Genexpression für IFT88 in den CPC 241 Rab5c KO nach der ITGA5 Hemmung. Es konnte ein Anstieg des mRNA-Levels um das fast 4,4fache festgestellt werden (5,36 ± 0,87; p < 0,001).



Abbildung 26: Auswertung der RT-PCR

Relative Quantifizierung des mRNA-Levels von IFT88 in CPC 241 hT (linker Balken) und CPC 241 hT Rab5c KO (rechter Balken) nach der Hemmung von ITGA5 durch ATN 161. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 27.

Vergleicht man den relativen mRNA Level von IFT88 der CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO vor (s. 4.1.2) und nach (4.2.2) der Hemmung durch ATN 161, so ist eine hochsignifikante Zunahme von mehr als 500 % zu erkennen (Abbildung 27). Die erste Säule zeigt die Genexpression von IFT88 in den CPC 241 Rab5c KO vor der ITGA5 Hemmung (0,24 ± 0,07; p < 0,001). Der Genexpressionslevel von IFT88 nach der Hemmung der CPC 241 hT Rab5c KO ist der zweiten Säule zu entnehmen (5,36 ± 0,87; p < 0,001).



Abbildung 27: Vergleich der relativen mRNA-Level von IFT88 vor und nach der Hemmung von ITGA5 Gegenüberstellung der relativen mRNA-Level von IFT88 in CPC 241 hT Rab5c KO vor (linker Balken) und nach (rechter Balken) der Hemmung durch ATN 161. Die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 27.

4.2.3 Nachweis auf Proteinebene durch Western Blot mit IFT88

Abbildung 28 zeigt den Nachweis des primären Ciliums nach der ITGA5 Hemmung der CPCs durch ATN 161. Es wurden für die Proben die zuvor mit ATN 161 behandelten CPC der Zelllinien CPC 241 hT (1) und CPC 241 hT Rab5c KO (2) verwendet. Dabei dient Probe 1 als Kontrolle, mit der Probe 2 verglichen wurde. Die unterschiedlichen MW der aufgetrennten Proteine werden durch den Proteinmarker in der Coomassie-Färbung gezeigt (A). Die Proteinbande von IFT88 ist bei seinem MW von 94 kDa zu sehen, während α -Tubulin mit einem MW von 55 kDa als Kontrollbande dient (B).



Abbildung 28: Western Blot-Analyse – Nachweis von IFT88 nach der Hemmung von ITGA5. Darstellung der durch die Protein-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden der CPC 241 hT (1) und CPC 241 hT Rab5c KO (2) in der Coomassie-Färbung (A). Die antikörpermarktierten Proteinbanden von IFT88 bei 94 kDa und der Kontrollbande α -Tubulin bei 55 kDa sind sowohl in Probe 1 als auch in Probe 2 zu erkennen. n = 3.

IFT88 konnte in beiden Proben nachgewiesen werden. Probe 2 zeigt jedoch im Vergleich mit Probe 1 eine hochsignifikante Abnahme (p < 0,001) von IFT88 um ca. 53 % (0,53 \pm 0,03) (C). Vergleicht man das relative Proteinlevel von IFT88 in den CPC 241 hT Rab5c KO vor der Hemmung von ITGA5 (s. 4.1.3.1) mit den CPC 241 hT Rab5c KO nach der Hemmung (s. 4.1.3.1) miteinander, so zeigt sich nach der Hemmung eine hochsignifikante Abnahme (p < 0,001) von IFT88 (Abbildung 29).



Abbildung 29: Auswertung der Western Blots mittels Densitometrie

Darstellung des relativen Proteinlevels von durch ATN 161 gehemmten CPC 241 hT Rab5c KO (rechter Balken) im Vergleich zur Kontrolle (linker Balken). Die Normalisierung erfolgte gegen α -Tubulin. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 3.

Abbildung 30 zeigt den Vergleich vor und nach der Hemmung jeweils in Bezug auf die Kontrollzellen der Linie CPC 241 hT Rab5c KO.


Abbildung 30: Vergleich der relativen Protein-Level von IFT88 vor und nach der Hemmung von ITGA5 Gegenüberstellung der relativen Proteinlevel von IFT88 in den CPC 241 hT Rab5c KO vor der Hemmung durch ATN 161 (linker Balken) und CPC 241 hT Rab5c KO nach der Hemmung (rechter Balken). Die Fehlerbalken kennzeichnen die jeweilige Standardabweichung. ***p < 0,001; n = 3.

