

Aus der Klinik für Zahnärztliche Prothetik
(Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Nachweis und isoformspezifische Funktion von
HMGB1-Protein im osteoarthritischen Knorpel und
chondrogenen Progenitorzellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christoph Lehmann

aus

Helmstedt

Göttingen 2019

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. A. Schilling
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 29.06.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*Nachweis und isoformspezifische Funktion von HMGB1-Protein im osteoarthritischen Knorpel und chondrogenen Progenitorzellen*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 01.04.2019

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Knorpelgewebe.....	1
1.2 Funktion und makroskopischer Aufbau des Gelenkknorpels	1
1.3 Mikroskopischer und biochemischer Aufbau des Knorpels.....	2
1.3.1 Chondrozyten	2
1.3.2 Aufbau der Extrazellulärmatrix	3
1.3.3 Systematik und Struktur der Kollagene.....	6
1.3.4 Systematik und Struktur der Proteoglykane.....	7
1.4 Erkrankungen des Gelenkknorpels: Osteoarthritis	10
1.4.1 Epidemiologie und gesundheitsökonomische Aspekte der Osteoarthritis	10
1.4.2 Ätiologische Formen und Risikofaktoren der Osteoarthritis.....	11
1.4.3 Histologie und Pathomechanismen der Osteoarthritis	12
1.4.4 Chondrogene Progenitorzellen im osteoarthritischen Knorpel	13
1.5 Einführung in die HMG-Proteinfamilie.....	15
1.6 Übersicht zur HMGA-Proteinfamilie.....	16
1.7 Übersicht zur HMGN-Proteinfamilie.....	16
1.8 Übersicht zur HMGB-Proteinfamilie.....	17
1.8.1 HMGB1-Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen	17
1.8.2 HMGB1-Funktionen als Kernprotein	19
1.8.3 HMGB1-Funktionen im Zytosol.....	20
1.8.4 HMGB1-Extrazelluläre Funktionen, Rezeptoren und Signalkaskaden	20
1.8.5 Stand der Forschung: HMGB1 und das osteoarthritische Gelenk.....	22
1.9 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Materialien.....	25
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.3 Kits und Analysensysteme	29
2.1.4 Antibiotika.....	30
2.1.5 Antikörper und Zytokine	30
2.1.6 Geräte.....	31
2.1.7 Zelllinien	32
2.1.8 Herkunft humaner Gewebeproben und Zelllinien	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Ablauf der Gewebepräparation.....	33
2.2.2 Gewinnung der chondrogenen Progenitorzellen.....	33
2.2.3 Zellkultur, Zellernte, Zellzählung und Passagieren.....	33
2.2.4 Kryokonservierung und Revitalisierung verwendeter Zelllinien	34
2.2.5 Kollagenaseverdau und Kultivierung von OA-Knorpelproben	34
2.2.6 <i>Ex-vivo</i> -Migration von CPC in Knorpelgewebe.....	35
2.2.7 Entkalkung der Knorpel-Knochen-Stanzpräparate für die IHC.....	35
2.2.8 Gewebefixierung und Einbettung für die IHC	36
2.2.9 Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin	38
2.2.10 Anfertigung der Paraffinschnitte am Mikrotom.....	38
2.2.11 Immunhistochemie zum Nachweis von HMGB1 im Knorpelgewebe.....	38
2.2.12 Laserexzitation zur Kontrolle der <i>ex-vivo</i> -Migration von CPC531ht.....	42

2.2.13	IHC zum Nachweis von HMGB1 in CPC- <i>ex-vivo</i> -Migrationsschnitten	43
2.2.14	Immunzytochemie zum Nachweis von HMGB1, TLR4 und RAGE	43
2.2.15	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	45
2.2.16	Western Blot.....	48
2.2.17	Proteindetektion auf der PVDF-Membran.....	49
2.2.18	Spezifische Proteindetektion durch Immunreaktion mit ECL.....	50
2.2.19	Quantifizierung der Immunreaktion.....	52
2.2.20	Lagerung und Wiederverwendung der PVDF-Membran.....	52
2.2.21	<i>In-situ</i> -Hybridisierung: Sondendesign	53
2.2.22	<i>In-situ</i> -Hybridisierung: HMGB1-RNA-Detektion.....	60
2.2.23	<i>In-vitro scratch assay</i>	65
2.2.24	Migrationsassay nach BOYDEN.....	66
2.2.25	Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1 β	67
3	Ergebnisse	69
3.1	Nachweis von HMGB1 im Knorpel, Chondrozyten und CPCs	69
3.1.1	Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	69
3.1.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	71
3.2	Nachweis von HMGB1-Rezeptoren auf Chondrozyten und CPCs	73
3.3	HMGB1-Nachweis nach CPC-<i>ex-vivo</i>-Migration in OA-Knorpel	75
3.4	Migrationswirkung von <i>fr</i>-HMGB1 auf CPCs	77
3.4.1	Ergebnisse: <i>Scratch assay</i>	77
3.4.2	Ergebnisse: <i>BOYDEN-chamber</i>	80
3.5	Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1β	82
4	Diskussion	84
4.1	Nachweis von HMGB1 im Knorpel, Chondrozyten und CPCs	84
4.2	Nachweis von HMGB1-Rezeptoren auf Chondrozyten und CPCs	87
4.3	HMGB1-Nachweis nach CPC-<i>ex-vivo</i>-Migration in OA-Knorpel	88
4.4	Migrationswirkung von <i>fr</i>-HMGB1 auf CPCs	89
4.5	Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1β	91
5	Zusammenfassung	93
6	Literaturverzeichnis	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur und molekularer Aufbau der EZM des Gelenkknorpels	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aggrecan-Hyaluronat-Komplexes	9
Abbildung 1.3: Darstellung der Lebenszeitprävalenz der Osteoarthrose	11
Abbildung 1.4: Neue Nomenklatur der HMG-Proteine.....	15
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Proteins HMGB1.....	18
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der nukleären HMGB1-Funktion.....	19
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der TLR- und RAGE-Signalwege	21
Abbildung 3.1: IHC und IZC zum HMGB1-Nachweis im Knorpel, Chondrozyten und CPCs.....	69
Abbildung 3.2: Western Blot zum HMGB1-Nachweis im Knorpel, Chondrozyten und CPCs	71
Abbildung 3.3: IZC zum Nachweis von extrazellulären HMGB1-Rezeptoren auf CH und CPCs	73
Abbildung 3.4: HMGB1-Nachweis nach CPC- <i>ex-vivo</i> -Migration in OA-Knorpel.....	75
Abbildung 3.5: CPC531ht- <i>scratch assay</i> in der Durchlichtmikroskopie.....	77
Abbildung 3.6: Migrationsergebnisse CPC531ht- <i>scratch assay</i>	78
Abbildung 3.7: Boxplot-Diagramme der CPC-Migrationsversuche in der BOYDEN- <i>chamber</i>	80
Abbildung 3.8: Stimulation von CPC531ht mit HMGB1/Il-1 β	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Chemikalien, Reagenzien und Puffer	25
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 2.3: Kits und Analysesysteme	29
Tabelle 2.4: Antibiotika	30
Tabelle 2.5: Antikörper und Zytokine	30
Tabelle 2.6: Geräte	31
Tabelle 2.7: Zelllinien	32
Tabelle 2.8: Stationen der Gewebeentwässerung im Einbettautomaten	37
Tabelle 2.9: Stationen der Gewebeentparaffinierung	40
Tabelle 2.10: Primärantikörper der Immunhistochemie	41
Tabelle 2.11: Stationen der Gewebedehydrierung	42
Tabelle 2.12: Primärantikörper der Immunzytochemie	44
Tabelle 2.13: Sekundärantikörper der Immunzytochemie	45
Tabelle 2.14: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelplatten	46
Tabelle 2.15: Primärantikörper der spezifischen HMGB1-Detektion	51
Tabelle 2.16: Sekundärantikörper der spezifischen HMGB1-Detektion	51
Tabelle 2.17: Primärantikörper der spezifischen α -Tubulin-Detektion	52
Tabelle 2.18: Sekundärantikörper der spezifischen α -Tubulin-Detektion	52
Tabelle 2.19: Reaktionsansatz PCR zur Synthese von cDNA aus mRNA	54
Tabelle 2.20: Primersequenz, Primergröße und Annealing-Temperatur	54
Tabelle 2.21: Reaktionsansatz der PCR	54
Tabelle 2.22: PCR-Protokoll des realplex Mastercyclers	55
Tabelle 2.23: Ligationsprotokoll des <i>pGEM-T Easy</i> -Vektors	57
Tabelle 2.24: Enzymatischer Verdau der Plasmid-DNA	59
Tabelle 2.25: Reaktionsansatz der <i>in-vitro</i> -Transkription	59
Tabelle 2.26: Stationen der Gewebeentparaffinierung	62
Tabelle 2.27: Antikörper der <i>in-situ</i> -Hybridisierung	63
Tabelle 2.28: Stationen der Gewebedehydrierung	64
Tabelle 2.29: Übersicht der verwendeten Zytokine	67
Tabelle 2.30: Übersicht Stimulationsschema	68

Abkürzungsverzeichnis

ACF	<i>ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bp.	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC42	<i>cell division control protein 42</i>
CHRAC	<i>chromatin accessibility complex</i>
CILP-1	<i>cartilage intermediate layer protein-1</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
CPC	chondrogene Progenitorzellen
CS	Chondroitinsulfat
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eER	raues endoplasmatisches Retikulum
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinases 1/2</i>
EZM	Extrazellulärmatrix; extrazelluläre Matrix
FACIT	<i>fibril-associated collages with interrupted triple helices</i>
F _c	<i>crystallisable fragment</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fr-HMGB1	<i>fully reduced-HMGB1</i> (Redoxform des Proteins)
GAG	Glykosaminoglykane
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HCl	Salzsäure
HeLa	Henrietta Lacks
HMG	<i>high-mobility-group</i>

HMGB1	<i>high-mobility-group-box-chromosomal-protein 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hsp47	Hitzeschockprotein 47
Ig	Immunglobulin
IGD	interglobuläre Domäne
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRAK	<i>interleukin-1 receptor- associated kinase</i>
ISH	<i>in-situ-Hybridisierung</i>
IZC	Immunzytochemie
IκB	<i>inhibitor of NFκB</i>
Iκκ α/β	<i>inhibitor of kappa α/β kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KS	Keratansulfat
LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MG	Maximalgeschwindigkeit
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MMP	Matrix- Metalloproteinase
m-RNA	<i>messenger-RNA</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC-4	<i>noncollagenous domain-4</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
OCT4	<i>octamer binding transcription factor 4</i>
P4-H	Prolyl-4-Hydroxylase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase
PRELP	<i>proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
PVFD	Polyvinylidenfluorid
Rac1	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>

Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGP	Sammelgelpuffer
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	SOB-Medium mit Glucose
SOX	<i>sex-determining region Y-box</i>
SRY	<i>sex-determining region Y</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
STRO-1	<i>stromal cell precursors-1</i>
SZP	<i>superficial zone protein</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAK1 (=MAP3K7)	<i>mitogen-activated protein-kinase-kinase-kinase 7</i>
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGP	Trenngelpuffer
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TLR	<i>toll like receptors</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF	<i>TNF receptor associated factors</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wnt	<i>wingless-related integration site</i>

1 Einleitung

1.1 Das Knorpelgewebe

„Auch in den lebendgebärenden Lebewesen sind viele knorpelartige Knochen enthalten, bei denen es nützlich ist, daß die festen Teile wegen des darumliegenden Fleisches weich und geschmeidig sind, wie es z. B. für die Ohren und die Nasen zutrifft. Denn das Spröde kann leicht an den abstehenden Teilen zerbrechen.“

(ARISTOTELES: Über die Teile der Lebewesen; deutsche Übersetzung nach W. KULLMANN 2007)

Die erste dokumentierte Erwähnung des menschlichen Knorpelgewebes wird dem griechischen Philosophen und Naturwissenschaftler ARISTOTELES zugeschrieben. Vor über 2350 Jahren erkannte ARISTOTELES die noch heute gültige Tatsache, dass Knorpel und umgebende Gewebe als funktionelle Einheit wirken. Auch wenn sich die überlieferten Beschreibungen nur auf Knorpelstrukturen der Ohren und Nase beziehen, erahnte ARISTOTELES den funktionellen Wert dieses besonderen Gewebes (Benedek 2006).

Knorpelgewebe wird in die Gruppe der Binde- und Stützgewebe eingeordnet, welche sich aus dem Mesenchym differenzieren. Der menschliche Körper weist unterschiedliche Knorpelformen auf: hyaliner Knorpel, Faserknorpel und elastischer Knorpel (Kuettner 1992). Hyaliner Knorpel ist der typische Gelenkknorpel, mit Ausnahme der Gelenkflächen des Kiefers. Weiterhin kommt dieser Knorpeltyp in verschiedenen Strukturen der Atemwege, wie dem Nasenseptum, dem Kehlkopfskelett, der Trachea und den Bronchien vor. Elastischer Knorpel ist beispielsweise in der Ohrmuschel, der Tuba auditiva und der Epiglottis lokalisiert. Faserknorpel ist Bestandteil der Menisci des Kniegelenkes, der Zwischenwirbelscheiben, der Symphysis pubica sowie der Gelenkflächen des Kiefergelenkes (Drenckhahn und Hunziker 2008).

1.2 Funktion und makroskopischer Aufbau des Gelenkknorpels

Für die Bewegungsfunktion des menschlichen Körpers ist das Zusammenspiel von Knochen-, Knorpel- und Muskelgeweben von entscheidender Bedeutung. Die reibungsarme Bewegung zwischen zwei knöchernen Strukturen wird durch den typischen Aufbau der Gelenke ermöglicht:

Die artikulierenden Gelenkflächen (lat. *Facies articularis*) sind durch einen Spalt getrennt, in welchem sich die Gelenkschmiere (Synovialflüssigkeit) befindet. Neben der Reduktion der Gleitreibung hat die Synovia wichtige nutritive Funktionen für den avaskulären Gelenkknorpel (Muir 1995). Nach außen ist das Gelenk durch die Gelenkkapsel (lat. *Capsula articularis*) abgegrenzt. Diese besteht aus einer äußeren straffen Kollagenfaserschicht (lat. *Membrana fibrosa*) und einer inneren Synovialmembran (lat. *Membrana synovialis*). Die jeweiligen knöchernen kraftübertragenden Skelettanteile sind mit hyalinem Knorpel (lat. *Cartilago articularis*) überzogen. Die Bezeichnung *hyalin* leitet sich aus dem altgriechischen Wort *hyalos* ab, welches *durchscheinend* bzw. *glasig* bedeutet. Gesunde Knorpeloberflächen erscheinen hell, glatt, weiß bis bläulich schimmernd und leicht transluzent (Drenckhahn und Hunziker 2008; Welsch et al. 2014). In großen Gelenken weist der Knorpel eine Schichtdicke von 1 – 4 mm auf (Shepherd und Seedhom 1999).

1.3 Mikroskopischer und biochemischer Aufbau des Knorpels

Hyaliner Gelenkknorpel besteht aus Knorpelzellen, den Chondrozyten und einer spezialisierten stark hydratisierten Extrazellulärmatrix (EZM). Adultes gesundes Knorpelgewebe weist keine Blut- und Lymphgefäße auf und ist nicht innerviert (Poole 1997; Welsch et al. 2014).

1.3.1 Chondrozyten

Der adult- gesunde Gelenkknorpel weist als alleinige Zellpopulation die Chondrozyten auf. Ihr prozentualer Gewichtsanteil am Gesamtknorpelvolumen ist mit ca. 10 % gering (Cohen et al. 1998). Am Gesamtknorpelvolumen nehmen die Zellen 5 – 10 % ein (Bruckner und van der Rest 1994; Archer und Francis-West 2003).

Die Morphologie der Chondrozyten hängt von der jeweiligen Lokalisation im Gelenkknorpel ab. In oberflächlichen Bereichen, der sog. Tangentialfaserzone (Zone I), sind kleine discoidale Chondrozyten parallel zur Knorpeloberfläche ausgerichtet. In der Übergangszone (Zone II) zeigt sich eine oval – halbkugelförmige Morphologie. Tiefere Knorpelbereiche (Radiärfaserzone; Zone III) weisen perpendikular ausgerichtete multi-zelluläre Zellsäulen auf (Youn et al. 2006). Die tiefste Knorpelzone stellt den Übergang zum Knochen dar und wird als kalzifizierte Knorpelzone (Zone IV) beschrieben (Bullough und Jagannath 1983).

Chondrozyten sind für die Bildung und Aufrechterhaltung der EZM verantwortlich. Durch den Zellstoffwechsel können sämtliche Komponenten der Matrix synthetisiert werden (Kuettner 1992).

Im gesunden Gelenkknorpel liegt ein Gleichgewicht zwischen der Synthese und der Degradation von Matrixbestandteilen vor, welches durch den chondrozytären Stoffwechsel aufrechterhalten wird (Aigner und Stove 2003). Um die Syntheseleistung an Proteoglykanen für die EZM aufbringen zu können, weisen die Zellen einen stark ausgeprägten Apparat an Zellorganellen auf. Vor allem zeigen sich ein prominentes raues endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat und zahlreiche freie Ribosomen (Kuettner et al. 1982).

Die Stoffwechselaktivität der Knorpelzellen muss differenziert betrachtet werden. Verschiedene Untersuchungen zeigen lokale Unterschiede der Stoffwechselaktivität in Abhängigkeit von der jeweiligen Knorpelzone. In oberflächlichen Knorpelbereichen ist die Stoffwechselleistung der Chondrozyten im Vergleich zu tiefen Schichten geringer. So konnte in der knochennahen Radialzone eine zehnfach erhöhte Stoffwechselaktivität im Vergleich zur Tangentialzone gezeigt werden (Kuettner 1992; Wong et al. 1996). Unter dauerhafter mechanischer Beanspruchung und pathologischen Veränderungen des Gelenkknorpels, wie der Osteoarthrose, kann die Syntheseleistung der Chondrozyten ansteigen (Goldring 2000). Der zelluläre Baustoffwechsel wird hauptsächlich durch anaerobe Glykolyse unterhalten, da der gesunde Gelenkknorpel nicht mit Gefäßen versorgt ist. Chondrozyten sind dabei gut an den geringen Sauerstoffpartialdruck des Knorpels angepasst (Archer und Francis-West 2003).

1.3.2 Aufbau der Extrazellulärmatrix

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Gewebeflüssigkeit und einem komplexen Gerüst verschiedener Makromoleküle. Die Gewebeflüssigkeit beansprucht etwa 70 % des gesamten Knorpelgewichtes (Kuettner 1992). Bei den Makromolekülen handelt es sich hauptsächlich um Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane (Aigner und Stove 2003). Zusammen machen diese ca. 92 % des Knorpel-Trockengewichtes aus (Maroudas et al. 1980). Vom Trockengewicht ausgehend, nimmt Kollagen mit 70 % den Hauptanteil ein, gefolgt von den Proteoglykanen mit 20 % (Lohmander 1988). In der Literatur sind unterschiedliche Angaben zur prozentualen Zusammensetzung der EZM publiziert.

DIJKGRAAF und Kollegen stellen fest, dass die biochemische Zusammensetzung der EZM interindividuell und intraindividuell, abhängig von Alter, Gelenklokalisierung und Gesundheitszustand, variiert (Dijkgraaf et al. 1995).

Auch innerhalb des adulten physiologisch gesunden Gelenkknorpels werden Unterschiede in der biochemischen und strukturellen Zusammensetzung der EZM beschrieben (Abbildung 1.1). In mittleren und tiefen Knorpelzonen wird die EZM, entsprechend dem Abstand zu den Knorpelzellen, in eine perizelluläre, territoriale und eine interterritoriale Matrixregion eingeteilt (Kuettner et al. 1982; Poole et al. 1984; Youn et al. 2006).

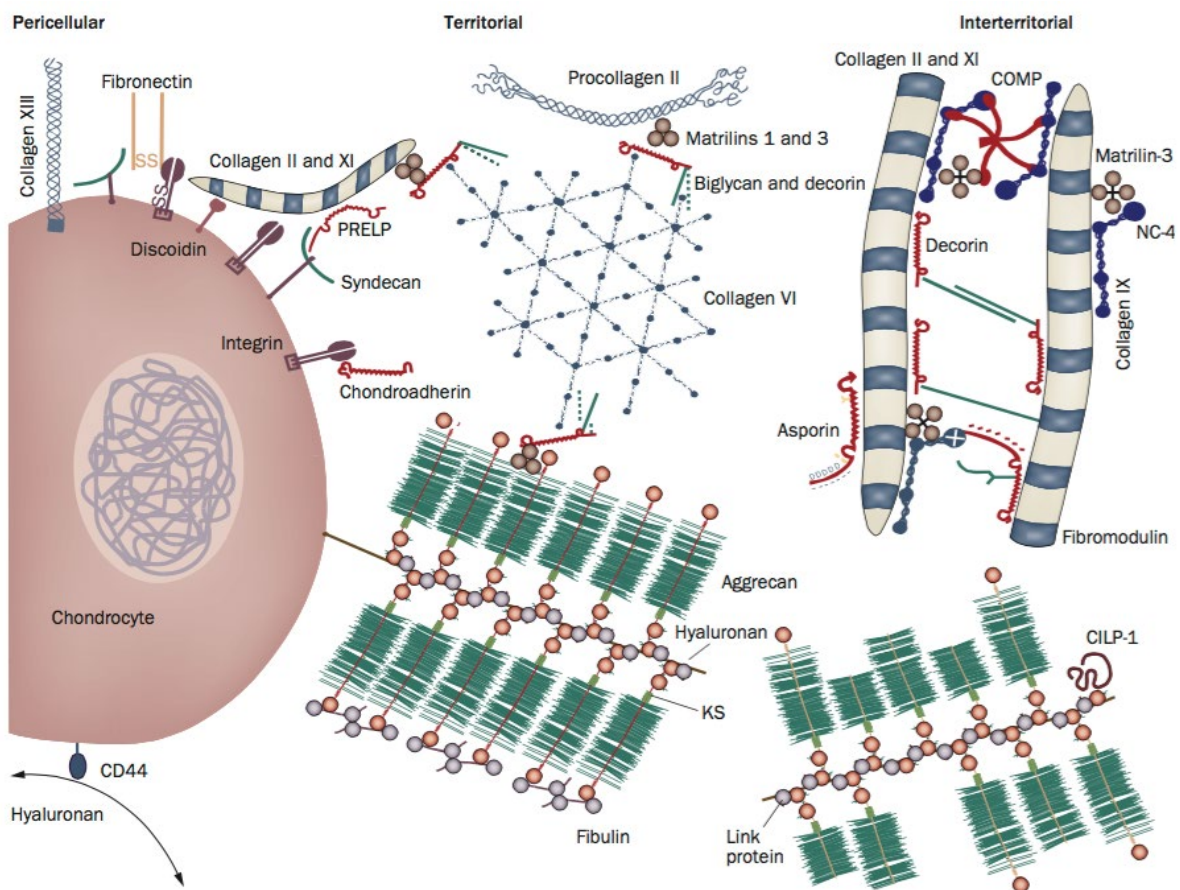


Abbildung 1.1: Struktur und molekularen Aufbau der EZM des Gelenkknorpels.

Darstellung unterschiedlicher Bereiche der EZM mit zonalen Unterschieden in der biochemischen Zusammensetzung. Der Chondrozyt steht mit der perizellulären Matrix in direktem Kontakt. Dargestellt ist die Interaktion verschiedener Rezeptoren (CD44, Integrin, Discoidin) mit verschiedenen Matrixmolekülen. Abkürzungen: CILP-1: *cartilage intermediate layer protein-1*, COMP: *cartilage oligomeric matrix protein*, KS: *keratan sulfate*, NC-4: *noncollagenous domain-4*, PRELP: *proline-arginine-rich end leucine-rich repeat protein*. Abbildung entnommen und modifiziert nach HEINEGARD und SAXNE (2011).

Die **perizelluläre Matrix** grenzt unmittelbar an die Zellmembran der Chondrozyten. Ein Chondrozyt bzw. eine isogene Chondrozytengruppe, mitsamt der umgebenen perizellulären Matrix, wird als Chondron bezeichnet (Poole et al. 1987). POOLE und Kollegen beschreiben weiterhin eine filzartige, kokonförmige perizelluläre Kapsel, welche das Chondron umgibt und dieses gegen die territoriale Matrix abgrenzt. Die perizelluläre Matrixregion wird als relativ flüssiges, deformierbares Kompartiment definiert, welches bei Krafteinwirkung zusammen mit der Kapsel den Chondrozyten schützt. Chondrone können nach dieser Beschreibung als kompressionsresistente, flüssigkeitsgefüllte Stoßdämpfer angesehen werden (Poole et al. 1984; Poole et al. 1987). Der perizelluläre Bereich ist für den Informationsaustausch zwischen EZM und Knorpelzellen von großer Bedeutung. Zahlreiche Makromoleküle stehen über spezifische Rezeptoren mit den Chondrozyten in Kontakt und geben somit über die Integrität der EZM Rückmeldung (Aigner und Stove 2003; Guilak et al. 2006; Youn et al. 2006). Eine Sonderstellung nimmt dabei Kollagen VI ein, welches ausschließlich in der perizellulären Matrix nachweisbar ist (Poole et al. 1988). Kollagen VI kann über Integrine und das zellmembranständige Proteoglykan *NG2* an Chondrozyten binden. Außerdem interagiert es mit zahlreichen Komponenten der EZM wie Biglycan, Decorin, Fibromodulin, Fibronectin, Hyaluronan und Perlecan (Guilak et al. 2006). Somit fungiert Kollagen VI als Bindeglied zwischen der EZM und den Chondrozyten. Aktuelle Studien von ZELENSKI und Kollegen unterstreichen die regulatorischen Eigenschaften von Kollagen VI innerhalb der perizellulären Matrix: Die Zellmorphologie, die Mechanotransduktion und die Calcium-Ionen-Homöostase über den *TRPV4*-Kanal sind wesentlich von der Präsenz von Kollagen VI abhängig (Zelenski et al. 2015).

In geringen Mengen sind die fibrillären Kollagene II, IX und XI vorhanden (Youn et al. 2006; Houard et al. 2013). Biglycan und Decorin wurden durch die immunhistochemischen Arbeiten von MIOSGE und Kollegen nachgewiesen (Miosge et al. 1994).

Die **territoriale Matrix** ist ein ca. 5 – 10 µm breiter Bereich, welcher zwischen der perizellulären Kapsel und der interterritorialen Matrix lokalisiert ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Arbeitsgruppe von POOLE zeigen, dass der Durchmesser der in der territorialen Matrix lokalisierten Kollagenfasern geringer ist als in der interterritorialen Matrix. Zwischen den Kollagenfasern sind Proteoglykane in die Matrix eingelagert.

Bei Druckbelastung kollabieren die ringförmig gruppierten Kollagenfasern zu einem Wellenmuster. Diese Eigenschaft soll eine protektive Wirkung auf die Chondrone haben (Poole et al. 1984; Poole et al. 1987).

In der **interterritorialen Matrix** sind Kollagen II, IX, X, XI und XXVII lokalisiert (Kuettner 1992; Goldring und Marcu 2009). Kollagen VI ist in der interterritorialen Matrix nicht nachweisbar (Poole et al. 1988; Guilak et al. 2006). Die strukturelle Integrität des Kollagennetzwerks wird durch zahlreiche niedermolekulare Proteoglykane unterstützt, welche sich spezifisch anlagern. So unterstützen Biglycan, Decorin, Fibromodulin und die Proteine Matrilin-3- und COMP (engl. *cartilage oligomeric matrix protein*) die Bildung und Erhaltung des Kollagennetzwerks (Huber et al. 2000; Aigner und Stove 2003; Heinegard und Saxne 2011).

1.3.3 Systematik und Struktur der Kollagene

Kollagene sind im menschlichen Organismus ubiquitär vertreten und gehören zu den häufigsten Proteinen überhaupt. Im Gelenkknorpel werden Kollagene von den Chondrozyten synthetisiert und in die extrazelluläre Matrix abgegeben. Von allen im Gelenkknorpel bekannten Proteinen stellen Kollagene den Hauptanteil dar (Kuettner 1992). Die Kollagene werden entsprechend ihrer molekularen Zusammensetzung und ihrer strukturellen Anordnung in unterschiedliche Kollagentypen klassifiziert. Im Gelenkknorpel kommt Kollagen II mit 85 – 95 % des Gesamtkollagengehalts am häufigsten vor. Die prozentuale Verteilung divergiert je nach Alter, dem Gesundheitszustand und der jeweiligen Knorpellokalisation (Eyre 1991; Huber et al. 2000; Ackermann und Steinmeyer 2005). Kollagen XI kommt mit 3 %, Kollagen IX mit 1 – 2 % und Kollagen VI ebenfalls mit 1 – 2 % vor (Trippel 1990; Kuettner 1992; Eyre 2002). In sehr geringen Konzentrationen (< 1 %) sind auch Kollagen III, V, X, XII, XIV und XVI nachweisbar (Eyre 2002; Kassner et al. 2003; Wachsmuth et al. 2006).

Die genannten Kollagene werden in unterschiedliche Klassen eingeordnet. Kollagen II, III und XI gehört der Gruppe der *fibrillenbildenden Kollagene* an. Kollagen VI ist ein *mikrofibrilläres Kollagen*. Als *Netzwerkkollagen* nimmt Kollagen X eine Sonderstellung ein, da dieses Protein hexagonale Netze bildet. Eine relativ neue Kollagengruppe ist die *FACIT (fibril-associated collages with interrupted triple helices)*, welcher Kollagen IX, XII, XIV und XVI angehören (Brinckmann et al. 2005).

Die Besonderheit dieser Kollagene besteht darin, dass die typische tripelhelikale Struktur (*COL-Domänen*) durch nicht-helikale Bereiche (*NC-Domänen*) unterbrochen wird.

Die Unterbrechung der Kollagenhelix erhöht vermutlich die intramolekulare Flexibilität, ebenso die enzymatische Degradation (Eyre 2002; Gelse et al. 2003). Das Kollagenetzwerk der EZM weist im gesunden Knorpel eine ausgesprochen hohe Resistenz gegen enzymatische Degradation auf. Die Halbwertszeit der Kollagenstrukturen wird mit über 100 Jahre angegeben (Goldring und Marcu 2009).

Der biochemische Aufbau der verschiedenen Kollagene zeigt ein universelles Muster. Eine wichtige Grundstruktur ist eine rechtsgängige Tripelhelix, welche aus der Zusammenlagerung von drei Tropokollagenen (α -Ketten) entsteht (Engel und Bächinger 2005). Die Aminosäuresequenz der α -Ketten zeigt einen repetitiven Aufbau aus AS-Tripletts. Je nach Kollagentyp können sich die beschriebenen Tripletts 500-fach wiederholen (Muir 1995; Gelse et al. 2003; Engel und Bächinger 2005).

1.3.4 Systematik und Struktur der Proteoglykane

Proteoglykane bestehen aus fadenförmigen Proteinen, welche Glykosaminoglykane (GAG) als Seitenketten gebunden haben. 20 % des Trockengewichtes aller EZM-Moleküle wird den Proteoglykanen zugeschrieben (Lohmander 1988).

GAG, welche auch als *saure Mukopolysaccharide* bezeichnet werden, können in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden: Hyaluronat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Keratansulfat (Kuettner 1992; Duhia 2005; Hauser 2016).

Jedes GAG setzt sich aus repetitiven Disaccharideinheiten zusammen, wobei immer eine *Uronsäure* (Glukuronsäure oder Iduronsäure) und ein *Aminozucker* (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin) verbaut sind. Die Aminozucker können weiterhin sulfatiert sein (Berg et al. 2014; Hauser 2016).

Hyaluronat weist aufgrund seiner extremen Kettenlänge das größte Molekulargewicht aller GAG auf. Die Disaccharideinheiten können sich 25.000-fach wiederholen. Das Disaccharid besteht aus Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin. Im Gegensatz zu den anderen GAG ist Hyaluronat nicht sulfatiert. Während die anderen GAG immer einen Proteinkern aufweisen, kommt Hyaluronat als *reines Glykan* ohne Proteinkern vor (Hauser 2016). Hyaluronat bildet mit anderen Proteoglykanen, insbesondere Aggrecan, große, nicht-kovalente Aggregate. Ebenso weisen Chondrozyten Rezeptoren (CD44) für Hyaluronat auf.

Insgesamt ist Hyaluronat für die Funktionserhaltung der EZM von großer Bedeutung. Durch die Hyaluronat-Aggregan-Aggregate wird Wasser in der EZM gehalten und somit die Stütz- und Dämpfungsfunktion ermöglicht.

Durch die Bindung an CD44-Rezeptoren auf der Chondrozytenoberfläche erfolgt die Zell-Matrix-Kommunikation (Hardingham und Fosang 1992; Muir 1995; Dudhia 2005; Hauser 2016).

Chondroitinsulfate bestehen aus Glukuronsäure oder Iduronsäure und N-Acetylgalaktosamin. Sie stellen eine heterogene Gruppe mit drei Vertretern dar.

Dermatansulfat kann ebenfalls in die Gruppe der Chondroitinsulfate eingeordnet werden und entspricht dem *Chondroitinsulfat B* (Hauser 2016). Im Gelenkknorpel bestehen ca. 90 % aller GAG aus Chondroitin-6-sulfat (und Keratansulfat), wogegen Chondroitin-4-sulfat nur ca. 5 % ausmacht (Dijkgraaf et al. 1995).

Keratansulfat ist ebenfalls Bestandteil der Proteoglykane Aggrecan und Fibromodulin. Während des Alterungsprozesses des Gelenkknorpels wird im Aggrecan-Molekül Chondroitinsulfat zunehmend durch Keratansulfat ausgetauscht (Roughley und Lee 1994; Hauser 2016). Die Disaccharideinheit besteht aus sulfatierter Galaktose und N-Acetylglukosamin (Hauser 2016).

Der molekulare Aufbau von **Heparansulfat** zeigt verschiedene Möglichkeiten der Disaccharidzusammensetzung. Das Disaccharid besteht aus einer Uronsäure und Glukosamin oder N-Acetylglukosamin. Innerhalb eines Heparansulfatmoleküls können sich unterschiedliche Kombinationen ergeben. Heparansulfat ist wichtiger Bestandteil des Proteoglykans Perlecan (Rabenstein 2002; Hauser 2016).