4.3 Migrationsvergleich der gehemmten und nicht gehemmten Zellen durch *Scratch* Assay

Um die Migrationsfähigkeit der CPC 241 hT Rab5c KO mit den Kontrollzellen der Linie CPC 241 hT vor (Abbildung 31) und nach der erfolgreichen Hemmung von ITGA5 durch ATN 161 (Abbildung 32) zu vergleichen, wurde ein Scratch Assay durchgeführt. Es wurde durch einen Stempel eine gerade Linie Zellen in einem Well einer 24-Well-Platte entfernt und über 48 h beobachtet. Eine Zählung der Zellen erfolgte nach 6 und 24 h. Nach 48 h war der Korridor bei allen vier Zelllinien gänzlich geschlossen.





6 h

48 h









Im Vergleich der ungehemmten CPC 241 hT Rab5c KO mit der CPC-Kontrollgruppe ist festzustellen, dass sich weder nach 6 h noch nach 24 h ein signifikanter Unterschied (p < 0,05) zwischen den in den Korridor migrierten Zellen ergibt.

Vergleicht man die Probe der CPC 241 hT Rab5c KO mit den CPC 241 hT je nach deren Hemmung von ATN 161, so zeigt sich nach 6 h ein hochsignifikanter Unterschied (p < 0,001). Es migrierten ca. drei Mal so viele CPCs der Kontrollzelllinie in den *Scratch* Korridor wie die der Linie CPC 241 hT Rab5c KO. Nach 24 h ist die Zahl der migrierten Zellen der Kontroll-CPCs zwar im Gegensatz zu den CPC 241 hT Rab5c KO gestiegen, zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied (p > 0,05).

Vergleicht man allerdings die gehemmten CPCs mit den ungehemmten Zelllinien zeigen sich signifikante Unterschiede. Sowohl nach 6 h (p < 0,05) als auch nach 24 h (p < 0,05) migrierten jeweils mehr als doppelt so viele der ungehemmten wie die der gehemmten CPC 241 hT.

Auch der Vergleich zwischen den gehemmten und ungehemmten CPC 241 hT Rab5c KO zeigt hochsignifikante Ungleichheiten. Nach 6 h migrierten fast achtfach so viele der ungehemmten wie die der gehemmten Rab5c-Knockout-Zellen (p < 0,001), nach 24 h noch mehr als dreifach so viele (p < 0,001).

Es ist bei allen Zellkulturen eine Migration zweifelsfrei erkennbar, die nach 48 h zu einem kontinuierlichen Schluss des Korridors führt.

5 Diskussion

Die chronische Gelenkerkrankung OA ist die häufigste Form aller muskulo-skelettalen Erkrankungen der heutigen Gesellschaft. Sie betrifft vor allem Menschen höheren Alters, weshalb die Häufigkeit aufgrund des stetig steigenden Bevölkerungsalters weiter zunehmen wird. Sie geht einher mit pathologischen Knorpelumbauprozessen, die zu Schmerzen, Bewegungseinschränkungen bis hin zum totalen Verlust der Beweglichkeit in den betroffenen Gelenken führen können. Bisher sind die Therapiemöglichkeiten noch sehr limitiert. Derzeit kann durch analgetische Therapie zwar eine Linderung der Symptome bewirkt werden, in späten Stadien der Ostoarthrose ist allerdings der Gelenkersatz meist die einzige Therapiemöglichkeit, um starke Schmerzen und Einschränkungen im täglichen Leben zu beheben (Lohmander und Roos 2007).

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicolai Miosge forscht unter anderem an der Entwicklung einer möglichen regenerativen Therapie bei OA. Mit der Entdeckung und Isolierung der stammzellähnlichen chondrogenen Progenitorzellen aus Knieknorpel im späten Stadium einer OA, eröffneten sich neue Forschungsansätze, um die Geweberegeneration in osteoarthritisch verändertem Knorpel anzuregen, zu manipulieren und dies für therapeutische Zwecke zu nutzen (Koelling et al. 2009). Durch die natürlichen Reparaturmechanismen des durch OA geschädigtem Knorpel wird Kollagen Typ I statt des physiologisch vorkommenden Kollagen Typ II produziert und Faserknorpel gebildet. Dieser unterscheidet sich zu gesundem Knorpel durch eine geminderte Widerstandsfähigkeit und geringere mechanische Belastbarkeit (Tesche und Miosge 2004).