Die **Proteoglykane** des Gelenkknorpels können in zwei Klassen eingeteilt werden. Eine Gruppe wird durch die großen aggregierenden Proteoglykane Aggrecan und Versican gebildet. Die andere Gruppe durch die kleineren Proteoglykane mit Biglycan, Decorin, Fibromodulin, Perlecan, das *superficial zone protein (SZP)* sowie das *cartilage intermediate layer protein (CILP)* (Buckwalter und Rosenberg 1988; Iozzo et al. 1994; Miosge et al. 1994; Matsumoto et al. 2006; Hauser 2016).

Für die Knorpelfunktion ist Aggrecan qualitativ und quantitativ von herausragender Bedeutung, sodass dieses Proteoglykan im Folgenden beschrieben wird.

Aggrecan ist das aggregierende Hauptproteoglykan des Knorpels. Aggrecan kann über nicht-kovalente Bindungen Hyaluronat binden und so große Proteoglykanaggregate bilden (*Abbildung 1.2*). Das Kernprotein des Aggrecans weist bestimmte Proteindomänen auf, welche durch Disulfidbrücken gebildet werden. Diese werden als globuläre Domänen (G1-G3) bezeichnet.

Die G1-Domäne ist N-terminal lokalisiert und fungiert als Bindungsstelle für Hyaluronat (Kuettner 1992; Muir 1995; Knudson und Knudson 2001). Nach C-terminal gerichtet, folgt der G1-Domäne eine längere, interglobuläre Domäne (IGD). Diese strangförmige Region zwischen der G1- und der G2-Domäne enthält Erkennungssequenzen für degradierende Proteasen, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) oder ADAMTS (engl. *α disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) (Hardingham und Fosang 1992; Dudhia 2005; Porter et al. 2005). Die Funktion der G2-Domäne ist unbekannt, auch wenn die Aminosäuresequenzen und die Struktur der G1-Domäne stark ähneln. Hyaluronat kann an diesen Bereich des Kernproteins nicht anbinden. Möglicherweise verzögert diese Domäne die Sekretion von Aggrecan, um eine möglichst vollständige Glykosylierung zu erreichen (Dudhia 2005). Zwischen der G2- und der C-terminalen G3-Domäne befinden sich Bereiche, wo Keratansulfat und Chondroitinsulfat kovalent gebunden sind. Die Funktion der G3-Domäne ist nicht vollständig erforscht. Möglicherweise dient dieser Bereich als intrazelluläre Erkennungssequenz für die zahlreichen posttranslationalen Modifikationen in den unterschiedlichen Zellorganellen (Hardingham und Fosang 1992; Muir 1995; Dudhia 2005).

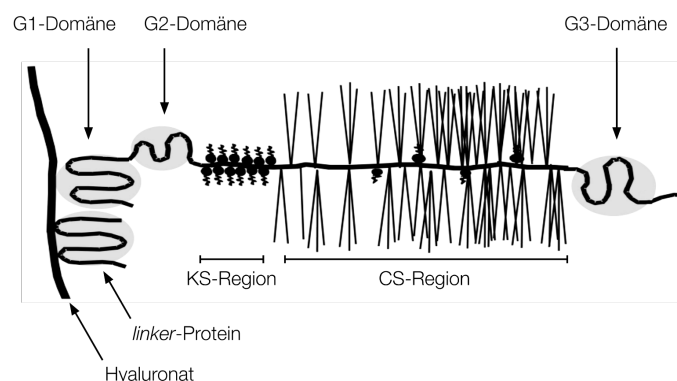


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aggrecan-Hyaluronat-Komplexes.

Das Aggrecan-Molekül zeigt drei globuläre Domänen (G1, G2, G3). Die N-terminale G1-Domäne bindet über ein *linker*-Protein Hyaluronat. Zwischen der G2- und G3-Domäne befinden sich Keratansulfat- (KS) und Chondroitinsulfat- (CS) reiche Proteinregionen. Die G3-Domäne befindet sich am C-terminalen Proteinende. Abbildung entnommen und modifiziert nach PORTER et al. (2005).

1.4 Erkrankungen des Gelenkknorpels: Osteoarthrose

Die Osteoarthrose (Kurzform: *Arthrose*) ist eine degenerative Erkrankung des muskuloskelettalen Systems. Im angloamerikanischen wird die synonyme Bezeichnung *Osteoarthritis* verwendet. Aufgrund der Komplexität dieser Erkrankung gibt es verschiedene Klassifikations- und Definitionsansätze. Je nach Betrachtung sind der patientenorientierte - symptomatische Verlauf, die klinisch - beschreibbaren Befunde, die histologischen Veränderungen oder biochemische Pathologien Schwerpunkt der jeweiligen Definition (O'Reilly und Doherty 2003; Sharma und Kapoor 2007).

Die Osteoarthrose nimmt in der modernen Medizin einen hohen Stellenwert ein. Arthrose ist global die häufigste Gelenkerkrankung des adulten Menschen, mit steigender Prävalenz im hohen Alter (Woolf und Pfleger 2003). Aufgrund des demographischen Wandels wird dieser Erkrankung auch in den nächsten Dekaden medizinisch wie auch gesundheitsökonomisch eine bedeutende Rolle zukommen. Mit dem Ausruf des „Knochen-und-Gelenk-Jahrzehnts“ Anfang 2000 durch die WHO zeigt sich die dringliche Relevanz, moderne Therapiestrategien zu entwickeln und die Erforschung dieser globalen Erkrankung zu forcieren (Fuchs et al. 2013).

1.4.1 Epidemiologie und gesundheitsökonomische Aspekte der Osteoarthrose

Nach WOOLF UND PFLEGER werden muskuloskelettale Erkrankungen in vier Klassen eingeteilt: Die Osteoarthrose, die rheumatoide Arthritis, die Osteoporose und der Lendenwirbelschmerz (Woolf und Pfleger 2003). Die Osteoarthrose ist dabei die häufigste Gelenkerkrankung. Epidemiologische Schätzungen zur Verbreitung dieser Erkrankungen sind jedoch schwierig. Problematisch ist der Vergleich (*Metaanalyse*) der zahlreichen Einzeluntersuchungen, da sich diese in der Methodik unterscheiden. Aufgrund unterschiedlicher Falldefinition (radiologisch-klinisch oder Selbstauskunft), Fallerfassung (z. B. Nachweis von frühen Phasen, welche ggf. symptomlos sind) und Fallabgrenzung (differentialdiagnostische Genauigkeit) zeigen die Einzelstudien große Unterschiede in der Prävalenz und Inzidenz (Fuchs et al. 2013).

Die folgende *Abbildung 1.3* zeigt die Ergebnisse einer repräsentativen Studie des Robert Koch-Institutes aus dem Jahr 2010. Gezeigt wird die Lebenszeitprävalenz der Arthrose in Deutschland für Frauen und Männer.

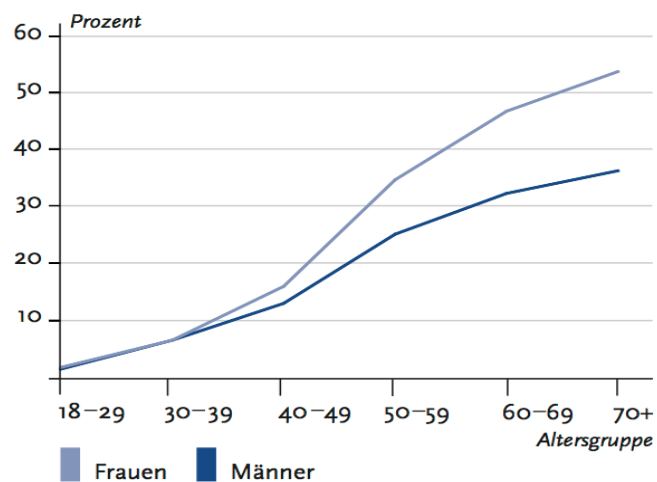


Abbildung 1.3: Darstellung der Lebenszeitprävalenz der Osteoarthritis.

Die Abbildung zeigt die Häufigkeit einer diagnostizierten Osteoarthritis abhängig vom Lebensalter und Geschlecht. Es besteht eine positive Korrelation zwischen erhöhtem Alter und osteoarthrotischen Erkrankungen. Ab dem 40. Lebensjahr steigt die Osteoarthritis-Prävalenz deutlich an. Datenbasis dieser Darstellung: *Gesundheit in Deutschland aktuell* (2010). Abbildung entnommen und modifiziert nach FUCHS et al. (2013).

Gesundheitsökonomisch entstehen durch die Inanspruchnahme ambulanter und stationärer Arthrosebehandlungen hohe Kosten. Das Statistische Bundesamt beziffert in der Krankheitskostenrechnung aus dem Jahr 2008 eine Gesamtbelastung von über 7,6 Milliarden Euro. Bei dieser Summe handelt es nur um direkte Kosten, welche aus der direkten Inanspruchnahme von Leistungen (Arztkonsultation, Medikamente, ...) resultiert. Die indirekten Kosten durch Arbeitsunfähigkeit und Invalidität sind bedeutend höher einzustufen (Fuchs et al. 2013).

1.4.2 Ätiologische Formen und Risikofaktoren der Osteoarthritis

Ätiologisch wird zwischen einer primären und einer sekundären Form der Osteoarthritis unterschieden. Bei der primären (idiopathischen) Form kann der Osteoarthritis keine eindeutige Ursache zugeordnet werden. Sind angeborene oder erworbene Erkrankungen bzw. Verletzungen Grund für die Entwicklung, handelt es sich um die sekundäre Form (Altman 1995). Metabolische Erkrankungen wie beispielsweise Rachitis, Hämochromatose oder Chondrokalzinose, aber auch endokrinologische Krankheitsbilder wie Akromegalie, Hyperparathyroidismus oder Hyperurikämie können sekundäre Arthroseformen begünstigen. Ebenfalls bedeutsam sind angeborene Fehlbildungen wie die Hüftdysplasie sowie Varus- und Valgusfehlstellungen.

Weiterhin können Traumata der Gelenkeinheit ursächlich sein (Poole et al. 2007; Michael et al. 2010). Unabhängig von den genannten Erkrankungen oder Fehlstellungen konnten allgemeine Risikofaktoren identifiziert werden, welche die Initiation und Progression der Osteoarthrose verstärken.

Als endogene Risikofaktoren sind das Alter, das Geschlecht, die genetische Disposition und die ethnische Herkunft beeinflussend (Felson et al. 2000; Nevitt et al. 2002; Reginato und Olsen 2002; Roach und Tilley 2007; Michael et al. 2010). Ein erhöhtes Körpergewicht (Adipositas) stellt dabei den wichtigsten exogenen Risikofaktor dar (Manninen et al. 1996; Coggon et al. 2001; Roach und Tilley 2007; Vrezas et al. 2010; Jiang et al. 2011).

1.4.3 Histologie und Pathomechanismen der Osteoarthrose

Die Gewebe der Gelenke sind in der Lage, Schäden und Stressoren durch Reparaturmechanismen entgegenzuwirken. Solange ein Gleichgewicht zwischen Geweberegeneration- und Destruktion besteht, ist die Funktionalität und Integrität des Gelenkes gesichert. Überwiegen jedoch die destruktiven Einflüsse, entwickeln sich langfristig irreversible Veränderungen bis hin zu einer manifesten Osteoarthrose (Aigner und Stove 2003; Goldring 2012).

Die Veränderungen der Chondrozyten und EZM im Verlauf der Osteoarthrose sind komplex. SANDELL UND AIGNER definieren zentrale Eckpunkte, welche die Veränderungen zusammenfassend beschreiben: Eine gesteigerte Zellproliferation und Apoptose unter Änderung der Zellmorphologie sowie Veränderung der Synthese von Matrixkomponenten und ein erhöhter Einfluss kataboler Faktoren (Sandell und Aigner 2001).

Auf histologischer Ebene lassen sich die Veränderungen des Knorpelgewebes mithilfe des OARSI (engl. *Osteoarthritis Research Society International*)-Systems beschreiben. Durch ein standardisiertes Bewertungsverfahren von histologischen Veränderungen der Chondrozyten und EZM wird ein OARSI-Wert gebildet, welcher von 0 (gesunder Knorpel) bis 6 (vollständige Knorpeldestruktion, freie Knochenexposition der Gelenkflächen) reicht (Pritzker et al. 2006).

Ein wichtiger Marker des frühen osteoarthritischen Gelenkknorpels ist der Verlust von Aggrecan in oberflächlichen Bereichen. Mit fortlaufender Destruktion zeigen sich Kontinuitätsunterbrechungen (Fissuren) der oberflächlichen Knorpelschichten (OARSI-Score ≥ 2).

Neben dem initialen Abbau von Aggrecan wird auch das Kollagen-Netzwerk proteolytisch abgebaut. Die Chondrozyten hypertrophieren und bilden typische Zellcluster. Histologisch lässt sich fibrokartilaginäres Ersatzgewebe identifizieren, welches einen erhöhten Kollagen-I-Anteil aufweist (OARSI-Score ≥ 4).

An der Knorpel-Knochen-Grenze bilden sich Gefäßeinsprossungen mit einwandernden Zellen aus dem Knochenmark, sog. *breaks in tidemark* (Poole 1997; Tesche und Miosge 2005; Lajeunesse und Reboul 2007; Koelling et al. 2009; Heinegard und Saxne 2011).

Der Verlust der physiologischen Zusammensetzung der EZM ist biochemisch vor allem durch die erhöhte Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen und Aggrecanasen (ADAMTS) zu erklären. MURPHY und NAGASE benennen MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und MMP-14 sowie ADAMTS-4, ADAMTS-5 und ADAMTS-9 als katabole Proteasen im osteoarthritischen Knorpel (Murphy und Nagase 2008). Zahlreiche Studien zeigen, dass die Expression der genannten Proteasen durch proinflammatorische Proteine induziert wird. Besonders katabol wirksame Zytokine sind das Interleukin-1 β (IL-1 β) und der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Goldring 2007). IL-1 β und TNF- α werden von in der Synovialmembran lokalisierten Monozyten in die Gelenkflüssigkeit sezerniert und können in das Knorpelgewebe diffundieren (Sellam und Berenbaum 2010). Weiterhin konnte eine endogene IL-1 β -Freisetzung von osteoarthritischen Chondrozyten-Clustern nachgewiesen werden, welche autokrin die MMP-Expression forcieren (Moos et al. 1999; Attur et al. 2000; Tetlow et al. 2001). Weitere katabol wirksame Zytokine sind IL-17, IL-18, VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) und HMGB1 (engl. *high mobility group box chromosomal protein 1*) (Murphy und Nagase 2008; Terada et al. 2011; Amin und Islam 2014). Die beschriebenen Zytokine binden an extrazelluläre Rezeptoren, v. a. TLR (engl. *toll like receptors*) und RAGE (engl. *receptor for advanced glycation endproducts*). Vermittelt durch intrazelluläre Signalkaskaden, kommt es zur gesteigerten Expression von MMP- und ADAMTS-Genen. Die Transkriptionsaktivierung erfolgt über den NF- κ B-Signalweg (Goldring 2012).

1.4.4 Chondrogene Progenitorzellen im osteoarthritischen Knorpel

Fibrokartilaginäres Ersatzgewebe im osteoarthritischen Gelenkknorpel kann als Reparaturversuch verstanden werden. Das faserknorpelige Gewebe kann die Gelenkfunktion zeitweise aufrechterhalten, weist aber langfristig eine geringere Resistenz gegenüber Belastungen auf.

Die fibroblastenartigen Chondrozyten zeigen eine verstärkte Expression von Kollagen I und III, wobei die Expression von Kollagen II sinkt (Miosge et al. 2004; Tesche und Miosge 2005). Weitere Untersuchungen belegen eine erhöhte Expression von Biglycan, Decorin und Perlecan im fibrocartilaginären Knorpel (Bock et al. 2001; Tesche und Miosge 2005). Die gesteigerte Synthese der beschriebenen Matrixbestandteile kann als Reparaturversuch verstanden werden, um den Verlust von Matrixmolekülen im osteoarthritischen Knorpel auszugleichen (Tesche und Miosge 2005).

KOELLING und Kollegen isolierten fibroblastenartige Chondrozyten aus dem arthritischen Gelenkknorpel. Die Zellen zeigten Eigenschaften, welche für Vorläufer- bzw. Progenitorzellen charakteristisch sind. Unter geeigneten Kulturbedingungen können die Zellen adipogen, osteogen oder chondrogen differenziert werden. Weiterhin weisen die Zellen ein erhöhtes Migrationspotential auf. Durch Immunhistochemie und Fluoreszenz-Durchflusszytometrie konnten typische Stammzellmarker nachgewiesen werden: Die Zellen sind positiv für STRO-1, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105. Typische Marker von mesenchymalen Stammzellen, wie CD18, CD31 und CD271, konnten in dieser neu entdeckten Zellpopulation nicht nachgewiesen werden. Zellen mit diesen Eigenschaften werden als *chondrogene Progenitorzellen* (CPC) bezeichnet.

CPCs können in osteoarthritisches Gewebe migrieren. Durch diese Eigenschaft sind die Zellen ein potentieller Therapieansatz in der Erforschung neuer, regenerativer Behandlungen (Koelling et al. 2009).

Das Migrationspotential und das proinflammatorische Verhalten von CPCs bei Stimulation durch das Zytokin HMGB1 ist Schwerpunkt dieser Arbeit.

1.5 Einführung in die HMG-Proteinfamilie

Als Entdecker der Proteine der HMG-Familie gilt die Arbeitsgruppe um ERNEST JOHNS am *Chester Beatty Research Institute* in London. Im Jahr 1973 isolierte JOHNS aus dem Chromatin des Kalbsthymus Nicht-Histon-Proteine, welche ein schnelles Laufverhalten in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigten (Goodwin und Johns 1973). Aufgrund dieser Beobachtung erfolgte die Namensgebung der *high-mobility-group*-Proteine. GOODWIN und JOHNS beschrieben zunächst zwei Isoformen, welche als HMG-1 und HMG-2 bezeichnet wurden. Beide Isoformen zeigten einen hohen Anteil an geladenen Aminosäuren und waren im Zellkern lokalisiert (Goodwin und Johns 1973).

In den folgenden Jahren wurden weitere Isoformen identifiziert. Ihrem Molekulargewicht entsprechend, erfolgte zunächst eine Einordnung in zwei Sammelgruppen: Eine für HMG-Proteine mit hohem und eine Gruppe für geringeres Molekulargewicht (Brown et al. 1980; Goodwin et al. 1980).

Aufgrund der heterogenen Nomenklatur wurde 2001 durch MICHAEL BUSTIN das *HMG Chromosomal Protein Nomenclature Committee* gegründet. Es folgte die Ausarbeitung einer einheitlichen Zuordnung sämtlicher HMG-Proteine in drei HMG-Superfamilien, welche bis heute gültig ist (Bustin 2001). Jede Superfamilie endet mit der Bezeichnung des jeweiligen funktionsrelevanten Proteinmotivs. Die HMGA-Superfamilie wird durch das *AT-hook*-Motiv charakterisiert, die HMGB-Gruppe durch das sogenannte *B-Box*-Motiv und die HMGN-Gruppe durch das *Nucleosom-binding-domain*-Motiv (Abbildung 1.4).

Im Folgenden soll die Funktion und Wirkungsweise der HMGA-, HMGB- und HMGN-Proteine dargestellt werden. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird ausschließlich mit HMGB1 gearbeitet, sodass der Fokus auf diesem Protein liegt.

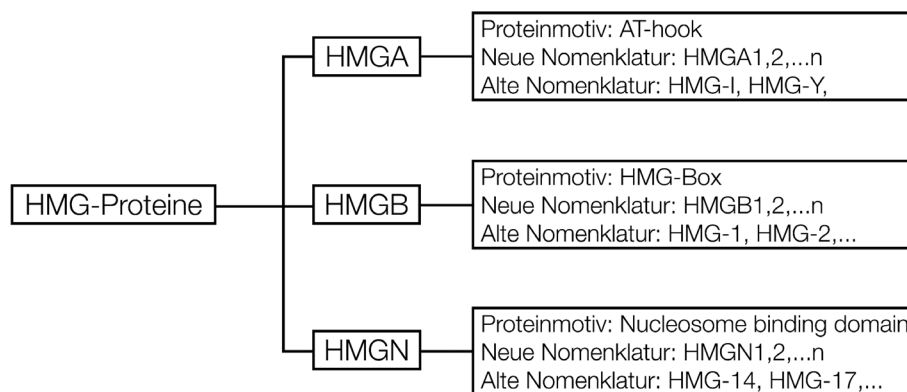


Abbildung 1.4: Neue Nomenklatur der HMG-Proteine.

Gegenüberstellung der alten und neuen Nomenklatur unter Einbeziehung der Proteinmotive. Modifiziert nach BUSTIN (2001).

1.6 Übersicht zur HMGA-Proteinfamilie

Erstbeschreiber von Proteinen aus der HMGA-Gruppe ist SØREN LALAND. 1983 isolierte die Arbeitsgruppe um LALAND zwei neue Proteine aus HeLa-Zellen, welche Ähnlichkeiten zur HMG-Gruppe zeigten. Zunächst wurden die Proteine als HMG-I und HMG-M bezeichnet (Lund et al. 1983). Nach der revidierten Nomenklatur von BUSTIN erfolgte die Umbenennung in HMGA1 und HMGA2 (Bustin 2001).

Gemeinsames Merkmal der HMGA-Gruppe ist das *AT-hook*-Motiv, welches sich in jedem HMGA-Protein dreifach wiederholt. Diese Proteinsequenz weist zahlreiche positiv geladene Aminosäuren auf, über welche in die *minor groove* der DNA eingebunden werden kann (Reeves 2000). HMGA-Proteine sind als Nicht-Histon-Kernproteine an der Chromatin-Umstrukturierung beteiligt und somit in Prozesse der Transkription bzw. Regulation der Genexpression involviert (Maher und Nathans 1996). HMGA1, wie auch HMGA2 ist in adulten Geweben bzw. ausdifferenzierten Zellen kaum nachweisbar. Während der Embryonalentwicklung werden beide Vertreter vermehrt exprimiert, wodurch ein regulatorischer Einfluss auf die Gewebeentwicklung und Differenzierung erfolgt (Cleynen und Van de Ven 2008). Die Aktivität und Lokalisation der HMGA-Proteine ist stark von posttranslationalen Modifikationen abhängig: Phosphorylierungen, Methylierungen und Acetylierungen beeinflussen die Affinität zu verschiedenen Zielstrukturen. HMGA-Proteine gehören zu den am stärksten phosphorylierten Proteinen im Zellkern (Lund et al. 1985; Bianchi und Agresti 2005).

Neuere Beobachtungen zeigen einen Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und einer verstärkten Expression von HMGA-Proteinen. HMGAs haben einen Einfluss auf die Tumorentwicklung und Progression (Fedele und Fusco 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit HMGA-negativen Tumoren eine höhere mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen als mit HMGA-positiven Tumoren (Liau et al. 2008). Aus diesem Grund sind HMGA-Proteine Bestandteil aktueller onkologischer Forschung.

1.7 Übersicht zur HMGN-Proteinfamilie

Die HMGN-Gruppe beinhaltet fünf Mitglieder: HMGN1 – 5. HMGN-Proteine wurden bisher nur in Wirbeltieren beschrieben (Furusawa und Cherukuri 2010). HMGNs beinhalten zwei Kernlokalisationssequenzen, eine *nucleosome-binding domain* sowie ein negativ geladenes C-terminales Proteinende. HMGNs interagieren mit dem Histon H1 (*linker histon*) und forcieren die Genexpression.

Dabei binden HMGNs kompetitiv zu den H1-Histonen in die Chromatin-Struktur und überführen diese in eine transkriptionsfähige Form (Ding et al. 1997). Die Proteine der HMGN-Familie nehmen zahlreiche Funktionen in der Steuerung der Embryonalentwicklung ein. Ähnlich der HMGA-Gruppe, werden die Proteine der HMGN-Familie vor allem während der Entwicklung exprimiert und sind in adulten Organismen in Stammzellen nachweisbar (Pash et al. 1990; Crippa et al. 1991; Furusawa et al. 2006).

1.8 Übersicht zur HMGB-Proteinfamilie

Die HMGB-Gruppe besteht aus vier hochkonservierten Proteinen mit einer ähnlichen Aminosäuresequenz (80 % identisch). Jedes HMGB-Protein weist zwei DNA-bindende Domänen auf, die *HMG-A-Box* und *HMG-B-Box* (Ueda und Yoshida 2010; Kang et al. 2014). Das C-terminale Ende von HMGB1 – 3 ist mit sauren Aminosäuren versehen, über welche Kernproteine gebunden und die Aktivität der HMG-Boxen reguliert werden kann. HMGB4 fehlt dieses saure, C-terminale Ende (Thomas und Travers 2001; Catena et al. 2009).

Die A-Box- und B-Box-Domäne wird auch in zahlreichen anderen Proteinen beschrieben, welche nicht der HMGB-Familie zugeordnet sind. Proteine mit diesen Domänen beeinflussen die Regulation komplexer Entwicklungsprozesse, intrazelluläre Signalkaskaden und die Genexpression (Kang et al. 2014). Beispielsweise sind hier LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*), der Transkriptionsfaktor des Wnt-Signalweges, SOX (*sex-determining region Y-box*) und SRY (*sex-determining region Y*), beides in Entwicklungsprozesse eingebundene Transkriptionsfaktoren, zu nennen (Giese und Grosschedl 1993; Wegner 1999; Ely et al. 2010).

Die Struktur sowie intra- und extrazelluläre Wirkungsweisen von HMGB1 werden im nächsten Abschnitt gesondert beschrieben.

1.8.1 HMGB1-Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen

Humanes HMGB1 weist eine Primärstruktur aus 215 Aminosäuren auf. Von N-terminal betrachtet, wird die Sequenz von Aminosäure 9 bis 79 als *HMG-A-Box* bezeichnet, der Bereich 95 bis 162 als *HMG-B-Box* (*Abbildung 1.5*). Beide Bereiche sind als DNA-bindende Proteindomänen relevant (Bianchi et al. 1992). Die HMG-B-Box beinhaltet Sequenzen, welche als Liganden für die extrazellulären HMGB1-Rezeptoren *TLR4* und *RAGE* dienen (Huttunen et al. 2002).

Die Aminosäuresequenz von Position 186 bis 215 beschreibt das C-terminale, saure Proteinende, welches 30 Asparagin- und Glutaminsäure-Moleküle enthält (Bianchi et al. 1992; Kang et al. 2014). Das C-terminale Ende ist, wie die A- und B-Box, für die DNA-Bindung (*looping*) von wichtiger Bedeutung. HMGB1-Proteine ohne C-terminales Ende weisen eine geringere Affinität zur DNA auf (Stros et al. 1994).

HMGB1 weist zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS: *Nuclear Localization Signal*) auf: Zwischen Aminosäure 28 bis 44 und Aminosäure 179 bis 185. Durch die Kernlokalisationssequenzen wird HMGB1, abhängig von posttranslationaler Modifikation, in den Nukleus zurückgeführt oder akkumuliert im Zytoplasma (Bonaldi et al. 2003).

HMGB1 weist intra- wie auch extrazellulär zahlreiche Funktionen auf, welche wesentlich von posttranslationalen Modifikationen abhängig sind. Hyperacetylierung (indirekt durch Hemmung von Deacetylasen) bewirkt eine Akkumulation von HMGB1 im Zytosol (Bonaldi et al. 2003; Yang et al. 2014). Phosphorylierungen an Serin-Resten in der NLS1-Region erhöhen ebenfalls die zytosolische HMGB1-Konzentration und Sekretion (Youn und Shin 2006).

Einen hohen Einfluss auf die Funktion und Lokalisation von HMGB1 hat der Redoxstatus der drei Cysteine (Cys23, Cys45, Cys106). Die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys23 und Cys45 führt zur Ausbildung der (oxidierten) Disulfid-HMGB1-Form, welche extrazellulär als proinflammatorischer Mediator wirkt. Die reduzierte HMGB1-Form (*fully reduced-HMGB1*) wirkt extrazellulär promigratorisch und nicht inflammatorisch (Liu et al. 2012; Venereau et al. 2012; Yang et al. 2012; Antoine et al. 2014).

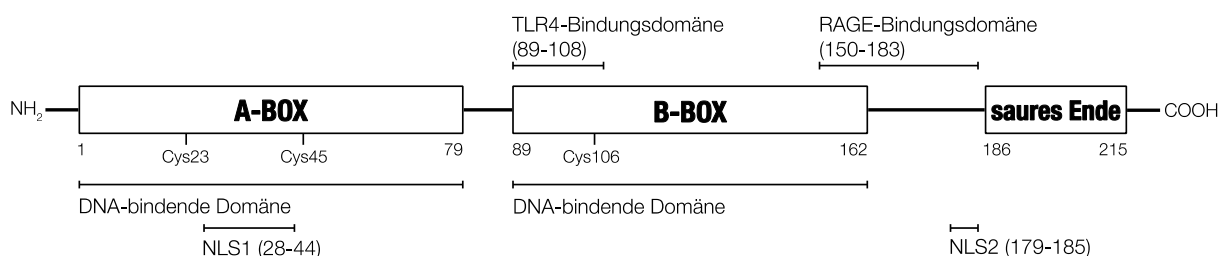


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Proteins HMGB1.

HMGB1 weist eine Primärstruktur von 215 Aminosäuren (AS) auf. Zwischen AS 1-79 befindet sich die DNA-bindende A-Box, welche eine Kernlokalisationssequenz (NLS1) beinhaltet. Die B-Box, von AS 89-162, weist eine Bindungsdomäne für TLR4-Rezeptoren auf. In der C-terminalen Proteinregion ist die RAGE-Bindungsdomäne lokalisiert. Eine weitere Kernlokalisationssequenz befindet sich zw. AS 179-185. Abbildung selbst erstellt unter inhaltlichem Bezug auf KANG et al. (2014).

1.8.2 HMGB1-Funktionen als Kernprotein

Als Kernprotein ist HMGB1 in zahlreiche Funktionen eingebunden. HMGB1 interagiert kompetitiv mit *linker*-Histonen (H1 und H5) und führt zu einer Auflockerung und Entwindung der Chromatinstruktur (Travers 2003; Cato et al. 2008). Durch das C-terminale Proteinende können ATP-abhängige Signalwege zur Chromatinmodifikation initiiert werden. BONALDI und Mitarbeiter beschreiben in diesem Zusammenhang die Aktivierung der nukleosomalen *remodelling*-Komplexe CHRAC/ACF (Bonaldi et al. 2002). Die Interaktion zwischen HMGB1 und Histonen ist ein transienter und dynamischer Prozess, welcher den Kondensationsgrad des Chromatins und damit auch die Genexpression beeinflusst (Falciola et al. 1997).

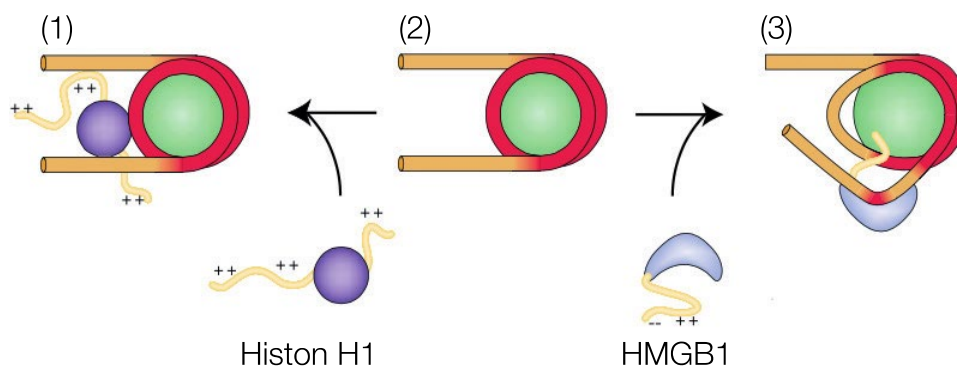


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der nukleären HMGB1-Funktion.

Die Bindung von Histon H1 führt zu einem hohen Kondensationsgrad des Chromatins, welche die Genexpression limitiert (1). Die Amphiphilie des HMGB1 ermöglicht es, DNA aus dem Histon-Oktamer zu decondensieren und diese der Genexpression zugänglich zu machen (3). Abbildung entnommen und modifiziert nach TRAVERS (2003).

Die speziellen Wirkungsweisen von HMGB1 in der Gentranskription sind äußerst komplex. Aktuell sind über 40 Interaktionspartner bekannt, welche im Zusammenspiel mit HMGB1 die Genexpression beeinflussen (Kang et al. 2014). Durch die Interaktion von HMGB1 mit OCT4 (*octamer binding transcription factor 4*) wird beispielsweise die embryonale Stammzellendifferenzierung reguliert (Adjaye et al. 2005).

HMGB1 ist weiterhin in Prozesse der DNA-Reparatur involviert. Studien konnten zeigen, dass das Protein in die Basenexzisionsreparatur, die Nukleotidexzisionsreparatur und in die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen eingebunden ist (Prasad et al. 2007; Lange et al. 2009; Lange und Vasquez 2009).

1.8.3 HMGB1-Funktionen im Zytosol

Die zytosolischen Funktionen von HMGB1 sind kaum erforscht. Ältere Untersuchungen an Herz-, Lungen-, Nieren- und Lebergewebe zeigen, dass die Konzentration von HMGB1 im Kern 30-fach höher ist als im Zytosol (Kuehl et al. 1984).

Heute ist bekannt, dass HMGB1 als Antwort auf multiple Stressoren (Zytokine, Hitze, Hypoxie, H₂O₂, Onkogene) aus dem Kern transloziert wird. Detaillierte Wirkungsweisen sind jedoch weitgehend unbekannt (Kang et al. 2014). Die Arbeitsgruppe von TANG beschreibt zytosolisches HMGB1 als Autophagie-regulierendes Protein. Durch Bindung an Beclin-1, einem Hauptregulator zellulärer Autophagie-Kaskaden, können zerstörte Zellorganellen und Proteinreste abgebaut werden (Kang et al. 2010; Tang et al. 2010).

1.8.4 HMGB1-Extrazelluläre Funktionen, Rezeptoren und Signalkaskaden

Extrazelluläres HMGB1 ist in Prozesse der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Migration sowie in Entzündungsreaktionen und die Angiogenese eingebunden. Die jeweilige Funktion ist von der posttranslationalen HMGB1-Modifikation, der Konzentration und der Bindung an entsprechende Rezeptoren abhängig (Kang et al. 2014).

Extrazelluläre Rezeptoren für HMGB1 sind RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*), TLR (toll-like receptor), CD24 und NMDAR (*N-methyl-D-aspartate receptor*). Im Folgenden soll die Wirkungsweise von RAGE und TLR beschrieben werden, da diese Rezeptoren auch in Zellen des OA-Knorpels nachweisbar sind. Signalkaskaden durch CD24 und NMDAR beziehen sich speziell auf neuronale und hämatopoetische Zellen (Hori et al. 1995; Yu et al. 2006; van Beijnum et al. 2008; Liu et al. 2009; Pedrazzi et al. 2012; Lee und Park 2013).

RAGE ist ein Transmembranrezeptor, dessen extrazelluläre Domäne unterschiedliche Liganden binden kann. Aus diesem Grund wird RAGE auch als Multi-Ligand-Rezeptor bezeichnet. Neben HMGB1 sind S100-Proteine und β -Amyloide potentielle Liganden (van Beijnum et al. 2008a). Zahlreiche Studien zeigen, dass durch Bindung von HMGB1 an RAGE die Zellmigration und Proliferation zunehmen und proinflammatorische Prozesse (Interleukin-Expression) initiiert werden (Degryse et al. 2001; Palumbo et al. 2004; Wu et al. 2013).

Untersuchungen von PALUMBO und BIANCHI zeigen eine HMGB1-RAGE-initiierte Stammzellrekrutierung (Mesangioblasten) in entzündetem Muskelgewebe (Palumbo und Bianchi 2004).

Die RAGE-vermittelten, intrazellulären Signalkaskaden zielen auf die Aktivierung des NFκB-Komplexes ab und forcieren somit die Genexpression (*Abbildung 1.7*) (van Beijnum et al. 2008).

Die Gruppe der TLR besteht aus evolutionär hochkonservierten Proteinen. Derzeit sind vier TLR-Formen bekannt, welche HMGB1 als Ligand binden: TLR2, TLR4 und TLR9 (Park et al. 2004; Park et al. 2006; Yu et al. 2006; Tian et al. 2007; Yanai et al. 2009). Die TLR sind keine spezifischen Rezeptoren für HMGB1 und benötigen für die Aktivierung oftmals Co-Liganden. URNONAVICIUTE beschreibt, dass HMGB1-Nukleosomen-Komplexe (aus nekrotischen Zellen) via Makrophagen-TLR2 proinflammatorische Zytokine freisetzen (Urbonaviciute et al. 2008).

In Gegenwart von bakteriellen LPS-Endotoxinen (Lipopolysaccharide) kann eine Komplexbildung mit HMGB1 (über CD14) den TLR4-Rezeptor aktivieren und die Sekretion von TNF-α in humanen Monozyten stimulieren (Youn et al. 2008).

Die TLR-vermittelten Signalkaskaden führen intrazellulär, wie bei den RAGE-Rezeptoren, zur Aktivierung von NFκB.

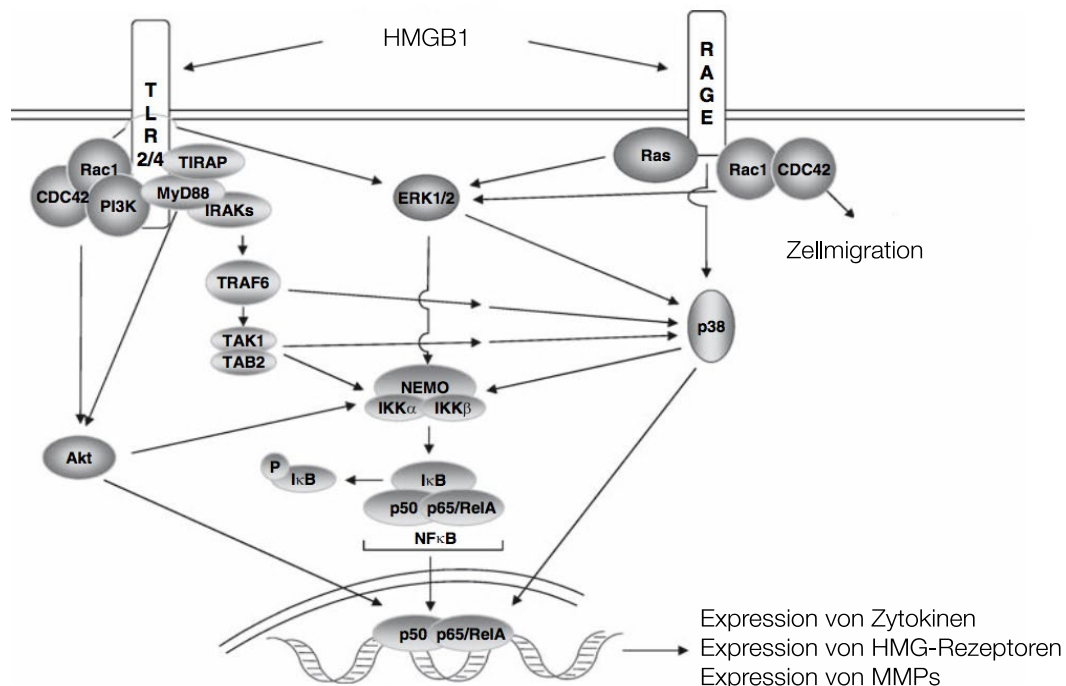


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der TLR- und RAGE-Signalwege.

HMGB1 bindet als Ligand an den TLR2, TLR4 und RAGE-Rezeptor. Die TLR-vermittelte Signalkaskade verläuft über MyD88, IRAK und TRAF in die Aktivierung von NFκB. Alternative Signalkaskaden zur Aktivierung von NFκB laufen über Rac1 unter Rekrutierung der Akt-Kinase oder ERK1/2.

Die Aktivierung von Rac1 und CDC42 am RAGE-Rezeptor initiiert Umbauprozesse des Zytoskeletts, welche als Grundlage der Zellmigration unabdingbar sind. Über Ras und p38 werden ebenfalls NFκB-abhängige Signalwege reguliert. Die Aktivierung von NFκB führt zu einer gesteigerten Expression von Genen, welche für Zytokine, MMPs und HMG-Rezeptoren codieren. Abkürzungen: Akt (*Synonym: Proteinkinase B*), CDC42 (*cell division control protein 42*), ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinases 1/2*), Iκκ α/β (*inhibitor of kappa α/β kinase*), IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*), IκB (*inhibitor of NFκB*), MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), NEMO (*NFκB essential modulator*), NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*), Ras (*rat sarcoma; funktionell eine kleine GTPase*), TAK1 (*Synonym: MAP3K7, Mitogen-activated protein-kinase-kinase 7*), TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*), TLR (*Toll-like receptors*), TRAF (*TNF receptor associated factors*). Abbildung entnommen und modifiziert nach VAN BEIJNUM et al. (2008).

1.8.5 Stand der Forschung: HMGB1 und das osteoarthritische Gelenk

Die zahlreichen physiologischen, aber auch pathophysiologischen Funktionen von HMGB1 im humanen Knorpelgewebe sind wenig erforscht. Erste Publikationen, welche einen Zusammenhang zwischen HMGB1 und Gelenkerkrankungen beschreiben, sind auf das Jahr 2002 zu datieren.

KOKKOLA und Mitarbeiter identifizierten HMGB1 erstmals als proinflammatorischen Mediator bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), Osteoarthritis und im OA-Tiermodell. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass HMGB1 im gesunden Gelenk primär im Kern der Synoviozyten und Chondrozyten lokalisiert ist. Bei RA- und OA-Patienten, wie auch im OA-Tiermodell, zeigte die Arbeitsgruppe von KOKKOLA eine erhöhte zytoplasmatische und extrazelluläre Lokalisation von HMGB1. Ebenso wurde freies HMGB1 in der Synovia nachgewiesen. Da die entzündungsfördernde Funktion von HMGB1 aus Versuchen mit Monozyten und Makrophagen zu diesem Zeitpunkt bekannt war, wurde ein Einfluss von HMGB1 auf die Pathogenese destruierender Gelenkerkrankungen geschlussfolgert (Kokkola et al. 2002). Im Mausmodell wurde die proinflammatorische Wirkung von HMGB1 durch intraartikuläre Injektionen des Proteins bestätigt (Pullerits et al. 2003).

Eine systematische Analyse der HMGB1-Verteilung im humanen Knorpel, abhängig von verschiedenen OARSI-Werten, wurde von TERADA und Mitarbeitern untersucht. Stark destruierte Knorpelproben (hoher OARSI-Wert) zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl von Chondrozyten mit zytosolischem HMGB1-Signal (Terada et al. 2011).

Weiterhin wurde beschrieben, dass die Stimulation von Chondrozyten mit IL-1 β zu einer gesteigerten Expression von HMGB1 führt (Terada et al. 2011). Immunhistochemische Arbeiten von HEINOLA und Mitarbeitern an bovinen OA-Knorpelexplantaten zeigen ebenfalls eine starke Akkumulation von HMGB1 in der intra- und interterritorialen Matrix bei hohem Destruktionsgrad. Weiterhin untersuchte die Arbeitsgruppe erstmals die Tidemark auf extrazelluläres HMGB1, welches nur im OA-Knorpel nachgewiesen wurde (Heinola et al. 2010).

Im OA-Knorpel konnten Gefäßeinsprossungen in der Tidemark als Migrationsort für chondrogene Progenitorzellen identifiziert werden (Koelling et al. 2009). Da HMGB1, abhängig vom Redoxzustand, eine promigratorische Wirkung aufweist, ist eine erhöhte extrazelluläre Konzentration im Bereich der Tidemark als potentieller Faktor für die Regulation der CPC-Migration in erkranktes Gewebe zu werten.

Aktuell gibt es keine Publikationen, welche die Wirkung von HMGB1 auf humane CPCs im OA-Gelenknorpel untersucht. Im Jahr 2012 veröffentlichten SEOL und Mitarbeiter Untersuchungen an gesunden, bovinen Knorpelexplantaten, welche *ex-vivo* durch Gewichtseinschläge geschädigt wurden. In die traumatisierten, hypozellulären Bereiche konnte die Migration von Zellen mit CPC-ähnlichen Eigenschaften dargestellt werden. Die Migration der beschriebenen *putative CPCs* (engl.: mutmaßliche CPC) wurde in Abhängigkeit von unterschiedlichen Medien bzw. Zytokinen untersucht. Neben PDGF und Zellkulturmedien, versetzt mit lysierten Chondrozyten, wurde erstmals HMGB1 als promigratorischer Faktor beschrieben. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe, dass potente Inhibitoren von RAGE die Migration der Zellen vermindern (Seol et al. 2012).

Weiterhin gibt es eine geringe Anzahl an Studien, welche die Wirkung von HMGB1 auf mesenchymale Stammzellen (MSCs) beschreiben. Untersuchungen von MENG und Mitarbeitern zeigen einen promigratorischen Effekt von HMGB1 auf *human bone marrow* MSCs. Ebenfalls forciert HMGB1 die Differenzierung von MSCs in Osteoblasten (Meng et al. 2008). Die Arbeitsgruppe von LIN publizierte eine systematische Untersuchung beteiligter Signalwege (Lin et al. 2016).

Die Experimente von SEOL und MENG basieren auf der Verwendung von rekombinantem, humanem HMGB1, welches keine reine posttranslationale Isoform darstellt. Nach ANDERSSON und ANTOINE ist die genaue Differenzierung in unterschiedliche Isoformen für die entsprechende Funktion und Wirkungsweise von hoher Bedeutung (Andersson et al. 2014; Antoine et al. 2014).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Durch die intensive Grundlagenforschung sind heute zahlreiche Pathomechanismen der Osteoarthritis bekannt. Durch moderne zellbiologische Forschungsansätze wird versucht, die Integrität der EZM möglichst aufrechtzuerhalten und destruiierende Faktoren auszuschalten. Durch die Entdeckung der CPCs eröffnet sich die Möglichkeit zellbasierter Regenerationsansätze, da diese Zellpopulation bereits eine körpereigene Reaktion auf OA-Prozesse darstellt. Durch die Fähigkeit zur Zellmigration können CPCs erkrankte Knorpelbereiche erreichen. Da CPCs – kontrolliert durch die Genaktivität von *runx2* und *sox9* – Kollagene der EZM bilden, besteht eine potentielle Möglichkeit der Geweberegeneration (Koelling et al. 2009; Koelling und Miosge 2009). Ziel der aktuellen Forschung ist es, Signalwege und Mechanismen zu identifizieren, welche das chondro-gene Regenerationspotential der CPCs steigern.

Die Wirkungsweise des Proteins HMGB1 auf CPCs und den OA-Knorpel ist in diesem Zusammenhang nahezu unerforscht. Durch die verschiedenen Redoxformen des Proteins sind zahlreiche Interaktionen mit CPCs möglich. Folgende Punkte sollen im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht werden:

1. Nachweis von HMGB1 in humanen Knorpelproben, Chondrozyten und CPCs durch Immunhistochemie, Immunzytochemie und Western Blot.
2. Nachweis von extrazellulären HMGB1-Rezeptoren (TLR4 und RAGE) auf Chondrozyten und CPCs durch Immunzytochemie.
3. Erstellen von *ex-vivo*-Migrationsschnitten durch in OA-Knorpelgewebe migrierte CPCs. Die Bildung von HMGB1 in CPCs (im OA-Milieu) soll auf m-RNA-Ebene (*in-situ*-Hybridisierung) und Proteinebene (Immunhistochemie) nachgewiesen werden.
4. Untersuchung der Migrationswirkung von *fully reduced*-HMGB1 auf CPCs durch *scratch assay* und *BOYDEN-chamber assay*.
5. Untersuchung der proinflammatorischen Wirkung von Disulfid-HMGB1 auf CPCs im Stimulationsversuch. Die Sekretion von TNF- α und IL-6 wird nach Stimulation im Medium ermittelt (ELISA).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tabelle 2.1: Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Chemikalie/Reagenz/Puffer	Hersteller und Produktnummer
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 3029.2
Agar	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 2266.1
Agarose	USB Corporation (Cleveland, USA) 32802.500GM
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 9592.2
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) A9647-100G
Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Roche (Mannheim, Deutschland) 11383221001
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) A3640,0005
Calcein AM	PromoCell (Heidelberg, Deutschland) PK-CA707-80011
Coomassie <i>brillant blue</i>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 3862.2
D-(+)-Glukose	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) G7021-100G
Denhardts-Reagenz (50x)	Invitrogen (Paisley, UK) 750018
Dextransulfat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 5956.5
Diamidinphenylindol (DAPI)	KPL (Gaithersburg, USA) 71-03-00
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) P030.2
DMEM-GlutaMax™-Zellnährmedium	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland) 21885.025
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) D2650
Eisessig/Essigsäure 100 %	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) A0662,1000
Essigsäureanhydrid	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) CP28.1
Ethanol 100 %	Walter CMP GmbH (Kiel, Deutschland) WAL10503 1000
Ethylendiaminessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) CN06.3
Eukitt <i>quick-hardening mounting medium</i>	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) 03989-100ML
FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	Thermo Fisher (Braunschweig, Deutschland) 10270-106

Fibronectin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) F1141
<i>Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako (Glostrup, Dänemark) S3023
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) CP10.1
Formamid; deionisiert	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) P040.1
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 3783.1
Glycin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) A3707,1000
Hämalaun	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) H3136-25G
Hefeextrakt	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) Y1625-250G
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 7590.1
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) P9333-500G
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 3904.1
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland) 5033.0500
Kollagenase Typ I	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland) 17100-017
Kollagenase Typ II	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) C6885-1G
Lachsspermien DNA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 5434.1
Levamisol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) L0380000
Lichtgrün-SF	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) 62110
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) M2670-100G
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) 63138-250G
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) KK39.2
Milchpulver	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) A0830,0500
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 3957.1
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) 71725-100G
Natriumzitat	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) W302600-1KG-K
Natronlauge (NaOH) 5N	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) 182159
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Roche (Mannheim, Deutschland) 11383213001
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 0335.3
Paraplast plus- Einbettmasse	Leica Biosystems (Richmond, USA) 39502004

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) P4417-100TAB
Poly-L-Lysin-Lösung (mit Thimerosal)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) P8920
Protease 24	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) P6911
Proteinase K	Roche (Mannheim, Deutschland) 108214001
Salzsäure (HCl)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland) 143378
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 4227.3
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 2367.3
Triethanolamin-HCl	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) 90350-250G
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) 5429.3
Triton-X-100	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) T8787-100ML
t-RNA (<i>S. cerevisiae</i>)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) R6750-100MG
Trypsin-EDTA (10x)	PANBiotech (Aidenbach, Deutschland) P10-024100
Trypton	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) T7293-250G
Tween 20	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) P2287-500ML
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) CN80.2

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller und Produktnummer
6-Well-Platte (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) 83.1839.300
12-Well-Platte (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) 83.3921.300
24-Well-Platte (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) 83.3922.300
50-ml-Zentrifugeneinsätze	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) 62.547.254
96-Well-Platte (Polystyrol, schwarz)	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich) 655079
<i>Blotting</i> -Filterpapiere	Heinmann (Schäbisch Gmünd, Deutschland) GB40/B004
ChemiPen WesternBright Leuchtmarkierung	Advansta (Menlo Park, USA) R-07055-001
Deckgläser Ø 10 mm	Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland) CB00100RA1
Deckgläser 24x24 mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) H875
Einbettkassetten	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) K113.1
Objektträger 75 x 25 mm Superfrost PLUS	Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland) J1800AMNZ
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel GmbH (Braunschweig, Deutschland) AA00000102E
Parafilm	BEMIS COMPANY (Neenah, USA) PM-996
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore Merck (Darmstadt, Deutschland) IPVH00010
Radiofilm <i>lucent blue x-ray</i>	Advansta (Menlo Park, USA) L-07014-100
Skalpell No.10	Pfm medical ag (Köln, Deutschland) 02.001.30.010
Zellkultureinsatz (<i>Thin-Cert</i>): 8,0 µm	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich) 665638
Zellkulturflasche TC-Flask T75	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) 83.3911.002
Kryoröhrchen Cryo Tube™ Vials	Thermo Fisher (Braunschweig, Deutschland) 375353
Nylonsieb 40 µm Porengröße	BD Biosciences (Erembodegem, Belgien) 352340
Pipettenspitze (p200)	StarLab GmbH (Hamburg, Deutschland) S1180-8710

2.1.3 Kits und Analysesysteme

Tabelle 2.3: Kits und Analysesysteme

Kit/Analysesystem	Hersteller und Produktnummer
<i>Antibody Diluent</i>	abcam (Cambridge, UK) ab 64211
<i>DAB Buffer</i>	Cell Marque (Rocklin, USA) 957D-11
<i>DAB Chromogen</i>	Cell Marque (Rocklin, USA) 957D-12
DNA Leiter <i>Gene Ruler 100bp</i> (Agarosegel)	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland) SM0321
DNA <i>Loading Dye 6x</i> (Agarosegel)	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland) R0611
ECL WesternBright Peroxide (HRP-Substrat)	Advanta (Menlo Park, USA) R03025-D10
ECL WesternBright Sirius (HRP-Substrat)	Advanta (Menlo Park, USA) R03027-D10
Entwickler (Röntgenfilm)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) P7042-1GA
Fixierer (Röntgenfilm)	Carestream Health (Paris, Frankreich) 507-1071
HiDef Detection™ AP-Amplifier	Cell Marque (Rocklin, USA) 962D-21
HiDef Detection™ AP-Polymer	Cell Marque (Rocklin, USA) 962D-22
HiDef Detection™ HRP-Amplifier	Cell Marque (Rocklin, USA) 954D-21
HiDef Detection™ HRP-Polymer	Cell Marque (Rocklin, USA) 954D-22
PageRuler™	Thermo Fisher (Bremen, Deutschland) SM0671
Perma Red/AP-Auto Chromogen	Emergo Europe (Den Haag, Niederlande) K049C-AUTO
Perma Red/AP-Auto Substrate Buffer	Emergo Europe (Den Haag, Niederlande) K049B-AUTO
pGEM-T Easy-Vektorsystem	Promega (Madison, USA) A1360
ProTaq-Demaskierungslösung	BIOCYC (Luckenwalde, Deutschland) 401602092
Pure Yield™ Plasmid Miniprep System	Promega (Madison, USA) A1223
Roti®-Safe GelStain	Roth (Karlsruhe, Deutschland) 3865.1
Universal-Block	KPL (Gaithersburg, USA) 71-00-61
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Madison, USA) A9281

2.1.4 Antibiotika

Tabelle 2.4: Antibiotika

Antibiotikum	Verwendungszweck	Hersteller und Produktnummer
Gentamycin	Behandlung der Zellkultur mit: 10 µg/ml	Roth (Karlsruhe, Deutschland) HN09.1
Ampicillin	Bakterienselektion: Sondendesign/ISH	Roth (Karlsruhe, Deutschland) K029.1

2.1.5 Antikörper und Zytokine

Tabelle 2.5: Antikörper und Zytokine

Antikörper/Zytokin	Hersteller und Produktnummer
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase	Roche (Mannheim, Deutschland) 11093274910
Anti-GFP	Invitrogen (Paisley, UK) A11120
Anti-HMGB1-ChIP Grade	abcam (Cambridge, UK) ab 18256
Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor 555)	abcam (Cambridge, UK) ab 150114
Anti-Mouse-IgG-Peroxidase	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) A9917
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor 555)	abcam (Cambridge, UK) ab 150074
Anti-Rabbit-IgG-Peroxidase	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) A0545
Anti-RAGE	antikoerper-online (Aachen, Deutschland) ABIN1453837
Anti-TLR4	antikoerper-online (Aachen, Deutschland) ABIN281829
Anti-α-Tubulin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) T6199
Disulfid-HMGB1	HMGBiotech S.r.l. (Milano, Italien) HM-122
<i>fully reduced</i> -HMGB1	HMGBiotech S.r.l. (Milano, Italien) HM-115
Interleukin-1β	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) SRP3083

2.1.6 Geräte

Tabelle 2.6: Geräte

Gerät	Hersteller
Cellometer™ Auto T4	peqLab (Erlangen, Deutschland)
Einfrierbox Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland) 5100-0001
Elektrophoresekammer	Individualanfertigung
Erlenmeyerkolben DURAN® 250 ml	Schott AG (Mainz, Deutschland) 21226360
Fluoreszenzplattenleser Victor X4	PerkinElmer (Waltham, USA)
FluoView 1000 Mikroskop	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
GFL-Wasserbad 1052	GFL GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Glasplatten und Dichtungen (SDS-PAGE)	Individualanfertigung
IKAMAG-REO-Magnetrührer, temperierbar	Janke&Kunkel GmbH (Staufen, Deutschland)
Jung Biocut Mikrotom 2035	Leica Instruments GmbH (Nussloch, Deutschland)
Keyence BZ-9000-Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence GmbH (Neu-Isenburg, Deutschland)
Labor-Wasserbad	Köthermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland) Typ: 3041
MEDAX Paraffinausgießstation Typ 43900	MEDAX GmbH (Rendsburg, Deutschland)
MEDAX Wärmeplatte 14801	MEDAX GmbH (Rendsburg, Deutschland)
Netzgerät pegPOWER	PEQLAB/VWR (Darmstadt, Deutschland) PEQL55-E250-230V
Nikon D90 Spiegelreflexkamera	Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Para-Cooler B Kühlplatte	RWW Medizintechnik (Forchheim, Deutschland)
Pipette: 0,1–2,5 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 3644634
Pipette: 0,5–10 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 4398413
Pipette: 100–1000 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 4691683
Pipette: 10–100 µl	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 4756895
Röntgenkassette	peqLab (Erlangen, Deutschland) ROTHX265.1
Schwenktisch Duomax 1030	Heidolf Instruments (Schwabach, Deutschland)
Shandon Elliott Einbettautomat-SCE0540	Shandon Elliott (Camberley, England)
Tank-Elektroblotter PerfectBlue	peqLab (Erlangen, Deutschland) PEQL52-WEB-10
Thermomixer comfort	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland) No. 5355
Trockenschrank Heraeus B-5042	Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)
Vortex REAX top Heidolph	Heidolph (Schwabach, Deutschland) No. 541.10000.000
Vortex REAXtop	Heidolf (Schwabach, Deutschland) 541.10000.000
Zeiss Axiovert 40 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Zellkulturschrank Labotect C200	Labotect (Göttingen, Deutschland)

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 2.7: Zelllinien

Zellen	Herkunft
CH292ht	Etablierte, hTERT-immortalisierte Zelllinie AG Prof. MIOSGE
CH656-OA	Kollagenaseverdau; Knorpel als Kniearthroplastik
CH657-OA	Kollagenaseverdau; Knorpel als Kniearthroplastik
CPC241ht	Etablierte, hTERT-immortalisierte Zelllinie AG Prof. MIOSGE
CPC242ht	Etablierte, hTERT-immortalisierte Zelllinie AG Prof. MIOSGE
CPC531ht	Etablierte, hTERT-immortalisierte Zelllinie AG Prof. MIOSGE
MSC577	Etablierte Zelllinie AG Prof. MIOSGE; kryokonserviert

2.1.8 Herkunft humaner Gewebeproben und Zelllinien

Das experimentelle Untersuchungsmaterial stammt aus humanem Knorpelgewebe und Zelllinien. Das Gewebe wurde intraoperativ von Osteoarthrose-Patienten entnommen, welche mit einer totalen Kniearthroplastik behandelt werden. Die Patienten sind zum Zeitpunkt der Probeentnahme zwischen 59 und 88 Jahre alt.

Die Gewebeverwendung zu Forschungszwecken erfolgte nach Aufklärung der Patienten mit einer entsprechenden schriftlichen Einwilligung. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen hat die Studie genehmigt (Antragsnummer 25/12/10). Der operative Eingriff erfolgte im akademischen Lehrkrankenhaus Neu-Mariahilf.

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme in DMEM-GlutaMax™ und PBS (Volumenanteil 1:1) überführt und an die *Arbeitsgruppe orale Biologie und Geweberegeneration* (Leitung: Prof. Dr. med. MIOSGE) gesendet.

Für die Experimente wurden weiterhin CPC-Linien und Chondrozyten verwendet. Die Zelllinien CH292ht, CPC241ht, CPC242ht und CPC531ht waren durch lentiviralen Gentransfer mit *humaner Telomerase Reverse Transkriptase* (hTERT) immortalisiert. Die aus dem Kollagenaseverdau isolierten CPC656-OA und CPC657-OA waren nicht immortalisiert. Die immortalisierten Zellen wurden von Frau CTA BODE (*AG orale Biologie und Geweberegeneration*) kultiviert und zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Ablauf der Gewebepräparation

Von neun Patienten wurden Gewebeproben aus dem osteoarthritischen Kniegelenk verwendet. Unter der Zellkulturbank erfolgte die Knorpelpräparation aus der Tibia und dem Femur mithilfe einer individuell hergestellten Henkellochstanze. Bei den Proben für die Migrationsexperimente wurde das Knorpelgewebe von dem subchondralen Knochen mit einem Skalpell präpariert und weiterverarbeitet (*Abschnitt 2.2.6*). Präparate für die Immunhistochemie (IHC) enthielten teilweise subchondrale Knochenabschnitte. Die gewonnenen Stanzpräparate wiesen einen Durchmesser von 1 cm auf.

2.2.2 Gewinnung der chondrogenen Progenitorzellen

Aus degenerierten Randzonen der Knorpelproben wurden dünne, wenige Millimeter große Explantate genommen und in Gewebekulturfalschen überführt. Die Kultivierung der Knorpelchips erfolgte in DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/1 % Gentamycin) für 7 – 10 Tage im Zellkulturschrank. In diesem Zeitraum migrierten CPCs aus dem Knorpelchip heraus in die Kulturflasche, wo sie adhärent wuchsen. Die Knorpelchips wurden mit PBS ausgewaschen und die Zellen weiter kultiviert. Die CPCs sollten ohne Zellkontakte zu Nachbarzellen proliferieren, um eine osteogene Differenzierung zu vermeiden.

2.2.3 Zellkultur, Zellernte, Zellzählung und Passagieren

Die CPC-Linien wurden in DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/1 % Gentamycin) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre aufgezogen. Das Medium war alle 3 Tage zu wechseln und die Kulturflasche mit PBS zu spülen.

Bei einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die Zellen passagiert. Dazu musste sämtliches Medium aus der Kulturflasche entfernt und 2-fach mit PBS gespült werden. Mit einer auf 37 °C temperierten Trypsin-PBS-Lösung erfolgte die Ablösung der adhärenen CPCs. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS) gestoppt, die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 300 g abzentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in PBS konnte die Zellzahl im Cellometer™ bestimmt werden.

2.2.4 Kryokonservierung und Revitalisierung verwendeter Zelllinien

Eine langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C . Zur Konservierung mussten die Zellen in ein spezielles Einfriermedium überführt und langsam abgekühlt werden. Das Medium bestand aus 70 % DMEM-GlutaMax™, 20 % FCS und 10 % DMSO (Gefrierschutz) und ist frisch anzusetzen. In einem Kryoröhrchen wurden max. $1 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. In einer mit 2-Propanol gefüllten Einfrierbox konnten die Zellen von Raumtemperatur beginnend auf -80 °C gekühlt werden (-1 °C/Minute). Nach 24 Stunden erfolgte der Transfer der Proben in Stickstoff.

Das Auftauen der Zellen musste schnell erfolgen. Die Kryoröhrchen wurden in einem Wasserbad (37 °C) aufgetaut und anschließend in eine Zellkulturflasche mit DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/1 % Gentamycin) pipettiert.

2.2.5 Kollagenaseverdau und Kultivierung von OA-Knorpelproben

Aus degenerierten Zonen des Tibiaplateaus bzw. der Femurköpfe wurden dünne, wenige Millimeter große Explantate genommen und in eine 25-ml-Flasche mit Rührfisch überführt. In 10 ml einer frisch angesetzten Kollagenaselösung erfolgte der enzymatische Verdau bei Standardbedingungen im Brutschrank (unter Rühren) für 2 Stunden. Die Suspension wurde anschließend über einem $40\text{-}\mu\text{m}$ -Nylonsieb abfiltriert. Das Filtrat war bei 1400 rpm für 10 Minuten zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das bodenständige Pellet in 1 ml DMEM-GlutaMax™ resuspendiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte im Cellometer™. Nach eintägiger Anzucht in 75-cm^2 -Kulturflaschen sollten Zelldebris mit PBS ausgewaschen und die adhärennten Zellen mit frischen DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/1 % Gentamycin) versorgt werden.

Reagenz:

- **Kollagenase-Lösung:**

Kollagenase Typ I 160 units/ml (Gibco Best.-Nr. 17100-017)

Kollagenase Typ II 600 units/ml (Sigma Best.-Nr. C6885-1G)

Kollagenase Typ I und II: je 1 mg/ml DMEM+10 % FCS mit Gentamycin frisch ansetzen, steril filtrieren ($0,2\text{ }\mu\text{m}$); ca. 20 ml Ansatz.

2.2.6 *Ex-vivo*-Migration von CPC in Knorpelgewebe

Die Knorpelproben für die *ex-vivo*-Migrationsversuche wurden, wie in *Abschnitt 2.2.1* beschrieben, unter sterilen Bedingungen gewonnen. Die Gewebeproben verblieben im Stanzzylinder und wurden in eine 6-Well-Platte mit DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/ 1 % Gentamycin) überführt. Für die Migration sind GFP-transfizierte CPC531ht kultiviert, gewaschen, trypsiniert und gezählt (Cellometer™) worden. Jeder Stanzzylinder erhielt 4000 Zellen in DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/1 % Gentamycin). Der Zylinder war anschließend mit Medium zu füllen. Durch den Zylinder erfolgte die Zellmigration gerichtet in superfizielle Knorpelzonen. Die konstruktionsbedingte Wandbegrenzung verhinderte die freie Migration von Zellen in das Medium und basale Knorpelzonen. Die Migrationszeit betrug 5 Tage bei 37 °C im Zellkulturschrank. Die Gewebeproben wurden aus dem Stanzzylinder entnommen und weiterverarbeitet (*Abschnitt 2.2.7*). Die Kontrolle der Migration erfolgte durch Argon-Laseranregung der GFP-CPC531ht (*Abschnitt 2.2.12*).

2.2.7 Entkalkung der Knorpel-Knochen-Stanzpräparate für die IHC

Stanzproben mit subchondralen Knochenanteilen mussten vor der Fixierung und Einbettung entkalkt werden. Durch das Entkalken lösten sich die knöchernen Hartgewebe auf, was für die Anfertigung dünner Paraffinschnitte unerlässlich war. Für die Entkalkung ist eine 20 %ige Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung anzusetzen. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Chelatbildner-Entkalkung.

Reagenz:

- **20 % EDTA-Lösung:**

400 g EDTA in ein Becherglas (2 l Fassungsvermögen) abwiegen. Zunächst 1700 ml destilliertes Wasser und 210 ml 5 N Natronlauge (NaOH) hinzugeben. Lösung mit einem Magnetrührer (bei 60 °C) für ca. 90 Minuten rühren. Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit Salzsäure (HCl) oder NaOH. Anschließend Volumen bis auf 2 l mit destilliertem Wasser komplettieren. Die Lösung in einer braunen Flasche bei RT lagern.

Die Gewebeproben wurden in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen mit 20 %iger EDTA-Lösung eingelegt. Das Röhrchen ist vollständig mit der Entkalkungslösung zu füllen.

In der ersten Entkalkungswoche war die Lösung täglich zu wechseln, in der zweiten Woche jeden zweiten Tag, in der dritten Woche jeden dritten Tag.