Ein Ansatz für neue Therapiemöglichkeiten ist die gezielte Manipulation der CPCs, um deren migratorisches Potenzial und die Multipotenz für die Bildung von Reparaturgewebe zu nutzen, das dem faserknorpeligen Ersatzgewebe in seinen mechanischen Eigenschaften überlegen und vergleichbar mit dem physiologischen Knorpelgewebe ist (Koelling et al. 2009). Bei der Steigerung des chondrogenen Potenzials spielen der Transkriptionsfaktor RUNX-2 und sein Interaktionspartner Rab5c eine bedeutende Rolle. Durch einen Knockout von Rab5c könnten chondrogene Marker vermehrt exprimiert und die Bildung eines höherwertigen Knorpelersatzgewebes erreicht werden (Janssen et al. 2021). Um diesen vielversprechenden Ansatz weiterzuverfolgen, müssen verschiedene Faktoren gewährleistet sein. Unter anderem muss ausgeschlossen werden, dass lebenswichtige Organellen der CPCs durch den Knockout von Rab5c nicht geschädigt werden oder gar fehlen. Des Weiteren darf auch die Migration der CPCs nicht gehemmt oder negativ beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von Rab5c und den Einfluss von Rab5c in Verbindung mit der Hemmung von ITGA5 auf die Ciliogenese und das Migrationsverhalten der CPCs zu untersuchen. Der Knockout von Rab5c erfolgte bereits im Vorfeld durch Christa Bode per *CRISPR/Cas*-Methode. Die CPCs der modifizierten Zelllinie CPC 241 hT Rab5c KO wurde zeitgleich mit den CPC 241 hT zweidimensional kultiviert. Im Anschluss wurden per ICC, qPCR und Western Blot für das primäre Cilium essentielle Proteine (IFT88, acetyliertes α -Tubulin) ermittelt, um Rückschlüsse auf eine eventuelle Beeinträchtigung der Ciliogenese durch den Knockout zu ziehen.

Zur erfolgreichen Hemmung von ITGA5 wurden beide Zelllinien zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen des Hemmstoffs ATN 161 über unterschiedliche Zeiträume behandelt und der jeweilige Hemmerfolg per ICC überprüft. Mit der dadurch festgelegten Konzentration wurde wurden die CPCs beider Zelllinien über den ermittelten Zeitraum in mit dem Hemmstoff versetztem Medium inkubiert. Um den Einfluss der Hemmung von ITGA5 in Verbindung mit dem Knockout von Rab5c auf die Entwicklung des primären Ciliums zu untersuchen, wurde analog zum oben beschriebenen Procedere der Versuchsablauf wiederholt.

Um etwaige Unterschiede im Migrationsverhalten der gehemmten und ungehemmten CPCs vor und nach dem Knockout von Rab5c feststellen zu können, wurde ein *Scratch* Assay durchgeführt.

5.1 Die Rolle des primären Ciliums bei OA

Mit seinen sensorischen Funktionen und der Beteiligung an der Zellproliferation und -entwicklung gilt das primäre Cilium als lebenswichtige Organellen von Zellen (Seeley und Nachury 2010). Dessen Aplasie, Dysplasie oder Dysfunktionalität kann zu weitreichenden Missbildungen und Dysfunktionen von Organen und zu weiteren Erkrankungen führen (Omran und Olbrich 2010; Sharma et al. 2011). Bereits 1978 konnten Wilsman und Fletcher primäre Cilien in neonatalen artikulären Chondrozyten von Hunden nachweisen (Wilsman und Fletcher 1978). Zwei Jahre später wurde auch in aus Ratten isolierten Chondrozyten die Existenz primärer Cilien gezeigt (Wilsman et al. 1980). Mittels Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie konnten auch humane Chondrozyten aus osteoarthritischen Kniegelenksknorpelproben untersucht und die Existenz primärer Cilien gezeigt werden (Kouri et al. 1996). Durch Immmunhistochemie und Histochemie wurden auch in bovinen Knorpelzellen, die an OA erkrankt waren, primäre Cilien durch acetyliertes α -Tubulin identifiziert (McGlashan et al. 2008). In aus dem Knochenmark isolierten mesenchymalen Stammzellen wurden primäre Cilien ebenfalls durch acetyliertes α -Tubulin nachgewiesen (Coughlin et al. 2016).

Es konnte festgestellt werden, dass der Verlust von primären Cilien im Knorpelgewebe zur Verringerung der mechanischen Eigenschaften führen können und sie für die Entwicklung eines mechanisch funktionellen Gelenkknorpels von großer Bedeutung sind (Irianto et al. 2014). Um einen möglichen Therapieansatz mit den durch den Knockout von Rab5C modifizierten CPCs weiterzuverfolgen, scheint die Anwesenheit des primären Ciliums nach dem Knockout essentiell.