Die Dauer der Entkalkung richtete sich nach den jeweiligen zu entkalkenden Knochenvolumina. Nachdem das Gewebe mit einer Präpariernadel leicht durchstochen werden konnte, endete der Entkalkungsvorgang. Das Gewebe wurde zweimal für 10 Minuten mit Leitungswasser gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

2.2.8 Gewebefixierung und Einbettung für die IHC

Ziel der Fixierung ist, das Gewebe für die folgenden Untersuchungen zu stabilisieren. Die Dimension, die Antigenität und die molekularen Eigenschaften sollten erhalten bleiben. Es gibt verschiedene Fixiermethoden, wobei grundlegend zwischen physikalischen und chemischen Verfahren unterschieden wird. Bei der folgenden Fixiermethode handelt es sich um die chemische Immersionsfixierung mit gepufferten Formalin nach LILLIE. Die LILLIE-Fixierlösung besteht aus Formaldehyd in SÖRENSEN-Puffer. Die Reagenzien wurden folgenderweise angesetzt:

Reagenz:

- **0,3 M SÖRENSEN-Puffer:**

Der SÖRENSEN-Puffer besteht aus einer A- und B-Lösung, welche in einem bestimmten Volumenverhältnis zusammengegeben werden.

Lösung A: 0,3 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)-Lösung; 20,42 g KH_2PO_4 in 500 ml destilliertem Wasser bei RT lösen.

Lösung B: 0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)-Lösung; 85,18 g Na_2HPO_4 in 2000 ml destilliertem Wasser bei RT lösen.

0,3 M SÖRENSEN-Puffer: 182 ml Lösung A und 818 ml Lösung B bei pH 7,4

- **LILLIE-Fixierlösung:**

30 ml 37 % Formaldehyd in 100 ml 0,3 M SÖRENSEN-Puffer mischen. Anschließend mit 270 ml destilliertem Wasser auf Gesamtvolumen von 300 ml auffüllen. Die Lösung ist 6 Wochen bei 4 °C lagerbar.

Die Gewebeproben wurden für 6 Stunden bei 4 °C mit der LILLIE-Fixierlösung behandelt (50-ml-Zentrifugenröhrchen). Nach der Fixierung lagerten die Proben in 70 % Ethanol über Nacht im Kühlschrank (4 °C). Die fixierten Explantate wurden in Einbettkassetten aus Plastik überführt und in den Einbettautomaten (*Shandon Elliott SCE0540*) eingesetzt.

In diesem Gerät durchliefen die Proben verschiedene Konzentrationsreihen von Ethanol, welche zur Entwässerung dienten. Nach dem Durchlaufen der aufsteigenden Ethanol-Reihe verweilten die Präparate in einem Intermedium. Dieses stellt den Übergang zwischen hydrophilen und hydrophoben Stationen dar. In der Regel wird Isopropanol und Xylol verwendet. Diese Stoffe sind Amphiphile und bereiten das Gewebe auf die Infiltration mit Paraffin vor. Die einzelnen Stationen und die jeweiligen Inkubationszeiten im Einbettautomaten sind tabellarisch dargestellt (*Tabelle 2.8*):

Tabelle 2.8: Stationen der Gewebeentwässerung im Einbettautomaten

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

Die paraffinfiltrierten Gewebeschnitte wurden in der Einbettkassette ausgerichtet und mit Paraffin aus der Ausgießstation aufgefüllt.

Die eingebetteten Proben härteten kontrolliert auf einer Kühlplatte aus, was eine gleichmäßige Erstarrung des Paraffins ermöglichte.

2.2.9 Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin

Um die Schnitthaftung der Objektträger zu verbessern, wurde die Glasoberfläche mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 %) mit Thimerosal (0,01 %) beschichtet. Die Lösung ist als Fertigprodukt zu erwerben (Sigma Aldrich: P8920). Die Oberfläche der Objektträger wurde vollständig mit der Poly-L-Lysin-Lösung benetzt und 5 Minuten inkubiert. Anschließend trockneten die Objektträger für 1 Stunde bei 60 °C im Wärmeschrank.

2.2.10 Anfertigung der Paraffinschnitte am Mikrotom

Das Mikrotom ist ein Präzisionsschneidewerkzeug, mit welchem dünne Schnitte aus den Paraffinblöcken erstellt werden. Der paraffinierte Gewebekblock wird von superfiziell nach basal geschnitten. Das verwendete Rotationsmikrotom (*Jung Biocut Mikrotom 2035*) weist ein starr verankertes Messer auf, über welches sich der Problock bewegt. Die Paraffinschnitte haben eine Dicke von 4 – 5 µm.

Die dünnen Paraffinschnitte wurden mit einem angefeuchteten Pinsel (in Wasser eintauchen) vorsichtig vom Messerblock abgehoben und in ein Wasserbad (40 °C) zur Entspannung überführt. Durch Eintauchen der beschichteten Objektträger in das Wasserbad sind die Schnitte an gewünschter Stelle zu platzieren. Die Objektträger trockneten zunächst auf einer Wärmeplatte (37 °C), anschließend für 24 Stunden im Trockenschrank (37 °C).

2.2.11 Immunhistochemie zum Nachweis von HMGB1 im Knorpelgewebe

Durch die Immunhistochemie (IHC) soll die intra- und extrazelluläre Verteilung des Proteins HMGB1 im osteoarthritischen Gelenkknorpel untersucht werden. Als Detektionssysteme werden das *HiDef Detection™ Alkalische Phosphatase Polymer System* (Cell Marque) und das *HiDef Detection™ Horseradish Peroxidase Polymer System* (Cell Marque) verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um eine indirekte Immunmarkierung (Primär- und Sekundärantikörper) mit Signalverstärkung durch enzymgekoppelte Trägerpolymere. Das *Alkalische Phosphatase (AP) Polymer System* setzt enzymatisch ein *Perma Red* Chromogen um, wodurch ein hellroter Farbstoff entsteht. Im *Horseradish Peroxidase Polymer (HRP) System* wird Diaminobenzidin (DAB) oxidiert und bildet ein braunes Endprodukt.

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Einteilung der Gewebeschnitte in Probe- und Kontrollgruppen. In der Kontrollgruppe wurden keine Primärantikörper inkubiert, der restliche Versuchsablauf war mit der Probegruppe identisch. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, wobei in jedem Durchgang mindestens drei Gewebeschnitte als Probe- und als Kontrollgruppe dienten. Vor Versuchsbeginn waren folgende Reagenzien herzustellen:

Reagenzien:

▪ **90 % Ethanol:**

900 ml 100 % Ethanol und 100 ml dest. Wasser.

▪ **80 % Ethanol:**

800 ml 100 % Ethanol und 200 ml dest. Wasser.

▪ **70 % Ethanol:**

700 ml 100 % Ethanol und 300 ml dest. Wasser.

▪ **60 % Ethanol:**

600 ml 100 % Ethanol und 400 ml dest. Wasser.

▪ **50 % Ethanol:**

500 ml 100 % Ethanol und 500 ml dest. Wasser.

▪ **10x TRIS-Buffered Saline and Tween 20 (TBS-T)- Stocklösung:**

24,2 g TRIS (200 mM) und 87,7 g NaCl (1,5 M) in 800 ml dest. Wasser lösen und pH 7,4 (mit HCl) einstellen. Anschließend 5 g Tween 20 zugeben und auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen.

▪ **1x TRIS-Buffered Saline and Tween 20 (TBS-T)- Arbeitslösung:**

100 ml 10x TBS-T und 900 ml dest. Wasser.

▪ **Protease 24-Lösung:**

45 ml dest. Wasser mit 5 ml 0,05 M TRIS-HCl (pH= 7,6), 25 mg CaCl₂ und 25 mg Protease 24 versetzen und homogenisieren.

▪ **1 % Bovines Serum-Albumin (BSA) in 1x TBS-T:**

0,5 g BSA in 50 ml 1x TBS-T (in 50-ml-Röhrchen) lösen und steril filtrieren. Lösung aliquotieren und bei -20 °C lagern.

▪ **Lichtgrün-SF Gegenfärbung:**

0,2 g Lichtgrün-SF und 0,2 ml Eisessig in 100 ml dest. Wasser lösen.

Vorbehandlung der Gewebeschnitte:

Im ersten Schritt musste das Einbettmedium aus den Gewebeschnitten ausgewaschen werden. Die Entparaffinierung wurde in Küvetten mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt (Tabelle 2.9):

Tabelle 2.9: Stationen der Gewebeentparaffinierung

Position	Lösung/Chemikalie	Inkubationszeit (Minuten)
1	Xylol	10
2	Xylol	10
3	100 % Ethanol	5
4	90 % Ethanol	5
5	80 % Ethanol	5
6	60 % Ethanol	5

Nach der Entparaffinierung mussten die Schnitte für 10 Minuten in 1x TBS-T-Lösung gewaschen werden. Um unspezifische Hintergrundsignale in der Immunreaktion zu minimieren, erfolgte eine Behandlung mit Universal-Block-Lösung (50 µl pro Schnitt) für 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei RT. Durch diesen Schritt wurden endogene Phosphatasen und Peroxidasen gehemmt. Nach dem Block sind sämtliche Schnitte dreimal in 1x TBS-T für 3 Minuten zu waschen. Anschließend folgte eine Antigen-demaskierung in einer 60 °C warmen *ProTaq*-Lösung für 20 Minuten. Unter Antigen-demaskierung versteht man die Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur der Epitope bzw. der Antigenität des Präparates.

Nach der Demaskierung erfolgte ein dreifacher Waschschrift in 1x TBS-T für je 3 Minuten. Um die Penetration der Antikörper in das Knorpelgewebe zu erleichtern, wurde ein Vorverdau mit Protease 24 durchgeführt (50 µl Protease-Lösung/OT für 2 Minuten bei RT). Anschließend folgte ein dreifacher Waschschrift sämtlicher Schnitte in 1x TBS-T für je 3 Minuten.

Letzter Schritt der Gewebebehandlung vor der Immunreaktion war ein zweiter Block mit 1 % BSA/TBS-T-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur (50 µl/OT).

Immunreaktion der Gewebeschnitte

Der Primärantikörper (*Tabelle 2.10*) wurde mit *Antibody Diluent* im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die Inkubation der Proben (50 µl pro Schnitt) erfolgte bei RT in einer feuchten Kammer über Nacht (16 Stunden). Die Gewebeschnitte, welche als Kontrollgruppe dienten, wurden nicht mit Primärantikörper inkubiert.

Tabelle 2.10: Primärantikörper der Immunhistochemie

Primärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti-HMGB1-ChIP Grade (<i>abcam; ab18256</i>)	1:200	Mensch Maus Ratte	Kaninchen	polyklonal

Ungebundene Primärantikörper wurden durch dreimaliges waschen in 1x TBS-T (jeweils 5 Minuten) entfernt. Der Sekundärantikörper wird, je nach gewähltem Detektionssystem, als *HiDef Detection™ AP-Amplifier* oder *HiDef Detection™ HRP-Amplifier* bezeichnet. Die Inkubation mit Sekundärantikörper erfolgte für 10 Minuten (50 µl/OT). Anschließend sind die Schnitte dreimal in 1x TBS-T (jeweils 5 Minuten) zu waschen.

Im nächsten Schritt wurde der Sekundärantikörper mit einem Polymer gekoppelt. An das Polymer sind, je nach verwendetem System, multiple AP oder HRP gebunden. Jeder Gewebeschnitt wurde mit 50 µl Polymerflüssigkeit für 10 Minuten behandelt. Danach erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit 1x TBS-T, jeweils für 5 Minuten.

Die Chromogene bestehen aus einem Zweikomponentensystem, welches kurz vor der Färbung zusammengefügt wird. Das *Perma Red Chromogen* wurde im Verhältnis 1:1 mit dem *Perma Red Buffer* gemischt und jeder Gewebeschnitt mit 100 µl Lösung für 10 Minuten unter Sicht inkubiert. Durch die Reaktion der AP mit dem *Perma Red Chromogen* entsteht ein leuchtend roter Farbstoff. Bei ausreichender Intensität (mikroskopische Kontrolle) wurde die Färbereaktion gestoppt (10 Min. in 1x TBS-T).

Die *DAB-Chromogen-Lösung* bestand aus jeweils einem Tropfen *DAB Chromogen* in 1 ml *DAB Buffer* gelöst. Der anschließende Ablauf war dem *Perma Red System* identisch.

Abschließend erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Lichtgrün (für das *DAB Chromogen*) und Hämalan (für das *Perma Red Chromogen*) nach Sicht (ca. 8 Minuten).

Die mit Hämalun gefärbten Präparate mussten anschließend 10 Minuten unter fließendem kaltem Leitungswasser gebläut werden. Vor dem Eindecken waren die Gewebeschnitte zu dehydrieren (*Tabelle 2.11*):

Tabelle 2.11: Stationen der Gewebedehydrierung

Position	Lösung/Chemikalie	Inkubationszeit (Minuten)
1	50 % Ethanol	5
2	60 % Ethanol	5
3	70 % Ethanol	5
4	80 % Ethanol	5
5	90 % Ethanol	5
6	100 % Ethanol	5
7	Xylol	10
8	Xylol	10

Nach der Dehydrierung wurden die Schnitte mit *Eukitt*- Eindeckmedium unter 24 x 24 mm Deckgläsern eingebettet.

2.2.12 Laserexzitation zur Kontrolle der *ex-vivo*-Migration von CPC531ht

Wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, wurden *ex-vivo*-Migrationsschnitte erstellt. Zum Nachweis einer erfolgreichen Migration von CPC 531ht-GFP in osteoarthritische Knorpelimplantate wurde eine Lasermikroskopie durchgeführt. Die migrierten CPCs konnten anhand der GFP-Expression mit einem 488 nm Argon-Laser angeregt und direkt detektiert werden. Die Emission lag bei einem Maximum von 509 nm. Die Untersuchung der Gewebeschnitte erfolgte am konfokalen Lasermikroskop *Olympus Fluoview 1000* in der *Plattform für Klinische Optische Mikroskopie*.

2.2.13 IHC zum Nachweis von HMGB1 in CPC-ex-vivo-Migrationsschnitten

Der Ablauf der IHC entsprach dem Verfahren wie in Abschnitt 2.2.11 beschrieben. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Rabbit-IgG (*Alexa Fluor 555; Thermo Fisher Scientific*) in 1:1000 Verdünnung für 1 Stunde inkubiert. Die Untersuchung der Gewebeschnitte erfolgte am konfokalen Lasermikroskop *Olympus Fluoview 1000* in der *Plattform für Klinische Optische Mikroskopie*.

2.2.14 Immunzytochemie zum Nachweis von HMGB1, TLR4 und RAGE

Die Immunzytochemie (IZC) ist eine Labormethode zum Nachweis von Antigenstrukturen. Im Gegensatz zur IHC werden isolierte, adhärente Zellen untersucht und keine gesamten Gewebeschnitte. Die Detektion der zu untersuchenden Zielproteine findet über fluoreszenzgekoppelte Antikörperbindung statt. Die IZC wurde an Chondrogenen Progenitorzellen (CPC531ht) und gesunden Chondrozyten (CH292ht) durchgeführt. Ziel war der Nachweis der Oberflächenrezeptoren TLR4 und RAGE, sowie intrazelluläres HMGB1.

Zur Versuchsvorbereitung mussten die Zelllinien auf sterilen Menzel-Gläsern (\varnothing 10 mm) in 12-Well-Platten kultivieren. In jedem Well wuchsen 20.000 Zellen für einen Zeitraum von 12 Stunden in DMEM-GlutaMax™-Medium (mit 10 % FCS und 1 % Gentamycin). Weiterhin waren folgende Reagenzien anzusetzen:

Reagenzien:

- **2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS:**

0,5 g PFA in 25 ml PBS (in einem 50-ml-Röhrchen) bei 70 °C im Wasserbad lösen. Die Lösung ist ca. 4 Wochen (bei 4 °C) lagerstabil.

- **0,25 % Triton-X-100 in PBS:**

0,125 g Triton X-100 in 50 ml PBS lösen. Die Lösung ist ca. 4 Wochen (bei 4 °C) lagerstabil.

- **1 % Bovines Serum-Albumin (BSA) in PBS:**

0,5 g BSA in 50 ml PBS (in 50-ml-Röhrchen) lösen und sterilfiltrieren. Die Lösung ist aliquotiert bei -20 °C zu lagern.

Versuchsdurchführung

Zuerst wurde das DMEM-Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die mit adhärennten Zellen bewachsenen Deckgläser durften dabei nicht berührt werden. Die Deckgläser konnten mit einer Pinzette entfernt und auf Parafilm abgelegt werden.

Auf jedes Deckglas wurde 100 µl PBS pipettiert und vorsichtig wieder abgesaugt. Dieser Waschschrift war zweifach durchzuführen. Im Folgenden wurden die Zellen für 15 Minuten mit 100 µl der 2 %igen PAF-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser zweifach mit je 100 µl PBS gewaschen. Für den Nachweis von intrazellulären Proteinstrukturen musste die Zellmembran permeabilisiert werden. Für HMGB1 und RAGE (Antikörper gegen *internal region* gerichtet) war eine Permeabilisierung erforderlich, für den TLR4-Rezeptor nicht. Die entsprechenden Deckgläser wurden für 10 Minuten mit je 100 µl 0,25 % Triton-X-100 bei Raumtemperatur inkubiert und folgend dreifach mit je 100 µl PBS gewaschen, um das Triton-X-100 vollständig zu entfernen. Jedes Deckglas wurde anschließend für 15 Minuten mit 100 µl der 1 %igen BSA-Lösung bei Raumtemperatur geblockt. In der Zwischenzeit sind die jeweiligen Primärantikörper vorzubereiten. Es erfolgte eine Verdünnung der Antikörper in 1 %iger BSA-Lösung (Tabelle 2.12).

Tabelle 2.12: Primärantikörper der Immunzytochemie

Primärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti-HMGB1-ChIP Grad (<i>abcam; ab18256</i>)	1:100	Mensch Maus Ratte	Kaninchen	polyklonal
Anti-RAGE (<i>antikoerper-online; 1453837</i>)	1:100	Mensch	Kaninchen	polyklonal
Anti-TLR4 (<i>antikoerper-online; 281829</i>)	1:100	Mensch	Maus	monoklonal

Auf jedes Deckglas wurden 50 µl Antikörperlösung pipettiert und für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Deckgläser sind anschließend zweifach mit je 100 µl PBS zu waschen, um ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Der Antikörper ist in 1 % BSA in PBS zu verdünnen (Tabelle 2.13).

Der angesetzten Lösung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Diamidinphenylindol (DAPI) im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. DAPI lagert sich in doppelsträngige DNA ein und kann durch Anregung mit UV-Licht blau fluoreszieren (Kerndarstellung).

Tabelle 2.13: Sekundärantikörper der Immunzytochemie

Sekundärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor) (<i>abcam; ab150074</i>)	1:1000	Kaninchen	Esel	polyklonal
Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor) (<i>abcam; ab150114</i>)	1:1000	Maus	Ziege	polyklonal

Die Deckgläser anschließend zweifach mit 100 µl PBS waschen, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit 10 µl *Fluorescens Mounting Medium* auf 76 x 26 mm Objektträger gedeckt. Die mikroskopische Untersuchung der Proben erfolgte zeitnah am Fluoreszenz-Mikroskop (*Keyence BZ-9000*).

2.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist ein analytisches Verfahren, um Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld zu trennen. Bei der verwendeten Methode handelt es sich um die diskontinuierliche Elektrophorese nach LAEMMLI. Das Gel setzt sich aus einer sauren Sammelgelphase (pH 6,8) und einer alkalischen Trenngelphase (pH 8,9) zusammen. Im Sammelgel befinden sich die Geltaschen zur Probenaufnahme. Die Aufteilung der Proteinprobe in molekulargewichtabhängige Banden erfolgt im Trenngel.

Die elektrische Ladung der Proteine und deren Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur beeinflusst die Wanderung im elektrischen Feld. Durch den Zusatz von anionischen Tensiden und Reduktionsmitteln können die Proteinladungen maskiert und die proteinalen Disulfidbrücken reduziert werden. Als Tensid wird das amphiphile Natriumdodecylsulfat (SDS) in die Probe gegeben, als Reduktionsmittel dient β-Mercaptoethanol. Nach der Behandlung liegen die Proteine in ihrer entfalteten Primärstruktur vor, wodurch eine Auftrennung korrelierend zum Molekulargewicht erfolgen kann.

Herstellung der SDS-Gele

Folgende Reagenzien sind vor Versuchsbeginn herzustellen:

Reagenzien:

- **Trenngelpuffer: 1,5M TRIS-Lösung (TGP)**
45,4 g TRIS in 250 ml dest. Wasser lösen. Mit HCl auf pH 8,9 einstellen. Im Kühlschrank lagern.
- **Sammelgelpuffer: 0,5M TRIS-Lösung (SGP)**
15,1 g TRIS in 250 ml dest. Wasser lösen. Mit HCl auf pH 6,8 einstellen. Im Kühlschrank lagern.
- **10 % Sodiumdodecylsulfat-Lösung**
10,0 g SDS in 100 ml dest. Wasser lösen. Bei Raumtemperatur lagern.
- **10 % Ammoniumperoxodisulfat-Lösung**
1,0 g APS in 10 ml dest. Wasser lösen. Im Kühlschrank lagern.

Tabelle 2.14: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-Gelplatten

Chemikalie/Lösung	Trenngel (15 %)	Sammelgel (5 %)
NF-Acrylamid/Bis-Lösung (30 %)	2,78 ml	400 µl
Puffer (TGP/SGP)	1,4 ml	625 µl
Dest. Wasser	1,06 ml	1,35 ml
SDS (10 %)	55 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl
APS (10 %): Polymerisationsinitiator	250 µl	100 µl
Endvolumen	5,3 ml	2,4 ml

Zur Herstellung der SDS-Gele wurden zwei spezielle Glasplatten (Ohrenplatte und Spacer-Platte) benötigt, welche an drei Seiten mit einem Gummiband abdichten. Vom unteren Plattenrand ist im Abstand von 6 cm eine Hilfslinie einzuzeichnen. Die Gele wurden entsprechend des in *Tabelle 2.14* dargestellten Pipettierschemas angesetzt. Um eine frühzeitige Polymerisation zu verhindern, muss APS als letztes Reagenz hinzugefügt werden. Das Trenngel wurde bis zur Markierung gegossen und anschließend mit 100 %igem Ethanol überschichtet. Das Gel muss vollständig auspolymerisieren (ca. 15 Minuten). Zwischenzeitlich kann das Sammelgel pipettiert werden.

Nach Abgießen der Ethanol­schicht wurde das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und die Taschen-*Spacer* eingesetzt. Die erstellten Gele sind für zwei Wochen im Kühlschrank lagerbar.

Probenvorbereitung

Folgende Reagenzien sind vor Versuchsbeginn herzustellen:

Reagenzien:

- **3-fach konzentrierter SDS-Probenpuffer**

3,6 g TRIS mit dest. Wasser in Lösung bringen und mit HCl auf pH 6,7 einstellen, anschließend auf 100 ml Volumen auffüllen. Dann 9 g SDS und 22,5 g Glycerin zugeben. Abschließend eine Spatelspitze Bromphenolblau. Die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

- **3-fach konzentrierter SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol**

Direkt vor Versuchsbeginn frisch ansetzen! 0,9 ml 3-fach SDS-Probenpuffer mit 0,1 ml β -Mercaptoethanol pipettieren.

Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsiniert, im Cellometer™ gezählt und pelletiert. Pro 100.000 Zellen sind 10 μ l 3-fach konzentrierter SDS-Probenpuffer (mit β -Mercaptoethanol) zuzugeben. Die Proben mussten mehrfach stark gevortext und im Thermomixer auf 95 °C erhitzt werden. Das Probenvolumen heiß in die Geltasche (max. 30 μ l/Tasche) applizieren. Das benötigte Volumen richtet sich nach der erwarteten Konzentration des Zielproteins und ist experimentell zu ermitteln.

Ladeschema der Proben und Elektrophorese

Die Gelplatten wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und fixiert. Die obere und untere Kammer ist mit Laufpuffer zu füllen.

Reagenzien:

- **5-fach konzentrierter Laufpuffer (Stammlösung)**

30,3 g TRIS, 142,6 g Glycin und 50 ml 10 % SDS mit dest. Wasser auf 1000 ml lösen und pH 8,7 einstellen.

- **Laufpuffer (Arbeitslösung)**

200 ml 5-fach konzentrierter Laufpuffer in 800 ml dest. Wasser lösen. Bei Raumtemperatur aufbewahren.

Randständige Geltaschen (ohne Untersuchungsmaterial) sollten mit Probenpuffer be- laden werden, um einen gleichmäßigen Durchfluss aller Proben durch das Poly- acrylamidnetz zu ermöglichen. In eine Geltasche musste 3 μ l *PageRuler* pipettiert werden, damit eine spätere Zuordnung der aufgetrennten Proteine zum entsprechenden Mole- kulargewicht erfolgen kann. Der verwendete *PageRuler* markierte Banden im Bereich von 10 – 170 kDa.

Im Sammelgel wurde eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt. Die Proteinproben konzentrierten sich in dünnen Banden am Übergang zum Trenngel. Anschließend wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht und der Versuch beendet, als die eingefärbten Proben das Trenngel vollständig durchlaufen hatten.

2.2.16 Western Blot

Der Western Blot beschreibt ein technisches Verfahren der Proteinübertragung auf eine adsorbierende Membran. Die Übertragung erfolgt in der Regel durch ein elektrisches Feld (Elektrophorese), welches senkrecht auf die vorübergehende Trägermatrix (z. B. Acryl- amid-Gel) gerichtet ist. Die negativ geladenen Proteine lösen sich aus der Trägermatrix, wandern in Richtung Anode und werden in einer PVDF-Membran immobilisiert. Zur Proteinübertragung wird ein gekühlter Transferpuffer in einer *tank*-Elektroblotkammer benötigt. Die übertragenen Proteine können anschließend durch eine Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Daraus resultiert die alternative Bezeichnung des *Immunblots*.

Folgende Reagenzien waren vor Versuchsbeginn herzustellen:

Reagenzien:

- **Transferpuffer (Arbeitslösung)**

6,05 g TRIS, 28,8 g Glycin und 400 ml Methanol (rein) werden auf 2000 ml End- volumen mit dest. Wasser äquilibriert und auf pH 8,3 eingestellt. Die Lösung ist bei 4 °C zu lagern.

Zuerst mussten sechs *blotting*-Filterpapiere und die PVDF-Transfermembran auf die Größe des Polyacrylamid-Gels zugeschnitten werden. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde für 15 Sekunden in 100 % Methanol aktiviert. Die Membran, Filterpapiere und Schwämme sollten vor Versuchsbeginn für 15 Minuten in kaltem Transferpuffer eingelegt werden. Die *Blot*-Einheit in der *Blot*-Kassette setzt sich aus der „*anodisch-roten*“ Kassettenseite, dem Schwamm, drei Lagen Filterpapier, der PVDF-Transfermembran, dem Acrylamid-Trägergel, drei weiteren Lagen Filterpapier, einem Schwamm und der „*kathodisch-schwarzen*“ Kassettenseite zusammen. Die luftblasenfrei zusammengesetzte Kassette wurde mit Gummibändern fixiert und in die *tank*-Elektroblotkammer überführt. Die Blotkammer war zuvor mit kaltem Transferpuffer zu füllen. Die Blotzeit betrug bei 1–2 Gelen ca. 90 Minuten bei 350 mA Stromstärke.

2.2.17 Proteindetektion auf der PVDF-Membran

Die geblottete PVDF-Membran wurde in einer Coomassie-Methanol-Essigsäure-Lösung angefärbt, wodurch bläuliche Proteinbanden erschienen. Die Färbung erfolgte unter Sichtkontrolle auf einem Schwenktisch für ca. 5 – 10 Minuten. Anschließend wurde der Hintergrund durch eine Entfärbelösung, bestehend aus Methanol und Essigsäure, ausgewaschen, die Membran in TBS-T (2 x 5 Minuten) gespült und zur Dokumentation eingescannt.

Folgende Reagenzien waren vor Versuchsbeginn herzustellen:

Reagenzien:

- **Coomassie-Färbelösung (Arbeitslösung)**
0,1 g Coomassie *brilliant blue R*, 50 ml 100 % Methanol und 7 ml 100 % Essigsäure mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen. Lösung bei Raumtemperatur lagern.
- **Coomassie-Entfärber (Arbeitslösung)**
50 ml 100 % Methanol und 7 ml 100 % Essigsäure mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen. Lösung bei Raumtemperatur lagern.
- **10-fach TBS-T (Stammlösung)**
24,2 g TRIS und 87,6 g NaCl in 800 ml dest. Wasser lösen und pH 7,4 einstellen. Anschließend 5 g Tween 20 zufügen und mit dest. Wasser auf ein Zielvolumen von 1000 ml einstellen. Bei Raumtemperatur lagern.
- **1-fach TBS-T (Arbeitslösung)**
100 ml 10-fach TBS-T mit dest. Wasser auf ein Zielvolumen von 1000 ml einstellen.

2.2.18 Spezifische Proteindetektion durch Immunreaktion mit ECL

Spezifische Zielproteine können durch indirekte Immunmarkierung nachgewiesen werden. Im ersten Schritt wird ein gegen das Zielprotein gerichteter Primärantikörper appliziert. Anschließend inkubiert ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper, welcher gegen den *Fc*-Abschnitt des Primärantikörpers gerichtet ist.

Das konjugierte Enzym des Sekundärantikörpers ist eine *horseradish peroxidase* (HRP), welche bei Zugabe eines entsprechenden Substrates (alkalische Luminol-Wasserstoffperoxid-Lösung) eine Chemolumineszenz hervorruft. Durch Zugabe verstärkender Reaktanten (Iodophenol) entsteht eine *enhanced chemiluminescence* (ECL), welche mithilfe eines Röntgenfilmes visualisiert wird.

Vorbereitung und Durchführung der spezifischen Proteindetektion

Folgende Reagenzien waren vor Versuchsbeginn herzustellen:

Reagenzien:

- **Blocklösung**

5 g Milchpulver in TBS-T lösen. Blocklösung immer frisch ansetzen.

- **Röntgenfilm-Entwickler**

Entwicklerkonzentrat 1:4 mit Leitungswasser verdünnen und bei Raumtemperatur in einer Braunglasflasche dicht verschlossen lagern. Die Lösung ist sauerstoffempfindlich!

- **Röntgenfilm-Fixierer**

Fixiererkonzentrat 1:10 mit Leitungswasser verdünnen und bei Raumtemperatur in einer Braunglasflasche dicht verschlossen lagern.

Zuerst wurde die PVDF-Membran in Milch-TBS-T für eine Stunde geblockt (Schwenktisch verwenden). Durch diesen Schritt konnten unspezifische Bindungsstellen auf der Membran belegt und der falsch-positive Hintergrund reduziert werden.

Zur HMGB1-Detektion wurde ein polyklonaler Anti-HMGB1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000 inkubiert (*Tabelle 2.15*).

Tabelle 2.15: Primärantikörper der spezifischen HMGB1-Detektion

Primärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti-HMGB1-ChIP Grad (<i>abcam; ab18256</i>)	1: 10.000	Mensch Maus Ratte	Kaninchen	polyklonal

Die Inkubation der PVDF-Membran erfolgte gekühlt (4 °C) über Nacht (unter Schwenken). Pro Membran wurden 5 ml Antikörperlösung verwendet. Es folgten 5 Waschschrte in TBS-T für jeweils 5 Minuten. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (5 ml) erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Rabbit-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100.000 (Tabelle 2.16). Die Membran war anschließend wie zuvor beschrieben zu waschen.

Tabelle 2.16: Sekundärantikörper der spezifischen HMGB1-Detektion

Sekundärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti-Rabbit-IgG-PO (<i>Sigma Aldrich; A0545</i>)	1:100.000	Kaninchen	Ziege	polyklonal

Die Substrat-Detektionslösung besteht aus einem 2-Komponentensystem: Die Peroxidlösung und die alkalische Luminollösung mussten im Volumenverhältnis von 1:1 zusammen pipettiert und auf Raumtemperatur äquilibriert werden. Pro Membran wurde 1 ml Lösung benötigt, welche in einer Dunkelkammer für 5 Minuten inkubierte. Anschließend wurde die Detektionslösung vorsichtig abgetropft und die Membran zwischen Klarsichtfolie gelegt und in eine Radiokassette (Leuchtmarkierungen anbringen) überführt. In der Dunkelkammer erfolgte durch die ECL-Reaktion die Röntgenfilmbelichtung und Entwicklung. Die notwendige Belichtungszeit musste experimentell ermittelt werden.

Der belichtete Röntgenfilm wurde für 2 Minuten in das Entwicklerbad getaucht, folgend kurz in einem Wasserbad geschwenkt und anschließend für 5 Minuten in der Fixiererlösung stabilisiert. Nach dem Trocknen der Filme sind die *PageRuler*-Banden mit Filzstift zu übertragen.

Zur Ladungskontrolle wurden die Membrane gestrippt (Abschnitt 2.2.20) und die spezifische Proteindetektion mit α -Tubulin wiederholt (Tabelle 2.17, 2.18). Anschließend ist es möglich, eine Quantifizierung der Röntgenfilme vorzunehmen (Abschnitt 2.2.19).

Tabelle 2.17: Primärantikörper der spezifischen α -Tubulin-Detektion

Primärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti- α -Tubulin (Sigma Aldrich; T6199)	1: 5.000	Mensch Ratte	Maus	monoklonal

Tabelle 2.18: Sekundärantikörper der spezifischen α -Tubulin-Detektion

Sekundärantikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Klonalität
Anti-Mouse-IgG-PO (Sigma Aldrich; A9917)	1: 40.000	Mensch Maus Ratte	Kaninchen	polyklonal

2.2.19 Quantifizierung der Immunreaktion

Die Proteinsignale auf den Röntgenfilmen wurden durch Einscannen digitalisiert. Mit dem Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* ist ein Vermessen der Bandendichte und Bandengröße möglich. Zur Berechnung des relativen Proteingehalts musste der Quotient des Bandensignales aus dem Zielprotein zu einer Ladungskontrolle (α -Tubulin) gebildet werden.