5.2 Der Einfluss von Rab5c auf die Ciliogenese der CPCs

Um den Einfluss des Knockouts von Rab5c auf die Ciliogenese der CPCs zu festzustellen, wurden die modifizierten CPCs und die entsprechenden Kontrollgruppen auf unterschiedlichen Ebenen untersucht.

Auf zellulärer Ebene erfolgte der Nachweis durch die ICC. Dabei wurde das primäre Cilium mit Hilfe der Antikörper acetyliertes α -Tubulin und IFT88 detektiert. Sowohl bei den modifizierten CPCs als auch bei der Kontrollgruppe konnte das primäre Cilium visuell nachgewiesen werden (s. 4.1.1). Eine entsprechende Quantifizierung erfolgte hierbei nicht. Des Weiteren wurde eine qPCR durchgeführt, um das mRNA Level von IFT88 zu bestimmen, um so auf die Existenz des primären Ciliums zu schließen. Es zeigte sich bei den CPC 241 hT Rab5c KO zwar eine signifikante Abnahme der mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle (s. 4.1.2), jedoch konnte die Existenz von IFT88 und somit des primären Ciliums nachgewiesen werden. Durch den Western Blot konnte auch das relative Proteinlevel von acetyliertem α -Tubulin und IFT88 bestimmt werden. Dabei wurde eine signifikante Abnahme der mROM eine signifikante Abnahme des relative Proteinlevel von acetyliertem α -Tubulin und IFT88 bestimmt werden. Dabei wurde eine signifikante Abnahme des relative Proteinlevel von acetyliertem α -Tubulin und IFT88 bestimmt werden.

von acetyliertem α -Tubulin und eine signifikante Zunahme der Proteinmenge von IFT88 festgestellt (s. 4.1.3). Beide cilienspezifischen Antikörper konnten also nachgewiesen werden, was wiederum auf die Existenz des primären Ciliums schließen lässt (McGlashan et al. 2008; Yuan et al. 2015).

Die Quantifizierungen der mRNA und des relativen Proteinlevels zeigten keine einheitlichen Tendenzen. Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass durch die Beteiligung unterschiedlicher Faktoren wie z.B. die Protein Halbwertszeit, Codon Bias, Menge an Ribosomen etc. eine direkte Korrelation nicht zwingend erwartet werden kann (Maier et al. 2009). Zum anderen spielt es ebenfalls eine Rolle, dass das primäre Cilium nicht in jedem Stadium des Zellzyklus vorhanden ist (Paridaen et al. 2013). Um eine genaue quantitative Auswertung der ICC, der qPCR und des Western Blots vorzunehmen und damit den Einfluss von Rab5c auf die vorhandene Cilienmenge zu bestimmen, müssten alle zu untersuchenden CPCs in ihrem Zellzyklus gleichgeschaltet und immer zum Zeitpunkt der Interphase geerntet werden (Omran und Olbrich 2010).

Außerdem wäre die qualitative und funktionelle Untersuchung des primären Ciliums nach dem Rab5c Knockout ein wichtiger Ansatz, da nicht nur dessen Abwesenheit, sondern auch dessen Fehlbildung negative Auswirkungen auf Entwicklung und Zellwachstum haben können. So gibt es z.B. verschiedene Syndrome, die sich auf Dysfunktionen des primären Ciliums zurückführen lassen und unter dem Begriff Ciliopathien zusammengefasst werden (Quinlan et al. 2008). Symptome können je nach Syndrom die Bildung von Nierentubulizysten, Degeneration von Photorezeptoren der Retina, kognitive Entwicklungsstörungen und andere organische Fehlbildungen sein (Omran und Olbrich 2010; Sharma et al. 2011). Eines dieser ciliopathischen Syndrome ist das Jeune Syndrom. Es handelt sich hierbei um eine autosomalrezessive Chondrodysplasie, die auf der Mutation des intraflagellaren Transportproteins IFT80 und damit auch auf das primäre Cilium zurückzuführen ist. Neben einigen der oben genannten Symptome zählt auch die Verkürzung der Röhrenknochen, die durch chondrale Ossifikation gebildet werden, zum Krankheitsbild dieses Syndroms (Quinlan et al. 2008). Ein weiterer Ansatz, um den Einfluss des Rab5c Knockouts auf die Ciliogenese der CPCs weiter zu überprüfen, könnte also auch die Einbeziehung weiterer Cilienproteine sein.

5.3 Der Einfluss von ITGA5 und Rab5c auf die Ciliogenese bei CPCs

Wie in der Einleitung beschrieben sind primäre Cilien sensorische Zellorganellen, die an multiplen Steuerungsprozessen menschlicher Zellen beteiligt sind (Coughlin et al. 2016). Der Empfang von Zellsignalen aus der EZM und die Weiterleitung an das Zellinnere geschieht durch EZM-Rezeptoren, die sich auf der Cilienmembran befinden (McGlashan et al. 2008). Unter anderem konnte der Fibronektinrezeptor ITGA5 an primären Cilien nachgewiesen werden (Wu et al. 2009). Da diesem sowohl die Beteiligung an der Gelenkentwicklung als auch an der Zellmigration zugeschreiben wird, wurde der Einfluss einer Hemmung von ITGA5 auf die Ciliogenese bei CPCs vor und nach dem Knockout von Rab5c untersucht (Chen et al. 2010; Garciadiego-Cazares 2004).

Dafür wurden die CPC 241hT Rab5c KO und CPC 241 hT mit ATN 161 behandelt. Durch die ICC konnte sowohl die erfolgreiche Hemmung von ITGA5 als auch die Existenz des primären Ciliums vor und nach der Hemmung von ITGA5 nachgewiesen werden (s. 4.2.1). Auch auf mRNA Ebene ließ sich das primäre Cilium durch IFT88 nachweisen, wobei sogar ein signifikanter Anstieg der mRNA Menge auf über 500 % zu vermerken war (s. 4.2.2). Auf Proteinebene wurde der relative Proteinlevel erneut durch die Durchführung eines Westerblots überprüft. Es zeigte sich auch hier, dass das primäre Cilium nach der ITGA5 Hemmung vorhanden war (s. 4.2.3). Da die ITGA5 Hemmung in Bezug auf die therapeutische Nutzung der CPCs zur Verbesserung der EZM und der vermehrten Prokollagen Typ II- und Aggrecanbildung führen könnte, wäre die Unversehrtheit des primären Ciliums nach der Hemmung eine wichtige Komponente, um diesen Ansatz weiterzuverfolgen (Tanaka et al. 2013).

Weiter gibt der erfolgreiche Ciliennachweis auf zellulärer Ebene, mRNA- und Proteinebene Anlass zu vermuten, dass es sich bei ITGA5 nicht um einen für die Ciliogenese essentiellen Rezeptor handelt. Ein Rückschluss über eventuelle qualitative Unterschiede der primären Cilien der CPCs vor und nach dem Knockout von Rab5c in Verbindung mit der ITGA5 Hemmung lässt sich allerdings nicht ziehen. Hierzu bedarf es weiterer Versuche. Ebenso verhält es sich mit der genauen quantitativen Bestimmung der primären Cilien (s. 5.3).

5.4 Der Einfluss von Rab5c und der Hemmung von ITGA5 auf die Migration von CPCs

Da die Migrationsfähigkeit der CPCs im Knorpel für die Bildung einer gleichmäßigen ECM im Knorpel und das Erreichen von nicht vaskularisierten Bereichen für deren therapeutische Nutzung eine wesentliche Rolle spielt, wurde das Migrationsverhalten der CPCs mit Hilfe des *Scratch* Assays untersucht (Schminke und Miosge 2014).

Die Ergebnisse zeigten bei den ungehemmten Zelllinien ein signifikant stärkeres Migrationspotenzial als bei den jeweils durch ATN 161 gehemmten CPCs (s. 4.3.). Somit scheint die Hemmung von ITGA5 nicht nur bei retinalen Pigmentepithelzellen und humanen Pulpa-Stammzellen, sondern auch bei den CPCs zu einer verminderten Migration zu führen (Chen et al. 2010; Xu et al. 2015). Um diese These weiter zu verifizieren sollten weitere Migrationsversuche durchgeführt werden. Zum Beispiel könnte man das Scratch Assay wiederholen und die jeweilige Zählung der Zellen über mehr Zeiträume absolvieren. Ergänzend dazu könnte man ein Migrations Assay durchführen, bei dem die CPCs durch eine semipermeable Membran migrieren und die jeweiligen Ergebnisse vergleichen. Dabei sind verschiedene Faktoren zu beachten. Den Prozess, Zellen zu therapeutischen Mitteln zum Ort einer Verletzung zu transportieren wird als Homing bezeichnet und wurde bisher beispielsweise an mesenchymalen Stammzellen erforscht. Dabei wurde unter anderem das Alter der Zellen, die Passage, die Art der Kultivierung und die Einbringmethode der Zellen als wichtige Einflussfaktoren evaluiert (Sohni und Verfaillie 2013). Diese Faktoren haben voraussichtlich auch Einfluss auf die CPCs. Durch chemotaktische Vorgänge migrieren CPCs bei Verletzungen zu den beschädigten Arealen zur Bildung von Knorpelersatzgewebe (Seol et al. 2012). Die Migrationsfähigkeit der CPCs, insbesondere der CPC 241 hT Rab5c KO und die Beteiligung des primären Ciliums sollte also noch weiter und gezielter unter Beachtung der relevanten Faktoren untersucht werden.