2.2.20 Lagerung und Wiederverwendung der PVDF-Membran

Die PVDF-Membran kann bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Membran wurde für 10 Sekunden in Methanol (100 %) eingelegt, auf Filterpapier vollständig getrocknet und umgeben von Pappe in Aluminiumfolie gewickelt und gelagert. Vor der Wiederverwendung musste die Membran erneut mit Methanol aktiviert werden.

Um bereites inkubierte Antikörper von der Membran zu entfernen, ist diese zu *strippen*. Für diesen Arbeitsschritt wurde ein Stripping-Puffer hergestellt.

Reagenzien:

- **Stripping-Puffer (Stammlösung)**

4,88 g TRIS in 900 ml dest. Wasser lösen und pH 6,7 einstellen. Anschließend 20 g SDS zugeben und ein Zielvolumen von 1000 ml mit dest. Wasser einstellen.

- **Stripping-Puffer (Arbeitslösung)**

100 ml Stripping-Puffer mit 1,09 ml β -Mercaptoethanol versetzen. Lösung unter dem Abzug pipettieren.

Der Stripping-Puffer wurde im Wasserbad auf 65 °C erwärmt und die Membran für 15 Minuten unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Es folgte ein doppelter Waschschritt in TBS-T für jeweils 10 Minuten. Die Membran war vor der nächsten Immunreaktion erneut in 5 % Milchpulver-TBS-T zu blocken.

2.2.21 *In-situ*-Hybridisierung: Sondendesign

Das Verfahren der *in-situ*-Hybridisierung ermöglicht es, DNA- oder RNA-Sequenzen in fixierten Gewebe- oder Zellproben nachzuweisen. Zum Nachweis wird ein Nukleinsäurefragment (Sonde) benötigt, welches sich komplementär an die Nukleinsäurezielsequenz anlagert (Hybridisierung). Die Detektion der hybridisierten Sonde – und somit der Zielsequenz – erfolgt autoradiografisch oder mikroskopisch. Das Verfahren zeigt somit die Aktivität der nachzuweisenden Zielgene zum Zeitpunkt der Gewebefixation.

Sondendesign und Markierung

Um die Zielsequenz im Gewebe lokalisieren zu können, muss die Sonde eine hohe Spezifität aufweisen. Um unspezifische Hintergrundsignale zu reduzieren, sollte die Sequenz der Sonde einzigartig komplementär zur Ziel-RNA sein.

Im ersten Schritt wurde tracheale mRNA mithilfe eines *Reverse Transcription Kits* in cDNA umgeschrieben (*Tabelle 2.19*). Die Synthese umfasste zwei Teilschritte, welche hintereinander abliefen. Zuerst wurde RNA (180 ng/µl) mit *7x gDNA-Puffer* und RNase-freies Wasser für 2 Minuten bei 42 °C im Thermomixer inkubiert. Durch diesen Schritt erfolgte eine Elimination potentieller genomischer DNA. Anschließend wurden *Primer*, *RT-Transkriptase* und *RT-Polymerase* in den Reaktionsansatz pipettiert und im Thermomixer bei 42 °C für 15 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung der *RT-Transkriptase* erfolgte bei 95 °C für 3 Minuten.

Tabelle 2.19: Reaktionsansatz PCR zur Synthese von cDNA aus mRNA

Reaktionsansatz 1	Volumen
Tracheale RNA (180 ng/μl)	2,2 μl
7x gDNA-Puffer	4,0 μl
RNase-freies Wasser	21,8 μl
Volumen	28,0 μl
Reaktionsansatz 2	
RT-Polymerase	8,0 μl
RT-Transkriptase	2,0 μl
Primer	2,0 μl
Volumen	12,0 μl
Gesamtvolumen	40,0 μl

Im zweiten Schritt mussten PCR-Primer für HMGB1 designt und die *Annealing*-Temperatur durch Gradienten-PCR ermittelt werden (*Tabelle 2.20*). Die Firma *Operon Biotechnologie GmbH* lieferte den Primer in lyophilisierter Form.

Tabelle 2.20: Primersequenz, Primergröße und Annealing-Temperatur

Zielgen	forward (5'-3')	reverse (5'-3')	Annealing-Temp. (°C)	Basenpaare (bp)
HMGB1	AAGCACCCAGATGCTTCAGT	GCAACATCACCAATGGACAG	55	270

Durch PCR wurde die synthetisierte cDNA amplifiziert. Der Reaktionsansatz und das PCR-Protokoll sind in *Tabelle 2.21* und *Tabelle 2.22* aufgeführt.

Tabelle 2.21: Reaktionsansatz der PCR

Reagenz	Volumen (μl)
cDNA	1
Forward-Primer (100 pmol/μl)	1
Reverse-Primer (100 pmol/μl)	1
Taq-DNA-Polymerase (1U/μl)	3
dNTP (2 mM)	5
10x PCR-Puffer	5
DEPC-Wasser	34
Gesamtvolumen	50

Tabelle 2.22: PCR-Protokoll des realplex Mastercyclers

Zyklus	Zeit (min.)	Temperatur (°C)
Initiale Denaturierung (<i>einfach</i>)	2	94
Denaturierung	1	94
Annealing	2	55
Extension	2	72
Terminale Extension (<i>einfach</i>)	5	75
Gesamtzahl der Zyklen: 30		

Das gewonnene PCR-Produkt wurde mit dem *Wizard SV-Gel & PCR Clean-up-System* (Promega) gereinigt. Zuerst mussten gleiche Volumenanteile des PCR-Produktes und der *Membrane-Binding-Solution* in eine *SV Minisäule* pipettiert und 1 Minute inkubiert werden. Im Folgenden war der Ansatz bei 16.000 g für 1 Minute zu zentrifugieren und der Durchfluss zu verwerfen.

Es folgte ein Waschschrift mit 700 µl *Membrane-Wash-Solution*, welche bei 16.000 g für 1 Minute zentrifugiert und verworfen wurde. Dieser Reinigungsschritt war mit 500 µl Lösung zu wiederholen. Zur Trocknung der Trägersäule musste diese 1 Minute bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und in ein reines *Eppendorf-Cup* überführt werden. Durch Zugabe von 50 µl nukleasefreien Wassers (Inkubation für 2 Minuten) und Zentrifugation bei 16.000 g (1 Minute) erfolgte die Elution des aufgereinigten PCR-Produktes. Die Lösung kann bei -20 °C gelagert werden. Die durchgeführten Versuchsschritte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Vor Versuchsbeginn waren folgende Reagenzien herzustellen:

- **0,5 M EDTA-Lösung:**

46,53 g EDTA in 200 ml Wasser lösen und pH 8,0 mit NaOH einstellen. Zielvolumen von 250 ml mit Wasser auffüllen.

- **50x TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Stocklösung:**

242 g TRIS, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 57,1 ml Essigsäure (100 %) mit KOH auf pH 8,5 einstellen und mit Wasser auf ein Zielvolumen von 1000 ml auffüllen. Lösung bei RT lagern.

- **1x TAE-Arbeitslösung:**

980 ml Wasser mit 20 ml 50x TAE versetzen.

- **100 bp DNA-Leiter:**

2 µl DNA-Leiter (1 µg) mit 3 µl Ladepuffer und 10 µl Wasser pipettieren.

Für das Agarosegel (1,5 %) wurden 0,75 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben überführt, mit 50 ml 1x TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung aufkocht und komplett gelöst war. Zu der Agaroselösung wurden 4 µl *Roti-Safe GelStain* pipettiert und gut vermischt. Durch diesen Fluoreszenzfarbstoff kann doppelsträngige DNA im Agarosegel nachgewiesen werden. Bei einer Temperatur von ca. 60 °C wurde die Agaroselösung in den Trägerschlitten überführt und ein Plastikkamm zur Taschenbildung eingliedert.

Nach 30 Minuten erhärtete das Gel und konnte mit den Proben beladen werden. 20 µl PCR-Produkt wurden mit 5 µl 6x Ladepuffer (*loading dye*) versetzt und in eine Geltasche pipettiert. Weiterhin waren 15 µl DNA-Leiter als Kontrolle zu pipettieren. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben und DNA-Leiter erfolgte bei 90 V für ca. 30 Minuten. Unter UV-Licht wurde das Bandenmuster des PCR-Produktes kontrolliert. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung der Proben durch ein Sequenzierungslabor (*Seqlab* Göttingen).

Klonierung der PCR-Produkte im *pGEM-T Easy*-Vektorsystem

Ziel der Klonierung ist es, eine Gensequenz (engl. *insert*) in einen Vektor (Plasmid) zu integrieren und diesen in kompetenten Bakterien zu vermehren. Plasmide können sich unabhängig von der genomisch-bakteriellen DNA vervielfältigen, wodurch das *insert* (PCR-Produkt) vermehrt repliziert wird.

Zuerst wurde das ringförmige Plasmid durch Restriktionsenzyme geschnitten, wodurch ein lineares DNA-Molekül entstand (Linearisierung). Unter Anwendung des folgenden Ligationsprotokolls wurde das *insert* in das linearisierte Plasmid eingebracht. Die Ligation katalysierte das Enzym *T4 DNA* Ligase. Sämtliche in *Tabelle 2.23* gelisteten Reagenzien wurden zusammen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 2.23: Ligationsprotokoll des pGEM-T Easy-Vektors

Reagenz	Volumen (μl)
2x Rapid Ligation Puffer	5
pGEM-T Easy-Vektor (25 ng)	0,5
PCR-Produkt (288 ng/ μl)	3,5
T4 DNA Ligase	1

Das legierte PCR-Produkt wurde in DH-5- α E.coli Bakterien transformiert. Die kompetenten Bakterien tauten für 10 Minuten auf Eis auf und wurden mit 100 ng des PCR-Produktes versetzt. Der Ansatz musste für 30 Minuten auf Eis inkubieren. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung (30 Sekunden bei 42 °C), welche die Inkorporation der Plasmide in die Bakterien forcierte. Abschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten auf Eis gekühlt und mit 950 μl SOC-Medium (RT!) versetzt.

- **SOB-Medium (nach HANAHAH):**

Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l), Trypton 2 % (w/v) (20 g/l), Natriumchlorid 10 mM (0,6 g/l), Kaliumchlorid 2,5 mM (0,2 g/l) vermischen und bei 121 °C für 20 Minuten autoklavieren. Vor Gebrauch 20 mM (10 ml/l) einer 2 M Mg^{2+} -Lösung applizieren (bestehend aus 1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Der pH-Wert ist bei 6,8 einzustellen.

- **SOC-Medium:**

Zugabe von 20 mM D-(+)-Glucose zum SOB-Medium.

Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 1 Stunde im *Thermomixer* (350 U/min) inkubiert. Auf zuvor erstellten LB-Agar-Platten wurden 100 μl des Transformationsansatzes mit einem DRIGALSKI-Spatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

- **LB-Komplexmedium (modifiziert nach MILLER) für Agar-Platten:**

Hefeextrakt 0,5 % (5 g/l), Trypton 1 % (10 g/l), Natriumchlorid (10 g/l) zusammen mit Agar 1,5 % (15 g/l) für 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren und anschließend auf 42 °C im Wasserbad äquilibrieren. Es folgt die Zugabe von **Ampicillin** (1:1000). Der Ansatz wird in sterile Petrischalen gegossen.

Durch die *pGEM-T Easy*-Vektor- vermittelte Antibiotikaresistenz wurden die Bakterien selektioniert. Somit konnten nur erfolgreich transformierte Bakterien auf den LB-Agar-Platten wachsen. Nach erfolgter Inkubation wurden die selektionierten Bakterienkolonien als weiße Punkte sichtbar, mit einem Zahnstocher gepickt und in ein LB-Medium überführt. Das angeimpfte Medium wurde für 18 Stunden bei 37 °C im *Thermomixer* (200 U/min) inkubiert. Durch diese Methode entstanden Klone, welche Plasmide mit dem Ziel-Genfragment in kleinen Mengen amplifizierten. Zur Kontrolle, ob die Transformation in den gepickten Klonen erfolgreich war, erfolgte die Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA. Anschließend wurde das *Insert* durch spezifische Restriktionsenzyme aus dem Vektor geschnitten und durch Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüft.

Aufreinigung der Plasmid-DNA durch das *Pure Yield™ Plasmid Miniprep System*

Im ersten Schritt wurden 1,5 ml der Bakterien-Lösung bei Maximalgeschwindigkeit (MG) zentrifugiert (30 Sekunden) und der Überstand verworfen. Dieser Schritt war im gleichen Eppendorf-Cup zu wiederholen. Anschließend musste das Pellet mit 600 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 100 µl *Cell Lysis-Puffer* versetzt werden. Nach vorsichtigem Durchmischen des Ansatzes wurde 350 µl *Neutralisationslösung* (4 °C) zugegeben und die Suspension 3 Minuten bei MG zentrifugiert. Im Folgenden mussten 900 µl des Überstandes auf eine Minisäule gegeben und für 15 Sekunden bei MG zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde verworfen und 200 µl *Endotoxin Removal Wash* auf die Säule pipettiert (15 Sekunden bei MG zentrifugieren). Die Säule wurde abschließend mit 400 µl *Collum Wash Solution* gereinigt (30 Sekunden bei MG zentrifugieren). In einem sauberen Eppendorf-Cup erfolgte die Elution der gereinigten Plasmid-DNA mit 30 µl nuklease-freiem Wasser (1 Minute Inkubation auf der Säule, dann 15 Sekunden zentrifugieren bei MG).

Enzymatischer Verdau der Plasmid-DNA (*Fast Digest-Methode*)

Der *pGEM-T Easy*-Vektor weist spezifische Sequenzen auf, an welche Restriktionsenzyme binden und schneiden. Durch diesen Vorgang kann das *Insert* aus dem Vektor ausgeschnitten werden. Bei der *Fast Digest-Methode* wurde der Reaktionsansatz mit entsprechenden Restriktionsenzymen für 10 Minuten auf 37 °C erhitzt (*Tabelle 2.24*). Bei den Enzymen handelte es sich um *SpeI* und *NcoI*, welche keine *star activity* aufwiesen.

Die *star activity* vermindert die Selektivität eines Restriktionsenzymes für spezifische DNA-Sequenzen unter bestimmten Bedingungen, wodurch unspezifische DNA-Schnitte erfolgen.

Tabelle 2.24: Enzymatischer Verdau der Plasmid-DNA

Reagenz	Volumen (µl)
10x Fast Digest Green-Buffer	2
Plasmid-DNA (1 µg)	x
Enzym <i>SpeI</i>	0,5
Enzym <i>NcoI</i>	0,5

Der enzymatische Verdau wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft und zur Sequenzierung an die Göttinger Firma *Seqlab* gesendet.

***In-vitro*-Transkription zur Herstellung von RNA-Sense/Antisense-Sonden**

Die molekularbiologische Methode der *in-vitro*-Transkription ermöglicht es, aus einer DNA-Sequenz RNA zu synthetisieren. In der DNA-Sequenz des *pGEM-T Easy*-Vektors sind spezifische Promotorregionen lokalisiert, wo RNA-Polymerasen binden und die Transkription starten. Diese werden als T7-RNA-Polymerase-Promotor und SP6-RNA-Polymerase-Promotor bezeichnet. Die entstehenden RNA-Sequenzen werden mit Digoxigenin (DIG) markiert. Es handelt sich dabei um das Aglykon des Herzglykosids Digoxin. Im Reaktionsansatz wird DIG an Uridintriphosphat gekoppelt. Das DIG der RNA-Sonden kann nach erfolgter *in-situ*-Hybridisierung über Immunreaktionen detektiert werden. Da der Vektor mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wird, entsteht in der *in-vitro*-Transkription eine RNA-Sense-Sonde, welche mit der gesuchten Ziel-m-RNA identisch ist und eine zur Ziel-m-RNA komplementäre RNA-Antisense-Sonde. Die Reaktionsansätze für die *in-vitro*-Transkription sind in *Tabelle 2.25* dargestellt.

Tabelle 2.25: Reaktionsansatz der *in-vitro*-Transkription

Ansatz 1	Volumen (µl)	Ansatz 2	Volumen (µl)
DNA linearisiert NcoI (1 µg)	8,4	DNA linearisiert SpeI (1 µg)	9,6
10x dNTP-DIG (1 mM E.K.)	2	10x dNTP-DIG (1 mM E.K.)	2
5x Transkriptionspuffer	4	5x Transkriptionspuffer	4
RNase-freies Wasser	3,6	RNase-freies Wasser	2,4
RNA-Polymerase Spe6	2	RNA-Polymerase T7	2
RNase-Inhibitor <i>Ribolock</i>	1	RNase-Inhibitor <i>Ribolock</i>	1

Die verwendete Sonde zur Detektion von HMGB1-RNA wurde von CTA C. BODE und Dr. med. dent. G. WAGNER designt und in der *Arbeitsgruppe orale Biologie und Geweberegeneration* etabliert.

2.2.22 *In-situ*-Hybridisierung: HMGB1-RNA-Detektion

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden alle zu verwendenden Labormaterialien (Küvetten, Messbecher, Messzylinder, Deckel, ...) im Thermoschrank ausgebrannt (4 Stunden bei 180 °C). Folgende Reagenzien waren anzusetzen:

Reagenzien:

- **90 % Ethanol:**
900 ml 100 % Ethanol und 100 ml dest. Wasser.
- **80 % Ethanol:**
800 ml 100 % Ethanol und 200 ml dest. Wasser.
- **70 % Ethanol:**
700 ml 100 % Ethanol und 300 ml dest. Wasser.
- **10 x PBS- Stocklösung:**
81,80 g NaCl (1,4 M), 2,01 g KCl (27 mM), 2,04 g KH₂PO₄ (15 mM) und 12,78 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O (90 mM) in 1000 ml dest. Wasser lösen, dabei pH 7,0 einstellen. Lösung autoklavieren.
- **1 x PBS- Arbeitslösung:**
100 ml 10x PBS und 900 ml dest. Wasser.
- **0,3 % Triton-X-100 in PBS:**
0,15 g Triton X-100 in 50 ml 1x PBS lösen.
- **Proteinase K-Lösung:**
10 µg Proteinase K/ml TRIS-EDTA (pH= 8,0); (100 mM TRIS/50 mM EDTA)
- **Glycin-Lösung:**
0,75 g Glycin in 100 ml 1 x PBS lösen (100 mM). Bei RT lagern.

- **4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS:**

0,5 g PFA in 25 ml PBS (in einem 50-ml-Röhrchen) bei 70 °C im Wasserbad lösen. Bei 4 °C maximal eine Woche lagerbar.

- **TRAP-Lösung:**

18,56 g Triethanolamin-HCl in 1000 ml dest. Wasser lösen, dabei pH 8,0 einstellen. Die 100 mM Lösung bei RT lagern.

- **Essigsäureanhydrid-TRAP-Lösung:**

250 µl Essigsäureanhydrid in 100 ml 100 mM TRAP-Lösung direkt vor der Verwendung ansetzen. Die Lösung kann nicht gelagert werden.

- **20 x SSC-Lösung:**

175,3 g NaCl (3 M) und 88,23 g Natriumzitat (0,3 M) in 800 ml dest. Wasser lösen und pH-Wert mit 10 N NaOH auf 7,0 einstellen. Anschließend Endvolumen von 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen. Lösung autoklavieren und bei RT lagern.

- **10 x TRIS-EDTA-Lösung:**

12,11 g TRIS (100 mM) und 2,92 g EDTA (10 mM) in 900 ml dest. Wasser lösen und pH-Wert auf 8,0 einstellen. Endvolumen von 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen. Lösung bei RT lagern.

- **1 x TRIS-EDTA-Lösung:**

100 ml TRIS-EDTA-Lösung in 900 ml dest. Wasser lösen. Lösung bei RT lagern.

- **Hybridisierungslösung:**

5 ml deionisiertes Formamid (Fertiglösung)

2 ml 20 x SSC

0,2 ml 50 x Denhardts-Reagenz (Fertiglösung)

0,5 ml Lachsspermien DNA (10 mg/ml)

0,25 ml t-RNA (10 mg/ml)

2 ml 50 % Dextransulfat-Lösung (zuvor in dest. Wasser bei 50 °C gelöst)

Die angesetzte Lösung ist bei -20 °C für 2 Monate lagerbar. Die Sonde wird direkt vor Versuchsbeginn zugefügt.

▪ **Detektionspuffer 1:**

12,1 g TRIS (100 mM) und 8,7 g NaCl (150 mM) in 900 ml dest. Wasser lösen und pH-Wert auf 7,5 einstellen. Endvolumen von 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen. Lösung bei RT lagern.

▪ **Detektionspuffer 2:**

4 g Milchpulver in 80 ml Detektionspuffer 1 lösen. Lösung immer frisch ansetzen.

▪ **Detektionspuffer 3:**

12,1 g TRIS (100 mM), 5,8 g NaCl (100 mM) und 4,7 g MgCl₂ (50 mM) in 900 ml dest. Wasser lösen, pH-Wert auf 9,5 einstellen und Endvolumen von 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen. Puffer bei 4 °C lagern.

▪ **Levamisol-Lösung:**

10 mg Levamisol in 1 ml dest. Wasser lösen und bei -20 °C lagern.

▪ **Färbelösung:**

3,4 µl NBT, 3,5 µl BCIP und 24 µl Levamisol-Lösung in 1 ml Detektionspuffer 3 frisch ansetzen.

Versuchsdurchführung:

Die Gewebeschnitte wurden in Probe- und Kontrollgruppen eingeteilt. Im ersten Schritt musste das Einbettmedium aus den Gewebeschnitten ausgewaschen werden. Die Entparaffinierung wurde in Küvetten mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt (*Tabelle 2.26*):

Tabelle 2.26: Stationen der Gewebeentparaffinierung

Position	Lösung/Chemikalie	Inkubationszeit (Minuten)
1	Xylol	10
2	Xylol	10
3	100 % Ethanol	5
4	90 % Ethanol	5
5	80 % Ethanol	5
6	70 % Ethanol	5

Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreifach in 1 x PBS für 5 Minuten gewaschen und zur Vorbereitung der Hybridisierung 15 Minuten in 0,3 % Triton-X-100-Lösung permeabilisiert und entfettet. Darauf erfolgte ein dreifacher Waschschrift für 5 Minuten in 1 x PBS. Anschließend mussten die Schnitte für 30 Minuten bei 37 °C im Thermoschrank mit Proteinase K inkubieren. Zur Inhibition der Proteinaseaktivität wurden die Objektträger für 5 Minuten mit 100 mM Glycin beschichtet. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 5 Minuten. Die Reduktion von Hintergrundartefakten wurde durch eine Behandlung mit 0,25 %iger Essigsäureanhydrid-TRAP-Lösung (10 Minuten) durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Sondeninkubation mussten die Schnitte für 60 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer mit Hybridisierungslösung (ohne Sonde) benetzt und anschließend vorsichtig abgesaugt werden.

Die DIG-markierte Anti-HMGB1-RNA-Sonde wurde aus dem -80 °C Thermoschrank entnommen, zwischenzeitlich eisgekühlt und bei 65 °C für drei Minuten im *Thermomixer* aktiviert. Die weitere Zwischenlagerung erfolgte auf Eis. Je 2 µl Sondenvolumen wurden in 38 µl Hybridisierungslösung gelöst. *Antisense*- und *Sense*-Sonde sowie eine weitere Kontrolle ohne Sonde war in jedem Versuchsdurchlauf getrennt anzuwenden.

Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von 41 °C in einer feuchten, abgeschlossenen Kammer für 21 Stunden hybridisiert und anschließend gewaschen (drei Waschschrift in vortemperierten Standküvetten bei 40 °C). Für 10 Minuten wurde in 2 x SSC, dann in 0,1 x SSC und abschließend in 1 x PBS gewaschen.

Zur Detektion der hybridisierten Sonde mussten alle Schnitte für 5 Minuten mit Detektionspuffer 1 benetzt und anschließend für 30 Minuten mit Detektionspuffer 2 inkubiert werden.

Die Antikörperreaktion gegen die digoxigeningekoppelten Sonden erfolgte mithilfe eines Anti-DIG-alkalische Phosphatase Antikörpers. Bei einer Verdünnung von 1:500 wurde der AK für 3 Stunden bei 37 °C (50 µl/OT) inkubiert.

Tabelle 2.27: Antikörper der *in-situ*-Hybridisierung

Antikörper	Verdünnung	Reaktivität	Wirt	Konjugation
Anti-DIG-AP (Roche; 11093274910)	1: 500	DIG	Schaf	Alkalische Phosphatase

Nach dem Ende der Inkubationszeit mussten die Gewebeschnitte dreifach für 10 Minuten in Puffer 1 und einfach für 5 Minuten in Puffer 3 gewaschen werden.

Anschließend wurde die NBT/BCIP-Färbelösung auf die Schnitte pipettiert (50 µl/OT) und bei RT in einer abgedunkelten, feuchten Kammer für 1 Stunde inkubiert. Die Färbereaktion stoppte durch Verwendung einer 1x TRIS-EDTA-Lösung (1 Minute). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (1:500 in PBS) für 20 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte waren abschließend mit 1x PBS zu spülen (10 Sekunden) und zu dehydrieren.

Tabelle 2.28: Stationen der Gewebedehydrierung

Position	Lösung/Chemikalie	Inkubationszeit (Minuten)
1	70 % Ethanol	5
2	80 % Ethanol	5
3	90 % Ethanol	5
4	100 % Ethanol	10
5	Xylol	10
6	Xylol	10

Nach der Dehydrierung wurden die Schnitte mit *Eukitt*-Eindeckmedium unter 24 x 24 mm Deckgläsern eingebettet.

Die Untersuchung der Gewebeschnitte erfolgte am konfokalen Lasermikroskop *Olympus Fluoview 1000* in der *Plattform für Klinische Optische Mikroskopie*.

2.2.23 *In-vitro scratch assay*

Experimentelle Grundlage des *scratch assays* ist ein definierter, zellfreier Korridor innerhalb eines Zell-Monolayers, in welchem die Zellmigration über bestimmte Zeitintervalle dokumentiert wird. Der zellfreie Bereich wird durch das Kratzen (engl. *scratch*) mit einer Pipettenspitze definiert. Als experimenteller Leitfaden wurde das standardisierte Protokoll „*In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*“ aus *nature protocols* verwendet (Liang et al. 2007).

Als Vorbereitung erfolgte eine Markierung des Bodens der 6-Well-Platten (von der Unterseite) mit drei farbigen, parallel ausgerichteten Referenzlinien. Senkrecht zu diesen Linien wurde im späteren Verlauf der *scratch* durch den Zell-Monolayer geführt. Mithilfe der farbigen Linien ergaben sich wiederauffindbare Schnittpunkte, welche gut dokumentiert werden konnten.

Vor Versuchsbeginn musste der Boden jedes Wells mit Fibronectin überzogen werden (1 ml Fibronectin-Lösung (10 µg/ml) für 12 Stunden bei 4 °C inkubieren und anschließend absaugen). Im nächsten Schritt erfolgte ein einstündiger Block mit 3 ml BSA pro Well (2 mg/ml) bei 37 °C. Dann wurde einmal mit 3 ml PBS vorsichtig gewaschen. In jedem Well kultivierten 50.000 Zellen CPC531ht in 2 ml DMEM-GlutamaxTM-Medium (5 % FCS und 1 % Gentamycin) unter Standardbedingungen für 24 Stunden.

Der Volumenanteil von FCS wurde von normalerweise 10 % in der Standard-Zellkultur auf 5 % reduziert. Damit sollte verhindert werden, dass die normale Zellproliferation die Migration der Zellen überlagert. Die FCS-Konzentration war so zu wählen, dass die Zellen vital und adhärent blieben.

Nach Ende der Inkubationszeit war in jedem Well ein gerader, senkrecht zu den Farbmarkierungen verlaufender *scratch* anzulegen (p200-Pipettenspitze). Um abgelöste Zellen aus dem Ansatz zu entfernen, war jedes Well zweifach mit 3 ml PBS zu waschen. Insgesamt wurden 12 Wells (zwei 6-Well-Platten) nach dem beschriebenen Prinzip angelegt: Drei Wells für die Kontrollgruppe und drei Wells für die Probegruppen mit 10, 50 und 100 ng HMGB1 in 1 ml DMEM-GlutamaxTM. Für den Versuch wurde *fully reduced*-HMGB1 (LPS-frei, keine Tags) der Firma HMGBiotech verwendet.

Die Dokumentation des Versuchsverlaufs erfolgte durch Fotografie (Nikon D90) bei 5-facher Vergrößerung im Zeiss Axiovert 40 CFL-Mikroskop. Nach Versuchsbeginn wurde jedes Well nach 0, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden fotografiert.

2.2.24 Migrationsassay nach BOYDEN

Die Migrationsassays basieren auf einer modifizierten Form der BOYDEN-*chamber*. BOYDEN entwickelte im Jahr 1962 einen Versuchsaufbau, der es ermöglichte, die Migrationskapazität von Zellen zu messen, welche unter einem chemotaktischen Stimulus stehen (Boyden 1962).

Zur Durchführung des Experiments wurden Zellkultureinsätze in eine 24-Well-Platte eingehängt. Diese wiesen eine Mikromembran mit einer definierten Porengröße von 8 μm auf, sodass die Zellen aktiv durch diese migrieren mussten. Durch das Einsetzen der Zellkultureinsätze entstand in jedem Well eine obere und untere Kammer, welche durch die Membranporen verbunden waren. In die untere Kammer wurde 600 μl serumfreies DMEM-GlutaMax™-Medium (mit 1 % Gentamycin) mit dem zu untersuchenden Chemoattraktant (HMGB1) pipettiert. Für den Versuch musste hochreines, *fully reduced*-HMGB1 (LPS-frei, keine Tags) verwendet werden. In die obere Kammer wurde 200 μl einer Suspension von 50.000 Zellen CPC531ht (in serumfreiem DMEM-Medium mit 1 % Gentamycin) zugefügt.

Die Zellen kultivierten zuvor 12 Stunden in serumfreiem DMEM-GlutaMax™ -Medium mit 1 % Gentamycin.

Fünf Wells bildeten die Kontrollgruppe, jede Probestrategie (mit 10, 50 und 100 ng HMGB1/ml DMEM-GlutaMax™ -Medium) wurde ebenfalls aus fünf Wells gebildet.

Die Wellplatte war anschließend für das jeweilige Zeitintervall (6, 12 oder 24 Stunden) unter Standardbedingungen im Zellkulturschrank zu inkubieren. Kurz vor Ende des jeweiligen Migrationsintervalls wurde eine neue 24-Well-Platte mit 500 μl serumfreiem Mediums mit 8 $\mu\text{mol/l}$ Calcein-AM (Calcein-Acetoxy-methylester) pro Well vorbereitet. Die Zellkultureinsätze wurden in die Calcein-AM-Lösung eingesetzt und unter Standardbedingungen für 45 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert.

Calcein-AM kann in vitalen Zellen durch die Zellmembran transportiert werden. Im Zytoplasma spalten Esterasen die Acetat- und Acetoxy-methylgruppen ab. Dadurch entsteht ein Fluoreszein-Derivat, welches ein Anregungsmaximum bei 490 nm (*Excitation*) und ein Abstrahlungsmaximum bei 515 nm (*Emission*) aufweist. Das fluoreszierte Calcein ist nur gering zytotoxisch und beeinflusst den zellulären Stoffwechsel, die Zellmigration und Proliferation jedoch nicht. Die messbare Fluoreszenz korreliert dabei mit der migrierten Zellzahl.

Nach Ende der Inkubationszeit in der Calcein-AM-Lösung wurden die Wells und die Zellkultureinsätze leergesaugt.

In jedes Well war 1 ml vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung zu pipettieren, sodass sich die Zellen von der Unterseite der Membran ablösen (10 Minuten Inkubationszeit unter leichtem schütteln).

Aus jedem Well wurden 4 Proben á 200 µl in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert. Weiterhin erfolgte die Entnahme von Leerwert-Proben mit reiner Trypsin-EDTA-Lösung. Die Analyse der Proben erfolgte zeitnah am Fluoreszenz-Plattenleser.

Nach Beratung im *Institut für medizinische Statistik* der Universität Göttingen wurde mithilfe der Software STATISTIKA eine *Kruskal-Wallis-Varianzanalyse (ANOVA)* und der *Mann-Whitney-U-Test* durchgeführt. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung und die Grafiken sind im Ergebnissteil einsehbar.

2.2.25 Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1β

Durch die Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1β wurde untersucht, ob eine gesteigerte Expression von proinflammatorischen Zytokinen (TNF-α und IL-6) erfolgt.

Die CPC-Linie wurde in DMEM-GlutaMax™ (10 % FCS/1 % Gentamycin) bei 37 °C unter 5 % CO₂-Atmosphäre aufgezogen und die Zellzahl im Cellometer™ bestimmt. 12 Stunden vor Stimulationsbeginn kultivierten 2 x 10⁵ Zellen in jeder Flasche. Vor Zugabe der Zytokine (*Tabelle 2.29*) wurden die adhärennten Zellen 2-fach in PBS gewaschen.