6 Zusammenfassung

In dieser experimentellen Arbeit konnte das primäre Cilium in CPCs nach dem Knockout von Rab5c und nach der zusätzlichen Hemmung von ITGA5 nachgewiesen sowie Unterschiede im Migrationsverhalten durch die verschiedenen Manipulationen der CPCs festgestellt werden. Das primäre Cilium erfüllt wichtige sensorische Funktionen, spielt eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation und ist an entwicklungsbestimmenden Signalwegen von Zellen beteiligt. Vor diesem Hintergrund wäre die Beschädigung durch den Knockout von Rab5c für den therapeutischen Einsatz der CPCs äußerst kontraproduktiv. Durch eine ICC konnte zunächst auf zellulärer Ebene das Vorhandensein und die Lokalisation der primären Cilien in CPCs gezeigt werden. Anschließend wurde der Ciliennachweis auch auf Gen-Ebene durch die Bestimmung der mRNA-Menge von IFT88 im Rahmen einer qPCR erbracht. Durch die Durchführung eines Western Blots konnte sowohl durch IFT88 als auch durch acetyliertes α -Tubulin auch auf Protein-Ebene die Existenz des primären Ciliums nach dem Rab5c Knockout nachgewiesen werden. Ein quantitativer Vergleich der CPCs vor und nach dem Knockout erfolgte allerdings nicht. Um eine eventuelle Beeinflussung der Ciliogenese durch ITGA5 zu untersuchen, wurden die CPC 241 hT und CPC 241 hT Rab5c KO mit dem ITGA5 Inhibitor ATN 161 behandelt. Wieder konnte auf drei Ebenen durch ICC, qPCR und Western Blot sowohl vor als auch nach der Hemmung von ITGA5 das primäre Cilium erfolgreich nachgewiesen werden. Um die Migration der CPCs zu untersuchen wurden vor und nach der Hemmung von ITGA5 mit beiden Zelllinien ein Scratch Assay durchgeführt. Die gehemmten Zellen migrierten signifikant langsamer als die ungehemmten, während zwischen den Knockout Zellen und der Kontroll-CPCs kein konstant signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Um weitere Rückschlüsse auf den Einfluss des Knockouts von Rab5c auf die Ciliogenese bei chondrogenen Progenitorzellen ziehen zu können, sind weitere Studien notwendig. Dabei wäre vor allem eine genauere Quantifizierung sowie Untersuchungen zur Qualität der primären Cilien nach dem Knockout von Interesse. Sollte auch insoweit keine Beeinträchtigung der Ciliogenese festzustellen sein, könnte der Knockout von Rab5c bei CPCs weiter als therapeutischer Ansatz weiterverfolgt werden. Erwägenswert scheinen darüber hinaus auch Versuche, die Zusammenhänge zwischen dem primären Cilium und der Migration von CPCs herstellen könnten. Dies wäre beispielsweise durch den Knockout des primären Ciliums in Verbindung mit diversen Migrationsversuchen möglich.

7 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J: Integrins. In: Taylor & Francis (Hrsg.): Molecular Biology of the Cell. Band 4; Garland Science, New York 2002, 1113–1118

Buckwalter JA, Mankin HJ (1998): Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis Rheum <u>41</u>, 1331–1342

Chang C-F, Ramaswamy G, Serra R (2012): Depletion of primary cilia in articular chondrocytes results in reduced Gli3 repressor to activator ratio, increased Hedgehog signaling, and symptoms of early osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage <u>20</u>, 152–161

Chen Z, Chen C, Gong W, Li J, Xing Y (2010): Integrin- α 5 Mediates Epidermal Growth Factor-Induced Retinal Pigment Epithelial Cell Proliferation and Migration. Pathobiology <u>77</u>, 88–95

Coughlin T, Schiavi J, Alyssa Varsanik M, Voisin M, Birmingham E, Haugh M, McNamara L, Niebur G (2016): Primary cilia expression in bone marrow in response to mechanical stimulation in explant bioreactor culture. Eur Cell Mater <u>32</u>, 111–122

De Bari C (2015): Are mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis the good or bad guys? Arthritis Res Ther $\underline{17}$, 1–9

Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA (2009): The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. Sports Health <u>1</u>, 461–468

Fuchs J, Kuhnert R, Scheidt-Nave C (2017): 12-Monats-Prävalenz von Arthrose in Deutschland. J Health Monit <u>2</u>, 55–60

Garciadiego-Cazares D (2004): Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by $\alpha 5\beta 1$ integrin in the developing appendicular skeleton. Development <u>131</u>, 4735–4742

Huber M, Trattnig S, Lintner F (2000): Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage. Invest Radiol <u>35</u>, 573–580

Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ (2008): The Symptoms of Osteoarthritis and the Genesis of Pain. Rheum Dis Clin N Am <u>34</u>, 623–643

Irianto J, Ramaswamy G, Serra R, Knight MM (2014): Depletion of chondrocyte primary cilia

reduces the compressive modulus of articular cartilage. J Biomech 47, 579–582

Janssen JN, Izzi V, Henze E, Cingöz G, Lowen F, Küttner D, Neumann R, Lenz C, Rosen V, Miosge N (2021): Enhancing the chondrogenic potential of chondrogenic progenitor cells by deleting RAB5C. iScience <u>24</u>, 102464

Kinumatsu T, Shibukawa Y, Yasuda T, Nagayama M, Yamada S, Serra R, Pacifici M, Koyama E (2011): TMJ Development and Growth Require Primary Cilia Function. J Dent Res <u>90</u>, 988–994

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

Koelling S, Miosge N (2010): Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. Arthritis Rheum <u>62</u>, 1077–1087

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 <u>4</u>, 324–335

Kouri JB, Jiménez SA, Quintero M, Chico A (1996): Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage 4, 111–125

Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. Clin Biochem <u>25</u>, 155–163

Lohmander LS, Roos EM (2007): Clinical update: treating osteoarthritis. Lancet <u>370</u>, 2082–2084

Maier T, Güell M, Serrano L (2009): Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett <u>583</u>, 3966–3973

McGlashan SR, Jensen CG, Poole CA (2006): Localization of Extracellular Matrix Receptors on the Chondrocyte Primary Cilium. J Histochem Cytochem <u>54</u>, 1005–1014

McGlashan SR, Cluett EC, Jensen CG, Poole CA (2008): Primary cilia in osteoarthritic chondrocytes: From chondrons to clusters. Dev Dyn <u>237</u>, 2013–2020

Mörgelin M, Paulsson M, Heinegård 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, 595-601

Morris NP, Keene DR, Horton WA: Morphology and Chemical Composition of Connective Tissue: Cartilage. In: Royce PM, Steinmann B (Hrsg.): Connective Tissue and Its Heritable Disorders. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA 2003, 41–65

Muhammad H, Rais Y, Miosge N, Ornan EM (2012): The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes. Cell Mol Life Sci <u>69</u>, 2101–2107

Murcia NS, Richards WG, Yoder BK, Mucenski ML, Dunlap JR, Woychik RP (2000): The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. Development <u>127</u>, 2347–2355

Nuki G (1999): Osteoarthritis: a problem of joint failure. Z Rheumatol 58, 142–147

Olivares-Navarrete R, Rodil SE, Hyzy SL, Dunn GR, Almaguer-Flores A, Schwartz Z, Boyan BD (2015): Role of integrin subunits in mesenchymal stem cell differentiation and osteoblast maturation on graphitic carbon-coated microstructured surfaces. Biomaterials <u>51</u>, 69–79

Omran H, Olbrich H (2010): Zilienkrankheiten unter besonderer Berücksichtigung der primären ziliären Dyskinesie. Med Genet <u>22</u>, 315–321

Palazzo C, Nguyen C, Lefevre-Colau M-M, Rannou F, Poiraudeau S (2016): Risk factors and burden of osteoarthritis. Ann Phys Rehabil Med <u>59</u>, 134–138

Paridaen JT, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB (2013): Asymmetric Inheritance of Centrosome-Associated Primary Cilium Membrane Directs Ciliogenesis after Cell Division. Cell <u>155</u>, 333–344

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res <u>29</u>, 45e–445

Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1985): Analysis of the morphology and function of primary cilia in connective tissues: A cellular cybernetic probe? Cell Motil <u>5</u>, 175–193

Pulai JI, Del Carlo M, Loeser RF (2002): The α 5 β 1 integrin provides matrix survival signals for normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro. Arthritis Rheum <u>46</u>, 1528–1535 Quinlan RJ, Tobin JL, Beales PL: Chapter 5 Modeling Ciliopathies: Primary Cilia in Development and Disease. In: Krauss RS (Hrsg.): Mouse Models of Developmental Genetic Disease. Elsevier, New York 2008, 249–310

Ruhlen R, Marberry K (2014): The chondrocyte primary cilium. Osteoarthritis Cartilage <u>22</u>, 1071–1076