Tabelle 2.29: Übersicht der verwendeten Zytokine

Zytokin	Hersteller
Disulfid-HMGB1	HMGBiotech S.r.l. (Milano, Italien) HM-122
Interleukin-1β	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) SRP3083

Die Inkubation erfolgte in 10 ml FCS-freiem DMEM-GlutaMax™- Medium für 24 Stunden unter Anwendung des tabellarisch dargestellten Stimulationschemas (*Tabelle 2.30*). Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

Tabelle 2.30: Übersicht Stimulationsschema

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Disulfid-HMGB1	-	+15ng/ml	+25ng/ml	-	+15ng/ml	+25ng/ml
Interleukin-1β	-	-	-	+10ng/ml	+10ng/ml	+10ng/ml

Nach Ablauf des Stimulationsintervalls wurde das Medium entnommen und in *Vivaspin 15*[®]-Röhrchen überführt. Zuvor musste die Filtermembran in den Röhrchen mit PBS aktiviert werden. Das zu analysierende Medium wurde für 30 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Die laboranalytische Auswertung der TNF- α und IL-6-Konzentration erfolgte in der Abteilung *Klinische Chemie der Universitätsmedizin Göttingen* durch ELISA. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung und die Grafiken sind im Ergebnissteil einsehbar.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von HMGB1 im Knorpel, Chondrozyten und CPCs

3.1.1 Immunhistochemie und Immunzytochemie

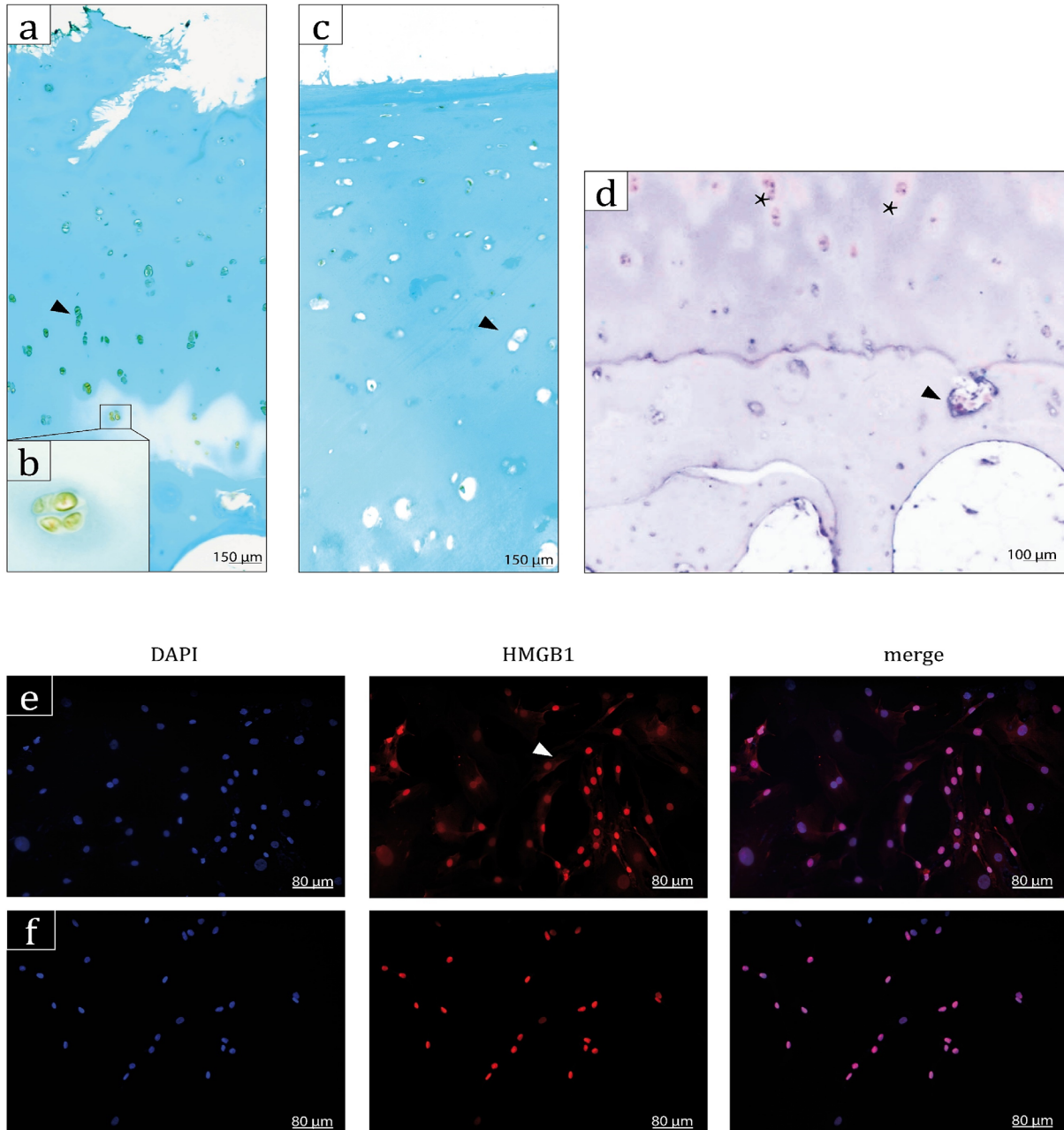


Abbildung 3.1: IHC und IZC zum HMGB1-Nachweis im Knorpel, Chondrozyten und CPCs.

Nachweis von HMGB1 in osteoarthritischen Knorpelproben [a, b, d] und im gesunden Knorpel [c] durch IHC. HMGB1 Nachweis in Chondrozyten [e] und CPCs [f] durch IZC (Vergrößerung: 20-fach). IHC unter Anwendung eines polyklonalen Anti-HMGB1-ChIP-Grade Antikörpers (abcam, 1:200) mit *HiDef DetectionTM HRP* [a-c] bzw. *HiDef DetectionTM AP* [d]. IZC unter Anwendung eines polyklonalen Anti-HMGB1-ChIP-Grade Antikörpers (abcam, 1:100) mit Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor) Fluoreszenz-Antikörper [e, f]. IHC und IZC wurden dreimal wiederholt. Die Kontrollgruppen zeigten keine falsch-positiven Signalmuster.

Der Nachweis von HMGB1 im osteoarthritischen Knorpel und histologisch gesunden Knorpelproben erfolgte durch IHC (Abb. 3.1 [a]-[d]). Für die IHC wurde ein polyklonaler Anti-HMGB1-ChIP-Grade Antikörpers (abcam, 1:200) unter Anwendung des *HiDef DetectionTM HRP-* (Abb. 3.1 [a]-[c]) bzw. *HiDef DetectionTM AP-*Systems (Abb. 3.1 [d]) appliziert. Die in Abb. 3.1 [a] dargestellte Knorpelprobe wies einen OARSI-Score von 3 auf. Die superfizielle Zone zeigte eine Kontinuitätsunterbrechung mit vertikalen Fissuren bis in den Bereich der mittleren Zone. In der tiefen Knorpelzone war der Beginn der Formation von Chondrozyten-Clustern (►) zu verzeichnen. Eine Detailvergrößerung (Abb. 3.1 [b]) aus dieser Zone zeigte ein deutlich positives HMGB1-Signal intrazellulär, wie auch perizellulär. In der superfiziellen und mittleren Zone waren vereinzelt schwache HMGB1-Signale zu erkennen, deren Intensität deutlich geringer war als in der tiefen Zone.

Abb. 3.1 [d] zeigt den Ausschnitt einer OARSI-Score 4 Knorpelprobe am Übergang der tiefen Zone zur Tidemark. In der tiefen Zone zeigten sich Formationen von Chondrozyten-Clustern mit ausgeprägten intra- und extrazellulären HMGB1-Signalen (*). Die territoriale Matrix in der Clusterumgebung zeigte eine deutliche Positivfärbung für HMGB1. Eine Kontinuitätsunterbrechung der Tidemark (*break in tidemark*) mit Gefäßsprossungen verzeichnete ebenfalls ein deutliches HMGB1-Signal (►).

Abb. 3.1 [c] stellt eine histologisch gesunde Knorpelprobe (OARSI 0-1) dar. Die superfizielle Zone war intakt, in der mittleren Zone zeigten sich sehr schwache intrazelluläre HMGB1 Signale, welche im Vergleich zu Abb. 3.1 [a] deutlich geringer erschienen. Der histologisch gesunde Knorpel zeigte insgesamt deutlich schwächere HMGB1 Signale.

Die immunzytochemische Untersuchung erfolgte an gesunden CH292ht (Abb. 3.1 [e]) und an CPC531ht (Abb. 3.1 [ff]). Zur Kerndarstellung wurden die Proben mit DAPI inkubiert (linke Spalte). Mithilfe eines polyklonalen Anti-HMGB1-ChIP-Grade Antikörpers (abcam, 1:100) wurde HMGB1 nachgewiesen (mittlere Spalte). Es zeigten sich deutliche nukleäre HMGB1-Signale bei CH292ht, wie auch bei CPC531ht. Bei gleicher Belichtungszeit wiesen die Chondrozyten ein stärkeres, zytoplasmatisches HMGB1-Signal auf (►). CPC531ht zeigte keine sichtbare, extranukleäre HMGB1-Fluoreszenz. Zur besseren Differenzierung zwischen Kernbereichen und Zytoplasma wurden die Aufnahmen in der rechten Spalte *merged* abgebildet.

Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Zu jeder Probe sind entsprechende Kontrollgruppen (ohne Primärantikörper) untersucht wurden, welche keine falsch-positiven Signalmuster aufwiesen. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit *Adobe InDesign*.

3.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

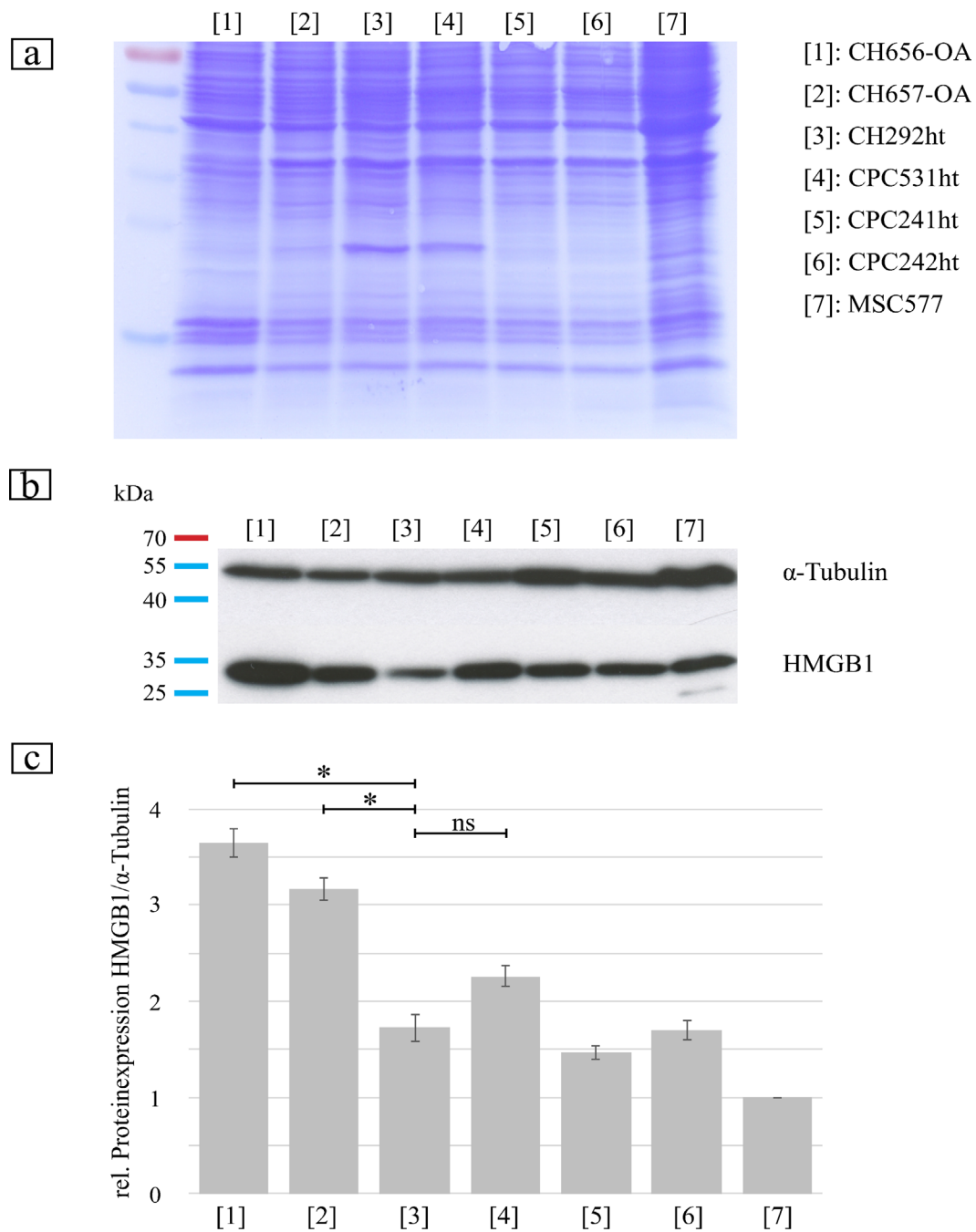


Abbildung 3.2: Western Blot zum HMGB1-Nachweis im Knorpel, Chondrozyten und CPCs.

[a]: Proteinfärbung der geblotteten PVDF-Membran mit Coomassie. Ladeschema der 7 Proben entsprechend der rechtsseitigen Legende. [b]: Antikörper-spezifische HMGB1-Detektion mit ECL auf Röntgenfilm. Ladekontrolle mit α -Tubulin. [c]: Relative HMGB1-Expression aller untersuchten Zelllinien; Normalisiert gegen α -Tubulin. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler vom Mittelwert an. Als Kontrollreferenz wurde Probe 7 (MSC577) festgelegt. Statistische Signifikanz (*); Nicht signifikant (ns). Die Versuchsdurchführung mit den sieben Probegruppen erfolgte dreimal.

Durch den Western Blot und die antikörperspezifische ECL Detektion wurde der HMGB1-Gehalt in sieben Proben quantifiziert. Aus den osteoarthritischen Gelenkflächen der Tibia- bzw. Femurexplantate wurden durch Kollagenase-Verdau CH656-OA und CH657-OA isoliert und kultiviert. Die gesunde Chondrozytenprobe bestand aus CH292ht. Ebenfalls wurden drei immortalisierte CPC-Linien untersucht: CPC531ht, CPC241ht und CPC242ht. Als Referenzprobe wurde in der letzten *lane* MSC577 geladen.

Abb. 3.2 [a] zeigt die Proteindetektion auf der geblotteten PVDF-Membran durch Coomassie-Färbung. Durch die Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Nach Inkubation mit einem polyklonalen Anti-HMGB1-Antikörper (abcam [ab18256], 1:10.000) erfolgte die spezifische Proteindetektion durch ECL auf dem Röntgenfilm (*Abb. 3.2 [b]*). Bei konstanter Belichtungszeit in allen drei Versuchswiederholungen zeigte sich ein deutliches HMGB1-Signal bei 29 kDa. In den Zellproben aus dem Kollagenase-Verdau lag das stärkste Bandenmuster vor. Die gesunden Chondrozyten wiesen eine schwächere Bandenstärke auf. Die Signalbanden der CPC-Proben waren von ähnlicher Intensität. Die Referenzprobe der MSCs zeigte als einzige Probe eine zweite Bande auf Höhe von 25 kDa. Zur Ladungskontrolle und Datennormalisierung wurde α -Tubulin verwendet (50 kDa).

Die Röntgenfilme wurden eingescannt und die Signalmuster analysiert. Jede HMGB1-Bande wurde gegen ihre entsprechende α -Tubulin-Bande normalisiert. Als Referenzwert wurde das Signal der MSC-Probe definiert. Zu jeder Probe wurde der Standardfehler des Mittelwertes berechnet, welcher als Fehlerbalken im Diagramm angegeben ist (*Abb. 3.2 [c]*). Im Vergleich zur Kontrolle wiesen die OA-Chondrozyten eine 3,6-fach (CH656-OA) bzw. 3,1-fach (CH657-OA) erhöhte HMGB1-Expression auf. Gesunde Chondrozyten (CH292ht) zeigten im Vergleich zu den MSCs eine 1,7-fach erhöhte HMGB1-Bande. Das Bandensignal der CPCs war 1,4-fach (CPC241ht) bis 2,2-fach (CPC531ht) erhöht.

Das Bandensignal der gesunden Chondrozyten war statistisch signifikant geringer als das der OA-Proben ($p[1-3]: 0,0008^*$; $p[2-3]: 0,0014^*$).

Die Quantifizierung der Bandensignale erfolgte mit *ImageJ*, die Diagrammerstellung und die statistische Auswertung mit *Excel 365*, *GraphPad* und *Adobe InDesign*. Die Untersuchung der sieben Proben erfolgte dreimal unter konstanten Bedingungen.

3.2 Nachweis von HMGB1-Rezeptoren auf Chondrozyten und CPCs

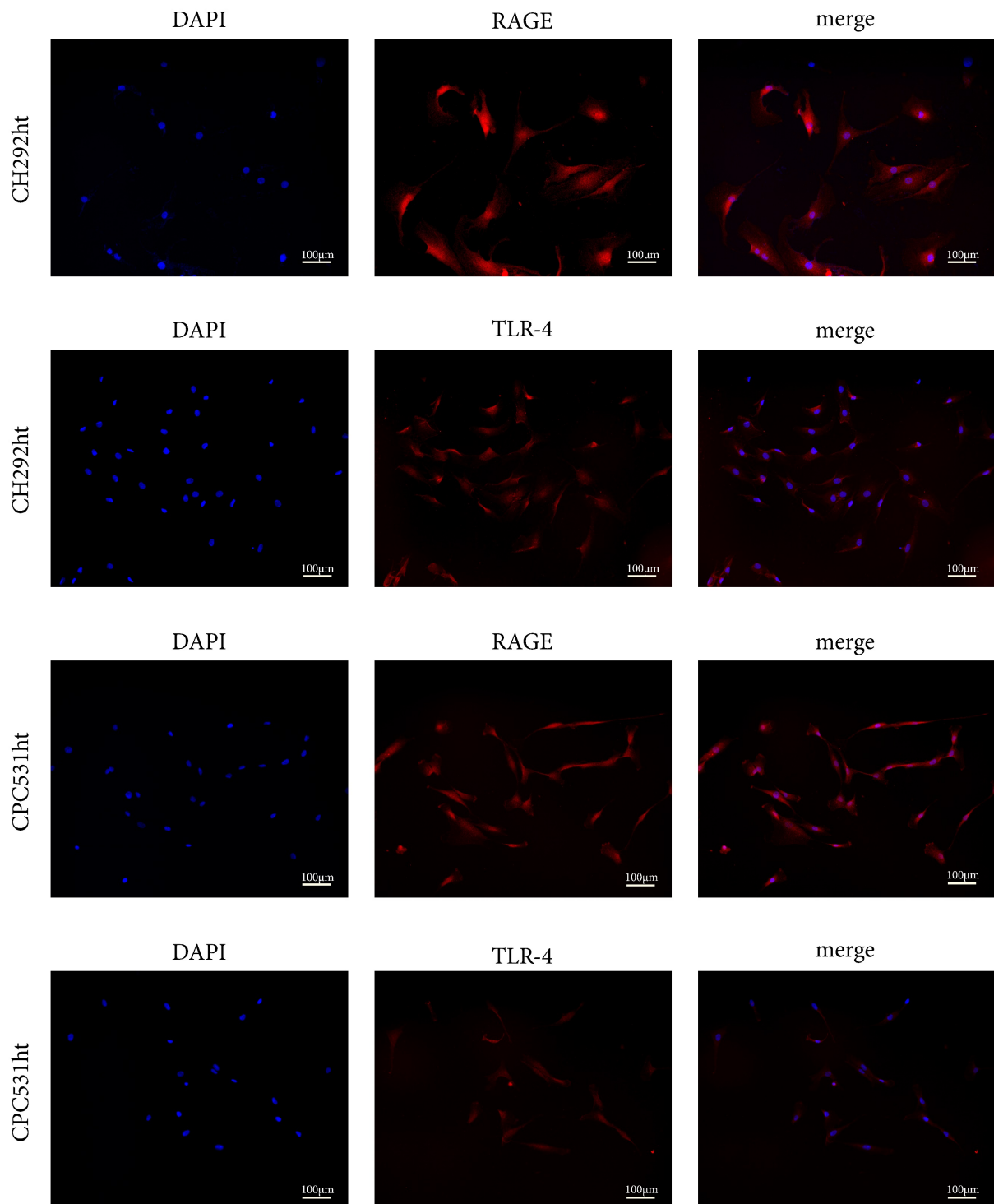


Abbildung 3.3: IZC zum Nachweis von extrazellulären HMGB1-Rezeptoren auf CH und CPCs.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von extrazellulären RAGE- und TLR4-Rezeptoren auf CH292ht und CPC531ht. Polyklonaler Anti-RAGE-Antikörper (ABIN1453837; 1:100); Monoklonaler Anti-TLR4-Antikörper (ABIN281829; 1:100). Kernfärbung durch DAPI. Vergrößerung: 20-fach. Die IZC wurde dreimal wiederholt. Negativkontrollen ohne Primärantikörper zeigten keine Signale (nicht dargestellt).

Durch die IZC an CH292ht und CPC531ht sollten extrazelluläre HMGB1-Rezeptoren nachgewiesen werden (*Abb. 3.3*). Zu den wichtigsten Oberflächenrezeptoren, welche HMGB1 als Ligand binden, gehören der RAGE- und der TLR4-Rezeptor.

Zur Versuchsvorbereitung kultivierten CH292ht und CPC531ht für 12 Stunden auf sterilen Menzel-Gläsern. Für die RAGE-Detektion wurde ein polyklonaler Anti-RAGE-Antikörper (antikörper-online; ABIN1453837) für 60 Minuten inkubiert. Die TLR4-Rezeptordetektion erfolgte durch einen monoklonalen Antikörper (antikörper-online; ABIN281829) bei gleicher Inkubationszeit. Beide Primärantikörper wurden 1:100 verdünnt. Als Fluoreszenz-Sekundärantikörper wurde *Alexa Fluor 555* in einer 1:1000 Verdünnung für 60 Minuten inkubiert. Zur Kerndarstellung erfolgte die Zugabe von DAPI (1:1000).

In beiden Zelllinien konnten die Rezeptoren qualitativ nachgewiesen werden. Die Zellfotographie erfolgte nach dem Eindecken der Menzel-Gläser am Keyence-BZ9000 Mikroskop. Bei konstanter Belichtungszeit zeigte sich in der CH292ht-Probe ein sehr deutliches Signal für den RAGE-Rezeptor. Die Signalstärke für den TLR4-Rezeptor war abgeschwächt. In den CPC531ht-Proben zeigte sich ein schwaches Signal für den TLR4-Rezeptor.

Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt. Negativkontrollen ohne Primärantikörper zeigten kein Signal (nicht dargestellt). *Abb. 3.3* wurde mithilfe von *Adobe InDesign* erstellt. Alle dargestellten Bilder wurden in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.3 HMGB1-Nachweis nach CPC-*ex-vivo*-Migration in OA-Knorpel

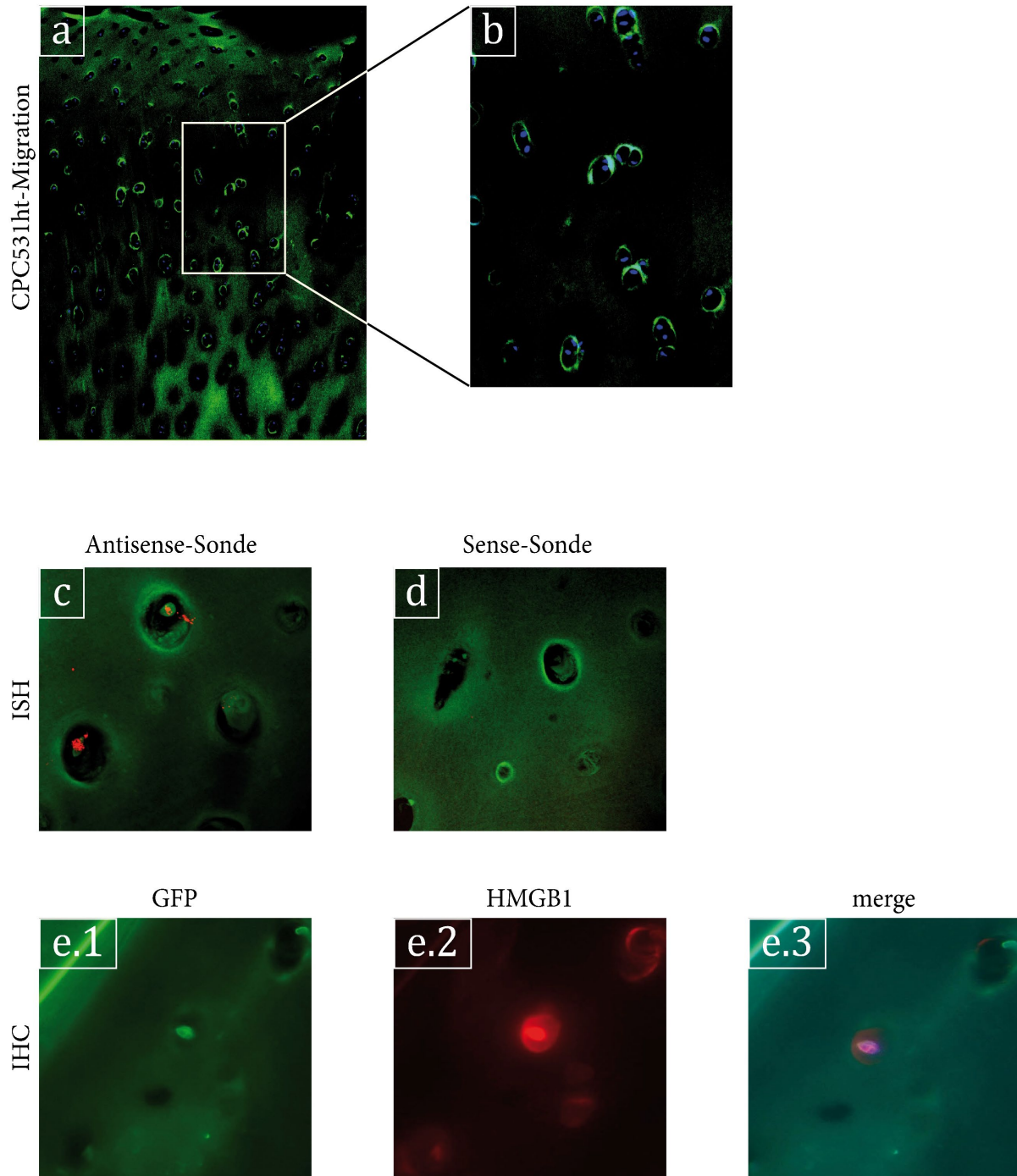


Abbildung 3.4: HMGB1-Nachweis nach CPC-*ex-vivo*-Migration in OA-Knorpel.

[a]: Nachweis erfolgreicher *ex-vivo*-Migration von CPC531ht in OA-Knorpelgewebe. Zelldetektion durch GFP-Anregung mit 488 nm Argonlaser in 40-facher Vergrößerung. [b]: 60-fach vergrößerter Ausschnitt mit Kerndarstellung durch DAPI. [c]: ISH zum Nachweis von HMGB1-RNA in CPC531ht. Detektion durch Anregung von NBT/BCIP mit 633 nm Laser. [d]: ISH-Kontrolle mit Sense-Sonde (100-fache Vergrößerung). [e.1-3]: Nachweis von HMGB1 durch Fluoreszenzmikroskopie (Alexa Fluor) bei 100-facher Vergrößerung. Die ISH und IHC wurden unter Anwendung von Negativkontrollen dreimal wiederholt.

Ziel der *ex-vivo*-Migrationsversuche war es, GFP-transfizierte CPC531ht im osteoarthritischen Knorpelgewebe zu untersuchen. Innerhalb des erkrankten Knorpelmilieus sollte die Bildung von HMGB1 auf RNA- und Proteinebene detektiert werden. Zur Probengewinnung verwendete OA-Knorpelimplantate mussten im Stanzzyylinder mit 4000 Zellen CPC531ht inkubieren.

Abb. 3.4 [a]-[b] zeigt die *ex-vivo*-Migration von GFP-transfizierten CPC531ht in osteoarthritisches Knorpelgewebe. Nach fünf Tagen Migrationszeit waren die Zellen in einer Gewebetiefe von 650 – 1300 µm zu lokalisieren. Die Detektion der CPC531ht erfolgte über direkte Anregung der GFP-Proteine, welche durch Transfektion konsekutiv gebildet wurden. Das mikroskopische Bild zeigt die migrierten Zellen bei 488 nm Argonlaser-Anregung (40-fache Vergrößerung). Der Bildausschnitt [b] zeigt eine 60-fache Vergrößerung. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung herausgestellt.

Abb. 3.4 [c]-[d] stellt die Ergebnisse der *in-situ*-Hybridisierung der Migrationsschnitte dar (Vergrößerung 100-fach). Die Digoxigenin-gekoppelte Antisense-Sonde (Abb. 3.4 [c]) lässt sich über einen Anti-DIG-AP-Antikörper lokalisieren. Die alkalische Phosphatase setzte dabei NBT/BCIP um, welches durch eine Reflexionsmethode (633 nm Laser) detektiert wurde. Die Expression von HMGB1-mRNA in migrierten CPC531ht zeigte sich durch nukleäre und zytosolische Signale. Die Kontrolle mit der Sense-Sonde (Abb. 3.4 [d]) war negativ. Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Abb. 3.4 [e.1]-[e.3] zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie zum Nachweis von HMGB1 in den Migrationsschnitten. Das GFP-Signal migrierter CPC531ht wurde durch direkte Anregung mit einem 488 nm Argonlaser detektiert (Abb. 3.4 [e.1]). Die Antikörperreaktion mit einem gegen HMGB1 gerichteten *Alexa Fluor555*-Antikörper zeigte deutliche Fluoreszenz-Signale (Abb. 3.4 [e.2]). Es waren nukleäre und zytosolische HMGB1-Signale zu erkennen. Abb. 3.4 [e.3] zeigt eine *gemergede* Darstellung.

Der Versuch wurde insgesamt dreimal wiederholt. Negativkontrollen ohne Primärantikörper zeigten kein Signal (nicht dargestellt).

Die Untersuchung der Gewebeschnitte erfolgte am konfokalen Lasermikroskop *Olympus Fluoview 1000* in der *Plattform für Klinische Optische Mikroskopie* unter der Leitung von Dr. BUNT. Die *Abbildung 3.4* wurde mithilfe von *Adobe InDesign* erstellt.

3.4 Migrationswirkung von *fr*-HMGB1 auf CPCs

3.4.1 Ergebnisse: *Scratch assay*

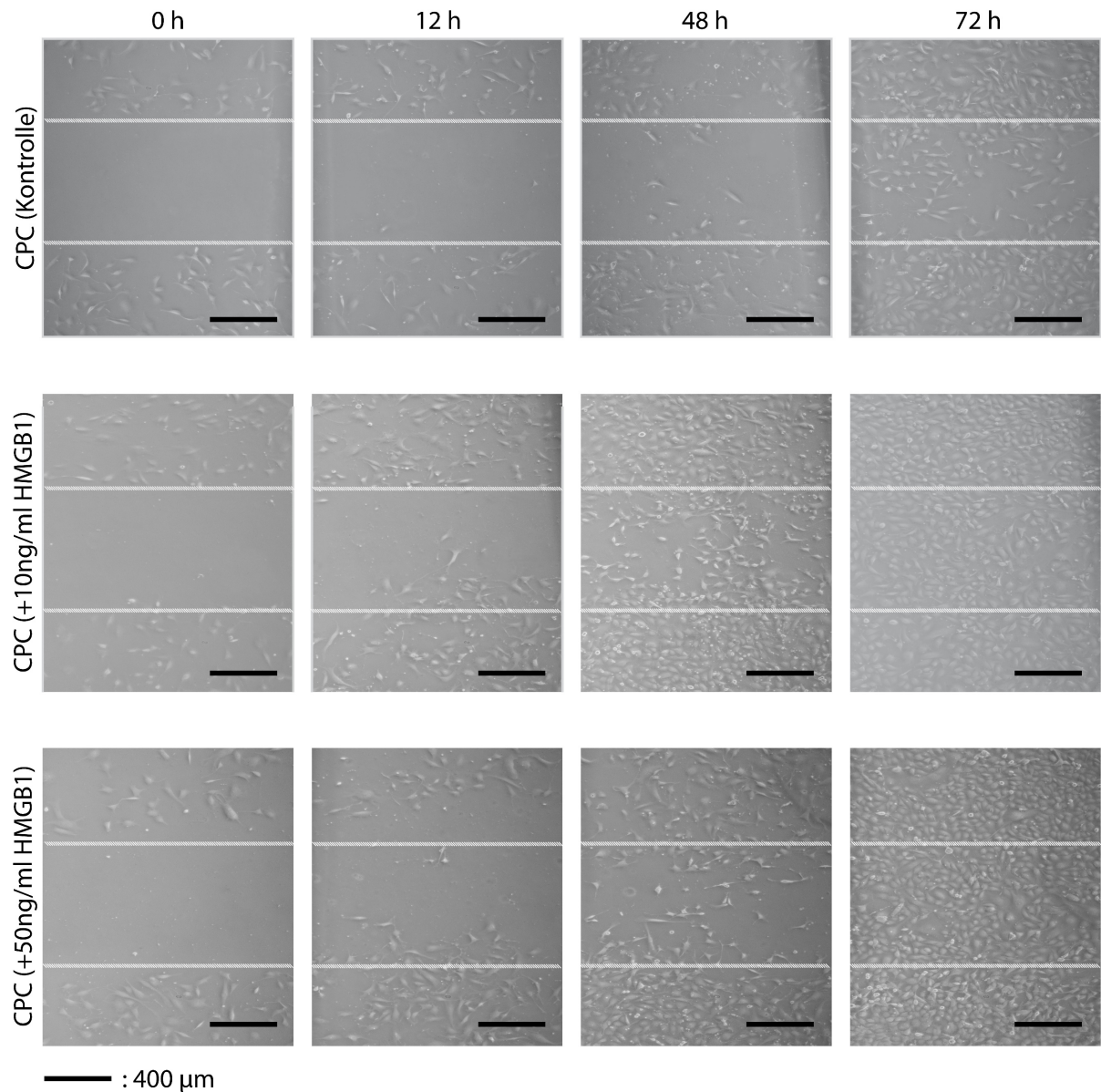


Abbildung 3.5: CPC531ht-scratch assay in der Durchlichtmikroskopie.

Durchlichtmikroskopische Aufnahme der *scratch assay*-Versuche mit CPC531ht in 5-facher Vergrößerung. Jedes Well wurde mit 50.000 Zellen in FCS-reduziertem (5 %) DMEM-Glutamax™-Medium präpariert. Die *scratch*-Korridore sind zur besseren Darstellung digital hervorgehoben. Die erste Zeile zeigt die Darstellung der Kontrollreihe zu den Untersuchungszeitpunkten (0, 12, 48, 72 h). Die Aufnahmen der Proben mit 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml *fully reduced*-HMGB1 (HMGBiotech) sind in der zweiten bzw. dritten Zeile abgebildet. Die Fotografie erfolgte mit einer Nikon D90 unter mikroskopischer Vergrößerung im Zeiss Axiovert 40 CFL. Maßstabsbalken [—]: 400 μm. Die Versuchsdurchführung erfolgte dreimal unter konstanten Bedingungen.

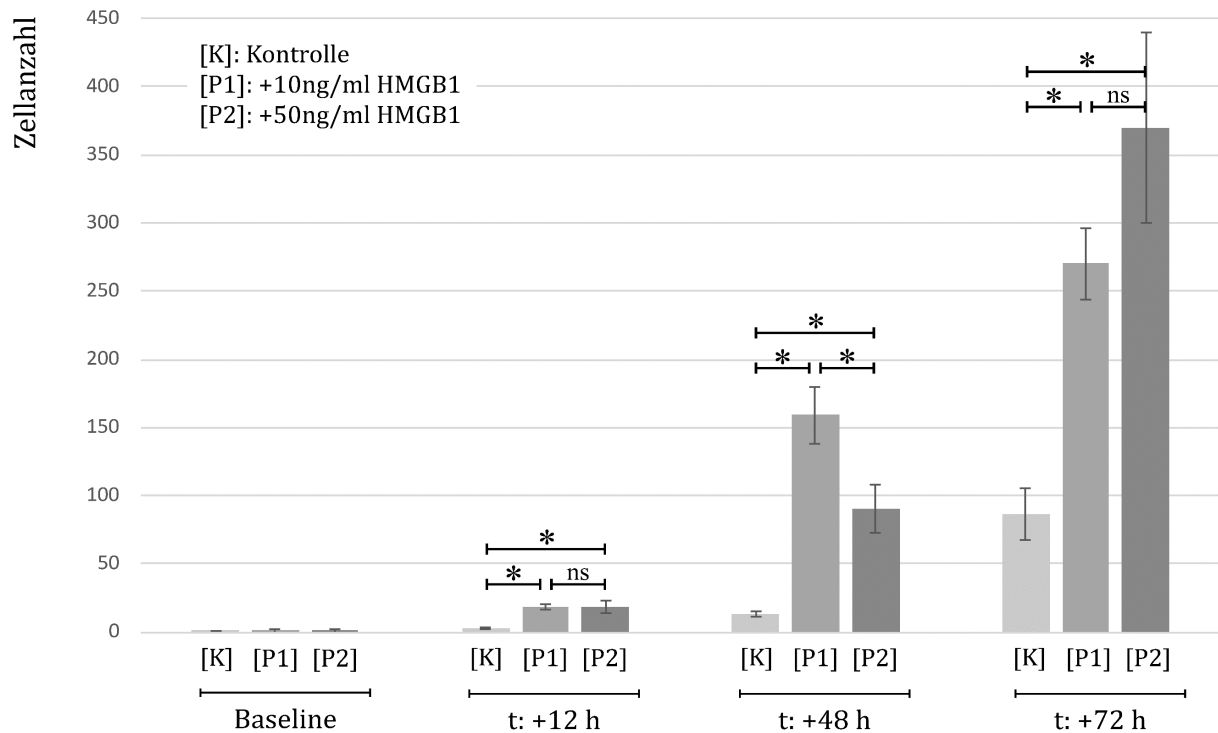


Abbildung 3.6: Migrationsergebnisse CPC531ht-scratch assay.

Grafische Darstellung und Statistik der Ergebnisse der drei Versuchsdurchgänge unter Auszählung der migrierten Zellzahlen. Säulendiagramme der mittelwertigen Migrationszahlen unter Angabe des Standardfehlers zu Versuchsbeginn (*baseline*) sowie nach 12, 48 und 72 Stunden. Statistische Signifikanz (*); Nicht signifikant (ns).

Durch die *scratch assay*-Experimente wurde die HMGB1-abhängige Migration von CPC531ht in einen zellfreien Korridor untersucht. In 6-Well-Platten mit Fibronectinbeschichtung wurde ein Monolayer aus CPC531ht kultiviert und ein definierter Migrationskorridor *gescratcht*.

Abb. 3.5 stellt die Ergebnisse des *scratch assays* in der lichtmikroskopischen Übersicht dar. Die Abbildung zeigt die Erste von drei Versuchswiederholungen. Der Versuchsverlauf wurde durch Fotografie (Nikon D90) bei 5-facher Vergrößerung im Zeiss Axiovert 40 CFL-Mikroskop dokumentiert. In der ersten Bildzeile wurde die CPC531-Kontrolle zu Versuchsbeginn und den Untersuchungsintervallen nach 12, 48 und 72 Stunden abgebildet. Die Probereihen (2. und 3. Zeile) enthielten 10 ng/ml bzw. 50 ng/ml *fr*-HMGB1 im Medium. Zu Versuchsbeginn lagen zellfreie *scratch*-Korridore vor, welche in der Abbildung digital hervorgehoben wurden.

Abb. 3.6 zeigt die Auswertung der migrierten Zellzahlen in sämtlichen Versuchsdurchläufen. Die Säulendiagramme geben die mittelwertigen Migrationszahlen unter Berücksichtigung des Standardfehlers an.

Nach 12 Stunden bestand ein signifikanter Unterschied [*] zwischen der Kontrollgruppe und den Probegruppen, jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Probegruppen (p[K-P1]: 0,0006*; p[K-P2]: 0,009*; p[P1-P2]: 1,0^{ns}).

Nach 48 Stunden Migrationszeit wies die Probegruppe mit 10 ng/ml HMGB1 die höchste Zellmigration auf. Zwischen allen Versuchsgruppen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied (p[K-P1]: 0,0006*; p[K-P2]: 0,003*; p[P1-P2]: 0,02*).

Zum letzten Untersuchungszeitpunkt (72 Stunden) zeigten die Probegruppen eine signifikant höhere Zellmigration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den Probegruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede (p[K-P1]: 0,001*; p[K-P2]: 0,005*; p[P1-P2]: 0,1^{ns}).

Die grafische Darstellung der Ergebnisse und die statistische Berechnung erfolgte mithilfe von *Office 365*, *Adobe InDesign* und *GraphPad*.

3.4.2 Ergebnisse: BOYDEN-chamber

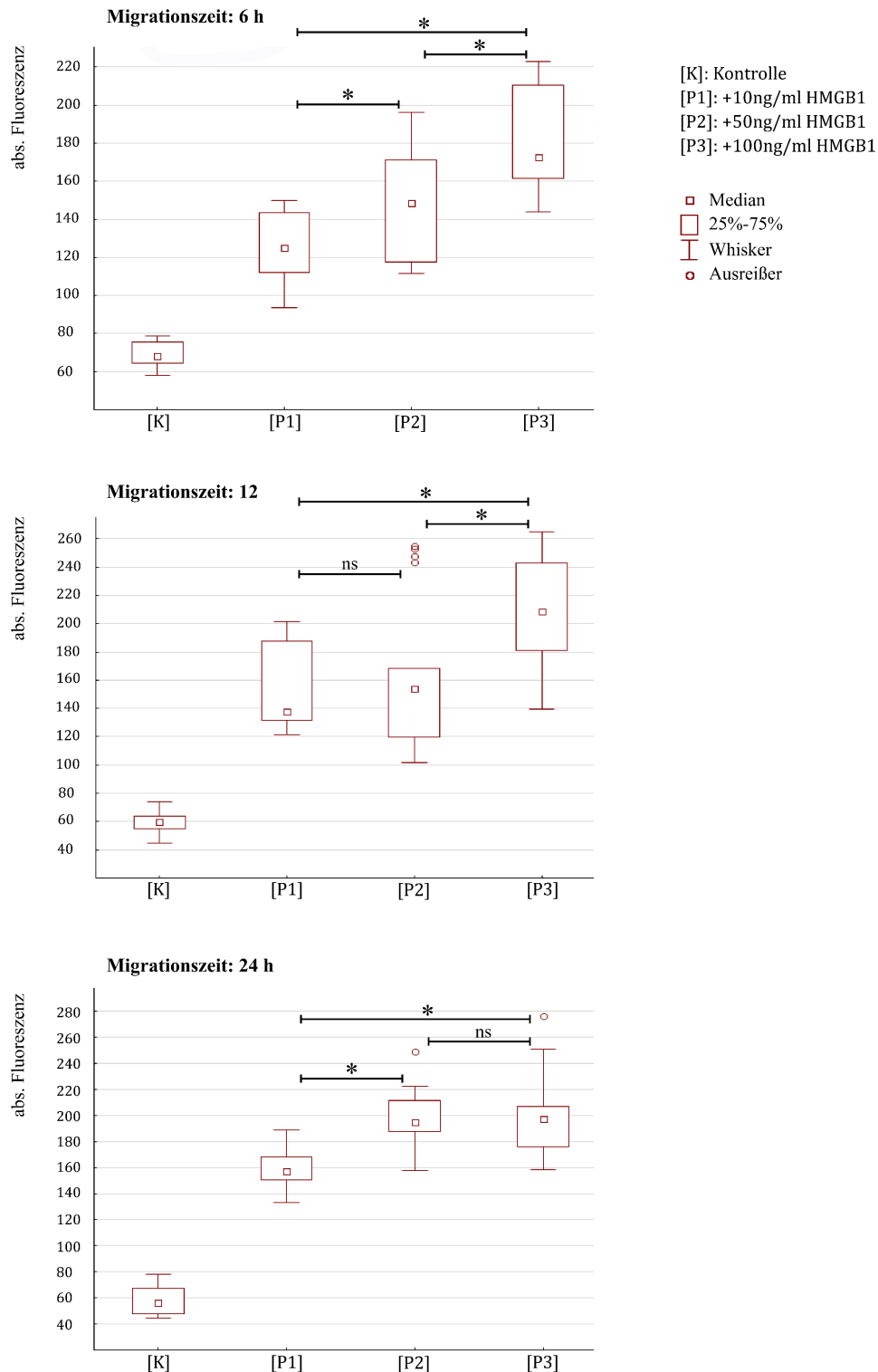


Abbildung 3.7: Boxplot-Diagramme der CPC-Migrationsversuche in der BOYDEN-chamber.

Ergebnisse nach 6, 12 und 24 h Migrationszeit bei Untersuchung von drei verschiedenen *fr*-HMGB1 Konzentrationen. Migration durch eine 8- μ m-Mikromembran. Detektion der migrierten CPCs durch Calcein-AM Fluoreszenz. Statistische Signifikanz (*); Nicht signifikant (ns). Die Versuchsdurchführung erfolgte fünfmal.

Durch die *BOYDEN-chamber* wurde die Migrationskapazität von CPC531ht unter dem Stimulus von *fr*-HMGB1 untersucht. Die Zellen migrierten durch ein definiertes Porengitter und wurden zeitabhängig detektiert.

Abb. 3.7 zeigt die Ergebnisse der Migrationsversuche nach 6, 12 und 24 Stunden Migrationszeit. Die Probestruppen bildeten drei unterschiedliche *fr*-HMGB1 Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml). Gemessen wurde die absolute Fluoreszenz (515 nm Emission) des Calceins als Korrelat erfolgter Zellmigration durch das 8- μ m-Membrangitter. Die Versuchsdurchführung erfolgte fünfmal.

Nach 6 Stunden Migrationszeit war eine konzentrationsabhängige Migrationssteigerung in den Probestruppen messbar. Die Kontrolle zeigte die geringste Fluoreszenz. Zwischen allen Gruppen bestand ein statistisch signifikanter Unterschied [*] in der gemessenen Fluoreszenz (p[K-P1/P2/P3]: jeweils <0,0001*; p[P1-P2]: 0,015*; p[P1-P3]: <0,0001*; p[P2-P3]: 0,0026*).

Nach 12 Stunden Migrationszeit wies die Kontrollgruppe das signifikant geringste Fluoreszenzsignal auf (p[K-P1/P2/P3]: jeweils <0,0001*). Zwischen den Probestruppen mit 10 ng/ml [P1] und 50 ng/ml HMGB1 [P2] bestand kein signifikanter Unterschied (p[P1-P2]: 0,76^{ns}). Die höchste HMGB1 Konzentration mit 100 ng/ml [P3] wies zu diesem Zeitpunkt das stärkste Signal auf, welches signifikant höher war als in der Probestgruppe P1 und P2 (p[P1-P3]: <0,0001*; p[P2-P3]: 0,005*).

In der Versuchsgruppe mit 24 Stunden Migrationszeit wurde in der Kontrollgruppe ebenfalls das geringste Signal gemessen (p[K-P1/P2/P3]: je <0,0001*). Die geringste HMGB1 Konzentration [P1] zeigte im Vergleich zu den anderen Proben das schwächste Signal mit einem signifikanten Unterschied zu P2 und P3 (p[P1-P2/P3]: je <0,0001*). Zwischen den Proben P2 und P3 konnte kein Unterschied in der Fluoreszenz gemessen werden (p[P2-P3]: 0,95^{ns}).

Zusammenfassend war eine Konzentrations-Zeit-Korrelation ersichtlich. Nach 6 Stunden zeigte die Probe mit der höchsten HMGB1 Konzentration das größte Fluoreszenzsignal bei einem Medianwert von 173 (abs. Fluoreszenz). Nach 12 Stunden lag der Median in der P3-Gruppe bei 208. Nach 24 Stunden bestand zwischen der mittleren und hohen HMGB1 Konzentration kein signifikanter Unterschied mehr (Median P2: 194; P3: 197).

Die grafische Darstellung der Ergebnisse und die statistische Berechnung erfolgte mithilfe von *STATISTICA* und *Adobe InDesign*.

3.5 Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1 β

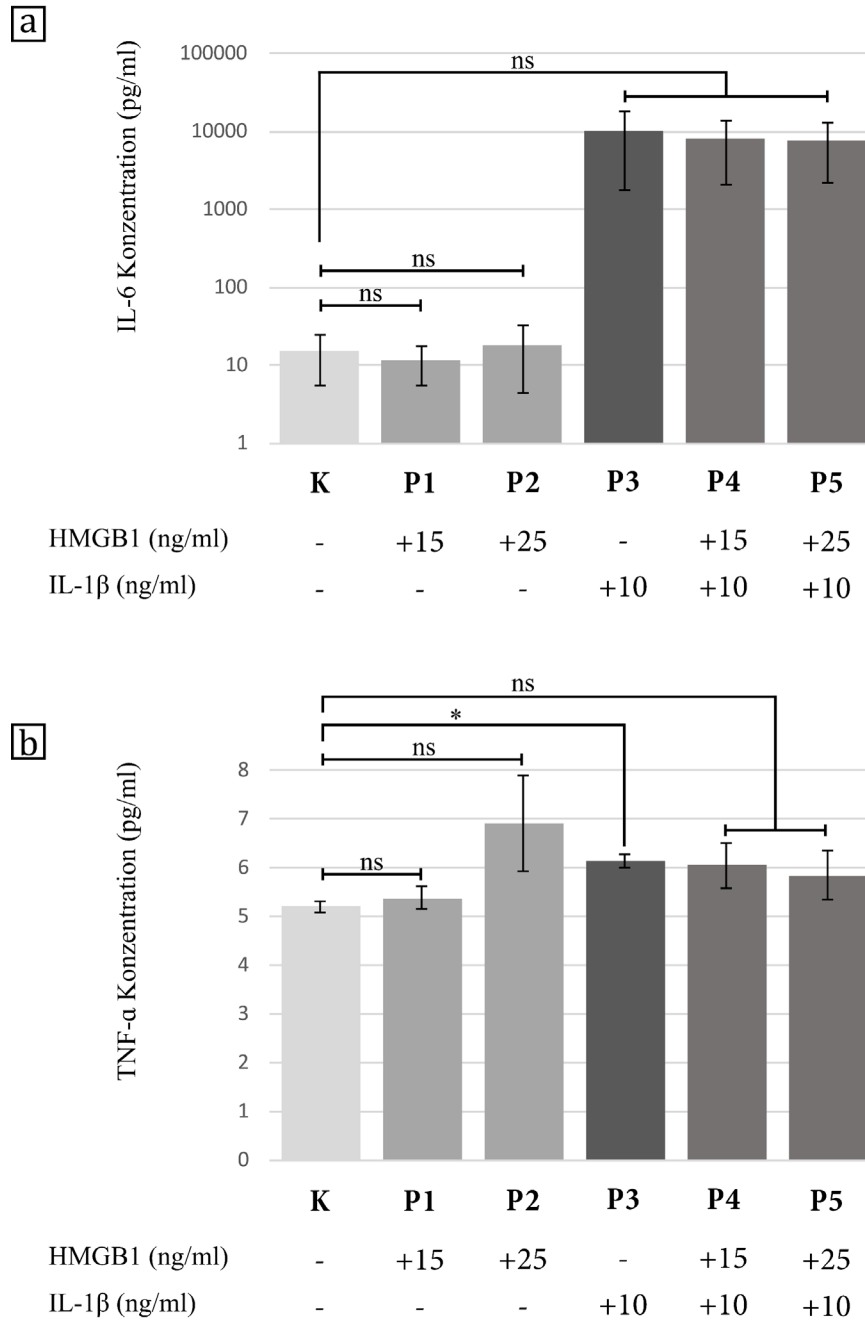


Abbildung 3.8: Stimulation von CPC531ht mit HMGB1/IL-1 β .

Darstellung der IL-6 [a] und TNF- α [b] Konzentration im Kulturmedium nach 24 Stunden Stimulation mit HMGB1/IL-1 β . Die Säulendiagramme zeigen die mittelwertigen Konzentrationen unter Angabe des Standardfehlers vom Mittelwert (Whisker). Statistische Signifikanz (*); Nicht signifikant (ns). Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

Durch die Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 sollte untersucht werden, ob eine entzündungsfördernde Expression von IL-6 und TNF- α erfolgt. Neben der isolierten Stimulation der Zellen mit hochreinem HMGB1 wurde eine kombinierte Versuchsreihe mit IL-1 β getestet. Durch die Stimulationsversuche sollte untersucht werden, ob chondrogene Progenitorzellen die destruktive Entzündungsreaktion fördern oder keine proinflammatorischen Zytokine abgeben.

Abb. 3.8 [a] zeigt die Ergebnisse der Stimulationsversuche mit Disulfid-HMGB1/IL-1 β an CPC531ht nach 24 Stunden. Jede Säule zeigt die mittelwertige IL-6 Konzentration unter Angabe des Standardfehlers vom Mittelwert. Gemessen wurde die IL-6 Konzentration im Medium des Zellkulturansatzes durch ELISA. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Neben der Kontrollgruppe [K] erfolgte die Stimulation an fünf Probegruppen [P1-P5] entsprechend des dargestellten Schemas. Die Säulendiagramme wurden logarithmisch skaliert.

Aufgrund der Streuung der Messwerte lag ein hoher Standardfehler vor. Die Berechnung der p-Werte zeigte keine statistische Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und den Probegruppen: p[K-P1]: 0,76 ns; p[K-P2]: 0,81 ns; p[K-P3]: 0,29 ns; p[K-P4]: 0,25 ns; p[K-P5]: 0,23 ns.

Die Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1/IL-1 β zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Abb. 3.8 [b] stellt die Ergebnisse der Messung der TNF- α Konzentration nach Stimulation dar. Die Versuchsmodalitäten entsprachen der in [a] beschriebenen Verfahrensweise. Nach 24-stündiger Stimulation mit Disulfid-HMGB1 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Probegruppe [P1/P2] festgestellt werden: p[K-P1]: 0,54 ns; p[P-P2]: 0,16 ns. Die Stimulation mit IL-1 β zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant erhöhte Expression von TNF- α : p[K-P3]: 0,0084 *. Eine kombinierte Stimulation von Disulfid-HMGB1/IL-1 β [P4/P5] wies keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf: p[K-p4]: 0,15 ns; p[K-P5]: 0,26 ns.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse und die statistische Berechnung erfolgte mithilfe von *Office 365, Adobe InDesign* und *GraphPad*.

4 Diskussion

4.1 Nachweis von HMGB1 im Knorpel, Chondrozyten und CPCs

Die Pathomechanismen der destruktiven Gelenkerkrankungen sind komplex. Nachdem die HMGB1-Sekretion von Makrophagen im Verlauf von Entzündungsprozessen beschrieben worden war, vermuteten KOKKOLA und Mitarbeiter einen Einfluss von HMGB1 auf entzündliche Gelenkerkrankungen (Wang et al. 1999; Kokkola et al. 2002). Die Forschungsgruppe stellte fest, dass in der gesunden Synovialmembran nur nukleäre HMGB1-Proteine nachweisbar sind. Bei Entzündungsprozessen konnte eine Änderung der HMGB1-Verteilung in das Zytoplasma der Synoviozyten und in die EZM verzeichnet werden (Kokkola et al. 2002).

Weitere Studien der Arbeitsgruppe von PULLERITS zeigten am Mausmodell, dass eine intraartikuläre Injektion von rekombinantem HMGB1 zu einer moderaten Synovitis und leichten, superfiziellen Knorpelerosionen führt (Pullerits et al. 2003).

HEINOLA und Mitarbeiter untersuchten an osteoarthritischen Rindergelenken die Expression von HMGB1 in Abhängigkeit zum Destruktionsgrad. Die histologischen Untersuchungen zeigten in gesunden Knorpelproben eine geringe, auf den Nukleus begrenzte HMGB1-Expression. Bei Proben mit fortgeschrittener OA konnten starke, extrazelluläre HMGB1-Signale in tiefen Knorpelzonen und Chondrozyten-Clustern lokalisiert werden (Heinola et al. 2010).

Die histologischen Arbeiten von TERADA und Mitarbeiter an menschlichen Knorpelproben zeigten gleiche Ergebnisse. Ein steigender OARSI-Score korreliert mit zunehmender extrazellulärer HMGB1-Expression (Terada et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit war es, durch IHC, IZC und Western Blot die HMGB1-Verteilung in menschlichen Knorpelproben qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Anschließend an die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von TERADA, wurde der histologische Fokus auf die Untersuchung der *Tidemark* gelegt. In OA-Knorpelgewebe (OARSI-Score 4) konnten Gefäßeinsprossungen in der *Tidemark* lokalisiert (*break in tidemark*) und ein erhöhtes HMGB1-Signal nachgewiesen werden. Wie bereits durch KOELLING und Kollegen beschrieben, stellen die Gefäßeinsprossungen den Migrationsort von chondrogenen Progenitorzellen in den OA-Knorpel dar (Koelling et al. 2009).

Eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von HMGB1 im Bereich der *Tidemark* kann als potentieller Faktor für die Regulation der CPC-Migration in erkranktes Gewebe oder als proinflammatorisches Signal gewertet werden.

Durch unterschiedliche Redoxformen und posttranslationale Modifikationen übernimmt das HMGB1-Protein unterschiedliche Funktionen. *Fully reduced* HMGB1, welches den nukleären Hauptanteil darstellt, weist (extrazellulär lokalisiert) eine promigratorische Funktion auf. Die Disulfid-HMGB1-Form zeigt keine promigratorischen Eigenschaften, fördert jedoch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Andersson et al. 2014; Antoine et al. 2014). Eine extrazelluläre Akkumulation im Bereich der *Tidemark* könnte die Migration von CPCs in tiefe Knorpelzonen forcieren. Zur Identifikation der HMGB1-Isoform im Bereich der *Tidemark* müsste das Untersuchungsspektrum erweitert werden. Ziel zukünftiger Arbeiten könnten massenspektrometrische Analysen der Proteinakkumulationen darstellen (Larsen et al. 2006).

Weiterhin wurden immunhistochemische Übersichtsaufnahmen angefertigt, welche superfizielle, mittlere und tiefe Knorpelzonen in gesunden und OA-Proben zeigen. Die Expression von HMGB1 entspricht dem von TERADA und Mitarbeitern beschriebenen Verteilungsmuster (Terada et al. 2011). Die Knorpelproben mit einem OARSI-Score 3 zeigen Chondrozyten-Cluster mit deutlichen intra- und extrazellulären HMGB1-Signalen. Gesunde Knorpelproben weisen geringe, zellulär begrenzte HMGB1-Signale auf.

Die IZC von CPC531ht und gesunden Chondrozyten CH292ht zeigte ein unterschiedliches Verteilungsmuster von HMGB1 in den Zellkompartimenten. In den Chondrozyten konnte das HMGB1-Signal durch die Immunfluoreszenz im Kern, aber auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die CPCs zeigten ein streng nukleär-begrenztes HMGB1-Signal. Arbeiten der Forschungsgruppen von MENG und LIN legen nahe, dass HMGB1 einen Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von CPCs haben könnte, wobei die Verteilung und die Isoform von HMGB1 von entscheidender Bedeutung sind. Bei Versuchen an *bone marrow-derived* MSCs mit rekombinantem HMGB1 konnte eine forcierte osteogene Differenzierung beschrieben werden (Meng et al. 2008; Lin et al. 2016). Um den Einfluss von HMGB1 auf das Differenzierungsverhalten von CPCs zu verstehen, sind weitere Untersuchungen notwendig. KOELLING und MIOSGE verweisen auf die Unterschiede zwischen CPCs und MSCs, sodass die Ergebnisse von MENG und LIN für CPCs erweitert werden müssen (Koelling et al. 2009; Koelling und Miosge 2009).

In den Studien von LIN und MENG wird rekombinantes HMGB1 verwendet, ohne dass eine genaue Unterscheidung der verschiedenen Redoxformen erfolgte.

Die Ergebnisse des Western Blots zeigen statistisch signifikante Unterschiede des HMGB1-Proteingehalts zwischen OA-Chondrozyten, gesunden Chondrozyten, CPCs und MSCs. Durch Kollagenase-Verdau wurden zwei OA-Chondrozyten-Linien (CH656-OA, CH657-OA) gewonnen. Diese Zellproben weisen eine 3,1 bis 3,6-fach erhöhte HMGB1-Expression zu gesunden Chondrozyten auf. Der Proteingehalt der drei untersuchten CPC-Linien zeigt keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Chondrozyten. Weiterhin zeigt sich, dass eine hohe Passagen-Anzahl (p) von CPCs in der Zellkultur keinen statistisch signifikanten Unterschied in der HMGB1-Expression ergibt. Im Western Blot wurden verschiedene CPC-Linien mit hoher (CPC241ht; $p > 50$) und geringer Passagen-Anzahl (CPC531ht; $p < 20$) eingesetzt. Ziel dieser Zellselektion war die Untersuchung, ob eine Langzeitkultivierung der Zellen einen Einfluss auf das HMGB1-Expressionmuster hat.

Die MSC577-Zelllinie zeigte als einzige Zellprobe im Western Blot eine weitere HMGB1-Bande. Während die Proteinsignale aller beschriebenen Zelllinien auf einer Bandenhöhe von 29 kDa lagen, zeigte sich bei den MSCs eine zusätzliche niedermolekulare Bande auf Höhe von 25 kDa. Durch die Ergebnisse des Western Blots liegen Hinweise vor, dass Zellen mit Stammzellcharakter unterschiedliche HMGB1-Expressionsmuster aufweisen und dass unterschiedliche posttranslationale Modifikationen des Proteins einen Einfluss auf die Differenzierung haben könnten. Der Einfluss verschiedener HMGB1-Formen auf das Differenzierungsverhalten von CPCs ist ein möglicher Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen, da hierdurch die regenerativen Eigenschaften dieser Zellen besser verstanden und möglicherweise therapeutisch genutzt werden könnten.

4.2 Nachweis von HMGB1-Rezeptoren auf Chondrozyten und CPCs

Extrazelluläres HMGB1 steuert Prozesse der Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Migration sowie Entzündungsreaktionen und die Angiogenese. Die unterschiedlichen Funktionen sind von der posttranslationalen HMGB1-Modifikation, der Konzentration und der Bindung an spezifische Rezeptoren abhängig (Kang et al. 2014).

HMGB1 ist Ligand für zahlreiche Transmembranrezeptoren (Hori et al. 1995; Yu et al. 2006; van Beijnum et al. 2008; Liu et al. 2009; Pedrazzi et al. 2012; Lee und Park 2013). LOESER und Mitarbeiter identifizierten den RAGE-Rezeptor auf OA-Chondrozyten und zeigte eine Rezeptor-vermittelte Expression von MMP-13 bei HMGB1-Bindung (Loeser et al. 2005). In der Pathogene der Osteoarthritis zeigt das Knorpelgewebe eine gesteigerte Expression von RAGE-Rezeptoren und die Akkumulation von HMGB1 in der EZM (Loeser et al. 2005; Steenvoorden et al. 2006; Terada et al. 2011). Neben dem RAGE-Rezeptor konnten für die Gruppe der TLR-Rezeptoren ähnliche Signalmuster in proinflammatorische und promigratorische Richtung identifiziert werden (van Beijnum et al. 2008; Sakaguchi et al. 2017).

Aktuell ist unbekannt, welche HMGB1-Rezeptoren von CPCs exprimiert werden und welche Signalkaskaden in der Transduktion beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es, durch Fluoreszenz-Immunzytochemie die HMGB1-Rezeptoren RAGE und TLR4 auf CPC531ht nachzuweisen und mit Chondrozyten (CH292ht) zu vergleichen. Auf CPC531ht konnten RAGE und TLR4- Rezeptoren nachgewiesen werden. Bei gleicher Belichtungszeit zeigt sich, dass die TLR4-Signale im Vergleich schwächer ausgeprägt sind. Die Chondrozyten zeigen für beide Rezeptoren ein stärkeres Signal bei gleicher Belichtungszeit als CPCs. Der Nachweis der Rezeptoren gibt einen Hinweis, dass extrazelluläres HMGB1 einen Einfluss auf CPCs hat. Die promigratorische Wirkung von HMGB1 auf CPCs sowie die proinflammatorische Wirkungsweise wurde im weiteren Verlauf untersucht. Vermutlich zeigen Chondrozyten eine stärkere Expression der TLR und RAGE Rezeptoren, was durch zukünftige Untersuchungen quantifiziert werden muss. Aufgrund der komplexen Modifikationsmöglichkeiten der beteiligten Rezeptoren und variablen Co-Proteine in der Signaltransduktion müssen weitere Untersuchungen klären, welche Liganden (HMGB1-Redoxformen) bei welcher Rezeptorkonfiguration welches Signalmuster (proinflammatorisch bzw. promigratorisch) induzieren (Sakaguchi et al. 2017).

4.3 HMGB1-Nachweis nach CPC-*ex-vivo*-Migration in OA-Knorpel

Chondrogene Progenitorzellen im osteoarthritischen Knorpel stellen eine Zellpopulation mit besonderem Migrations- und Regenerationspotenzial dar. Die Entdeckung dieses multipotenten Zelltyps eröffnete neue Forschungsansätze einer stammzellbasierten, regenerativen Osteoarthrosetherapie. CPCs können in verschiedene Zelllinien differenziert werden, wodurch ein zellbasierter Therapieansatz osteoarthritischer Knorpelgewebe besteht. Die Zelldifferenzierung und Migrationskapazität der Zellen ist von verschiedenen Faktoren abhängig (Koelling et al. 2009).

HMGB1 ist aufgrund seiner unterschiedlichen Redoxformen und der heterogenen Verteilung im Knorpelgewebe ein potentiell regulatorisches Protein (Kang et al. 2014). Die immunzytochemischen Untersuchungen dieser Arbeit belegen die CPC531ht Expression von HMGB1 in der *Monolayer*-Zellkultur. Ziel der CPC-*ex-vivo*-Migrationsversuche war es, die HMGB1-Expression der CPCs im osteoarthritischen Milieu zu untersuchen. Insbesondere sollte die Verteilung des Proteins in der Zelle und der EZM dargestellt werden.

Die Auswertung der *in-situ*-Hybridisierung zeigte die Expression von HMGB1-RNA in migrierten CPCs. Aufgrund der Funktion als Kernprotein ist eine konsekutive Bildung von HMGB1 zu erwarten (Travers 2003; Cato et al. 2008; Polanska et al. 2014). Die immunhistochemischen Ergebnisse wiesen starke HMGB1-Signale im Kern und geringere im Zytoplasma der CPCs auf. Extrazelluläre Signale waren vergleichsweise schwach ausgeprägt.

Durch die bildgebenden Untersuchungsmethoden der ISH und der IHC konnte die Verteilung von HMGB1 im OA-*ex-vivo*-Migrationsschnitten aufgezeigt werden. Die migrierten CPCs zeigten stark zellulär konzentrierte Signale. Aufgrund der schwachen extrazellulären Signale erscheint eine aktiv-sekretorische Funktion von HMGB1 aus CPCs im OA-Knorpel eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ziel weiterer Untersuchungen könnte die Analyse der exprimierten HMGB1-Redoxformen sein, welche sich mit den verwendeten Methoden nicht erfassen lassen.

4.4 Migrationswirkung von *fr*-HMGB1 auf CPCs

Die körpereigenen Reparaturmechanismen des osteoarthritischen Knorpels führen zur Bildung fibrokartilaginärer Ersatzgewebe, welche eine geringere Widerstandsfähigkeit aufweisen (Tesche und Miosge 2005; Sandell 2007). Mit der Entdeckung der Chondrogenen Progenitorzellen eröffnete sich ein regenerativer Forschungsschwerpunkt zur Behandlung des OA-Knorpelgewebes. Nach Inhibition der *runx-2* Expression weisen CPCs ein hohes chondrogenes Potenzial auf und können vermehrt *sox-9*, Aggrecan und Kollagen Typ-II bilden (Koelling et al. 2009).

Ziel der Migrationsversuche war es, die Wirkung von *fr*-HMGB1 auf CPCs zu untersuchen. Durch die histologischen Arbeiten der Forschungsgruppe von TERADA wurde eine gesteigerte HMGB1-Akkumulation in tiefen OA-Knorpelschichten beschrieben (Terada et al. 2011). Die IHC Ergebnisse dieser Arbeit konnten ein verstärktes HMGB1-Signal in Gefäßeinsprossungen der Tidemark (*break in tidemark*) zeigen. KOELLING und Mitarbeiter beschrieben diesen Bereich der Knorpel-Knochengrenze als Migrationspforte für CPCs in den OA-Knorpel (Koelling et al. 2009). Abgeleitet aus diesen Erkenntnissen, erwies sich HMGB1 als potentiell promigratorisches Protein, welches einen Einfluss auf die CPC-Migration haben könnte.