Satir P, Pedersen LB, Christensen ST (2010): The primary cilium at a glance. J Cell Sci <u>123</u>, 499–503

Schminke B, Miosge N (2014): Cartilage Repair In Vivo: The Role of Migratory Progenitor Cells. Curr Rheumatol Rep <u>16</u>, 461

Seeley ES, Nachury MV (2010): The perennial organelle: assembly and disassembly of the primary cilium. J Cell Sci <u>123</u>, 511–518

Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA, Martin JA (2012): Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. Arthritis Rheum 64, 3626–3637

Sharma N, Kosan ZA, Stallworth JE, Berbari NF, Yoder BK (2011): Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. Mol Biol Cell <u>22</u>, 806–816

Singla V, Reiter JF (2006): The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. Science <u>313</u>, 629–633

Sohni A, Verfaillie CM (2013): Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. Stem Cells Int <u>2013</u>, 130763

Tanaka N, Ikeda Y, Yamaguchi T, Furukawa H, Mitomi H, Nakagawa T, Tohma S, Fukui N (2013): $\alpha 5\beta 1$ integrin induces the expression of noncartilaginous procollagen gene expression in articular chondrocytes cultured in monolayers. Arthritis Res Ther <u>15</u>, R127

Tesche F, Miosge N (2004): Perlecan in late stages of osteoarthritis of the human knee joint. Osteoarthritis Cartilage <u>12</u>, 852–862

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 <u>20</u>, 329–337

Thompson CL, Chapple JP, Knight MM (2014): Primary cilia disassembly down-regulates

mechanosensitive hedgehog signalling: a feedback mechanism controlling ADAMTS-5 expression in chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage <u>22</u>, 490–498

Valente EM, Rosti RO, Gibbs E, Gleeson JG (2014): Primary cilia in neurodevelopmental disorders. Nat Rev Neurol <u>10</u>, 27–36

Veevers-Lowe J, Ball SG, Shuttleworth A, Kielty CM (2011): Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through α 5 β 1-integrin-mediated activation of PDGFR- β and potentiation of growth factor signals. J Cell Sci <u>124</u>, 1288–1300

Wang W, Wang F, Lu F, Xu S, Hu W, Huang J, Gu Q, Sun X (2011): The Antiangiogenic Effects of Integrin α 5 β 1 Inhibitor (ATN-161) In Vitro and In Vivo. Investig Ophtalmol Vis Sci 52, 7213–7220

Wilsman NJ, Fletcher TF (1978): Cilia of neonatal articular chondrocytes incidence and morphology. Anat Rec <u>190</u>, 871–890

Wilsman NJ, Farnum CE, Reed-Aksamit DK (1980): Incidence and morphology of equine and murine chondrocytic cilia. Anat Rec <u>197</u>, 355–361

Wu J, Du H, Wang X, Mei C, Sieck GC, Qian Q (2009): Characterization of Primary Cilia in Human Airway Smooth Muscle Cells. Chest <u>136</u>, 561–570

Xu S, Cui L, Ma D, Sun W, Wu B (2015): Effect of ITGA5 down-regulation on the migration capacity of human dental pulp stem cells. Int J Clin Exp Pathol <u>8</u>, 14425–14432

Yuan X, Serra RA, Yang S (2015): Function and regulation of primary cilia and intraflagellar transport proteins in the skeleton. Ann N Y Acad Sci <u>1335</u>, 78–99

Zhang Z, Morla AO, Vuori K, Bauer JS, Juliano RL, Ruoslahti E (1993): The alpha v beta 1 integrin Functions As a Fibronectin Receptor But Does Not Support Fibronectin Matrix Assembly and Cell Migration on Fibronectin. J Cell Biol <u>122</u>, 235–242

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge, der mir nach meinem Examen die Möglichkeit gab, unter seiner hervorragenden Betreuung zu promovieren. Von Beginn an stand er mir mit wertvollen Anregungen und Hinweisen zur Seite und unterstützte mich jederzeit bei allen Problemen und Unklarheiten.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Jérôme Janßen, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und immer mit fachlichen und praktischen Tipps behilflich war.

Für die ausführliche und ausgezeichnete Einarbeitung im Labor danke ich Frau Christa Bode und Frau Elvira Henze. Während meiner Experimente waren sie stets mit kompetenten Hinweisen zur Stelle und standen mir mit Rat und Tat zur Seite.

Abschließend bedanke ich mich bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Viktor Martian und meinem Mitstreiter Herrn Hagen Nenast für die kollegiale Zusammenarbeit und die großartige Arbeitsatmosphäre.