Untersuchungen der Arbeitsgruppe von MENG zeigten, dass HMGB1 promigratorischen Einfluss auf *human bone marrow* MSCs hat. In dreistündigen Migrationsversuchen (*BOYDEN-chamber*) wurden drei unterschiedliche HMGB1-Konzentrationen getestet, wobei eine konzentrationsabhängige Migrationssteigerung beschrieben wurde (Meng et al. 2008).

Eine weitere Publikation von SEOL und Kollegen beschreibt die promigratorische Wirkung von HMGB1 an Rinder- und humanen Knorpelimplantaten. Die verwendeten (histologisch gesunden) Explantate wurden einer mechanischen Knorpeldestruktion durch Gewichtseinschläge unterzogen. Dieses Verfahren simulierte eine traumatisch induzierte OA. Die Wissenschaftler beschrieben eine Re-Popularisierung in hypozelluläre Destruktionsbereiche mit „*putative* CPCs“. Nach Auffassung der Arbeitsgruppe von SEOL werden durch die destruktionsbedingte Zellnekrose promigratorische Zellbestandteile freigesetzt, welche das Einwandern von „*putative* CPCs“ fördern (Seol et al. 2012).

Die Arbeitsgruppen von SEOL und MENG verwendeten in den Migrationsexperimenten rekombinantes, humanes HMGB1 ohne die entsprechenden Redoxformen bzw. die post-translationale Proteinmodifikation zu definieren.

Nach ANDERSSON und ANTOINE ist die genaue Einteilung der unterschiedlichen HMGB1-Redoxformen für die entsprechende Funktion und Wirkungsweise von hoher Bedeutung. Extrazelluläres *fr*-HMGB1, welches drei Thiolgruppen aufweist, forciert die Zellmigration, während die oxidierte Form mit Disulfidbrücken (Disulfid-HMGB1) eine proinflammatorische Wirkung zeigt (Venereau et al. 2012; Yang et al. 2012; Andersson et al. 2014; Antoine et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von hochreinem *fr*-HMGB1 auf CPC531ht zeit- und konzentrationsabhängig untersucht. Im *scratch assay* zeigte sich eine zeit- und konzentrationskorrelierte Steigerung der CPC531ht Migration durch *fr*-HMGB1. Nach 12 Stunden Migrationszeit war zwischen den Probegruppen mit 10 und 50 ng/ml HMGB1 kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der migrierten Zellen messbar, jedoch zeigte die Kontrolle eine signifikant geringere CPC-Migration. Nach 48 Stunden war in der Probestruppe mit 10 ng/ml HMGB1 die höchste Zellmigration zu verzeichnen. Nach 72 Stunden konnte zwischen den beiden Probestruppen kein statistisch messbarer Unterschied festgestellt werden. Zur Kontrollgruppe lag zu allen Untersuchungszeitpunkten ein signifikanter Unterschied vor.

In der BOYDEN-*chamber*-Versuchsreihe wurde die CPC-Migration zu drei Zeitpunkten (6, 12 und 24 h) ermittelt. Die verwendeten *fr*-HMGB1 Konzentrationen lagen bei 10, 50 und 100 ng/ml. Alle Probestruppen zeigten zu allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant erhöhte Zellmigration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 12 Stunden Migrationszeit lag in der hochkonzentrierten Probestruppe die größte Zellmigration vor. Dieser Effekt war nach 24 Stunden Versuchszeit statistisch nicht mehr signifikant.

Die Ergebnisse der Migrationsversuche an CPC531ht zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Migrationssteigerung. Der von MENG und Mitarbeitern publizierte dreistündige Migrationsversuch an MSCs weist ähnliche Ergebnisse bezüglich der HMGB1-Konzentrationen auf (Meng et al. 2008).

Zurzeit ist unklar, welche Rezeptoren die Migrationsfunktion initiieren. Die Signalkaskaden der TLR- und RAGE-Rezeptoren sind detailliert erforscht, jedoch besteht in der Literatur ein Dissens bezüglich der Migrationswirkung (Sakaguchi et al. 2017). SEOL und Kollegen beschreiben eine Migrationsinhibition bei der Zugabe von Anti-RAGE-Antikörpern. Die Forschungsgruppe von MENG publizierte Ergebnisse, die keine Inhibition der Zellmigration bei Zugabe von Anti-RAGE-Antikörpern während der HMGB1-Inkubation zeigen (Meng et al. 2008; Seol et al. 2012).

4.5 Stimulation von CPC531ht mit Disulfid-HMGB1 und IL-1 β

Das proinflammatorische Milieu und die katabolen Abbauprozesse des osteoarthritischen Knorpels werden durch zahlreiche Entzündungsmediatoren vermittelt. Die beteiligten zellulären und extrazellulären Prozesse, welche zur erhöhten Expression von MMPs und ADAMTS führen, sind detailliert erforscht (Goldring 2000; Nefla et al. 2016; Lavric et al. 2017).

Durch die Stimulation von CPC531ht mit isoformreinem Disulfid-HMGB1 und IL-1 β wurde untersucht, ob die Zellen ein proinflammatorisches Expressionsmuster aufweisen. Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden mit 15 bzw. 25 ng/ml Disulfid-HMGB1 sowie in Kombination mit 10 ng/ml IL-1 β . Nach Stimulation der CPC531ht erfolgte die Konzentrationsmessung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α im Kulturmedium. Publikationen der Arbeitsgruppe von GARCIA-ARNANDIS beschreiben eine entzündungsfördernde Signalamplifikation durch HMGB1-IL-1 β -Komplexe, sodass die Stimulation isoliert mit HMGB1 und in Kombination mit IL-1 β erfolgte (Garcia-Arnandis et al. 2010). TERADA und Mitarbeiter beschreiben, dass Chondrozyten durch Stimulation mit IL-1 β eine erhöhte HMGB1-Expression aufweisen, sodass ein möglicher Synergieeffekt der beiden Zytokine vermutet werden kann (Terada et al. 2011).

Die einfache Stimulation mit Disulfid-HMGB1 zeigt bei CPCs keine erhöhte Expression von IL-6. IL-1 β in Kombination mit HMGB1 führte zu einer erhöhten IL-6 Konzentration im Medium. Die isolierte Stimulation mit IL-1 β und die Kombination beider Zytokine zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Eine Stimulation von CPCs mit Disulfid-HMGB1 hat folglich keinen Einfluss auf die Bildung von IL-6.

Die TNF- α Konzentrationen waren nach Stimulation mit HMGB1 sowie in Kombination mit IL-1 β nicht erhöht. Nur die isolierte Stimulation mit IL-1 β wies eine statistisch signifikant erhöhte TNF- α Konzentration auf.

Zahlreiche Studien an Zellkulturen, histologische Untersuchungen und am Tiermodell zeigen einen katabolen und proinflammatorischen Einfluss von HMGB1 und IL-1 β im OA-Krankheitsverlauf (Goldring 2000; Kokkola et al. 2002; Pullerits et al. 2003; Palmblad et al. 2007).

Durch die Stimulationsexperimente dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CPCs die Sekretion von TNF- α und IL-6 nach Disulfid-HMGB1-Stimulation nicht steigern.

Damit unterscheiden sich CPCs grundlegend von Chondrozyten, Osteozyten und gewebe-spezifischen Makrophagen (Osteoklasten, Chondroklasten, Typ-A-Synovioyztzen). Die Stimulationsexperimente stehen im Einklang mit den Migrationsuntersuchungen von Joos und Kollegen, welche eine Inhibition der CPC-Migration nach TNF- α und IL-1 β -Stimulation beschrieben (Joos et al. 2013). Es erscheint biologisch sinnvoll, dass CPCs bei Stimulation mit Disulfid-HMGB1 keine Zytokine exprimieren, welche die Migrationsfunktion hemmen und die Gewebedestruktion forcieren. Aktuelle Sekretomanalysen von CPCs zeigen eine verminderte Expression von katabolen Proteinen sowie eine erhöhte Bildung von Proteinen mit regenerativen Potential (Batschkus et al. 2017).

5 Zusammenfassung

Die Osteoarthritis ist die häufigste muskuloskeletale Erkrankung des Menschen. Zum Millenniumwechsel rief die WHO das „Jahrzehnt der Knochen- und Gelenkerkrankungen“ aus, wodurch die Notwendigkeit der Erforschung moderner Therapiestrategien unterstrichen wurde. Nach intensiver Grundlagenforschung ist die Ätiologie und Pathogenese dieser Volkskrankheit gut erfasst. Der osteoarthritische Prozess im Gelenkknorpel wird von der Bildung fibrokartilaginärer Ersatzgewebe begleitet, welche eine geringere biomechanische Funktionalität aufweisen. Der degenerative Prozess der Osteoarthritis wird durch die Freisetzung zahlreicher kataboler und proinflammatorischer Zytokine begleitet.

Ziel aktueller Forschung sind zellbasierte, regenerative Therapieansätze, welche zu einer *restitutio ad integrum* defekter Gelenkstrukturen führen. Mit der Entdeckung der chondrogenen Progenitorzellen (CPC) wurde ein wichtiger Regenerationsansatz eröffnet, da diese Zellen eine körpereigene Reaktion auf osteoarthritische Prozesse darstellen. CPCs sind multipotent und können durch die Regulation der Gene *runx2* und *sox9* Kollagene der EZM bilden. Durch Migration kann diese besondere Zellpopulation defekte Knorpelbereiche bevölkern.

Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung und die Wirkungsweise des Proteins HMGB1 (*high mobility group box chromosomal protein 1*) im OA-Knorpel und in CPCs zu untersuchen. HMGB1 weist verschiedene posttranslationale Modifikationen auf, wodurch vielseitige intra- und extrazelluläre Funktionen beschrieben wurden. Neben der Funktion als Kernprotein zeigt HMGB1 promigratorische und proinflammatorische Eigenschaften. Die Immunhistochemie zeigte eine Akkumulation von HMGB1 im OA-Knorpel im Vergleich zu gesunden Proben. Der OA-Knorpel zeigte verstärkte HMGB1-Signale an der Knorpel-Knochen-Grenze, wo Gefäßneubildungen darstellbar waren. Diese sog. *break in tidemark* wird als Migrationspforte von CPCs in den OA-Knorpel angesehen.

In der Immunzytochemie konnte HMGB1 in Chondrozyten und in CPCs nachgewiesen werden. CPCs zeigten nur schwache intrazelluläre HMGB1-Signale, die kernbegrenzt waren.

Durch *GFP-CPC-ex-vivo*-Migrationsversuche wurde die HMGB1-Bildung im OA-Knorpel durch *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht. In OA-Knorpel migrierte CPCs wiesen ein stark zellulär begrenztes HMGB1-Signal auf. Es lagen keine mikroskopischen Hinweise auf eine aktive HMGB1-Sektion der CPCs in die EZM vor.

Mithilfe des Western Blots wurde die HMGB1-Konzentration in OA-Chondrozyten, gesunden Chondrozyten, CPCs und MSCs verglichen. OA-Chondrozyten zeigten dabei ein signifikant erhöhtes HMGB1-Signal, wobei kein signifikanter Unterschied in der HMGB1-Expression zwischen gesunden Chondrozyten und CPCs vorlag.

Durch Immunzytochemie konnten auf Chondrozyten und CPCs die Oberflächenrezeptoren RAGE und TLR-4 nachgewiesen werden. Die Expression dieser Rezeptoren ließ eine extrazelluläre Wirkungsweise von HMGB1 auf diese Zellen erwarten.

In der *BOYDEN-chamber* und im *scratch assay* wurde die Migrationswirkung von hochreinem *fr*-HMGB1 auf CPCs belegt. Es bestand eine zeit- und konzentrationsabhängige Migrationssteigerung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bestimmte HMGB1-Redoxformen einen wichtigen Einfluss auf die CPC-Migration in den OA-Knorpel haben.

Weiterhin wurde die proinflammatorische Wirkung von Disulfid-HMGB1 auf CPCs im Stimulationsexperiment untersucht. Unter Stimulation von Disulfid-HMGB1, auch in Kombination mit IL-1 β , zeigten CPCs keine gesteigerte Expression von TNF- α und IL-6.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HMGB1 als konsekutiv exprimiertes Kernprotein in Chondrozyten wie auch in CPCs nachgewiesen werden kann. In der Funktion eines extrazellulären Zytokins wirkt *fr*-HMGB1 auf CPCs promigratorisch. Eine proinflammatorische Wirkung Disulfid-HMGB1 wurde an CPCs nicht nachgewiesen.

6 Literaturverzeichnis

- Ackermann B, Steinmeyer J (2005): Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 13, 906–914
- Adjaye J, Huntriss J, Herwig R, BenKahla A, Brink TC, Wierling C, Hultschig C, Groth D, Yaspo ML, Picton HM (2005): Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells* 23, 1514–1525
- Aigner T, Stove J (2003): Collagens-major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1569–1593
- Altman RD (1995): The classification of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 43, 42–43
- Amin AR, Islam AB (2014): Genomic analysis and differential expression of HMG and S100A family in human arthritis: upregulated expression of chemokines, IL-8 and nitric oxide by HMGB1. *DNA Cell Biol* 33, 550–565
- Andersson U, Antoine DJ, Tracey KJ (2014): The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. *J Intern Med* 276, 420–424
- Antoine DJ, Harris HE, Andersson U, Tracey KJ, Bianchi ME (2014): A systematic nomenclature for the redox states of high mobility group box (HMGB) proteins. *Mol Med* 20, 135–137
- Archer CW, Francis-West P (2003): The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 401–404
- Attur MG, Dave M, Cipolletta C, Kang P, Goldring MB, Patel IR, Abramson SB, Amin AR (2000): Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor. Potential for pharmacological intervention. *J Biol Chem* 275, 40307–40315
- Batschkus S, Atanassov I, Lenz C, Meyer-Marcotty P, Cingoz G, Kirschneck C, Urlaub H, Miosge N (2017): Mapping the secretome of human chondrogenic progenitor cells with mass spectrometry. *Ann Anat* 212, 4–10
- Benedek TG (2006): A history of the understanding of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 203–209
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemie*. 7. Auflage; Springer Spektrum, Berlin 2014
- Bianchi ME, Agresti A (2005): HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 15, 496–506

- Bianchi ME, Falciola L, Ferrari S, Lilley DM (1992): The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes), both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J* 11, 1055–1063
- Bock HC, Michaeli P, Bode C, Schultz W, Kresse H, Herken R, Miosge N (2001): The small proteoglycans decorin and biglycan in human articular cartilage of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 654–663
- Bonaldi T, Langst G, Strohner R, Becker PB, Bianchi ME (2002): The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *EMBO J* 21, 6865–6873
- Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME (2003): Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 22, 5551–5560
- Boyden S (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453–466
- Brinckmann J: Collagens at a Glance. In: Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK (Hrsg.): *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*. Springer, Berlin 2005, 1–6
- Brown E, Goodwin GH, Mayes EL, Hastings JR, Johns EW (1980): Heterogeneity of proteins resembling high-mobility-group protein HMG-T in trout testes nuclei. *Biochem J* 191, 661–664
- Bruckner P, van der Rest M (1994): Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* 28, 378–384
- Buckwalter JA, Rosenberg LC (1988): Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. *Electron Microsc Rev* 1, 87–112
- Bullough PG, Jagannath A (1983): The morphology of the calcification front in articular cartilage. Its significance in joint function. *J Bone Jt Surg Br* 65, 72–78
- Bustin M (2001): Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 152–153
- Catena R, Escoffier E, Caron C, Khochbin S, Martianov I, Davidson I (2009): HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol Reprod* 80, 358–366
- Cato L, Stott K, Watson M, Thomas JO (2008): The interaction of HMGB1 and linker histones occurs through their acidic and basic tails. *J Mol Biol* 384, 1262–1272
- Cleynen I, Van de Ven WJ (2008): The HMGA proteins: a myriad of functions. *Int J Oncol* 32, 289–305

- Coggon D, Reading I, Croft P, McLaren M, Barrett D, Cooper C (2001): Knee osteoarthritis and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25, 622–627
- Cohen NP, Foster RJ, Mow VC (1998): Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther* 28, 203–215
- Crippa MP, Nickol JM, Bustin M (1991): Developmental changes in the expression of high mobility group chromosomal proteins. *J Biol Chem* 266, 2712–2714
- Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME (2001): The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 152, 1197–1206
- Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS (1995): Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 53, 924–929
- Ding HF, Bustin M, Hansen U (1997): Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14. *Mol Cell Biol* 17, 5843–5855
- Drenckhahn D, Hunziker EB: Knorpelgewebe. In: Drenckhahn D (Hrsg.): *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1; 17. Auflage; Urban und Fischer/Elsevier, München 2008, 128-133
- Dudhia J (2005): Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* 62, 2241–2256
- Ely D, Underwood A, Dunphy G, Boehme S, Turner M, Milsted A (2010): Review of the Y chromosome, Sry and hypertension. *Steroids* 75, 747–753
- Engel J, Bächinger HP: Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. In: Brinckmann J, Notbohm H, Müller PK (Hrsg.): *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*. Springer, Berlin 2005, 7–34
- Eyre DR (1991): The collagens of articular cartilage. *Semin Arthritis Rheum* 21, 2–11
- Eyre DR (2002): Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 4, 30–35
- Falciola L, Spada F, Calogero S, Langst G, Voit R, Grummt I, Bianchi ME (1997): High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells. *J Cell Biol* 137, 19–26
- Fedele M, Fusco A (2010): HMGA and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1799, 48–54
- Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, Kington RS, Lane NE, Nevitt MC, Zhang Y, et al. (2000): Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann Intern Med* 133, 635–646

- Fuchs J, Rabenberg M, Scheidt-Nave C (2013): Prävalenz ausgewählter muskulo-skelettaler Erkrankungen. Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). Bundesgesundheitsbl 56 (5-6), 678–86
- Furusawa T, Cherukuri S (2010): Developmental function of HMGN proteins. Biochim Biophys Acta 1799, 69–73
- Furusawa T, Lim JH, Catez F, Birger Y, Mackem S, Bustin M (2006): Down-regulation of nucleosomal binding protein HMGN1 expression during embryogenesis modulates Sox9 expression in chondrocytes. Mol Cell Biol 26, 592–604
- Garcia-Arnandis I, Guillen MI, Gomar F, Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Alcaraz MJ (2010): High mobility group box 1 potentiates the pro-inflammatory effects of interleukin-1beta in osteoarthritic synoviocytes. Arthritis Res Ther 12, R165
- Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003): Collagens- structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 55, 1531–1546
- Giese K, Grosschedl R (1993): LEF-1 contains an activation domain that stimulates transcription only in a specific context of factor-binding sites. EMBO J 12, 4667–4676
- Goldring MB (2000): The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arthritis Rheum 43, 1916–1926
- Goldring MB: Cytokines, Growth Factors and Bone-Derived Factors in Cartilage. In: Bronner F, Farach-Carson MC (Hrsg.): Bone and Osteoarthritis- Topics in Bone Biology, Volume 4; Springer, London 2007, 41–63
- Goldring MB (2012): Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Ther Adv Musculoskelet Dis 4, 269–285
- Goldring MB, Marcu KB (2009): Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther 11, 224
- Goodwin GH, Johns EW (1973): Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. Eur J Biochem 40, 215–219
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW (1973): A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. Eur J Biochem 38, 14–19
- Goodwin GH, Brown E, Walker JM, Johns EW (1980): The isolation of three new high mobility group nuclear proteins. Biochim Biophys Acta 623, 329–338
- Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA (2006): The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. Ann N Acad Sci 1068, 498–512

- Hardingham TE, Fosang AJ (1992): Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6, 861–870
- Hauser K: Extrazelluläre Matrix. In: Rasso J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (Hrsg.): *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2016, 403–415
- Heinegard D, Saxne T (2011): The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 50–56
- Heinola T, Kouri VP, Clarijs P, Ciferska H, Sukura A, Salo J, Konttinen YT (2010): High mobility group box-1 (HMGB-1) in osteoarthritic cartilage. *Clin Exp Rheumatol* 28, 511–518
- Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D (1995): The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270, 25752–25761
- Houard X, Goldring MB, Berenbaum F (2013): Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 15, 375
- Huber M, Trattng S, Lintner F (2000): Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35, 573–580
- Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H (2002): Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res* 62, 4805–4811
- Iozzo RV, Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD (1994): The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 302, 625–639
- Jiang L, Rong J, Wang Y, Hu F, Bao C, Li X, Zhao Y (2011): The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 78, 150–155
- Joos H, Wildner A, Hogrefe C, Reichel H, Brenner RE (2013): Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage. *Arthritis Res Ther* 15, R119
- Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, Loze MT, Tang D (2010): HMGB1: a novel Beclin 1-binding protein active in autophagy. *Autophagy* 6, 1209–1211
- Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, et al. (2014): HMGB1 in health and disease. *Mol Asp Med* 40, 1–116

- Kassner A, Hansen U, Miosge N, Reinhardt DP, Aigner T, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P, Grassel S (2003): Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol* 22, 131–143
- Knudson CB, Knudson W (2001): Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 12, 69–78
- Koelling S, Miosge N (2009): Stem cell therapy for cartilage regeneration in osteoarthritis. *Expert Opin Biol Ther* 9, 1399–1405
- Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* 4, 324–335
- Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, Palmblad K, Li J, Wang H, Ulloa L, Yang H, Yan XJ, Furie R (2002): High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 46, 2598–2603
- Kuehl L, Salmond B, Tran L (1984): Concentrations of high-mobility-group proteins in the nucleus and cytoplasm of several rat tissues. *J Cell Biol* 99, 648–654
- Kuettner KE (1992): Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 25, 155–163
- Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK (1982): Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol* 93, 743–750
- Kullmann W (Hrsg.): Aristoteles: Werke in deutscher Übersetzung. Band 17/1: Zoologische Schriften 2: Über die Teile der Lebewesen. Akademie-Verlag, Berlin 2007, 49
- Lajeunesse D, Reboul P: The Role of Bone in the Development of Osteoarthritis. In: Bronner F, Farach-Carson MC (Hrsg.): Bone and Osteoarthritis- Topics in Bone Biology, Volume 4; Springer, London 2007, 19–39
- Lange SS, Vasquez KM (2009): HMGB1: the jack-of-all-trades protein is a master DNA repair mechanic. *Mol Carcinog* 48, 571–580
- Lange SS, Reddy MC, Vasquez KM (2009): Human HMGB1 directly facilitates interactions between nucleotide excision repair proteins on triplex-directed psoralen interstrand crosslinks. *DNA Repair Amst* 8, 865–872
- Larsen MR, Trelle MB, Thingholm TE, Jensen ON (2006): Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques* 40, 790–798
- Lavric M, Miranda-Garcia MA, Holzinger D, Foell D, Wittkowski H (2017): Alarmins firing arthritis: Helpful diagnostic tools and promising therapeutic targets. *Jt Bone Spine Rev Rhum* 84, 401–410

- Lee EJ, Park JH (2013): Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases. *Genomics Inf* 11, 224–229
- Liang CC, Park AY, Guan JL (2007): In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2, 329–333
- Liau SS, Rocha F, Matros E, Redston M, Whang E (2008): High mobility group AT-hook 1 (HMGA1) is an independent prognostic factor and novel therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 113, 302–314
- Lin F, Zhang W, Xue D, Zhu T, Li J, Chen E, Yao X, Pan Z (2016): Signaling pathways involved in the effects of HMGB1 on mesenchymal stem cell migration and osteoblastic differentiation. *Int J Mol Med* 37, 789–797
- Liu A, Fang H, Dirsch O, Jin H, Dahmen U (2012): Oxidation of HMGB1 causes attenuation of its pro-inflammatory activity and occurs during liver ischemia and reperfusion. *PLoS One* 7, e35379
- Liu Y, Chen GY, Zheng P (2009): CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. *Trends Immunol* 30, 557–561
- Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, Chen H, Cole A, Im H-J, Bursch LS, Yan SD (2005): Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52, 2376–2385
- Lohmander S (1988): Proteoglycans of joint cartilage. Structure, function, turnover and role as markers of joint disease. *Baillieres Clin Rheumatol* 2, 37–62
- Lund T, Holtlund J, Fredriksen M, Laland SG (1983): On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett* 152, 163–167
- Lund T, Holtlund J, Laland SG (1985): On the phosphorylation of low molecular mass HMG (high mobility group) proteins in Ehrlich ascites cells. *FEBS Lett* 180, 275–279
- Maher JF, Nathans D (1996): Multivalent DNA-binding properties of the HMG-1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6716–6720
- Manninen P, Riihimaki H, Heliovaara M, Makela P (1996): Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20, 595–597
- Maroudas A, Bayliss MT, Venn MF (1980): Further studies on the composition of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 39, 514–523
- Matsumoto K, Kamiya N, Suwan K, Atsumi F, Shimizu K, Shinomura T, Yamada Y, Kimata K, Watanabe H (2006): Identification and characterization of versican/PG-M aggregates in cartilage. *J Biol Chem* 281, 18257–18263

- Meng E, Guo Z, Wang H, Jin J, Wang J, Wang H, Wu C, Wang L (2008): High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway. *Stem Cells Dev* 17, 805–813
- Michael JW, Schluter-Brust KU, Eysel P (2010): The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 107, 152–162
- Miosge N, Flachsbarth K, Goetz W, Schultz W, Kresse H, Herken R (1994): Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochem J* 26, 939–945
- Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R (2004): Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 122, 229–236
- Moos V, Fickert S, Muller B, Weber U, Sieper J (1999): Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol* 26, 870–879
- Muir H (1995): The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 17, 1039–1048
- Murphy G, Nagase H (2008): Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pr Rheumatol* 4, 128–135
- Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C (2016): The danger from within: alarmins in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12, 669–683
- Nevitt MC, Xu L, Zhang Y, Lui LY, Yu W, Lane NE, Qin M, Hochberg MC, Cummings SR, Felson DT (2002): Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* 46, 1773–1779
- O'Reilly S, Doherty M: Clinical features of osteoarthritis and standard approaches to the diagnosis. In: Brandt KD, Doherty M, Lohmander S (Hrsg.): *Osteoarthritis*, Second edition. 2. Auflage; Oxford University Press, Oxford 2003, 195–227
- Palmblad K, Sundberg E, Diez M, Soderling R, Aveberger A-C, Andersson U, Harris HE (2007): Morphological characterization of intra-articular HMGB1 expression during the course of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 9, R35
- Palumbo R, Bianchi ME (2004): High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochem Pharmacol* 68, 1165–1170
- Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME (2004): Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 164, 441–449

- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E (2004): Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279, 7370–7377
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, et al. (2006): High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C917-924
- Pash JM, Bhorjee JS, Patterson BM, Bustin M (1990): Persistence of chromosomal proteins HMG-14/-17 in myotubes following differentiation-dependent reduction of HMG mRNA. *J Biol Chem* 265, 4197–4199
- Pedrazzi M, Averna M, Sparatore B, Patrone M, Salamino F, Marcoli M, Maura G, Cervetto C, Frattaroli D, Pontremoli S, et al. (2012): Potentiation of NMDA receptor-dependent cell responses by extracellular high mobility group box 1 protein. *PLoS One* 7, e44518
- Polanska E, Pospisilova S, Stros M (2014): Binding of histone H1 to DNA is differentially modulated by redox state of HMGB1. *PloS One* 9, e89070
- Poole A, Guilak F, Abramson SB : Etiopathogenesis of Osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, Hochberg MC (Hrsg.): Osteoarthritis- Diagnosis and Medical/Surgical Management. 4. Auflage; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007, 27–49
- Poole CA (1997): Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 191, 1–13
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1984): Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat* 138, 113–138
- Poole CA, Flint MH, Beaumont BW (1987): Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* 5, 509–522
- Poole CA, Ayad S, Schofield JR (1988): Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J Cell Sci* 90, 635–643
- Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR (2005): The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386, 15–27
- Prasad R, Liu Y, Deterding LJ, Poltoratsky VP, Kedar PS, Horton JK, Kanno S, Asagoshi K, Hou EW, Khodyreva SN, et al. (2007): HMGB1 is a cofactor in mammalian base excision repair. *Mol Cell* 27, 829–841
- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006): Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 13–29

- Pullerits R, Jonsson IM, Verdrengh M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, Tarkowski A (2003): High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 1693–1700
- Rabenstein DL (2002): Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 19, 312–331
- Reeves R (2000): Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. *Env Health Perspect* 108 Suppl 5, 803–809
- Reginato AM, Olsen BR (2002): The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res* 4, 337–345
- Roach HI, Tilley S: The Pathogenesis of Osteoarthritis. In: Bronner F, Farach-Carson MC (Hrsg.): *Bone and Osteoarthritis- Topics in Bone Biology Volume 4*; Springer, London 2007, 1–18
- Roughley PJ, Lee ER (1994): Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 28, 385–397
- Sakaguchi M, Kinoshita R, Putranto EW, Ruma IMW, Sumardika IW, Youyi C, Tomonobu N, Yamamoto K-I, Murata H (2017): Signal Diversity of Receptor for Advanced Glycation End Products. *Acta Med Okayama* 71, 459–465
- Sandell LJ (2007): Modern molecular analysis of a traditional disease: progression in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56, 2474–2477
- Sandell LJ, Aigner T (2001): Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3, 107–113
- Sellam J, Berenbaum F (2010): The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 6, 625–635
- Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, Walter MW, Lehman AD, Ding L, Buckwalter JA, et al. (2012): Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum* 64, 3626–3637
- Sharma L, Kapoor D: Epidemiology of Osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, Hochberg MC (Hrsg.): *Osteoarthritis- Diagnosis and Medical/Surgical Management*. 4. Auflage; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007, 3–26
- Shepherd DE, Seedhom BB (1999): Thickness of human articular cartilage in joints of the lower limb. *Ann Rheum Dis* 58, 27–34
- Steenvoorden MMC, Huizinga TWJ, Verzijl N, Bank RA, Runday HK, Luning HAF, Lafeber FPJG, Toes REM, DeGroot J (2006): Activation of receptor for advanced glycation end products in osteoarthritis leads to increased stimulation of chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 54, 253–263

- Stros M, Stokrova J, Thomas JO (1994): DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 22, 1044–1051
- Tang D, Kang R, Cheh CW, Livesey KM, Liang X, Schapiro NE, Benschop R, Sparvero LJ, Amoscato AA, Tracey KJ, et al. (2010): HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* 29, 5299–5310
- Terada C, Yoshida A, Nasu Y, Mori S, Tomono Y, Tanaka M, Takahashi HK, Nishibori M, Ozaki T, Nishida K (2011): Gene expression and localization of high-mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 65, 369–377
- Tesche F, Miosge N (2005): New aspects of the pathogenesis of osteoarthritis: the role of fibroblast-like chondrocytes in late stages of the disease. *Histol Histopathol* 20, 329–337
- Tetlow LC, Adlam DJ, Woolley DE (2001): Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 44, 585–594
- Thomas JO, Travers AA (2001): HMG1 and 2, and related „architectural“ DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 167–174
- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, et al. (2007): Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 8, 487–496
- Travers AA (2003): Priming the nucleosome: a role for HMGB proteins? *EMBO Rep* 4, 131–136
- Trippel SB (1990): Articular cartilage research. *Curr Opin Rheumatol* 2, 777–782
- Ueda T, Yoshida M (2010): HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* 1799, 114–118
- Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, Bianchi ME, Kirschning C, Wagner H, Manfredi AA (2008): Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 205, 3007–3018
- van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW (2008): Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 11, 91–99
- Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, Liu J, Antonelli A, Preti A, Raeli L (2012): Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* 209, 1519–1528

- Vrezas I, Elsner G, Bolm-Audorff U, Abolmaali N, Seidler A (2010): Case-control study of knee osteoarthritis and lifestyle factors considering their interaction with physical workload. *Int Arch Occup Env Health* 83, 291–300
- Wachsmuth L, Soder S, Fan Z, Finger F, Aigner T (2006): Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol Histopathol* 21, 477–485
- Wegner M (1999): From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1409–1420
- Welsch U, Deller T, Kummer W: *Lehrbuch Histologie: mit 49 Tabellen*. 4. Auflage; Elsevier, München 2014
- Wong M, Wuethrich P, Eggli P, Hunziker E (1996): Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res* 14, 424–432
- Woolf AD, Pfleger B (2003): Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81, 646–656
- Wu X, Mi Y, Yang H, Hu A, Zhang Q, Shang C (2013): The activation of HMGB1 as a progression factor on inflammation response in normal human bronchial epithelial cells through RAGE/JNK/NF-kappaB pathway. *Mol Cell Biochem* 380, 249–257
- Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, Nakasato M, Lu Y, Hangai S, Koshiba R, et al. (2009): HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 462, 99–103
- Yang H, Lundback P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, Al-Abed Y, Andersson U, Tracey KJ, Antoine DJ (2012): Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med* 18, 250–259
- Yang L, Xie M, Yang M, Yu Y, Zhu S, Hou W, Kang R, Lotze MT, Billiar TR, Wang H, et al. (2014): PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nat Commun* 5, 4436
- Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Guilak F (2006): Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 889–897
- Youn JH, Shin JS (2006): Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 177, 7889–7897
- Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS (2008): High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* 180, 5067–5074

Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H (2006): HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 26, 174–179

Zelenski NA, Leddy HA, Sanchez-Adams J, Zhang J, Bonaldo P, Liedtke W, Guilak F (2015): Type VI Collagen Regulates Pericellular Matrix Properties, Chondrocyte Swelling, and Mechanotransduction in Mouse Articular Cartilage. *Arthritis Rheumatol* 67, 1286–1294

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation. Durch die uneingeschränkte Unterstützung und anregende Diskussionen habe ich Freude am wissenschaftlichen Arbeiten gefunden.

Weiterer Dank gilt Christa Bode, Andrea Bernhard sowie Dr. Boris Schminke, Dr. Hayat Muhammad und Dr. Gökhan Cingöz für die exzellente Einarbeitung in die Labormethoden und für die zahlreichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und kritischen Anmerkungen in der experimentellen Phase der Arbeit. Ich möchte mich für das gute Arbeitsklima im Labor und den konstruktiven Gedankenaustausch bedanken.

Besonderes möchte ich an dieser Stelle Dr. Gunar Wagner danken, der mich in die „Welt der HMGB-Proteine“ einführte und letztendlich die Grundsteine für diese Promotionsarbeit legte. Gerne erinnere ich mich an die gemeinsamen Tage im Labor.